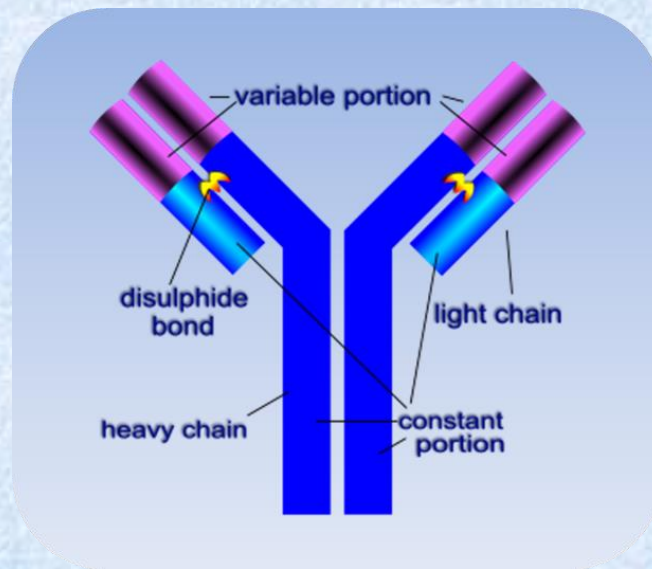


## **MUDr. Martina Vachová**

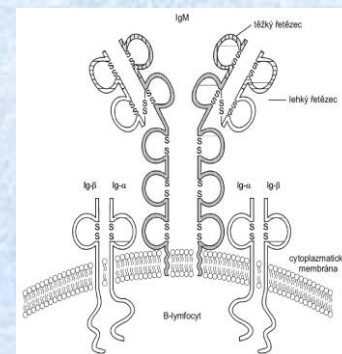
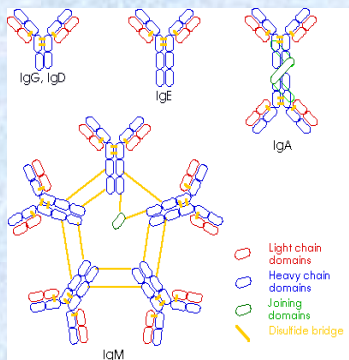
31. Imunoglobuliny - struktura
32. Imunoglobuliny - funkce
33. Genetický základ tvorby imunoglobulinů
34. Biologické a chemické vlastnosti jednotlivých tříd imunoglobulinů I. (IgG, IgA)
35. Biologické a chemické vlastnosti jednotlivých tříd imunoglobulinů II. (IgM, IgD, IgE)
36. Izotypový přesmyk. Idiotypy a antiidiotypy - význam. Imunologická paměť
37. Ontogeneze imunitní odpovědi
38. Primární imunitní odpověď
39. Sekundární imunitní odpověď. Efektorové funkce protilátek

# 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 -  $\kappa$ ,  $\lambda$
- Typy H řetězců -  $\mu$ ,  $\delta$ ,  $\gamma$  ( $\gamma_1-4$ ),  $\alpha$  ( $\alpha_1, \alpha_2$ ),  $\epsilon$

# Struktura imunoglobulinů

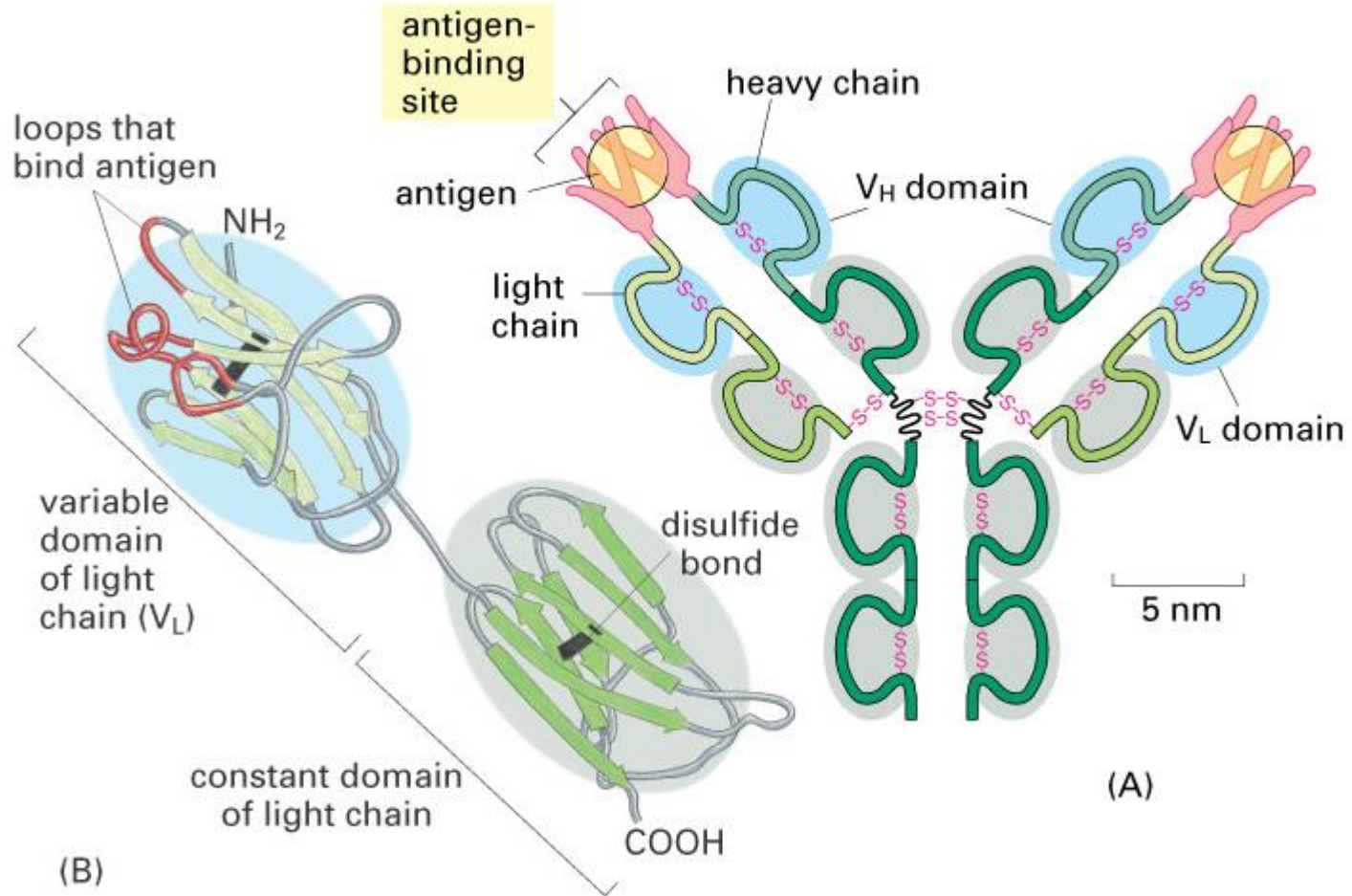


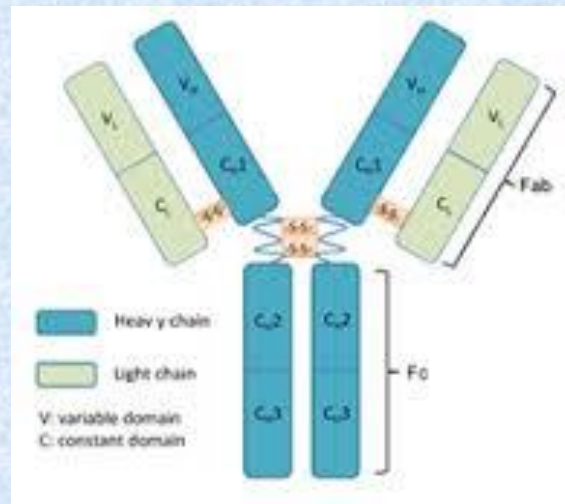
Figure 4-32 Essential Cell Biology, 2/e. (© 2004 Garland Science)

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

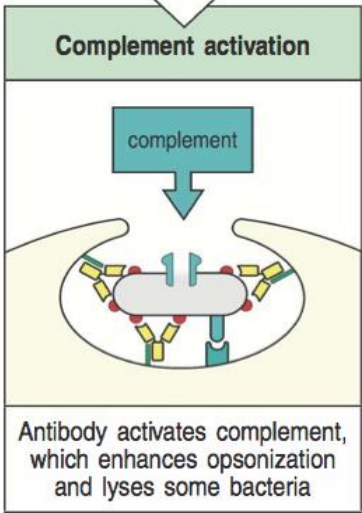
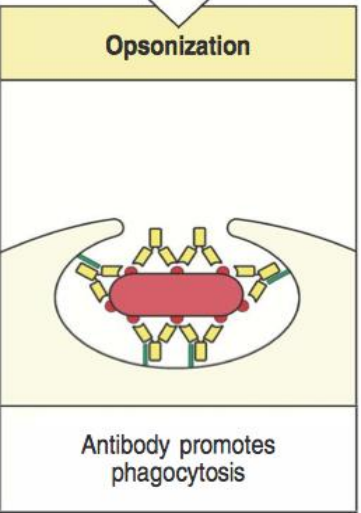
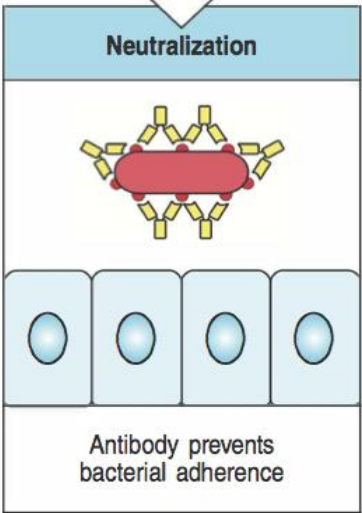
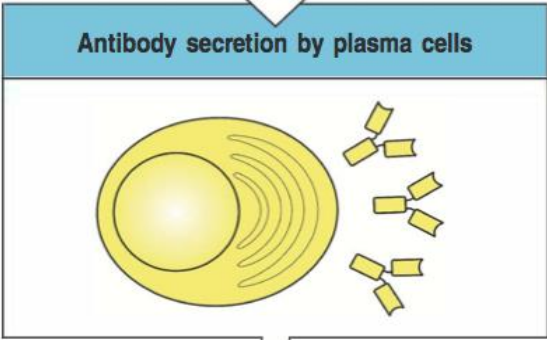
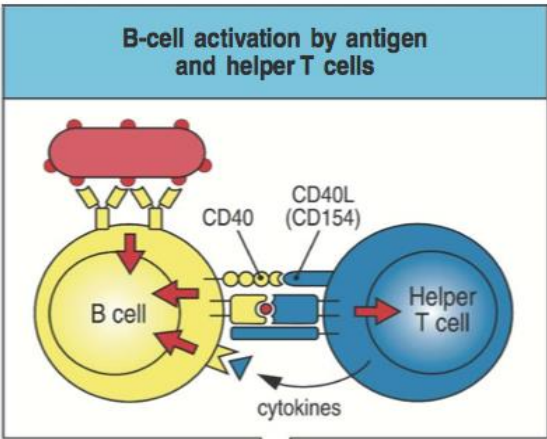


**J řetězec** (molekuly některých tříd imunoglobulinů se skládají z několika jednotek spojených řetězcem J)

**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)

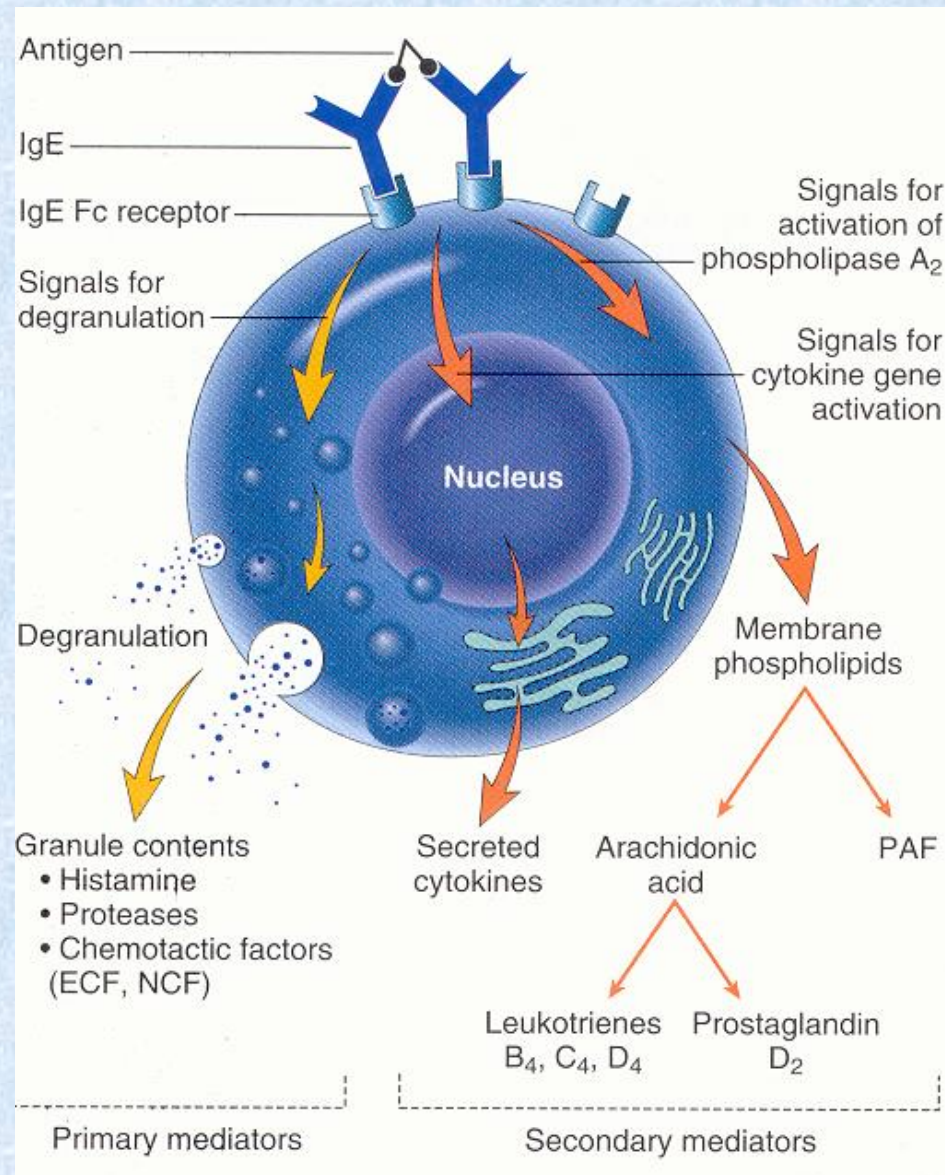




# Aktivace mastocytů prostřednictvím IgE

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

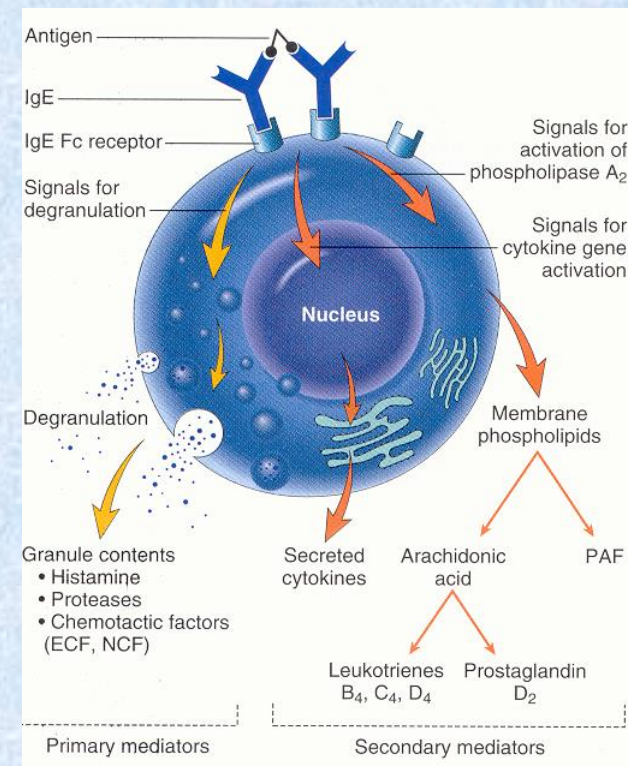


## Preformované mediátory:

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**

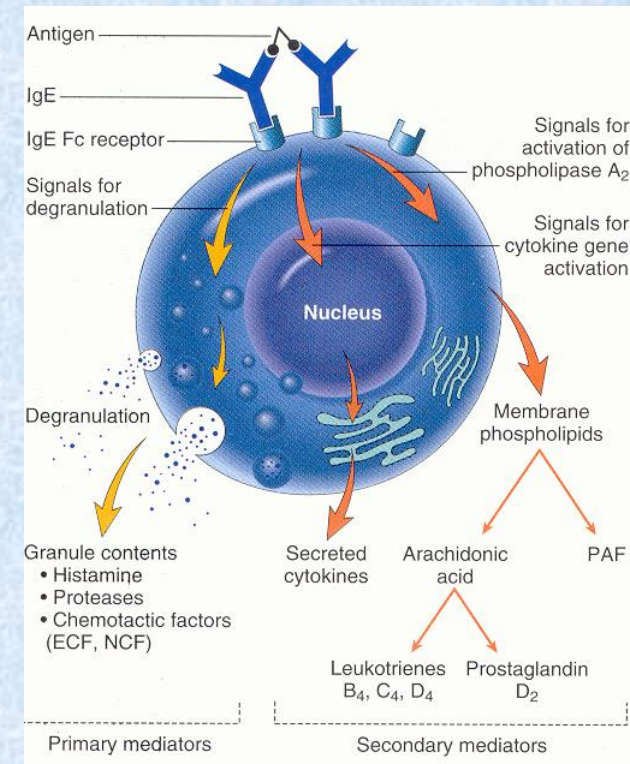
(bronchokonstrikce, vazodilatace, zvýšení cévní permeability, přímo aktivuje eosinofily)

- 5-lipoxygenázou za vzniku **leukotrienů**

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

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

→ **PAF** obdobné účinky jako výše uvedené

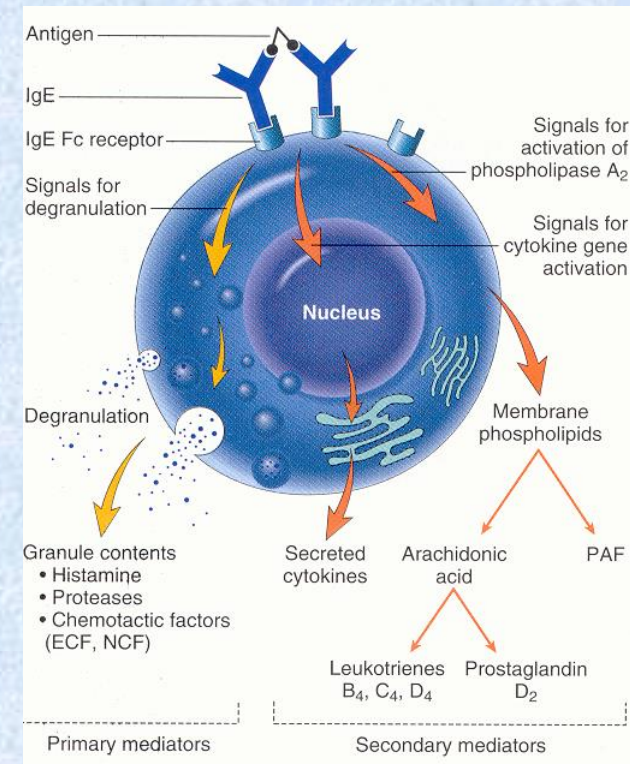


## Cytokiny produkované mastocyty a bazofily

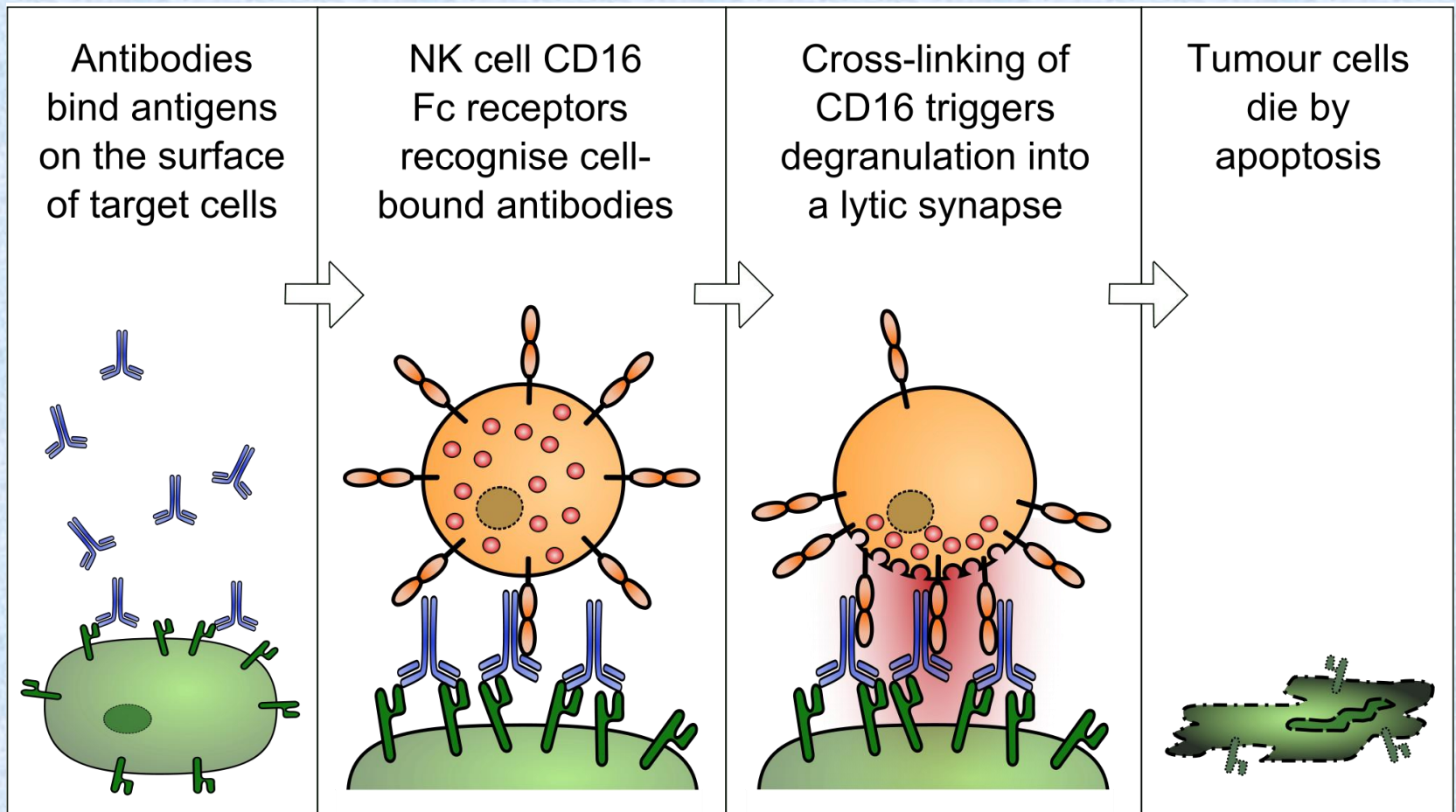
IL 4 a 13 podporují tvorbu IgE protilátek

IL 5 proliferační faktor a chemoatraktant pro eosinofily

TNF- $\alpha$  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)

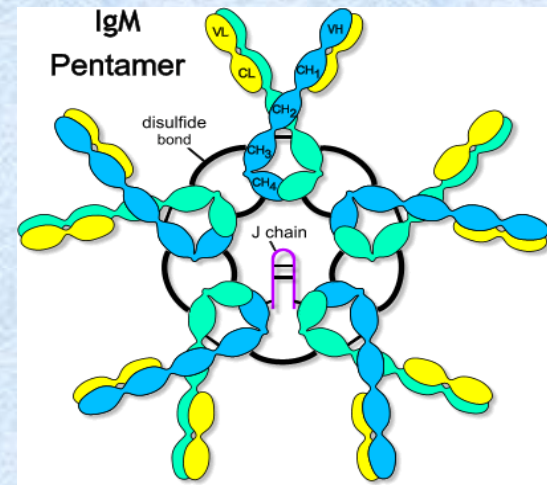


# Třídy imunoglobulinů a jejich funkce

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

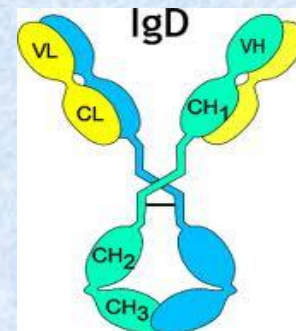
**IgM** - první izotyp, který se tvoří po setkání s Ag

- 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)

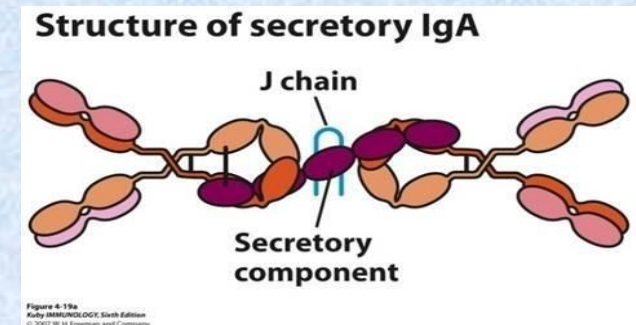


- **IgG** - tvořen při sekundární imunitní odpovědi
  - podtřídy IgG1-IgG4
  - funkce: neutralizace, opsonizace, aktivace komplementu, ADCC
  - jednotlivé izotypy IgG1-IgG4 se liší schopností aktivovat komplement a vázat se na Fc receptory fagocytů (opsonizace)
  - přestupuje placentou
  - (koncentrace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

- **IgA**

**slizniční IgA** - nejvýznamější slizniční imunoglobulin

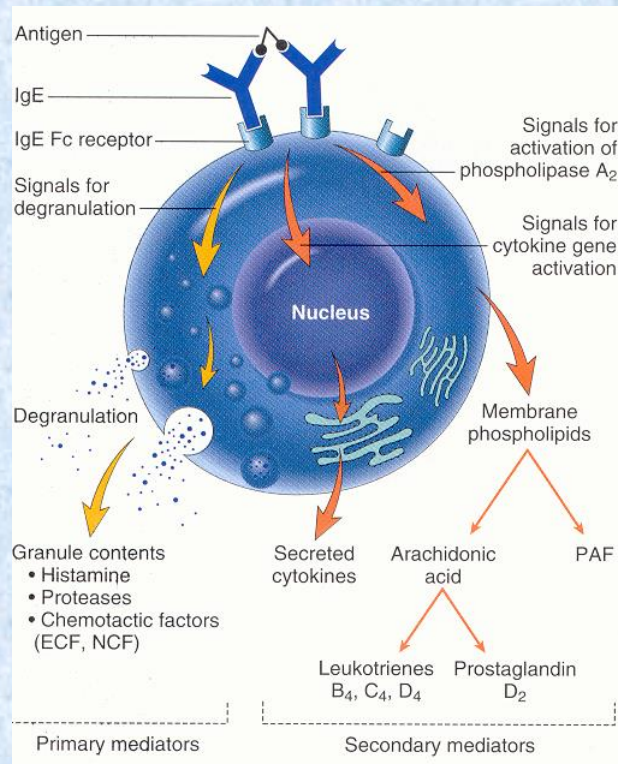
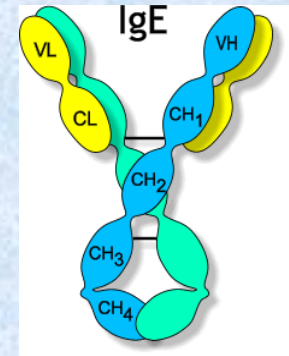
- dimér se **sekreční komponentou**
- transcytoza – IgA je přes epitel transportován pomocí transportního Fc receptoru (poly-Ig-receptor), na lumenální straně je IgA odštěpen i s částí receptoru tzv. sekreční komponentou, která chrání Ig před střevními proteázami
- ochrana sliznic – neutralizace antigenů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

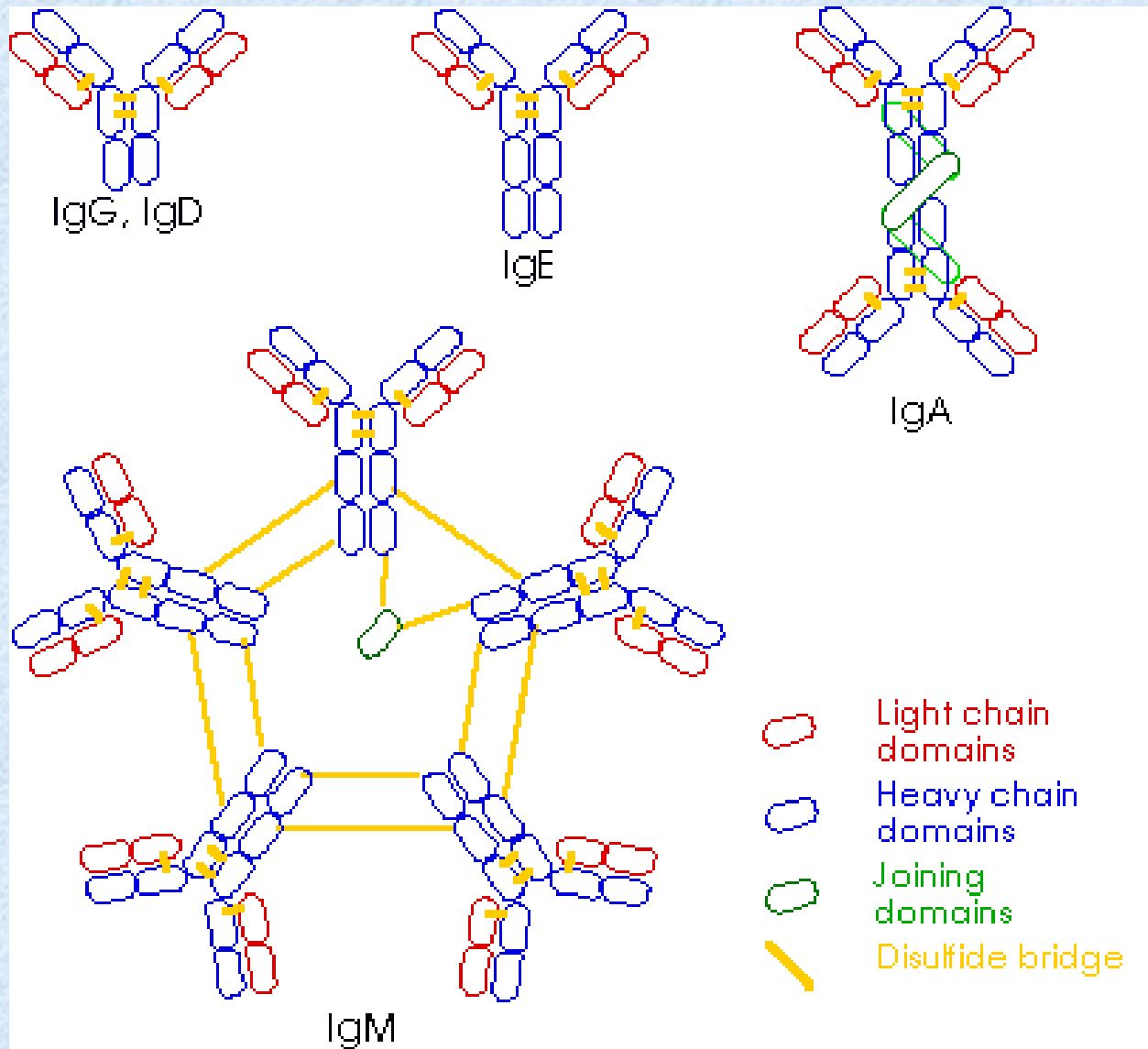


- **IgE** - uplatňuje se při obraně proti mnohobuněčným parazitům
  - je hlavní příčinou alergických reakcí
  - (koncentrace 0-100 kIU/l; biol. poločas 2 dny)



- 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**), které při vývoji lymfocytů podléhají procesu zvanému přeskupování (**rearrangement**)
  - **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 -  $\kappa$  chromozóm 2**

- $\lambda$  chromozóm 22

- V (variabilita)

- J (joining)

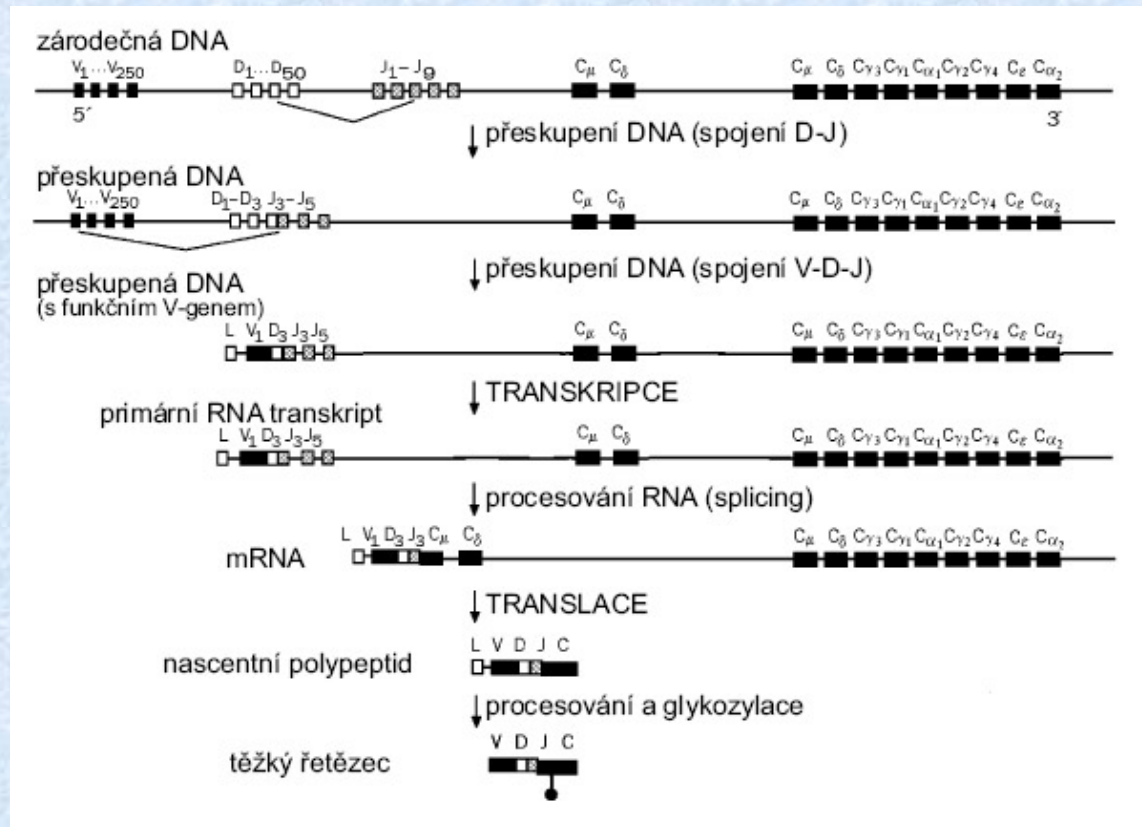
- C konstantní části L řetězce

- **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  $\mu$
- v okamžiku, kdy buňka prošla přeskupováním IgH genů a prokázala to tvorbou  $\mu$  řetězců, stává se z ní **pre- B lymfocyt**
- pre-B lymfocyt nese pre-B receptor, složený z IgH řetězce  $\mu$  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  $\kappa$  - dochází k vyštěpování úseků mezi některým V a J segmentem.
2. Jestliže není přeskupování  $\kappa$  genů úspěšné, zahájí se přeskupování genů  $\lambda$ .

Není-li přeskupování úspěšné, B lymfocyt hyne.

## Přeskupování genů kódujících L řetězce

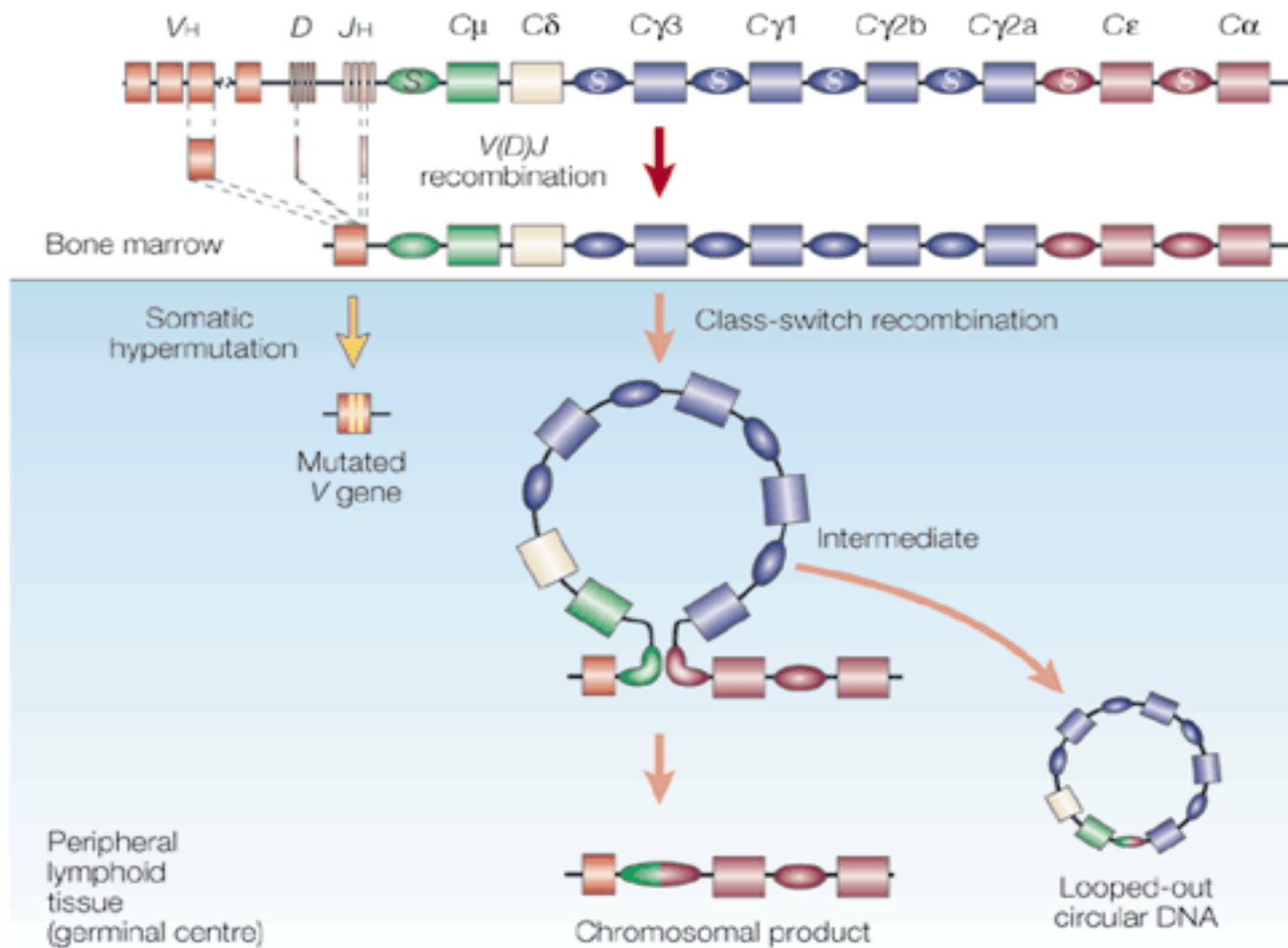
- funkční L řetězec vytvoří s H (m) řetězcem kompletní povrchový **IgM**, který nahradí pre-B receptor
- expresí povrchového IgM se buňka stává **nezralým B lymfocyt**
- v dalším vývojovém stadiu dochází k současné expresi povrchového **IgM a IgD**, čímž se z buňky stává **zralý B lymfocyt**

**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



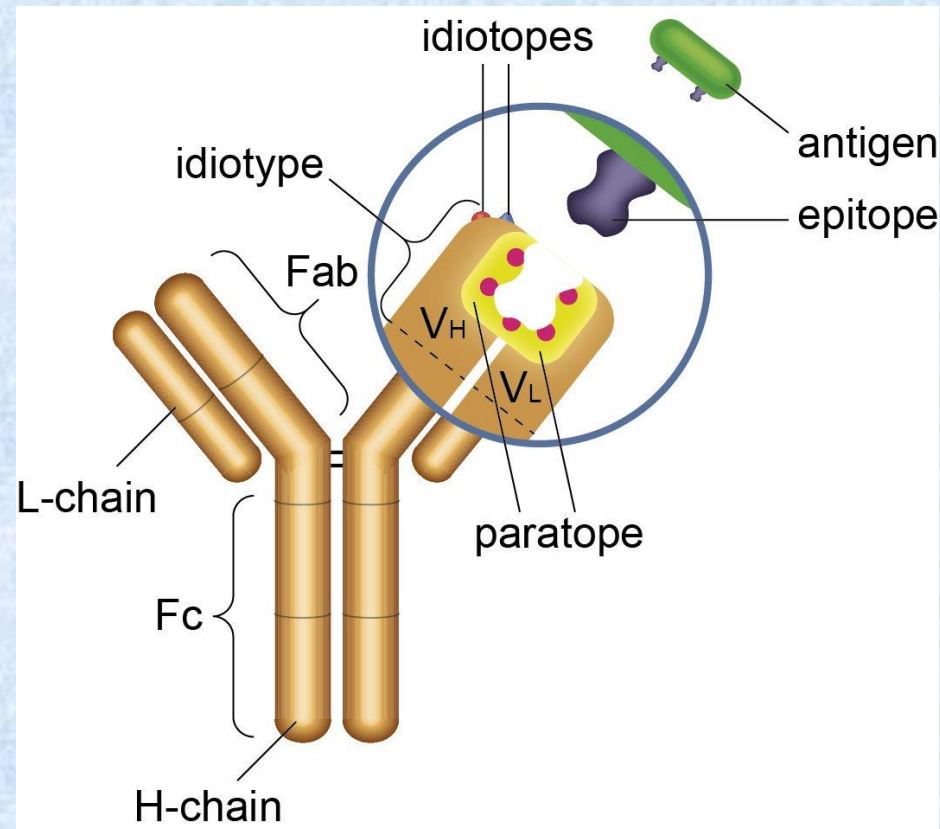
## Izotypový přesmyk (class switch)

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

# Antiidiotypové protilátky

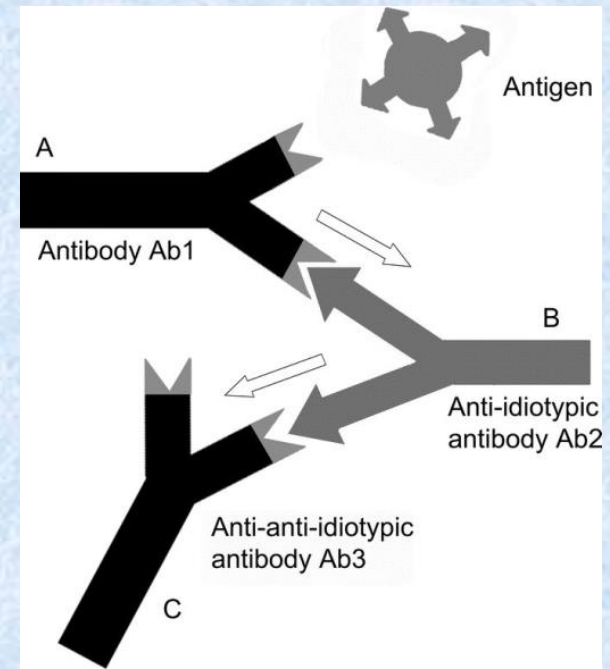
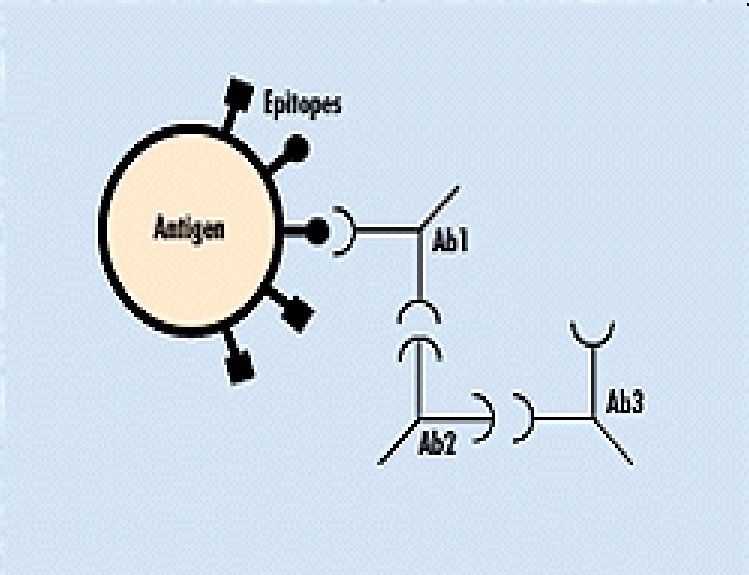
Paratop = část protilátky schopná specificky vázat antigen, vyskytuje se ve variabilní oblasti Ig  
Variabilní oblast protilátky však může vystupovat také v opačné roli, v roli antigenu. Každý imunoglobulin tak má ve své variabilní oblasti jedno nebo více míst, kterou může být antigen-specificky vázána 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

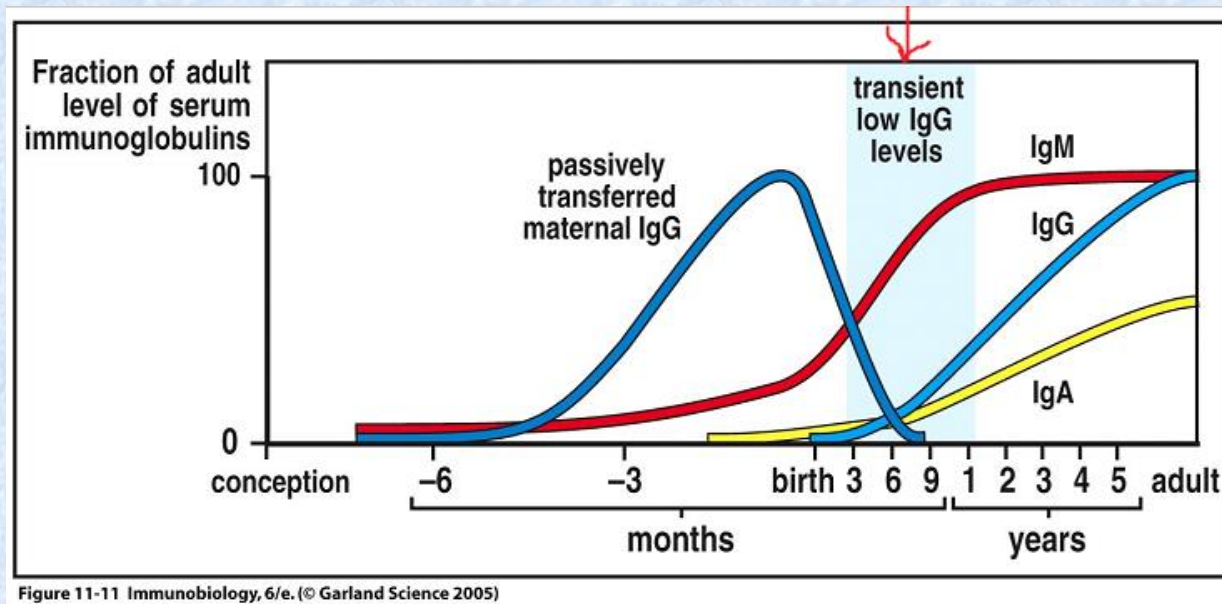


# Ontogeneze imunitního systému

- vývoj imunitního systému úzce souvisí s vývojem krve tvorby
- fáze mezoblastická trvá 10 týdnů, probíhá ve žloutkovém váčku
- fáze hepatální- nastupuje kolem 6.-8.týdne gestace, probíhá v játrech
- fáze myeloidní – začíná od 10.-12.týdne gestace, od 20.týdne gestace je kostní dřeň hlavním orgánem krve tvorby, v době porodu je krve tvorba rozložena do všech kostí, v dospělosti přetrvává jen v plochých kostech a žebrech.

# 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 počet B lymfocytů klesá
- 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 autoprottilátek



# Ontogeneze dalších složek imunity

## T lymfocyty

- Prekurzory T lymfocytů se objevují kolem 7.týdne gestace ve fetálních játrech a žloutkovém váčku, mezi 8.-9. týdnem gestace začínají kolonizovat thymus, kde se diferencují v thymocyty exprimující TCR, CD3,CD4 a CD8. Po expresi TCR následuje pozitivní a negativní selekce a poté T lymfocyty migrují do sekundárních lymfat. orgánů.
- Novorozenecké T lymfocyty mají deficit některých cytokinů (INF gama, IL 3, 4 a 5) a je snížena exprese CD40L, což vede k vážnutí izotyp. přesmyku.

## Fagocyty, NK buňky, komplement

- Fagocyty novorozenců mají nižší funkční výkonnost, aktivita NK buněk je zhruba poloviční, koncentrace komplementu je v době narození 50-70%

# 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:

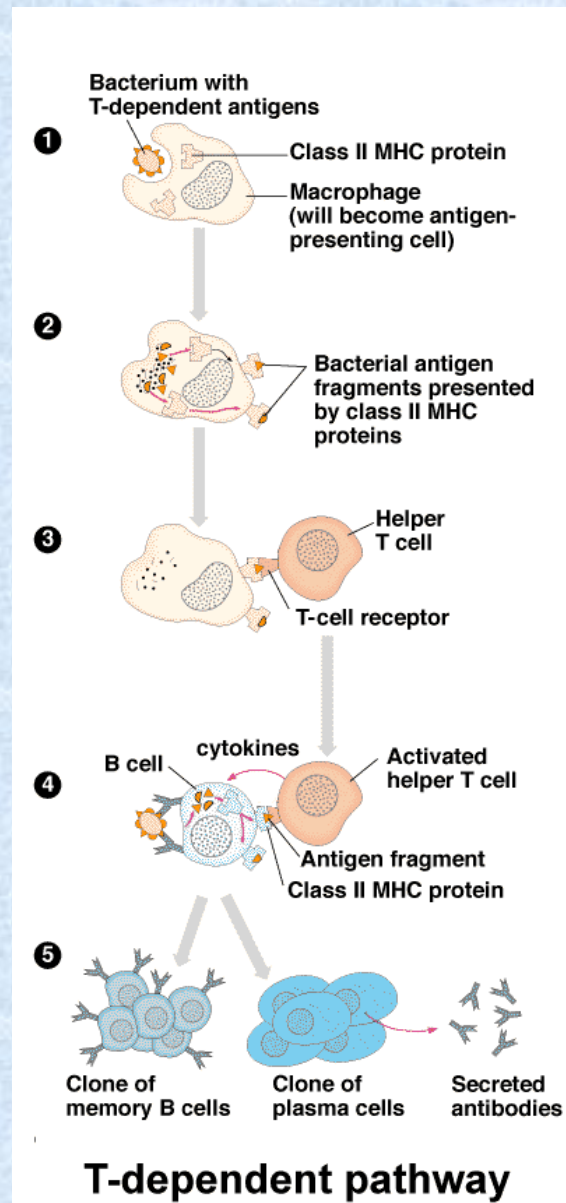
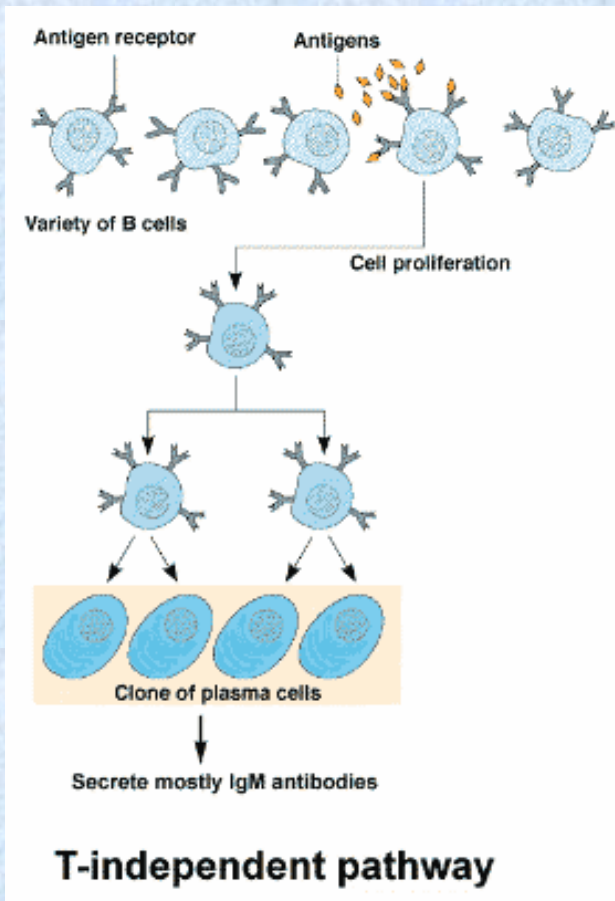
## Antigeny nezávislími na T lymfocytech

- 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

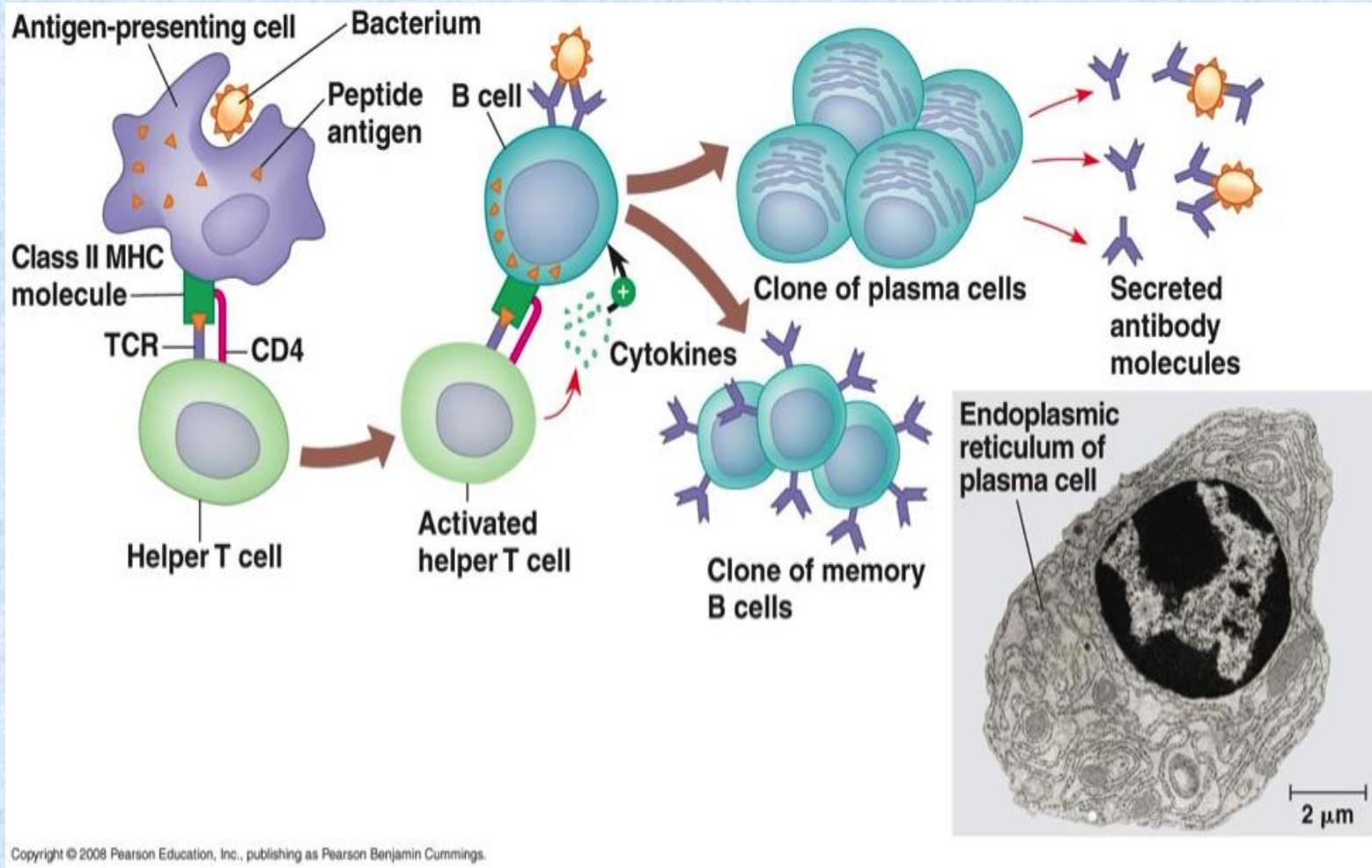
## Primární fáze protilátkové reakce

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  $T_H2$  buněk

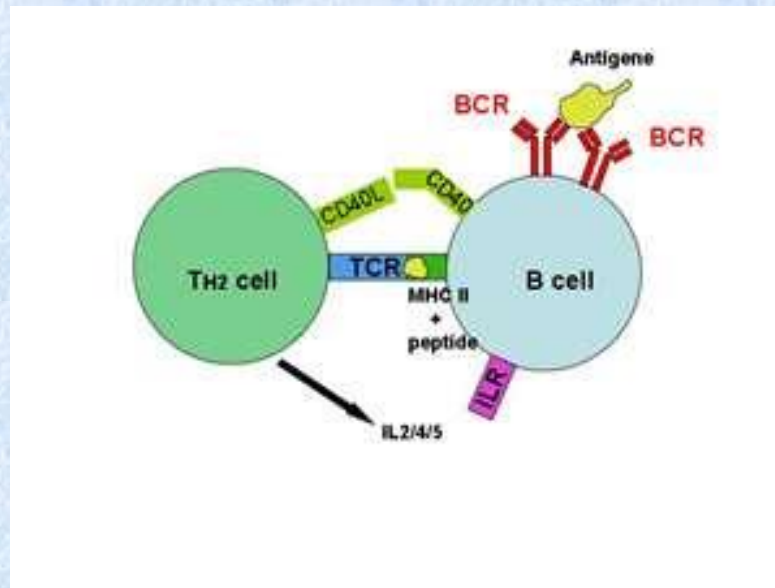
**Th2 lymfocyty** pak poskytují pomoc antigenem stimulovaným **B lymfocytům** (mají na povrchu antigenní peptidy v komplexu s MHC gp II), což vede k jejich proliferaci, diferenciaci na **plazmatické bb** (produkují Ab) a na **paměťové bb**

# Setkání B lymfocytu s Ag v sekundárních lymfatických orgánech



# T<sub>H</sub>2 imunitní odpověď – pomoc B lymfocytům

- Základní funkcí T<sub>H</sub>2 buněk je spolupráce s B lymfocyty (které byly stimulovány Ag) prostřednictvím cytokinů (IL-4, IL-5, IL-6) 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 a po obdržení pomocných signálů od Th 2 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 Th – 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** ( $T_H2$  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

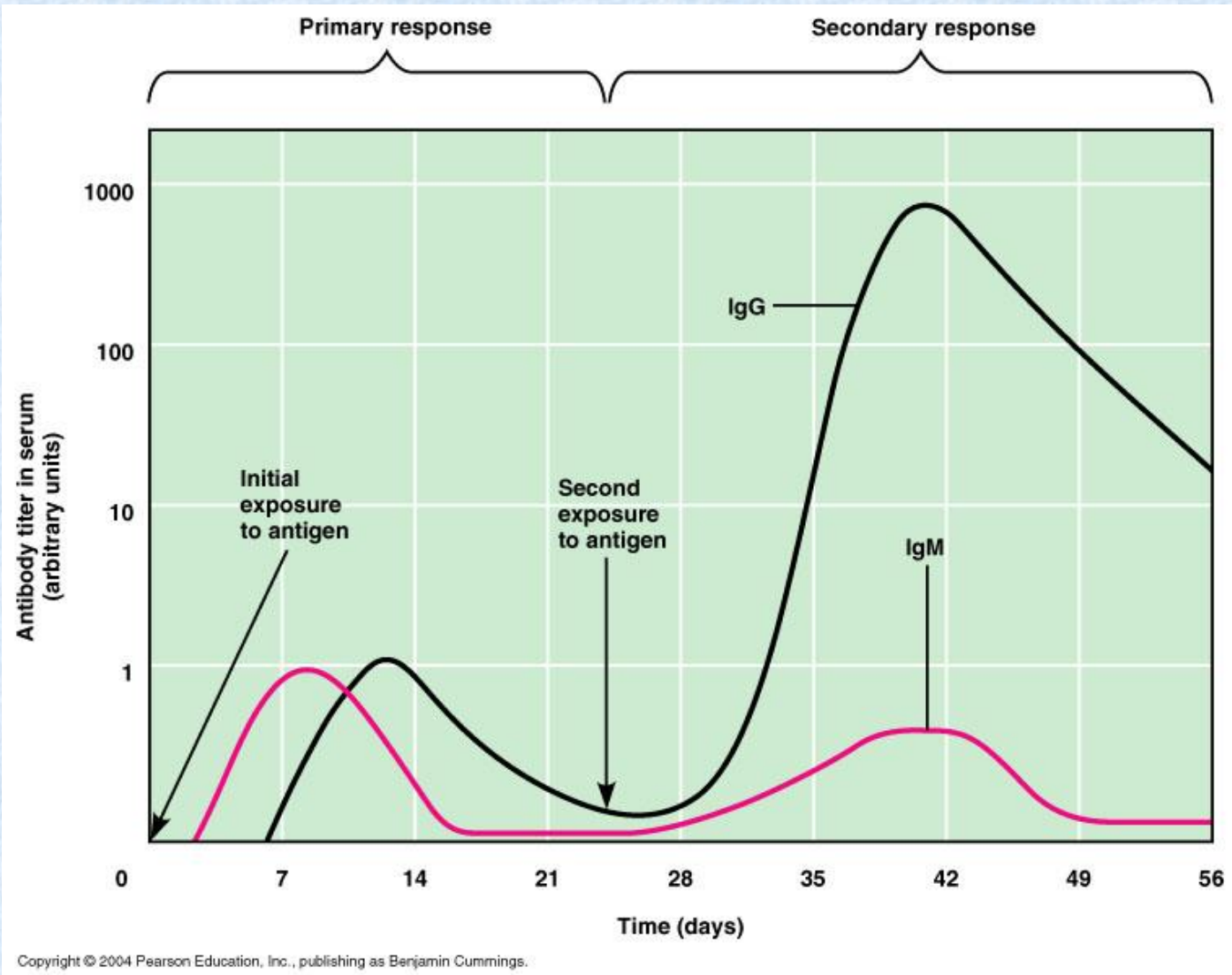
## Primární imunitní odpověď

- 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



- [https://www.youtube.com/watch?v=jPqb1\\_pE41g&list=PLNMRRM8YNM-urW9d6KrbkeW2nakXFm0zI9&index=1](https://www.youtube.com/watch?v=jPqb1_pE41g&list=PLNMRRM8YNM-urW9d6KrbkeW2nakXFm0zI9&index=1)

**Děkuji za pozornost !**