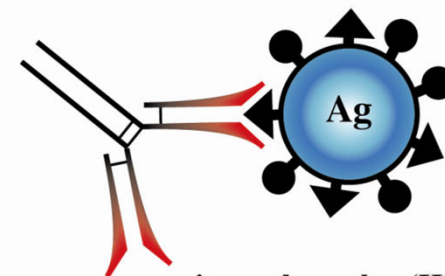


Antigen



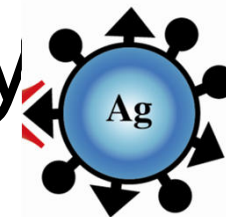
Antigen= imunogen

- Má schopnost navodit specifickou imunitní odpověď
- tj. **tvorbu protilátek**, efektorových a regulačních buněk buněčné imunity, a specificky reagovat s produkty této odpovědi
- antigen (Ag) - ligand protilátek (Ab)
 - protilátka = imunoglobulin nebo jeho fragment



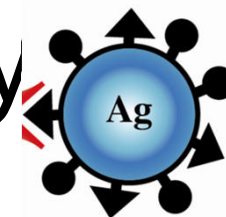
imunokomplex (IK)

Antigenní determinanty



- Ag determinanta (epitop)
 - úsek (poly)peptidu nebo polysacharidu (5 - 7 jednotek)
 - ligand Ab/TCR
- Ag částice obsahuje většinou řadu determinant
- determinanty
 - imunogenní (rozeznatelné, cizí)
 - skryté (kryptické)
 - neimunogení = tolerované (daným jedincem)
- determinanta lineární, konformační

Antigenní determinanty



- haptén „malá“ molekula
 - imunogenní po vazbě na nosič
 - antigenní sám o sobě
- Komplexní antigen – soubor kompletních antigenů
 - např. ledvina

haptén + nosič = kompletní antigen

Major histocompatibility complex

- MHC člověka = Human Leukocyte Antigens (HLA)
 - původně nalezen na leukocytech
 - přítomen na všech bb.
- výskyt molekul HLA I. třídy
 - všechny jaderné bb
 - řádově několik set tisíc molekul
 - exprese není konstitutivní, podléhá změnám pod vlivem cytokinů (IFN γ , IFN α)
- výskyt molekul HLA II. třídy
 - profesionální APC: dendritické bb, B bb, monocyto-makrofágový systém
 - exprese nízká na klidových bb



HLA polymorfismus

- geny MHC jsou multialelické, jejich produkty jsou výrazně polymorfní
- Existují desítky „sérologických specifit“ a stovky „molekulárních variant“
 - varianty genů = alely
- **polymorfismus je dán množstvím variant genů (lokusů)**
 - existují **3 geny HLA I.** (A,B,C), tzn. na bb je vyjádřeno 6 různých molekul HLA I. Třídy
 - pro **HLA II. třídy** (2xDR, DQ, DP) je vyjádřeno 8 rozdílných molekul na bb povrchu
 - Řetězce α HLA I., α , β HLA II.



HLA polymorfismus

POLYMORFISMUS HLA SYSTÉMU (WHO, 2000)					
HLA I. třídy		HLA II. třídy		HLA III. třídy	
specifita	počet alel	specifita	počet alel	specifita	počet alel
HLA A	195	HLA DR β	323	TAP 1	6
HLA B	395	HLA DR α	2	TAP 2	4
HLA C	93	HLA DP β	89	MICA	15
HLA E	5	HLA DP α	19		
HLA G	13	HLA DQ β	45		
		HLA DQ α	20		
celkem	683	celkem	498	celkem	25

Funkce molekul HLA

- vázat peptidové fragmenty proteinů a vystavovat je (na povrchu bb) pro T lymfocyty
- Rozdíl mezi HLA I a HLA II: typ peptidového fragmentu proteinů:
 - produkováných buňkou – HLA I. třídy
 - pohlcených buňkou – HLA II. třídy



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



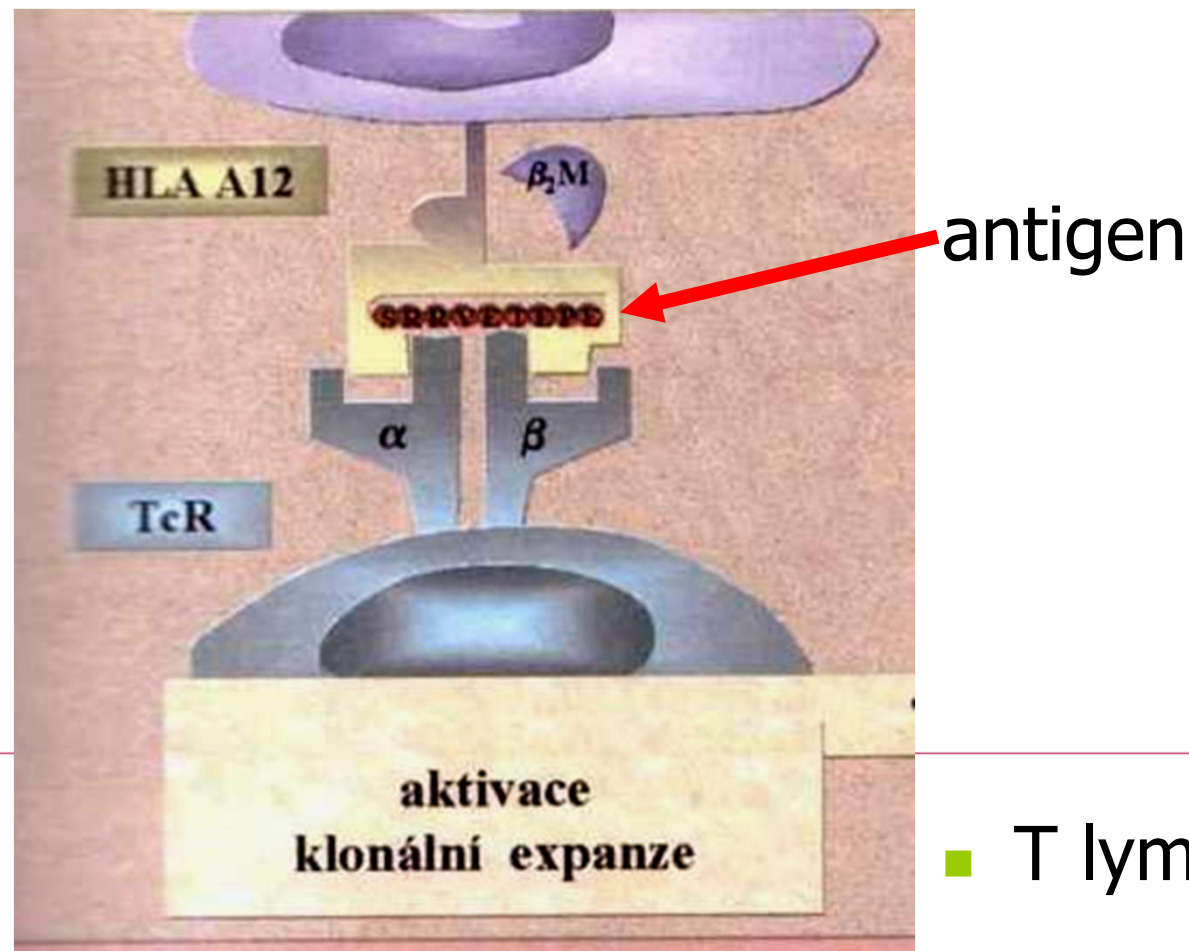
Univerzita
Pardubice

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tento projekt je spolufinancován Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky

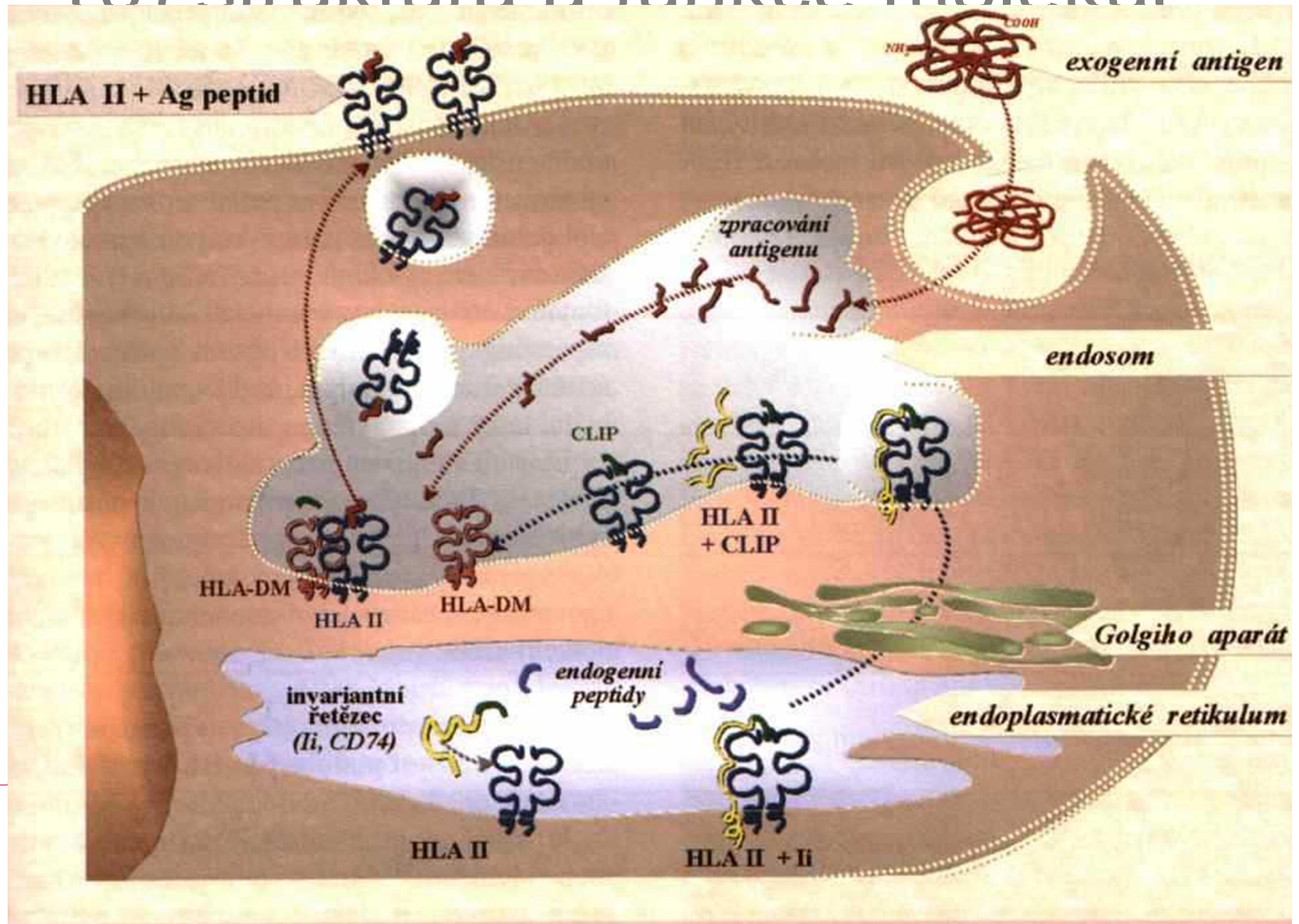
prezentace Ag v kontextu MHC I. třídy

- antigen prezentující buňka HLA I.

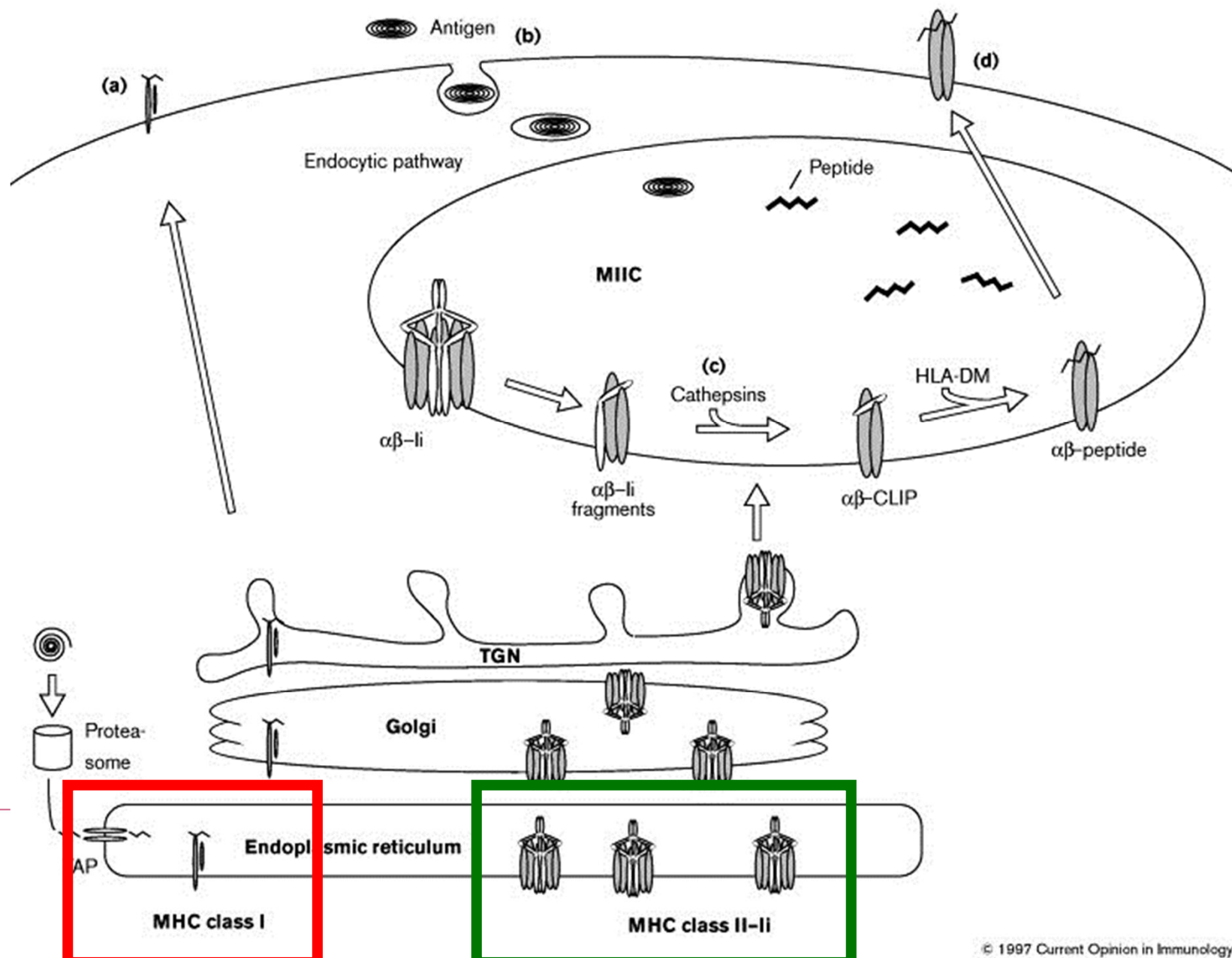


■ T lymfocyt

10) struktura a funkce molekul

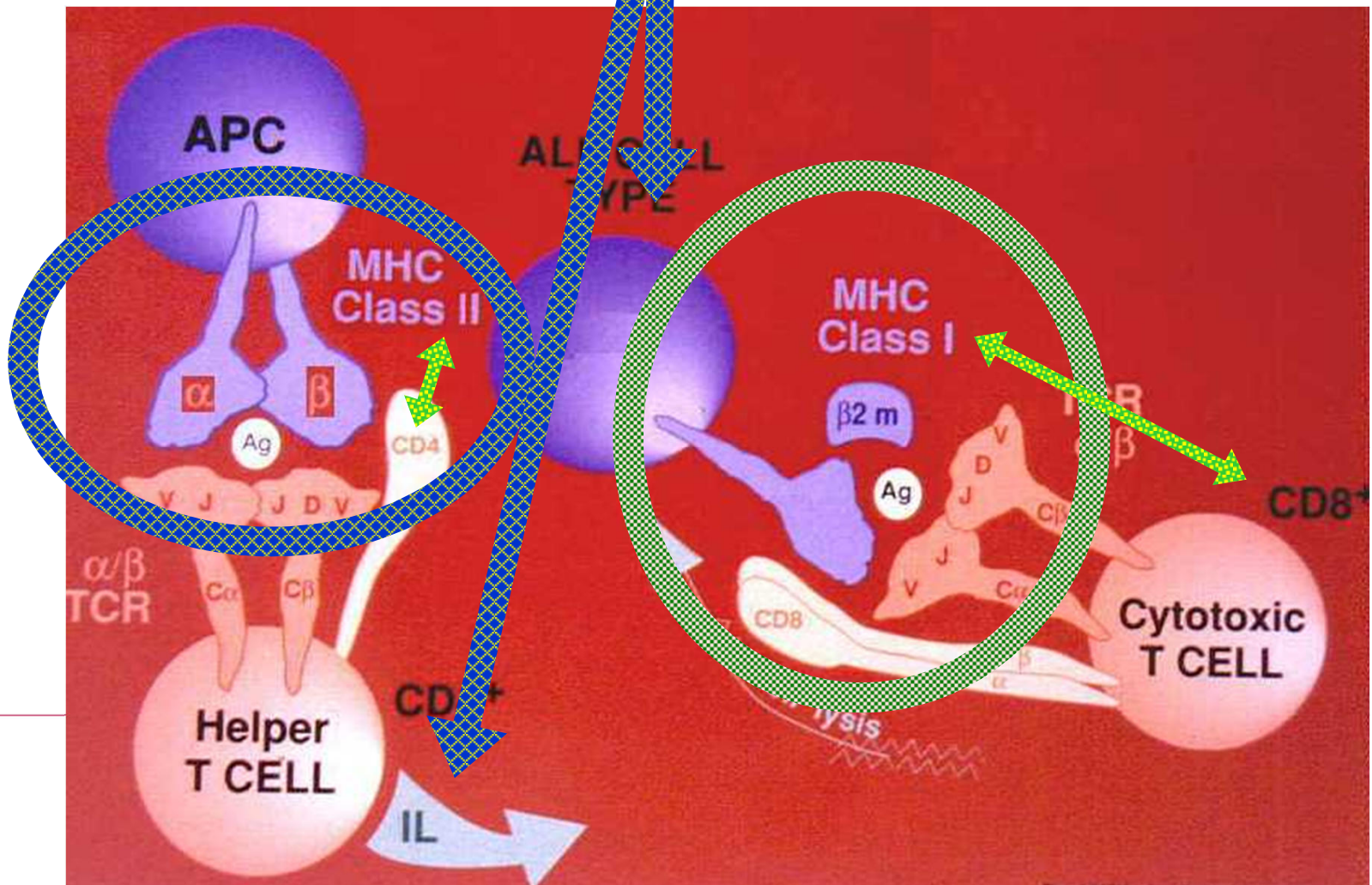


Vazba Ag s MHC shrnutí



fenomén HLA restrikce

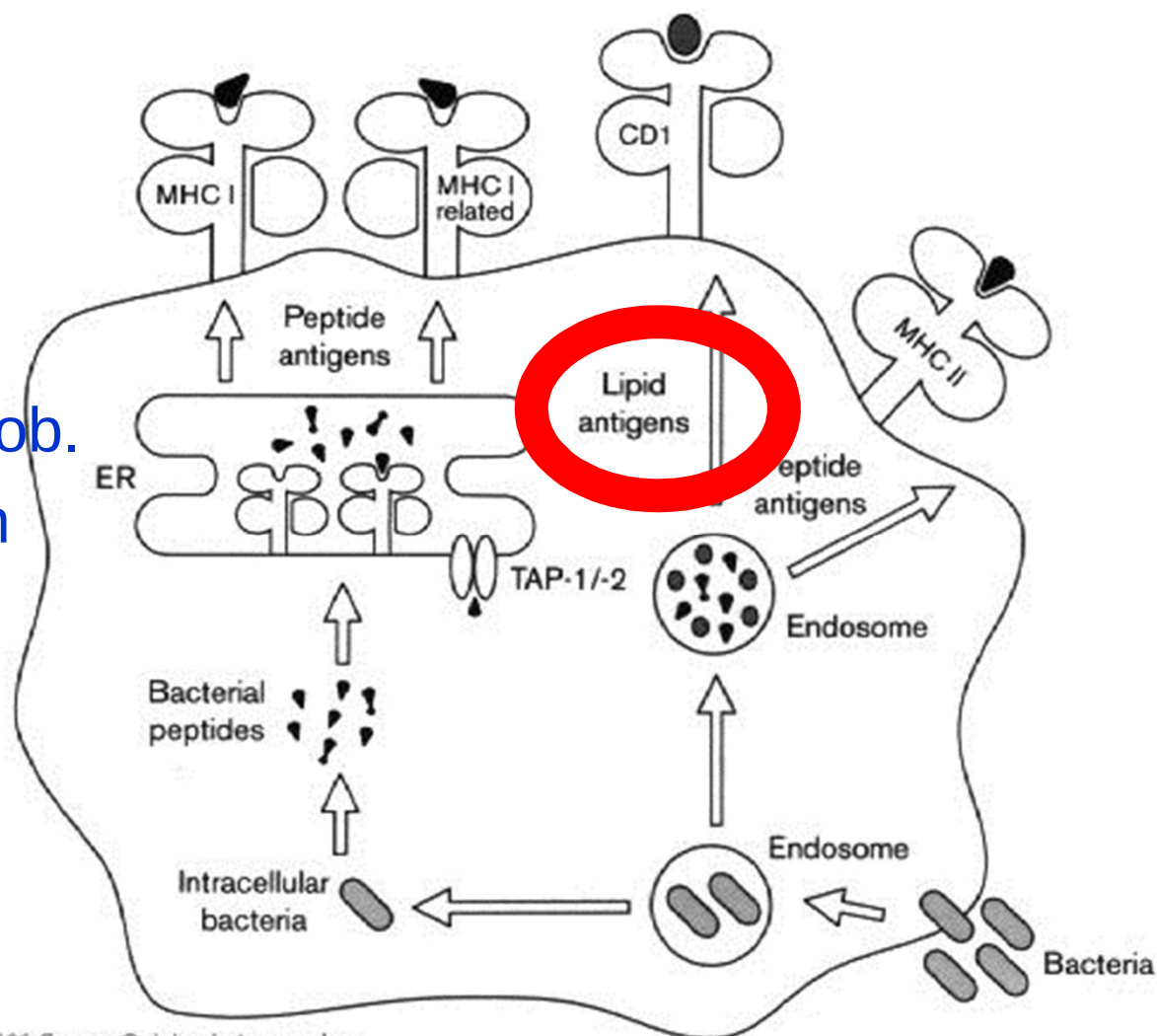
- **I. třída** prezentuje T_C buňkám - **zánik** předkládající buňky
- **II. třída** prezentuje T_H buňkám - **rozvoj specifické odpovědi**



ostatní molekuly prezentující Ag

CD 1

- je kódován na 1. chrom.
- podobná HLA I. třídy
- asociována s $\beta 2$ -mikroglob.
- exprese na dendritických bb, monocytech
- předkládání T bb $\gamma\delta$

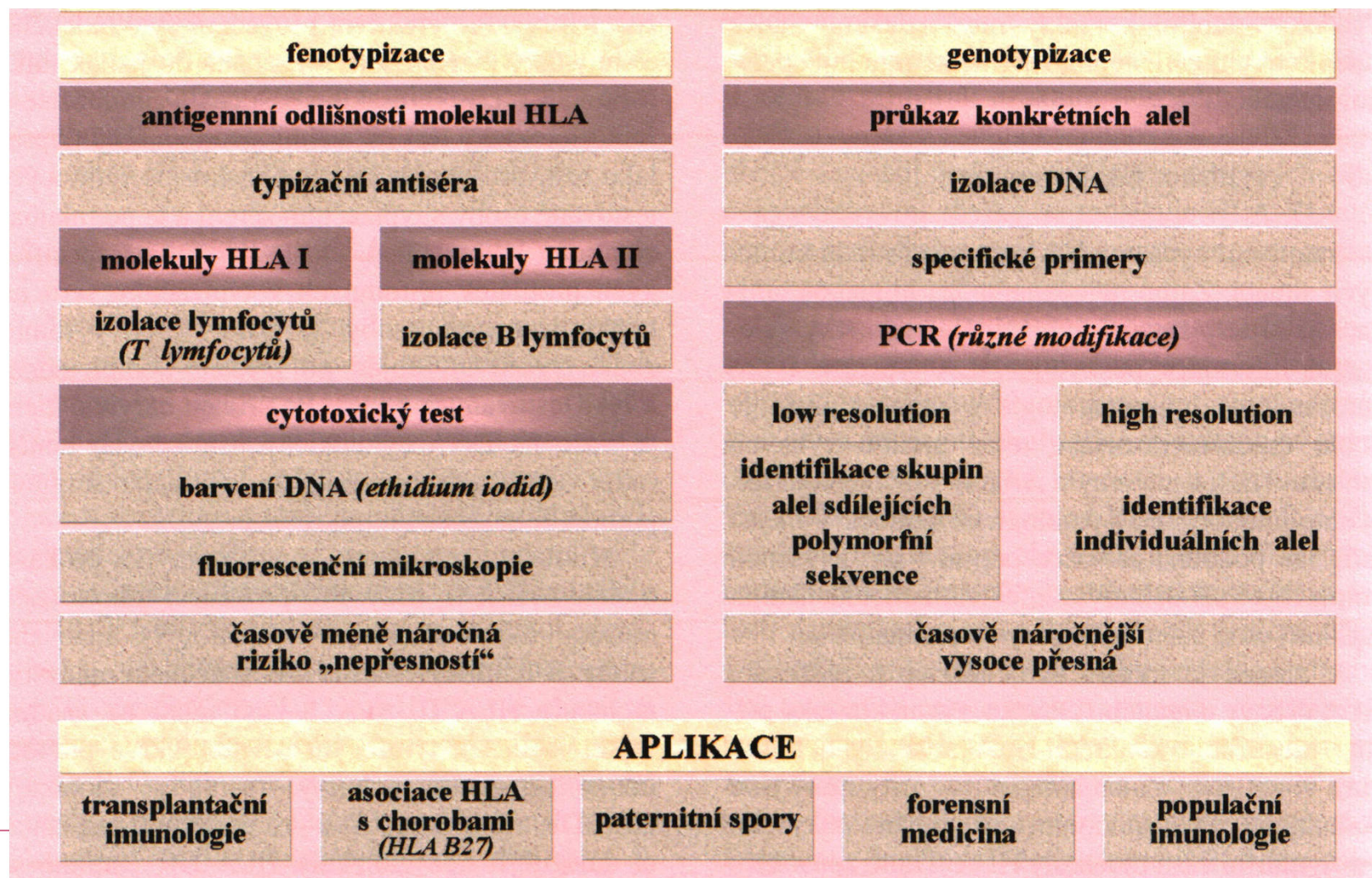


Asociace HLA s nemocemi

- Jedná se současný výskyt určitého HLA komplexu a onemocnění
- Většinou autoimunitní onemocnění

<i>Onemocnění</i>	<i>HLA alela</i>
Revmatoidní artritida	DR4
Gravesova ch.	DR3
Myastenia gravis	DR3
Celiakie	DR3-DQ2, B8
SLE	DR3
Diabetes mellitus I-dep.	DR3 a DR4
Roztroušená skleróza	A3, B7, B2, DR2

Typizace HLA systému



Sérologicky - Mikrocytotoxický test

Určování HLA I. i II.

Princip – narušení membrány buněk za účasti komplementu a uvolněného barviva eozinu

Provedení v Terasakiho destičkách:

- + izolované B nebo T lymfocyty z periferní nesrážlivé krve
- + diagnostická HLA antiséra z vícenásobných rodiček (120 sér pro HLA I. Třída; 60 sér pro HLA II. třídu)
- + Přidá se králičí komplement a vitální barvivo (*např. eosin Y – žluté*), *ethidium bromid* pro mrtvé bb

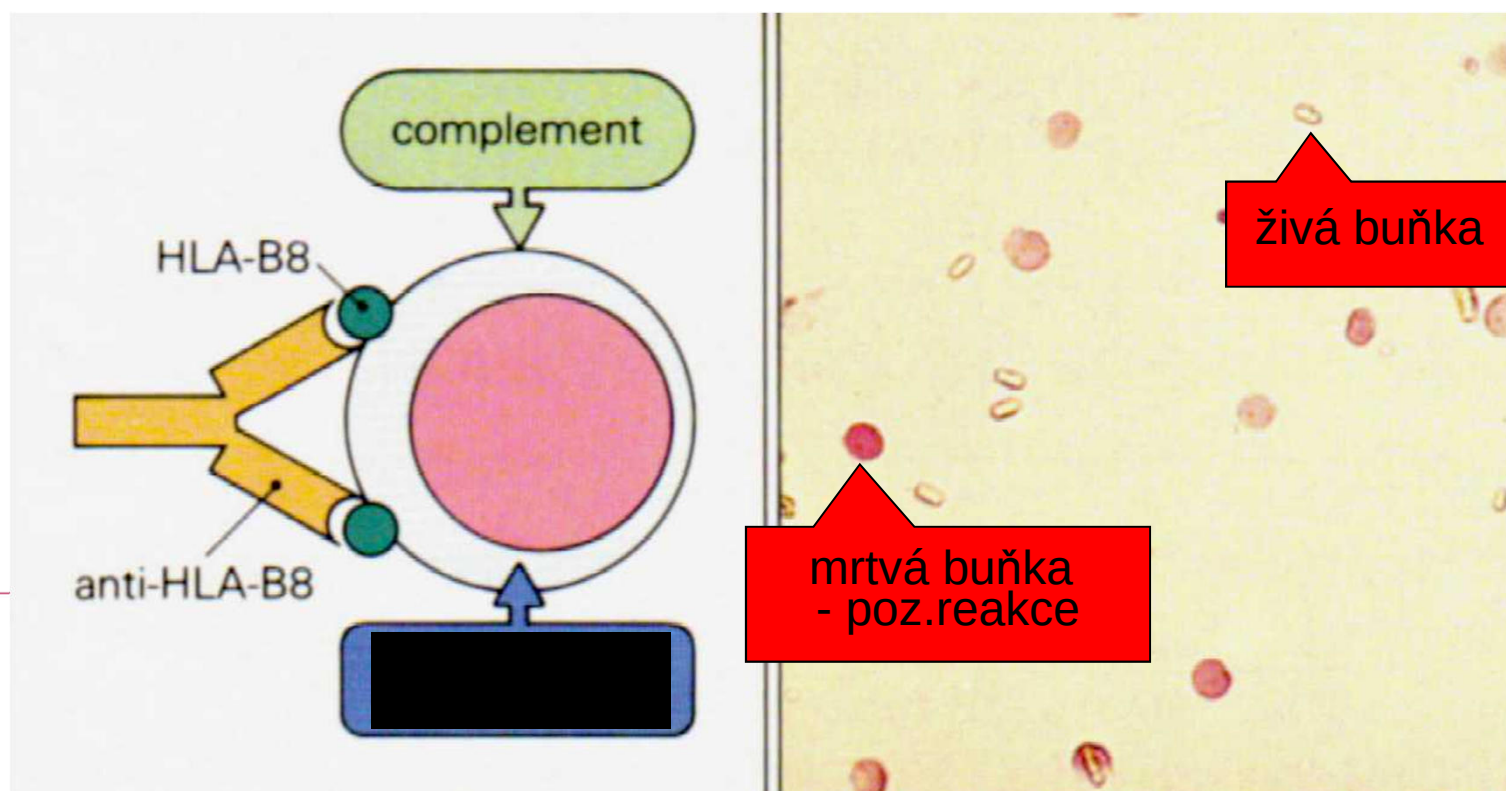
Detekce:

- sledování v mikroskopu
- buňka s navázanou protilátkou lyzuje; mrtvé buňky jsou tmavé, barvivo do buňky proniká póry a zůstává tam
- živé buňky opaleskují a září (pumpují barvivo z buňky ven)
- hodnotí se počet buněk lyzovaných k celkovému počtu buněk v zorném poli (%)



Mikrocytotoxický test

- Lyzují buňky nesoucí HLA, proti které byly namířeny specifické protilátky
- vitální barvení



Buněčné metody:

MLC (mixed lymphocyte culture, **technika směsné lymfocytární kultury**)

Průkaz HLA I. a II. třídy HLA DR, DQ

Kultivace lymfocytů dvou jedinců odlišných v antigenech HLA;
proliferace bb měřená inkorporací thymidinu

Provedení:

- lymfocyty pacienta jsou kultivovány společně s typovými lymfocyty se známým alelickým složením HLA antigenů II. třídy (typové lymfocyty se nedělí, ozářeny!!)
- v kultivačním médiu také ^3H thymidin
- **rozdílné HLA antigeny**: indukce proliferace u lymfocytů pacienta
- bb se zvětšují, syntetizují DNA, proliferují
- radioaktivní ^3H thymidin se zabudovává do DNA proliferujících buněk

Detekce:

- změří radioaktivita promytých bb
- negativita značí shodu v HLA - antigenech

CML (cell-mediated lympholysis, test buňkami zprostředkované lyze)

- pro HLA II. třídy

Princip: po expozici buněk cizím antigenům se objevují cytotoxické T lymfocyty

Provedení:

- kultivace testovaných lymfocytů s lymfocyty typovými (ozářeními, suprimovanými)
- buněčná suspenze se přidá do kultury terčových bb dárce značených ^{51}Cr

Detekce

- v případě **rozdílných HLA antigenů** se lymfocyty pacienta aktivovaly a cytotoxické T lymfocyty pacienta lyzují terčové buňky dárce, ty uvolňují atomy ^{51}Cr
- po centrifugaci a oddělení buněk se proměřuje uvolněná radioaktivita do média

Molekulárně-biologické metody

- vhodné pro typizaci HLA I. i II. třídy
- PCR (polymerázová řetězová reakce)
 - sekvenčně specifické typizování s použitím značených (radioaktivně nebo fluorescenčně) hybridizačních sond
 - porovnání s databází
 - rutinní stanovení, citlivé
- RFLP (restriction fragment length polymorfism)
 - Určování HLA na základě polymorfismu restrikčních fragmentů podle znalostí sekvence nukleotidů jednotlivých alel



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



Univerzita
Pardubice

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tento projekt je spolufinancován Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky