

OBSAH

(akt. 20.11.2015, pro IMUNL)

7. Úvod do imunogenetiky

7.1 MHC glykoproteiny a jejich polymorfismus

7.1.1 *MHC glykoproteiny 1. třídy*

7.1.2 *MHC glykoproteiny 2. třídy*

7.1.3. *Geny kódující MHC molekuly*

7.2 Variabilita imunoglobulinů a lymfocytárních receptorů

7.2.1 *Přeskupování genových segmentů a spojovací variabilita*

7.2.2 *Alelická exkluze*

7.2.3 *Negativní a pozitivní selekce*

7.2.4 *Somatická mutace při formování B-lymfocytů*

Pracovní text

7. Úvod do imunogenetiky

Základní vlastností **specifického imunitního systému** je schopnost rozlišit neškodné částice od nežádoucích částic a to i na základě velmi malých rozdílů (u peptidů rozhoduje často jediná AMK, u sacharidů koncové zbytky, alosterické formy aj.). Tato rozlišovací schopnost je dána extrémní variabilitou specifických imunocytů resp. jejich povrchových molekul (především receptorů). Skutečnost, že receptory specifické imunity existují v tolika variantách (tzv. fenotypový polymorfismus), je výsledkem tzv. **genetického polymorfismu**¹ a řadou dalších regulačních mechanismů uplatňujících se během vývoje lymfocytů. Mezi molekuly, vykazující největší variabilitu patří MHC resp. HLA glykoproteiny, imunoglobuliny a receptory T a B lymfocytů.

Imunogenetika je obor zabývající se geny kódující jednotlivé složky imunitního systému, genetickou variabilitu a mechanismy vedoucí k jejich dosažení, stejně jako vztahy různých onemocnění ke složkám IS.

7.1 MHC glykoproteiny a jejich polymorfismus

Zkratka MHC (z angl. **Major Histocompatibility Complex**) označuje transmembránové glykoproteiny, vyskytující se na všech jaderných buňkách vyšších obratlovců vč. člověka. Byly objeveny v souvislosti s inkompatibilními transplantacemi: Bylo zjištěno, že právě variabilita v MHC glykoproteinech je odpovědná za odvržení štěpu příjemcem, a podle toho také získaly MHC molekuly svůj název **hlavní histokompatibilní systém**. MHC glykoproteiny se v populaci každého druhu vyskytují v obrovské variabilitě, takže je prakticky nemožné, aby dva jedinci (kromě jednovaječných dvojčat) měli stejnou kombinaci MHC molekul. Imunitní systém příjemce pak rozpoznává MHC glykoproteiny obsažené v tkáni dárce jako cizorodé antigeny, a spouští imunitní odpověď vedoucí k jejich eliminaci a tím i k degradaci dárcovského štěpu.

Primární biologickou funkcí MHC glykoproteinů je však stimulace T-lymfocytů antigenními peptidy. MHCgp jsou syntetizovány v endoplazmatickém retikulu a tvoří intracelulární komplex s peptidovými fragmenty potenciálních antigenů. Komplex MHC-Ag je pak transportován na povrch buňky, kde je Ag prezentován T-lymfocytům.

U člověka byly MHC glykoproteiny primárně zkoumány na leukocytech, kde se jich nachází nejvyšší koncentrace. Proto jsou lidské MHC molekuly označovány jako leukocytární antigeny, resp. **HLA** (z angl. **H**uman **L**eukocyte **A**ntigen). Pro člověka jsou tedy termíny MHC a HLA ekvivalenty.

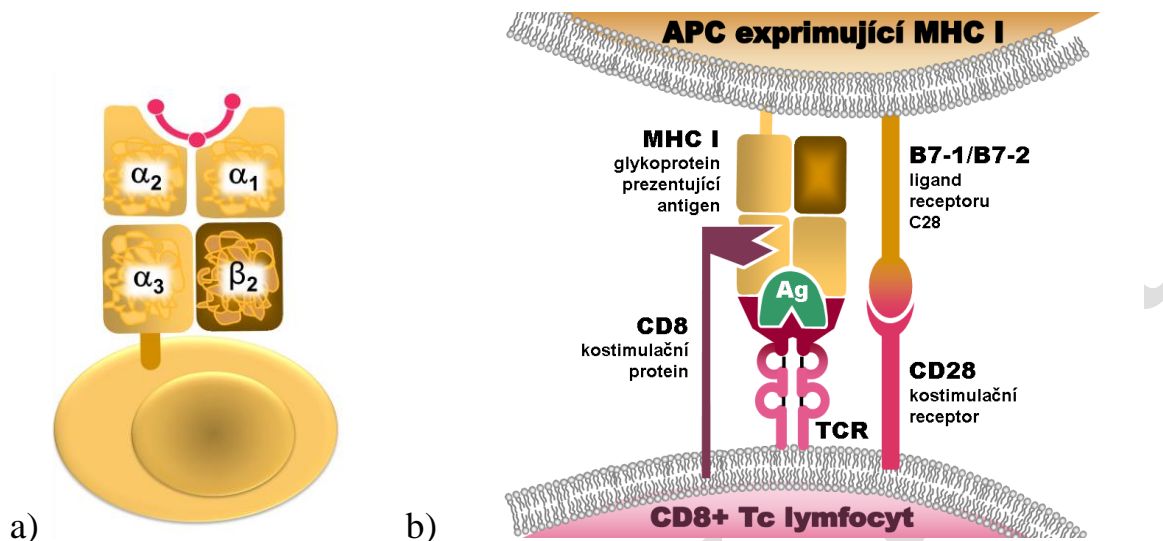
Na základě molekulární struktury MHCgp, podle typu prezentovaného antigenu a podle typu populace stimulovaných T-lymfocytů rozlišujeme dva základní typy humánních MHC molekul:

- MHC glykoproteiny 1. třídy (ozn. také jako MHCgp I, MHC-I – patří sem HLA-A,-B,-C)
- MHC glykoproteiny 2. třídy (ozn. také jako MHCgp II, MHC-II – patří sem sem sem HLA-DP, -DQ, -DR)

7.1.1 MHC glykoproteiny 1. třídy

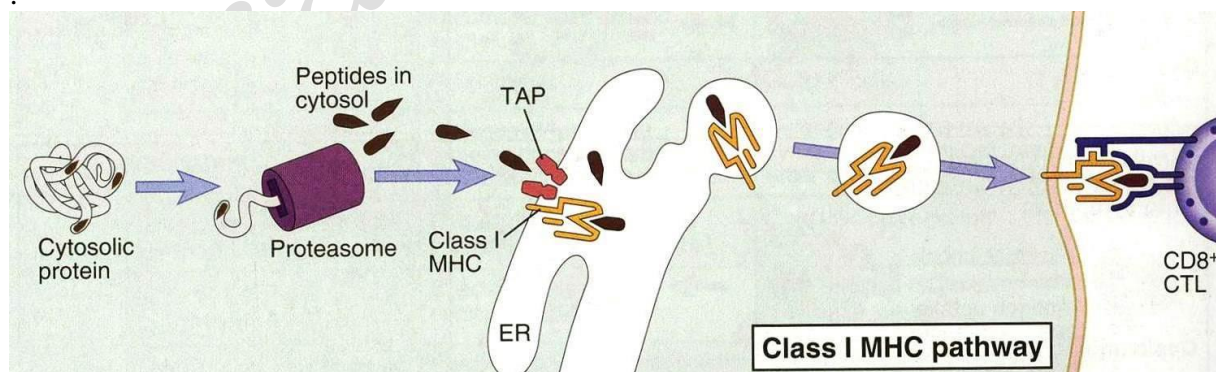
¹ je dán existencí mnoha alel (variant) daného genu

MHC-I gp se nachází na všech jaderných buňkách těla. Jejich molekula se skládá z transmembránového vysoce variabilního řetězce α a mikroglobulinu β . Řetězec α obsahuje tři domény α_1 , α_2 a α_3 . Domény α_1 a α_2 jsou nejvariabilnější a tvoří vazebné místo pro proteinový antigen (obr. 7.1a).



Obr. 7.1 : a) Molekulární struktura glykoproteinu MHC-I. b) Komplexní schéma vazebné interakce mezi buňkou prezentující antigen ve vazbě s MHC-I a cytotoxickým $CD8^+$ T-lymfocytem.

Glykoproteiny MHC-I vážou antigen syntetizovaný v cytosolu a prezentují ho cytotoxickým $CD8^+$ T_c lymfocytům (obr. 7.1b). Typickými cytosolovými antigeny jsou virové nebo nádorové proteiny; vznikají tak ale i normální fyziologické proteiny. Všechny tyto proteiny jsou v rámci buněčné „kontrolы“ označeny ubikvitinem² a následně rozštěpeny v proteolytickém komplexu proteazomu. Fragmenty rozštěpených proteinů vstupují do endoplazmatického retikula³ a vážou se na MHC-Igp, které jsou v ER syntetizovány. Vazebné místo pro antigenní proteiny je na MHC-I gp relativně malé a morfologicky uzavřené, takže může vázat jen peptidy o délce 8-10 aminokyselin. Vzniklý komplex MHC-I-Ag je formou vezikul transportován přes Golgiho komplex až na povrch dané buňky, kde může aktivovat cytotoxické $CD8^+$ T_c lymfocyty (obr. 7.2).



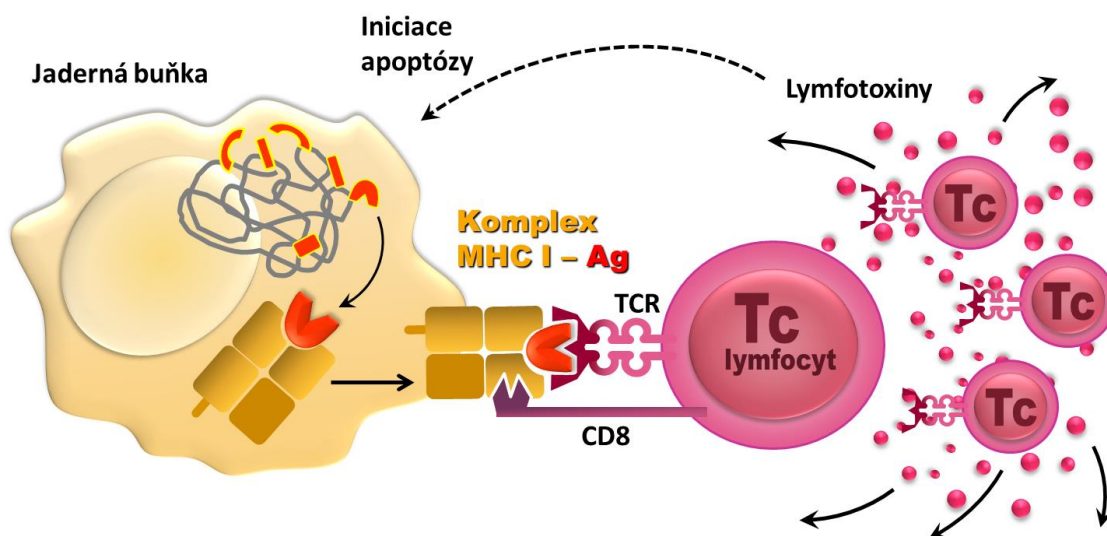
Obr. 7.2: Schéma syntézy MHC-Igp, vznik komplexu MHC-I s endogenním Ag a proces prezentace Ag cytotoxickým T_c lymfocytům. **PŘEKRESLIT**

² NC za chemii 2004 (A.Ciechanover, A.Hershko, I.Rose: Ubikvitinem zprostředkovaná degradace proteinů)

³ Přes TAP (Transport Antigen Protein) - specifickou transportní pumpu umístěnou v membráně ER

Cytotoxické $CD8^+$ T-lymfocyty stimulované takovým antigenem pak iniciují apoptózu takto poškozené buňky. Tím chrání organismus před šířením viru popř. před množením nádorových buněk. Ve skutečnosti jsou na MHC I vystavovány všechny peptidy syntetizované danou buňkou. Pokud však není daný peptid škodlivý nebo jinak nestandardní nevyvolá u T-lymfocytů imunitní odpověď ale naopak toleranci. S jistou nadsázkou lze MHC gp I třídy označit za „výstupní kontrolu“ proteinů, které jsou v buňkách syntetizovány (obr. 7.3).

Reálně platí, že na MHC-I se vyskytne vše, co se dostane do cytoplasmy. Může však nastat situace, kdy se do cytoplazmy dostanou exogenní peptidy, které bývají normálně uchovány v endozomálních vácích. Tomuto mechanismu prezentace exogenních peptidů na MHC-I se říká cross-prezentace. Navození imunitní odpovědi $CD8^+$ T-lymfocytů proti exogenním antigenům se říká cross-priming. Prezentace exogenních antigenů na MHC-I a aktivace $CD8^+$ T-lymfocytů je esenciální pro obranu vůči virům, které nenapadají antigen prezentující buňky.



Obr. 7.3: Princip aktivace cytotoxických T-lymfocytů komplexem MHC-I gp s navázaným intracelulárně syntetizovaným antigenem.

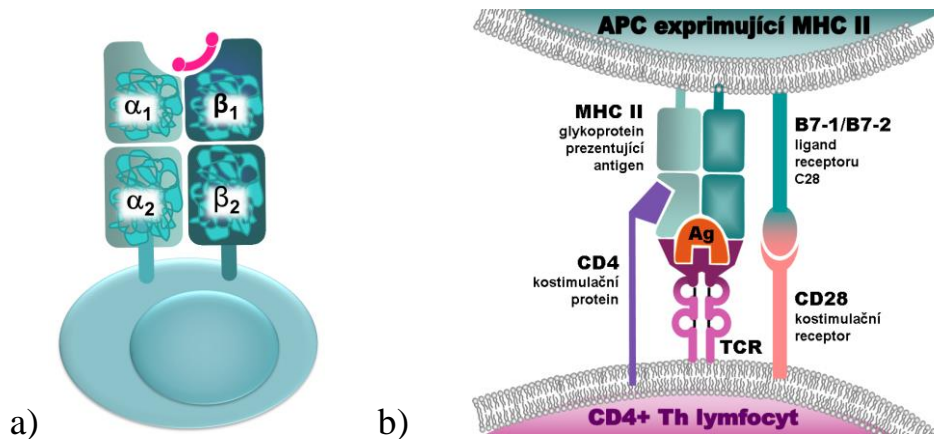
Na MHC-I gp je vazebné místo jednak pro Ag, dále pro receptor T-lymfocyty (TCR) a nakonec pro koreceptorovou molekulu cytotoxického lymfocyty - CD8. Aktivované cytotoxické lymfocyty proliferují a sekretují lymfotoxiny, které iniciují apoptózu původní buňky.

7.1.2 MHC glykoproteiny 2. třídy

MHC-II gp se fyziologicky⁴ vyskytují jen na imunitních buňkách, jejichž primární funkcí je fagocytóza potencionálně škodlivých částic (antigenů). Proto jsou takové buňky nazývány jako **profesionální fagocyty**; patří k nim především **dendritické buňky**, **monocyty** a **makrofágy**. MHC-II gp vážou fragmenty **pohlčených, tedy exogenních antigenních částic** a prezentují je na svém povrchu **pomocných $CD4^+$ T-lymfocytům**. Takové profesionálně fagocytující buňky proto nazýváme **antigen prezentující buňky (APC)**.

Molekula MHC-II glykoproteinů se skládá ze dvou transmembránových, kovalentně vázaných řetězců α a β . Vazebné místo pro antigen je tvořeno terminálními jednotkami obou řetězců (obr. 7.4a).

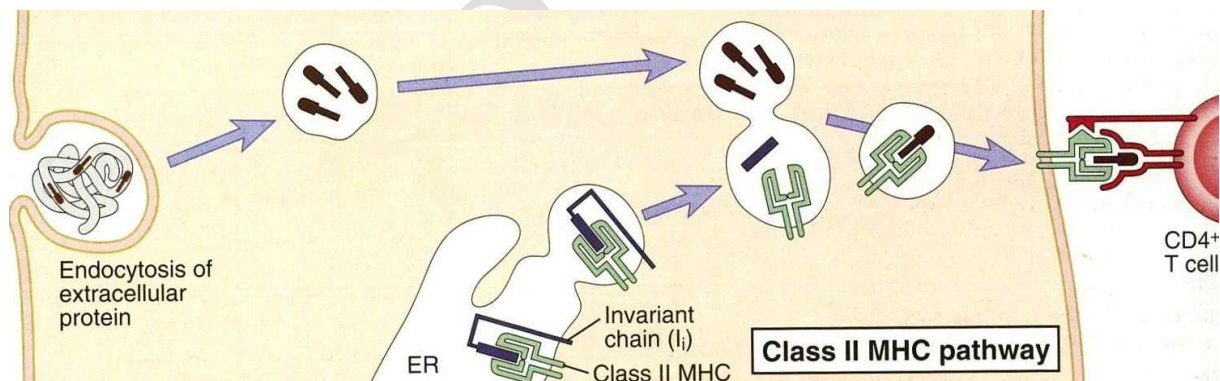
⁴ S patologickým výskytem MHC-IIgp se setkáváme např. na buňkách štítné žlázy, kde prezentací vlastních Ag mohou navodit tvorbu protilátek proti vlastnímu tyreotropnímu receptoru (Graves-Basedova choroba)



Obr. 7.4: a) Molekulární struktura glykoproteinu MHC-II. b) Komplexní schéma vazebné interakce mezi buňkou prezentující antigen ve vazbě s MHC-II a pomocným $CD4^+$ Th lymfocytům.

Glykoproteiny MHC-II vážou **antigen exogenního původu**, který byl buňkou fagocytován a následně ho prezentují **pomocným $CD4^+$ T_h lymfocytům** (obr. 7.4b, 7.5).

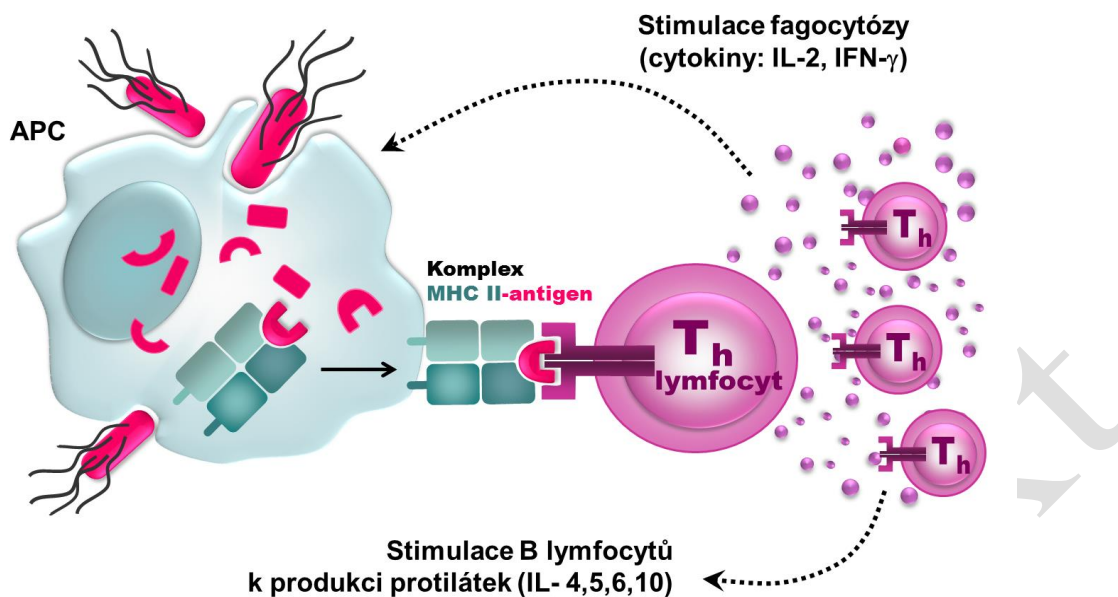
Typickými antigeny jsou složky patogenních mikroorganismů, především bakterií. Pohlcený antigen je uzavřen do fagosomu, kde dochází k jeho fragmentaci. Současně je v endoplazmatickém retikulu syntetizován MHC-II gp, jehož vazebné místo je dočasně blokováno specifickým proteinem, tzv. invariantním řetězcem (Ii). Komplex MHC-IIgp + Ii je v transportním váčku přes Golgiho aparát uvolněn a nakonec splývá s endosomem, obsahujícím fagocytovaný antigen. Po odštěpení Ii řetězce se Ag váže na uvolněné vazebné místo MHC-II gp a spolu s ním je transportován na povrch antigen prezentující buňky, a prezentován **pomocným $CD4^+$ T_h lymfocytům** (obr. 7.5).



Obr. 7.5: Schéma syntézy MHC-II gp, vznik komplexu MHC-II s exogenním Ag a proces prezentace Ag pomocným Th lymfocytům. **PŘEKRESLIT**


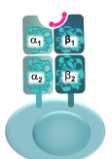
Pomocné $CD4^+$ T_h lymfocyty stimulované exogenním fagocytovaným antigenem pak v závislosti na typu prezentovaného antigenu iniciují proliferaci naivního T_h lymfocytu do jedné z následujících subpopulací (obr. 7.6):

- **subpopulace T_h1** prostřednictvím sekrece zánětlivých cytokinů (IL-2, IFN- γ) stimuluje u APC fagocytózu a aktivuje zánětlivé procesy
- **subpopulace T_h2** prostřednictvím sekrece cytokinů (především IL-4, 5, 6 a 10) stimuluje B-lymfocyty k produkci protilátek na Th závislých, které mají vysokou afinitu k danému antigenu, jež byl prezentován



Obr. 7.6: Princip aktivace cytotoxických T-lymfocytů komplexem MHC-II gp s navázaným extracelulárním fagocytovaným antigenem. Aktivované pomocné CD4⁺ Th lymfocyty proliferují a podle typu prezentovaného antigenu sekretují cytokiny rozvíjející zánětlivou reakci (IL-2, IFN- γ), nebo cytokiny IL-4,5,6,10 aj. Ty aktivují B-lymfocyty k produkci protilátek na T-lymfocytech závislých.

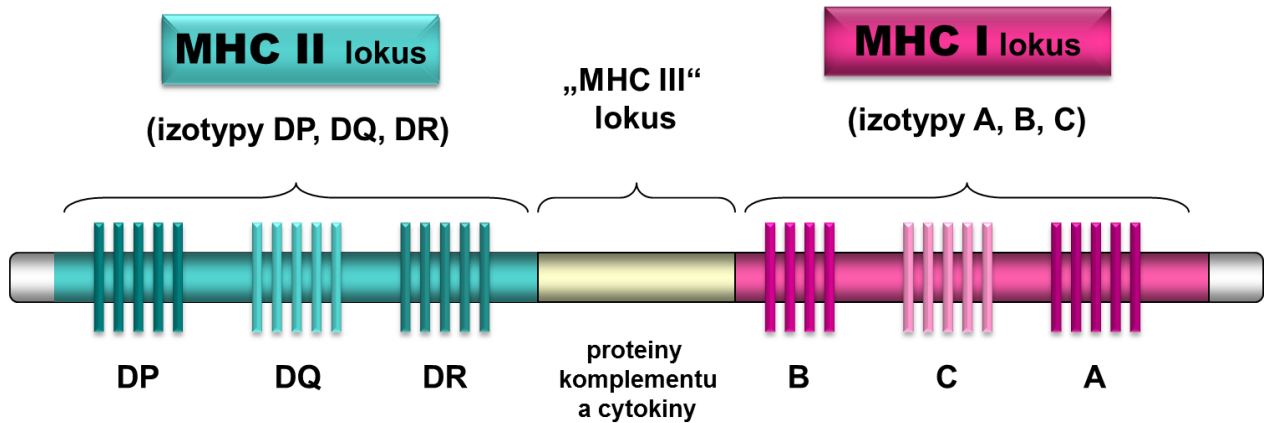
Srovnání základních vlastností a funkcí MHC glykoproteinů I. a II. třídy je uvedeno v tab 7.1.

	MHC-I	MHC-II
struktura	Polymorfní řetězec α (3 domény) a mikroglobulin β 	Dva polymorfní řetězce α a β 
výskyt	Všechny jaderné buňky	Profesionální fagocyty (dendritické buňky, monocyty, makrofágy)
stimulovaný lymfocyt	CD8 ⁺ cytotoxický T _c lymfocyt	CD4 ⁺ pomocný T _h lymfocyt
typ prezentovaného antigenu	Endogenně syntetizovaný protein v cytosolu (typicky virus, nádorové proteiny)	Exogenní fagocytovaný protein (typicky bakteriální)
Místo vazby MHC-Ag	Endoplazmatické retikulum	Vezikula vzniklá splynutím fagosomu a transportního váčku z Golgiho aparátu
Pomocné interagující proteiny	TAP v endoplazmatickém retikulu (transportuje antigenní fragmenty z cytosolu do ER)	Invariantní protein dočasně blokuující vazebné místo u MHC-II před splynutím s fagosomem obsahujícím Ag

7.1.3 Geny kódující MHC molekuly

Lidské MHC glykoproteiny jsou kódovány **vysoce polymorfním genovým komplexem** uloženými na **6. chromosomu**. Ten obsahuje lokusy jednak pro MHC-I, MHC-II ale také lokus označovaný někdy jako „MHC-III“ kódující cytokiny, proteiny komplementu, stresové proteiny⁵ aj (obr. 7.7).

⁵ proteiny tepelného šoku, tzv. HSp (**H**eat **S**hock **p**rotein)

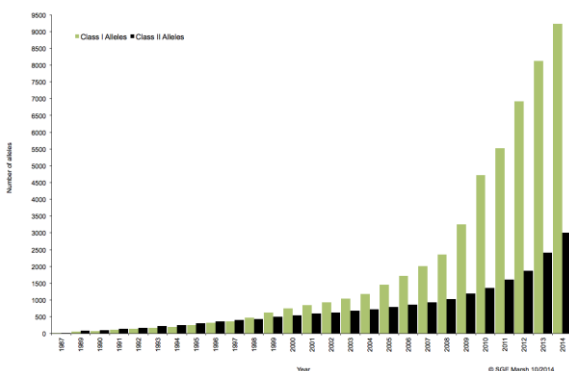


Obr. 7.7: – Zjednodušené schéma stavby 6. chromozomu a rozložení genů pro MHC glykoproteiny. Pro přehlednost jsou vybrány jen hlavní skupiny genů kódující MHC-Igp a MHC-IIgp s tím, že pořadí genů je zachováno. Řada dalších genů není pro přehlednost zobrazena.

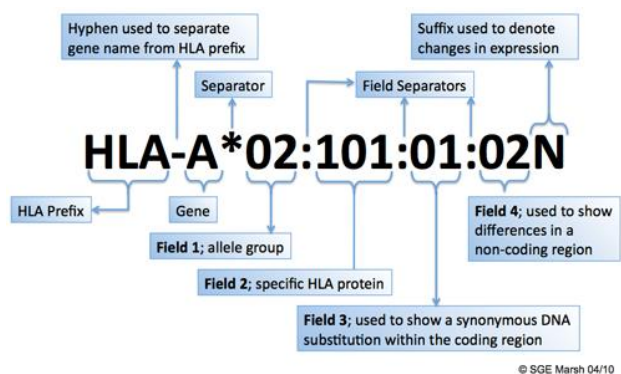
V rámci lokusu pro MHC-I se na 6. chromozomu nachází izotypy genů A, B, C, E, H a F, které kódují α -řetězce glykoproteinu MHC-I (viz dále).

V rámci lokusu MHC-II se nachází izotypy genů DP, DQ, DR kódující MHC-II glykoproteiny. Vzhledem k tomu, že se na variabilitě MHC-IIgp podílí jak podjednotka α tak podjednotka β (obr. 7.4a), jsou geny kódující MHC-IIgp tvořeny vždy současně dvěma alelami – jedna kóduje α -podjednotku MHC-IIgp a druhá kóduje β -podjednotku MHC-IIgp.

Každý z genů kódujících MHC glykoproteiny se v populaci vyskytuje v obrovském množství alel. K říjnu 2015⁶ bylo detekováno 10 297 alel pro geny na lokusu MHC-I, a 3 543 alel pro geny na lokusu MHC-II, tj. celkový počet 13 840 alel. Počet alel však není zdaleka konečný (obr. 7.8). S rozvojem imunodetekčních metod je prokazována existence dalších a dalších alel.



Obr. 7.8: Vývoj poznání v oblasti počtu HLA alel v letech 1987 – 2014. (<http://hla.alleles.org/nomenclature/index.html>)



Obr. 7.9: Metodika popisu jednotlivých alel HLA systému (<http://hla.alleles.org/nomenclature/index.html>)

⁶ Aktuální počty MHC alel jsou k dispozici na stránkách <http://hla.alleles.org/nomenclature/stats.html>

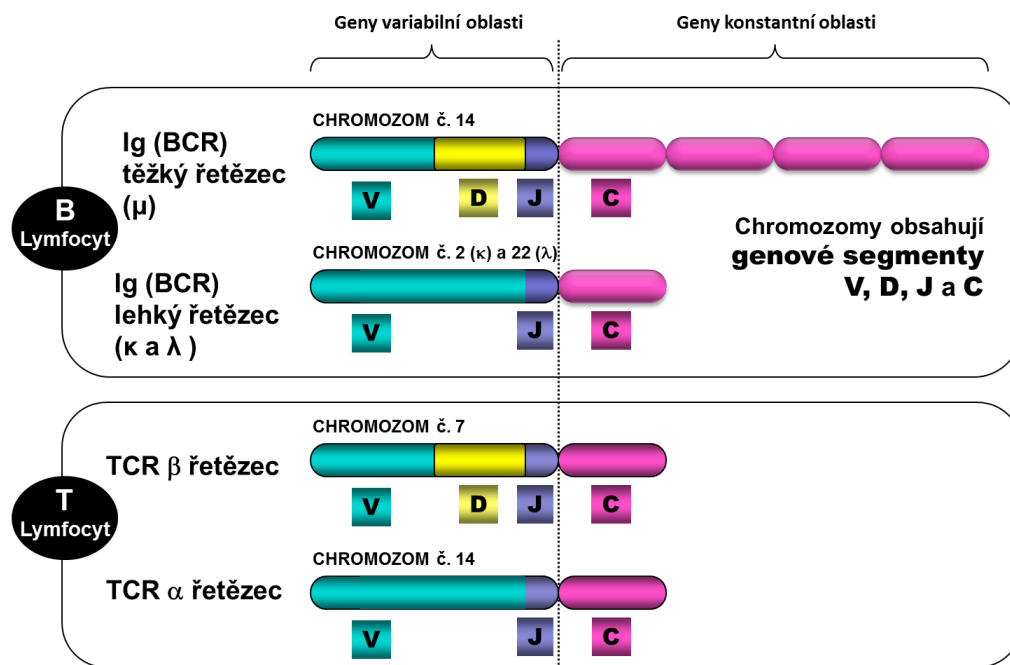
Jednotlivé alely se dědí kodominantně. Každý člověk dědí jednu sadu alel po otci a druhou po matce. Při tak obrovském počtu existujících alel je tedy prakticky nemožné, aby se dva nepříbuzní jedinci shodovali v kombinaci svých MHC genů resp. glykoproteinů. Naprostá shoda nastává pouze u jednovaječných dvojčat. Příbuzenské křížení však značně zvyšuje podobnost jedinců v MHC molekulách. Ve výzkumné praxi je toho využíváno pro získání tzv. **imbredních linií**⁷, které jsou považovány z hlediska genetického téměř za 100% homozygoty.

7.2. Variabilita imunoglobulinů a lymfocytárních receptorů

V zájmu maximální obranyschopnosti imunitního systému, musí každý jedinec disponovat obrovským množstvím imunoglobulinů resp. specifických receptorů B a T lymfocytů. Jen v takovém případě je člověk schopen čelit nepřebornému množství potenciálně nebezpečných antigenů. Z kapacitních důvodů však není možné, aby byl každý imunoglobulin resp. receptor kódován samostatným genem. Proto se evolucí vyvinuly speciální genetické mechanismy, uplatňující se k odvození vysoce variabilních proteinů tvořících koncovou variabilní oblast T a B lymfocytárních receptorů resp. imunoglobulinů. To umožňuje z relativně malého počtu genů v zárodečné DNA vytvářet po celý život jedince neustále nové kombinace.

Geny pro receptory B-lymfocytů (resp. pro imunoglobuliny) leží na 14., 2. a 22. chromozomu. Geny pro receptory T-lymfocytů leží na 7. a 14. chromozomu (obr. 7.10). Při formování lymfocytárních receptorů resp. imunoglobulinů (probíhají na genové úrovni v primárních lymfatických orgánech), se uplatňují podobné mechanismy. Jedná se o následující procesy:

- Přeskupování genových segmentů (kap. 7.2.1)
- Spojovací variabilita (kap. 7.2.1)
- Alelická exkluze (kap. 7.2.2)
- Somatická mutace (na periférii v lymfatických uzlinách a jen u B-lymfocytů) - (kap. 7.2.4)



Obr. 7.10: Přehled genových segmentů kódujících variabilní a konstantní oblast receptorů B a T lymfocytů resp. imunoglobulinů.

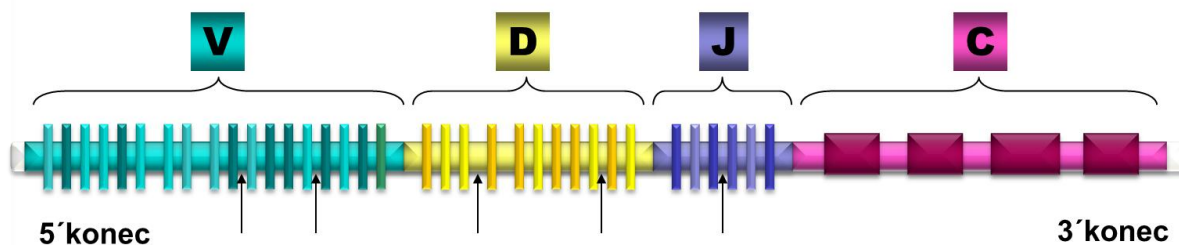
⁷ U myši po více jak 20 generacích příbuzenského křížení (mezi sourozenci nebo mezi rodiči a dětmi)

Geny pro variabilní N-terminální konec těžkého řetězce imunoglobulinů resp. receptoru B-lymfocytů leží na 14. chromozomu. Geny pro variabilní N-terminální konec lehkého řetězce imunoglobulinů resp. receptoru B-lymfocytů leží na 2. a 22. chromozomu. Geny pro variabilní N-terminální konec β řetězce receptoru T-lymfocytů leží na 7. chromozomu a geny pro N-terminální konec α řetězce receptoru T-lymfocytů leží na 14. chromozomu.

7.2.1 Přeskupování genových segmentů a spojovací variabilita

Proces probíhá v primárních lymfatických orgánech (kostní dřeň, thymus, fetálně játra) při formování receptorů T i B lymfocytů. Jedná se o **náhodnou somatickou úpravu genů zárodečné DNA**. Proces zajišťuje maximální diversitu receptorů, podloženou relativně malým počtem genů v zárodečné DNA.

Příslušné geny jsou v zárodečné DNA uspořádány do čtyř genových segmentů. Segmenty V, D a J obsahují geny kódující variabilní N-terminální oblast lymfocytárního receptoru resp. imunoglobulinu. Segment C obsahuje geny kódující konstantní oblast receptoru resp. imunoglobulinu (**obr. 7.11**)



Obr. 7.11: Geny 14. chromozomu kódující těžký řetězec B-lymfocytárního receptoru resp. imunoglobulinu. Segment „V“ („variability“) obsahuje více jak 100 genů, které kódují AMK č. 1-101 variabilní oblasti receptoru. Segment „D“ („diversity“) obsahuje přibližně 50 genů, které kódují AMK č. 102-106 variabilní oblasti receptoru. Segment „J“ („joining“) obsahuje přibližně 9 genů, které kódují AMK č. 107-123 variabilní oblasti receptoru. Segment „C“ obsahuje geny kódující konstantní oblast B-lymfocytárního receptoru resp. imunoglobulinu. Šipky ukazují místa s charakteristickou sekvencí nukleotidů, které jsou rozpoznávány enzymy provádějícími přeskupování genových segmentů.

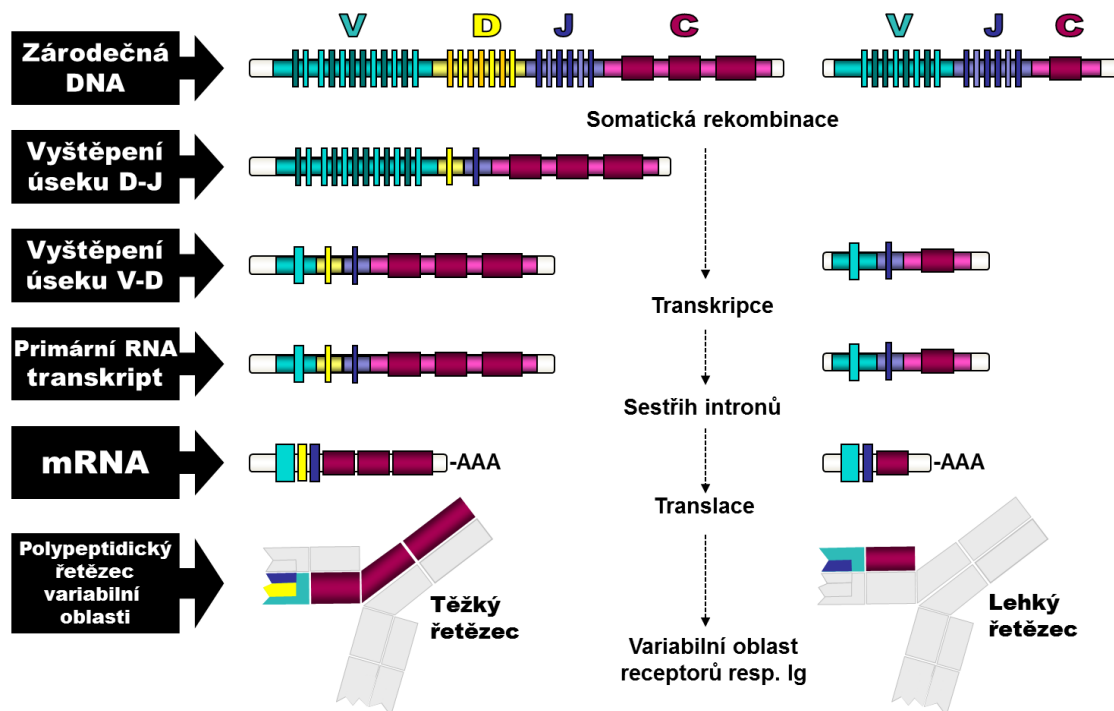
Přeskupování genových segmentů probíhá ve dvou fázích. Nejprve dochází k přeskupení a expresi genů kódujících **těžký řetězec u B-lymfocytu** resp. **β řetězce u T lymfocytu**. U lymfocytů u kterých neproběhne úspěšně syntéza prvního řetězce, je automaticky aktivovaná **apoptóza**. Všechny lymfocyty, které projdou úspěšně fází syntézy jednoho řetězce, přechází automaticky do fáze přeskupování a exprese genů druhého řetězce: **lehkého ř. u B-lymfocytu** resp. **α řetězce u T lymfocytu** (**obr. 7.12**):

1. FÁZE: Přeskupení a exprese genů pro těžký μ (mý) řetězec (B-lymfocyt, 14.chromozom) resp. β řetězec (T-lymfocyt, 7.chromozom): Enzymy provádějící přeskupování genů, rozpoznávají charakteristické sekvence nukleotidů v jednotlivých úsecích chromozomu. V daném místě pak DNA rozštěpí, náhodně „vystřihnou“ její část a zbytek opět spojí. Proces se může několikrát opakovat a probíhá v následujícím pořadí:

- Nejprve dochází k tzv. „D-J“ **přeskupování**: v rámci těchto segmentů jsou postupně náhodně a opakovaně vyštěpovány jednotlivé geny, čímž se mění původní sekvence zárodečné DNA.
- Následuje proces tzv. „V-D“ **přeskupování**, kdy jsou analogicky opakovaně náhodně vyštěpovány geny v rámci úseků „V“ a „D“.

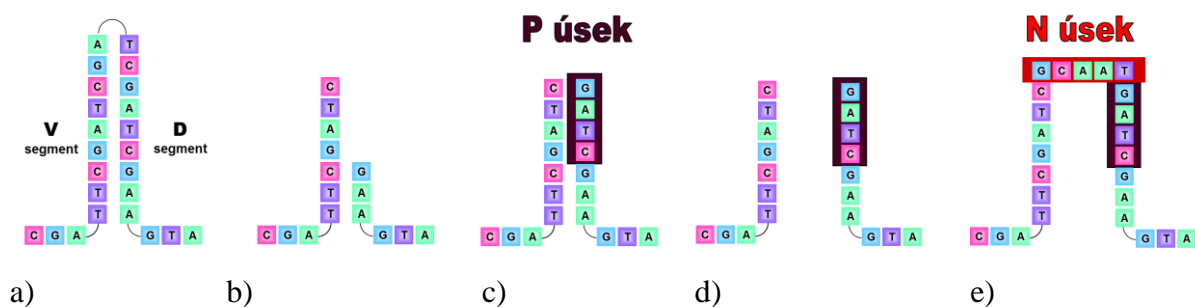
2. FÁZE: Přeskupení a exprese genů pro lehký κ (kappa) řetězec (B-lymfocyt, 2. chromozom), resp. α řetězec (T-lymfocyt, 14.chromozom): Proces probíhá analogicky

jako v první fázi. Protože má ale zárodečná DNA kódující κ resp. α řetězec jen segmenty „V“ a „J“, tak přeskupování probíhá pouze v rámci těchto segmentů.



Obr. 7.12: Přehled procesů v rámci formování variabilní oblasti Ig resp. BCR

Variabilitu celého procesu dále ještě navyšuje proces označovaný jako „**spojovací variabilita**“, která se uplatňuje při každém rozštěpení a znovuspojení zárodečné DNA (rekombinaci). Lymfocyt-specifická rekombináza Rag-1 a Rag-2⁸ odstříhne část DNA mezi příslušnými rekombinovanými úseky. V případě asymetrie je podle delšího vlákna DNA syntetizováno vlákno komplementární – tzv. **P úsek**. Oba volné konce DNA jsou pak spojeny náhodným vložením dalších nukleotidů - tzv. **N úsek** (obr. 7.13). Tyto nukleotidy v N úseku jsou přidávány speciální DNA polymerázou, označovanou jako TdT⁹ nebo DNTT¹⁰. N úseky jsou tedy úplně nové sekvence DNA, které nebyly součástí zárodeční DNA.



Obr. 7.13: Spojovací variabilita.

a) Počátek procesu přeskupování genů v rámci segmentů „V“ a „D“. b) Rekombináza Rag rozštěpí zárodečnou DNA v místě specifických rozpoznávaných nukleotidových sekvencí. c) V případě nestejných konců vzniklých rozštěpením, jsou k DNA přidány nukleotidy vytvářející úsek P. d-e) Volné konce upravené zárodečné DNA jsou spojeny úsekem N, tvořeným náhodně nakombinovanými nukleotidy.

⁸ Recombination-Activating Gene

⁹ Terminal deoxynucleotidyl Transferase

¹⁰ DNA Terminal Transferase nebo DNA TerminalexoTransferase

Původní zárodečná DNA, která je zcela náhodně modifikována v procesech „přeskupování genových segmentů“ a „spojovací variability“ pak slouží jako matrice pro standardní transkripci a translaci: Modifikovaná DNA je nejprve přepsána do primární RNA, která po sestřihu intronů představuje mRNA, a ta je přeložena do primární sekvence AMK tvořící variabilní část receptoru resp. imunoglobulinu (obr. 7.12).

7.2.2 Alelická exkluze

Přeskupování genových segmentů kódujících řetězce lymfocytárních receptorů resp. imunoglobulinů probíhají souběžně na obou homologních chromozomech příslušného lymfocyty. Protože proces na obou chromozomech probíhá zcela nezávisle, je výsledkem každého náhodného přeskupování jiný výsledný produkt. Aby nedošlo k expresi dvou různých receptorů na jednom lymfocyty, je vždy proces přeskupování na jednom homologním chromozomu zastaven – mluvíme o tzv. **alelické exkluzi**. Ta je zárukou, že každý lymfocyt exprimuje jediný, zcela unikátní specifický receptor.

V případě, že chybou dojde k vytvoření lymfocytárního klonu se dvěma typy receptorů, podléhá takový lymfocyt apoptóze.

7.2.3 Negativní a pozitivní selekce

Vzhledem k tomu, že procesy přeskupování genových segmentů a spojovací variabilita jsou založeny na zcela náhodných krocích, je při vzniku nových lymfocytárních receptorů vysoká pravděpodobnost vzniku autoreaktivních receptorů resp. protilátek. Proto dříve, než jsou nové lymfocyty uvolněny z primárních lymfatických orgánů¹¹ do periferie, procházejí přísnou kontrolou. Všechny potenciálně autoreaktivní ale také nefunkční (anergní) klony jsou zničeny formou apoptózy (*negativní selekce*). Tímto způsobem zaniká odhadem až 98% nově vzniklých lymfocytů.

- U **B-lymfocytů** je v kostní dřeni testována reaktivita receptorů k vlastním antigenům. Všechny potencionálně autoreaktivní klony jsou eliminovány řízenou apoptózou. Na periférii, v lymfatických uzlinách jsou dále eliminovány klony s nefunkčními receptory k cizím antigenům (anergní receptory) a selektovány klony s nejvyšší afinitou k potencionálně škodlivým antigenům (tzv. somatická mutace – viz dále). Také to není tak sofistikované jak u TCR protože vznik vysoce afinitního BCR nebo Ab je stejně závislé na T-lymfocytech. Proto je selekce extrémně přísná u T-lymfocytů.
- U **T-lymfocytů** je proces selekce mnohem komplikovanější. Je to způsobeno řadou vazebných ploch, které jsou součástí úspěšné stimulace T-lymfocyty (obr. 7.1 a 7.4). Úspěšná stimulace TCR je založena jednak na komplementaritě TCR-Ag a jednak na vazbě TCR-MHC. Kromě autoreaktivity nebo naopak slabé afinity k potenciálním antigenům (*negativní selekce*), musí být proto u TCR testována také síla vazby k MHC proteinu antigen prezentujících buněk. Tato vazba musí být dostatečně silná, aby došlo úspěšně ke vzniku komplexu MHC-TCR (*pozitivní selekce*). Na druhé straně ale nesmí být příliš silná, aby MHC nepůsobil jak potenciální antigen. Síla vazby TCR s MHC je také jedním z faktorů formujících T_{reg} lymfocyty, které rozpoznávají vlastní antigeny (jsou v zásadě autoreaktivní) avšak tuto schopnost nevyužívají k rozvoji imunitní reakce ale naopak k jejímu utlumení.

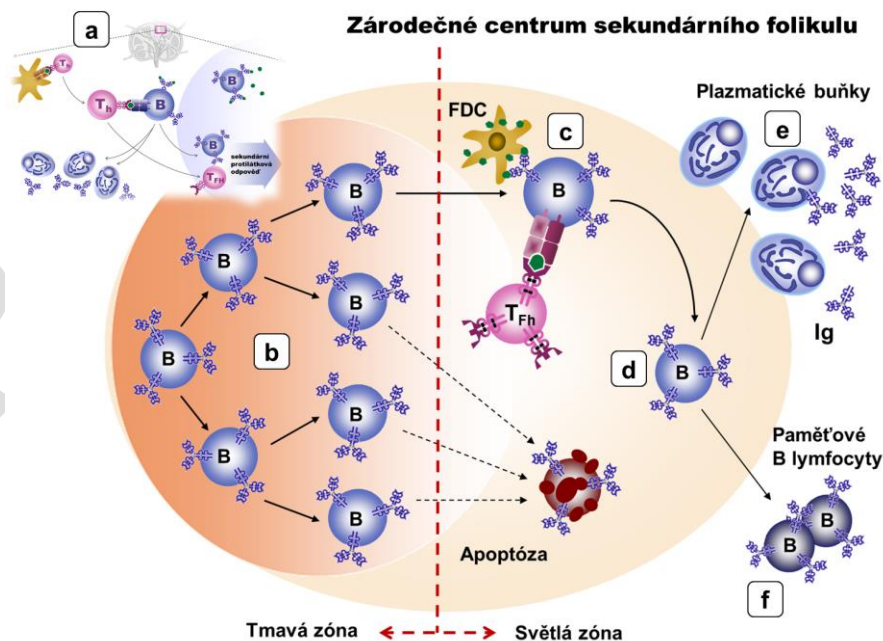
¹¹ kostní dřeně, popř. brzlíku, či sleziny

7.2.4 Somatická mutace při formování B-lymfocytů

Somatická mutace¹² je proces selektování B-lymfocytárních mutantů s nejvyšší afinitou k danému antigenu. Proces probíhá v **lymfatických uzlinách, konkrétně v zárodečných centrech sekundárních lymfoidních folikulů** (Kap. 5, obr. 5.10.)

Zárodečná centra jsou tvořena prolifерujícími B-lymfocyty, které byly v primární fázi aktivovány Th lymfocyty. Aktivované B-lymfocyty se diferencují v tzv. **centroblasty**, u kterých během intenzivního dělení probíhá jak **izotypový přesmyk**, tak proces tzv. **somatické hypermutace** genů kódujících variabilní oblast BCR. Oblast intenzivní proliferace B lymfocytů se díky vysoké koncentraci centroblastů jeví tmavě a je proto označována jako „**tmavá zóna**“. Z ní migrují diferencované B-lymfocyty do „**světlé zóny**“, kde se zároveň nacházejí **folikulární dendritické buňky (FDC¹³)** a **folikulární T-lymfocyty (T_{Fh})**. FDC prezentují na svém povrchu antigeny, které jsou diferencovanými B-lymfocyty rozpoznávány. Stejný Ag je aktivovaným B-lymfocytem současně prezentován a rozpoznáván folikulárními T-lymfocyty. Přitom jsou selekčním tlakem upřednostňovány ty nově vzniklé varianty B-lymfocytů, které mají největší afinitu k antigenu, rozpoznávaného na **folikulárních dendritických buňkách (FDC)** a současně rozpoznávaného folikulárními T_{Fh} lymfocyty. B-lymfocyty procházejí opakovanými cykly proliferace, mutace a selekce. V těchto následných cyklech dále dochází opět k **izotypovému přesmyku**, kdy se místo původních IgM, v závislosti na charakteru stimulačního antigenu a **cytokinového prostředí**, mění třída imunoglobulinu. Např. **IL-4** indukuje izotypový přesmyk primárně na IgG1 a IgE; **TGF-β** indukuje produkci IgA a IgG2b; **IL-5** zvyšuje produkci IgA, a **IFN-γ** stimuluje tvorbu IgG3, IgG2a.

Na závěr celého procesu se buňky, které úspěšně produkují vysoce afinitní imunoglobuliny, diferencují v plazmatické buňky a částečně v dlouhodobé paměťové buňky, a opouštějí zárodečné centrum. Ty z centroblastů, které mají slabou nebo žádnou afinitu k danému antigenu, jsou odsouzeny k řízené buněčné smrti – apoptóze (obr. 5.12).



¹² Označ. někdy také jako hypermutace

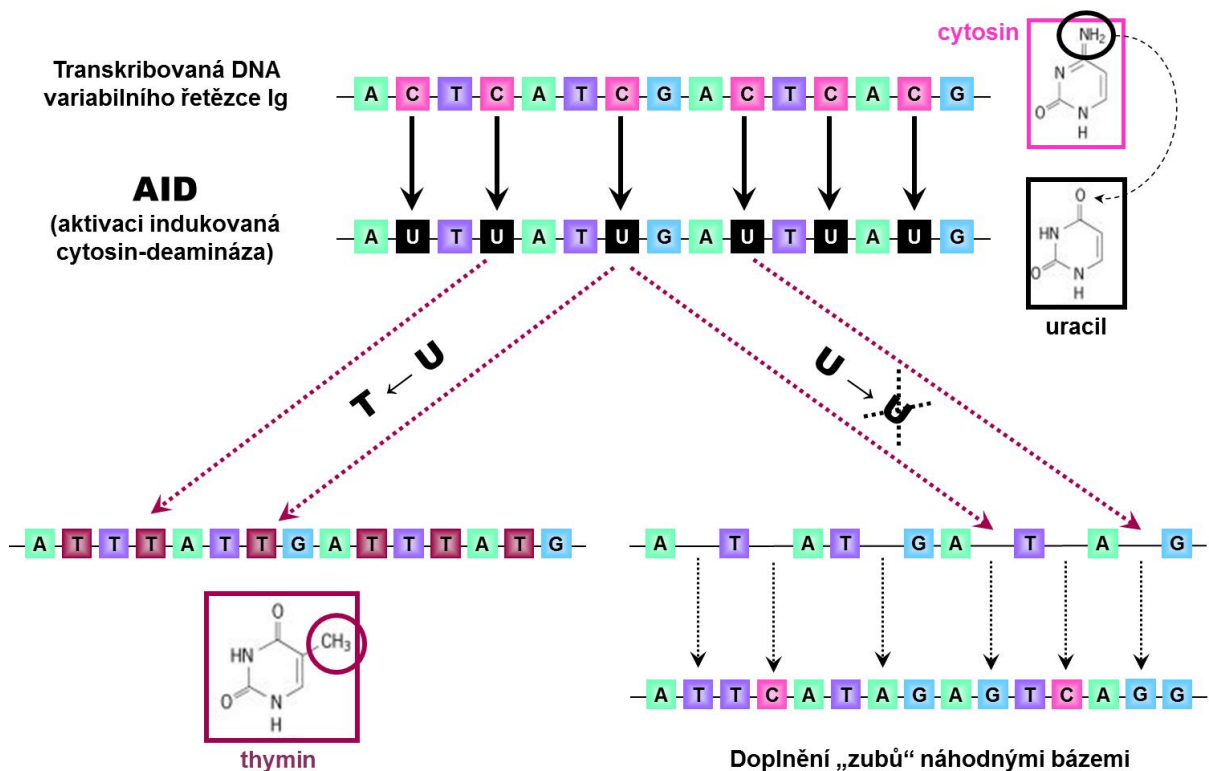
¹³ FDC nejsou vývojově příbuzné s DC, nejsou hematopoetického ale mezenchymálního původu; název získaly na základě podobnosti s DC. Antigeny neprezentují v kontextu MHC, ale mají je pouze „nalepeny“ na svém povrchu

Obr. 5.12: Sekundární fáze protilátkové reakce v zárodečném centru sekundárního folikulu lymfatické uzliny: V první tzv. extrafolikulární fázi prezentují aktivované B lymfocyty antigen pomocným T_h lymfocytům, které zpětně u B lymfocytů stimulují proliferaci a izotypový přesmyk (a). Část takto stimulovaných T_h lymfocytů migruje do zárodečného centra lymfatických folikulů, kde představují specifickou skupinu folikulárních T_{FH} . Podobně i aktivované B lymfocyty migrují do zárodečného centra, kde v tmavé zóně probíhá jejich intenzivní proliferace doprovázená izotypovým přesmykem a somatickou hypermutací (b). Takto vzniklé centroblasty putují do světlé zóny, kde jsou z nich selektovány – pomocí vazby s FDC a T_{FH} (c) B lymfocyty s nejvyšší afinitou k danému antigenu (d). Tímto procesem vznikají klonální expanzi plazmatické buňky produkující vysoce afinitní na T lymfocytech závislé protilátky (e) a dlouhodobě žijící paměťové B lymfocyty (f).

Po aktivaci B-lymfocytů v lymfatických uzlinách (obr. 5.12 - krok a-c), dochází ke transkripci úseku genů, kódujících variabilní část Ig řetězců. Během transkripce dochází k několika procesům, které mění původní sekvenci DNA (obr. 7.14):

Deaminace cytosinu v transkribované DNA. Proces je řízen enzymem, tzv. „aktivací indukovanou cytosin deaminázou“ (AID), která odstraněním $-NH_2$ skupin mění cytosin na uracyl. Takto pozměněná DNA je dále upravena jedním z následujících dvou procesů:

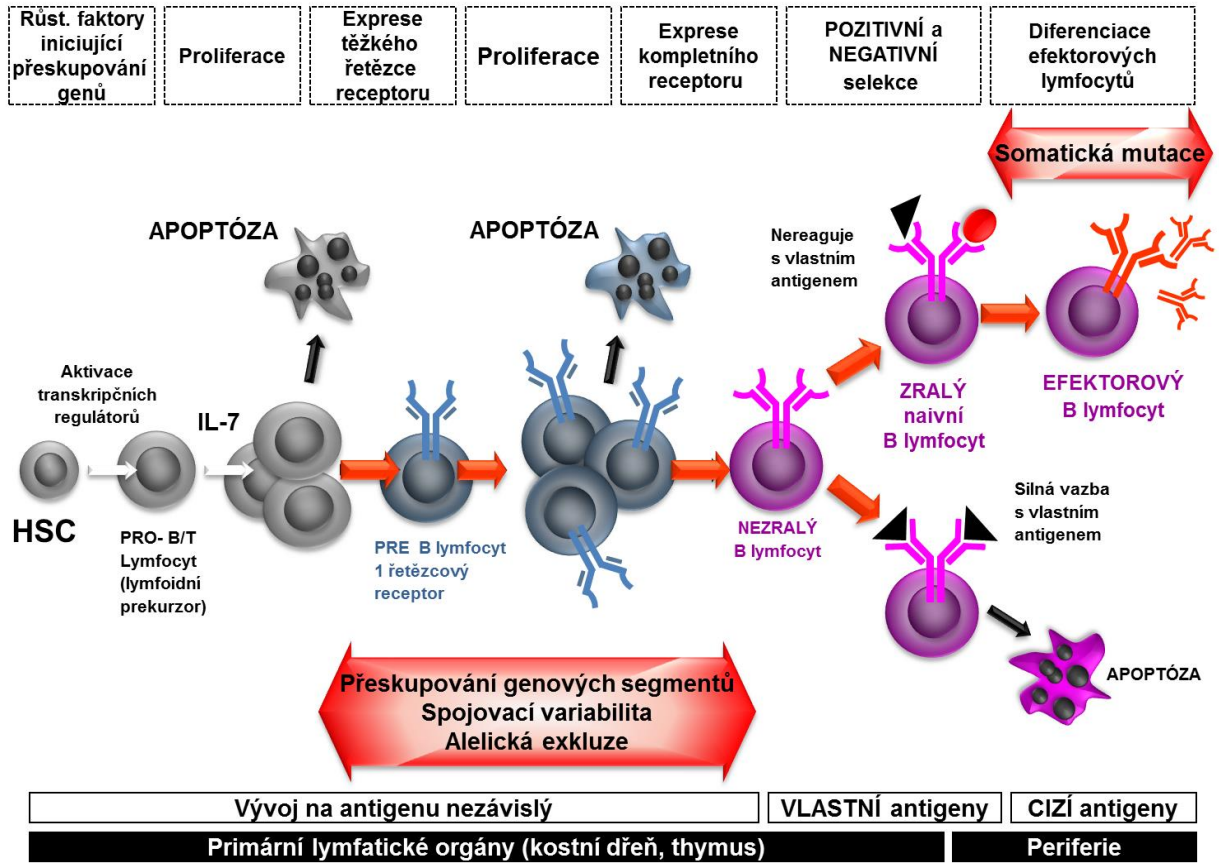
- **Změnou uracilu na thymin** přidáním CH_3 skupiny k původnímu uracilu, nebo
- **Odstraněním uracilu** čímž vzniknou v DNA mezery (tzv. zuby). Chybějící báze jsou následně, zcela náhodně nahrazeny jinými bazemi.



Obr. 7.14: Přehled dílčích kroků během somatické hypermutace u DNA při formování B-lymfocytů s nejvyšší afinitou k antigenu.

V prvním kroku je enzymem deaminázou indukovaná přeměna cytosinu na uracyl. Další úpravy se mohou ubírat dvěma směry: Vazbou CH_3 skupiny na molekuly uracilu dochází k jeho změně na thymin (levá spodní část obrázku). Druhou možností je odbourání uracilu a následné náhodné doplnění nukleotidů (pravá spodní část obrázku)

Závěrečný obrázek této kapitoly (obr. 7.15) shrnuje v přehledu jednotlivé dosud popsané procesy, které se uplatňují při formování vysoce variabilních BCR resp. Ig.



Obr. 7.15: Komplexní přehled vývoje B-lymfocytů od hematopoetické kmenové buňky až k efektorové plazmatické buňce s nejvyšší afinitou k antigenu.

Záklavi v horní části obrázku označuje jednotlivé dílčí procesy vývoje B lymfocytu, který je zobrazen ve střední části obrázku. Černé panely ve spodní části vymezují, které procesy jsou vázány na primární lymfatické orgány a které probíhají na periferii. Bílé panely ve spodní části vymezují, které procesy probíhají nezávisle na antigenech a které jsou závislé na vlastních resp. cizích antigenech. Červené šipky v obrazové části ukazují, kde probíhají jednotlivé procesy zodpovědné za variabilitu BCR resp. Ig.