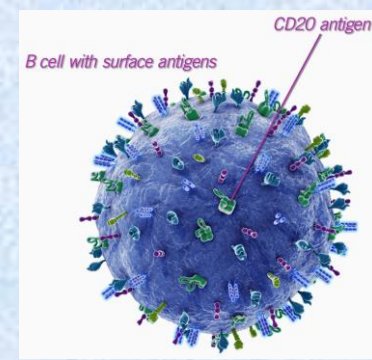
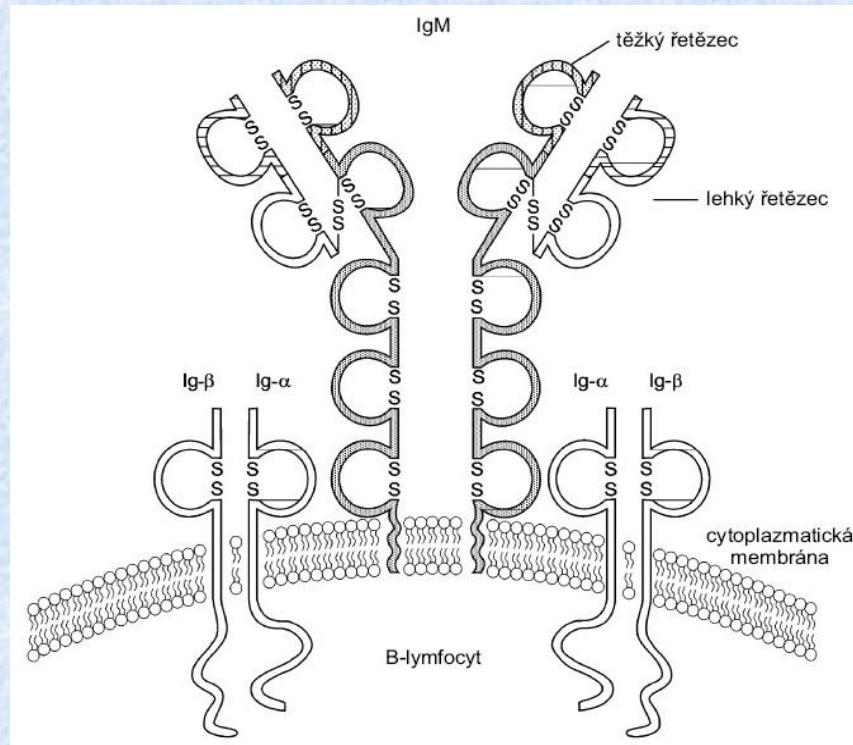


B lymfocyty



- **B-lymfocyty (B buňky)** jsou buňky zodpovědné především za specifickou, protilátkami zprostředkovanou imunitní odpověď’.
- B-lymfocyty rozpoznávají nativní antigen pomocí **BCR** (B cell receptor)
- Příslušný B-lymfocyt, na jehož receptorech došlo k vazbě antigenu, je stimulován k pomnožení a diferenciaci na efektorové neboli plazmatické bb., které produkují velké množství protilátek. Z části stimulovaných B-lymfocytů se diferencují paměťové buňky.

BCR



- BCR se skládá z povrchového imunoglobulinu (IgM, IgD) a asociovaných signalizačních molekul (Ig α a Ig β), které jsou asociovány s cytoplazmatickými protein tyrosin-kinázami (PTK) skupiny Src
- Po současném navázání Ag na 2 či více BCR dojde k přiblížení PTK, vzájemné fosforylaci a fosforylaci dalších cytoplazmatických proteinů, což vede ke změnám transkripce genů, proliferaci, diferenciaci a sekreci protilátek

Povrchové znaky B lymfocytů

- **CD 19** a **CD 20** – charakteristické povrchové znaky B lymfocytů
- **IgM, IgD** - BCR
- **MHC gp II.třídy** - Ag prezentující molekuly
- **CD 40** – kostimulační receptor

Vývoj B lymfocytů

- Vývoj B lymfocytů probíhá v kostní dřeni a dokončuje se po setkání s Ag v sekundárních lymfatických orgánech.

Pluripotentní hematopoetická kmenová buňka



Progenitor B lymfocytu → zahájení rekombinačních procesů, které vedou ke vzniku velkého množství klonů B lymfocytů s individuálně specifickými BCR



Pre B lymfocyt → exprese pre-B receptoru (tvořen H(μ) řetězcem a náhradním L řetězcem)



Nezralý B lymfocyt → exprese povrchového IgM (BCR); v této fázi vývoje dochází k eliminaci autoreaktivních klonů



Zralý B lymfocyt → exprese povrchového IgM a IgD (BCR), migrace do sekundárních lymfatických orgánů

Eliminace autoreaktivních klonů B lymfocytů

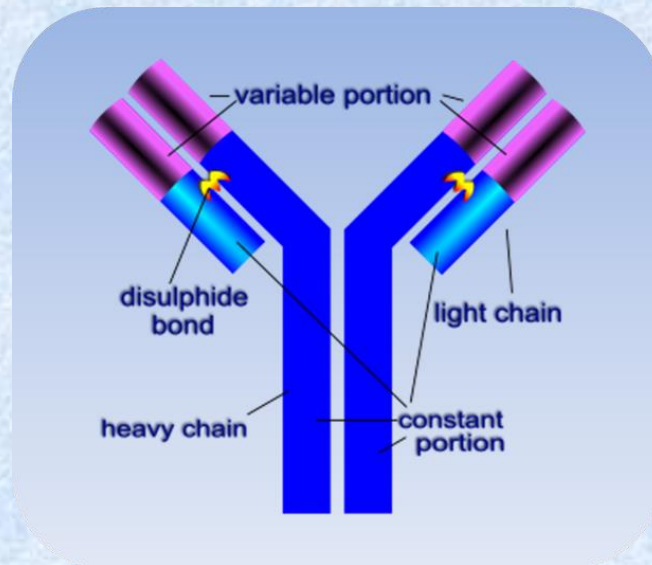
- Při náhodném přeskupování genů, spojovacích nepřesnostech, párování H-L a somatických mutací mohou vzniknout i klony B lymfocytů nesoucí autoreaktivní receptory a produkující autoreaktivní protilátky.
- Většina autoreaktivních B lymfocytů je eliminována **na úrovni nezralých B lymfocytů** (v kostní dřeni), jestliže svým BCR váží autoantigen s dostatečnou afinitou, obdrží signál vedoucí k **apoptotické smrti**.
- Pokud touto eliminací projdou některé autoreaktivní klony, jejich autoreaktivita se většinou neprojeví, protože k jejich aktivaci chybí příslušné T_H lymfocyty

Funkce B-lymfocytů

- **Tvorba protilátek- zajištění protilátkové odpovědi**
- **Imunologická paměť**
- **Prezentace antigenu** - schopny zachycovat pomocí BCR exogenní antigeny, internalizovat je pomocí endocytózy a po zpracování prezentovat ve spojení s MHC II.tř. T_H-lymfocytům

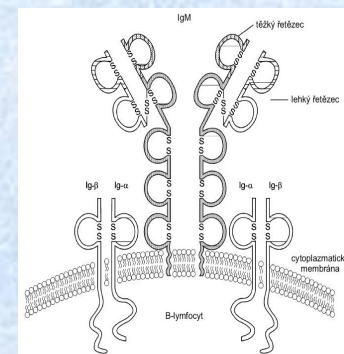
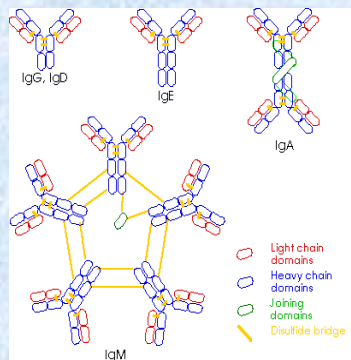
Imunoglobuliny

Protilátky



Imunoglobuliny

- Imunoglobuliny neboli protilátky jsou glykoproteiny, které jsou hlavní humorální komponentou specifické imunitní odpovědi.
- Jsou produktem plazmatických buněk, terminálního diferenciačního stadia B lymfocytů.
- Sekretované (rozpuštěné) imunoglobuliny x membránově vázané imunoglobuliny (BCR)



Struktura imunoglobulinů

- 2 těžké (H) řetězce kovalentně spojeny cystinovými můstky, ke každému H řetězci je cystinovým můstkem připojen lehký (L) řetězec

Složení řetězců:

- Řetězce se skládají z tzv. **domén** (prostorová struktura domény připomíná „soudek“, tvořený smyčkami polypeptidového řetězce (110-120 AMK))
- Domény na N konci těžkého i lehkého řetězce se označují **variabilní**, ostatní domény jsou **konstantní**
- H řetězec se skládá ze 4 až 5 domén (1 variabilní, 3-4 konstantní)
- L řetězec se skládá ze 2 domén (1 variabilní, 1 konstantní)

Typy řetězců:

- Typy L řetězců - κ , λ
- Typy H řetězců - μ , δ , γ (γ_1-4), α (α_1, α_2), ϵ

Struktura imunoglobulinů

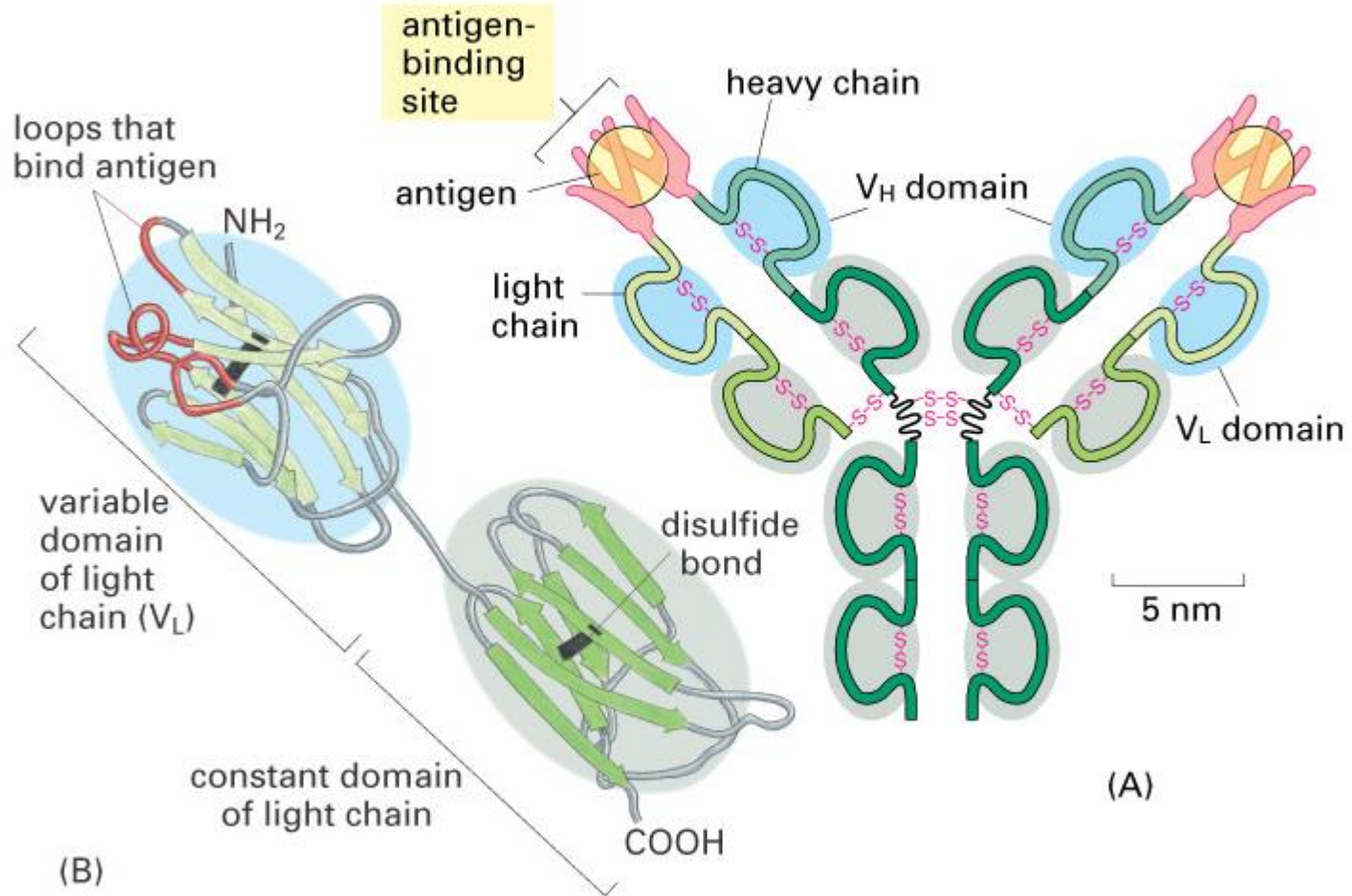


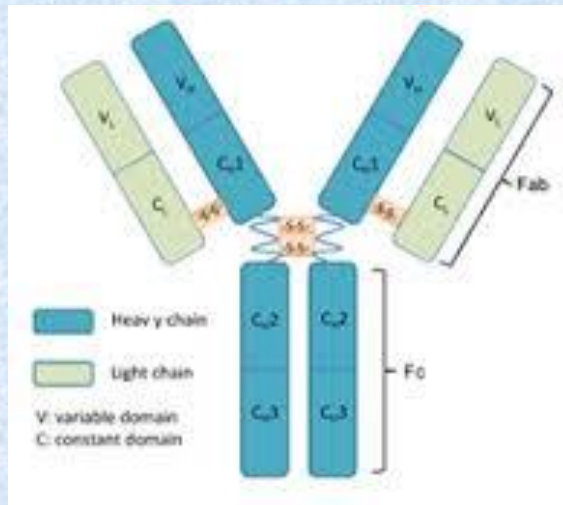
Figure 4-32 Essential Cell Biology, 2/e. (© 2004 Garland Science)

Variabilní domény L a H řetězce tvoří vazebné místo pro Ag

Pantová oblast = místo, kde jsou těžké řetězce spojeny cystinovými můstky

Molekulu imunoglobulinu lze proteolyticky rozštěpit

- použitím enzymu papainu získáme 2 fragmenty zvané Fab a fragment Fc, Fc části imunoglobulinů jsou silně glykosylovány, váží se na Fc receptory fagocytů

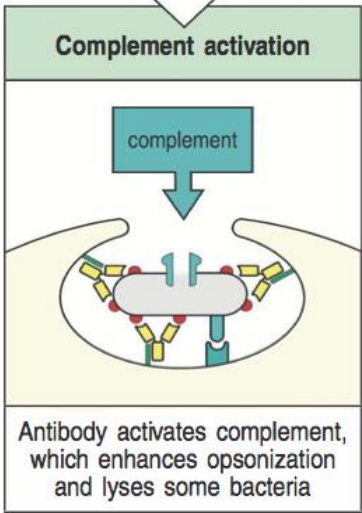
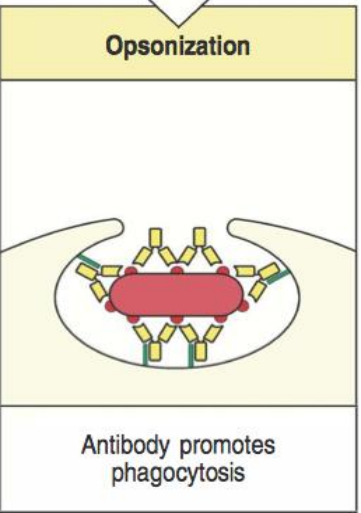
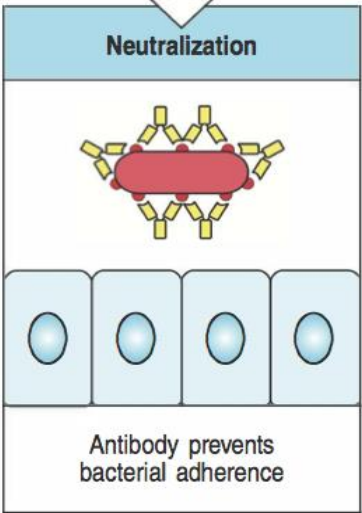
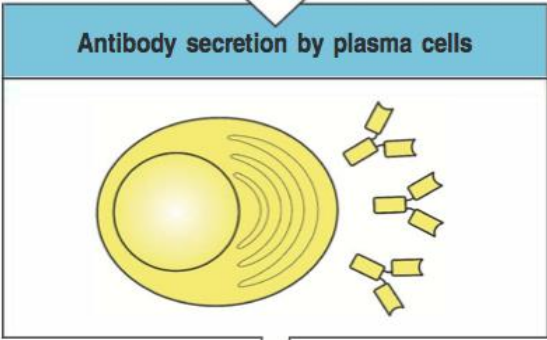
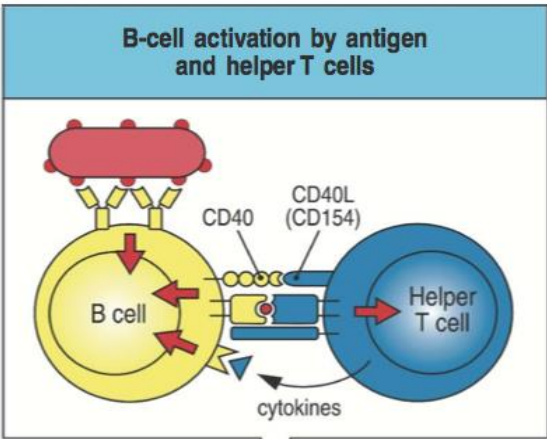


J řetězec (molekuly některých tříd imunoglobulinů se skládají z několika jednotek spojených řetězcem J)

Sekreční komponenta (podjednotka obsažená v sekrečním IgA)

Funkce imunoglobulinů

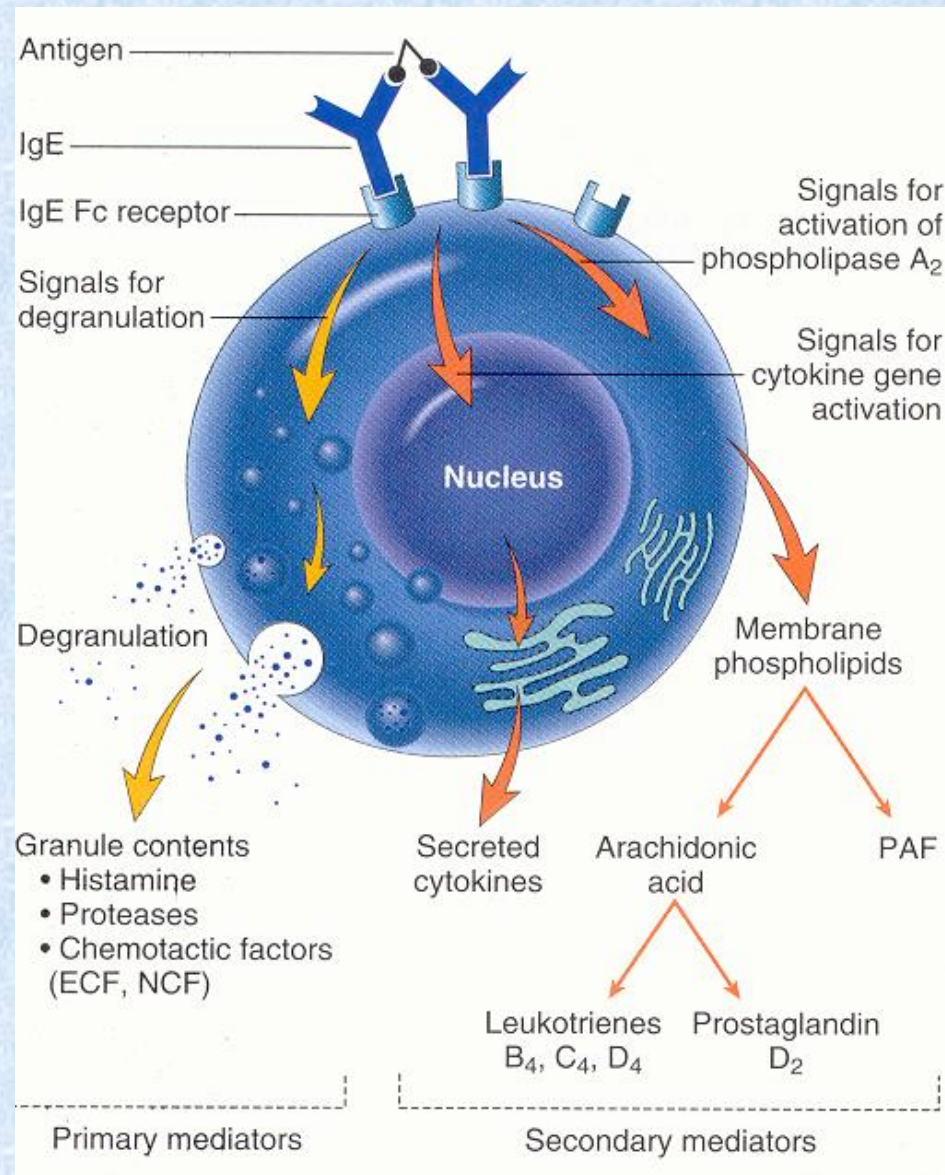
- Neutralizace Ag (zablokování funkce Ag)
- Aktivace komplementu (protilátky navázené na antigen mohou aktivovat klasickou cestu komplementu)
- Opsonizace (vazbou protilátky na antigenní částice a mikroorganismy se zlepšuje jejich pohlcení fagocyty)
- Aktivace mastocytů prostřednictvím IgE
- ADCC (cytotoxická reakce závislá na protilátkách- Fc receptor CD 16 na povrchu NK bb+opsonizovaná buňka-aktivace NK buněk)



Aktivace mastocytů prostřednictvím IgE

vazbou alergenu nebo
mnohobuněčného parazita
na IgE protilátky dochází
k přemostění sousedních FcεRI
receptorů umístěných na
mastocytech a
dochází k vyplavení :

- preformované mediátory
- novotvořené mediátory
- cytokiny

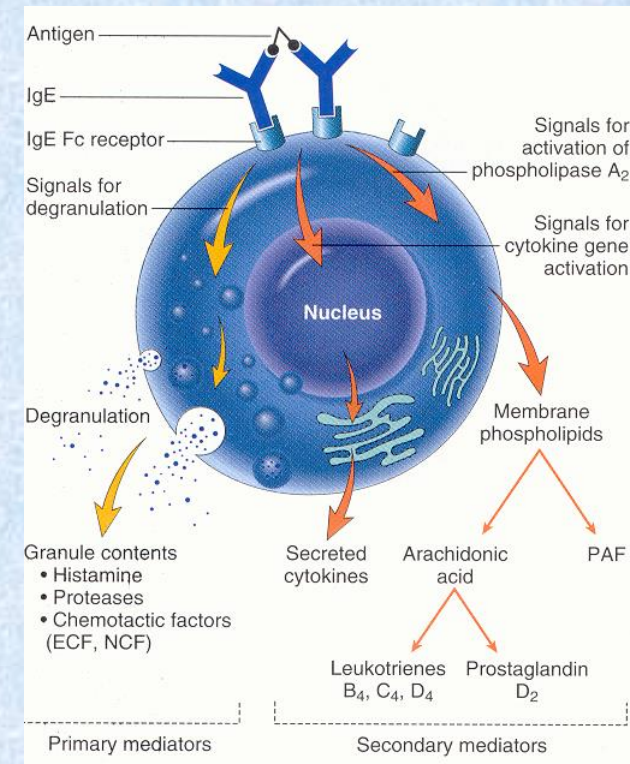


Preformované mediátory:

histamin - biogenní amin, způsobuje bronchokonstrikci, zvýšenou sekreci hlenu v DC, vazodilataci a zvýšenou permeabilitu stěn cév, zvýšená peristaltika

proteázy – tryptáza, chymáza, katepsin, karboxypeptidáza A, kininogenáza

proteoglykany – heparin, chondroitin sulfát



Novotvořené mediátory

Přemostění molekul IgE na povrchu mastocytů vede k aktivaci fosfolipázy A2 – uvolňuje kys. arachidonovou a PAF z membránových fosfolipidů

→ **kys. arachidonová** je metabolizována

- cyklooxygenázou za vzniku **prostaglandinu D2**

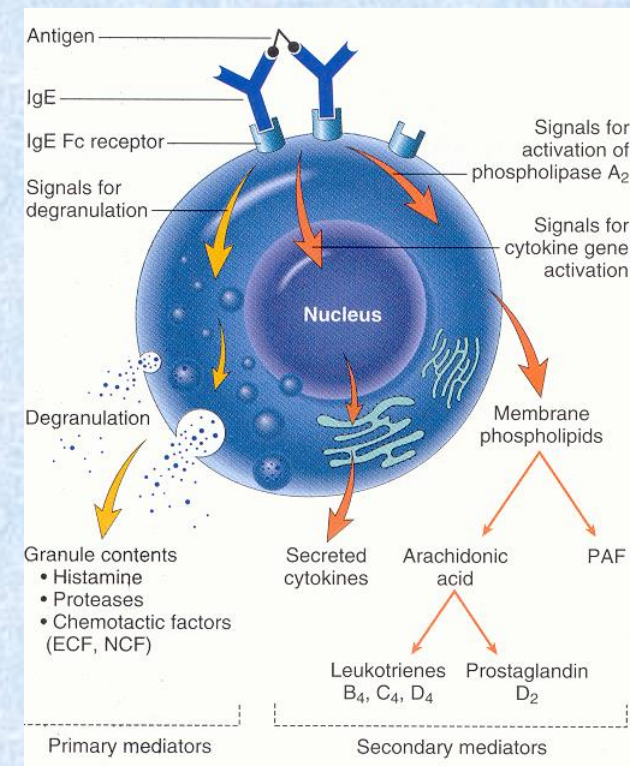
(bronchokonstrikce, vazodilatace, zvýšení cévní permeability, přímo aktivuje eosinofily)

- 5-lipoxygenázou za vzniku **leukotrienů**

(LTB4 zvyšuje expresi adhezivních molekul na leukocytech, LTC4, LTD4 a LTE4

navodí prolongovanou bronchokonstrikci, nárůst kapilární permeability, působí chemotakticky na eosinofily a neutrofilny)

→ **PAF** obdobné účinky jako výše uvedené

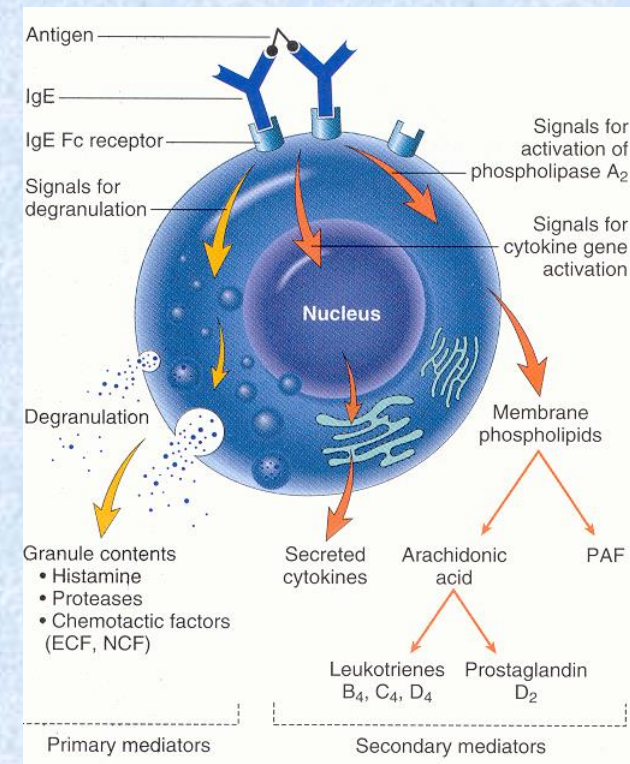


Cytokiny produkované mastocyty a bazofily

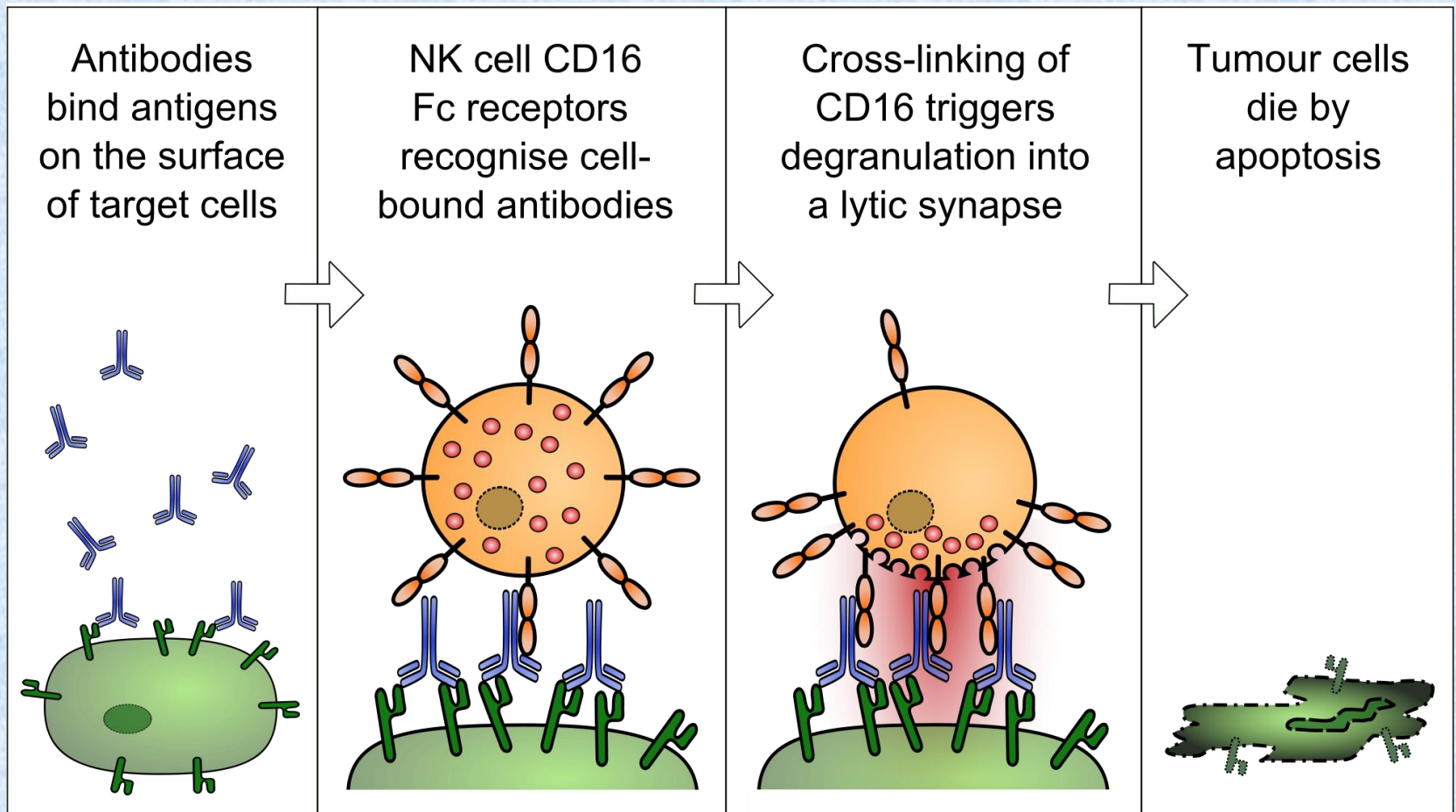
IL 4 a 13 podporují tvorbu IgE protilátek

IL 5 proliferační faktor a chemoatraktant pro eosinofily

TNF- α zvyšuje expresi adhezivních molekul na cévním endotelu, umožňuje vycestování eosinofilů a neutrofilů mimo cévní řečiště



- **ADCC** (antibody-dependent cellular cytotoxicity, cytotoxická reakce závislá na protilátkách) : NK buňky rozpoznají buňku opsonizovanou IgG protilátkami prostřednictvím svých Fc receptorů CD 16, což vede k aktivaci cytotoxických mechanismů (degranulaci NK buněk)

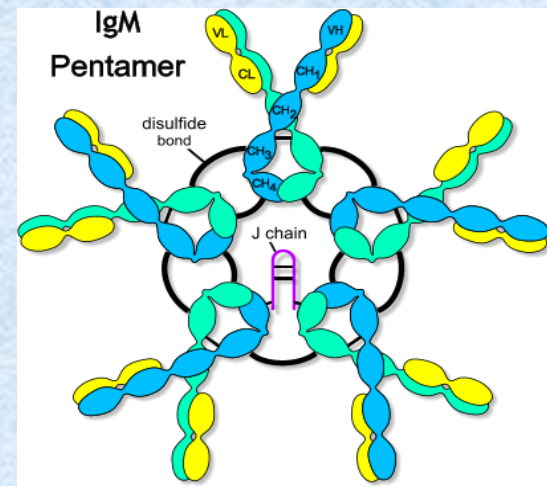


Třídy imunoglobulinů a jejich funkce

- Rozlišujeme podle konstantní části H řetězce
- IgM, IgD, IgG (IgG1 – IgG4), IgA (IgA1, IgA2), IgE

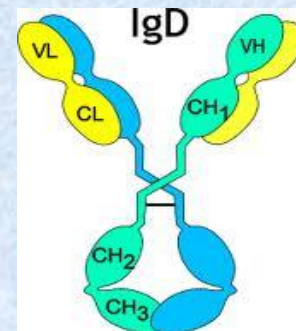
IgM - první izotyp, který se tvoří po setkání s Ag

- jako monomer tvoří BCR
- sekretovaný ve formě pentamerů (10 vazebných míst)
- funkce : neutralizace Ag, aktivuje komplement, neváže se na Fc receptory fagocytů
- (koncentrace 0,4 – 2,3 g/l; biol. poločas 6 dnů)



IgD - jako monomer tvoří BCR

- v séru se nachází ve velmi malé koncentraci
- (koncentrace 0,1 g/l; biol. poločas 3 dny)

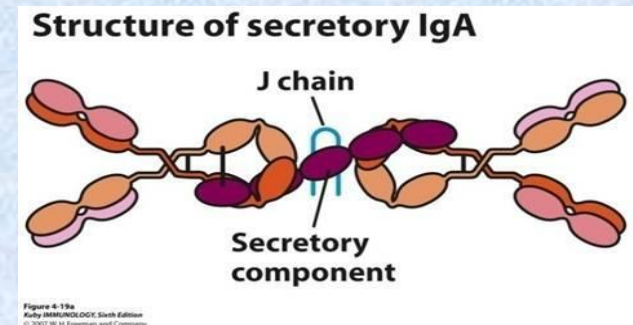


- **IgG** - tvořen při sekundární imunitní odpovědi
 - podtřídy IgG1-IgG4
 - funkce: neutralizace, opsonizace, aktivace komplementu, ADCC
 - jednotlivé izotypy IgG1-IgG4 se liší schopností aktivovat komplement a vázat se na Fc receptory fagocytů (opsonizace)
 - přestupuje placentou
 - (koncentrace 8 – 18 g/l; biol. poločas **21** dnů)

- **IgA**

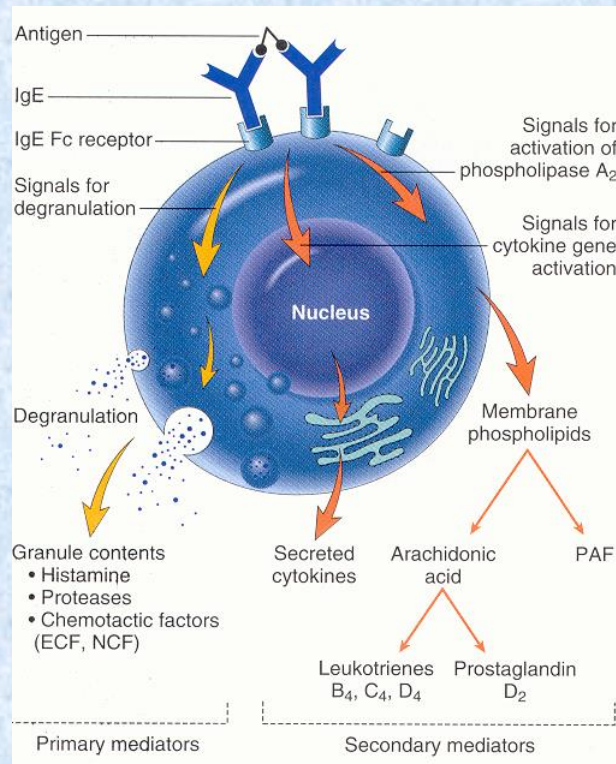
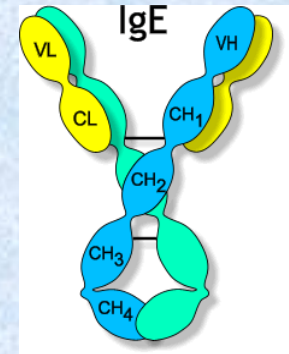
slizniční IgA - nejvýznamější slizniční imunoglobulin

- dimér se **sekreční komponentou**
- transcytoza – IgA je přes epitel transportován pomocí transportního Fc receptoru (poly-Ig-receptor), na lumenální straně je IgA odštěpen i s částí receptoru tzv. sekreční komponentou, která chrání Ig před střevními proteázami
- ochrana sliznic – neutralizace antigenů na sliznicích, opsonizace, neaktivuje komplement
- sliny, slzy, mateřské mléko



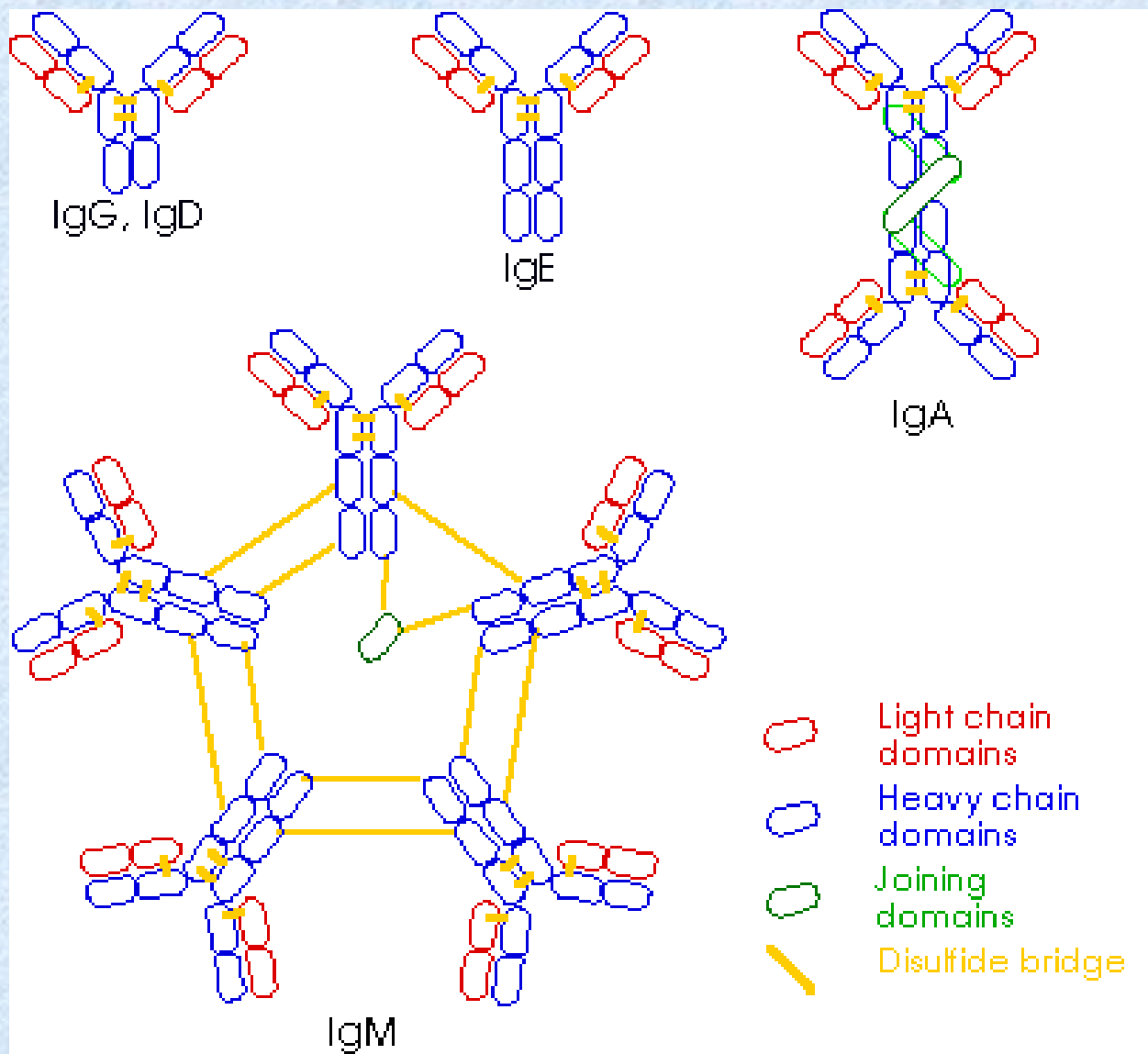
sérový IgA – monomer, dimer či trimer
(koncentrace 0,9 – 3,5 g/l; biol. poločas 6 dnů)

- **IgE** - uplatňuje se při obraně proti mnohobuněčným parazitům
 - je hlavní příčinou alergických reakcí
 - (koncentrace 0-100 kIU/l; biol. poločas 2 dny)



- navázání mnohobuněčného parazita nebo alergenu → agregace několika molekul FcεRI → aktivace mastocytu

Imunoglobuliny – shrnutí:



Genetický základ tvorby imunoglobulinů

- Geny kódující řetězce imunoglobulinů se skládají z většího počtu několika druhů úseků (**genové segmenty**)
 - **Geny kódující H řetězce imunoglobulinů** se nacházejí v genovém komplexu na chromozomu 14. Genové segmenty V, D, J kódují variabilní domény H řetězců. Genové segmenty C kódují celou konstantní část imunoglobulinového řetězce.
 - **Geny kódující L řetězce imunoglobulinů** se nacházejí v genovém komplexu na chromozomu 2 a 22. Jejich struktura je jednodušší, neobsahují segmenty D a skládají se z menšího počtu úseků V a J.

- **Genové segmenty pro H řetězce - chromozóm 14**

- V (variabilita) - několik set

- D (diversita) - asi 50

- J (joining) – 9

- C konstantní části H řetězce

- **Genové segmenty pro L řetězce - κ chromozóm 2**

- λ chromozóm 22

- V (variabilita)

- J (joining)

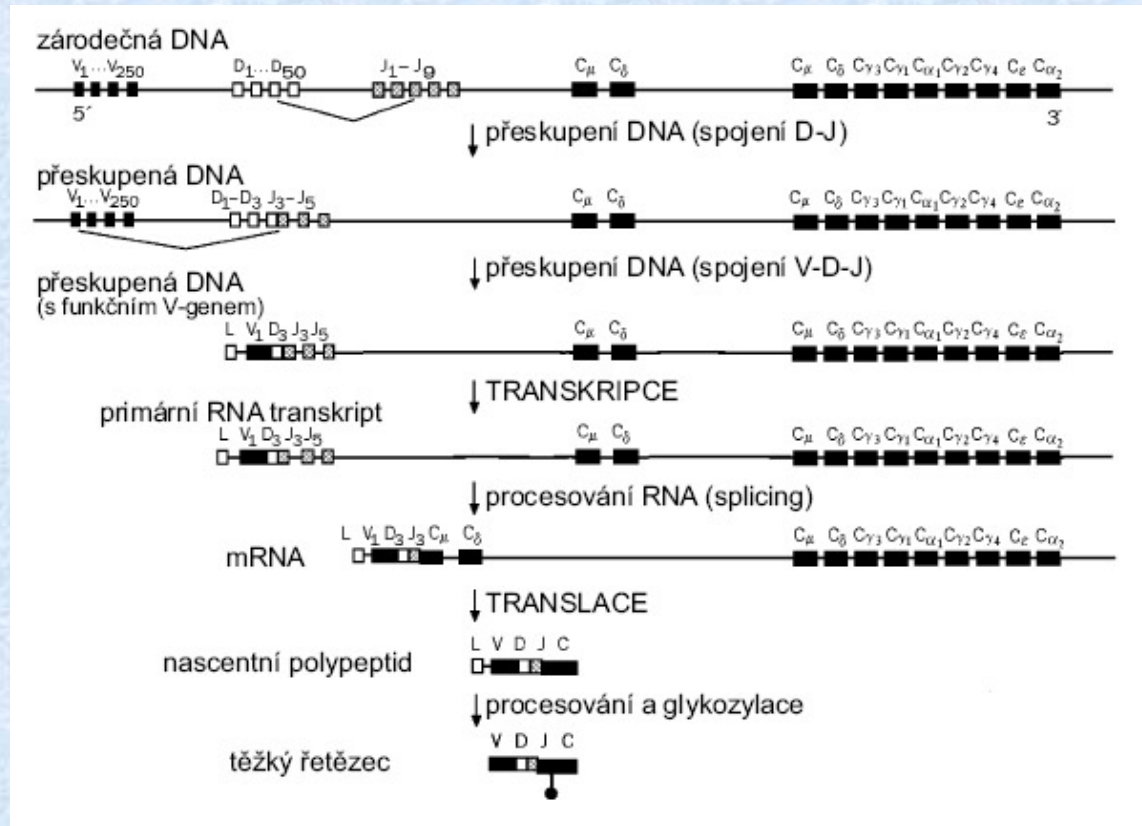
- C konstantní části L řetězce

- **Na koncích V, D, J úseků jsou signální sekvence**, které jsou rozpoznávány enzymy rekombinázami, které provádějí přeskupování těchto genů

- **Po stranách C segmentů jsou tzv. switch sekvence**

- (přesmykové), které jsou rozpoznávány enzymy rekombinázami, které provádějí izotypový přesmyk

Přeskupování genů kódujících H řetězce



1. D-J přeskupení - vyštěpení úseku IgH genového komplexu mezi některým D a J segmentem (probíhá na obou chromozómech), v progenitorech B-lymfocytů (pro-B)

2. V-D přeskupení – vyštěpení úseku mezi některým V segmentem a DJ. Přepis přeskupěného IgH genu do mRNA, sestřih primárního transkriptu - translace - těžký řetězec.

Přeskupování genů kódujících H řetězce

- jako první se tvoří H řetězce μ
- v okamžiku, kdy buňka prošla přeskupováním IgH genů a prokázala to tvorbou μ řetězců, stává se z ní **pre- B lymfocyt**
- pre-B lymfocyt nese pre-B receptor, složený z IgH řetězce μ a náhradního L řetězce, po vytvoření a objevení se pre-B receptoru na povrchu pre-B lymfocytu dojde k zahájení přeskupování L-řetězců
- není-li přeskupování úspěšné, B lymfocyt hyne

Přeskupování genů kódujících L řetězce

1. Nejprve se přeskupují geny kódující L řetězec κ - dochází k vyštěpování úseků mezi některým V a J segmentem.
2. Jestliže není přeskupování κ genů úspěšné, zahájí se přeskupování genů λ .

Není-li přeskupování úspěšné, B lymfocyt hyne.

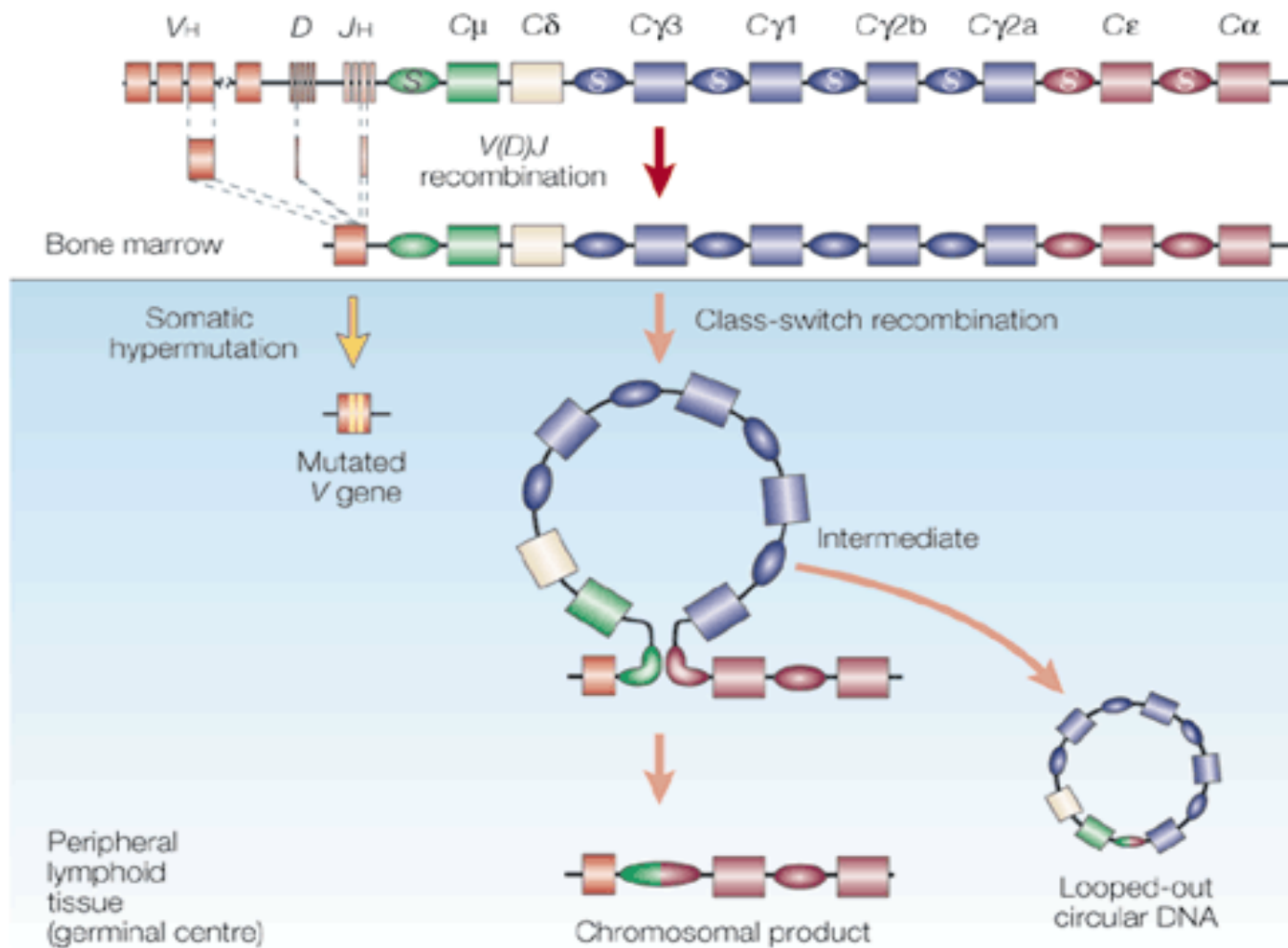
Přeskupování genů kódujících L řetězce

- funkční L řetězec vytvoří s H (μ) řetězcem kompletní povrchový **IgM**, který nahradí pre-B receptor
- expresí povrchového IgM se buňka stává **nezralým B lymfocyt**
- v dalším vývojovém stadiu dochází k současné expresi povrchového **IgM a IgD**, čímž se z buňky stává **zralý B lymfocyt**

Pro B lymfo – pre B lymfo – nezralý B lymfocyt – zralý B lymfocyt

Izotypový přesmyk (class switch)

- Dochází k němu během terminální diferenciaci B lymfocytu po aktivaci Ag na povrchu FDC (nezbytný kostimulační signál přes CD40 na povrchu B buněk)
- Enzymy rekombinázy rozpoznávají switch sekvence lokalizované po stranách C segmentů a vyštěpují úseky genů
- Po eliminaci části C oblasti je do mRNA přepsán ten segment, který je nejbližší VDJ segmentu a po sestřihu a translaci vzniká příslušný izotyp H řetězce



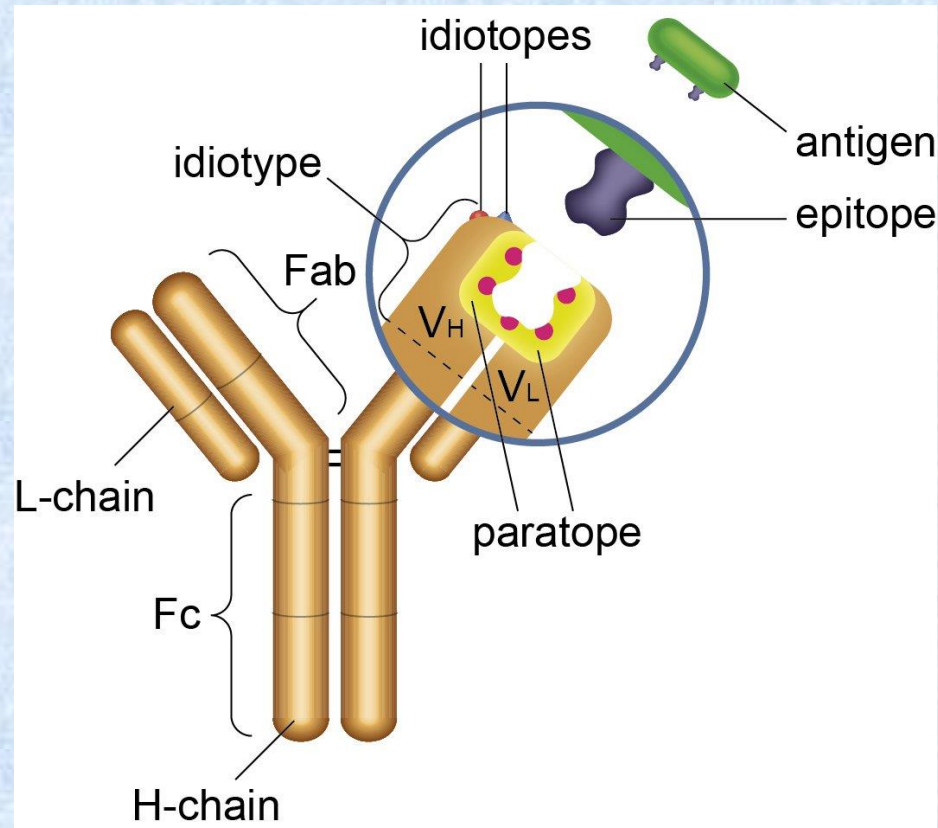
Izotypový přesmyk (class switch)

- **Cytokiny** regulují k jakému izotypovému přesmyku dojde:
 - **IL-4** stimuluje přesmyk na IgE a IgG4, (u myší IgG1)
 - **TGF β** stimuluje přesmyk na IgG2 a IgA

Antiidiotypové protilátky

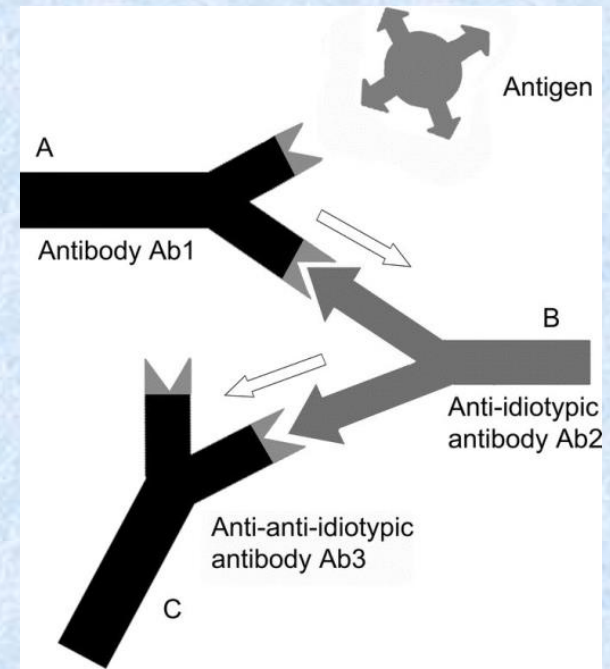
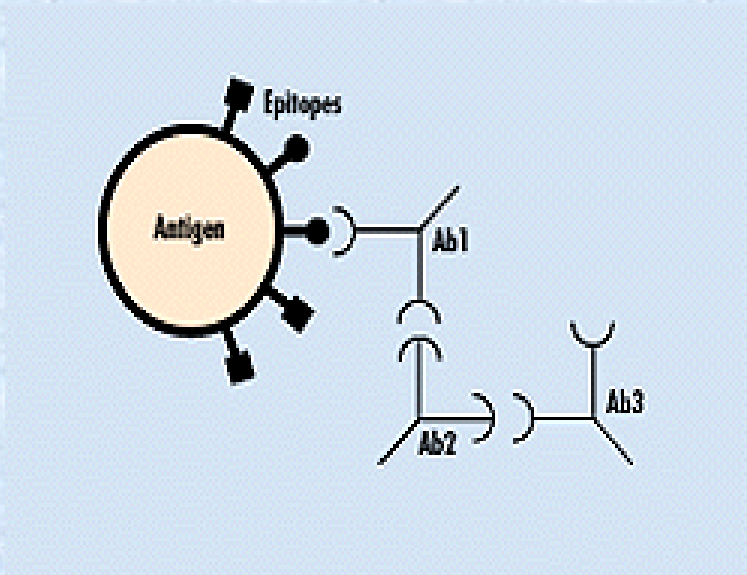
Paratop = část protilátky schopná specificky vázat antigen, vyskytuje se ve variabilní oblasti Ig
Variabilní oblast protilátky však může vystupovat také v opačné roli, v roli antigenu. Každý imunoglobulin tak má ve své variabilní oblasti jedno nebo více míst, kterou může být antigen-specificky vázána jinou protilátkou. Tato struktura se označuje jako **IDIOTOP** a je vlastně obdobou epitopu na běžných antigenech.

IDIOTYP = souhrn idiotopů



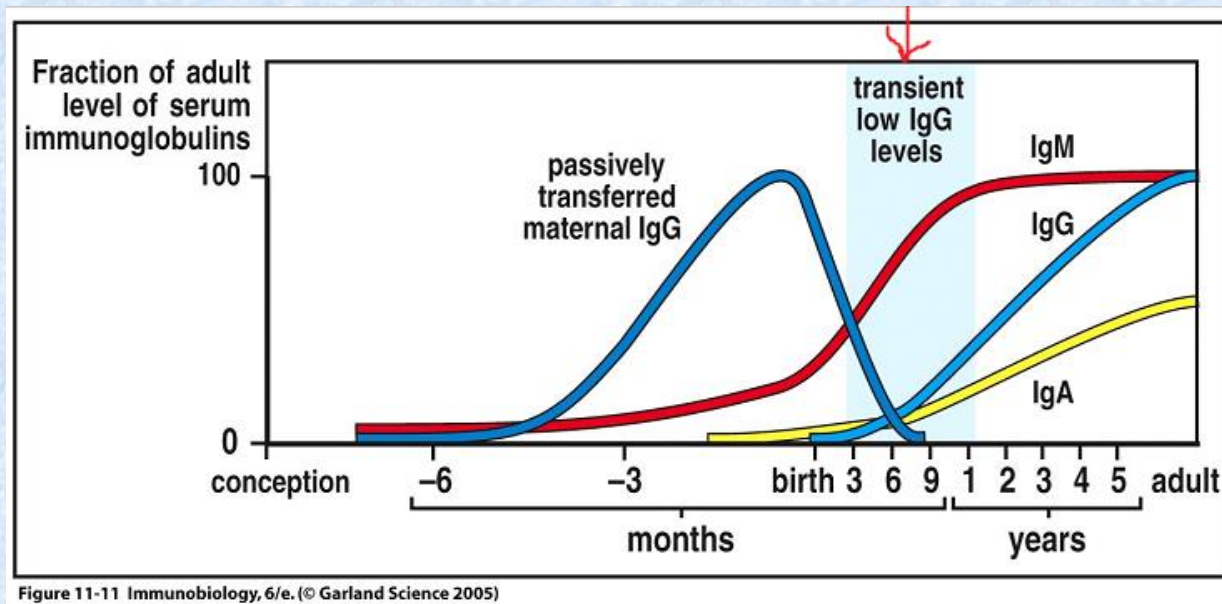
Antiidiotypové protilátky

- Idiotypické struktury protilátek 1. generace jsou rozpoznávány některými B lymfocyty jako antigeny a mohou se proti nim tvořit tzv. antiidiotypové protilátky (protilátky 2. generace; některá vazebná místa mohou připomínat Ag, který vyvolal tvorbu protilátek 1. generace)
- Proti protilátkám 2. generace se tvoří protilátky 3. generace (anti-antiidiotypové protilátky)
- Tato **idiotypová síť** může hrát roli v regulaci protilátkové odpovědi



Ontogeneze tvorby protilátek

- Syntéza specifických protilátek začíná kolem 20. - 24. týdne gestace, celková koncentrace IgA a IgM zůstává až do porodu neměřitelná, IgG se začínají tvořit až po porodu



- Pozvolný nárůst tvorby vlastních IgG za poklesu mateřských IgG (kolem 3. - 6.měs.)
- Koncentrace IgM dosahuje hodnot srovnatelných s dospělými v 1. - 3.roce života, IgG +A mezi 10. - 15. r.

Ontogeneze tvorby protilátek

- Po porodu B lymfocyty na imunizaci reagují převážně tvorbou IgM, přesmyk na jiné izotypy je pomalejší (z důvodu nižší výkonnosti pomocných T lymfocytů)
- Protilátková reakce na polysacharidové antigeny se objevuje až kolem 2.roku života (proto očkování proti těmto antigenům - pneumokokovým a hemofilovým- vakcínami, v nichž jsou konjugovány s proteinovými antigeny)
- Ve stáří je slabší protilátková odpověď na nové podněty a vyšší produkce autoproti látek

Imunitní odpověď založená na protilátkách

- Tento druh imunitních reakcí je založen na rozeznání antigenu povrchovým antigeně specifickým receptorem B lymfocytů (BCR).
- Za vhodných podmínek se takto stimulované B lymfocyty pomnoží a diferencují na plazmatické buňky, které sekretují velké množství protilátek.
- Vytvořené protilátky se váží na antigen, který vyvolal jejich tvorbu, po navázání protilátky neutralizují nebo opsonizují antigen ev. aktivující komplement

Protilátková reakce vyvolaná:

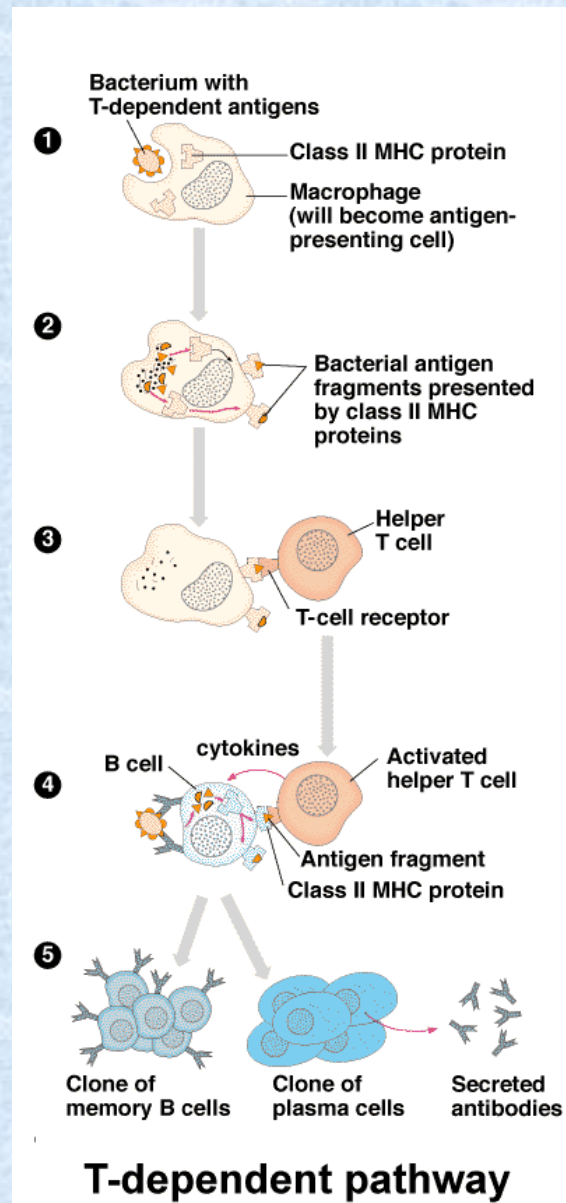
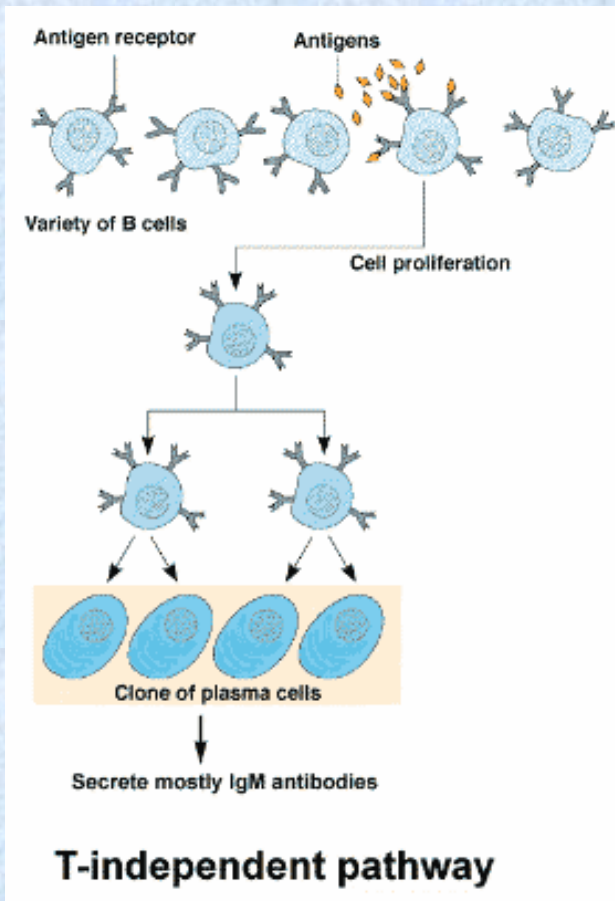
Antigeny nezávislími na T lymfocytech

- vyvolávají diferenciaci B lymfocytů na plasmocyty a sekreci protilátek i bez spolupráce s Th lymfocyty
- vyvolávají převážně tvorbu nízkoafinních IgM protilátek
- jedná se zvláště o bakteriální lipopolysacharidy (vazba na receptor B lymfocytů pro LPS) a polysacharidy (reagují simultánně s velkým počtem BCR)

Antigeny závislími na T lymfocytech

- schopny vyvolat protilátkovou odpověď pouze při spolupráci Th buněk s B lymfocyty
- reakce na tyto Ag probíhá ve dvou fázích – primární a sekundární
- tvorba paměťových buněk a vznik vysokoafinních protilátek v procesu tzv. afinitní maturace
- většina antigenů, zejména proteinových

T-nezávislá a T-závislá imunitní odpověď



Protilátková reakce vyvolaná antigeny závislými na T lymfocytech

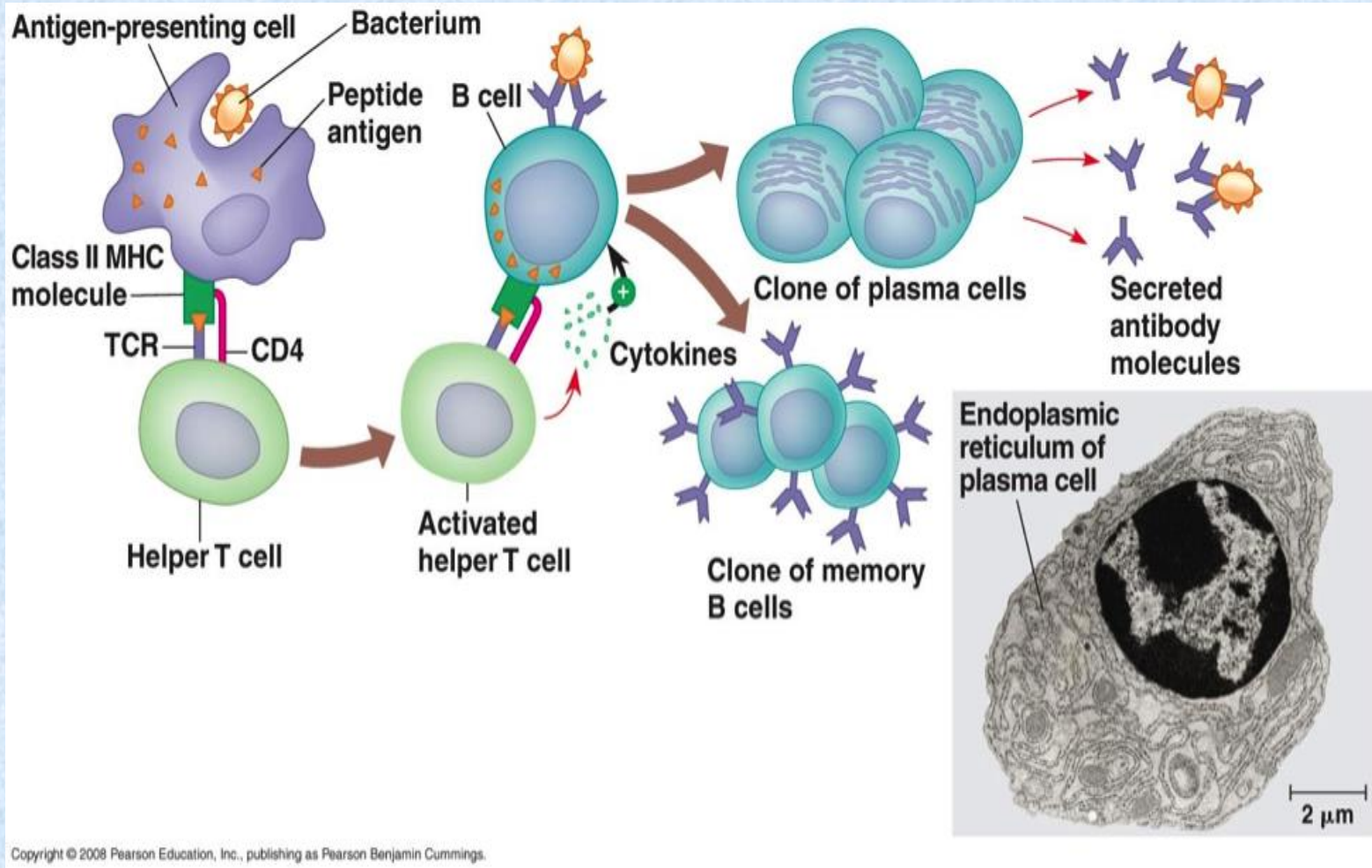
Primární fáze protilátkové reakce

Při prvním setkání s antigenem téměř současně probíhají 2 děje:

- Stimulace B lymfocytu vazbou Ag na BCR
- Pohlčení Ag APC a jeho prezentace prostřednictvím MHC gp II prekurzorům T_H buněk → vznik klonu antigenně specifických Tfh buněk (folikulární pomocné T lymfo)

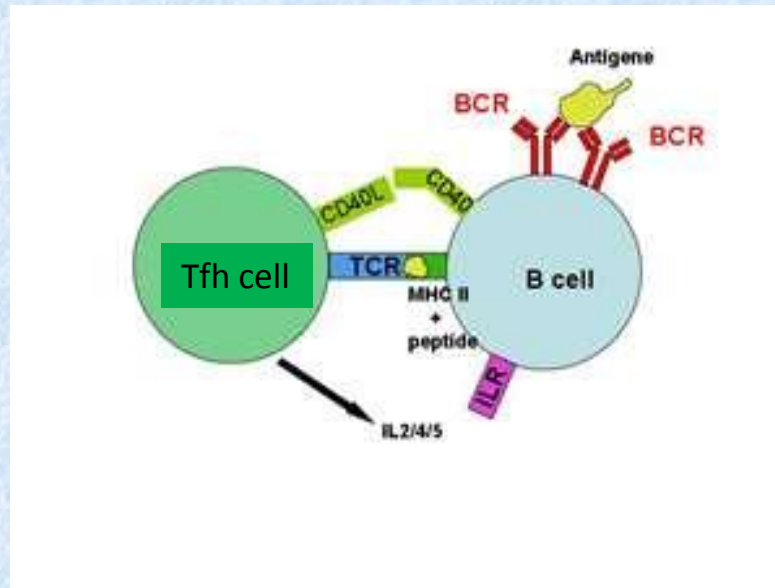
Tfh lymfocyty pak poskytují pomoc antigenem stimulovaným **B lymfocytům** (mají na povrchu antigenní peptidy v komplexu s MHC gp II), což vede k jejich proliferaci, diferenciaci na **plazmatické bb** (produkují Ab) a na **paměťové bb**

Setkání B lymfocytu s Ag v sekundárních lymfatických orgánech



Tfh imunitní odpověď – pomoc B lymfocytům

- Základní funkcí Tfh buněk je spolupráce s B lymfocyty (které byly stimulovány Ag) prostřednictvím cytokinů (IL-4, IL-21) a přímého mezibuněčného kontaktu



- Protilátky produkované v primární fázi (za 3-4 dny) jsou **IgM** a mají nízkou afinitu k Ag, s Ag tvoří imunokomplexy
- Imunokomplexy jsou zachytávány v sekundárních lymfoidních orgánech na povrchu **FDC (folikulárních dendritických bb)** v primárních lymfoidních folikulech– na povrchu těchto bb se ve formě imunokomplexů antigeny skladují a koncentrují, následně mohou být rozeznány B lymfocyty

FDC = bb prezentující Ag B lymfocytům

Protilátková reakce vyvolaná antigeny závislými na T lymfocytech

▪ Sekundární fáze protilátkové reakce

- po rozeznání antigenu B lymfocyty na povrchu FDC v primárních lymfoidních folikulech a po obdržení pomocných signálů od Tfh buněk začne nové kolo dělení a diferenciaci B lymfocytů
- doprovázeno somatickými mutacemi V segmentů pro H a L řetězce → vznik klonů B lymfocytů s novými BCR → přežívají pouze B lymfocyty s BCR s nejvyšší afinitou k Ag = **afinitní maturace protilátek** (4-6x vyšší afinita ve srovnání s IgM z 1.kola)
- intenzivní proliferace doprovázená masivním hynutím B buněk je mikroskopicky pozorovatelná jako vznik sekundárních lymfoidních folikulů, které mají zárodečné (germinální) centrum obsahující B bb, FDC a Tfh – celý děj se nazývá **germinální reakce**

Protilátková reakce vyvolaná antigeny závislými na T lymfocytech

- Kromě změn afinity dochází také k **izotypovému přesmyku**, tj. záměně konstantní části produkovaných protilátek, místo původních IgM se začnou tvořit jiné izotypy (IgG, IgA, IgE), jaké izotypy vzniknou určuje cytokinové prostředí
- Kontakt mezi **CD40** (B lymfocyt) a **CD40L** (Tfh lymfocyt) je nezbytný pro zahájení somatických mutací, izotypového přesmyku a vznik paměťových bb.

- V sekundární fázi imunitní reakce vznikají protilátky s vyšší afinitou k Ag a s jinými efektorovými vlastnostmi závislými na izotypu (aktivace komplementu, vazba na Fc receptory), vznikají také **paměťové bb** pro další setkání s Ag
- Protilátky v organismu po primární infekci přetrvávají po dlouhou dobu
- Primární a sekundární fáze na sebe při typických infekcích bezprostředně navazují.

Protilátková odpověď při opakované infekci

- reakce na první a opakované (pozdější) setkání

Primární imunitní odpověď

- následuje po prvním kontaktu s antigenem, kdy ještě nejsou přítomny paměťové buňky
- následuje po určité době latence (cca 5-7 dnů) od prvního setkání s Ag
- tvoří se převážně nízkoafinní IgM, postupně se tvoří ostatní izotypy s vyšší afinitou
- vznikají paměťové B a T lymfocyty

Sekundární imunitní odpověď

- následuje při dalším kontaktu s antigenem, přetrvává hladina protilátek z předchozího kontaktu a jsou přítomny paměťové buňky – reakce je rychlejší a silnější
- hladina IgM protilátek je nižší, rychleji se tvoří ostatní izotypy, protilátky mají vyšší afinitu k antigenu, protože jsou aktivovány paměťové buňky
- Při opakovaném kontaktu se protilátková odpověď zrychluje a zesiluje, má kratší dobu latence (asi několik hodin) , koncentrace vytvořených protilátek je asi 10x vyšší než u primární odpovědi, převažuje izotyp IgG

Dynamika tvorby protilátek při primární a sekundární odpovědi

