

Přednáška I

Imunitní systém (přehled základních funkcí)

Základní funkce imunitního systému: rozlišování mezi *cizím* a *vlastním* a eliminace *cizího*.

Cíl: zachování integrity organismu.

Obrana proti infekci.

Imunitní dohled (likvidace vlastních degradačních produktů, nádorových buněk atd).

HISTORIE

Immunis - osvobozený od(prvotní význam: rezistence k infekci)

Stará Čína, Turecko - *variolace* (inokulace obsahu puchýřků osob s lehkým průběhem neštovic)

Edward Jenner (1749-1823)

Infekce kravskými neštovicemi - rezistence k pravým neštovicím (variola)

1796 - první očkování kravskými neštovicemi - *vaksinace* (vacca = kráva, název zavedený později Pasteurem).

Louis Pasteur (1822-1895)

Vaksinace atenuovanými kmeny bakterií (*Pasteurella aviseptica* - původce cholery drůbeže).

1881 Pasteur vakcinoval ovce bacily antraxu oslabenými teplem a pak je infikoval virulentní kulturou *Bacillus anthracis*. Zvířata byla imunní.

1885 Pasteur zachránil chlapce pokousaného vzteklým psem očkováním inaktivovaným virem vztekliny.

Von Behring a Kitasato (1890): přenos imunity k záškrtu sérem (objev humorální imunity).

Označení sérových komponent (protilátek): antitoxiny, precipitiny, bakteriolyziny, aglutininy.

Humorální teorie imunity.

Jules Bordet (1870-1961): bakteriolyza a hemolýza vyžaduje termostabilní senzitivátor a termolabilní alexin (komplement).

Oponizace - zesílení fagocytózy mikrobů působením imunního séra.

Paul Ehrlich (1854-1915): teorie postranních řetězců. Buňky produkující protilátku (PI) mají na svém povrchu řetězce, které reagují s antigenem (Ag). Vazba Ag vyvolá další produkci a uvolňování těchto řetězců.

Selekční teorie tvorby protilátek.

Reakce Ab- Ag: teorie zámku a klíče.

Ilja Mečnikov (1845-1916)

Objevil a pojmenoval fagocytózu bakterií leukocyty. Fagocytóza byla zvýšena u uzdravených či vakcinovaných jedinců.

Buněčná teorie imunity.

Některé disciplíny v rámci imunologie: imunopatologie

imunogenetika

nádorová imunologie

transplantační imunologie

imunochemie.

PŘEHLED IMUNITNÍHO SYSTÉMU

Přirozená (nespecifická) imunita

Čtyři typy bariér: anatomická

fyziologická

fagocytární a endocytická

zánět

Anatomické bariéry: kůže a povrchy mukózních membrán. Fyzikální a anatomické překážky, kyselé pH (kyselina mléčná, mastné kyseliny).

Řasinkové buňky - aktivní odstraňování mikrobů.

Sliny, slzy, mukózní sekrety (antivirové a antibakteriální proteiny).

Fyziologické bariéry: teplota, pH, tenze kyslíku, rozpustné faktory. Lysozym (mukózní sekrety) - štěpí peptidoglykan bakteriální stěny.

Pattern recognition receptors (PRR)

Umožňují primární detekci invadujících patogenů. Jsou schopny perfektně rozpoznat vlastní a cizí. Vzory, které rozpoznávají se označují jako PAMPs – pathogen associated molecular patterns. Mezi PRR patří Toll-like receptors (TLR), Nucleotide oligomerisation receptors (NLR), C-type lectin receptors (CLR – potřebují vápník pro vazbu ligandu)) a RIG-1 like

receptors (retinoic acid-inducible gene-I-like receptors, RLR) . TLR 1,2,4,5a 6 jsou na povrchu buněk a rozpoznávají triacyl lipopeptidy (TLR 1+2), LPS (TLR4), flagellin (TLR5) nebo glykofosfatidyl inositolovou (GPI) kotvu, zymosan, lipoteichovou kyselinu (LTA), diacyl lipopeptidy (TLR2+TLR6). TLR 7 a 8 jsou v cytosolu a rozpoznávají ssRNA, TLR9 je též v cytosolu a reaguje s nemetylovými CpG ostrovy na DNA. NLR jsou v cytosolu a rozpoznávají různé motivy peptidoglykanu. CLR vážou cukry kalcium-dependentním mechanismem. Cytosolické RLR rozpoznávají dvouvláknovou RNA. Přes TLR jsou aktivovány MAP kinázová dráha, NFκB dráha a IRF (interferon regulatory factor) dráha.

Interferony - proteiny produkované buňkami infikovanými virem - indukce antivirového stavu.

Komplement - skupina sérových proteinů, které mohou být aktivovány specifickými i nespecifickými imunologickými mechanismy. Vytvářejí kaskádu vedoucí k lýze patogenních mikroorganismů.

NK buňky (přirození zabíječi)

Byly objeveny na základě schopnosti zabíjet nádorové buňky. Fungují jako most mezi přirozenou a získanou imunitou. Rozpoznávají stresované nebo transformované buňky.

Endocytické a fagocytické bariéry:

Endocytóza – obecný termín pro internalizaci materiálu z okolí buňky

Pinocytóza- buňka pohlcuje tekutinu spolu s molekulami v ní obsaženými

Receptory mediovaná endocytóza – extracelulární molekuly jsou internalizovány po vazbě na buněčné receptory. Endocytické vezikuly fúzí v endozómy. Zde se v kyselém pH uvolňují receptory, které recirkulují. Endozómy splývají s primárními lysozomy na sekundární lysozomy, kde jsou cizorodé molekuly štěpeny proteázami, nukleázami, lipázami a dalšími hydrolázami.

Fagocytóza - ingesce větších partikul včetně mikrobů. Částice jsou pohlcovány do fagozómů, které fúzí s lysozomy. Zde jsou degradovány podobně jako v procesu endocytózy. Fagocytují jen specializované buňky: monocyty, makrofágy, polymorfonukleáry.

Bariéry spojené se zánětlivou reakcí:

Zánět - poškození spojené s proniknutím patogenních mikroorganismů.

- zvýšení krevního toku (naplnění kapilár, erytém, lokální zvýšení teploty)
- zvýšení kapilární permeability (akumulace exudátu, otok)
- migrace fagocytujících buněk do místa zánětu.

Fagocyty adherují ke stěnám kapilár, pronikají mezi endotelovými buňkami do tkání (diapedesa) a migrují v tkáni do místa zánětu (chemotaxe).

Proteiny akutní fáze - chemotaktické mediátory.

C-reaktivní protein - váže se na C komponentu buněčné stěny bakterií a hub a váže komplement.

Získaná imunita

Základní vlastnosti: specifita, diversita, paměť a rozpoznávání cizího a vlastního.

Specifita - rozpoznávání nejjemnějších rozdílů mezi antigeny (jedna AK záměna).

Diverzita - schopnost vytvořit obrovské množství struktur rozpoznávajících biliony různých antigenů.

Imunologická paměť - opakované setkání s Ag indukuje vyšší stav imunitní reaktivity. Existuje celoživotní imunita proti některým patogenům.

Rozlišování cizího a vlastního - imunitní systém reaguje v normálním případě pouze proti cizím antigenům.

Systémy přirozené a získané imunity úzce spolupracují.

Buňky imunitního systému:

Lymfocyty - vznikají při hematopoéze v kostní dřeni, cirkulují v krvi a osídlují lymfatické orgány.

Antigen prezentující buňky - makrofágy, dendritické buňky.

B lymfocyty

Dozrávají v kostní dřeni, nesou protilátkovou molekulu jako receptor pro Ag. Protilátková molekula má 2 lehké a 2 těžké polypeptidové řetězce spojené S-S můstky. Na N-terminálním konci vytvářejí těžké a lehké řetězce vazebné místo pro antigen. Po vazbě Ag B buňky proliferují a potomstvo se diferencuje na *paměťové* a *plazmatické buňky* produkující protilátky. Plazmatické buňky už nemají imunoglobulinové receptory. Jedna plazmatická buňka sekretuje 2.000 protilátkových molekul za sekundu.

T lymfocyty

Vznikají z hemopoetických kmenových buněk v kostní dřeni, ale zrají v thymu. Během zrání exprimují membránový receptor pro antigen - heterodimer ze dvou proteinových řetězců (α, β nebo γ, δ). Na rozdíl od B lymfocytů rozpoznávají T lymfocyty Ag v komplexu

a antigeny hlavního histokompatibilního komplexu (MHC). Rozpoznání vede k proliferaci a diferenciaci na *paměťové* a *efektorové* T buňky.

Existují dvě základní subpopulace T lymfocytů: cytotoxické (Tc) CD8+
pomocné (Th) CD4+.

Tc lymfocyty rozpoznávají Ag v kontextu s MHC molekulami a pod vlivem lymfokínů produkovaných Th buňkami diferencují na cytotoxické T lymfocyty (CTL). CTL téměř neprodukuje lymfokíny a likviduje virem infikované, nádorové nebo transplantované buňky.

Buňky prezentující antigen (APC)

APC zahrnují makrofágy, dendritické buňky a B lymfocyty. Tyto buňky internalizují Ag endo- nebo fagocytózou a reexprimují jeho části společně s MHC molekulami na své membráně. Th buňky rozpoznávají Ag pouze ve spojení s MHC molekulou.

Aktivace humorální i buněčné větve imunitního systému vyžaduje lymfokíny produkované Th buňkami.

Funkce humorálních a buněčných mechanismů:

Humorální odpověď:

Efektory - protilátky (neutralizace Ag, opsonizace, aktivace komplementu).

Buněčná odpověď:

Efektory - Th i CTL buňky.

Lymfokíny sekretované Th buňkami mohou aktivovat různé fagocytující buňky, zvyšovat jejich fagocytární a zabíjecí aktivitu. Aktivované CTL zabíjejí pozměněné vlastní buňky (virem infikované a nádorové buňky).

Rozpoznávání antigenu T a B lymfocyty:

T a B lymfocyty nerozpoznávají celé velké antigeny, ale jednotlivé antigenní determinanty - *epitopy*.

B lymfocyty rozpoznávají antigen samotný, T lymfocyty ve spojení s MHC molekulami.

Molekuly buněčné membrány zodpovědné za rozpoznávání imunitním systémem: na membránu vázané protilátky

heterodimerické T receptory

MHC molekuly I třídy (na všech buňkách)

MHC molekuly II třídy (na Ag prezentujících buňkách).

B a T buněčná specifita a diverzita:

Specifita B buněk je dána specifitou jejich receptorů - Pl molekul

Protilátková specifita je dána náhodným přeskupením genových segmentů kódujících protilátkové molekuly během maturace B buněk v kostní dřeni. Všechny 10^5 imunoglobulinových molekul na B buňce má stejnou specifitu. Přeskupování genových segmentů vede k obrovské diverzitě protilátkových specifit (10^8).

T maturace též zahrnuje přeskupování genových segmentů kódujících T receptory. T buňka exprimuje asi 10^5 identických receptorových molekul. Produkovaná enormní receptorová diverzita (až 10^{15} specifit) je snížena během selekčního procesu zrání T buněk v thymu. Pouze ty T buňky, které jsou schopné rozpoznat Ag v komplexu s MHC antigeny jsou schopné dozrát.

Úloha hlavního histokompatibilního komplexu:

MHC antigeny se dělí na dvě třídy MHC I a MHC II.

MHC I jsou glykoproteiny na membráně všech jaderných buněk, vždy v komplexu s malým proteinem označovaným jako β_2 mikroglobulin. Každý MHC lokus se vyskytuje v řadě alelických forem.

MHC II jsou glykoproteiny exprimované na antigen prezentujících buňkách. Molekuly MHC II se skládají z α a β řetězců.

MHC fungují též jako molekuly rozpoznávající Ag, ale nemají takovou specifitu jako T nebo B receptory. Distální část molekul MHC s vysokou AK variabilitou vytváří šterbinu, ve které sedí antigenní epitop. Takto vázaný, prezentují molekuly MHC I a II antigen T lymfocytům.

Zpracování a prezentace antigenu:

Cizí proteinový Ag musí být degradován na malé peptidy, které tvoří komplexy s MHC I a II molekulami. Jestli bude Ag prezentován spolu s MHC I nebo s MHC II závisí na vstupu Ag do buňky.

Exogenní antigen vstupuje do buňky endo- nebo fagocytózou a je zpracován endozomální cestou. Příslušné peptidy se váží na MHC II molekuly, které jsou pak exportovány na buněčný povrch. $CD4^+$ T buňky rozpoznávají Ag spojený s MHC II a jsou označovány jako MHC II restringované. Obecně fungují jako Th buňky.

Endogenní antigen je produkován v hostitelské buňce (virové antigeny nebo produkty nádorových buněk). Tyto antigeny jsou degradovány na peptidové fragmenty, které se váží na MHC I molekuly v endoplazmatickém retikulu. Cytotoxické $CD8^+$ buňky rozpoznávají tyto Ag vázané na MHC I na všech typech jaderných buněk.

Klonální selekce:

Specifita každého T a B lymfocytu je určena ještě před kontaktem s Ag. Úloha antigenu spočívá v aktivaci zralých lymfocytů příslušné specifity a jejich expanzi. Tento proces se nazývá klonální selekcí, protože jeho výsledkem jsou klony lymfocytů stelné specifity.

Klonálně selekční model dobře vysvětluje tři aspekty získané imunity: specifitu, paměť a rozpoznání vlastního/cizího. Specifita je dána tím, že pouze lymfocyty, jejichž receptory jsou specifické pro daný epitop, klonálně expandují. Model vysvětluje i rozdíl mezi primární a sekundární imunitní odpovědí. Zvýšený počet paměťových buněk podmiňuje rychlejší a intenzivnější sekundární odpověď. Rozpoznání vlastního a cizího je zajišťováno klonální eliminací během vývoje lymfocytů nesoucích receptory rozpoznávající vlastní antigeny nebo funkční supresí těchto buněk v dospělosti.

Klonální selekce se uplatňuje jak v humorální, tak v buněčné větvi imunitního systému.

Buněčné interakce potřebné pro vývoj imunitní odpovědi:

Vývoj humorální i buněčné imunitní odpovědi závisí na aktivaci Th buněk. Rozpoznání prezentovaného antigenu spolu s působením interleukinu 1 (IL-1) produkovaného makrofágy vede k aktivaci Th buněk. Tato aktivace indukuje sekreci IL-2 Th buňkami a expresi vysoce afinního membránového receptoru pro IL-2 na povrchu těchto buněk. Sekretovaný IL-2 se váže na tento receptor a tak autostimuluje Th proliferaci. Dochází ke klonální expanzi Th buněk, které pak pomáhají v aktivaci T a B efektorových lymfocytů.

Vývoj humorální odpovědi:

Maturované B buňky žijí krátce (několik dnů), pokud se nesečkají s antigenem. K jejich aktivaci vede přemostění jejich receptorů antigenem a působení růstových faktorů produkovaných makrofágy a Th buňkami. Interakce s Ag-specifickými Th lymfocyty je usnadňována samotnými B buňkami, které mohou sloužit jako buňky prezentující antigen. B buňky specificky zachycují Ag svým membránovým receptorem, internalizují ho, zpracovávají a prezentují na membráně spolu s MHC II molekulami. Th lymfocyty po vazbě na takto prezentovaný Ag produkují řadu cytokinů - IL-2, IL-4, IL-6 a interferon gama (IFN- γ), které aktivují B buňky k dělení a diferenciaci. Asi za 5 dnů B buňky diferencují na paměťové a plasmatické buňky.

Vývoj buněčné odpovědi:

Th buňky slouží k aktivaci různých T efektorových buněk. Např. Tc buňky rozpoznávají Ag v kontextu s MHC I a za přítomnosti IL-2 sekretovaného Th buňkami diferencují na CTL.

Cytokíny produkované Th buňkami mohou regulovat i další nespecifické efektorové buňky. Např. IL-2 a IFN- γ aktivují makrofágy, které tak získávají zvýšenou schopnost

fagocytovat a zabíjet pohlcené patogeny. Kromě toho mají zvýšenou schopnost zabíjet nádorové buňky a buňky infikované parazity. Podobně IL-2 a IFN- γ aktivují tzv. **NK buňky** (přirozené zabíječe), což jsou velké granulární lymfocyty, kterým chybějí T nebo B markery. Tyto buňky zabíjejí zejména nádorové a virem infikované buňky. **NKT buňky** mají vlastnosti Cytotoxických T lymfocytů i NK buněk. Mají invariantní T receptor, který nerozpoznává peptidy prezentované MHC antigeny, ale glykolipid prezentovaný nepolymorfní CD1d molekulou. Netvoří paměťové buňky a exprimují některé znaky NK buněk. Mají imunoregulační úlohu, protože produkují množství cytokinů. Mohou rozpoznávat lipidické antigeny nádorových buněk a podílejí se na protinádorové imunitě.

Jak makrofágy, tak NK buňky mohou fungovat v tzv. na protilátkách závislé buněčné cytotoxicitě (ADCC), kde molekuly specifických protilátek, vážících na jedné straně antigen, váží se svou Fc oblastí na Fc receptor cytotoxických buněk a tím zprostředkují kontakt mezi těmito buňkami a cílovými buňkami. V tomto případě protilátka zajišťuje specifitu, ale zabíječskou funkci mají nespecifické efektorové buňky.

Přednáška II

Experimentální systémy používané v imunologii

Experimentální zvířecí modely:

Pro přípravu antisér - králíci, kozy, ovce.

Vakcinační studie - primáti.

Základní výzkum - inbrední kmeny myší (geneticky charakterizované, rychle se množí, imunitní systém dobře charakterizován).

Inbreeding - bratr x sestra po 20 generací - homozygotní potomstvo ve více než 98% loků. Existuje více než 150 inbredních kmenů myší.

Adoptivní přenosy imunity: přenos lymfocytů do syngenního recipienta, u kterého byly inaktivovány buňky imunitního systému (ozáření subletální dávkou 650-750 rad zabije 99,99% lymfocytů, vyšší dávky vedou k eliminaci celého hemopoetického systému). Adoptivní přenosy umožňují studium různých subpopulací lymfocytů a buněčných interakcí potřebných k vývoji imunitní odpovědi.

Buněčné kultury:

Primární kultury - izolace lymfocytů z krve, nebo z různých lymfoidních orgánů. Buňky rostou v chemicky definovaném mediu obsahujícím fyziologický roztok, cukry, aminokyseliny, vitamíny, stopové prvky a další živiny. Přidává se sérum (většinou fetální telecí sérum).

Tyto metody umožňují studovat funkci buněčných subpopulací, identifikovat cytokíny fungující v aktivaci a diferenciaci lymfoidních buněk.

Klonované lymfoidní buněčné kultury:

Normální savčí buňky rostou v kultuře po omezenou dobu. Po určitém počtu dělení se růst zastaví. Nádorové buňky nebo buňky transformované chemickými kancerogeny se mohou *in vitro* množit neomezeně. Tyto buňky se označují jako *buněčné linie* (L 929 - myší linie získaná ve 40. letech působením metylcholantrenu na podkožní pojivovou tkáň). Linie lymfoidních buněk byly získány ze spontánně se vyskytujících tumorů nebo transformací normálních buněk některými viry (SV-40, virus Epsteina a Barrové, virus lidské T buněčné leukemie atd.). Tyto linie však mají abnormální růstové vlastnosti a aneuploidní počet chromozomů.

T buněčné klony mohou být získány kultivací normálních T buněk s antigenem za přítomnosti IL-2. Klony specifické pro antigen umožnily studovat membránové a intracelulární jevy související s rozpoznáváním antigenu, produkcí a funkcí jednotlivých lymfokínů. Tyto linie byly užity i k purifikaci a klonování genů pro interleukiny a jejich receptory.

Hybridní lymfoidní buněčné kultury:

Po fúzi T nebo B lymfocytů s nádorovými buňkami a po náhodné ztrátě některých chromozomů vznikají hybridomy obsahující chromozomy obou fúzovaných buněk. Působením polyetylglykolu mohou být B buňky produkující protilátky zfúzovány s nádorovými plazmatickými buňkami, označovanými jako myelomové buňky. Hybridomy přejímají od obou rodičovských buněk jak schopnost produkovat protilátky, tak schopnost neomezeně růst v tkáňové kultuře. Hybridomové klony produkují protilátky jedné specifity - monoklonální protilátky.

T buněčné hybridomy mohou být získány fúzí T lymfocytů s T lymfomy.

Byly připraveny stabilní hybridomy s Th i Tc aktivitou.

Technologie rekombinantní DNA:

Štěpení DNA restrikčními endonukleázami:

Bakteriální restrikční endonukleázy štěpí DNA pouze v restrikčních místech, což jsou sekvence zahrnující 4-8 nukleotidů. Některé enzymy produkují fragmenty dvouvláknové DNA s tupými, jiné s kohezivními konci, kde jeden řetězec přesahuje druhý. Když jsou dvě molekuly DNA štěpeny stejným restrikčním enzymem, kohezivní konce jsou komplementární a tyto dvě molekuly mohou být spojeny na základě párování bazí a vytvořit molekulu rekombinantní DNA.

Klonování DNA sekvencí:

Daný DNA fragment je vnesen do autonomě se replikující molekuly DNA (vektor), takže tento fragment je replikován společně s vektorem. Nejčastěji užívanými vektory jsou bakteriofágy nebo plasmidy. Nejčastějším hostitelem je *Escherichia coli*. Fragменты DNA mohou být získány z genomické nebo komplementární DNA.

Komplementární DNA (cDNA) se získá po izolaci mRNA z buňky jejím přepisem na cDNA reverzní transkriptázou. DS cDNA se získá z mRNA-cDNA hybridní molekuly rozštěpením RNA řetězce alkalií a dosyntetizováním druhého řetězce DNA DNA polymerázou. cDNA může být klonována v plasmidovém vektoru. Soubor DNA sekvencí v plasmidových vektorech reprezentující všechny mRNA sekvence z jedné buňky nebo tkáně se nazývá cDNA knihovna.

Fragменты genomické DNA se získají štěpením chromozomální DNA restričními endonukleázami, které produkují kohezivní konce. Fragменты mohou být klonovány pomocí bakteriofága lambda jako vektora. Úsek chromozomu bakteriofága (asi 15 kb), který není nezbytný pro jeho replikaci v *E. coli* se nahradí fragmentem genomické DNA. Z toho vyplývá, že když v jedné fágové částici může být klonováno asi $1,5 \times 10^4$ párů bazí, pro kompletní DNA genomovou knihovnu člověka je třeba více než milion různých rekombinantních fágových částic (savčí genom obsahuje asi 3×10^9 párů bazí).

Větší fragменты DNA mohou být klonovány v kosmidech nebo v umělých chromozomech kvasinek, což jsou lineární segmenty DNA schopné replikace v kvasinkových buňkách.

Jednotlivé DNA fragменты v cDNA nebo genomické DNA knihovně mohou být identifikovány pomocí hybridizace in situ. Rekombinantní DNA je extrahována z buněk, denaturována a na filtru inkubována s radioaktivně značenou sondou specifickou pro příslušný gen. Sonda hybridizuje s rekombinantní DNA a její poloha je identifikována autoradiografií. K syntéze oligonukleotidové sondy stačí znát sekvenci pěti nebo šesti AK zbytků peptidu kódovaného příslušným genem.

DNA fragменты získané štěpením restričními endonukleázami mohou být identifikovány metodou Southern blotting, která je založena na separaci fragmentů DNA v agarózovém gelu, denaturaci DNA a přenesení na nitrocelulóзовou membránu, kde je příslušný fragмент detegován na základě hybridizace s radioaktivní sondou.

Polymerázová řetězová reakce (PCR):

slouží k amplifikaci specifických DNA sekvencí, i když jsou přítomny v extrémě nízkých koncentracích ve směsi. Je třeba znát sekvence ohraničující příslušnou DNA sekvenci aby bylo možno podle nich syntetizovat tzv. primery. Směs DNA je denaturována krátkým zahřátím a chlazená za přítomnosti nadbytku primerů, které hybridizují s komplementární SS DNA. Druhý komplementární řetězec je pak dosyntetizován

termorezistentní DNA polymerázou (Taq polymeráza). Nově syntetizovaný DNA duplex je separován zahřátím a cyklus se opakuje. V každém cyklu se dubluje příslušná DNA sekvence. Během 25 cyklů je tato sekvence pomnožena asi milionkrát.

Přenos genů do savčích buněk:

K transfekci genů jsou často užívány retroviry, jejichž strukturální geny se nahradí klonovanými geny. Rekombinantní DNA retroviru se integruje do buněčného genomu.

Jinou metodou je elektroporace, kdy se působením elektrického proudu vytvoří póry v buněčné membráně, kterými klonovaná DNA proniká do buňky. Transfektovaná DNA se obvykle značí nějakým markerovým genem, např. genem kódujícím rezistenci na antibiotika.

Transgenní zvířata:

se připravují injekcí naklonované DNA do oplodněných vajíček. Transgenová DNA se integruje do chromozomální DNA a je předávána do dceřinných buněk. Vajíčka jsou pak implantována do vejcovodů pseudopregnantních samic (normální samice oplodněné sterilním samcem). Účinnost metody je nízká, pouze jedna až dvě transgenní myši na každých 100 oplodněných vajíček.

Buňky a orgány imunitního systému

Lymfocyty tvoří 25% bílých krevních buněk a 99% jaderných buněk lymfy. Lidské tělo obsahuje asi 10^{12} lymfocytů. Lymfocyty průběžně recirkulují mezi krví, lymfou a různými lymfoidními orgány, což zajišťuje integraci imunitního systému.

Hematopoéza:

Vývoj červených a bílých krevních buněk začíná ve žloutkovém vaku, pak se hematopoéza přemísťuje do fetálních jater a sleziny (3.-7. měsíc gestace). Hlavní krvetvornou funkci má však kostní dřeň.

Všechny funkčně odlišné krevní buňky vznikají z jedné pluripotentní kmenové buňky, která dává vznik erytrocytům, granulocytům, monocytům, žírným buňkám, lymfocytům a megakaryocytům. Frekvence kmenových buněk je asi jedna na 10^4 buněk kostní dřeně. Kmenové buňky s obměňují a udržují na homeostatické úrovni po celý život.

V časně hematopoéze pluripotentní kmenové buňky diferencují na lymfoidní a myeloidní kmenové buňky. Během další diferenciaci se vytvářejí progenitorové buňky předurčené pro příslušnou buněčnou linii. Lymfoidní kmenové buňky dávají vznik T a B lymfocytům, z myeloidních kmenových buněk vznikají erytrocyty, neutrofil, eosinofily, bazofily, monocyty, žírné buňky a destičky. Hemopoetické buňky zrají v mikroprostředí kostní dřeně, kterou opouštějí krevní cestou.

K poznání růstových faktorů potřebných pro proliferaci, diferenciaci a maturaci hematopoetických buněk přispěly metody kultivace těchto buněk in vitro na vrstvě adhezaních buněk stromatu.

Hematopoéza je regulována tzv. faktory stimulujícími tvorbu kolonií hemopoetických buněk (CSF), což jsou glykoproteiny označené podle buněčných linií, jejichž tvorbu indukují (multi-CSF stimuluje všechny linie, GM-CSF granulocytovou a makrofágovou linii, G-CSF, M-CSF). Dalším důležitým cytokínem v hemopoéze je erythropoetin, který indukuje terminální vývoj erytrocytů. Dále se hemopoézy účastní interleukiny 4, 5, 6, 7, 8 a 9. Většina těchto cytokínů je sekretována buňkami stromatu kostní dřeně, aktivovanými Th buňkami a makrofágy.

Produkce krevních buněk odpovídá jejich ztrátám. Erytrocyty přežívají 120 dnů, pak jsou fagocytovány makrofágy sleziny. Délka života buněk bílé krevní řady kolísá od dnů (neutrofil) po 20-30 let (některé T lymfocyty). Průměrný člověk produkuje $3,7 \times 10^{11}$ krevních buněk za den.

Hematopoéza je udržována v rovnováze produkcí cytokínů buňkami kostní dřeně. V případě infekce dochází k indukci hematopoetické aktivity produkcí cytokínů aktivovanými Th buňkami a aktivovanými makrofágy. Produkce jednotlivých hematopoetických linií je řízena lokálními koncentracemi cytokínů, nebo expresí receptorů pro tyto cytokíny.

Poruchy v regulaci exprese hematopoetických cytokínů nebo jejich receptorů může vést ke vzniku leukemií. Např. neschopnost GM-CSF snížit expresi receptorů pro G-CSF nebo M-CSF na leukemických buňkách způsobuje, že tyto buňky reagují na tak nízké koncentrace CSF, které u normálních hematopoetických buněk proliferaci nevyvolají. T buněčná leukemie způsobená infekcí retrovirem HTLV-I souvisí s tím, že infikované T buňky exprimují IL-2 receptor bez předchozí antigenní stimulace. Sekrece IL-2 těmito buňkami vede k neregulované buněčné proliferaci rezultující v leukemii.

Mononukleární buňky:

Mononukleární fagocytární systém je tvořen cirkulujícími monocyty v krvi a makrofágy v tkáních. Makrofágy jsou pojmenovány podle jejich tkáňové lokalizace: Kupferovy buňky v játrech, alveolární makrofágy, mikroglie v mozku, lymfoidní makrofágy ve slezině.

Kromě fagocytózy jsou makrofágy významné jako antigen prezentující a sekreční buňky.

Jednotlivé kroky fagocytózy: chemotaxe, adheze antigenu k buněčné membráně, pohlcení do fagozómu, fúze s lysozómem a vznik fagolysozómu. Lysozomy obsahují peroxid vodíku, volné kyslíkové radikály, peroxidázu, lysozym a různé hydrolytické enzymy, které rozkládají zfagocytovaný materiál. Ztrávený obsah fagolysozómu je eliminován exocytózou. Některé mikroorganismy se mohou množit ve fagozómu (*Listeria*, *Salmonella*, *Mycobacterium*) -brání fúzi fagozómů s lysozomy, odolávají lysozomálním enzymům nebo unikají z fagozómu do cytoplazmy.

Důležitou funkcí je prezentace antigenu Th buňkám ve spojení s MHC II molekulami.

Makrofágy sekretují řadu důležitých proteinů. IL-1 je sekretován po fagocytóze antigenu a je potřebný pro aktivaci Th buněk antigenem. Působí též na endotelie cév a hraje tak úlohu v zánětu a má pyrogenní účinky. Aktivované makrofágy sekretují složky komplementu, hydrolytické enzymy, které přispívají k rozvoji zánětu. Tumor necrosis factor (TNF- α) sekretovaný aktivovanými makrofágy může zabíjet různé buňky a zřejmě má význam v protinádorové imunitě.

Protilátky a komplement zesilují funkci makrofágů opsonizací (zvýšení fagocytózy až 4.000x). Aktivita makrofágů může být zvýšena chemotaktickými faktory produkovanými T buňkami, nebo složkami komplementu. Interferon gama aktivuje makrofágy k sekreci cytotoxických proteinů, které jim pomáhají zabíjet extra- i intracelulární patogeny, virem infikované a nádorové buňky. Aktivované makrofágy také exprimují více MHC II molekul na svém povrchu.

Granulocyty:

Dělí se na neutrofilů, eosinofilů a bazofilů na základě morfologie a charakteristického barvení.

Neutrofilů (polymorfonukleáry) mají segmentované jádro, cytoplazmu s množstvím granul, které se barví bazickými i kyselými barvivy. Granula eosinofilů se barví kyselým eosinem, granula bazofilů basicou metylenovou modří. Pouze neutrofilů a eosinofilů mohou fagocytovat. Neutrofilů tvoří 50-70% bílých krevních buněk, eosinofilů 1-3%, bazofilů <1%.

Neutrofilů žijí jen asi 3 dny. V místě zánětu adherují k vaskulárním endotelovým buňkám pomocí receptorů. Proces fagocytózy je podobný jako u makrofágů, ale místo lysozómů fúzují fagozomy s granuly obsahujícími lytické enzymy a baktericidní látky.

Fagocytická aktivita eosinofilů je méně důležitá než u neutrofilů, hlavní význam se jim přičítá v obraně proti parazitům. Sekretovaný obsah eosinofilních granul poškozuje buněčnou membránu parazitů.

Bazofily nefagocytují, jejich funkce spočívá v uvolňování farmakologicky aktivních látek při alergické reakci.

Žírné buňky jsou rozmístěny v různých tkáních, např. v kůži, pojivové tkáni, mukózní epitelální tkáni respiračního, urogenitálního a trávicího traktu. Fungují podobně jako bazofily v alergických reakcích.

Dendritické buňky odvozují své jméno od dlouhých membránových výběžků, připomínajících dendrity nervových buněk. Expresují velké množství MHC II molekul a hrají důležitou roli v prezentaci antigenu T lymfocytům. Po zachycení antigenu v tkáních dendritické buňky migrují do lymfoidních orgánů, kde prezentují antigen lymfocytům.

Nelymfoidní dendritické buňky zahrnují Langerhansovy buňky epidermis a intersticiální dendritické buňky v nejrůznějších orgánech.

Lymfoidní dendritické buňky zahrnují interdigitující a folikulární buňky. Interdigitující dendritické buňky jsou v T buněčných oblastech lymfatických orgánů. Vytvářejí mnohobuněčné agregáty s T buňkami, což umožňuje účinnější prezentaci antigenu těmto buňkám.

Folikulární dendritické buňky exprimují vysoké hladiny receptorů pro protilátky a komplement. Cirkulující antigen-protilátkové komplexy jsou zachycovány na membráně těchto buněk po velmi dlouhou dobu, což zřejmě hraje roli ve vývoji paměťových B buněk.

Lymfocyty:

Tvoří 20-40% bílých krvinek. Cirkulují v krvi a lymfě a migrují do tkání a lymfatických orgánů. Na základě funkce a membránových znaků se dělí na T, B a nulové buňky. T a B lymfocyty nestimulované antigenem jsou označovány jako klidové, jsou v G₀ fázi a jsou to malé lymfocyty o průměru 6 μm. Po setkání s antigenem vstupují do buněčného cyklu, zvětšují se na lymfoblasty (15 μm) s vyšším poměrem cytoplasma/jádro. Lymfoblasty diferencují na efektorové nebo paměťové buňky. Plasmatické buňky mají bohaté endoplasmatické retikulum. Efektorové buňky žijí krátce (dny až týdny). Paměťové buňky jsou dlouhožijící a zůstávají v G₀ fázi dokud se nesetkají s antigenem.

Různé linie a diferenciační stadia lymfocytů mohou být odlišeny na základě exprese membránových molekul pomocí monoklonálních protilátek. V roce 1982 (First International Workshop on Human Leukocyte Differentiation Antigens) byly monoklonální protilátky rozděleny podle molekul se kterými reagují. Jednotlivé antigeny rozpoznávané těmito protilátkami byly označeny *cluster of differentiation* (CD). Takže např. CD4 je adhesivní molekula vázající se na MHC II, CD8 se váže na MHC I, CD3 je signální transdukční element T receptoru atd.

B lymfocyty odvozují své jméno od místa svého zrání u ptáků, kterým je Fabriciova bursa. Zralé B lymfocyty mají na svém povrchu imunoglobulinové molekuly sloužící jako receptory pro antigen. U plasmatických buněk tyto receptory chybí.

Název T lymfocytů je odvozen od jejich maturace v thymu. Rozpoznávají antigen pouze ve spojení s MHC molekulami. Subpopulace CD4+ funguje jako Th buňky, CD8+ jako Tc buňky. Th buňky sekretují lymfokíny, hrající ústřední úlohu v aktivaci B a Tc buněk. V normální periferní krvi je poměr Th:Tc asi 2:1. Byla postulována ještě další subpopulace T lymfocytů - regulační T lymfocyty (Tregs). Patří do subpopulace CD4+ lymfocytů, jejich charakteristické znaky jsou CD25+ (alfa řetězec IL-2 receptoru) a Foxp3+ (transkripční faktor). Dělí se na přirozené a indukované. Indukovat je lze z naicních CD4+ T lymfocytů působením TGF-beta. Tregs produkují imunosupresivní cytokiny jako IL-10, TGF-beta nebo IL-35, granzym A a perforin a molekulu CTLA-4, která způsobuje imunosupresi T lymfocytů po interakci s kostimulačním receptorem CD28. Hlavní význam Tregs spočívá v obraně proti autoimunitě, ale Tregs jsou často zneužívány nádory nebo patogeny.

Nulové buňky neexprimují T nebo B markery, nemají imunologickou specifitu a paměť. Na základě funkce byla jedna populace označena jako přirození zabíječi (NK buňky). Jsou to velké granulární lymfocyty, tvoří 5-10% lymfocytů periferní krve u člověka. Mají význam v protinádorové imunitě, vcházejí do membránového kontaktu s nádorovými buňkami a ničí je cytotoxickými faktory. Nemají vysoce specifické receptory jako T nebo B lymfocyty. NK buňky mají aktivační a inhibiční receptory. Některé z aktivačních receptorů mají charakter lektinů C-typu (NKG2D, nebo aktivační isoformy Ly49), jiné, označované jako NCR (natural cytotoxicity receptors) zahrnují proteiny NKp30, NKp44 a NKp46. Ligandy aktivačních receptorů jsou velmi různorodé. Patří mezi ně na příklad proteiny MIC-A a MIC-B, exprimované na buňkách stresovaných infekcí, teplem nebo traumatem. Kromě aktivačních receptorů mají NK buňky inhibiční receptory, na příklad KIR (killer cells immunoglobulin-like receptors), které rozpoznávaly některé MHC I antigeny (HLA-C2, HLA-C1). Rozhodující pro zabití cílové buňky je, který ze signálů převládne. Společně s protilátkami proti nádorovým antigenům mohou fungovat v buněčné cytotoxicitě závislé na protilátkách (ADCC). Existuje kmen tzv. běžových myší, které mají autozomální recesivní mutaci způsobující chybění NK buněk. Tyto myši jsou citlivější k nádorům. NKT buňky mají vlastnosti cytotoxických T lymfocytů i NK buněk. Mají invariantní T receptor, který nerozpoznává peptidy prezentované MHC antigeny, ale glykolipid prezentovaný nepolymorfni CD1d molekulou. Netvoří paměťové buňky a exprimují některé znaky NK buněk. Mají imunoregulační úlohu, protože produkují množství cytokinů. Mohou rozpoznávat lipidické antigeny nádorových buněk a podílejí se na protinádorové imunitě.

Orgány imunitního systému:

Dělí se na primární (centrální) a sekundární (periferní). Nezralé lymfocyty získávají svou antigenní specifitu v primárních lymfatických orgánech (kostní dřeň, thymus). V sekundárních lymfatických orgánech se imunokompetentní buňky setkávají s antigenem.

Thymus je plochý laločnatý orgán situovaný nad srdcem. Vazivovými septy je rozdělen do lalůček. Každý lalůček je rozdělen do dvou oblastí - vnější kůry, která obsahuje 85-90% thymocytů a vnitřní dřeň řídké osídlené thymocyty. Nezralé T buňky se začínají množit v kůře, kde jich však většina též hyne. Malá subpopulace zralejších thymocytů pak migruje do dřeň kde dále zraje a opouští thymus krevním řečištěm. Thymus obsahuje síť epitelálních, interdigitujících dendritických buněk a makrofágů které přispívají ke zrání thymocytů. Epitelie thymu sekretují hormonální faktory nezbytné pro diferenciaci a zrání T buněk. Jsou to α_1 thymosin, β_4 thymosin, thymopoietin a thymulin. Během zrání v thymu dochází k náhodnému přeskupování genů kódujících T receptory. Zrající T buňky procházejí pozitivní selekcí umožňující další vývoj jen těm, které rozpoznávají cizí peptidy ve spojení s vlastními MHC molekulami. Ostatní jsou eliminovány procesem označovaným jako programovaná buněčná smrt (apoptóza). Při negativní selekci jsou dále eliminovány thymocyty rozpoznávající samotné vlastní MHC molekuly s vysokou aviditou nebo tyto molekuly v komplexu s vlastním antigenem. Celkem 95-99% thymocytů v thymu uhyne.

Důkazy o významu thymu v imunitě pocházejí z pokusů s neonatální thymektomií. Existují tzv. nahé (nude) myši s defektem ve vývoji thymu. Thymus dosahuje maximální velikosti v pubertě pak atrofuje. Involuce thymu ve stáří je spojována s poklesem některých imunitních funkcí.

Kostní dřeň a zřejmě i další lymfatické tkáně nahrazují funkci Fabriciovy bursy u ptáků. Vývoj B buněk v kostní dřeni též podléhá negativní selekci zabraňující autoimunitě. Autoreaktivní nezralé B lymfocyty podléhají klonální delecí při níž hynou apoptózou. Ale hlavním mechanismem bránícím autoimunitě je receptor editing což znamená, že autoreaktivní nezralé B buňky reaktivují přeskupování genových segmentů u L řetězce, což vede k expresi nového L řetězce, který s existujícím těžkým řetězcem vytváří nový paratop B buněčného receptoru, který již není autoreaktivní. V poslední době se ukázalo, že receptory B lymfocytů procházejí, podobně jako receptory T buněk, i pozitivní selekcí. Pre-B buňky totiž exprimují invariantní B buněčný receptor (BCR), neboli náhradní receptor kódovaný v germinální linii. Tento pre-BCR je autoreaktivní (váže heparan sulfát nebo galerktin na stromálních buňkách kostní dřeň). Může též tvořit homotypické agregáty (ligand-independent crosslinking) a tím aktivovat pre-B buňku. Tato aktivace vede k nahrazení náhradního L řetězce normálním, u něhož proběhne rekombinační proces (receptor editing). Aktivace pre-B buněk autoantigeny vede k jejich proliferaci a tím k větší expanzi. Větší počet prekurzorových buněk umožňuje vznik široké diverzity protilátek.

Lymfatické uzliny:

Lymfa teče z intercelulárních prostorů v tkáních do lymfatických kapilár, lymfatických cév až do hrudního mízovodu, který spojuje lymfatický systém s krevním oběhem. Při své cestě z tkání je lymfa filtrována přes lymfatické uzliny, ve kterých fagocyty a dendritické buňky zachycují antigen nesený lymfou. Morfologicky se lymfatická uzlina dělí na tři oblasti - kůru, parakortex a dřevnou oblast. Vnější kůra obsahuje hlavně B buňky a makrofágy uspořádané do shluků nazvaných primární folikuly. Po stimulaci antigenem se primární folikuly vyvíjejí na sekundární s germinálními centry obsahujícími lymfoblasty a plazmatické buňky. Podkorová oblast (parakortex) obsahuje hlavně T lymfocyty a dendritické buňky, které sem migrují z tkání. Tato oblast se na rozdíl od kůry označuje jako závislá na thymu. V dřevu je málo lymfocytů, většinou jde o plazmatické buňky produkující protilátky. Antigenní stimulace může výrazně zvýšit migraci lymfocytů do uzliny, což se projeví zvětšením uzliny.

Slezina:

Je sekundární lymfatický orgán uložený v břišní dutině. Na rozdíl od lymfatických uzlin filtruje krev a zachycuje přítomné antigeny. Ve slezině jsou dva druhy tkáně: červená pulpa, která se uplatňuje při likvidaci zestárých erytrocytů a bílá pulpa, tvořená lymfatickou tkání. Většina lymfatické tkáně je uspořádána kolem centrálních arterií jako lymfocytární pochva. Pochva obsahuje T buňky a B buňky tvořící primární resp. sekundární folikuly s germinálními centry. Efekt splenektomie závisí na věku, ve kterém se provede. U dětí vede k zvýšenému výskytu bakteriálních sepsí, u dospělých má menší efekt.

Slizniční lymfatická tkáň (MALT):

Hlavní úlohou je zachycování antigenů, které proniknou přes slizniční membrány. Jsou to místa interakce lymfocytů s antigenem. Lymfatická tkáň je různě složitě organizována od volných shluků buněk po organizované struktury jako jsou tonsily, slepé střevo nebo Payerovy pláty na povrchu střev. Organizované struktury MALT obsahují podobně jako lymfatické uzliny folikuly s germinálními centry a T buněčné oblasti.

Recirkulace lymfocytů:

Lymfocyty recirkulují mezi krví, lymfou a lymfatickými orgány. Během recirkulace se setkávají s buňkami prezentujícími antigen v periferních lymfatických orgánech. Protože asi jen 10^3 - 10^6 lymfocytů může rozpoznat určitý antigen, musí se do kontaktu s antigenem prezentující buňkou dostat velké množství lymfocytů v relativně krátké době. Po injekci

určitého antigenu zmizí během 48 hodin z cirkulace lymfocyty specificky rozpoznávající tento antigen. Lymfocyty vstupují z krve do lymfatických orgánů mezi epiteliálními buňkami cévní stěny (extravasace). K tomuto procesu dochází ve specializovaných místech endotelu s kvádrovitými buňkami (high endothelial venules - HEV). Endoteliální buňky HEV exprimují buněčné adhezivní molekuly (CAM), které jsou rozpoznávány příslušnými receptory lymfocytů, monocytů a granulocytů. Jedna skupina těchto receptorů se nazývá integriny. Exprese adhezivních molekul se zvyšuje působením lymfokínů produkovaných aktivovanými buňkami lymfatického systému. Některé adhezivní molekuly jsou tkáňově specifické a nazývají se vaskulární adresíny. Umožňují pronikání určitých subpopulací recirkulujících lymfocytů do určitých periferních lymfatických orgánů. Příslušné receptory na lymfocytech jsou pak označovány jako *homing receptor*. Např. B lymfocyty vykazují přednostní homing do slizničních lymfatických tkání, zatím co T lymfocyty do lymfatických uzlin. Proces extravasace je dvoustupňový. V prvním stupni reaguje lymfocytový homing receptor s tkáňově specifickým adresínem, ve druhém stupni je adheze zesílena vazbou integrinového receptoru na CAM. Exprese adhezivních molekul je ovlivňována lymfokíny tvořenými v časných fázích imunitní odpovědi (IL-1, IFN- γ , TNF- α). T a B lymfocyty ztrácejí své homing receptory po aktivaci antigenem. To zajišťuje, že aktivované lymfocyty zůstávají na místě a dále nerekulují. Adhezivní molekuly také přispívají k funkčním interakcím mezi buňkami imunitního systému.

Přednáška III

Antigeny

Definice antigenů na základě 4 imunologických vlastností: imunogenity, antigenity, alerogenity a tolerogenity.

Imunogenita - schopnost vyvolat humorální nebo buněčnou imunitní odpověď (antigen=imunogen).

Antigenita - schopnost specificky se vázat s finálními produkty imunitních reakcí (*hapteny* mají vlastnosti antigenů ale ne imunogenů).

Alerogenita - schopnost vyvolat alergickou reakci.

Tolerogenita - schopnost indukovat specifickou imunologickou neodpovídavost.

Imunogeny- proteiny nebo polysacharidy, nikoli lipidy nebo nukleové kyseliny (pouze v komplexu s proteinem nebo polysacharidem).

Pro buněčnou imunitu slouží jako imunogeny pouze proteiny.

Imunogenita je určena cizorodostí, molekulární hmotností a chemickým složením a degradovatelností makrofágovými enzymy.

Cizorodost: všechny molekuly ke kterým jedinec nezíská toleranci během fetálního vývoje jsou rozpoznávány jako cizí. Čím větší je fylogenetická vzdálenost mezi druhy, tím větší je antigenní odlišnost mezi nimi. Některé komponenty vlastního těla (tkáň rohovky, sperma) jsou tak dobře odděleny od imunitního systému, že když se injikují do jedince ze kterého byly získány, vyvolají imunitní odpověď.

Molekulová hmotnost: nejlepší imunogeny mají m.h. kolem 100 kDa. Molekuly menší než 5-10 kDa jsou slabé imunogeny.

Chemické složení a heterogenita: syntetické homopolymery postrádají imunogenitu bez ohledu na velikost. Kopolymery dostatečné velikosti obsahující dvě nebo více AK jsou imunogenní. Primární, sekundární terciární i kvarterní struktura antigenu ovlivňují jeho imunogenitu.

Degradovatelnost: makromolekuly, které nemohou být degradovány a zpracovány buňkami prezentujícími antigen, jsou špatné imunogeny (např. syntetické polymery z D-aminokyselin). Ke zvýšení imunogenity se užívá chemického propojení makromolekul, agregace teplem a navázání na nerozpustné matrice.

Vliv biologického systému na imunogenitu:

Genetická konstituce imunizovaného zvířete ovlivňuje typ imunitní odpovědi i její velikost. Imunitní odpověď je řízena geny MHC. Proteiny MHC, které fungují při prezentaci antigenu T buňkám, hrají hlavní úlohu v určení stupně odpovídavosti na antigen. Dále je imunitní odpověď ovlivňována geny kódujícími T a B receptory a geny kódujícími různé regulační proteiny.

Dávka imunogenu a způsob podání:

Výsledek imunizace závisí na kombinaci dávky, způsobu podání a časového schematu. Příliš nízká nebo příliš vysoká dávka může vyvolat neodpovídavost (toleranci). Obvykle je třeba více dávek antigenu. Antigen podaný intravenózně se nejprve dostává do sleziny, antigen podaný podkožně jde do lokálních lymfatických uzlin.

Adjuvancia:

Z latiny - adjuvare = pomoci. Zvyšují imunogenitu antigenu.

Např. síran hlinitodraselný (alum) precipituje antigen a pomalu ho uvolňuje z místa injekce. Freundovo adjuvans obsahuje minerální olej ve vodě a emulsifikátor. Malé kapky oleje obklopují antigen, který je pak uvolňován velmi pomalu. Kompletní Freundovo adjuvans obsahuje navíc teplem usmrcená mykobakteria, jejichž stěnová složka - muramyl dipeptid aktivuje makrofágy, které produkcí IL-1 aktivují Th buňky. Jiná adjuvancia jako polyribonukleotidy nebo lipopolysacharidy nespecificky stimulují lymfocytární proliferaci a tak zvyšují pravděpodobnost antigenem indukované klonální selekce. Některá adjuvancia vyvolávají chronické záněty s granulomy. Vysoké počty makrofágů v granulomu usnadňují zpracování antigenu a stimulují aktivaci Th buněk.

Epitopy (antigenní determinanty):

Jsou to imunologicky aktivní oblasti imunogenu, které se váží na membránové receptory lymfocytů nebo sekretované protilátky. Protože B buňky váží volný antigen v roztoku, jsou příslušné epitopy přístupná místa povrchu imunogenu. Obecně obsahují hydrofilní AK.

Velikost B epitopů je určena velikostí vazebného místa pro antigen (paratopu) na protilátkové molekule. Vazba protilátky s epitopem zahrnuje slabé nekovalentní interakce, které fungují na krátké vzdálenosti a proto závisí na komplementaritě epitopu a

paratopu, aby se tyto interakce maximalizovaly. 15-22 AK na povrchu proteinového antigenu přichází do kontaktu s podobným počtem AK v paratopu. Jako B epitopy jsou většinou rozpoznávány oblasti vyčnívající z povrchu proteinu. B epitopy mohou být sekvenční nebo konformační. Sekvenční epitopy zahrnují určitou sekvenci AK v peptidickém řetězci, AK tvořící konformační epitopy jsou daleko od sebe v primární struktuře, ale dostávají se k sobě v terciární struktuře proteinu. Jsou závislé na nativní konformaci proteinu. B epitopy bývají lokalizovány ve flexibilních oblastech imunogenu a vykazují pohyblivost. Komplexní proteiny obsahují mnohočetné překrývající se B epitopy. Imunodominantní epitopy indukují silnější odpověď než ostatní epitopy. Je to dáno topografickými vlastnostmi epitopů i regulačními mechanismy zvířete.

T epitopy:

Jako T epitopy fungují oligomerické peptidy obsahující 7-20 AK. Antigenní peptidy rozpoznávané T buňkami tvoří trimolekulární komplexy s T receptorem a MHC molekulou. Byla krystalizována MHC I molekula obsahující malý peptid, zřejmě zpracovaný antigen. Antigen rozpoznávaný T buňkami musí nést dvě interakční místa: jedno (epitop) interaguje s T receptorem, druhé (*agretop*) interaguje s MHC molekulou. Vazba peptidu na MHC nevykazuje takovou antigenní specifitu jako interakce protilátka-epitop. Peptidy schopné specifické interakce s MHC molekulami vznikají při zpracování antigenu. Pouze jedna hodina stačí antigen prezentující buňce k tomu, aby zpracovala antigen a prezentovala ho na své membráně.

Antigeny rozpoznávané T buňkami často obsahují amfifatické peptidy. Hydrofobní AK zbytky zřejmě fungují jako *agretopy*, zatímco hydrofilní jako epitopy. Byl vypracován počítačový program analyzující peptidové sekvence a přiřazující jim "amfifatický index". To umožňuje předpovědět potenciální T epitopy pro syntetické peptidové vakcíny proti infekčním nemocem. Imunodominantní T epitopy jsou částečně určeny povrchovými molekulami MHC exprimovanými jedincem.

Hapteny:

Jsou to malé organické molekuly vázané na velký proteinový *nosič*. Konjugát haptenu-*nosič* je použit k imunizaci. Indukované protilátky jsou namířeny jak proti haptenu, tak proti nosiči. Hapten vlastně funguje jako imunodominantní epitop na molekule nosiče. Pomocí haptenu byl studován vliv změny chemické struktury antigenu na jeho reaktivitu s protilátkou. Pozměněné hapteny, které ještě reagovaly s protilátkou proti původnímu haptenu byly označeny jako skříženě reagující.

Mnoho biologicky aktivních látek (léky, peptidické hormony, steroidní hormony) může fungovat jako hapteny.

Virové a bakteriální antigeny:

Složení virové částice - nukleokapsida (kapsomery) a lipoproteinový obal. Podjednotkové struktury kapsidy (u nahých virů) a glykoproteinové výběžky obalených virů = B epitopy. T epitopy jsou často na vnitřních virových proteinech produkovaných v hostitelských buňkách. Např. hlavním antigenem rozpoznávaným Tc buňkami je u viru chřipky nukleoprotein spojený s virovou RNA a nacházející se pod glykoproteinovým obalem. Virus chřipky průběžně mění složení svých obalových glykoproteinů. Velké změny (antigenní shift) nebo menší (antigenní drift) vedou ke vzniku nových epitopů, umožňujících viru uniknout obranným imunitním mechanismům, což vede ke chřipkovým epidemiím. Podobné časté změny v obalových glykoproteinech jsou pozorovány u HIV (virus AIDS), což komplikuje vývoj vakcíny.

Buněčná stěna grampozitivních bakterií je složená převážně z peptidoglykanu (polysacharidy propojené krátkými polypeptidickými řetězci). Gramnegativní bakterie mají tenkou peptidoglykanovou vrstvu pokrytou vnější membránou obsahující fosfolipid, protein, lipopolysacharid a lipoprotein. Lipopolysacharid je hlavní antigenní komponentou. Bakteriální pouzdra jsou složená z polysacharidů nebo polypeptidů a jsou důležitým faktorem virulence bakterií, protože interferují s fagocytózou.

Mitogeny:

Jsou to látky, které indukují buněčné dělení u vysokého procenta T nebo B buněk. Jsou to nespecifické polyklonální aktivátory. Patří mezi ně lektiny, což jsou proteiny rostlinného původu vážající cukry. Rozpoznávají různé glykoproteiny na povrchu buněk včetně lymfocytů. Nejznámější jsou konkanavalin A (Con A), tetramer schopný přemostit glykoproteiny na buněčném povrchu a tak aktivovat buňky. Je to T mitogen podobně jako fytohemagglutinin (PHA), který se získává z fazolí a aspecificky rozpoznává N-acetylgalaktosamín. Pokeweed mitogen (PWM) je mitogenní pro T i B buňky. Důležitým neelektinovým B mitogenem je lipopolysacharid (LPS), komponenta bakteriální stěny gramnegativních bakterií. Vlastní aktivita je nesena lipidem A, který reaguje s plasmatickou membránou.

Neobvyklou skupinou polyklonálních aktivátorů jsou *superantigeny*. Aktivují všechny T lymfocyty exprimující společnou sekvenci na T receptoru bez ohledu na jejich antigenní nebo MHC specifitu. Rozpoznávají AK sekvence mimo vazebné místo pro antigen. Váží se současně na T receptor a MHC molekulu a aktivují velké množství T buněk. Patří sem stafylokokové enterotoxiny a toxin šokového syndromu produkovaný bakterií *Staphylococcus aureus*. Každý pátý T lymfocyt může být aktivován tímto toxinem, což vede k produkci abnormálního množství cytokínů, k šoku a smrti.

Struktura a funkce imunoglobulinů

Sérové protilátky jsou obsaženy v gamaglobulinové frakci séra (Tiselius a Kabat 1939). Označují se jako *imunoglobuliny*.

Základní studie struktury imunoglobulinů provedli Porter a Edelman (Nobelova cena v roce 1972). Porter štěpil molekulu IgG rostlinným enzymem papainem za vzniku dvou identických Fab fragmentů nesoucích antigen vazebnou aktivitu a Fc fragmentu, který bylo možno získat krystalizací. Štěpení jinou proteinázou - pepsinem (Nisonoff) poskytlo jeden F(ab)₂ fragment, Fc fragment nebyl získán, protože byl rozštěpán na mnoho fragmentů. Edelman redukoval disulfidické vazby v molekule IgG merkaptoetanolem a denaturovaný protein podrobil elektroforéze ve škrobovém gelu. Tyto pokusy ukázaly, že molekula IgG se skládá ze dvou identických *těžkých* peptidických řetězců o m.h. 50 kDa a dvou stejných *lehkých* řetězců o m.h. 25 kDa. Těžké a lehké řetězce jsou spojeny disulfidickými můstky. Papain štěpí IgG molekulu těsně nad S-S můstkem spojujícím těžké řetězce, pepsin štěpí těsně pod ním.

Zjištění primární struktury imunoglobulinů (sekvenace) bylo dlouho limitováno velkou heterogenitou sérových imunoglobulinů. Sekvenaci umožnilo teprve objevení mnohotných myelomů - nádorů postihujících plasmatické buňky. Zatímco normální plazmatické buňky produkují protilátky po několik dnů a pak hynou, myelomové buňky produkují imunoglobuliny neomezeně, takže myelomový protein představuje 95% sérových imunoglobulinů. Většina pacientů s mnohotným myelomem ještě produkuje nadbytek lehkých řetězců, které mohou být nalezeny v moči jako Bence-Jonesovy proteiny. Mnohotný myelom lze vyvolat u myši injekcí minerálního oleje do peritoneální dutiny.

Sekvenování lehkých imunoglobulinových řetězců ukázalo, že oblast zahrnující asi 110 AK na N-konci řetězce je vysoce variabilní, zatím co C-konec byl označen jako konstantní, vyskytující se ve dvou typech kapa a lambda. U lidí je poměr mezi kapa a

lambda řetězci 2:1, u myši je 95% lehkých řetězců typu kapa. Jedna protilátková molekula má vždy pouze jeden typ lehkých řetězců, nikdy oba.

Sekvenování těžkých řetězců ukázalo také variabilní oblast (100-110 AK) na N-konci, zbytek (konstantní oblast) se vyskytoval v pěti typech uspořádání aminokyselin, což odpovídá pěti známým třídám imunoglobulinů IgM, IgG, IgA, IgD a IgE. Délka konstantní oblasti byla 330 AK pro IgA, IgG a IgD a 440 AK pro IgM a IgE. Každá protilátková molekula má dva stejné těžké řetězce (označené podle tříd) a dva stejné lehké řetězce kapa nebo lambda.

Struktura imunoglobulinové molekuly:

Je určena primární, sekundární, terciární a kvarterní strukturou proteinové molekuly. Primární struktura zodpovídá za konstantní a variabilní oblasti lehkých a těžkých řetězců. Sekundární struktura tvoří tzv. skládaný list, který je stabilizován disulfidickými a vodíkovými můstky. Řetězce jsou v terciární struktuře poskládány do kompaktních globulárních domén. Globulární domény sousedících lehkých a těžkých řetězců interagují ve kvarterní struktuře tvořící funkční domény, umožňující specifickou vazbu antigenu a další biologické funkce.

Struktura imunoglobulinových domén:

Struktura lehkých i těžkých řetězců se skládá z homologních jednotek (asi 110 AK) nazvaných *domény*. Každá doména obsahuje jednu disulfidickou smyčku, zahrnující asi 60 AK. L řetězce obsahují jednu variabilní a jednu konstantní doménu, těžké řetězce jednu variabilní a 3 nebo 4 konstantní domény podle protilátkové třídy. Krystalografické studie ukázaly, že Ig domény jsou poskládány do charakteristické struktury (immunoglobulin fold).

Struktura a funkce variabilní domény:

Variabilní doména obsahuje tři hypervariabilní oblasti v L i H řetězcích. Tyto oblasti zahrnují 15-20% variabilní domény, zbytek se označuje jako kostra. Hypervariabilní oblasti tvoří vazebné místo pro antigen. Protože struktura vazebného místa je komplementární ke struktuře antigenního epitopu, jsou hypervariabilní oblasti nazývány *oblasti určující komplementaritu (CDR)*. Úloha CDR ve vazbě antigenu byla demonstrována pomocí techniky afinitního značení (affinity labeling). Tato technika využívá syntetického haptenu obsahujícího skupiny, které mohou být převedeny do chemicky reaktivního stavu po aktivaci ultrafialovým světlem. Aminokyseliny tvořící vazebné místo jsou pak kovalentně vázány s haptenem a mohou být identifikovány. Tato analýza ukázala, že CDR vyčnívají z Ig struktury a vytvářejí vazebné místo pro antigen. V daném případě interagovalo 17 AK protilátky s 16 AK antigenu. V některých případech (protilátka proti

neuraminidáze chřipkového viru) je tvorba komplexu antigen-protilátka provázena konformačními změnami jak antigenního epitopu, tak paratopu.

Struktura a funkce domén konstantní oblasti:

Těžké řetězce IgG, IgD a IgA obsahují peptidovou sekvenci mezi C_{H1} a C_{H2} doménami která je ozanačována jako peptidický pant (hinge region) a která umožňuje pohyblivost Fab řetězců v tom smyslu, že mohou navzájem svírat různý úhel podle velikosti antigenu, který vážou. Flexibilita peptidického pantu byla demonstrována na elektronoptických snímcích komplexů antigen-protilátka. Protilátky třídy IgM a IgE nemají hinge region, ale mají navíc 110 AK doménu s podobnými vlastnostmi.

C_{H2}/C_{H2} domény jsou odděleny oligosacharidovými postranními řetězci což vede k tomu, že tyto dvě globulární domény jsou mnohem přístupnější okolnímu prostředí a mohou hrát úlohu v aktivaci komplementu.

Poslední C-koncová doména protilátkové molekuly vázané na membránu funguje v připojení této molekuly k B buňce. U volných protilátkových molekul tato doména spolu s přilehlou doménou interaguje s Fc receptorem na různých buňkách. Např. některé podtřídy IgG se váží na receptor na placentálních buňkách a jsou pak přenášeny přes placentu, což umožňuje mateřským protilátkám chránit plod. Vazba IgE na žírné buňky a bazofily je také zprostředkována Fc receptory na těchto buňkách. C-koncová doména IgA a IgM hraje úlohu v polymerizaci volných molekul těchto protilátek. Přítomnost cysteinových zbytků umožňuje tvorbu S-S můstků což vede ke vzniku pentamerů u IgM a dimerů nebo trimerů u IgA.

Antigenní determinanty na imunoglobulinech:

Imunoglobuliny jsou glykoproteiny, které mohou fungovat jako silné imunogeny.

Epitopy na Ig molekulách spadají do tří kategorií: *izotypy, alotypy a idiotypy*.

Izotypové determinanty leží v konstantních oblastech těžkých a lehkých řetězců a odlišují třídu a podtřídu u těžkých řetězců a typ a subtyp u lehkých řetězců v rámci druhu. To znamená, že všichni jedinci určitého druhu nesou stejné geny pro konstantní oblast. Odlišné druhy exprimují odlišné izotypy.

Antigenní determinanty které odlišují imunoglobuliny stejného izotypu u různých jedinců téhož druhu se nazývají alotypovými determinantami (je známo 25 Gm alotypů u lidí). Antialotypové protilátky jsou někdy tvořeny matkou proti otcovským alotypovým determinantám na fetálních imunoglobulinech nebo po krevní transfuzi.

Jedinečná AK sekvence V_H a V_L domén obsahující paratop může fungovat jako antigenní determinanta. Každá jednotlivá determinanta variabilní oblasti se nazývá *idiotop*. Některé idiotopy mohou být totožné s vazebným místem pro antigen, jiné leží mimo paratop. Suma všech idiotopů na jedné protilátkové molekule se nazývá *idiotyp*

protilátky. Některé idiotypové determinanty jsou shodné na různých protilátkách (public idiotopes). Dokazují expresi téhož genu zárodečné linie u různých B buněk.

Izotypy imunoglobulinů:

Imunoglobulin G - je nejčastějším izotypem v séru (80% všech sérových Ig). Existují 4 podtřídy IgG1-4. Rozdíly mezi podtřídami jsou velikost hinge region a počet a umístění S-S můstků. IgG1, 3 a 4 procházejí placentou, IgG3 nejefektivněji aktivuje complement, IgG4 neaktivuje complement vůbec. Podtřídy se liší i v afinitě k Fc receptorům.

Imunoglobulin M - tvoří 5-10% sérových Ig. Monomerní IgM je exprimován na B buňkách, sekretovaný IgM je pentamer, obsahující polypeptidický J řetězec, navázaný na C-koncové cysteinové zbytky na dvou z 10 H řetězců. J řetězec je asi nezbytný pro polymerizaci monomerních IgM molekul. IgM je produkován jako první v primární odpovědi na antigen a je prvním izotypem tvořeným u novorozenců. Molekula pentameru obsahuje 10 vazebných míst pro antigen a může vázat 10 malých hapténových molekul. U větších antigenů sterická zábrana omezuje vazebnou kapacitu na polovinu. IgM velmi účinně aglutinuje a neutralizuje viry, je účinnější než IgG v aktivaci complementu. Přítomnost J řetězce umožňuje IgM molekulám vázat se na receptory na sekretorických buňkách, kterými je transportován do sekretů, které omývají mukózní povrchy.

Imunoglobulin A - tvoří 10-15% sérových Ig, ale zcela převládá v sekretech jako je mateřské mléko, sliny, slzy a hlen dýchacího, urogenitálního a trávicího traktu. *Sekreční IgA* je dimer nebo tetramer obsahující J řetězec a další polypeptidický řetězec nazvaný sekretorická komponenta. J řetězec je stejný jako u IgM a má stejnou funkci, sekretorická komponenta je produkována epitelii mukózních membrán. Za den se tvoří více sekrečního IgA než ostatních Ig tříd. Plazmatické buňky sekretující IgA jsou koncentrovány podél mukózních membrán. Sekretorickou komponentu získává dimerický IgA během transportu přes mukózní epitelální buňky do mukózního sekretu. IgA dimer se váže na receptor pro polymerický Ig na mukózních epitelích, je endocytován a transportován přes buňku do lumen. Během tohoto procesu je receptor rozštěpen a jeho část získává imunoglobulin jako sekretorickou komponentu. Sekretorická komponenta chrání sekretorický IgA před proteolytickými enzymy v mukózních sekretech.

Imunoglobulin E - je v séru v extrémě nízké koncentraci 0,3 ug/ml.

IgE protilátky zprostředkují reakce časného typu přecitlivělosti (astma, senná rýma). Prausnitz a Kustner (1921) injikovali sérum alergického pacienta do kůže nealergického jedince. Když na stejné místo injikovali antigen (alergen), vyvinula se vyrážka (= první biologický test na IgE protilátky). IgE protilátky se vážou na Fc receptory na krevních bazofilech a tkáňových žírných buňkách. Jejich přemostění alergenem indukuje degranulaci bazofilů a žírných buněk a uvolnění farmakologicky aktivních mediátorů vede k alergické reakci. IgE protilátky mají též význam v protiparazitární imunitě.

Imunoglobulin D - byl poprvé objeven až u pacienta s příslušným myelomem. Tvoří jen 0,2% serových Ig, jeho biologická funkce není dosud známa. Je spolu s IgM hlavním receptorem B buněk a funguje v jejich aktivaci antigenem.

Velká imunoglobulinová rodina (immunoglobulin superfamily)

Struktura imunoglobulinových těžkých a lehkých řetězců má určité rysy, naznačující společného evolučního předka. Je to hlavně typická doménová struktura imunoglobulinů ukazující na vývoj z jednoho primordiálního genu kódujícího peptid o asi 110 AA. Struktura β_2 mikroglobulinu, který je součástí MHC I molekul vykazuje homologii s konstantními doménami imunoglobulinových těžkých i lehkých řetězců. Podobně řada dalších membránových proteinů nese jednu nebo více oblastí homologních s imunoglobulinovými doménami. Je to T buněčný receptor, CD2, CD3, CD4 a CD8 molekuly, MHC I a MHC II, buněčné adhezivní molekuly, receptor pro polymerický IgA a IgM atd. Některé proteiny z této rodiny mají variabilní a konstantní domény homologní s imunoglobulinovými doménami. Protože většina členů této rodiny neváže antigen, musí být jiná příčina pro to, že mnoho odlišných proteinů má podobnou strukturu domén jako imunoglobuliny. Jednou z možností je to, že tato struktura je vhodná pro interakce mezi proteiny plasmatické membrány. Takovéto interakce existují na příklad mezi CD4 a MHC II molekulami, CD8 a MHC I, nebo T receptorem a MHC molekulam

Přednáška IV

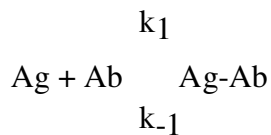
Interakce antigenu s protilátkou

Síla vazby antigen-protilátka:

Mezi antigenem (Ag) a protilátkou (Ab) se uplatňují nekovalentní vazby zahrnující: vodíkové můstky, iontové vazby, hydrofobní vazby a van der Waalsovy síly (obr. 1). Protože jsou tyto vazby slabé, silná interakce Ag-Ab vyžaduje velké množství těchto vazeb. Kromě toho každá z těchto vazeb funguje na velmi malou vzdálenost (méně než $1 \text{ \AA} = 10^{-7} \text{ mm}$), takže silná vazba je podmíněna vysokou komplementaritou mezi Ag a Ab, s čímž souvisí vysoká specifita Ag-Ab interakce.

Protilátková afinita:

Suma jednotlivých nekovalentních interakcí mezi paratopem a epitopem je rovná *afinitě* protilátky pro daný epitop. Protilátky s nízkou afinitou slabě váží Ag a snadno disociují, zatím co Ab s vysokou afinitou váží Ag silněji a déle. Vazba mezi paratopem a epitopem na monovalentním Ag může být popsána rovnicí



kde k_1 je asociační rychlostní konstanta a k_{-1} je disociační rychlostní konstanta. Poměr k_1/k_{-1} je asociační konstanta K , která je měřítkem afinity. Je možno ji spočítat z poměru koncentrací komplexu Ag-Ab ke koncentraci nenavázaného Ag a Ab

$$K = \frac{k_1}{k_{-1}} = \frac{(\text{Ab-Ag})}{(\text{Ab})(\text{Ag})}$$

Ab s nízkou afinitou pro Ag mají hodnoty K mezi $10^4 - 10^5$ l/mol, vysoce afinní Ab mohou mít hodnotu K až 10^{11} l/mol.

Hodnota K se může stanovit pomocí *rovnovážné dialýzy* (obr. 2). Dialyzační komůrka se rozdělí semipermeabilní membránou, která propustí pouze Ag, nikoli Ab. Do jedné části komůrky se dá Ab, do druhé Ag. Ag se radioaktivně označí a po ustavení rovnováhy se měří koncentrace Ag v obou částech komůrky. Koncentrace volného Ag v obou částech je stejná, v části s Ab je navíc Ag navázaný na Ab. Rozdíl v koncentraci Ag v obou částech komůrky vyjadřuje koncentraci Ag vázaného na Ab. Čím vyšší je afinita Ab, tím více Ag je vázáno na Ab. Rovnovážná rovnice se může přepsat do tvaru

$$K = \frac{(\text{Ab-Ag})}{(\text{Ab})(\text{Ag})} = \frac{r}{(n-r)(c)}$$

kde r = poměr koncentrace vázaného Ag k celkové koncentraci Ab, c = koncentrace volného Ag a n = počet vazebných míst v jedné Ab molekule. Výraz může být přepsán do Scatchardovy rovnice

$$\frac{r}{c} = Kn - Kr$$

Hodnoty r a c mohou být získány opakovanou rovnovážnou dialýzou se stejnou koncentrací Ab a různými koncentracemi Ag. Když se pak vynese r/c proti r , směrnice získané přímky je rovna $-K$. Toto platí pro monoklonální protilátku. V případě polyklonálních Ab s různou afinitou je možno vypočítat průměrnou afinitu.

Protilátková avidita:

Když je komplexní Ag nesoucí mnoho epitopů smíchán s protilátkami nesoucími mnoho paratopů, interakce Ab s Ag na jednom místě zvýší pravděpodobnost reakce na dalším místě. Síla takovéto vazby mezi multivalentní protilátkou a antigenem je nazývána *avidita*. Avidita je používána pro polyklonální antiséra na rozdíl od monoklonálních

protilátek. Výsledná avidita séra je mnohem vyšší než pouhý součet afinit jednotlivých protilátek v séru a rovná se jejich součinu.

Skřížená reaktivita:

Potilátka vyvolaná jedním Ag může skříženě reagovat s odlišným Ag. K takovéto skřížené reakci dojde, jestliže odlišné antigeny nesou společný epitop, nebo jestliže se protilátky, specifické pro jeden epitop, vážou na jiný epitop mající podobné chemické vlastnosti. V tomto případě je vazebná afinita Ab pro původní Ag vyšší než pro tento skříženě reagující epitop. Skřížená reaktivita se často vyskytuje mezi polysacharidovými antigeny, které obsahují podobné oligosacharidové zbytky.

Krevně skupinové antigeny (ABO) jsou glykoproteiny exprimované na červených krvinkách. Jedinec, kterému chybí některý z těchto Ag má protilátky proti tomuto chybějícímu Ag. Jedinec s krevní skupinou A má Ab proti B a naopak. Tyto Ab jsou výsledkem expozice skříženě reagujícím antigenům pocházejícím z bakterií běžně se vyskytujících ve střevech.

Řada virů a bakterií má antigenní determinanty identické nebo podobné s epitopy hostitelských buněk. Tyto Ag mohou vyvolat autoimunitní Ab odpověď poškozující vlastní tkáň. Např. *Streptococcus pyogenes* obsahuje ve své buněčné stěně proteinové M antigeny, které mohou skříženě reagovat s antigeny srdečního svalu a dalších kosterních svalů a způsobovat poškození srdečního svalu a ledvin. Skřížená reaktivita mezi kravskými neštovicemi a variolou umožnila vakcinaci proti variole.

Precipitační reakce (obr. 4):

Interakce mezi Ab a rozpustným Ag vytváří síť, která je stabilizována hydrofobními silami, což činí Ab-Ag komplex nerozpustným. Protilátka musí být bivalentní, Ag musí nést dvě nebo více kopií téhož epitopu. Např. myoglobin je dobře precipitován polyklonálními séry ale ne monoklonální protilátkou protože obsahuje mnoho odlišných Ag determinant pouze s jednou kopií každé determinanty.

Precipitace v roztoku:

Kvantitativní precipitační reakce se provádí ve zkumavkách do kterých se přidá konstantní množství Ab a vzrůstající množství Ag. Precipitát se odcentrifuguje a jeho množství se změří. Vynesením množství precipitátu proti zvyšující se koncentraci Ag se získá precipitační křivka, která má vzestupnou část, sestupnou část a zónu ekvivalence, kdy je optimální poměr Ab:Ag. V zóně nadbytku Ab se tvoří malé rozpustné komplexy tvořené několika molekulami Ab vázajícími jednu molekulu Ag. V oblasti nadbytku Ag se váže jedna nebo dvě molekuly Ag k jedné molekule Ab a síť se netvoří. Tato metoda se někdy používá ve formě prstencového testu, kde se antisérum v malé zkumavce

převrství antigenem. Ag i Ab difundují proti sobě a v zóně ekvivalence se vytvoří prstencový precipitát.

Precipitační reakce v gelech:

Ag a Ab difundují proti sobě v agaru a v zóně ekvivalence se vytvoří viditelný precipitát. Imunodifuzní technikou, kdy Ag difunduje z jamky do agaru obsahujícím protilátku, je možno určit neznámou koncentraci antigenu ze standardní křivky získané vnesením průměrů precipitačních kroužků proti log příslušných koncentrací antigenu. Metoda se nazývá Manciniho jednoduchá radiální imunodifuze a rutinně se používá ke kvantifikaci jednotlivých tříd sérových imunoglobulinů, nebo složek komplementu. Citlivost metody je 5-10 µg/ml.

V Ouchterlonyho metodě dvojité imunodifuze (obr. 5) Ag i Ab difundují proti sobě z jamek vyříznutých v agaru a vytvářejí koncentrační gradient. Tato jednoduchá technika umožňuje zjistit vztah mezi antigeny i to, kolik Ab-Ag systémů je přítomno. Pokud se dva Ag umístí do sousedních jamek a jsou testovány proti jednomu séru, získané precipitační linie umožní zjistit, zda tyto Ag sdílejí společný epitop (linie částečné identity), jsou identické (linie identity) nebo zcela odlišné (linie nonidentity).

Imunoelektroforéza (imunoelfo obr. 6) kombinuje elektroforetickou separaci s dvojitou imunodifuzí. Směs antigenů je rozdělena elektroforézou v agaru, pak jsou v agaru ve směru elektrického pole vyříznuty žlábků, které jsou naplněny antisérem. Antigeny a protilátky difundují proti sobě a vytvářejí precipitační linie. Imunoelfo je užívána v laboratořích k detekci přítomnosti jednotlivých proteinů v séru (imunodeficiencie). Je to pouze kvalitativní technika.

Raketová elektroforéza (obr. 7) umožňuje i kvantifikaci antigenu až do koncentrace 20 µg/ml. Negativně nabitý Ag elektroforeticky migruje v gelu obsahujícím Ab. Precipitát má tvar rakety, jejíž výška odpovídá koncentraci Ag. Modifikace raketové elfo nazvaná dvousměrná imunoelektroforéza, umožňuje kvantifikovat několik antigenů ve směsi.

Aglutinační reakce:

Interakce mezi protilátkou a partikulárním antigenem vede ke vzniku viditelných shluků - k *aglutinaci*. Nadbytek Ab inhibuje aglutinační reakci (efekt prozóny).

Hemaglutinační reakce je rutinně prováděna při stanovení krevních skupin. Při neutrálním pH jsou erythrocyty obklopeny negativním iontovým mrakem, takže se navzájem odpuzují (odpudivé síly se nazývají zeta potenciál). IgM může překonat zeta potenciál a vyvolat hemaglutinaci. IgG je mnohem méně efektivní. Hemaglutinace se používá i při stanovení Rh fenotypu.

Produkce sérových Ab při bakteriální infekci se využívá při bakteriální aglutinaci. Aglutinační titr je definován jako recipoká hodnota nejvyššího ředění séra, které ještě

vyvolá aglutinaci. Aglutinační reakce slouží nejen při diagnostice bakteriálních infekcí, ale i k serotypizaci bakterií.

Pasivní hemaglutinace je založena na navázání antigenů na červené krvinky a jejich aglutinaci antisérem proti tomuto Ag. K navázání Ag se užívá taninová kyselina nebo chlorid chromitý. Pasivní hemaglutinace je daleko citlivější než precipitační reakce a může detegovat Ab ještě v koncentraci 0,001 µg/ml.

Inhibice aglutinace je velmi citlivá metoda, umožňující detekci malých množství antigenů. Ag je navázán např. na latexové partikule a v testu je přítomná protilátka proti tomuto Ag, která aglutinuje. Přítomnost totožného Ag ve zkoumaném vzorku inhibuje aglutinaci, protože tento Ag obsadí vazebná místa Ab. Tento test se používá i k průkazu užívání drog (kokain, heroin). Některé viry spontánně hemaglutinují a proto inhibice hemaglutinace sérovými protilátkami může být využita k diagnostice (zarděnky, chřipka).

Radioimunoassay (RIA obr. 8):

RIA je vysoce citlivá technika schopná prokázat pikogramy (10^{-12} g) antigenů nebo protilátek. Rosalyn Yalow dostala za vývoj této techniky v roce 1977 Nobelovu cenu. Principem je soutěžení mezi radioaktivně značeným Ag a neznačeným Ag o vazbu s vysoce afinní Ab. Značí se obvykle ^{125}I (gamma zářič) a značený Ag je smíchán s Ab v takové koncentraci, že právě saturuje vazebná místa na Ab molekule. Přidání neznačeného Ag vede k vytěsnění značeného Ag z vazby na Ab, které je úměrné koncentraci neznačeného Ag. Měření uvolněného značeného Ag umožňuje určit koncentraci neznačeného Ag. Protilátka s navázaným Ag je vyprecipitována z roztoku anti-izotypovým sérem nebo proteinem A ze *Staphylococcus aureus*. Některé metody využívají navázání Ab na pevnou fázi, což mohou být sefárové kuličky nebo mikrotitrační destička. Tato metoda byla použita např. k detekci viru sérové hepatitidy B, což mělo velký význam pro vyřazení infikovaných dárců krve.

Imunoenzymatická metoda:

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) je založena na podobném principu jako RIA a má srovnatelnou citlivost. Místo značení radioizotopem se užívá navázání enzymu na protilátku. Reakce enzymu s bezbarvým substrátem vede k barevnému produktu, jehož množství lze spektrofotometricky měřit. Používají se enzymy peroxidáza, alkalická fosfatáza a další. Existují různé typy ELISA testů, kdy je na destičku navázán Ag nebo Ab a které se liší počtem dalších vrstev. Nepřímá ELISA s vrstvami Ag, sérová Ab, antiizotypová Ab značená peroxidázou se užívá k průkazu sérových protilátek proti HIV.

Western blotting (obr. 9):

Slouží k identifikaci specifického proteinu ve směsi proteinů, nebo protilátky k danému proteinu. V této metodě jsou proteiny elektroforeticky separovány v polyakrylamidovém gelu za přítomnosti dodecylsulfátu sodného. Proteinové proužky jsou elektroforeticky přeneseny na nitrocelulóзовou membránu a jednotlivé proteiny jsou identifikovány protilátkou značenou izotopem nebo enzymem.

Imunofluorescence:

Vazba Ab na Ag je vizualizována označením protilátky fluorochromem. Nejčastěji užívanými fluorochromy jsou fluorescein a rhodamin. Oba mohou být konjugovány s Fc oblastí protilátkové molekuly aniž dojde k poškození antigen-vazebné kapacity. Tyto fluorochromy absorbují světlo určité vlnové délky a emitují světlo o vyšší vlnové délce. Např. fluorescein absorbuje modré světlo (490 nm) a emituje žlutozelené (517 nm). K hodnocení testu se užívají fluorescenční mikroskopy se zdrojem UV záření a excitačními filtry. Imunofluorescence se používá ke studiu buněčných antigenů. V přímé metodě je je fluorochromem značena Ab proti sledovanému Ag, v nepřímé se k vizualizaci této Ab používá značené antiizotypové protilátky nebo značeného proteinu A, nebo je jedna z protilátek konjugována s biotinem a k jejímu průkazu se užije streptavidin konjugovaný s fluorochromem. Nepřímá metoda je citlivější než přímá.

Subpopulace lymfocytů označené protilátkami konjugovanými s fluorochromy mohou být analyzovány a děleny na základě intenzity fluorescence. K separaci buněk se používá přístroj *fluorescence-activated cell sorter (FACS)*, který vychyluje buňky s laserem excitovaným fluorochromem v elektrickém poli (obr. 10).

Imunoelektronová mikroskopie:

Protilátky k buněčným komponentám jsou vizualizovány elektron-densními značkami - feritinem nebo koloidním zlatem. Protože tyto značky absorbují elektrony jeví se jako malé černé tečky. Při značení koloidním zlatem mohou být různé Ab značeny zlatými partikulami různé velikosti, což umožňuje jejich odlišení na snímku.

Hybridomy a monoklonální protilátky

Kohler a Milstein (1975) - fúzovali normální plasmatické buňky s myelomovými buňkami a získali hybridní buňky (hybridomy), které získaly nesmrtelnost od myelomových buněk a schopnost produkovat Ab od plasmatických buněk.

Fúze dvou buněk lze dosáhnout působením viru Sendai nebo častěji polyetylénglykolu, agens, která podporují fúzi buněčných membrán (obr. 11). Vznikne mnohojaderný heterokaryon, jehož jaderné membrány postupně splynou a jedno velké jádro obsahuje chromozomy obou rodičů. Během dělení této hybridní buňky dochází k náhodným ztrátám chromozomů, dokud se buňka nestabilizuje. Pokud dojde ke ztrátě chromozomu potřebného pro přežití, buňka hyne. Hybridomy z myších a lidských buněk postupně ztratí všechny lidské chromozomy. K selekci hybridomových buněk na úkor rodičovských se používá selektivní medium obsahující hypoxantin, aminopterin a thymidin (HAT). Savčí buňky mají dvě dráhy pro syntézu nukleotidů - hlavní a náhradní. Když je hlavní dráha blokována aminopterinem, analogem kyseliny listové, buňky využívají náhradní dráhu katalyzovanou enzymy hypoxantin-guanin fosforibozyl transferázou (HGPRT) a thymidin kinázou. Mutace v kterémkoli z těchto enzymů blokuje tuto náhradní dráhu. HAT medium obsahuje aminopterin k zablokování hlavní dráhy a hypoxantin a thymidin pro náhradní dráhu. Pokud jsou k fúzi použity myelomové buňky s mutací v HGPRT, v HAT mediu rostou pouze hybridomové buňky, protože využívají náhradní dráhu získanou od B lymfocytů. Samotné lymfocyty pouze přežívají několik dnů, in vitro se nedělí.

Produkce monoklonálních protilátek:

Skládá se ze tří základních kroků: (1) konstrukce B hybridomů, (2) testování získaných klonů na produkci protilátky požadované specifity a (3) pomnožení vybraných hybridomů.

Zfúzované buňky se nasazují do jamek mikrotitračních panelů s tzv. feeder buňkami, což jsou nejčastěji peritoneální makrofágy nebo thymocyty. Po 5-10 dnech růstu v HAT mediu jsou viditelné kolonie hybridomových buněk, každá představuje klonální expanzi jedné hybridomové buňky.

K testování hybridomů na produkci požadovaných Ab se nejčastěji užívá technika jako je ELISA (obr. 12) a RIA, které umožňují současné vyšetření velkého počtu vzorků. Úspěšně bývá využita i imunofluorescence.

Pozitivní hybridomy se dále klonují metodou limitního ředění, kdy se buňky naředí tak, aby na jednu jamku mikropanelu připadla asi jedna buňka. Získají se tak klony buněk představující potomstvo jedné buňky a produkující monoklonální protilátky.

Monoklonální protilátky (MAbs) mohou být pak produkovány in vitro kultivací hybridomových buněk v mediu (výtěžek MAbs 10-100 µg/ml), nebo v peritoneu syngenních myší jako ascitické tekutiny (výtěžek MAbs 1-25 mg/ml). MAbs se z ascitické tekutiny purifikují chromatografií.

Produkce lidských monoklonálních protilátek:

Problémem užití myších MAbs u lidí je antiizotypová reakce, která může vést až k alergickým komplikacím. Problémy se získáním lidských MAbs spočívají v imunizaci (pouze in vitro) a absenci vhodných myelomových buněk.

Alternativní cesta je přes infekci B buněk virem Epstein a Barrové, čímž tyto buňky získají vlastnosti nádorových buněk a přitom sekretují požadovanou protilátku. Klonováním těchto transformovaných buněk je možno získat lidské MAbs.

Použití monoklonálních protilátek:

Purifikace proteinů:

Místo opakovaných chromatografií s nízkým výtěžkem je možno využít imunosorbentů, kde je MAb navázána na nějaký nosič (sefárové kuličky) a specificky vychytává antigen ze směsi. Použití takové imunosorbentní kolony k vyčištění hrubého preparátu interferonu vedlo k 5000násobnému zvýšení čistoty.

Identifikace a izolace lymfocytárních subpopulací a klonů:

Protože subpopulace lymfocytů nebo jejich různá diferenciacní stadia nesou na povrchu charakteristické antigeny, mohou být MAbs využity k jejich rozlišení (např. separace CD4+ a CD8+ buněk pomocí FACS). Určitá subpopulace může být ze směsi odstraněna působením MAb a komplementu. *Klonotypické* MAbs rozpoznávají membránové proteiny jedinečné pro určitý lymfocytární klon.

Identifikace nádorových buněk:

Nádorové buňky nesou specifické antigeny, které je odlišují od netransformovaných buněk. MAbs proti těmto antigenům umožňují detekci tumorů, např. metastáz ve velmi časném stadiu. Problémem je však to, že řada tumorů nenesou společný specifický antigen.

Likvidace nádorových buněk:

MAbs společně s komplementem mohou zabíjet nádorové buňky. Pomocí velkých dávek specifických MAbs se podařilo vyléčit pacienta s metastázovaným B lymfomem. V případě, že jsou nádorové buňky rezistentní k lýze zprostředkované komplementem, nádorově specifická MAb se konjuguje s radioizotopem nebo toxinem a vzniklý *imunotoxin* je může rozpoznat a zabít (obr. 13). Užívají se ricin, Shigella toxin a difterický toxin. Každý z těchto toxinů sestává ze dvou nebo více polypeptidových komponent - ze samotného toxinu a ligandy, která se váže na buněčný receptor. Tento vazebný polypeptid je u imunotoxinu zaměněn za protilátkovou molekulu specificky rozpoznávající nádorovou buňku.

Diagnostické reagensy:

Existují stovky MAbs usnadňujících diagnostiku infekčních chorob, monitorování terapeutických léků, detekci diabetu, tumorových buněk, průkaz těhotenství, mapování HLA antigenů atd.

Modifikace monoklonálních protilátek užitím technologie rekombinantní DNA:

Chimerické monoklonální protilátky:

Připraví se rekombinantní DNA obsahující promotor a sekvence pro variabilní oblast protilátky z myšičího protilátkového genu a exony kódující konstantní oblast z genu pro lidskou protilátku. Antigenní specifita odpovídá myšičí protilátce, izotyp je lidský. Tyto chimerické protilátky jsou méně imunogenní, pokud jsou injikovány lidem. Byly připraveny i chimerické MAbs obsahující pouze myšičí CDR, v lidské protilátkové molekule.

Lze také připravit *heterokonjugáty* jako hybridy dvou odlišných protilátkových molekul. Polovina protilátkové molekuly má specifitu pro nádorovou buňku, druhá polovina pro povrchovou molekulu na imunní efektorové buňce (NK buňka, aktivovaný makrofág, Tc lymfocyt). Tyto heterokonjugáty slouží k přemostění efektorových a tumorových buněk.

Příprava monoklonálních protilátek z imunoglobulinových genových knihoven:

Nová technologie přípravy MAbs bez hybridomů a dokonce bez imunizace. K amplifikaci DNA kódující lehké a těžké řetězce Fab fragmentů z hybridomových nebo plazmatických buněk se použije PCR. Knihovny lehkých a těžkých řetězců jsou konstruovány v bakteriofágu lambda. Pomocí restričního enzymu EcoRI jsou připraveny náhodné kombinace lehkých a těžkých řetězců. Tento postup vede ke vzniku obrovské diverzity protilátkových kombinací. Klony obsahující tyto náhodné kombinace se pak testují na specifitu pro vybraný antigen.

Katalytické monoklonální protilátky (abzomy):

Vazba protilátky na antigen je v mnoha směrech podobná jako vazba enzymu na substrát. Enzym využívá své vazebné energie ke stabilizaci tranzičního stavu substrátu a tak snižuje aktivační energii potřebnou pro chemickou modifikaci substrátu. Proto byl připraven komplex haptenu-nosič, ve kterém haptenu strukturálně napodoboval tranziční stav esteru, podléhajícího hydrolyze. Když byly anti-haptenové MAbs inkubovány s esterem, některé urychlovaly hydrolyzu až 1000x. Katalytická aktivita těchto protilátek byla vysoce specifická. Tyto protilátky byly nazvány abzomy. Produkce velkého množství monoklonálních protilátek pomocí imunoglobulinových genových knihoven umožnila získání řady MAbs s katalytickou aktivitou. Předpokládá se, že tímto způsobem se může podařit připravit baterie abzymů, které budou štípat peptidové řetězce ve specifických místech podobně jako restriční enzymy.

T hybridomy:

Jsou připravovány fúzí stimulovaných T buněk s nádorovými T buňkami (thymomové buňky) podobně jako B hybridomy. T hybridomy sekretují interleukíny nebo mají cytotoxickou aktivitu. Konstrukce T hybridomů přispěla k poznání struktury a funkce interleukinů, T receptorů a dalších T-specifických molekul.

Přednáška V

Organizace a exprese imunoglobulinových genů

Sekvence B lymfocytové maturace a antigenem indukované diferenciace jsou na obr. č. 1. Genetický model odpovídající imunoglobulinové struktuře musí vysvětlovat následující skutečnosti:

- a) obrovskou diverzitu protilátkových specifit (asi 10^8 specifit)
- b) přítomnost variabilní oblasti na N konci a konstantní oblasti na C konci těžkých a lehkých řetězců
- c) přítomnost různých izotypů se stejnou antigenní specifitou.

Existovaly dvě teorie na uspořádání imunoglobulinových genů:

Podle *germinální* reorie genom obsahuje velký repertoár Ig genů dostatečný pro tvorbu 10^8 Ab specifit.

Podle *somatické variační* teorie obsahuje genom relativně malé množství Ig genů z nichž se velký počet Ab specifit vytváří v somatických buňkách mutačními nebo rekombinačními mechanismy.

V roce 1965 Dryer a Bennett předložili model, podle kterého každý těžký nebo lehký řetězec kódují dva oddělené geny, z nichž jeden kóduje variabilní a druhý konstantní část. Tyto dva geny se pak spojují na úrovni DNA, aby vytvořili informaci, která je dále přepsána a vede k syntéze lehkých a těžkých proteinových řetězců. Podle této teorie obsahuje germinální linie stovky tisíc genů kódujících V oblast, ale pouze několik genů pro C oblast. Spojení V a C oblastí se uskutečňuje na úrovni DNA. Představa dvou genů kódujících jeden polypeptid neodpovídala všeobecně přijímanému principu jeden gen -

jeden polypeptid. Vývoj nových technik (m-RNA purifikace, restriční endonukleázy, hybridizace nukleových kyselin, Southern blotting, klonování a sekvenování DNA, transfekce a transgeneze) potvrdil tuto teorii.

První potvrzení hypotézy Dryera a Bennetta poskytly pokusy Tonegawy a Hozumiho (1976). Fragmenty DNA z embryonálních a myelomových buněk rozdělili elektroforézou a hybridizovali s radioaktivní m-RNA pro kapka řetězec. Zatím co 2 restriční fragmenty z embryonální DNA hybridizovaly s m-RNA sondou, u myelomové DNA hybridizoval pouze jeden fragment. Z toho vyplývá, že v embryonálních buňkách jsou V a C geny vzdálené a oblast mezi nimi obsahuje restriční místo. V plazmatických buňkách je DNA přeskupena tak, že V a C úseky jsou blíže.

Kapka a lambda řetězce a těžké řetězce jsou kódovány oddělenými multigenními rodinami umístěnými na odlišných chromozomech (např. u člověka je gen pro lambda řetězec na chromozomu 22, pro kapka řetězec na chr. 2 a pro těžké řetězce na chr. 14). Každá z těchto rodin obsahuje skupinu kódujících sekvencí nazvaných genové segmenty. Kapka a lambda rodiny obsahují genové segmenty L, V, J a C, rodina těžkých řetězců obsahuje segmenty L, V, D, J a C. Funkční Ig geny se vytvářejí během maturace B buněk v procesu, kde se genové segmenty přeskupují a dostávají se k sobě. Genový segment L kóduje krátký signální nebo uváděcí (leader) peptid, který vede těžké a lehké řetězce endoplazmatickým retikulem a před složením Ig molekuly je odštipnut.

Multigenová rodina lambda řetězce (obr. 2):

Gen pro variabilní oblast obsahuje dva kódující segmenty V a J, které jsou v germinální DNA odděleny. Multigenová rodina obsahuje 2 V segmenty, 4 J segmenty a 4 C segmenty. Segmenty J4 a C4 jsou defektní pseudogeny. V a J segmenty kódují variabilní oblast, C segmenty kódují konstantní oblasti tří subtypů lambda řetězců.

Multigenová rodina kapka řetězce (obr. 2):

Obsahuje asi 300 V genových segmentů, každý má svou leader sekvenci. Dále je zde 5 J segmentů (jeden z nich je nefunkční pseudogen) a jeden C segment.

Multigenová rodina těžkých řetězců (obr. 2):

Obsahuje 300-1000 V genových segmentů, dále asi 12 D segmentů (tento segment kóduje aminokyseliny v CDR3 a protože se výrazně podílí na diverzitě Ab molekul, byl označen D), 4 J segmenty a skupinu C genových segmentů. Každý C segment kóduje konstantní oblast určitého izotypu. Genové segmenty konstantní části těžkých řetězců obsahují skupiny exonů a intronů, každý exon kóduje jednu doménu těžkého řetězce. C_H genové segmenty jsou uspořádány v pořadí C_μ - C_δ - C_{γ3} - C_{γ1} - C_{γ2b} - C_{γ2a} - C_ε - C_α. Toto pořadí není náhodné a odpovídá postupnému výskytu Ig tříd během imunitní odpovědi.

Přeskupení genů variabilní oblasti:

Uskutečňuje se během zrání B buněk v kostní dřeni. Nejdříve se přeskupují geny variabilní oblasti těžkých řetězců, pak geny pro variabilní oblast lehkých řetězců. V této době už je dána antigenní specifita příslušné B buňky. K přeskupení genů pro konstantní oblast těžkých řetězců dochází později bez vlivu na Ag specifitu protilátky. I když k přeskupování genů pro variabilní oblast dochází v předem určeném pořadí, dochází k náhodným jevům, jejichž výsledkem je náhodné určení Ab specifity.

V-J přeskupení v DNA pro lehké řetězce (obr. 3):

Během přeskupování lambda genových segmentů se může V1 genový segment spojit s J1 nebo J3, nebo V2 segment s J2 segmentem. V případě kapa řetězce se může libovolný z 300 V genových segmentů spojit s jedním ze 4 funkčních J segmentů. Přeskupené geny pro lambda a kapa řetězce obsahují krátký L segment, pak intron, dále spojené VJ segmenty, zase intron a nakonec C segment. Nad L segmentem je promotorová sekvence. Přepisem sekvence pro lehký řetězec vzniká primární RNA transkript, z něhož jsou následně odstraněny introny a m-RNA pak opouští jádro, váže se na polyribosomy a je přeložena do proteinové struktury lehkého řetězce (obr. 4).

V-D-J přeskupení v DNA pro těžké řetězce (obr. 5):

Vytvoření funkčního genu pro těžký řetězec vyžaduje dvojí přeskupení ve variabilní oblasti. D segment se nejdříve připojí k J segmentu, vzniklý DJ segment se pak přiblíží k V segmentu a spojí se s ním. Struktura přeskupěného genu kódujícího V_H oblast zahrnuje L segment, intron, VDJ segment, další intron a skupinu C genových segmentů.

Nejdříve se přepisují jak C_μ, tak C_δ genové segmenty. Při enzymatickém zpracování primárního transkriptu jsou odstraněny introny a vznikají dvě m-RNA kódující buďto C_μ nebo C_δ. Protože jsou v jedné buňce produkovány dvě odlišné m-RNA pro těžké řetězce, imunokompetentní B buňka exprimuje na svém povrchu IgM a IgD s identickou Ag specifitou.

Mechanismus přeskupování DNA pro variabilní oblast:

Byly objeveny rekombinační signální sekvence (RSS) na okrajích germinálních V, D a J genových segmentů. Každá RSS obsahuje konzervovanou heptamerickou a nonamerickou (bohatou na AT) sekvenci. Tyto sekvence byly nalezeny na obou stranách D segmentů, na 3' straně V segmentů a 5' straně J segmentů. Nonamerické a heptamerické sekvence jsou odděleny sekvencí nazvanou *spacer*, která má konzervovanou pouze délku - 12 nebo 23 párů bazí. Je zajímavé, že RSS mající spacer o 12 párech bazí se může spojit pouze se sekvencí obsahující 23 párový spacer. Toto tzv. 12/23 spojovací pravidlo

zajišťuje, že se V_L segmenty spojí pouze s J_L segmenty a ne s jiným V_L segmentem a že V_H , D_H a J_H segmenty se spojí ve správném pořadí.

Spojování genových segmentů (obr. 6):

Existují dva typy spojování - deleční a inverzní. Při obou typech spojování se vytvoří klička DNA, ve které se rekombinační signální sekvence dostávají do blízkosti. V případě delečního typu spojování enzym rekombináza rozpozná strukturu kličky, vystřihne ji a spojí V a J segmenty. Když jsou transkripční orientace V a J segmentů opačné, vytvoření kličky zahrnuje inverzi a orientuje oba segmenty do stejného směru transkripce (5'→3'). V tomto případě nedojde k deleci.

Spojování V - D - J segmentů je do jisté míry flexibilní (obr. 7) v tom smyslu, že do přeskupené sekvence mohou přijít jeden nebo dva nukleotidy místo tří. Potom není zachována tripletová čtecí kostra a vytvoří se stop kodony, což vede k tomu, že toto přeskupení je neproduktivní. Neproduktivní přeskupení se vyskytuje s vysokou frekvencí. Na druhé straně flexibilita přeskupování přispívá k vytváření diversity protilátkových specifit. Pokud se jedna alela přeskupí neproduktivně, buňka přeskupí druhou alelu. Produktivní přeskupení V - D - J segmentů těžkého řetězce je podmínkou pro přeskupení V - J segmentů lehkých řetězců. Kapa řetězec se přeskupuje první. Pokud je toto přeskupení neproduktivní pro obě alely, přeskupují se geny pro lambda řetězec. Pokud jsou obě přeskupení neproduktivní, B buňka přestane žít.

Vyloučení alel (allelic exclusion):

B buňky jsou diploidní a obsahují mateřské i otcovské chromozomy. B buňky však exprimují přeskupené geny pro těžké řetězce pouze z jednoho chromozomu. Totéž platí pro lehké řetězce. To zaručuje, že funkční B buňka nikdy neobsahuje víc než jednu $V_H D_H J_H$ a jednu $V_L J_L$ sekvenci. To znamená, že po jednom produktivním přeskupení genů pro těžké a lehké řetězce se enzymy zodpovědné za přeskupování vypnou a k dalšímu přeskupování nedojde. Jako signál k zastavení dalšího přeskupování zřejmě funguje exprimovaný protein kódovaný již přeskupenou DNA.

Jako jiné promotory, Ig promotory obsahují vysoce konzervovanou sekvenci bohatou na AT, nazvanou TATA box, ke které se váže RNA polymeráza II. Po V - D - J a V - J přeskupení se zvyšuje rychlost transkripce. Je to způsobeno vlivem enhanceru, což je DNA sekvence působící v cis a nějakým způsobem usnadňující vytvoření iniciačního komplexu pro transkripci v místě promotoru. Během přeskupování se promotor dostává do blízkosti enhanceru což zvyšuje rychlost transkripce příslušných sekvencí 10.000x.

Přeskupení DNA umožňující přesmyk imunoglobulinových tříd:

Po antigenní stimulaci B buňky může dojít k dalšímu přeskupení DNA pro těžké řetězce, při kterém se $V_H D_H J_H$ sekvence může spojit s kterýmkoli z C_H genových segmentů.

Tohoto procesu se zřejmě účastní tzv. přesmyková místa (switch sites) lokalizovaná před jednotlivými C_H segmenty. Předpokládá se, že na tato místa se mohou vázat rekombinázové proteiny specifické pro jednotlivé Ig třídy a tak usnadňovat rekombinaci DNA. Přesmyk Ig třídy může být indukován některými cytokíny (např IL-4 indukuje přesmyk z C_{μ} na $C_{\gamma 1}$ nebo C_{ϵ}). Přesmyk je provázen delecí sekvencí kódujících předcházející typy C řetězců, které byly prokázány v cirkulární formě.

Exprese imunoglobulinových genů:

K produkci funkční m-RNA je třeba enzymatické zpracování primárního transkriptu. Po navázání 7-metylguanosinu na 5' konci a polyadenylaci 3' konce dojde k excisi intronů v procesu nazvaném *RNA splicing*. m-RNA je pak exportována z jádra a dochází k její translaci na polyribosomech.

Odlišné zpracování primárních transkriptů pro těžké řetězce vysvětluje produkci na membránu vázané a sekretované formy imunoglobulinů i současnou expresi IgM a IgD.

Sekvenování C genového segmentu ukázalo, že $C_{\mu 4}$ exon obsahuje na svém 3' konci sekvence kódující hydrofilní sekvence $C_H 4$ domény sekretovaného IgM. Za tímto exonem jsou však další dva exony M1 a M2, které kódují transmembránový a cytoplasmatický segment C 4 domény u IgM vázaného na buněčnou membránu (obr. 8). Primární transkript obsahuje všechny exony C segmentu včetně M1 a M2. Produkce sekretované nebo membránové formy imunoglobulinu závisí na zpracování společného primárního transkriptu. Čili jestli dojde k odštěpení M1 a M2 exonů, nebo zůstanou součástí m-RNA.

Podobně je tomu u současné exprese IgM a IgD (obr. 9). Transkripce přeskupených genů pro těžké řetězce ve zralých B buňkách produkuje primární transkripty obsahující C_{μ} i C_{δ} genové segmenty. Čili primární transkript $VDJC_{\mu C_{\delta}}$ je zpracován dvěma cestami za vzniku $VDJC_{\mu}$ a $VDJC_{\delta}$.

m-RNA pro lehké a těžké řetězce jsou překládány na odlišných polyribosomech endoplazmatického retikula (obr. 10). Nově syntetizované řetězce obsahují signální (leader) sekvenci, která vede řetězec do lumen ER a je potom odstřižena. Ke spojení lehkých a těžkých řetězců a jejich glykosylaci dochází když řetězce procházejí přes cisterny ER do Golgiho aparátu a pak do sekrečních váčků, které fúzí s plazmatickou membránou. V případě IgM se H a L řetězce spojují v ER a tvoří poloviční molekuly, které se potom spojují do kompletní molekuly. U IgG se nejdříve spojují těžké řetězce a k nim se pak připojí lehké.

Diferenciace B buněk v souvislosti s přeskupením genů a alternativním zpracováním RNA (obr. 11):

Ke zrání B buněk dochází ve dvou fázích, z nichž první je nezávislá na antigenu, druhá je antigen-dependentní. V první fázi kmenová buňka diferencuje na progenitorovou B buňku a pak na zralou imunokompetentní B buňku. Během této fáze dochází k přeskupení V_H a V_L genových segmentů. Zralá B buňka opouštějící kostní dřev má na membránu vázané imunoglobuliny jedné Ag specifity. Jestliže se zralá B buňka setká s Ag, dojde k její klonální expanzi za vzniku plazmatických a paměťových buněk.

Nejnežralejší odlišitelná B buňka - progenitorová B buňka exprimuje specifický antigen B220. V tomto stadiu dochází k přeskupení D_H-J_H . V dalším stadiu dojde k přeskupení $V_H-D_H-J_H$ a vzniku pre-B buňky. V tomto stadiu se uskutečňuje vyloučení alel. Gen pro těžký řetězec je přepsán do primárního transkriptu obsahujícího $V_H D_H J_H C_{\mu} \delta$.

Diferenciální zpracování tohoto primárního transkriptu produkuje m-RNA, která kóduje membránovou formu těžkého řetězce. Pak dojde k přeskupení V_L-J_L a vzniká nezralá B buňka. Přeskupování začíná na kappa segmentu, pokud je neproduktivní, přesune se na lambda segment. Další diferenciace nezralých B buněk vede k koexpresi IgD a IgM na membráně, což charakterizuje zralé B buňky.

Po setkání s Ag dochází ke klonální selekci a dalšímu zrání B buněk na plazmatické a paměťové buňky. Paměťové buňky mohou prodělat přesmyk vedoucí k expresi nového izotypu na membráně (t.j. IgG, IgA nebo IgE). Některé paměťové buňky exprimují jeden izotyp, zatímco jiné dva (jeden z nich je vždy IgM).

Plazmatické buňky nemají membránový Ig ale sekretují velké množství Ab molekul.

Vznik protilátkové diverzity (obr. 12):

DNA germinální linie obsahuje asi 300 V kappa genových segmentů, 300-1000 V_H segmentů, ale pouze dva V lambda genové segmenty. K diverzitě přispívají i $J_L D_H$ a J_H segmenty, které se vyskytují v několika formách. K další diverzifikaci dochází kombinováním segmentů při přeskupování. 300-1000 V_H segmentů kombinuje s 12 D_H segmenty a 4 J_H segmenty, t.j. $300 \times 12 \times 4 = 1,4 \times 10^4$ kombinací. Podobně 300 V kappa genových segmentů kombinuje se 4 J kappa segmenty což vede k $1,2 \times 10^3$ možným kombinacím.

Protože specifita Ab pro Ag je určena variabilními oblastmi H i L řetězců, další diverzita vzniká kombinací H a L řetězců. $1,4 \times 10^4 \times 1,2 \times 10^3 = 1,7 \times 10^7$ možných kombinací kappa řetězce s těžkými řetězci.

Tato diverzita je dále zvýšena díky flexibilitě procesu spojování. Idkyž tato flexibilita vede k mnoha neproduktivním přeskupením, zvyšuje Ab diverzitu vznikem produktivních kombinací kódujících alternativní aminokyseliny v místě spojení. Tato místa se nacházejí v třetí hypervariabilní oblasti (CDR3), z čehož vyplývá velký vliv těchto AK

záměn na Ab diverzitu. V průměru vytváří tato flexibilita 3 různé AK na každé spojovací místo. Protože tato místa jsou dvě pro těžké řetězce, je diverzita H řetězců takto zvýšena 9x, zatímco u lehkých řetězců pouze 3x. Flexibilita spojování tedy zvyšuje celkový počet kombinací pro H řetězce $1,4 \times 10^4 \times 3 \times 3 = 1,3 \times 10^5$ a pro lehké kapa řetězce $1,2 \times 10^3 \times 3 = 3,6 \times 10^3$.

Hranice mezi spojenými V-D a D-J segmenty obsahuje tzv. N-oblasti, kam jsou během spojování genových segmentů náhodně připojovány nukleotidy deoxynukleotidyl transferázou. Takto vytvořená diverzita je dosti značná, protože N-oblasti obsahují zcela náhodné sekvence a jsou lokalizovány v CDR3 těžkých řetězců.

Další diverzita se vytváří v přeskupených variabilních oblastech *somatickými mutacemi*, kdy jsou jednotlivé nukleotidy nahrazovány alternativními bázemi. Porovnání variabilních oblastí germinální DNA s těmito oblastmi u somatických buněk prokázalo somatické mutace v genech pro L i H řetězce. Odhadnutá frekvence somatických mutací v imunoglobulinových genech je 10^{-3} mutací/pár bází/buněčné dělení, což je 10^6 x více než v jiných genech, což ukazuje na predispozici B buněk k somatickým mutacím.

Je zajímavé, že během vývoje imunitní odpovědi od primární přes sekundární k terciární atd. se zvyšuje afinita protilátek. I když je proces somatických mutací náhodný a může produkovat Ab s vyšší nebo nižší afinitou, schopnost antigenu řídit klonální expanzi selektivně zvyšuje proliferaci B buněk s vysoce afinními receptory na povrchu.

Přednáška VI

Hlavní histokompatibilní komplex

Je to soubor 40-50 genů seřazených v dlouhém úseku DNA na chromozomu 6 u lidí a chr. 17 u myši. Hlavní histokompatibilní komplex (MHC) se u lidí nazývá HLA komplex a u myši H-2 komplex.

MHC geny jsou organizovány do oblastí kódujících tři třídy MHC molekul: MHC I, MHC II a MHC III. MHC I geny kódují glykoproteiny exprimované na povrchu téměř všech jaderných buněk a prezentují peptidové antigeny potřebné pro aktivaci T_C lymfocytů. MHC II kódují glykoproteiny exprimované na Ag prezentujících buňkách, které nabízejí zpracované antigenní peptidy T_H buňkám. MHC III geny kódují poněkud odlišné produkty spojené s imunitními procesy (složky komplementu, enzymy, tumor nekrosis faktor). Molekuly MHC I jsou kódovány K a D oblastmi u myši a A, B a C oblastmi u lidí. Molekuly MHC II jsou kódovány I oblastí u myši a D oblastí u lidí. Úseky (loci) tvořící MHC jsou vysoce polymorfní, to znamená, že v každém lokusu existuje mnoho alternativních forem (alel) jednoho genu. MHC lokusy jsou těsně vázané (rekombinační frekvence pouze 0,5%). Každý jedinec dostane dva soubory alel, od každého rodiče jeden. Každý soubor alel se označuje jako haplotyp. Čili jedinec dědí jeden haplotyp od otce, druhý od matky. V outbrední populaci je potomstvo geneticky heterozygotní a kodominantně exprimuje jak mateřské, tak otcovské alely. U inbredních myši je každý H-2 lokus homozygotní, protože otcovský a mateřský haplotyp jsou identické a celé potomstvo exprimuje identické haplotypy.

Určité kmeny myši byly označeny jako prototypové a jimi exprimované haplotypy byly náhodně označeny indexy (H-2^a, H-2^b, H-2^d atd). Tři různé inbrední linie myši mohou mít stejný haplotyp, ikdyž se liší v genech vně H-2 komplexu.

Dědičnost a exprese MHC II molekul je komplikována tím, že tyto molekuly obsahují dva odlišné peptidické řetězce (α a β), které jsou kódovány odlišnými lokusy v IA a IE podoblastech H-2 komplexu. F₁ potomstvo získané křížením dvou inbredních kmenů nenexprimuje pouze rodičovské MHC II molekuly, ale také hybridní molekuly obsahující řetězce od obou rodičů.

MHC kongenní myši kmeny:

Dva kmeny jsou kongenní, jestliže jsou geneticky identické kromě jednoho loku nebo oblasti. Kongenní kmeny lišící se pouze v MHC komplexu mohou být připraveny serií křížení, zpětných křížení a selekcí. Kromě odlišnosti v celém H-2 komplexu dochází během produkce kongenních kmenů ke crossing-overu přímo v H-2 komplexu a pak se získané rekombinantní kmeny liší od rodičovských v jednom nebo několika lokusech H-2 komplexu.

Mapování MHC:

Serologické testy:

Když se buňky z jednoho inbredního kmene injikují do geneticky odlišného kmene, dojde k produkci Ab proti MHC epitopům. Pokud jsou tyto epitopy jedinečné pro daný haplotyp, nazývají se privátní, pokud jsou společné několika haplotypům, označují se jako obecné (public). Pomocí specifických antisér k MHC antigenům byly

identifikovány jednotlivé MHC produkty a bylo zjištěno, zda jsou kódovány oddělenými lokusy.

Funkční testy:

Jestliže se zvíře imunizuje alogenními buňkami (z geneticky odlišného jedince stejného druhu), vytvoří se CTL specifické pro MHC molekuly na alogenních buňkách. Aktivita CTL se měří buňkami zprostředkovanou lymfolýzou (CML). Slezinné lymfocyty z imunizovaného zvířete se inkubují s alogenními buňkami značenými ^{51}Cr . Množství uvolněného ^{51}Cr je mírou cytotoxicity. CML provedená s kongenními kmeny lišícími se v různých oblastech MHC ukázaly, že zabíjení alogenních buněk CTL je podmíněno rozdíly v K nebo D oblasti H-2 komplexu.

Podobně mohly imunní CTL zabíjet virem infikované buňky, pouze když efektorové a cílové buňky měly stejné K nebo D oblasti MHC I.

Funkční testy na MHC II antigeny využívají funkci těchto molekul v prezentaci Ag T_H buňkám. Bylo zjištěno, že morčata, ale i myši, odlišně odpovídají na některé jednoduché antigeny jako např. DNP-polylysin. Morčata mohla být rozdělena na "odpovídače" a "neodpovídače", přičemž se zjistilo, že odpovídavost je řízena jedním dominantním genem, resp. genovou oblastí. Tato oblast byla označena jako Ir a dnes se ví, že zahrnuje dvě podoblasti IA a IE.

MHC II molekuly hrají také úlohu v T buněčné proliferaci jako reakci na antigeny alogenních buněk. Jestliže se smísí in vitro lymfocyty ze dvou inbredních kmenů myší, začnou proliferovat. Intenzita této smíšené lymfocytární reakce (MLR) se měří pomocí inkorporace ^3H thymidinu do proliferujících buněk. Ve dvoucestné MLR proliferují obě populace lymfocytů, v jednocestné je jedna populace inhibována ozářením nebo mitomycinem C. Provedení jednocestné MLR s kongenními rekombinantními kmeny ukázalo, že nejdůležitější je rozdíl mezi kmeny v I oblasti. MLR totiž měří proliferaci T_H buněk.

Molekulární mapování:

Byly připraveny cDNA klony kódující MHC I, II a III molekuly. Pozice jednotlivých MHC genů byla zjištěna pomocí restričních endonukleáz. Mapování HLA komplexu prokázalo 40-50 genů v 3500 kb úseku DNA. Velké množství genů třídy I bylo nalezeno vně MHC komplexu. V lidské DR oblasti bylo objeveno několik funkčních genů kódujících beta řetězec, přičemž každý z nich může být exprimován společně s genem pro alfa řetězec. Tím se zvyšuje počet Ag prezentujících molekul na jedné buňce.

Geny a molekuly MHC I:

Molekuly MHC I obsahují velký alfa řetězec nekovalentně vázaný s mnohem menší β_2 mikroglobulinovou molekulou. Alfa řetězec je kódován geny A, B a C oblastí HLA komplexu a K a D/L oblastí myšího H-2 komplexu. U myši jsou MHC I molekuly též kódovány geny v Qa a Tla oblastech, ležících těsně pod H-2 komplexem.

MHC I molekuly prezentují Ag peptidy T_C lymfocytům. Jsou na všech jaderných buňkách, ale v různé hustotě. Nejvíce je jich na lymfocytech, kde tvoří asi 1% proteinů plazmatické membrány (5×10^5 molekul na buňku). Velmi málo MHC I Ag exprimují fibroblasty, svalové buňky nebo hepatocyty.

K izolaci MHC I molekul lze použít detergentu (Nonidet P-40), který extrahuje tyto molekuly v nerozpustné formě. Druhou metodou je užití papainu, který odštípne hydrofilní část molekuly. Tyto produkty se pak izolují afinitní chromatografií vazbou na lektin a precipitují specifickou protilátkou.

Struktura MHC I molekul:

Těžký alfa řetězec je polymorfní transmembránový glykoprotein o m.h. 45kDa, β_2 mikroglobulin je invariantní protein (12 kDa), kódovaný geny na odlišném chromozomu. Pro expresi MHC I molekul na buněčné membráně je nutné spojení alfa řetězce s β_2 mikroglobulinem. Alfa řetězec je ukotven v membráně hydrofobním transmembránovým segmentem a hydrofilním cytoplazmatickým koncem. Alfa řetězec je organizován do tří domén, z nichž každá obsahuje asi 90 AK. Velikost a organizace β_2 mikroglobulinu je podobná jako u externí domény. Ukázalo se, že existuje značná homologie mezi alfa 3 doménou, β_2 mikroglobulinem a doménami konstantní oblasti imunoglobulinů.

Alfa 1 a alfa 2 domény interagují a vytvářejí štěrbinu $25 \times 10 \times 11$ Å, která je zřejmě vazebným místem pro prezentovaný peptid (velikost odpovídá peptidu o 10-20 AK). Díky své struktuře jsou MHC I molekuly a β_2 mikroglobulin klasifikovány jako členové velké imunoglobulinové rodiny. Alfa 3 doména je vysoce konzervovaná a obsahuje sekvence rozpoznávané CD8 molekulami T lymfocytů. Zdá se, že vazba peptidu na alfa 1/alfa 2 domény umožňuje alfa 3 doméně interagovat s β_2 mikroglobulinem.

Geny a molekuly MHC II:

MHC II molekuly obsahují dva odlišné polypeptidické řetězce označené alfa a beta. Oba jsou kódované D oblastí HLA a I oblastí H-2 komplexu. I oblast je rozdělena na podoblasti IA a IE, D oblast se dělí na DP, DQ a DR. Každá z těchto podoblastí obsahuje nejméně jeden alfa a jeden beta gen. MHC II molekuly jsou exprimovány pouze určitými buňkami imunitního systému, makrofágy, dendritickými buňkami, thymovými epiteliálními buňkami, B buňkami a aktivovanými lidskými T buňkami.

Struktura MHC II molekul:

MHC II molekula obsahuje 33 kDa alfa řetězec a 28 kDa beta řetězec, které jsou spojeny nekovalentními vazbami. S tímto heterodimerem je dočasně spojen invariantní Ii řetězec během transportu k plasmatické membráně. Každý řetězec obsahuje dvě domény, alfa 1 a alfa 2, beta 1 a beta 2. Alfa 2 a beta 2 domény vykazují sekvenční homologii s imunoglobuliny a proto jsou MHC II antigeny též řazeny do velké imunoglobulinové rodiny. Alfa 1 a beta 1 domény tvoří štěrbinu pro zpracovaný Ag.

MHC III molekuly:

Zahrnují několik složek komplementu, dva steroidní 21-hydroxylázové enzymy a TNF α a β .

Techniky míchání genů a cílené mutagenesy (site-directed mutagenesis) ukázaly, že pro rozpoznání T_C buňkami jsou nezbytné alfa 1 i alfa 2 domény MHC I molekul, pro rozpoznání T_H buňkami alfa 1 a beta 1 domény. Záměna jedné Al₁ v alfa 1/2 doméně už inhibuje rozpoznání antigenu T_C buňkou. Transfekce MHC II genů do myších L buněk (neexprimují MHC II) ukázala, že odlišné haplotypy se liší ve schopnosti prezentovat Ag T_H buňkám.

Regulace exprese MHC molekul:

U Ag prezentujících buněk závisí exprese MHC II na stadiu diferenciaci buňky (pre B buňky neobsahují MHC II, zralé B buňky ano). Interferony α , β , γ a TNF zvyšují expresi MHC I. IFN γ také zvyšuje MHC II expresi. Exprese MHC může být snížena kortikosteroidy nebo prostaglandiny. Sníženou expresi MHC I mohou způsobit i infekce některými viry (adenoviry). Některým maligním nádorovým buňkám zcela chybí MHC I molekuly, což jim umožňuje uniknout T_C buňkám.

MHC a imunitní odpověď:

Imunitní odpověď k exogenním Ag měřená produkcí sérových Ab je řízena MHC II geny. Podle modelu "výběru determinanty" se různé MHC II molekuly liší ve schopnosti vázat zpracovaný Ag. Bylo skutečně prokázáno, že afinita jednotlivých IA a IE molekul různých haplotypů koreluje s typem MHC II restrikce u "odpovídajících" myších kmenů.

Podle modelu "děř v repertoáru T buněk" mohou být T buňky nesoucí receptory pro cizí Ag, které se podobají vlastním antigenům, eliminovány během zrání v thymu.

Polymorfismus MHC I a II molekul:

Lokusy kódující MHC I a II molekuly jsou nejvíce polymorfní mezi geny vyšších obratlovců. V rámci druhu existuje obrovské množství alel od každého lokusu. Odhaduje se

existence více než 100 alel pro každý lokus. Tento enormní polymorfismus vede k obrovské diverzitě MHC proteinů v rámci druhu. Uvažujeme-li 100 různých alel pro každý gen, pak teoretická MHC diverzita je

$$100(K) \times 100(A\alpha) \times 100(A\beta) \times 100(E\alpha) \times 100(E\beta) \times 100(D) = 10^{12}$$

Porovnání AK sekvencí různých alelických MHC molekul kódovaných jedním lokusem ukázalo 5-10% rozdíly. To odpovídá rozdílům v genech kódujících určitý enzym u různých druhů zvířat. Sekvenční variabilita mezi MHC molekulami není náhodně rozmístěna podél peptidického řetězce, ale vyskytuje se ve shlucích většinou v alfa 1 a alfa 2 doménách MHC I a alfa 1 a beta 1 doménách MHC II. Lokalizace těchto polymorfních AK v předpokládaných vazebných místech pro zpracovaný Ag zřejmě ovlivňuje schopnost různých MHC molekul interagovat s tímto Ag.

MHC a infekční choroby:

Bylo zjištěno, že určité choroby jsou spojeny s určitými MHC alelami. Patří sem autoimunitní choroby, citlivost k virovým infekcím, poruchy komplementového systému, různé druhy alergií.

Např. když hlavní epitopy určitého patogena napodobují určité MHC molekuly, jedinci mohou chybět příslušné T lymfocyty. Kromě toho představují některé MHC molekuly vazebná místa pro viry, bakterie či jejich produkty. Snížení MHC polymorfismu v rámci druhu může predisponovat druh k určité chorobě. Gepardi jsou na příklad citlivější k virovým infekcím než jiné velké kočky, což může souviset s malými populacemi gepardů vytvářejícími malou MHC diverzitu. Tato malá diverzita s sebou přináší omezení v množství různých zpracovaných antigenů, s nimiž mohou interagovat MHC molekuly.

MHC a prezentace antigenu:

Shlukování polymorfních AK ve vazebném místě pro Ag umožňuje interagovat s různými zpracovanými peptidy. Vazba peptidu na MHC molekulu nemá charakter jemné specifity vazby protilátky na epitop, avšak jistá specifita zde existuje. Tato široká, ale selektivní interakce mezi agretopem a MHC umožňuje vazbu různých antigenních peptidů, jejichž struktura nese určité společné rysy, na tutéž MHC molekulu. Avšak protože každá jednotlivá MHC molekula selektivně váže pouze některé peptidy, repertoár MHC alel zděděný jedincem určuje, které peptidy mohou být prezentovány T buňkám.

Spojování a transport MHC molekul:

MHC I molekuly váží antigenní peptidy uvnitř ER, zatímco MHC II molekuly v lysosomech. Protože buňky prezentující antigen exprimují jak MHC I tak MHC II, musí

existovat nějaký mechanismus bránící vazbě stejných peptidů na MHC I a MHC II. Během syntézy MHC II molekul v ER, se tyto molekuly spojují s invariantním Ii řetězcem, který interaguje se štěrbinou, na kterou se váže antigenní peptid. Tím zabraňuje, aby se endogenní peptidy vázaly na MHC II pokud jsou v ER. Ii řetězec je kromě toho také využíván ke směřování MHC II molekul k lysozomům, kde je zpracováván exogenní Ag. Po ztrátě Ii řetězce v lysozomech vážou MHC II molekuly zpracované peptidy a přemísťují se k buněčné membráně.

T buněčný receptor

Po tom, co se prokázalo, že T buněčný receptor (TCR) nemá charakter imunoglobulinů a že má zřejmě variabilní oblast (reaguje s některými antiidiotypovými protilátkami), bylo důležité zjištění, že je restringován MHC antigeny. Tato restrikce byla objevena v roce 1974 Zinkernagelem a Dohertym a spočívala v tom, že T_C buňky rozpoznávaly virem infikované buňky pouze v případě, že virové antigeny byly prezentovány společně s MHC I antigeny stejného haplotypu jako T_C buňky.

Byly navrženy dva modely pro rozpoznávání Ag T receptorem. Duální model předpokládal, že T buňky mají dva oddělené receptory, jeden pro Ag, druhý pro MHC I nebo MHC II. Druhý model (altered-self model) předpokládal jeden receptor schopný rozpoznat cizí Ag v komplexu s MHC molekulou. Pokusy s fúzí dvou T buněk s

odlišnou specifitou pro Ag i s odlišným restringujícím haplotypem ukázaly, že platí druhý model předpokládající rozpoznání komplexu Ag-MHC.

Identifikace TCR byla umožněna přípravou tzv. klonotypických monoklonálních protilátek (MAbs), které byly specifické pro určitý klon T lymfocytů a nereagovaly s jinými T klony. Pomocí klonotypických MAbs byl z membránové frakce T lymfocytů vyprecipitován glykoprotein, obsahující dva řetězce spojené disulfidickým můstkem. Dále bylo zjištěno, že TCR alfa a beta řetězce podobně jako Ig řetězce mají variabilní a konstantní oblast. Později byl objeven jiný TCR heterodimer složený z gama a delta řetězců, který je exprimován pouze na 2-5% T buněk.

Organizace a přeskupování TCR genů germinální linie:

Sekvenování nukleotidů TCR genů germinální linie ukázalo značnou podobnost s multigenovou organizací imunoglobulinových genů.

Multigenové rodiny germinální DNA kódují každá jeden TCR řetězec. Funkční TCR geny jsou produkovány přeskupováním zahrnujícím V a J segmenty u alfa řetězce a V, D a J segmenty u beta řetězce. Je zajímavé, že gen pro delta řetězec je lokalizován mezi V a J segmenty. Při produktivním přeskupení segmentů alfa řetězce dojde k delecí genu pro delta řetězec, což zajišťuje, že jedna T buňka nemá současně $\alpha\beta$ a $\gamma\delta$ receptor.

Myši germinální DNA obsahuje 75-100 $V\alpha$ a 50 $J\alpha$ genových segmentů a jeden $C\alpha$ segment. Delta genová rodina obsahuje 10 V segmentů, dva D, dva J a jeden C segment. Genová rodina pro beta řetězec má asi 30 V genových segmentů, a dvě seskupení D, J a C segmentů, z nichž každé obsahuje jeden D, 6 J a jeden C segment. Gen pro gama řetězec sestává ze 7 V exonů a tří funkčních J-C dvojic.

Přeskupení genových segmentů kódujících TCR je podobné jako u imunoglobulinových genů. Byly prokázány rekombinační signální sekvence a jejich párování podle pravidla 12/23 a ukázalo se, že T a B buňky zřejmě využívají stejné rekombinázové systémy. Jedním z modelů umožňujících studium spojování V, D, J genových segmentů jsou tzv. SCID myši, kterým chybí funkční T a B buňky. Tyto myši s těžkou kombinovanou imunodeficiencí mají poruchu v přeskupování D-J genových segmentů, při kterém dochází k delecí J segmentu.

Vznik TCR diverzity:

I když jsou TCR kódovány mnohem menším počtem V exonů než Ig molekuly, je diverzita TCR dokonce vyšší než u imunoglobulinů. TCR mají totiž mnohem více J segmentů a je zde vyšší příspěvek dalších diversifikačních mechanismů (alternativní spojování D segmentů, flexibilita spojování a připojování nukleotidů v N oblastech).

Orientace rekombinačních signálních sekvencí umožňuje nejen spojování V-D-J, ale i V-J nebo V-D-D-J kombinace. Tato variabilita není možná u imunoglobulinových genů.

Diverzifikace v N oblasti probíhá v genech pro všechny 4 typy TCR řetězců. Připojení až 6 nukleotidů v každém spojovacím místě vede k 5461 možným kombinacím nukleotidů. Kromě toho se zde uplatňuje podobná flexibilita spojování genových segmentů jako u imunoglobulinů. Podle odhadů je možno vytvořit až 10^{13} různých AK sekvencí jen na základě diverzifikace v N oblasti a flexibility spojování. TCR geny však zřejmě nepostihují somatické mutace.

TCR musí rozpoznávat jak velké množství zpracovaných antigenů, tak relativně menší množství vlastních MHC molekul. Zdá se, že omezený počet germinálních V segmentů vytváří diverzitu potřebnou pro rozpoznání MHC molekul, zatím co enormní diverzita vytvářená v oblastech spojování genových segmentů umožňuje rozpoznávání antigenu.

Struktura T buněčných receptorů:

Doménová struktura TCR ho řadí do velké imunoglobulinové rodiny. Oba řetězce TCR heterodimeru vykazují vysokou AK variabilitu na N konci, zatím co C konce jsou konzervované. Jednotlivé domény obsahují klíčky o 60-75 AK. Variabilní oblast TCR má strukturu skládaného listu a byly zde nalezeny tři oblasti určující komplementaritu (CDR) podobně jako u Ig. V genové segmenty kódují CDR 1 a CDR 2, CDR 3 je kódována oblastmi s vysokou diverzitou spojení. Přeskupené TCR geny také obsahují krátkou L (leader) sekvenci. Konstantní oblasti TCR jsou kódovány C segmenty a jejich exony korespondují se strukturálními doménami proteinových řetězců. Je zde oblast pantu (hinge region), transmembránová a cytoplazmatická oblast.

T akcesorní membránové molekuly:

Tyto přidružené molekuly fungují při rozpoznávání Ag jako adhezivní molekuly nebo předávají signál od TCR do cytoplazmy. Jsou členy velké Ig rodiny nebo integrinové rodiny.

TCR-CD3 membránový komplex:

CD3 molekula je těsně spojena s $\alpha\beta$ nebo $\gamma\delta$ heterodimerem a její exprese je podmínkou pro expresi TCR. Mutace v genech pro CD3 nebo TCR vede ke ztrátě komplexu CD3-TCR na buněčné membráně.

CD3 je komplex 5 polypeptidů: gama, delta a epsilon v komplexu buď s homodimerem dvou zeta řetězců, nebo s heterodimerem zeta-eta. CD3 molekula zřejmě přenáší do buňky signál o rozpoznání Ag T receptorem a tak přispívá k aktivaci T buňky. Anti-CD3 MAb aktivuje T lymfocyty bez přítomnosti Ag.

CD4 a CD8 akcesorní molekuly:

CD4 a CD8 jsou spojeny v membráně s TCR a fungují jako adhezivní molekuly. Zřejmě zvyšují aviditu interakce TCR-Ag/MHC komplex. Bylo zjištěno zesílení vazby TCR-Ag až 100x, takže T buňky mohou odpovídat na 100x nižší hladiny Ag-MHC než v nepřítomnosti CD4, CD8 molekul.

CD4 je 55 kDa glykoprotein obsahující ve své struktuře 4 domény imunoglobulinového typu. CD8 je menší glykoprotein mající jen jednu extracelulární doménu. CD8 je exprimován jako homodimer, heterodimer nebo v multimerní formě.

Další akcesorní molekuly CD2 a LFA-1:

CD2 je adhezivní 50 kDa glykoprotein exprimovaný na většině thymocytů, periferních T buňkách a velkých granulárních lymfocytech. Obsahuje 2 domény Ig typu. Jeho fyziologickou ligandou je LFA-3, též člen velké Ig rodiny. Interakce CD2-LFA-3 usnadňuje vazbu T_H buňky na buňku prezentující Ag, T_C lymfocytů na cílové buňky a thymocytů na epitelie v thymu. CD2 se váže na glykoprotein na beraních erytrocytech což umožňuje separaci lidských T buněk tvorbou rozet s krvinkami. CD2 též funguje jako molekula přenášející aktivační nebo inhibiční signál.

LFA-1 je člen integrinové rodiny a váže se na jinou adhezivní molekulu ICAM-1, která se vyskytuje na T,B buňkách, makrofágách, dendritických buňkách a thymových epitelích. Stabilizuje interakci T buněk s cílovou nebo Ag prezentující buňkou.

MHC restrikce a tolerance k vlastním antigenům:

Při přeskupování genů pro všechny 4 typy TCR řetězců vzniká TCR diverzita převyšující číslo 10^{13} . Tato obrovská diverzita germinálního repertoáru musí být podrobena selekci vedoucí k tomu, že pouze těm T buňkám, které rozpoznávají Ag + vlastní MHC, je dovoleno dozrát. Ke zrání a selekci progenitorových T lymfocytů dochází v thymu. Nejprve dochází k pozitivní selekci buněk schopných vázat vlastní MHC molekuly, následuje negativní selekce T lymfocytů s vysokou afinitou pro vlastní MHC molekuly nebo vlastní antigeny prezentované v kontextu s vlastními MHC. Tím se získá MHC restrikce a současně tolerance k vlastnímu. Pozitivní selekce zahrnuje interakci nezralých thymocytů s epiteliálními buňkami thymové kůry. Tyto nezralé thymocyty exprimují TCR-CD3 komplex a CD4 i CD8 akcesorní molekuly. Protože současně exprimují CD4 a CD8, říká se jim "dvojitě pozitivní" thymocyty. Neschopnost rozeznat vlastní MHC vede u těchto buněk k programované buněčné smrti (apoptóza). MHC restringované thymocyty nesoucí vysoce i nízkou afinitu TCR podlévají negativní selekci v thymové dřeni. Thymocyty s vysoce afinními TCR interagují s makrofágy a dendritickými buňkami a jsou eliminovány. Mechanismus této eliminace není znám. Zdá se, že pozitivní i negativní selekci přežívají pouze thymocyty s TCR s nízkou afinitou k MHC.

Vývoj T buněk:

Progenitorové buňky jsou naváděny do thymu chemotaktickými faktory sekretovanými thymovými epitelii. Podobně jako u B buněk koreluje diferenciaci T buněk s přeskupováním germinálních TCR genů a expresí různých povrchových znaků. Na rozdíl od B buněk zahrnuje diferenciaci T buněk různé vývojové linie dávající vznik funkčně odlišným subpopulacím zralých T buněk. Po vstupu do thymu exprimují progenitorové T buňky Thy-1 antigen, který je u myši znakem pro všechny lymfocyty prošlé thymem. Nejprve nemají fetální thymocyty detegovatelné CD4 a CD8 a nazývají se "dvojitě negativní". Ty, které prodělaly produktivní přeskupení gama a delta řetězců, se vyvíjejí na dvojitě negativní CD3⁺ buňky, které tvoří 0,5-1% thymocytů.

Většina dvojitě negativních thymocytů se však diferencuje odlišným způsobem. Přeskupují TCR geny pro beta řetězec a exprimují CD4 a CD8 antigeny, pak exprimují celý TCR-CD3 komplex. Většina z těchto dvojitě pozitivních thymocytů v thymu hyne. Thymocyty prošlé selekcí se dále diferencují na CD4⁺ thymocyty reprezentující 10% celé thymocytové populace a CD8⁺ thymocyty tvořící 5% thymocytové populace. 0.5% tvoří CD4-CD8⁻ TCR⁺ thymocyty.

Mezi CD4⁺ T buňkami, které mají T_H funkci, byly nedávno objeveny dvě subpopulace. T_H1 subpopulace produkuje IL-2, IFN a lymfotoxin, pomáhá polyklonální B aktivaci, suprimuje Ag specifickou B odpověď, zprostředkuje oddálený typ přecitlivělosti (DTH) a buněčnou cytotoxicitu. T_H2 subpopulace produkuje IL-4 a IL-5, pomáhá polyklonální i Ag specifické aktivaci B buněk, nesuprimuje, nefunguje v DTH ani buněčném zabíjení. Ukázalo se, že tyto funkčně odlišné subpopulace se liší i v expresi dvou diferenciacních antigenů CD45 a CDw29.

Ačkoli $\gamma\delta$ T buňky tvoří 1-3% T buněk v lymfoidních orgánech, reprezentují hlavní T buněčnou populaci v kůži, intestinálním (intraepiteliální lymfocyty) a plicním epitelu. V kůži jsou tyto buňky známy jako "dendritické epidermální buňky". Na rozdíl od $\alpha\beta$ T buněk $\gamma\delta$ T buňky neregulují a zůstávají fixovány v tkáních. Aktivace $\gamma\delta$ T buněk je nezávislá na prezentaci antigenu MHC molekulami. Navíc $\gamma\delta$ T buňky nesou množství receptorů NK buněk, což jim umožňuje rychle reagovat na infikované nebo transformované buňky. Často rozpoznávají nepeptidické pyrenyl pyrofosfáta, tzv. fosfoantigeny. Tyto antigeny se mohou nacházet na nádorových buňkách, mykobakteriích nebo malarických plasmodiích. $\gamma\delta$ T lymfocyty také rozpoznávají stresové antigeny buněčného původu nebopolymorfní MHC-like molekuly (CD1) prezentující lipidy (podobnost s NKT buňkami). Funkce těchto buněk je zatím nejasná. Některé mohou fungovat v nerestringované lýze nádorových buněk, přisuzuje se jim též úloha v likvidaci poškozených vlastních buněk a některých invadujících mikrobů.

T buněčná odpověď na alogenní histokompatibilní antigeny:

Odhojení štetu je přímou reakcí T buněk na alogenní MHC molekuly (díky polymorfismu MHC v rámci druhu). Obecně CD4⁺ T buňky reagují s MHC II, CD8⁺ odpovídají na MHC I aloantigeny. Přímá reakce T buněk s povrchovými buněčnými aloantigeny se zdá popírat představy, že T buňky rozpoznávají pouze antigeny prezentované v komplexu s vlastními MHC antigeny. Aloantigeny jsou však rozpoznávány přímo, bez zpracování a prezentace. Frekvence aloreaktivních T lymfocytů je vysoká (1-5% všech T buněk), mnohem vyšší než frekvence T buněk reagujících s komplexem Ag-MHC.

Vysvětlením pro tento paradox je to, že T buňky specifické pro Ag-MHC, skříženě reagují s určitými MHC haplotypy, čili že cizí MHC molekuly svou strukturou napodobují zpracovaný peptid vázaný na vlastní MHC molekulu. Protože alogenní buňky exprimují řádově 10⁵ MHC I molekul na buňku, mohou se na tento vysoký počet molekul vázat T buňky se skříženě reagujícími nízkoafinními receptory. Cizí zpracovaný Ag, který je řídce rozmístěn a membráně prezentující buňky, může být rozpoznán pouze T lymfocyty s vysoce afinními receptory. Existují experimentální důkazy, že antigen-specifické T klony mohou být současně aloreaktivní.

Přednáška VII

Cytokiny

Cytokiny jsou sekretovány různými buňkami zahrnutými v imunitní odpovědi a působí na cílové buňky nesoucí receptory pro daný cytokin. Jednotlivé cytokiny mohou působit *autokrinně* na stejnou buňku, která je sekretovala, nebo *parakrinně* na sousední buňky, nebo *endokrinně* a pak se váží na vzdálené buňky. Vazba cytokinu na buněčný

receptor přenáší signál do buňky a vede k aktivaci a expresi genů. Cytokiny regulují intenzitu a trvání imunitní odpovědi stimulací a inhibicí proliferace různých buněk nebo sekrece Ab nebo jiných cytokinů těmito buňkami.

Působení cytokinů je *pleiotropní*, to znamená, že vyvolávají různé biologické aktivity u různých cílových buněk. Jsou také *redundantní* v tom, že různé cytokiny mohou mít podobnou funkci, což ztěžuje popis funkce jednotlivých cytokinů. Dva cytokiny mohou působit *synergicky*, což značí, že jejich společný účinek je větší, než součet účinků jednotlivých cytokinů. Jindy vykazují *antagonismus*, kdy účinek jednoho cytokinu inhibuje účinek jiného. Účinek jednoho cytokinu na buňku obvykle reguluje expresi cytokinového receptoru a expresi dalších cytokinů, které působí na jiné buňky. Např. cytokiny produkované aktivovanými T_H buňkami mohou ovlivňovat aktivitu B buněk, T_C buněk, NK buněk, makrofágů, granulocytů, hemopoetických kmenových buněk a tím aktivovat celou síť interagujících buněk.

Určitá nespecifita (ve srovnání se specifitou protilátek či T receptorů) v působení cytokinů je nahrazena přísnou regulací exprese cytokinových receptorů na buňkách. Často jsou tyto receptory exprimovány na buňce až po její interakci s Ag. Tím je nespecifická lymfokinová aktivace omezena na lymfocyty, které se setkaly s Ag. Jiným mechanismem udržujícím specifitu je požadavek na vzájemný kontakt buněk, aby se vytvořily účinné koncentrace cytokinu.

K poznání struktury a funkce cytokinů přispělo objevení nádorových buněk sekretujících cytokiny. To poskytlo možnost získat homogenní populace buněk, sekretujících cytokiny ve větším množství, než kultury lymfoidních buněk. Dalším pokrokem byl objev buněčných linií, jejichž růst byl závislý na určitém cytokinu. Když bylo popsáno velké množství cytokinů na základě svého účinku, zjistilo se, že často jsou popisovány různé aktivity téhož faktoru. Byla proto vytvořena standardizovaná nomenklatura, v níž většina cytokinů byla označena jako *interleukiny* aby se zdůraznila jejich úloha v komunikaci mezi leukocyty.

Protože biochemická purifikace nebyla schopná poskytnout dostatečná množství vyčištěných cytokinů, umožnilo jejich charakterizaci až klonování a exprese cytokinových genů.

Struktura a funkce cytokinů a jejich receptorů:

Interleukin 1 (IL-1):

Přišlo s na něj tak, že thymocyty mohly být stimulovány k proliferaci T mitogenem PHA pouze po přidání media z aktivovaných makrofágů. Faktor produkovaný makrofágy byl nejdříve nazván LAF (lymfocyty aktivující faktor), později byl přejmenován na IL-1.

IL-1 je produkován řadou buněk zahrnujících monocyty, makrofágy, B lymfocyty, dendritické buňky, fibroblasty, Langerhansovy buňky, neutrofilny, epiteliální a endotelové buňky. IL-1 je těmito buňkami produkován pouze po jejich stimulaci. Jako stimulus pro produkci IL-1 může sloužit fagocytóza bakterií. Lipopolysacharid (LPS) z buněčné stěny gramnegativních bakterií sám indukuje IL-1. Také fagocytóza pevných částic a komplexů Ab-Ag-C stimuluje produkci IL-1 makrofágy stejně jako řada dalších látek jako složky komplementu nebo $IFN\gamma$. Aktivované T_H buňky mohou také indukovat IL-1 produkci makrofágy membránovou interakcí mezi TCR a komplexem MHC-Ag nebo uvolněním určitých cytokinů, jako jsou M-CSF, $IFN\gamma$ nebo $TNF\beta$. Během 3 hodin po stimulaci makrofágů jsou uvolňována velká kvanta IL-1.

Ukázalo se, že IL-1 aktivitu mají dva polypeptidy 17 kDa, které se liší nábojem. Jsou kódovány nezávislými geny a je mezi nimi 27% homologie. IL-1 také existuje vázaný na buněčné membráně a aktivuje T buňky při membránové interakci.

Hlavní úlohou IL-1 je aktivace T_H buněk, které vyžadují dva typy aktivačních signálů. Specifický signál vzniká při interakci TCR s Ag-MHC II. Tento signál nestačí k indukci T_H proliferace a je třeba dalšího kostimulačního signálu. Ten je předán vazbou IL-1 na příslušný receptor na T_H membráně. tyto dva signály indukují v T_H buňkách transkripci genů pro IL-2, IL-2 receptor, IL-3, IL-4 a $IFN\gamma$.

IL-1 je značně pleiotropní ve svém účinku. Urychluje zrání a klonální expanzi B buněk po Ag indukované aktivaci. Zvyšuje aktivitu NK buněk a ovlivňuje lokální zánětlivou reakci. Po podání IL-1 in vivo neutrofilny opouštějí kostní dřeň, vstupují do cirkulace a pronikají přes stěny kapilár do tkání. IL-1 má na neutrofilny a makrofágy chemotaktický účinek. Kromě toho má IL-1 endokrinní efekt a indukuje produkci proteinů akutní fáze jaterními hepatocyty. Působí též na nervový systém a vyvolává horečku, ospalost a nechutenství.

Interleukin 2 (IL-2):

Byl objeven na základě zjištění, že kondiciovaná media z T buněk aktivovaných PHA byla schopná udržet proliferaci T buněk v kultuře (původně byl pojmenován jako růstový faktor T buněk). Tento faktor poprvé umožnil získat klony normálních T buněk. Jeho testování umožnil objev IL-2 dependentních buněčných linií.

Hlavním producentem IL-2 jsou aktivované T_H buňky. Během 24-48 hod. po aktivaci začínají T_H buňky syntetizovat a sekretovat IL-2 a současně exprimovat vysoce afinní membránový receptor pro IL-2.

IL-2 receptor je tvořen dvěma subjednotkami, 55 kDa subjednotkou a 75 kDa subjednotkou. Obě subjednotky mohou vázat IL-2 s různou afinitou. Alfa subjednotka s nízkou, beta se střední afinitou. heterodimer má vysokou afinitu k IL-2.

NK buňky konstitutivně exprimují beta subjednotku. Aktivované T_H buňky exprimují jak vysoce afinní, tak nízko afinní IL-2 receptory. Je asi 5×10^3 vysoce afinních a asi 10x více nízko afinních receptorů na jedné T_H buňce.

IL-2 má zásadní úlohu ve spuštění proliferace T buněk (T_H i T_C) aktivovaných mitogenem nebo antigenem. Po vazbě na vysoce afinní IL-2 receptor je IL-2 rychle internalizován a spouští T buněčnou proliferaci. Na IL-2 odpovídají pouze T buňky aktivované antigenem, protože klidové T buňky neexprimují vysoce afinní IL-2 receptor. Dokud dochází k interakci mezi T receptorem a komplexem Ag-MHC, je stimulována exprese IL-2 receptoru. Jakmile se interakce přeruší, začne se snižovat exprese IL-2 R. Čili regulací exprese vysoce afinního IL-2 receptoru je modulována klonální expanze zprostředkovaná IL-2.

Interleukin 3 (IL-3):

Aktivované T_H buňky produkují množství kolonie stimulujících faktorů, které podporují růst a diferenciaci různých krvetvorných buněk. Faktor, který působí nejdříve, je multi-CSF, stimulující multipotentní hemopoetické buňky. Tento faktor byl přejmenován na IL-3 a kromě vlivu na krvetvorbu přispívá k lokální zánětlivé reakci, stimuluje růst žírných buněk a sekreci histamínu.

Interleukin 4 (IL-4):

Má také široké spektrum biologických účinků na různé typy cílových buněk. Např. vykazuje různý efekt na různá diferenciacní stadia B buněk. Na klidové B buňky působí jako aktivační faktor (zvyšuje jejich velikost a expresi MHC II). Po aktivaci antigenem nebo mitogenem působí jako růstový faktor. U proliferačních B lymfocytů působí jako diferenciacní faktor tím, že reguluje přesmyk na izotypy IgG_1 a IgE .

Interleukin 5 (IL-5):

Podobně jako IL-4 stimuluje proliferaci a diferenciaci B buněk. Zvyšuje produkci IgA a indukuje růst a diferenciaci eosinofilů.

Interleukin 6 (IL-6):

Je produkován aktivovanými T_H buňkami, makrofágy, monocyty a fibroblasty. U nádorových buněk funguje autokrinně a stimuluje buněčnou proliferaci. Stimuluje sekreci imunoglobulinů plazmatickými buňkami a společně s IL-1 působí jako kostimulátor aktivity T_H buněk.

Interleukin 7 (IL-7):

Indukuje diferenciaci kmenových buněk na progenitorové B buňky. Zvyšuje expresi IL-2 a IL-2 receptoru na klidových T buňkách a tím indukuje T proliferaci.

Interleukin 8 (IL-8):

Je primárně sekretován monocyty a má různé účinky na neutrofile. Za jeho přítomnosti neutrofile adheřují k endotelním cév a migrují z krve do tkání proti koncentračnímu spádu IL-8 (aktivní jsou nanogramové koncentrace).

Interleukin 9 (IL-9):

Je sekretován určitými T_H klony. Podporuje proliferaci T_H buněk za nepřítomnosti antigenu. Může fungovat jako autokrinní růstový faktor u T_H2 buněk.

Interleukin 10 (IL-10):

Je důležitým regulačním cytokinem nazvaným *inhibiční faktor cytokinové syntézy*. Je sekretován subpopulací T_H2 buněk a potlačuje produkci cytokinů T_H1 subpopulací. T_H1 subpopulace sekretuje IL-2 a IFN γ a účastní se aktivace makrofágů a oddálené přecitlivělosti. Subpopulace T_H2 sekretuje IL-4 a IL-5 a spouští humorální protilátkovou odpověď. Tím, že inhibuje T_H1 subpopulaci, hraje IL-10 centrální úlohu v regulaci humorální a buněčné odpovědi.

Interferony (IFN):

Jsou to glykoproteiny produkované různými typy buněk, které interferují s virovou replikací a pomáhají regulovat imunitní odpověď. IFN α je tvořen leukocyty, IFN β je produkován fibroblasty. IFN γ je sekretován T lymfocyty po jejich antigenní nebo mitogenní aktivaci. Všechny tři typy jsou uloženy z virem infikovaných buněk a vyvolávají antivirovou rezistenci u sousedních buněk. IFN γ má pleiotropní aktivity včetně zvyšování funkční aktivity makrofágů, T_C buněk, T buněk angažovaných v DTH a NK buněk. Velmi zajímavým efektem IFN je zvýšení exprese MHC I a MHC II antigenů. Zvýšená exprese MHC II u makrofágů je činí efektivnějšími v prezentaci Ag. IFN γ antagonizuje účinek IL-4 na přesmyk protilátkových tříd.

Tumor necrosis factor (TNF) alfa a beta:

TNF α je produkován makrofágy jako reakce na endotoxin. Má přímý cytotoxický účinek na nádorové buňky, ale ne na normální buňky. Má také důležitou úlohu ve vývoji zánětlivé odpovědi.

Jeho produkce však může poškozovat hostitele. Bylo zjištěno, že za rozsáhlý úbytek váhy (cachexie), provázející některé bakteriální a parazitické infekce a tumory je zodpovědný

právě $\text{TNF}\alpha$ dříve označovaný jako cachetin. Tento cytokin se též účastní bakteriálního toxického šoku.

Dalším chemicky příbuzným polypeptidem sekretovaným aktivovanými T buňkami je lymfotoxin, nyní označený jako $\text{TNF}\beta$. Podobně jako $\text{TNF}\alpha$ zabíjí nádorové buňky, nepoškozuje normální buňky.

Sekrece cytokinů subpopulacemi T_H buněk:

Obě T_H1 a T_H2 subpopulace produkují pouze IL-3 a GM-CSF, v produkci ostatních cytokinů se liší. T_H1 subpopulace může být zodpovědná za odpověď na virové infekce, protože sekretuje IL-2, který aktivuje T_C buňky a $\text{IFN}\gamma$, který má antivirovou aktivitu. T_H2 subpopulace se zřejmě účastní odpovědi na parazitické infekce a vyvolává alergické reakce, protože IL-4 a IL-5 indukují produkci IgE a aktivaci eosinofilů. U lidí nebyly tyto subpopulace pozorovány.

Úloha cytokinů v aktivaci lymfocytů:

Aktivace T lymfocytů:

Klidové T lymfocyty jsou necyklující buňky v G_0 fázi buněčného cyklu. Po aktivaci vstupují do buněčného cyklu přes G_1 fázi do S fáze, ve které se replikuje DNA. Aktivace klidových T buněk z G_0 do časné G_1 vyžaduje dva tzv. kompetenční signály. První vzniká při interakci komplexu Ag-MHC s TCR, druhý je kostimulační signál IL-1. Po transdukcii signálů přes plazmatickou membránu dojde k transkripci řady genů včetně genů pro IL-2 a IL-2 receptor. Následující vazba IL-2 na svůj receptor slouží jako progresivní signál, který umožňuje přechod T buňky z G_1 do S fáze.

Aktivace B lymfocytů:

Klidové B lymfocyty jsou aktivované antigenem a různými cytokiny produkovanými T_H buňkami. Kromě vazby Ag na protilátkové receptory jsou nezbytné kostimulační signály IL-1 a IL-4. Aktivace může být dosaženo též působením B mitogenu LPS nebo pomocí anti-IgM, který se váže na membránový IgM, oba tyto stimuly však musí působit společně s IL-4. Interakce Ag s membránovým protilátkovým receptorem slouží jako kompetenční signál, který uvede klidovou B buňku z G_0 fáze do časné G_1 , ve které je schopna odpovědět na IL-4 signál. Interakce s IL-4 působí jako kompetenční signál uvádějící B buňku do pozdní G_1 fáze. IL-4 také funguje jako progresivní signál umožňující přechod buňky do S fáze.

Úloha cytokinů v zánětlivé odpovědi:

V odpovědi na infekci nebo poškození tkáně dochází ke kaskádě nespecifických jevů známých jako odpověď akutní fáze. Pod vlivem cytokinů dochází k adherenci zánětlivých

buněk na vaskulární endotel a k jejich migraci do tkáně. Výsledkem je příliv lymfocytů, neutrofilů, monocytů, eosinofilů, basofilů a žírných buněk do místa poškození a účast těchto buněk v likvidaci antigenu.

Systemická odpověď zahrnuje vývoj horečky, zvýšenou syntézu hormonů jako ACTH a hydrokortizonu, leukocytózu a produkci proteinů akutní fáze. Zvýšená teplota inhibuje růst patogenů a zvyšuje imunitní odpověď. C-reaktivní protein se váže na mikroby a aktivuje komplement.

Akutní fáze zánětlivé reakce je zahájena aktivací tkáňových makrofágů a uvolněním tří cytokinů: $\text{TNF}\alpha$, IL-1 a IL-6. Tyto cytokiny působí synergicky a indukují množství lokálních i systémových změn. Pod jejich vlivem dochází ke koagulaci a zvýšení propustnosti cév. $\text{TNF}\alpha$ a IL-1 zvyšují expresi adhezivních molekul na cévních endoteliích. Oba cytokiny také působí na makrofágy a indukují produkci IL-8, který zvyšuje adhezi neutrofilů k endotelovým buňkám a současně funguje jako jejich chemotaktický faktor. $\text{IFN}\gamma$ chemotakticky přitahuje makrofágy, $\text{IFN}\gamma$ a $\text{TNF}\alpha$ aktivují makrofágy a neutrofilů.

Společné působení IL-1, $\text{TNF}\alpha$ a IL-6 vyvolává teplotu, TNF vyvolává sekreci kolonie stimulujících faktorů endoteliálními buňkami a makrofágy.

Syntéza $\text{TNF}\alpha$, IL-1 a IL-6 je indukována různými stimuly jako viry endotoxinem a cytokiny samotnými. $\text{TNF}\alpha$ a IL-1 vzájemně indukují svou expresi nebo expresi IL-6.

Cytokiny a choroby:

Úloha nadprodukce cytokinů v patogenéze může být ilustrována septickým šokem. K vývoji šoku dochází během několika hodin po infekci některými gramnegativními bakteriemi jako *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* aj. Symptomy bakteriálního septického šoku, který je často smrtelný, je pokles krevního tlaku, teplota, průjem a rozsáhlé srážení krve v různých orgánech. Nepomáhá léčba konvenčními antibiotiky. Za šok zodpovídá nadprodukce IL-1 a $\text{TNF}\alpha$ makrofágy stimulovanými endotoxinem. Zdá se, že by se mohlo podařit odvrátit šok injekcí monoklonálních protilátek proti těmto cytokinům. Podobně by mohl fungovat rekombinantní antagonist IL-1 receptoru, jehož účinnost byla potvrzena u králíků.

Řada mikroorganismů produkuje toxiny, které fungují jako superantigeny a stimulují T buňky bez ohledu na jejich antigenní specifitu. Superantigeny se váží současně na MHC II molekulu a V doménu T receptoru a aktivují celé rodiny T buněk. Zatím co pouze $1/10^4$ - $1/10^6$ T buněk odpovídá na konvenční antigeny, $1/4$ - $1/20$ T buněk reaguje se superantigeny. Nadprodukce cytokinů stimulovaná superantigeny jako jsou toxiny *Staphylococcus aureus* nebo *Streptococcus pyogenes* vyvolává onemocnění z otravy potravinami nebo fatální toxický šok.

Nekontrolovaná produkce lymfokinů hraje úlohu i u některých nádorových onemocnění. Některé B myelomy sekretují IL-6, který slouží jako autokrinní stimulant jejich růstu. Buňky infikované virem lidské T buněčné leukemie konstitutivně exprimují IL-2 a IL-2 receptor, což je stimuluje k proliferaci.

Cytokinová terapie:

Experimentálně bylo prokázáno zvýšení přežívání transplantátů podáním MAbs proti IL-2 receptoru. T_H aktivace byla též blokována klonovaným rozpustným IL-1 receptorem. Odhojení transplantátu bylo potlačeno cytokiny konjugovanými s různými toxíny. Aktivita IL-2 byla úspěšně blokována jeho analogem, který při zachování vazebné aktivity na receptor ztratil biologickou aktivitu.

Naopak u některých imunodeficiencí byly úspěšně použity rekombinantní IL-2, $IFN\gamma$ a $TNF\alpha$.

Kultivace různých populací NK buněk nebo T_C buněk za přítomnosti vysokých koncentrací IL-2 vedla k vývoji vysoce účinných protinádorových efektorů označovaných jako LAK (lymphokine-activated killer).

Cytokinová terapie by mohla být účinná i při léčbě alergií. Selektivní inhibice přesmyku na IgE by mohla mít příznivý efekt u alergiků.

Problémem je nutnost dosažení vysokých lokálních koncentrací cytokinů a jejich velmi krátký poločas.

Vývoj humorální imunitní odpovědi

Během 24 hod. po aktivaci se B buňky zvětšují na lymfoblasty, replikují svou DNA a pak se dělí. Následuje 8-9 cyklů buněčného dělení, každý cyklus trvá 12-15 hod. Pro tuto klonální expanzi je třeba účasti T_H buněk. Výsledkem je diferenciaci na plazmatické a paměťové buňky. Jestliže se B buňka nepotká se specifickým Ag, hyne během několika dnů (až 90% z 10^8 B buněk v periferních lymfatických orgánech). Tyto buňky jsou průběžně nahrazovány B buňkami z kostní dřeně (2×10^7 imunokompetentních buněk za den).

Primární odpověď:

Kinetika primární odpovědi měřená hladinou sérových Ab závisí na druhu Ag a způsobu imunizace. Po lag fázi, během níž dochází ke klonální selekci a diferenciaci na plazmatické a paměťové buňky a která trvá 3-4 dny, je dosaženo vrcholu plazmatických buněk za 4-5 dnů a vrcholu Ab v séru 5.-7. den po podání Ag. První je sekretován IgM, pak IgG. Trvání primární odpovědi závisí na perzistenci Ag (obvykle dny až týdny).

Sekundární odpověď:

Paměťové buňky vzniklé během primární odpovědi zastavují dělení v G_0 fázi. Některé perzistují po celý život jedince (původní antigenní hřích - imunizace chřipkovou vakcínou ukázala, že ve vyšším titru byly vytvořeny Ab proti jinému než vakcinačnímu kmenu, který infikoval imunizované osoby v mládí). Kromě paměťových B buněk jsou pro vývoj sekundární odpovědi potřebné paměťové T buňky. Sekundární odpověď se vyvíjí rychleji, dosahuje vyšších titrů a trvá déle. Produkované Ab mají vyšší afinitu a kromě IgM zahrnují další třídy imunoglobulinů.

Experimentální systémy:

Tvorba Ab může být studována in vitro při kultivaci lymfocytů ve vhodných mediích s fetálním telecím sérem.

Jednotlivé plazmatické buňky mohou být prokazovány in vitro Jerneho plakovou metodou, která má podobný princip jako virový plakový test.

Ze sleziny myši imunizované beranými krvinkami (SRBC) se připraví buněčná suspenze, smísí se s agarem a nadbytkem SRBC a vyleje na Petriho misku. Během inkubace 1 hod při 37°C difundují Ab produkované plazmatickými buňkami do agaru a váží se na SRBC v jejich okolí. Pak se přidá morčecí sérum obsahující komplement, což vede k lýze

SRBC obalených protilátkou. To se projeví světlým plakem bez viditelných SRBC. Tímto testem se prokazuje pouze produkce IgM (= přímý PFC test), IgG + C' nezpůsobují lýzu SRBC. Průkaz IgG se provádí po přidání antiizotypového séra a komplementu (= nepřímý PFC test). Počet plazmatických buněk sekretujících IgG se vypočítá odečtením počtu PFC v přímém testu od počtu PFC v nepřímém testu. Plazmatické buňky produkující Ab proti jiným Ag se mohou prokazovat pomocí SRBC, na kterých je tento Ag navázán.

Podobný je princip modernějšího testu ELISPOT, kdy jsou imunní lymfocyty inkubované na Petriho misce s navázaným Ag. Produkované Ab se vážou na Ag v okolí plazmatických buněk. Po odstranění buněk je navázaná Ab prokázána ELISA testem. Výsledkem jsou barevné skvrny odpovídající jednotlivým plazmatickým buňkám.

Antigeny nezávislé na thymu:

Většina Ag potřebuje k aktivaci B buněk T_H buňky. Některé Ag však mohou aktivovat B buňky bez asistence T_H buněk a jsou označovány jako na thymu nezávislé. Většina z nich jsou polysachridy rezistentní k degradaci v makrofágách. Jejich polymerní struktura umožňuje propojení receptorů na B buňkách, potřebné pro aktivaci. Některé z těchto Ag působí ve vyšších dávkách jako B mitogeny. Humorální odpověď na tyto na thymu nezávislé antigeny je obvykle slabá (pouze IgM), nejsou tvořeny paměťové buňky. Příkladem těchto antigenů jsou bakteriální flagelin, lipopolysacharid, dextran, pneumokokový kapsulární polysacharid atd.

Užití konjugátů haptenu-nosič pro studium buněčných reakcí:

V těchto konjugátech funguje haptenu jako imunodominantní B epitop. Na rozdíl od konformačních epitopů může být haptenu prezentován B buňkám na různých nosičích. Právě pomocí imunizace komplexů haptenu-nosič bylo možno prokázat, že pro vývoj protilátkové odpovědi je nutné asociativní rozpoznání antigenu T_H a B buňkami, přičemž obě rozpoznávají různé epitopy na témže antigenu.

Jednotlivé kroky při aktivaci, proliferaci a diferenciaci B buněk:

Prezentace antigenu B buňkami:

Na rozdíl od makrofágů zachycují B buňky Ag specificky - endocytózou zprostředkovanou Ig receptorem. Protože před objevem hybridomové technologie bylo obtížné studovat endocytózu antigenu B buňkami (asi jen jedna B buňka z 10^4 buněk nese receptory specifické pro daný Ag), byl tento problém obejit použitím králičí Ab proti myšimu Ig místo Ag. Anti-myší Ig byl endocytován a zpracován B buňkami jako Ag a příslušné peptidy byly prezentovány spolu s MHC II na B buněčné membráně. Tak bylo poprvé prokázáno, že B buňky jsou právě tak účinné v prezentaci Ag jako makrofágy.

Ikdyž pohlcení Ag B buňkou obecně vyžaduje vazbu Ag na buněčný receptor, při extrémě vysokých koncentracích Ag dochází k jeho nespecifické pinocytóze a prezentaci B buňkami. Metoda se nazývá pulzování B buněk antigenem.

Během 30-60 min. po internalizaci Ag je tento prezentován na membráně spolu s MHC II molekulami. Protože B buňky rozpoznávají Ag specificky pomocí svých Ig receptorů, mohou prezentovat T_H buňkám Ag, který je v 1000x nižší koncentraci než v případě makrofágů jako antigen prezentujících buněk.

Tvorba konjugátu T_H buňka-B buňka:

Jakmile T_H buňka rozpozná zpracovaný Ag spolu s MHC II na membráně B buňky, dojde k vytvoření T-B konjugátu. U T_H buněk dochází k reorganizaci Golgiho aparátu a mikrotubulárních center směrem k místu spojení s B buňkou. Tato reorganizace může zajistit uvolnění cytokinů směrem k Ag specifické B buňce. Podobně dochází k redistribuci TCR, CD4 a LFA-1 molekul do oblasti spojení s B buňkou. Shlukování těchto povrchových molekul zvyšuje aviditu této buněčné interakce. Zvýšená avidita prodlužuje dobu spojení mezi T_H buňkou a B buňkou a poskytuje čas pro směrovanou sekreci cytokinů.

Přemostění membránových IgM a IgD molekul B buněk antigenem přenáší aktivační signál přes plazmatickou membránu a indukuje sekvenci enzymatických reakcí vedoucí k expresi příslušných B buněčných genů. Nedávno byl na B buňkách nalezen komplex podobný CD3, spojený s membránovým Ig receptorem. Tento komplex zřejmě funguje v přenosu aktivačního signálu podobně jako CD3.

Cytokinové signály:

Aktivace klidových B buněk vyžaduje dva typy signálů. Kompetenční signály zahrnují přemostění receptorů antigenem, kostimulační IL-1 a IL-4 a zřejmě ještě membránové signály související se vznikem T-B konjugátu. Progresivní signál vzniká interakcí s IL-4. Následující proliferaci a diferenciaci stimulují další růstové faktory. Většina cytokinů zahrnutých v aktivaci B buněk je produkována aktivovanými T_H buňkami (kromě IL-1). IL-4 funguje současně jako kompetenční a progresivní signál, kromě toho působí jako proliferační a diferenciací faktor. Pod vlivem IL-4 dochází ke zvýšení exprese MHC II a ICAM molekul na B buněčné membráně. Toto zvýšení způsobuje, že B buňky mohou efektivněji prezentovat Ag a zesiluje interakci s T_H buňkami.

Z dalších T_H cytokinů IL-2 indukuje sekreci pentamerického IgM. Ikdyž klidové B buňky nemají IL-2 receptor, jeho subjednotky jsou exprimovány pod vlivem IL-4 a IL-5. Vazba IL-2 na tento vysoce afinní receptor indukuje expresi J řetězce, který je nezbytný pro sekreci

pentamerního IgM. IL-4 indukuje přesmyk Ab tříd na IgG₁ a IgE, TGFβ indukuje přesmyk na IgA.

Změny charakteristické pro sekundární humorální odpověď:

Pro sekundární odpověď je charakteristické zvýšení afinity protilátek a izotypový přesmyk. Paměťové B buňky mohou být odlišeny od právě dozrálých B buněk na základě povrchových Ig. Čerstvě dozralé B buňky exprimují IgM a IgD, paměťové B buňky exprimují další izotypy IgG, IgA a IgE. Hladina IgD je u těchto buněk redukována. Podle povrchových znaků CD44 a CD45 se dají odlišit čerstvě dozralé B buňky od paměťových.

Paměťové B buňky exprimují receptory s vyšší afinitou pro Ag a jsou proto aktivovatelné nižšími koncentracemi antigenu. Paměťové B buňky neexprimují receptory s vyšší afinitou, ale mají vysoce afinní IL-2 receptory a zvýšenou expresi buněčných adhezivních molekul (LFA-1), což zvyšuje aviditu interace mezi buňkami. V průběhu imunitní odpovědi se afinita protilátek zvyšuje 100-10.000x. Je to výsledek dvou procesů, selekce vysoce afinních B klonů a somatických mutací v odpovídajících klonech. Jak postupně klesá koncentrace antigenu, zvyšuje se soutěž mezi B lymfocyty o tento Ag. Nakonec jsou pouze B buňky s vysoce afinními receptory schopné vázat dostatek Ag ke své aktivaci.

První sekretované Ab v primární odpovědi jsou IgM, které jsou postupně nahrazeny IgG. V sekundární odpovědi se produkuje velmi málo IgM a objevují se IgG, IgA a IgE. IL-4 řídí přesmyknutí Ab tříd v pořadí IgM - IgG₁ - IgE. Tak aktivace paměťových IgG₁ může vést k produkci plazmatických buněk sekretujících IgE.

Indukce humorální odpovědi in vivo:

Ag, který vnikne do těla je koncentrován v lymfatických orgánech. Krevní Ag je filtrován slezinou, tkáňový Ag je zachycován v lymfatických uzlinách. Lymfatická uzlina zachytí víc než 90% Ag z aferentních lymfatických cév. Ag je v uzlině fagocytován makrofágy nebo interdigitujícími dendritickými buňkami nebo je zachycen na specializovaných folikulárních dendritických buňkách. Tyto dendritické buňky zachycují na své Fc receptory komplexy Ag-Ab a uchovávají je dlouho na membráně. Předpokládá se, že mají hlavní roli v aktivaci paměťových buněk. Ag nebo komplexy Ag-Ab vstupují do lymfatických uzlin samy, nebo v transportujících buňkách (Langerhansovy buňky) a v makrofázích. Lymfocyty vstupují do uzlin lymfatickými cévami nebo přes stěnu krevních cév. Dosahují parakortikální oblasti, která je hustě osídlena T lymfocyty a Ag prezentujícími buňkami. Interdigitující dendritické

buňky exprimují vysoké hladiny MHC II antigenů a jejich dlouhé výběžky mohou vejít v kontakt až s 200 T_H buněk. I když nemohou fagocytovat, endocytují Ag a prezentují ho lymfocytům. Aktivované T_H buňky pak migrují do primárních folikulů. Ve folikulech je mnoho B buněk, folikulárních dendritických buněk a makrofágů. Zde dochází k tvorbě B-T konjugátů a aktivované B buňky vytvářejí zóny proliferujících buněk zvané germinální centra. Většina proliferujících B buněk v germinálním centru hyne. Ty, které přežily se vyvíjejí na malé paměťové buňky a velké lymfoblasty, které migrují do dřeně, kde se diferencují na plazmatické buňky. Produkované Ab jsou nesené lymfatickými cévami do hrudního mízovodu, kde vstupují do krve. Paměťové buňky buďto zůstávají ve folikulech, nebo recirkulují.

Konvenční a B-1 B buňky.

Kromě konvenčních B lymfocytů označovaných jako B-2 buňky, existuje u lidí minoritní subpopulace B lymfocytů, která se od konvenčních v řadě vlastností liší. Zatímco B-2 buňky se vyskytují v sekundárních lymfoidních orgánech, B-1 v peritoneální a pleurální dutině. B-2 buňky se vyvíjejí z prekurzorů v kostní dřeni, nové B-1 buňky vznikají z existujících B-1 buněk (self-renewing). Mají omezenou diverzitu ve variabilní oblasti, nepostihují je somatické mutace a nepotřebují pomoc Th buněk. Produkují zejména IgM protilátky v reakci na karbohydrátové antigeny. Téměř nemají imunologickou paměť a chybí jim IgD na zralých B buňkách.

Buněčná imunita

Je zodpovědná zejména za likvidaci intracelulárních patogenů, virem infikovaných buněk, nádorových buněk a transplantátů. Systém je adaptován na rozpoznání pozměněných vlastních buněk a jejich eliminaci.

Děti narozené bez thymu (DiGeorge syndrom) trpí na časté infekce virem, intracelulárními bakteriemi a houbami.

Přímá cytotoxická odpověď

Efektorové mechanismy se dělí na:

- antigen specifické T lymfocyty
 - nespecifické cytotoxické buňky, jako jsou NK buňky nebo mikrofégy
- Cílové buňky jsou alogenní, nádorové, virem infikované a chemicky konjugované.

Cytotoxicita zprostředkovaná CTL:

Obecně jsou CTL CD8+, MHC I restringované, zřídka CD4+, MHC II restringované.

Imunitní odpověď CTL se dělí na dvě fáze. Fáze senzibilizace zahrnuje aktivaci a rozsáhlou proliferaci T_H buněk jako odpověď na prezentaci Ag mikrofágy nebo jinými buňkami. Také dochází k proliferaci T_C buněk stimulovaných Ag vázaným na MHC I, ale ta je mnohem menší než u T_H buněk. Klonální expanze T_H buněk vede ke zvýšení sekrece IL-2. Po aktivaci Ag a IL-2 T_C buňky proliferují a diferencují se na CTL. (obr. 1)

Ve druhé efektorové fázi CTL rozpoznávají Ag-MHC I komplexy na cílových buňkách a ničí je.

Senzibilizační fáze:

Může být měřena in vitro smíšenou lymfocytární reakcí (MLR) nebo in vivo reakcí štěpu proti hostiteli (GVHR). Během kokultivace alogenních slezinných buněk v MLR dochází k extenzivní blastické transformaci a proliferaci T buněk. Stupeň proliferace se měří inkorporací 3H thymidinu. Během 24-48 hod po stimulaci aloantigeny se T buňky začínají dělit a za 72-96 hod vzniká populace CTL. Odstranění T_H buněk zabrání tvorbě CTL. Nutná je též přítomnost akcesorních buněk - mikrofágů. Funkce těchto buněk spočívá v aktivaci T_H buněk.

GVH reakce:

Imunokompetentní lymfocyty se injikují do jedince s potlačeným vlastním imunitním systémem, což brání imunitní reakci hostitele proti štěpu. Jako příjemci se používají novorozená nebo ozářená zvířata. U lidí se GVH reakce často rozvine po transplantaci kostní dřeně. Alogenní lymfocyty proliferují v lymfatických orgánech, např. ve slezině. Tato proliferace indukuje příliv hostitelských buněk, které také proliferují, což vede ke zvětšení sleziny - splenomegalii. Pozitivní GVH reakce se pak měří pomocí slezinného indexu:

$$I = \frac{\text{váha exp. sleziny/celk. tělesná váha}}{\text{váha kontrol. sleziny/celková těl. váha}}$$

Neaktivované T_C buňky nejsou schopné cytotoxické aktivity. Tyto CTL prekurzory nemají IL-2 receptor a neproliferují. Rozpoznání Ag-MHC I na cílových buňkách indukuje expresi IL-2 receptoru. Vazba IL-2 produkovaného T_H buňkami na tento receptor vede k proliferaci a diferenciaci těchto buněk na CTL. Exprese IL-2 R až po vazbě Ag zajišťuje, že se pouze Ag specifické T_C buňky diferencují na CTL.

Efektorová fáze:

Zahrnuje lýzu cílových buněk CTL efektory. Metodou studia je buňkami zprostředkovaná lymfolýza (CML), ve které jsou cílové buňky označeny ^{51}Cr , jehož uvolnění je mírou cytotoxické aktivity efektorových buněk. K poznání efektorové fáze cytotoxické odpovědi přispěly i možnosti vývoje CTL klonů, připravených klonováním diferencovaných CTL za přítomnosti vysokých koncentrací IL-2. Rozpoznávání cílových buněk podléhá histokompatibilní restrikci (obr. 2).

Mechanismus cytotoxického působení CTL:

Nejprve dochází k tvorbě konjugátu mezi CTL a cílovou buňkou.(obr.3)Tvorba konjugátu zahrnuje rozpoznání Ag-MHC CTL receptorem. Spojení je zesíleno vazbou integrinového receptoru LFA-1 na membráně CTL na adhezivní molekuly (ICAM) na membráně cílové buňky. Aktivace CTL antigenem převádí LFA-1 z nízkoavidního stavu na vysoce avidní. Vysoce avidní LFA-1 perzistuje pouze 5—10 min, pak se vrací do nízkoavidního stavu. To umožňuje oddělení CTL od cílové buňky. Po vytvoření konjugátu dochází k sekvenci událostí vedoucí k poškození membrány cílové buňky. Nejdříve se Golgiho aparát a cytoplazmatická granula koncentrují do místa kontaktu CTL s cílovou buňkou. Příjem Ca^{2+} indukuje exocytózu obsahu granul do oblasti kontaktu s cílovou buňkou. Granula obsahují perforiny, proteiny vyvolávající tvorbu pórů, esterázové enzymy - granzymy A—F, vysokomolekulární proteoglykany a toxické cytokiny jako TNF β . Prekurzory CTL nemají granula ani

perforin. Po vzniku konjugátu a exocytóze granul jsou z granul uvolňovány monomery perforinu, které se spojují s buněčnou membránou. po spojení u nich dochází ke konformační změně vedoucí k odkrytí amfifatické domény, která se zanoří do membrány cílové buňky. Monomery pak polymerizují a vytvářejí válcovitý pór s vnitřním průměrem 5-20 nm. Těmito póry zřejmě vnikají do cílových buněk lytické substance též obsažené v granulích CTL. Perforin vykazuje sekvenční homologii s C9 složkou komplementu a též tvorba pórů je podobná jako u komplememtem zprostředkované lýzy. Samotné CTL zřejmě obsahují membránový protein (protectin), který inaktivuje perforin a brání jeho vazbě s membránou CTL. Tím se CTL chrání před poškozením vlastními lytickými mechanismy. (obr.4a)

Na lýze cílových buněk se zřejmě podílejí i další mechanismy, neboť některé linie CTL nemají detegovatelný perforin, u jiných byl pozorován pomalejší způsob zabíjení založený na poškození jaderné membrány a fragmentaci DNA cílové buňky (apoptosa).

Cytotoxicita zprostředkovaná NK buňkami:

NK buňky představují populaci velkých granulárních lymfocytů, tvořících 5 % populace recirkulujících lymfocytů. Mají některé znaky T lymfocytů, monocytů a granulocytů. Na 90% NK buněk se váže monoklonální protilátka rozpoznávající Fc receptor pro IgG (CD 16). NK buňky neexprimují T receptory ani CD3. Rozpoznání Ag není restringováno MHC. NK odpověď nevytváří imunologickou paměť. Kromě nádorových buněk NK buňky zabíjejí některé virem infikované cílové buňky. Aktivita NK buněk spadá do období aktivace, proliferace a diferenciací T_C buněk na CTL. Význam NK buněk pro obranu proti infekci vyplývá ze známého případu pacientky s normální T a B imunitou, které zcela chyběly NK buňky. Pacientka trpěla těžkými infekcemi virem planých neštovic a cytomegalovirem. NK buňky exprimují 75 kDa složku IL-2 receptoru, jejich aktivitu zvyšuje IL-2 a interferony, které fungují synergicky a stimulují proliferaci NK buněk. K lýze cílových buněk dochází podobným mechanismem jako u CTL.

Buněčná cytotoxicita závislá na protilátkách: (obr.4b)

Řada buněk s cytotoxickým potenciálem má membránový receptor pro Fc oblast Ab molekuly. Tyto buňky se mohou vázat na protilátkové molekuly navázané na cílových buňkách a následně je zabít. I když jsou tyto cytotoxické buňky nespecifické, specifita je zajišťována protilátkou. Tento typ cytotoxicity je označován jako cytotoxicita závislá na protilátkách (ADCC). Efektory jsou NK buňky, makrofágy, monocyty, neutrofilové a eosinofily. ADCC zajišťuje lýzu buněk infikovaných virem, nebo zabíjení cizopasných červů (schistosoma). Vazba efektorových buněk na cíle pomocí Fc receptoru zvyšuje metabolickou aktivitu těchto buněk i obsah lytických komponent jejich granul. Kromě toho aktivované monocyty, makrofágy a NK buňky vylučují TNF, který může mít cytotoxický účinek na cílové buňky. NK buňky a eosinofily též obsahují perforin.

Oddálený typ přecitlivělosti:

Když se některé subpopulace aktivovaných T buněk setkají s určitými typy antigenů, vylučují cytokiny, které indukují lokální zánětlivou reakci zvanou oddálený typ přecitlivělosti (DTH). Reakce je charakterizována mohutným přílivem nespecifických zánětlivých buněk, zejména makrofágů. Tato reakce byla pozorována už v roce 1890 Robertem Kochem po intradermální injekci filtrátu z Mycobacterium tuberculosis osobám, které prodělaly TBC. DTH sice může za určitých okolností způsobit poškození tkáně, ale tato reakce hraje výraznou úlohu v obraně proti intracelulárním patogenům.

Fáze DTH odpovědi: (obr.5a)

Vývoj DTH odpovědi vyžaduje senzibilizační časový interval 1-2 týdny po prvním kontaktu s Ag. Během tohoto intervalu se komplexem Ag-MHC aktivují T_H buňky a klonálně expandují. Jako Ag prezentující buňky fungují Langerhansovy buňky a makrofágy. Sekundární kontakt s Ag indukuje efektorovou fázi odpovědi. V této fázi aktivované T buňky sekretují řadu cytokinů zodpovědných za přísun a aktivaci mikrořágů a dalších nespecifických zánětlivých buněk. Aktivované T buňky jsou obecně $CD4^+$, ale v některých případech mohou i $CD8^+$ T buňky indukovat DTH reakci. Aktivované T buňky jsou často označovány TDTH, ale ve skutečnosti je to subpopulace T_H buněk. Obecně to trvá 24 hod. po druhém kontaktu s Ag, než se začne rozvíjet DTH odpověď. Vrchol odpovědi je pak za 48-72 hod. po podání Ag. V době plně rozvinuté DTH tvoří TDTH asi jen 5% účastníků se buněk. Zbytek je tvořen makrofágy a dalšími nespecifickými buňkami. Cytokiny produkované TDTH indukují krevní monocytů k adhezenci na endoteliální buňky a migraci z krve do tkáni. Během tohoto procesu se monocytů diferencují na aktivované makrofágy. Aktivované makrofágy vykazují zvýšenou fagocytózu a schopnost zabít mikroorganismy. Kromě toho exprimují větší množství MHC II molekul a adhezivních molekul, a proto jsou efektivnější v prezentaci Ag. Většinou je patogen rychle odstraněn a dochází k malému poškození tkáni. V opačném případě se DTH odpověď prodlužuje a intenzivní zánětlivá reakce se vyvíjí v granulomatosní reakci. V granulomu k sobě navzájem těsně adherují aktivované makrofágy, získávají epiteloidní tvar a někdy fúzí v mnohojaderné obrovské buňky. Díky zvýšené koncentraci lysosomálních enzymů uvolňovaných do okolních tkáni dochází k jejich destrukci, k poškození krevních cév a rozsáhlé tkáňové nekróze.

Cytokiny zahrnuté v DTH: (obr.5b)

Cytokiny zahrnuté v DTH odpovídají těm, které jsou produkované T_H1 subpopulací. IL-2 funguje autokrinně a zmnožuje populaci T buněk produkujících cytokiny. IL-3 a GM-CSF indukují hematopoézu granulocytů a monocytů. $IFN\tau$ a $TNF\beta$ působí na endoteliální buňky a usnadňují pronikání monocytů a dalších buněk přes cévní stěnu. První se v postižené tkáni objevují neutrofilů (za 6 hod), pak monocytů (za 24-48 hod). Monocytů jsou směřovány do místa DTH odpovědi $IFN\tau$. Migraci inhibující faktor (což je asi IL-4) brání mikrořágům migrovat z místa DTH reakce. Makrofágy, které se akumulují v místě DTH reakce, jsou aktivovány zejména $IFN\tau$. Aktivované makrofágy mohou aktivovat víc T_{DTH} buněk, které sekretují více lymfokinů a tím aktivují více makrofágy.

Ochranná úloha DTH odpovědi:

Řada intracelulárních bakterií a hub (*Mycobacterium*, *Listeria*, *Brucella*, *Candida*, *Pneumocystis carini*) indukuje DTH odpověď, která způsobuje destrukci buněk nesoucích vnitrobuněčné patogeny. Význam DTH v obraně proti těmto patogenům je ilustrován u AIDS. Infekce HIV způsobuje výraznou ztrátu $CD4^+$ T buněk, což vede ke ztrátě DTH odpovědi. Pacienti s HIV často těžce onemocní tzv. oportunními infekcemi intracelulárními bakteriemi, houbami či prvky.

Detekce DTH reakce in vivo a in vitro:

Intradermální injekce Ag vede ke vzniku charakteristické kožní léze. Pozitivní kožní test prokazuje, že jedinec má populaci senzibilizovaných T_{DTH} buněk specifických pro testovací Ag. Injekce PPD, proteinu ~5uněčné stěny mykobakterií, vyvolá u jedinců v minulosti exponovaných *Mycobacterium tuberculosis* začervenalou lehce nateklou tvrdou lézi v místě vpichu.

In vitro se DTH měří pomocí produkce migraci inhibujícího faktoru (MIF), který je sekretován aktivovanými T_{DTH} buňkami. Lymfocyty jsou nejprve kultivovány za přítomnosti Ag a prezentujících buněk. Supernatanty z těchto kultur jsou naplněny spolu s makrofágy do skleněných kapilár, které jsou horizontálně umístěny do kultivačního media. Zatímco v kontrolách makrofágy migrují ven z kapilár, za přítomnosti MIF zůstávají v kapiláře.

Regulace imunity a imunologická tolerance

Po každém podání Ag je regulačními mechanismy určena větev imunitního systému, která bude aktivována, intenzita odpovědi a délka trvání.

Už samotný Ag působí jako regulátor. Bakterie, bakteriální produkty a rozpustné proteiny indukují produkci humorálních Ab, intracelulární bakterie a viry indukují buněčnou imunitu.

V některých případech přítomnost kompetujícího Ag může regulovat odpověď na nepříbuzný Ag. Např. odpověď na koňské erytrocyty je výrazně redukována předchozí imunizací beraními krvinkami. Jde zřejmě o soutěžení o prezentující buňky a tím aktivaci T buněk.

Protilátky vykazují inhibiči zpětnou vazbou na svou vlastní produkci. Je-li zvíře imunizováno antigenem injikovaným se specifickou Ab, nebo je tato Ab podána do 5 dnů po Ag, imunitní odpověď na Ag je snížena až 100X. Mluví se o supresi zprostředkované protilátkou. Pasivně podané Ab zřejmě soutěží s B receptory o Ag, takže B buňky nemohou klonálně expandovat. Tato kompetice směřuje B buněčnou odpověď k vyšší afinitě produkovaných Ab. Právě kvůli supresi zprostředkované protilátkou nejsou některé vakcíny podávány dětem mladším jednoho roku. Hladina přirozeně získaných mateřských IgG Ab transplacentárním přenosem přetrvává 6 měsíců po porodu. Když jsou novorozenci imunizováni vakcínou proti spalničkám nebo příušnicím, způsobí přítomnost mateřských protilátek nízkou Ab odpověď a špatný vývoj imunologické paměti.

Na druhé straně podání antiséra proti Rh antigenu Rh- matkám s Rh+ prvním dítětem brání jejich senzibilizaci Rh Ag při porodu a tím zabraňuje vývoji Rh-reaktivních paměťových buněk, což významně snižuje riziko sekundární mateřské IgG odpovědi na fetální Rh+ krev během následujícího těhotenství.

Regulace zprostředkovaná cytokiny:

Již dlouho bylo známo, že produkce humorálních Ab a T_{DTH} jsou v inverzním vztahu. Může to být vysvětleno složením cytokinů produkovaných během imunitní odpovědi. Je známo, že T_H1 subpopulace zprostředkuje DTH, zatímco T_H2 subpopulace podporuje tvorbu protilátek. $IFN\tau$ produkovaný T_H1 buňkami inhibuje proliferaci T_H2 buněk a IL-10 produkovaný T_H2 buňkami inhibuje produkci cytokinů T_H1 buňkami.

Regulační funkce cytokinů také zahrnuje výběr Ig izotypů. Přesmyk u B buněk aktivovaných LPS na IgG1 a IgE je indukován IL-4, ale za přítomnosti $IFN\tau$ je působení IL-4 blokováno. Takže rovnováha mezi IL-4 a $IFN\tau$ produkovanými během imunitní odpovědi reguluje hladiny IgG1, IgE a IgG2a.

Idiotypová regulace: (obr.6)

Současné odhady ukazují, že imunitní systém je schopen produkovat řádově 10^{11} protilátkových specifit a 10^{15} - 10^{18} TCR specifit. Protože myš produkuje pouze 10^8 lymfocytů za den, je během života myši exprimována pouze část tohoto potenciálu. Protože protilátky a T receptory nejsou exprimovány během fetálního vývoje imunitního systému, jejich variabilní oblasti mohou být rozpoznávány imunitním systémem jako cizí.

V roce 1973 formuloval Niels Jerne svou teorii imunologické sítě, za kterou dostal v roce 1985 Nobelovu cenu. Podle této teorie každá protilátka indukovaná antigenem indukuje tvorbu Ab proti své variabilní oblasti. Jednotlivé Ag determinanty variabilní oblasti se nazývají idiotypy a jejich suma je idiotyp. V některých případech je idiotyp identický s vazebným místem pro Ag paratopem, jindy leží idiotypy vně paratopu. během Ab odpovědi primární Ab indukují tvorbu sekundárních Ab, tzv. antiidiotypových Ab (Ab2). Proti jednotlivým idiotypům na Ab2 se tvoří Ab3 atd. Ab3 někdy napodobují Abl, a tak se síť sama limituje sníženou produkcí Ab v každé následné aktivaci.

Antiidiotypová regulace může fungovat i u T buněk, protože T receptory obsahují též variabilní oblasti. idiotypová síť představuje komplex interagujících buněk, který funguje buď

zesílením nebo potlačením imunologické aktivace.

Základním principem teorie je to, že některé antiidiotypové protilátky reagující s paratopem nesou vnitřní obraz původního antigenního epitopu. Tyto antiparatopové protilátky napodobující původní epitop udržují imunitní systém aktivovaný i v nepřítomnosti původního Ag. To může zajišťovat dostatečnou klonální proliferaci a produkci paměťových buněk.

Antiidiotypové protilátky byly úspěšně použity k indukci protektivní imunity proti virům vztekliny, sérové hepatitidy B, listeriím, streptokokům, trypanosomám a schistosomám.(obr.7a)

Suprese zprostředkovaná T buňkami:

Když jsou zvířata imunizována velkými dávkami Ag, stávají se tolerantní neboli neodpovídá na tento Ag. tato neodpovídavost může být přenesena na syngenní myši T buňkami zvanými proto supresorové (T_S) buňky. Bylo prokázáno, že supresivní efekt je Ag specifický. V některých případech T_S buňky uvolňovaly supresorické faktory, některé Ag specifické, jiné idiotypově specifické.

Byla postulována ještě další subpopulace T lymfocytů - regulační T lymfocyty (Tregs).

Patří do subpopulace CD4+ lymfocytů, jejich charakteristické znaky jsou CD25+ (alfa řetězec IL-2 receptoru) a Foxp3+ (transkripční faktor). Dělí se na přirozené a indukované. Indukovat lze z naivních CD4+ T lymfocytů působením TGF-beta. Tregs produkují imunosupresivní cytokiny jako IL-10, TGF-beta nebo IL-35, granzym A a perforin a molekulu CTLA-4, která způsobuje imunosupresi T lymfocytů po interakci s kostimulačním receptorem CD28. Hlavní význam Tregs spočívá v obraně proti autoimunitě, ale Tregs jsou často zneužívány nádory nebo patogeny.

Indukce imunologické tolerance:

Imunologická tolerance k vlastním antigenům se vyvíjí během zrání imunitního systému, experimentálně indukovaná tolerance znamená neodpovídavost na Ag, který je normálně imunogenní.

Fetální a neonatální indukce tolerance:

Už v roce 1945 pozoroval Owen, že neidentická dvojčata narozená kravám, jejichž placenty zřezovaly v časném vývojovém stadiu (což vedlo ke smíšení cirkulujících buněk a antigenů) byla tolerantní k antigeně odlišným krevním buňkám druhého dvojčete. Burnet toto zjištění později formuloval tak, že rozpoznání vlastního je cosi, co se musí jedince naučit a co není dědičné. Ukázalo se, že pro vývoj tolerance je důležité přežívání alogenních buněk v chimerickém jedinci, zatímco proteinové antigeny jsou rychle likvidovány fagocyty. Indukce tolerance u novorozenech myši vyžaduje 100X nižší koncentrace proteinových Ag než u dospělých myši, což odporuje představě, že nezralé lymfocyty se mohou snáze naučit toleranci než zralé. Existuje představa, že interakce nezralých B buněk s vlastními Ag indukuje ztrátu IgM receptoru a tím způsobuje toleranci k vlastnímu.

Indukce tolerance v dospělosti:

Pro navození tolerance je důležitý způsob podání Ag. Nejvýhodnější je intravenózní injekce. Dobrymi tolerogeny jsou Ag, které se obtížně fagocytují a zpracovávají makrofágy (deagregované proteiny, polymery D aminokyselin).

Imunizace různými dávkami bovinního sérového albuminu (BSA) ukázala, že existují dvě zóny tolerance v závislosti na dávce antigenu. Dávky nad 10 mg a pod 1 µg s maximem 1 ng. Mezi těmito zónami byla imunogenní zóna.(obr.7b)

Tolerance může být indukována u T i B buněk, které se však liší dávkou Ag potřebnou k

indukci tolerance a délkou trvání tolerantního stavu. Thymocyty se stávají tolerantními dříve a zůstávají tolerantní déle než buňky kostní dřeně.

Mechanismus indukce tolerance:

Kontakt vlastního Ag s receptorem na nezralých T a B buňkách indukuje buďto smrt těchto buněk (klonální delece), nebo stav neodpovídavosti (klonální anergie), kdy jsou lymfocyty reagující s Ag přítomny, ale jsou funkčně neaktivní.

K indukci tolerance u nezralých T a B buněk dochází v lymfatických orgánech během zrání. Je však obtížné si představit, že všechny možné vlastní antigeny mají přístup do kostní dřeně nebo thymu. Zdá se, že jsou produkovány imunokompetentní T a B buňky s receptory pro vlastní Ag. U těchto zralých periferních lymfocytů musí být též indukována tolerance k vlastním Ag. To je zvláště důležité u B buněk, jejichž receptory se během vývoje imunitní odpovědi mění díky somatickým mutacím. jednou z možností je, že zatímco interakce s Ag za přítomnosti kostimulačního signálu od T_H buněk vede k imunitě interakce s Ag bez kostimulačního signálu vede k toleranci. (obr.8)

To by mohlo mít obrovský význam pro alergiky, u kterých by podání alergenu společně s blokátorem sekundárního signálu indukovalo stav alergie k alergenu.

Komplement

Proteiny a glykoproteiny tvořící komplementový systém jsou většinou produkovány hepatocyty. Složky komplementu (C') tvoří 15% sérových globulinů a cirkulují v séru ve funkčně neaktivní formě, některé jako proenzymy s maskovaným aktivním místem. Při aktivaci se od proenzymu odštěpí inhibiční fragment a exponuje se aktivní místo. Aktivace C' systému zahrnuje sekvenční enzymatickou kaskádu, ve které proenzymový produkt v jednom stupni je katalytickým enzymem v dalším stupni.

Složky komplementu se označují čísly (C1-C9). Peptidové fragmenty jsou po aktivaci označovány malými písmeny a to tak, že menší fragment je označen "a" a větší fragment "b". Komplexy s enzymatickou aktivitou jsou označeny čarou nad čísly nebo písmeny (z technických důvodů bude v tomto textu označeno tučnou kurzívou) (např. *C4b2b*).

Počáteční stupně aktivace komplementu vedoucí ke vzniku C5b mohou probíhat dvěma cestami: *klasickou* a *alternativní*. Konečné stupně vedoucí ke vzniku komplexu poškozujícího membránu jsou stejné pro obě cesty (obr.1).

Klasická cesta aktivace komplementu:

Je zahájena tvorbou rozpustných Ag-Ab komplexe nebo vazbou Ab na Ag na povrchu cílové buňky. Klasická cesta může být aktivována IgM a některými podtřídami IgG.

Vazba Ab-Ag indukuje konformační změny v Fc oblasti Ab, které exponují vazebné místo pro C1 složku C'. C1 existuje v séru jako makromolekulární komplex sestávající z C1q a dvou molekul C1r a C1s. Komplex je stabilizován Ca²⁺. C1q molekula je tvořena 18 polypeptidickými řetězci, C1r₂s₂ zaujímá dvojí možnou konfiguraci. Volný připomíná tvarem S, vázaný na C1q má podobu čísla 8. Každá C1 molekula se musí vázat nejméně na dvě Fc oblasti. V jedné molekule pentameru IgM navázaného na nějaký povrch jsou exponována

nejméně 3 vazebná místa pro C1q. IgG obsahuje jen jedno vazebné místo pro C1q, a proto je pevné vazby C1q dosaženo pouze, když jsou dvě molekuly IgG vzdáleny 30—40 nm. K lýze erytrocytu komplementem stačí jedna molekula IgM, ale nejméně 1000 molekul IgG. Vazba C1q na Fc indukuje konformační změnu v C1r, která autokatalyticky přemění C1r na aktivní esterázový enzym. **C1r** potom štěpí C1s na podobný aktivní enzym **C1s**. **C1s** má dva substráty C4 a C2. Odštěpením C4a od C4 pomocí **C1s** se exponuje vazebné místo na C4b. C4b se pak připojí k cílovému povrchu poblíž C1 a proenzym C2 se pak naváže na vazebné místo na C4b. Zde je z něj pomocí **C1s** odštěpen fragment C2a. Vzniklý **C4bC2b** komplex je nazýván C3/C5 konvertáza, protože konvertuje C3 a C5 proenzymy na enzymaticky aktivní formy. Hydrolyza krátkého fragmentu C3a vede ke vzniku C3b. Jedna molekula C3/C5 konvertázy může vytvořit více než 200 molekul C3b, což vede k výrazné amplifikaci na tomto stupni aktivace C'. C3b se váže na povrch cizího antigenu a slouží jako vazebné místo pro C5. Konvertázový enzym pak odštěpí C5a za vzniku C5b. Vázaná C5b pak iniciuje tvorbu komplexu poškozujícího membránu. C3b též slouží jako důležitý opsonin, protože fagocytující buňky mají receptor pro C3b. (obr.2)

Alternativní cesta: (obr.3)

Zahrnuje 4 sérové proteiny: C3, faktor B, faktor D a properdin. Alternativní cesta je aktivována cizími povrchovými složkami, např. složkami buněčné stěny bakterií (g⁺ i g⁻). Sérová C3 spontánně hydrolyzuje na C3a a C3b, C3b složka se pak váže na cizí povrchové antigeny, nebo dokonce na vlastní buňky. Membrány většiny savčích buněk mají vysoký obsah kyseliny sialové, která přispívá k rychlé inaktivaci vázaných C3b molekul.

C3b váže další sérový protein faktor B, který slouží jako substrát, pro pro faktor D. Faktor D štěpí vázaný faktor B za vzniku **C3bBb**. Tento komplex je analogický komplexu **C4b2b** a má C3/C5 konvertázovou aktivitu. Tato aktivita má poločas pouze 5 minut, pokud se na **C3bBb** neváže další sérový protein properdin, který tento poločas prodlužuje na 30 min.

C3bBb může aktivovat nehydrolyzovanou C3 k autokatalytické produkci dalších molekul C3b.

Tvorba komplexu poškozujícího membránu:

Terminální sekvence aktivace C zahrnuje C5b, C6, C7, C8 a C9. Po vazbě C5 na neenzymatickou složku C3/C5 konvertázy C3b je C5 rozštěpena na C5a, která oddifunduje a C5b fragment, který má vazebné místo pro následující složky C' tvořící komplex poškozující membránu. C5b je extrémně labilní a inaktivuje se během 2 minut, pokud se na ni nenaváže C6. Jakmile se na C5b naváže C7, dojde u ni ke změně struktury exponující hydrofobní oblasti sloužící jako vazebná mletka pro membránové fosfolipidy. To umožňuje komplexu C5b67 vnořit se do fosfolipidové dvojvrstvy. Když reakce proběhne na imunním komplexu, komplex se nemůže zakotvit v membráně a je uvolněn. Uvolněný komplex se může vázat na okolní buňky a způsobit jejich poškození. Vazba C8 na C5b67 komplex vede také k expozici hydrofobní oblasti u C8, kterou tato složka interaguje s plazmatickou membránou. Komplex C5b678 vytváří malé póry (poměr 10 Å (angstrémů)), které vedou k lýze červených krvinek, ale ne jaderných buněk. Konečným stupněm je vazba a polymerace C9,

molekuly podobné perforinům. Úplný membránu poškozující komplex má tubulární tvar a průměr pórů 70- 100 Å. Protože těmito póry mohou volně difundovat ionty a malé molekuly, nemohou udržet svou osmotickou stabilitu a lýžují.

Regulace komplementového systému:

Klasická i alternativní cesta aktivace C' zahrnuje množství extrémně labilních složek, které se spontánně inaktivují, jakmile difundují od cílové buňky. Např. vazebné místo na C3b spontánně hydrolyzuje, jestliže difunduje 40nm od **C4b2b** nebo **C3bBb** konvertáz. Tato rychlá hydrolýza brání vazbě C3b na okolní buňky. Kromě toho obě cesty obsahují regulační proteiny, které inaktivují různé složky C'. Např. glykoprotein označovaný jako C1 inhibitor tvoří komplex s C1r₂s₂ a tím způsobuje jeho disociaci od C1q, čímž brání další aktivaci C4 a C2. Aby se zabránilo poškození zdravých buněk C3b, existuje řada tzv. regulátorů aktivace komplementu (RCA), což jsou proteiny, které brání vzniku C3/C5 konvertázového komplexu. RCA proteiny způsobují také disociaci C3 konvertázy. Regulační proteiny fungují i na úrovni komplexu poškozujícího membránu. Např. na membráně široké škály buněk jsou dva proteiny (HRF a CD59), které chrání buňky před nespecifickou lýzou tím, že se vážou na C8 a brání připojení C9 a jejímu včlenění do membrány. Tyto proteiny blokují C9 pouze v případě, že C je ze stejného živočišného druhu jako buňky.

Komplementové receptory:

Každá červená či bílá krvinka má receptory pro některé složky C'. Tyto receptory zprostředkují biologické aktivity komplementového systému. Kromě toho některé receptory hrají úlohu ve vazbě a degradaci komplementových složek.

Komplementový receptor typu 1 (CR1):

Je to glykoprotein s vysokou afinitou pro C3b, ale může vázat i C4b s nižší afinitou. CR1 je na erytrocytech, monocytech, makrofágách, neutrofilech, eosinofilích, B buňkách a některých T buňkách. Buňky s CR1 vážou imunní komplexy a komplexy Ag-C3b. Vazba C3b nebo C4b na CR1 umožňuje jejich proteolytickou degradaci faktorem I.

Komplementový receptor typu 2 (CR2):

Váže degradační produkty C3b a je pouze na B a některých T buňkách. Je receptorem pro virus Epstein a Barrové (EBV).

Komplementové receptory typu 3 a 4 (CR3 a CR4):

Primárně váží degradační produkty C3b složky. Jsou na makrofágách, monocytech, neutrofilech, NK buňkách a některých T buňkách. Jsou členy integrinové rodiny společně s LFA—1. Vazba částic obalených komplementem na CR3 spouští fagocytózu.

Vazba fragmentů C3a, C4a a C5a na receptory na bazofilech a žírných buňkách indukuje jejich degranulaci a uvolnění farmakologicky aktivních mediátorů.

Biologické následky aktivace komplementu:

Komplement slouží jako amplifikátor imunitní odpovědi na invadující mikroorganismy a viry. Membránu poškozující komplex může lýzovat široké spektrum mikrobů, virů, erytrocytů a jaderných buněk. Alternativní cesta slouží jako důležitý přirozený systém nespecifické obrany proti infekci. Většina obalených virů je kromě bakterií citlivá ke komplementem zprostředkované lýze. Zatím co gramnegativní bakterie jsou citlivé k lytickým účinkům komplementu, grampozitivní jsou resistantní, protože peptidoglykanová vrstva v buněčné stěně brání proniknutí membránu poškozujícího komplexu k vnitřní membráně. Rezistence některých g- bakterií ke komplementu je spojena s jejich zvýšenou virulencí.

Fragmenty C3a, C4a a C5a zvané *anafylatoxiny* indukují degranulaci žírných buněk a bazofilů. Uvolněné mediátory indukují kontrakci hladkých svalů a zvýšenou vaskulární permeabilitu. C5a indukuje pronikání monocytů a makrofágů přes cévní stěnu do místa aktivace C' a tak se významně účastní zánětu. (Obr. 5a)

C3 je hlavním opsoninem komplementového systému. C3b obalené antigeny se váží na buňky nesoucí CR1. Tím je zesílena fagocytóza Ag. Aktivace fagocytů C5a anafylatoxinem zvyšuje množství CR1 molekul až 10X a tím usnadňuje fagocytózu opsonizovaných částic. (Obr. 5b)

Některé viry mohou aktivovat alternativní nebo dokonce klasickou cestu za nepřítomnosti Ab. U většiny virů vazba sérových protilátek na strukturální antigeny poskytuje vhodné podmínky pro aktivaci C' klasickou cestou. Komplement umožňuje virovou neutralizaci tvorbou velkých agregátů, obalené virové částice se nemohou adsorbovat na virové receptory. Kromě toho zvyšuje C' fagocytózu virových částic, obalené viry mohou být komplementem účinně lýzovány.

Přecitlivělost

Základní dělení:

- časná přecitlivělost, iniciovaná vazbou Ab na Ag
- oddálená přecitlivělost, buňkami zprostředkovaná, iniciovaná T_H buňkami.

Na základě diferencí efektorových molekulách se hypersenzitivní reakce dělí na 4 typy.(Obr. 6)..

Typ I - hypersenzitivita zprostředkovaná IgE protilátkami: (Obr.7)

Je indukována určitými typy Ag, označovanými jako alergeny. Alergen indukuje vznik paměťových a plazmatických buněk sekretujících IgE obvyklým způsobem. IgE Ab se váží s vysokou afinitou na Fc receptory na povrchu tkáňových žírných buněk a krevních basofilů a tím je senzibilizují. Přemostění IgE molekul vázaných na membránu vede k degranulaci těchto buněk a k uvolnění farmakologicky aktivních mediátorů. Základní účinek těchto látek - vazodilatace a kontrakce hladkých svalů - může být systémový nebo lokalizovaný.

Následky těchto reakcí mohou být systémová anafylaxe, astma, senná rýma nebo ekzém.

Systémová anafylaxe:

Je šokový a často fatální stav, který nastává během minut po podání alergenu.

Anafylaxe - z řečtiny *ana* = proti, *phylaxis* ochrana.

Modelem pro studium anafylaxe je morče. Aktivní senzibilizace se dosáhne jednou injekcí cizího proteinu (vaječného albuminu). Po inkubaci asi 2 týdny se zvířeti podá intravenózně tentýž Ag. Během jedné minuty začne být zvíře neklidné, obtížně dýchá, klesne mu krevní tlak. Díky kontrakci hladkých svalů trávicího a vylučovacího ústrojí intenzivně vylučuje. Za 2-4 min. po podání Ag hyne udušením díky stažení bronchiolů. Příčinou je systémová vazodilatace a kontrakce hladkých svalů způsobená uvolněnými mediátory. U lidí mohou tyto reakce vyvolat látky obsažené ve včelím, vosím či mravenčím žihadle, některé léky (penicilin), antitoxiny nebo mořské ryby.

Lokalizovaná anafylaxe:

Je omezená na cílovou tkáň nebo orgán v místě vstupu alergenu. Tendence k lokalizovaným anafylaktickým reakcím je dědičná a nazývá se atopie. Nejčastějším projevem lokální anafylaxe je alergická rýma zvaná senná rýma.

Je výsledkem reakce vzdušných alergenů se senzibilizovanými žírnými buňkami ve spojivce a nosní sliznici. Uvolněné mediátory působí lokalizovanou vazodilataci a zvýšenou kapilární propustnost. Příznaky jsou exudát ze spojivky a nosní sliznice, kýchání a kašláni. Při astmatu je anafylaktická reakce lokalizovaná v dolním respiračním traktu. Stažení bronchů působí dýchací obtíže (sípání). Některé alergen y z potravy mohou také vyvolat lokalizovanou anafylaxi projevující se zvracením a průjmem. Jiným projevem je atopická kopřivka, když je alergen z potravy přiveden ke kožním žírným buňkám.

Mediátory uvolňované během hypersenzitivní reakce typu I často indukují lokální zánětlivou reakci nazvanou reakce pozdní fáze. Začíná se vyvíjet za 4-6 hod po časné reakci a trvá 1-2 dny. Reakce je charakterizována infiltrací buněk, z nichž nejdůležitější jsou eosinofily. Degranulující žírné buňky totiž uvolňují chemotaktický faktor pro eosinofily. Eosinofily mají receptor pro IgG a IgE a váží komplexy Ab-alergen, což vede k jejich degranulaci a uvolnění řady mediátorů zánětu.

Alergeny:

Většina lidí produkuje IgE protilátky jako obranu proti parazitickým infekcím. Atopické osoby však mají defekt v regulaci IgE odpovědi, což umožňuje neparazitickým alergenům stimulovat hypersenzitivní reakce typu I.

Reaginové protilátky (IgE):

Přenos hypersenzitivity sérovými Ab byl prokázán už v roce 1921 Prausnitzem a Kustnerem (P-K kožní reakce).

Hladina sérového IgE u normálních lidí je asi 0,1-0,4 $\mu\text{g/ml}$, ani u těžkých alergiků nepřesahuje 1 $\mu\text{g/ml}$. Až objevení IgE myelomu umožnilo stanovit jeho m.h. na 190 000 \sim IgG má 150 000) a přítomnost 4. domény v konstantní oblasti těžkých řetězců.

Cílovými buňkami pro IgE jsou žírné buňky přítomné v pojivové tkáni zvláště blízko krevních a lymfatických cév, v kůži a sliznicích a basofily, tvořící 0,5-1% cirkulujících bílých krvinek.

Fc receptory pro IgE:

Fc_εRI je vysoce afinní receptor specifický pro C_H2 doménu IgE. Je na povrchu basofilů a žírných buněk. (Obr.8)

B buňky, makrofágy a eosinofily exprimují Fc_εRII s menší afinitou, specifický pro C_H3 doménu IgE.

Fc_εRI obsahuje 4 polypeptidické řetězce, z nichž jeden má doménovou strukturu podobnou imunoglobulinům, další dva řetězce vykazují homologii s CD_ε molekulou a mohou být zahrnuty v přenosu signálu o vazbě alergenu do buňky.

Mechanismus degranulace zprostředkované IgE:

Degranulace začíná přemostěním IgE molekul vázaných na receptory alergenem. Podobný efekt mají i protilátky proti samotným receptorům. Během 15 sec, po přemostění dochází k metylaci membránových fosfolipidů. Dochází ke vzniku a akumulaci fosfatidylcholinu, což zvyšuje tekutost membrány a umožňuje vznik kanálů pro Ca^{2+} ionty. Příjem Ca^{2+} dosahuje maxima 2 min. po přemostění receptorů a aktivuje fosfolipázu, která štěpí fosfatidylcholin na arachidonovou kyselinu, která je důležitým prekurzorem dvou skupin mediátorů, prostaglandinů a leukotrienů. Současně dochází k přechodnému zvýšení adenylát cyklázové aktivity vázané na membránu, což vede k prudkému nárůstu cAMP. Ten se uplatňuje prostřednictvím aktivace cAMP dependentních proteinových kináz. Ty fosforylují membránové proteiny granul a mění jejich propustnost, čímž přispívají k jejich fúzi s plazmatickou membránou a uvolnění mediátorů z granul.

Mediátory reakcí typu I:

Dělí se na primární a sekundární.

Primární mediátory jsou přítomné v granulech a zahrnují histamin, proteázy, chemotaktický faktor pro eosinofily a heparin.

Sekundární mediátory jsou syntetizovány po aktivaci cílových buněk a jsou uvolňovány během degranulačního procesu. Zahrnují faktor aktivující destičky, leukotrieny a prostoglandiny.

Histamin:

Je hlavní složkou granul žírných buněk. Jeho biologický účinek je pozorován během minut po degranulaci. Váže se a dva typy receptorů. Vazba na H_1 indukuje kontrakci hladkých svalů a zvyšuje propustnost cév a sekreci hlenu. Vazba na H_2 receptory zvyšuje vazopermeabilitu a dilataci a stimuluje exokrinní žlázy.

Leukotrieny:

Jejich efekt je výraznější než u histaminu a déle trvá. 1000X účinněji vyvolávají stažení bronchů ve srovnání s histaminem.

Leukotrieny zřejmě způsobují dlouhodobé bronchoepasmy u astmatiků.

Regulace hypersenzitivní odovědi typu I:

Tento typ přecitlivělosti je ovlivňován dědičností. U obou alergických rodičů je 50% šance, že dítě bude alergik, když je alergický jeden z rodičů je tato možnost 30%.

Nízké opakovaně dávky vhodného Ag indukují perzistentní IgE odpověď, vyšší dávky vedou k přesmyku na IgG. Produkce IgE je podporována T_H2 subpopulací prostřednictvím IL-4. Naopak $IFN\gamma$ snižuje tvorbu IgE. Produkce IgE je regulována těž faktory vázajícími IgEmolekuly. Tyto faktory jsou produkovány T buňkami a jejich supresivní nebo potenciační Účinek je determinován jejich glykosylací.

Detekce hypersenzitivity typu I:

Nejčastěji se užívají kožní testy, kdy se malé množství alergenu píchne přímo do kůže, nebo se použije skarifikace. Alergická reakce se projeví zarudnutím v místě vpichu během 30 min. U některých jedinců následuje reakce pozdní fáze vyvolaná poškozením tkáně obsahem eosinofilních granul.

Jinou metodou je určení celkových IgE protilátek radioimunosorbentním testem (RIST). Tato technika umožňuje prokázat nanogramová množství IgE. Pacientovo sérum se přidá k agarózovým kuličkám nebo papírovým diskům s navázaným králičím anti-IgE. Po promytí je přidáno totéž antisérum značené ^{125}I . Promyté kuličky nebo disky se pak měří v gama počítací. (Obr.9)

V podobném radioalergosorbentním testu (RAST) je na kuličky nebo disky navázán alergen, takže se stanovuje specifický IgE.

Léčba přecitlivělosti typu I:

Imunoterapie zvyšujícími se dávkami alergenu může způsobit přesmyk na IgG, které jsou pak produkovány jako blokuující protilátky, soutěžící o alergen s IgE. Jedna dávka alergenu, který se aplikuje subkutánně nebo sublinguálně (pod jazyk), je 100x vyšší než celková dávka alergenu, kterou pacient dostane přirozenou cestou (přes sliznice). Alergenová imunoterapie vede k imunní deviaci, tj. přepnutí z $Th2$ na $Th1$ odpověď. To je doprovázeno zvýšenou produkcí $Th1$ cytokinů ($IFN-\gamma$) a indukci Treg lymfocytů. Ty produkují regulační cytokiny jako IL-10, TGF- β a IL-35. Výsledkem imunoterapie je produkce alergen-specifických IgG4 protilátek, které soutěží s IgE o alergen.

Antihistaminika se váží na histaminové receptory a blokuji vazbu histaminu.

Protilátkami zprostředkovaná cytotoxická hypersenzitivita (typ II):

Zahrnuje protilátkami zprostředkovanou destrukci buněk. Provází krevní transfuze, při kterých hostitelovy Ab reagují s Ag na inkompatibilních krvinkách. Efektorovými mechanismy jsou komplement, ADCC, eventuelně opsonizace cizích krvinek a jejich fagocytóza. Protiklátky proti krevně skupinovým antigenům jsou obvykle IgM, které dobře aktivují komplement. ABO inkompatibilita se projeví během hodin po transfuzi volným hemoglobinem v krvi a hemoglobinurii. Část hemoglobinu je přeměněna na bilirubin, který je ve vyšších koncentracích toxický. Příznaky jsou teplota, mrazení, nevolnost, srážení krve v cévách. Při akumulaci hemoglobinu v ledvinách hrozí tubulární nekróza.

Hemolytické onemocnění novorozenců se vyvíjí, když mateřské protilátky proti fetálním erytrocytům projdou placentou. Erythroblastosis fetalis se může vyvinout Rh- matek s Rh+ dítětem. Matka se imunizuje Rh antigenem dítěte při prvním porodu, vytvoří se paměťové buňky a hrozí nebezpečí, že při dalším těhotenství anti-Rh protilátky proniknou placentou a poškodí fetus. Proto se podávají během 24-48 hodin po prvním porodu anti-Rh protilátky (Rhogam), které umožní odstranění erytrocytů dítěte z krevního oběhu matky a tím zabrání vytvoření paměťových buněk.

Hemolytická anemie může být někdy způsobena vazbou některých antibiotik na červené krvinky. Tato antibiotika pak fungují jako hapteny a protilátky, které se proti nim tvoří, indukují lýzu krvinek komplementem.

Přecitlivělost zprostředkovaná imunními komplexy (typ III):

Ačkoli tvorba imunních komplexů většinou usnadňuje eliminaci Ag, v některých případech může velké množství imunních komplexů vést k poškození tkání.

Lokální ukládání komplexů blízko místa vstupu Ag vyvolá *Arthusovu reakci* (Obr.10) pokud jsou komplexy tvořeny v krvi, dochází k poškození tkáně, ve které se ukládají. Hypersenzitivní reakce typu III. Se vyvíjí, když imunitní komplexy aktivují komplement. Fragmenty složek C3a, C4a a C5a jsou anafylatoxiny, které působí lokální degranulaci žírných buněk a následné zvýšení propustnosti cév. Kromě toho působí jako *chemotaktické faktory pro neutrofile*. Poškození tkáně je pak výsledkem působení *lytických enzymů uvolněných neutrofilem*.

Injekce Ag do kůže zvířat s vysokým titrem Ab vyvolá lokální tvorbu imunitních komplexů a akutní Arthusovu reakci. Reakce je charakteristická vysokým obsahem neutrofilů, akumulací tekutin (otok) a červených krvinek (erytém). Arthusova reakce se někdy vyvíjí u přecitlivělých osob po štípnutí bodavým hmyzem.

Po intravenózním podání velkého kvanta Ag se tvoří *malé komplexy*, které se obtížně fagocytovatelné. Ty mohou způsobit poškození tkání reakcí typu III. Za dny až týdny se u pacientů vyvine *sérová nemoc* s příznaky *teploty, slabosti, vyrážky, zvětšení lymfatických uzlin, bolesti kloubů* a někdy se *zánětem ledvin*.

Hypersenzitivita zprostředkovaná T_{DTH} buňkami (typ IV):

Vyvíjí se v případě, že likvidace Ag patogena není dostatečně účinná a vede k *chronické DTH reakci s nadbytkem makrofágů* a kontinuálním uvolňováním lysozomálních enzymů a následnou destrukcí tkáně.

Granulomatosní kožní reakce doprovázející lepru a plicní tkavítace jsou charakteristické pro tuberkulózu. V kožním DTH testu se léze (začervenání, otok) vyvíjí za 48-72 hodin po intradermální injekci antigenu (purified protein derivative, PPD).

Řada kontaktních dermatitid (na formaldehyd, nikl, terpentýn a různé kosmetické prostředky) je zprostředkována T_{DTH} buňkami.

Vakciny

1977 – **eradikace viru vario1y** díky vakcinaci vakciniálním virem.

250 milionů lidí je chronicky infikováno virem hepatitidy B. Malárii onemocní ročně 200 milionů lidí, 1-2 miliony jich umírá. Odhaduje se, že 10 - 20 mil. lidí je infikováno HIV.

Aktivní a pasivní imunizace: (obr.1)

Pasivní imunizace:

Předem vytvořené Ab jsou přeneseny do příjemce. To se může stát při přenosu Ab z matky na plod, nebo injekcí imunního séra příjemci. Injekce koňského antiséra se dává při podezření na tetanus, pasivní imunizace je rutinně užívána u botulismu záškrtu, hepatitidy a vztekliny. Pasivně podaná séra poskytují ochranu proti hadímu uštknutí.

Při imunizaci heterologními séry může antiizotypová odpověď produkovat IgE Ab, což může vést k **anafylaktickému šoku**. Ukládáním imunních komplexů může vyvolat hypersenzitivní reakci III typu.

Aktivní imunizace:

Se dosáhne **přírozenou infekcí** nebo uměle **vakcinací**. Při vakcinaci je důležitá úloha paměťových buněk v imunitě, která souvisí s inkubační dobou patogenu. V případě chřipky, která má velmi krátkou inkubační dobu, se příznaky nemoci už rozvíjejí v době, kdy se paměťové buňky teprve aktivují. Účinná ochrana proti chřipce proto závisí na udržení vysoké hladiny neutralizačních Ab opakovanou imunizací. U patogenů s dlouhou inkubační dobou není přítomnost Ab v době infekce nezbytná. Např. poliovirus potřebuje více než 3 dny k infekci CNS. Inkubační doba poskytuje paměťovým buňkám dost času k vývoji Ab odpovědi. Proto je u vakcíny proti polio důležitá indukce imunologické paměti.

Vakcíny, které mají indukovat **humorální imunitu** musí obsahovat imunodominantní **B epitopy**. Kromě toho musí taková vakcinace brát v úvahu i lokalizaci potenciálního patogenu tak, aby mohl být příslušnými Ab izotypy dostižen. Např. při imunizaci proti kapavce je třeba produkovat sekreční IgA blokující přilnutí bakterií k slizničním buňkám. Injekčně podané vakcíny indukují tvorbu zejména TgM a IgG Ab, nikoli sekrečního IgA. Proto musí být vakcína aplikována na sliznice a vydržet zde dostatečně dlouhou dobu.

U některých typů infekcí je důležitější **buněčná imunita**. Proto musí příslušná vakcína aktivovat T buňky. Vzhledem k tomu, že **T epitopy** jsou interní, hydrofobní a. lineární peptidy, musí být vakcína zpracována buňkami prezentujícími Ag a prezentována ve spojení s MHC II molekulami. K aktivaci T_H buněk musí být vakcína schopná replikace v hostitelových buňkách a její peptidy jsou prezentovány s MHC I. Z těchto důvodů jsou k indukci buněčné imunity nejvhodnější **atenuované vakcíny**. Přitom je třeba si uvědomit, že imunodominantní epitop pro jednoho jedince nemusí být imunodominantní pro jiného jedince exprimujícího jiný haplotyp MHC molekul.

Atenuované virové a bakteriální vakcíny:

Atenuace mikrobů znamená ztrátu patogenity, avšak uchování schopnosti omezeného růstu v hostiteli. Atenuace bývá, dosaženo kultivací patogenních kmenů bakterií nebo virů v abnormálních kultivačních podmínkách. Dlouhodobá kultivace v těchto podmínkách vede k selekci mutant, které jsou lépe přizpůsobeny k růstu v abnormálních podmínkách a proto špatně rostou v přírodním hostiteli.

Např.: atenuovaný kmen *Mycobacterium bovis* zvaný Bacillus Calmette-Guerin (BCG) byl získán kultivací *M. bovis* v mediu obsahujícím zvýšenou koncentraci žluči. Po 13 letech se bakterie adaptovaly na toto medium a staly se atenuovanými, takže mohly být užity jako vakcína proti tuberkulóze.

Poliovirus užitý v **Sabinově vakcíně** byl získán pasážováním v buňkách **opičích ledvin**.

Výhodou atenuovaných vakcín je, že díky určité perzistenci v organismu nevyžadují opakovanou imunizaci a jsou zvláště vhodné pro indukci buněčné imunity (obr.2).

Hlavní nevýhodou atenuovaných vakcín je možnost jejich reverze na virulentní formu. Např. u Sabinovy **vakcíny**, je frekvence této reverze **4 z miliónu**.

Techniky genového inženýrství poskytují možnosti **selektivního odstranění genů virulence**, což vylučuje reverzi na virulentní kmeny.

Inaktivované virové a bakteriální vakcíny:

Tyto vakcíny se připravují tepelnou nebo chemickou inaktivací patogena tak, aby nebyl schopen se replikovat v hostiteli. Je důležité, aby se při inaktivaci udržela struktura povrchových epitopů. Tepelná inaktivace často vede k denaturaci proteinů, lepší je chemická inaktivace **formalínem** nebo **alkylačními látkami**. Mrtvé vakcíny vyžadují opakování imunizace, aby se udržel imunní stav jedince. Kromě toho tyto vakcíny indukují převážně **humorální imunitu**.

Purifikované makromolekuly jako vakcíny:

Některé nevýhody předchozích typů vakcín mohou být vyřešeny užitím Vyčištěných makromolekul k imunizaci. Polysacharidové vakcíny jsou limitovány jejich neschopností aktivovat T_H buňky. Aktivují B buňky pouze k produkci IgM protilátek. Tato nevýhoda se obchází konjugací polysacharidu k

proteinovému nosiči. Např. u vakcíny proti *Haemophilus influenzae* je **kapsulární polysacharid** kovalentně navázán na tetanický toxoid. Získaný konjugát je imunogennější než samotný polysacharid a aktivuje TH buňky.

Rekombinantní vakcíny:

Řada genů virových, bakteriálních a protozoálních patogenů byla úspěšně **klonována** a použita k vývoji vakcín. První rekombinantní vakcína vyzkoušená u lidí byla vakcína proti hepatitidě B. Základem vakcíny byl vyklonovaný gen pro hlavní povrchový antigen viru (HBsAg) v kvasinkových buňkách. Další rekombinantní vakcíny zahrnují beta subjednotku cholerového toxinu, cirkumsporozoitový Ag *Plasmodium malariae* a glykoproteinový membránový Ag EB viru. Nevýhodou takto získaných proteinových nebo glykoproteinových vakcín je to, že jsou zpracovávány **jako exogenní antigeny** a proto **neaktivují T_C buňky**.

Rekombinantní vektorové vakcíny:

Využívají možnosti vložit geny pro hlavní antigeny virulentních patogenů do atenuovaných virů či bakterií. **Atenuovaný mikroorganismus slouží jako vektor**, který se replikuje v hostiteli a exprimuje genové produkty patogena. Jako vektory slouží virus vakcinie, atenuovaný poliovirus, atenuované kmeny salmonel nebo BCG. Např. virus vakcinie obsahující asi 200 genů, může nést několik tuctů cizích genů aniž by ztratil schopnost infikovat hostitelské buňky a množit se v nich. Jestliže je cizí genový produkt exprimovaný vakcínou virový obalový protein, je vložen do membrány infikované buňky a indukuje jak T buněčnou, tak humorální imunitu (obr.3).

Rekombinantní vakcína, ve které byly geny *Vibrio cholerae* vloženy do vektora *Salmonella typhimurium* využívá toho, že salmonela infikuje mukózní povrchy a indukuje produkci sekrečního IgA.

Syntetické peptidové vakcíny:

I když jsou B epitopy většinou tvořeny terciární konfigurací proteinu, ukázalo se, že není vyloučeno užití lineárních peptidů jako vakcín. Jednou z metod hledání imunodominantních epitopů bylo testování různých peptidů odvozených z primární struktury antigenu na reaktivitu s protilátkami jedinců imunních proti danému patogenu. Takové peptidy byly nalezeny např. u viru hepatitidy B. Naproti tomu imunodominantní T epitopy představují vnitřní amfifatické lineární peptidy.

Multivalentní sub jednotkové vakcíny: (obr.4)

Nevýhodou syntetických a rekombinantních vakcín je to, že jsou málo imunogenní a indukují většinou pouze humorální odpověď. Proto je snaha připravit vakcíny obsahující imunodominantní B i T epitopy. Jedním z přístupů je příprava **komplexů**, ve kterých je antigen navázán na protilátku vázanou na pevný nosič. Volbou vhodných monoklonálních Ab je možno navázat do komplexu T i B imunodominantní epitopy.

Jiným přístupem je užití detergentu k inkorporaci proteinových nebo peptidových Ag do lipidických rněchýřků (liposomů), imunostimulujících komplexů (ISCOM) nebo proteinových micel. Micely jsou tvořeny smícháním proteinů v detergentu a následným odstraněním detergentu. Jednotlivé proteiny se orientují svými hydrofilními zbytky směrem k vodnému prostředí a hydrofobními dovnitř. **Liposomy** obsahující proteinové antigeny se připravují smícháním proteinů se suspenzí fosfolipidů. Proteiny jsou inkorporovány do fosfolipidové dvojvrstvy hydrofilními zbytky ven.

ISCOM se připravují smícháním proteinu s detergentem a glykosidem zvaným Quil A, který tvoří micely interagující s Ag. Protein nebo peptid je pak exprimován jako multivalentní komplex na povrchu micel.

Kromě zvýšené imunogenity liposomi a ISCOM vnášejí Ag do buněk a proto mohou indukovat buněčnou imunitu.

Antiidiotypové vakcíny:

Umožňují připravit vakcíny proti nebezpečným patogenům, aniž by byl člověk exponován jakékoli jejich složce. Antiidiotypové vakcíny, nesoucí vnitřní obraz epitopů na glykoproteinu gp 120, kterým se virus HIV výže na CD4 receptor, se v současné době vyvíjí.

Protiinfekční imunita

Virové infekce (obr. 5)

Protilátky k virovým povrchovým Ag jsou důležité pro zábranu šíření viru během akutní infekce a v ochraně před reinfekcí.

Viry se adsorbují na specifické receptory na hostitelských buňkách. Pro virus chřipky je to kyselina sialová, rinoviry se váží na intercelulární adhezivní molekuly, receptorem pro EB virus je komplementový receptor typu 2.

Neutralizace viru znamená vazbu Ab na virový epitop, kterým se virus váže na buněčný receptor. V některých případech neutralizační Ab blokuji fúzi virového obalu s plazmatickou membránou nebo tzv. odpláštění. Ab spolu s komplementem může způsobit lýzu obalených virů, aglutinovat virové částice a opsonizovat je.

Pokud už došlo k virové infekci, nbývá na významu buněčná protivirová imunita. Aktivované TH buňky produkují řadu cytokinů, které přímo či nepřímo ovlivňují virové množení. IFN γ působí přímo navozením antivirového stavu v buňce. Nepřímo aktivuje NK buňky, které hrají významnou roli během prvních dní než se vyvine specifická CTL odpověď. U většiny virových infekcí se CTL aktivita objevuje za 3-4 dny po infekci a vrcholí asi týden po infekci. Pak klesá. CTL ničí infikované buňky a tím i virus, který se „nich replikuje. Úloha jednotlivých imunitních mechanismů v obraně proti dané virové infekci se prokazuje **adoptivními přenosy imunity**.

Způsoby, jakými viry obcházejí obranné mechanismy hostitele:

Řada virů průběžně mění své antigeny. Např. virus chřipky kontinuálně mění svou antigenní strukturu, občas vznikají- zcela nové infekční kmeny, které vyvolávají chřipkové epidemie. U viru HIV je mutační rychlost ještě 65x vyšší než u viru chřipky.

Řada virů způsobuje generalizovanou imunosupresi (virus příušnic, EB virus, cytomegalovirus a HIV). Imunosuprese je způsobena přímým cytolytickým působením viru na lymfocyty nebo makrofágy, nebo nepřímo jako výsledek lymfokinové nerovnováhy. Např. nedávno bylo ukázáno, že EBV genom obsahuje gen homologní s genem pro IL-10. Protože IL-10 potlačuje produkci lymfokinů T_H1 subpopulací (IL-2 a

IFN γ), předpokládá se, že genový produkt EBV by mohl mít podobné účinky.

Herpetické viry inhibují transporter TAP, čímž blokuje prezentaci virových antigenů MHC I. Adenoviry nebo cytomegalovirus potlačují expresi MHC I antigenů, HIV snižuje expresi MHC II. Protein kódovaný virem vakcinie se váže na C4b složku komplementu a tím blokuje klasickou dráhu aktivace komplementu. Virus herpes simplex má glykoprotein, který se váže na C3b a tím blokuje jak klasickou, tak alternativní dráhu aktivace komplementu.

Virus chřipky:

Pandemie chřipky v letech 1918 - 1919 zabila 20 milionů lidí. V některých oblastech (Aljaška, ostrovy v Pacifiku) zemřela více než polovina populace.

Viriony obsahující 8 segmentů jednovláknové RNA jsou obklopeny lipoproteinovým obalem obsahujícím dva důležité glykoproteiny, hemagglutinin (HA) a neuraminidázu (NA). Hemagglutinin zodpovídá za připojení viru k hostitelské buňce. Neuraminidáza štěpí kyselinu sialovou a její aktivita zřejmě souvisí s pučením viru z infikovaných buněk (obr.6)

Výraznou vlastností chřipkových virů je jejich antigenní variabilita. Virus může tak změnit své povrchové antigeny, že imunita po jedné epidemii neposkytuje téměř žádnou ochranu proti další epidemii.

Antigenní změny jsou podmíněny dvěma odlišnými mechanismy:

- *Antigenní drift*: zahrnuje série spontánních bodových mutací vedoucích k menším změnám v HA a NA.
- *Antigenní shift*: vede k náhlému vzniku nového subtypu nesoucího výrazně odlišný HA a NA. Každý antigenní shift nalézá populaci imunologicky nepřipravenou což vede k chřipkové pandemii. Mezi pandemiemi prodělává chřipkový virus změny antigenního driftu, které způsobují rozdíly mezi kmeny. Akumulace bodových mutací může vést ke vzniku nového kmene, schopného uniknout imunitní eliminaci.

Antigenní shift je zřejmě důsledkem genetické výměny mezi lidskými a zvířecími chřipkovými viry. Je to možné díky segmentovanému genomu těchto virů při společné infekci jedné buňky.

Odpověď hostitele na chřipkovou infekci:

Humorální protilátky chrání před reinfekcí a jsou kmenově specifické. Neutralizační Ab blokuje virovou infektivitu mají vrchol za několik dnů po infekci, během dalších 6 měsíců poklesnou, ale zůstávají přítomny po několik let. Zdá se však, že nepodmiňují uzdravení, protože pacienti s agamaglobulinemií se

mohou uzdravit z chřipkové infekce. Neutralizační Ab mají významnou roli v rezistenci před reinfekcí stejným kmenem.

CTL se vyvíjejí během 3-4 dnů po infekci a vrcholí 8. den. Pak mizí. Na rozdíl od protilátek jsou CTL **zkříženě reaktivní**, někdy zabíjejí cílové buňky infikované kterýmkoli subtypem chřipky A. To je výhodné z hlediska vakcinace, ale vakcína musí být infekční a schopná se replikovat v hostitelských buňkách. Jedním z Ag **rozpoznávaných CTL** je virový nukleoprotein, což je vnitřní Ag virionu.

Bakteriální infekce:

V imunitě proti bakteriím, které nerostou intracelulárně se uplatňují protilátky, DTH je důležitá pro intracelulární patogeny.

Infekce extracelulárními bakteriemi indukuje tvorbu humorálních Ab, které jsou sekretovány plazmatickými buňkami v regionálních lymfatických uzlinách a v submukóze respiračního a gastrointestinálního traktu. Protilátky spolu s C3b složkou C' fungují jako opsoniny a zvyšují fagocytózu bakterií. Protilátková aktivace komplementového systému indukuje lokalizovanou produkci efektorových molekul napomáhajících vývoji zánětlivé reakce. Např. anafylatoxiny indukují lokální degranulaci žírných buněk a tím vazodilataci a diapedézu lymfocytů a neutrofilů. Gramnegativní bakterie jsou komplementem lýzovány. Protilátky také mohou neutralizovat bakteriální endo či exotoxiny (obr.7). Infekce bakteriemi schopnými růst ve fagocytárních buňkách indukuje buněčnou imunitní odpověď, zvláště DTH. Z uvolněných lymfokínů je významný zejména IFN γ , který aktivuje makrofágy k efektivnějšímu zabíjení intracelulárních patogenů.

Jak bakterie unikají obranným mechanismům hostitele:

Některé bakterie mají mechanismy zvyšující jejich schopnost kolonizovat slizniční povrchy. Např.: *Neisseria* a hemofily sekretují **proteázy**, které štěpí **sekreční IgA** na Fab a Fc fragmenty, které mají menší poločas a nejsou schopné aglutinovat mikroby. Pili *Neisseria gonorrhoeae*, kterými se bakterie přichycuje k epiteliálním buňkám, vykazují velkou antigenní variabilitu. Proteinová složka pili nazvaná pilin je kódována úsekem obsahujícím kromě dvou expresních genů 10—20 spících genů, jejichž úseky mohou rekombinovat s úseky expresních genů. Kontinuální změny v pilinu umožňují *Neisseriím* unikat neutralizačním protilátkám.

Pouzdra některých streptokoků brání fagocytóze. *Mycobacterium tuberculosis* a *K. leprae* mohou uniknout z fagolysosomu a množit se v cytoplasmě.

Patogenetické důsledky imunitní odpovědi na bakteriální infekci:

V některých případech není nemoc způsobena bakteriálním patogenem ale imunitní odpovědí na infekci. Endotoxiny gramnegativních bakterií aktivují makrofágy, což vede k uvolnění vysokých hladin

IL-1 a $\text{TNF}\alpha$. Tyto lymfokiny mohou způsobit fatální bakteriální **septický** šok. Enterotoxiny *Staphylococcus aureus* fungují jako superantigeny a aktivují velké množství T_H buněk. Uvolněné cytokiny jsou zodpovědné za řadu příznaků, stafylokokově otravy potravinami.

Schopnost některých bakterií přežít ve fagocytech vede k chronické **aktivaci** T_{DTH} buněk a k destrukci tkáně DTH reakcí (mykobakteria).

Záškrt (*Corynebacterium diphtheriae*):

Je prototypovou bakteriální nemocí **vyvolanou sekrecí bakteriálního exotoxinu**. Imunita může být vyvolána imunizací toxoidem.

Přirozená infekce bacily záškrtu se vyskytuje pouze u lidí. Přenáší se kapénkami a mikrob kolonizuje nasofaryngeální trakt. Destrukce tkáně je způsobena exotoxinem, což vede k tvorbě **pseudomembrány** tvořené fibrinem, bílými krvinkami a mrtvými epitelii. Vznik pseudomembrány může vést k udušení. Kromě toho působí exotoxin poškození myokardu a neurologické změny. Toxin je kódován genem neseným fágem β . Pouze kmeny *C. diphtheriae* ve stavu lysogenie (DNA profága beta perzistuje v bakteriální buňce) mohou produkovat exotoxin. Toxin se skládá ze dvou fragmentů, z nichž fragment B se váže na gangliosidový receptor na buňce a fragment A inhibuje **buněčnou proteosyntezu**.

Difterický **toxoid** se připravuje inaktivací toxinu formalínem. Imunizace toxoidem vyvolá tvorbu Ab, které neutralizují aktivitu toxinu. Imunita trvá nejméně 10 let.

Lymeská choroba (*Borrelia burgdorferi*):

B. burgdorferi je gramnegativní spirocheta přenášená klíšťaty. Začíná typickou vyrážkou (erythema chronicum migrans), bolestmi hlavy a pokračuje záněty kloubů a někdy neurologickými komplikacemi. Infikovaní lidé často tvoří Ab proti Ag bičíku spirochet. Avšak tyto Ab nepřenášejí ochranu a zřejmě přispívají k patogenéze infekce. Imunní komplexy se spirochetovými antigeny zřejmě vyvolávají hypersenzitivní reakci typu III. Ukládání těchto komplexů v místě sání klíštěte vede k charakteristickému zarudnutí, ukládání komplexů v kloubech vyvolává artritidu. Předpokládá se též úloha **IL-1** v patogenéze lymeské boreliózy. Buněčná stěna borelií obsahuje endotoxin, který indukuje produkci IL-1 makrofágy. Experimentálně bylo prokázáno, že IL-1. může vyvolat většinu příznaků lymeské nemoci.

Protozoární infekce:

Patogenní prvoci mohou být zasaženi humtorálními protilátkami ve stádiích, která se vyskytují volně v krvi a buněčnými mechanismy, pokud se množí intracelulárně.

Malárie:

Je v současné době jedna z nejdůležitějších nemocí na světě. Podle odhadů je infikováno 600 milionů lidí a tato nemoc působí 1-2 miliony úmrtí ročně. Malárii způsobují prvoci rodu *Plasmodium*, z nichž

nejdůležitější je *P. falciparum* přenášené komáry rodu *Anopheles*.

Samička komára nasaje při sání krve gametocyty Plasmodií z infikovaného jedince (obr.8) samčí a samiččí gametocyty fúzí v komářím střevě na zygotu. Zygota se množí a diferencuje na ve slinných žlázách. Toto stadium je pokryto 45kDa proteinem nazvaným cirkumspozoitovaný (CS) antigen. Člověk se infikuje sporozoity při sání komára. Během 30 min. sporozoidy migrují z krve do jater a infikují hepatocyty. Zde probíhá intenzivní množení a diferenciaci na merozoity. Jeden sporozoit dává vznik 5000-10000 merozoitům. Uvolněné merozoity infikují erythrocyty a způsobují patologické příznaky malárie. V krvinkách se merozoity množí a napadali další erythrocyty. Nakonec se některé diferencují na gametocyty a cyklus se uzavírá. Infikovaní jedinci jsou slabí, anemičtí a mají splenomegalii. Velké množství merozoitů může blokovat kapiláry a způsobovat bolesti hlavy, selhání ledvin a nebo poškození mozku.

V endemických oblastech je imunitní odpověď na malárii slabá. Nejslabší je u dětí mladších 14 let a v některých oblastech dosahuje úmrtnost dětí 50%. Ani u dospělých není imunita dostatečná a většina lidí v endemických oblastech je celoživotně infikována. Vývoj plasmodií zahrnující několik stadií vede ke kontinuálním antigenním změnám, se kterými se setkává imunitní systém. Intracelulární fáze životního cyklu snižují stupeň aktivace imunitního systému. Nejdostupnější stadium – sporozoit - cirkuluje v krvi pouze 30 minut, což neposkytuje dost času pro imunitní aktivaci. Navíc sporozoity mohou odhazovat svůj CS antigen a tím činit příslušné Ab neúčinné.

Na experimentálních modelech byla úspěšně vyzkoušena vakcína z ozářených sporozoitů. Avšak tato vakcína není z hlediska obtížnosti přípravy použitelná pro imunizaci milionů lidí. Je proto snaha identifikovat imunodominantní B a T epitopy na různých stadiích plasmodií a připravit syntetické peptidové vakcíny obsahující tyto epitopy. Imunodominantní B epitop CS antigenu byl skutečně objeven a zahrnuje 4 aminokyseliny ve třech opakováních. Imunizace tímto peptidem navázaným na tetanický toxoid však nezajišťovala vznik specifických paměťových T buněk. Počítačovou analýzou byla v CS antigenu nalezena sekvence s nejvyšším amfifatickým indexem a příslušný peptid byl konjugován s imunodominantním B epitopem. Imunizace tímto konjugátem indukovala vysoké titry Ab avšak pouze u určitých inbredních kmenů myši, což ukazuje na závislost na haplotypu MHC II antigenů při prezentaci CS peptidu TH buňkám.

Na základě specifického odstranění CD4+ nebo CD8+ buněk z experimentálních zvířat bylo prokázáno, že v imunitě proti malárii hrají významnou úlohu CTL, které zřejmě rozpoznávají sporozoitové antigeny prezentované MHC I molekulami na infikovaných hepatocytech.

Onemocnění způsobená parazitickými červy:

I když jsou červi přístupnější imunitnímu systému než prvoci, jejich počet v hostiteli je většinou malý a

proto poskytují jen malý impuls pro imunitní systém.

Schistosomiáza:

Různými druhy *schistosom* je infikováno podle odhadů více než 300 milionů lidí. Onemocnění je charakteristické celkovou slabostí a postižením urogenitálního nebo gastrointestinálního traktu, které je někdy fatální.

Člověka infikují volně plovoucí infekční larvy - **cerkárie**, které opouštějí infikovaného plže v množství 300-3000 za den. Cerkárie pronikají kůží, a transformují se na **shistosomuly**. Ty vstupují do kapilár a migrují do plic; pak do jater a nakonec do venózních systémů vnitřních orgánů. Schistosomuly zde dozrávají na samčí a samiččí dospělé červy. Oplozené samičky produkují nejméně 300 vajíček za den. Vajíčka se močí nebo obsahem střev dostávají ven a ve vodním prostředí se z nich vyvíjejí obrvená **miracidia**, která infikují mezihostitele - vodní plže.

Většina příznaků schistosomiázy je vyvolána vajíčky. Nejméně polovina vajíček zůstává v hostiteli a invaduje střevní stěnu játra nebo močový měchýř a vyvolává hemoragie. Vyvíjí se chronický stav kdy vajíčka indukují **DTH reakci** vedoucí k tvorbě velkých **granulomů**, Tyto granulomy mohou bránit přítoku krve do jater a močového měchýře. Imunitní odpověď většinou není schopna eliminovat dospělé červy, kteří mohou v člověku přežít až 20 let. Nejcitlivější k postižení imunitními mechanismy jsou schistosomuly, které však díky své pohyblivosti unikají lokálním zánětlivým buňkám. Dospělí červi snižují expresi Ag na své membráně a uzavírají se do glykolipidového a glykoproteinového obalu tvořeného hostitelem a maskujícího vlastní Ag červa. Na povrchu červa byly prokázány i hostitelské MHC antigeny Infekce schistosomami vyvolá humorální odpověď charakteristickou produkcí IgE Ab, lokálním zvýšením počtu žírných buněk, jejich degranulací a zvýšením počtu eosinofilů. Eosinofily s Fc γ a Fc ϵ receptory se vážou na parazity obalené protilátkami a účastní se na protilátkách závislé buněčné cytotoxicity (ADCC). V imunitní odpovědi hrají významnou úlohu cytokiny produkované T_H2 buňkami **IL-4** indukuje přesmyk na produkci IgE, IL-5 indukuje diferenciaci **eosinofilů**, IL-3 zvyšuje lokální počty žírných buněk (obr.9).

Experimenty na myších však ukázaly, že účinným mechanismem v imunitě proti schistosomóze je zřejmě **DTH - odpověď**, která je právě T_H2 buňkami inhibována. Zdá se, že právě indukce T_H2 imunitní odpovědi schistosomami je mechanismem, který jim umožňuje přežít.

Transplantační imunologie

Autoštěp - vlastní tkáň přenesená z jednoho místa na těle na druhé (popáleniny).

Isoštěp - mezi geneticky identickými jedinci (monozygotická. dvojčata).

Aloštěp - mezi geneticky odlišnými jedinci téhož druhu.

Xenoštěp - mezi odlišnými druhy.

Odhojení štěpu vykazuje specifitu a paměť. Kožní štěpy jsou odhojovány rychleji než vaskularizované tkáně jako ledviny nebo srdce.

Během **primárního** odhojení štěpu (*first-set rejection*) je vaskularizovaný transplantát infiltrován lymfocyty, monocyty a dalšími zánětlivými buňkami, zvyšuje se vaskularizace, **nekróza** začíná **10. den** a k úplnému odhojení dojde 14. den. Při **sekundární** odpovědi (*second-set rejection*) dojde k úplnému odhojení štěpu za 5–6 dnů (obr. 1).

Imunita ke štěpu může být přenesena lymfocyty, nikoli sérem. Nahé myši (nude mice), které nemají thymus, nejsou schopné odhojit aloštěp a přijímají dokonce xenoštěpy. Odhojení aloštěpu se účastní jak CD4+, tak CD8+ subpopulace, přičemž obě subpopulace spolupracují.

Transplantační antigeny:

Antigenně podobné tkáně jsou *histokompatibilní* a při transplantaci neindukují imunitní odpověď, Histokompatibilní Ag jsou kódovány více než 40 odlišnými lokusy, nejdůležitější pro odhojení jsou antigeny *hlavního histokompatibilního komplexu (MHC)*. MHC geny jsou obvykle děděny jako jeden haplotyp od každého rodiče. Když se kříží dva inbrídní kmény myši, získává F₁ potomstvo jeden haplotyp od každého rodiče a přijímá jejich štěpy. Při křížení outbrídních myši je pouze 25% šance, že dva sourozenci budou dědit stejné MHC haplotypy. To má význam při transplantacích mezi sourozenci. Při transplantaci z rodiče na potomka, dárce a příjemce budou vždy sdílet jeden haplotyp a budou se lišit ve druhém.

Mechanismus odhojení štěpu:

Cizí MHC I a MHC II molekuly jsou rozpoznávány CD8+ a CD4+ buňkami, protože napodobují vlastní MHC asociované s antigenem. Antigen prezentující buňky mohou vstupovat do štěpu, endocytovat cizí aloantigeny a prezentovat je s vlastními MHC molekulami. Efektorové lymfocyty vznikají v regionálních uzlinách, vracejí se do štěpu a poškozují ho. V některých štěpech (ledviny, thymus) jsou populace tzv. *cestujících leukocytů (passenger leukocytes)* (obr. 2a) což jsou leukocyty dárce, které migrují ze štěpu do regionálních lymfatických uzlin a protože nesou alogenní MHC antigeny, stimulují zde T lymfocyty příjemce. Bylo zjištěno, že tyto cestující leukocyty jsou dendritické buňky, které exprimují molekuly. Odstranění těchto buněk ze štěpu prodloužilo jeho odhojení. Další buňky, které významně prezentují aloantigeny imunitnímu systému příjemce jsou Langherhanzovi buňky a endotelie vystylající krevní cévy. Oba. typy buněk exprimují MHC I i MHC II. Proliferace T buněk po rozpoznání cizích aloantigenů může být prokázána in vitro směsnou *lymfocytární* reakcí (MLR). Hlavně proliferují CD4+T buňky, což jsou aktivované T_H buňky, které hrají centrální úlohu v indukci efektorových mechanismů při odhojování štěpu.

Efektorové mechanismy zahrnují DTH a cytotoxicitu zprostředkovanou CTL. Méně častá je lýza protilátkou a komplementem nebo ADCC. Příliv T buněk a makrofágů do štěpu připomíná DTH reakci. Buňky s cizími aloantigeny jsou likvidovány CD8+ nebo CD4+ CTL. Centrální úlohu hrají cytokiny sekretované T_H buňkami. Nejdůležitější jsou **IL - 2, IFN γ a TNF β** . IL - 2 je nezbytný pro vznik CTL. IFN γ podporuje příliv makrofágů a aktivuje je. TNF γ má přímý cytotoxický účinek na transplantované buňky. Řada cytokinů zvyšuje expresi MHC I a MHC II na transplantovaných buňkách, což má význam pro jejich snadnější rozpoznávání CTL (obr. 2b)

Klinika odhojení štěpu:

- **Hyperakutní odhojení:** štěp odhojen téměř ihned, takže se vůbec nevaskularizuje (obr. 3). Hyperakutní reakce je způsobena **preexistujícími hostitelskými protilátkami**, specifickými pro Ag štěpu. Komplexy Ab-Ag aktivují komplement, což vede k intenzivní infiltraci neutrofilů do štěpu. Zánětlivá reakce vede k ucpání kapilár, což brání vaskularizaci štěpu.
- **Akutní odhojení** začíná asi 10 dnů po transplantaci. Histologické vyšetření ukazuje masivní infiltraci makrofágů a lymfocyty.
- **Chronické odhojení** zahrnuje humorální a buněčnou odpověď. Špatně se ovlivňuje

imunosupresivy.

Typizace tkání:

Protože jsou za odhojovací reakce zodpovědné krevně skupinové a MHC antigeny, byly vyvinuty postupy typizace tkání umožňující testovat pravděpodobnost tkáňové kompatibility mezi dárce a příjemcem štěpu.

HLA typizace se provádí mikrocytotoxickým testem pomocí komplementu a MAbů proti různým MHC I a MHC II alelickým produktům (obr. 4a).

Ke zjištění kompatibility v MHC II se užívá jednocestná MLR. Lymfocyty donora se ozáří nebo ovlivní mitomycinem C a použijí se jako stimulační buňky. Proliferace lymfocytů příjemce se měří inkorporací ^3H thymidinu.

Imunosupresivní terapie:

Alogenní transplantace vyžaduje určitou imunosupresi. Nevýhodou je nespecifita většiny imunosupresivních látek, což vede ke zvýšenému nebezpečí infekce. Mnoho imunosupresiv sice zpomaluje proliferaci aktivovaných lymfocytů, ale současně poškozuje rychle se dělící buňky kostní dřeně nebo střeva.

Mitotické inhibitory:

Azathioprin (imuran) se často podává před a po transplantaci k potlačení proliferace T buněk. Působí na buňky v S fázi tím, že blokuje syntézu kyseliny inosinové.

Cyklofosfamid - alkylační látka poškozující DNA.

Kortikosteroidy jsou hormony, deriváty cholesterolu. Procházejí přes cytoplasmatickou membránu, vážou se na receptory v cytosolu a jsou transportovány do jádra, kde se vážou na regulační sekvence DNA. Mají silně protizánětlivý účinek. Jejich aplikace vede k odstranění cirkulujících lymfocytů. U některých zvířat způsobují lymfolýzu, u člověka ovlivňují cirkulaci lymfocytů. Také potlačují fagocytární a zabíjecí schopnost makrofágů a neutrofilů.

Cyklosporin specificky suprimuje T lymfocyty aktivované antigenem. Blokuje transkripční aktivaci genů T_H buněk kódujících IL-2, IL-4 a $\text{IFN}\gamma$. Potlačuje i expresi IL-2 receptoru.

Ozáření lymfatického systému:

Využívá toho, že lymfocyty jsou extrémně citlivé k rentgenovému záření. Příjemci se ozáří před transplantací a nově produkované lymfocyty jsou tolerantnější k antigenům štěpu.

Antilymfocytární serum:

Pro lidské transplantace se připravuje imunizací koní nebo králíků lidskými lymfocyty. Odstranění lymfocytů zřejmě není způsobeno jejich lýzou komplementem, ale opsonizací a fagocytózou vlastními fagocyty.

Terapie monoklonálními protilátkami:

Měla by umožnit náhradu generalizované imunosuprese antigen specifickou supresí, aby se snížilo riziko infekce pacienta. Např. byly úspěšně použity MAbů proti IL-2 receptoru, který se exprimuje pouze na aktivovaných buňkách. K prodloužení přežití transplantátu vedlo i podání anti-CD4 Mab. Podobný efekt měly i MAbů proti cytokínům $\text{TNF}\beta$, $\text{IFN}\gamma$ nebo IL-2.

Transplantace kostní dřeně:

Používá se při léčbě leukemií, lymfomů a imunodeficiencí obecně. Štěp obsahuje asi 10^9 buněk na kg váhy příjemce.

Protože štěp obsahuje imunokompetentní buňky, může působit proti buňkám hostitele a vyvolat reakci štěpu proti hostiteli (GVHR), která postihuje 50-70% pacientů s transplantovanou kostní dření. GVHR může vést ke krvácení do trávicího traktu nebo selhání ledvin. K potlačení GVHR se užívá imunosupresivní léčba po transplantaci (cyklosporin, methotrexát), nebo odstranění T buněk ze štěpu před transplantací pomocí MAbů nebo specifických antisér.

Úspěšnost transplantací stoupla v současnosti na 90% u ledvin a 80% u srdce, nižší je jater a pankreatu (obr.4b). Velkou šanci na přežití mají transplantace v místech, které nejsou pod imunologickým dozorem (rohovka, varlata, mozek) .

Protinádorová imunita

- Nádor benigní: není schopen neomezeně růst a **neinvaduje** zdravou okolní tkáň.
- Nádor maligní: s nekontrolovaným růstem, který je **progresivně invazivní**. Rakovina se týká maligních tumorů.
- Metastázy: jsou shluky nádorových buněk **přenesené** krví nebo lymfatickými cévami do dalších tkání, kde proliferují.
- Karcinomy: jsou nádory **z ektodermálních nebo endodermálních tkání**, jako je kůže nebo epitelální výstelky vnitřních orgánů a žláz.

- Sarkomy: jsou odvozené z **mezodermální pojivové tkáně** jako je kost, tuk, nebo chrupavka.
- Leukemie a Lymfomy: jsou maligní nádory **hemopoetických buněk** kostní dřeně.

Většina nádorů pochází z jedné nádorové buňky, která má defekt v regulaci, takže nádory jsou většinou monoklonální. Základní charakteristikou nádorových buněk je jejich nekontrolovaný invazivní růst. Přitom rychlost růstu nádorů nemusí být nejvyšší v organismu. Např. regenerující jaterní buňky rostou rychleji než hepatomy. Nádorové buňky také ztrácejí tkáňově specifickou afinitu, což jim umožňuje růst mimo hranice původní tkáně a metastázovat, v odlišných tkáních. Některé nádory zřejmě získávají homing receptory, které jim umožňují napadat specifické tkáně (obr.5)

Nádorové buňky mají zvýšenou glykolytickou aktivitu, která jim umožňuje růst při snížené dodávce kyslíku. Řada nádorů sekretuje faktory indukující tvorbu krevních cév uvnitř nádoru, sloužících k jeho zásobování kyslíkem a živinami.

Nádorové buňky jsou většinou aneuploidní kromě toho vykazují delece, translokace a duplikace genů.

Zatímco normální buňky mají omezený počet dělení in vitro a vykazují inhibici růstu při dosažení určité hustoty, nádorové buňky narůstají do mnohem vyšších denzit a počet jejich dělení in vitro je neomezený. Nádorové buňky nevyžadují tolik růstových faktorů jako normální buňky a některé mohou růst in vitro dokonce bez přidání séra.

Maligní transformace buněk:

Působení chemických kancerogenů, záření nebo některých virů může změnit morfolonii a růstové vlastnosti buněk. Maligní transformace vede ke vzniku buněk, které po injikování do zvířete vyvolají vznik nádoru.

Mezi chemickými mutageny jsou **alkylační** látky přímo mutagenní, jiné se stávají karcinogeny až po enzymatické změně v těle. Mezi fyzikální mutageny patří **ionizující** a **ultrafialové záření**. UV záření indukuje tvorbu thyminových dimerů, ionizující záření způsobuje chromozomové zlomy.

Mezi viry indukující maligní transformace patří virus Rousova sarkomu (ptačí retrovirus) nebo DNA viry polyomu a SV40. RNA transformujících retrovirů se integruje do genomu hostitelské buňky a nádorová transformace je spojována s přítomností **onkogenů** nesených retrovirem.

Howard Temin (1971) formuloval teorii, podle které normální buňky obsahují tzv. **protoonkogeny**, které se mohou lišit od virových onkogenů pouze bodovými mutacemi. Podle současných názorů je většina onkogenů odvozena od buněčných genů kódujících různé růstové proteiny. V normálních buňkách jsou protoonkogeny exprimovány v nízkých hladinách a exprese je často omezena na určitá stadia buněčného cyklu a buněčné diferenciaci. Různé produkty onkogenů fungují jako růstové regulátory (růstové faktory nebo jejich receptory) a jejich exprese je u normálních buněk pečlivě regulována. Jiná skupina onkogenových produktů přenáší signály z membrány na sekundární přenašeče, které regulují genovou aktivitu nebo jiné buněčné funkce. Protoonkogeny mohou být konvertovány na onkogeny při přeskupování genů díky změně regulace jejich exprese. K podobnému efektu může dojít mutací protoonkogenů. Řada nádorů exprimuje zvýšené hladiny růstových faktorů a jejich receptorů. Např. T buňky infikované virem HTLV konstitutivně exprimují IL-2 a IL-2 receptor, což vede k autostimulaci jejich proliferace (obr.6)

Nádorové antigeny:

Dělí se na nádorově specifické (TSA) a s nádory spojené (TAA). TSA se vyskytují pouze na nádorových buňkách, TAA se vyskytují i na normálních buňkách za podmínek, které neindukují stav imunologické tolerance. TAA mohou být antigeny, které jsou na normálních buňkách během fetálního vývoje, nebo jsou na normálních buňkách přítomny v extrémně nízkých koncentracích. Většina nádorových antigenů neindukuje humorální Ab, ale indukuje buněčnou

odpověď. Protože přítomnost nádorových Ag vyvolávajících CNI byla prokázána odhojením nádorů transplantovaných do syngenních příjemců, jsou tyto Ag označovány jako nádorově specifické transplantační antigeny nebo s nádory spojené transplantační antigeny.

Nádorově specifické Ag byly prokázány u nádorů indukovaných chemickými a fyzikálními karcinogeny a některými viry. Když tentýž chemický karcinogen indukuje nádory na odlišných místech těla jednoho zvířete, tyto nádory se liší svými nádorovými antigeny a imunita k jednomu nádoru nechrání před druhým nádorem. Na rozdíl od toho, všechny nádory indukované jedním virem exprimují stejné nádorové antigeny. Např. u viru SV40 slouží jako nádorově specifický Ag časný virový antigen označený velké T. U viru polyomu je tímto Ag časný virový protein zvaný střední T. V obou případech nejsou nádorové Ag součástí obalových proteinů virionu, ale jsou primárně exprimovány v jádře nádorových buněk. Tyto Ag mohou být zpracovány a prezentovány s MHC I nebo MHC II molekulami na membráně nádorových buněk a aktivovat T_C nebo T_H buňky.

Většina nádorových Ag není specifická pro nádorové buňky, ale je přítomna i na normálních buňkách. Tyto Ag mohou být exprimovány pouze na fetálních buňkách nebo jsou v nízkých koncentracích na normálních a ve vysokých na nádorových buňkách. Jako Ag spojené s nádory slouží např. receptory pro růstové faktory.

Onkofetální antigeny:

Vyskytují se v dospělosti na nádorových buňkách, jsou rozpoznávány jako cizí a indukují imunitní odpověď. Příkladem jsou alfafetoprotein a karcinoembryonický antigen.

Imunitní odpověď na nádory:

Chemicky nebo jinak indukované nádory vyvolávají silnou imunitní odpověď. Nádory, které vznikají spontánně ve zvířatech, jsou málo imunogenní. Myši nesoucí nádory vytvářejí T_C buňky specifické pro nádorové buňky. Tyto CTL mohou být testovány buněčnou lymfolýzou (CML) in vitro. Mezi efektorové mechanismy těchto buněk patří perforiny a TNFβ (lymfotoxin).

Normální zvířata mají vysoké hladiny lymfocytů, schopných zabít řadu nádorových buněk. Jsou to NK – **buňky**, velké granulární lymfocyty, které nemají membránový Ig ani T receptor. Neví se, jak NK buňky rozpoznávají nádorové cíle, rozpoznání není MHC restringováno. Zabíjení probíhá podobným mechanismem jako u CTL navíc NK buňky sekretují rozpustný faktor cytotoxický pouze pro nádorové buňky.

U běžových myší s defektem v aktivitě NK buněk je pozorován zvýšený výskyt určitých typů nádorů. Kromě NK buněk některé T_C buňky s αβ nebo γδ receptory nespecificky rozpoznávají a zabíjejí nádorové buňky. Jsou označovány jako **NC (natural cytotoxic) buňky**. Aktivita NK i NC buněk může být in vitro zvýšena působením IFNγ nebo IL-2.

Makrofágy často obalují nádory a jejich přítomnost je spojována s regresí nádoru. Aktivace makrofágů IFNγ a makrofágy aktivujícím faktorem (MAF) zvyšuje jejich cytotoxicitu pro nádorové buňky. Aktivované makrofágy sekretují zvýšená množství enzymů, které dosahují vysokých lokálních koncentrací. Potentním protinádorovým cytokinem je TNFα.

Humorální Ab indukované nádorovými antigeny mohou aktivovat komplement, anafylatoxiny indukují degranulaci žírných buněk a uvolněné mediátory umožňují příliv zánětlivých buněk. Ab se mohou účastnit ADCC, kde jako efektorové buňky vystupují NK buňky nebo makrofágy. Na druhé straně mohou specifické Ab blokovat lýzu nádorových buněk CTL zřejmě **maskováním nádorových antigenů**.

Mechanismy umožňující nádorovým buňkám uniknout imunitnímu systému:

Séra, získaná imunizací zabitými nádorovými buňkami nebo séra ze zvířat s progresivním růstem nádorů blokuje CML reakci, zatímco séra z jedince s regredujícími nádory nemají blokační aktivitu. Blokujícími faktory nejsou většinou samotné Ab, ale imunní komplexy. Imunní komplexy blokuje CML in vitro blokováním nádorových antigenů nebo vazbou na F_C receptory T_C buněk. Některé nádorově specifické Ag mizí z nádorových buněk za přítomnosti sérových protilátek. Jev se nazývá **antigenní modulace**.

Maligní transformace je často spojena s redukcí exprese MHC I antigenů.

Imunoterapie nádore:

Některá adjuvantia zvyšují protinádorovou odpověď. Nejčastěji se užívá **BCG**, který aktivuje makrofágy k vyšší produkci IL-1, stimulující TH buňky. BCG má nejlepší efekt, když je injikován přímo do nádoru. Z dalších adjuvancií se užívá *Corynebacterium parvum* a **levamisol**.

Klonování genů pro cytokiny umožnilo **cytokinovou terapii nádorů**. Jde však o zásahy do složité rovnováhy cytokinů a systémové podání některých cytokinů má těžké důsledky ohrožující život. Rekombinantní **interferony** měly slibný účinek při léčbě nádorů. Všechny 3 typy IFN zvyšují expresi MHC I Ag na nádorových buňkách, IFN γ zvyšuje expresi MHC II na makrofázích. Tím se zvyšuje aktivita CTL proti nádorovým buňkám. Kromě toho interferony inhibují dělení normálních a maligních buněk in vitro. IFN γ navíc zvyšuje aktivitu T_C buněk, makrofágů a NK buněk.

TNF α a β mají přímou protinádorovou aktivitu. Zabíjejí některé nádorové buňky a snižují proliferaci jiných. TNF α inhibují vaskularizaci indukovanou nádorem. Nejúčinnější je injekce TNF přímo do nádoru. Problémem léčby pomocí TNF je jeho extrémně krátký poločas, vyžadující časté injekce TNF, a některé negativní vedlejší účinky.

Další možnou léčebnou metodou je aktivace lymfocytů pacienta in vitro kultivací s ozářenými nádorovými buňkami za přítomnosti IL-2. Aktivované lymfocyty jsou pak injikovány do pacienta. Tyto tzv. **LAK (lymphokine activated killer) buňky** jsou heterogenní populací zahrnující NK a NC buňky.

Jiným přístupem je získání lymfocytů infiltrujících tumor pomocí biopsie a pomnožení těchto buněk za přítomnosti IL-2 in vitro. Tyto buňky se podobají LAK buňkám, ale k jejich aktivaci je třeba 100x méně IL-2 než u LAK buněk.

Monoklonální protilátky mohou být při léčbě nádorů využity jako **imunotoxiny**. Jiným přístupem je nespecifická aktivace T buněk pomocí MAb proti CD3 antigenu. MAb mohou být užity jako můstky mezi aktivovanými T buňkami a nádory. K tomuto účelu se připravují hybridní protilátky se specifitou pro nádorové antigeny a CD3 molekuly TCR komplexu. Novým přístupem je příprava vakcíny z pacientova nádoru. Nádorové buňky se zabijí ozářením a injikují pacientu spolu s BCG.