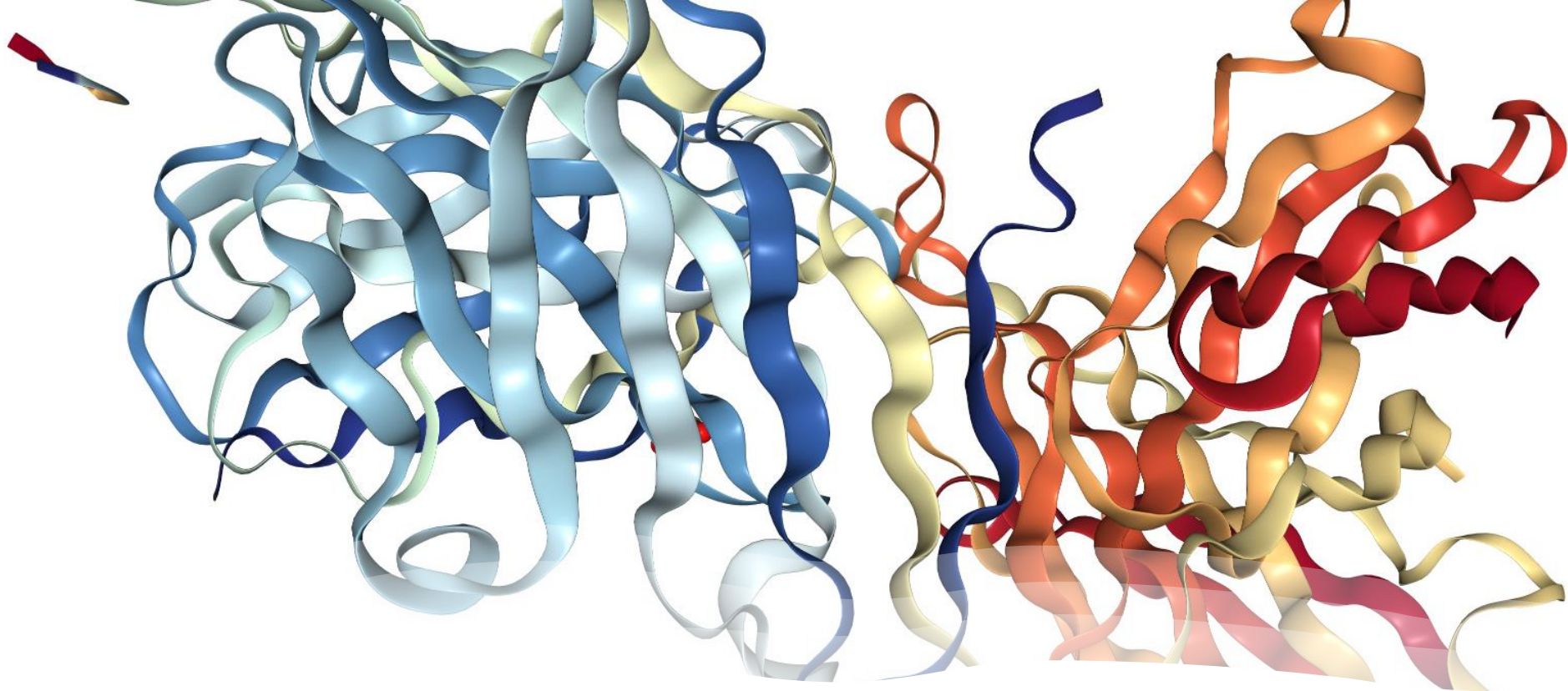




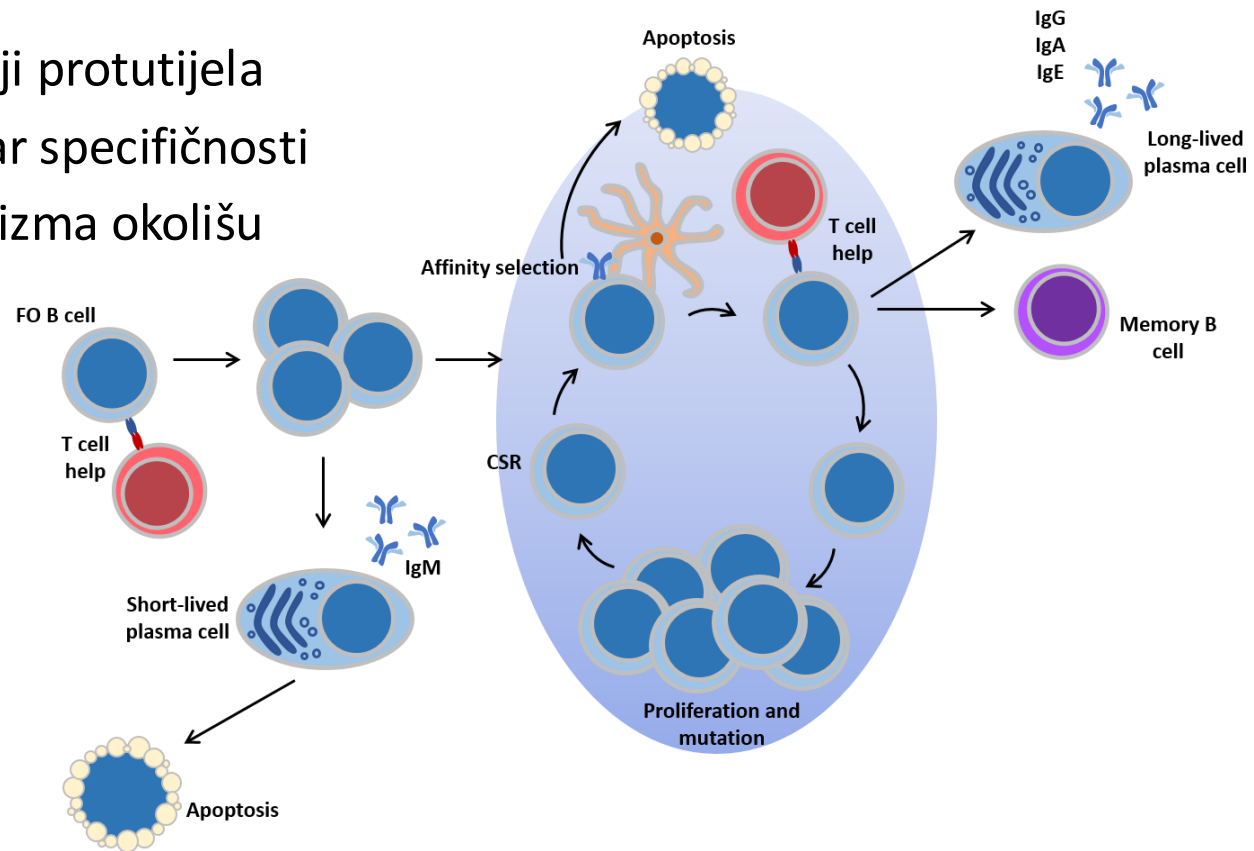
Stvaranje protutijela na molekularnoj razini

Marta Jančić
Lovro Krhlanko
David Dujmović-Mimić
Iva Kuštović
Ana Petrović

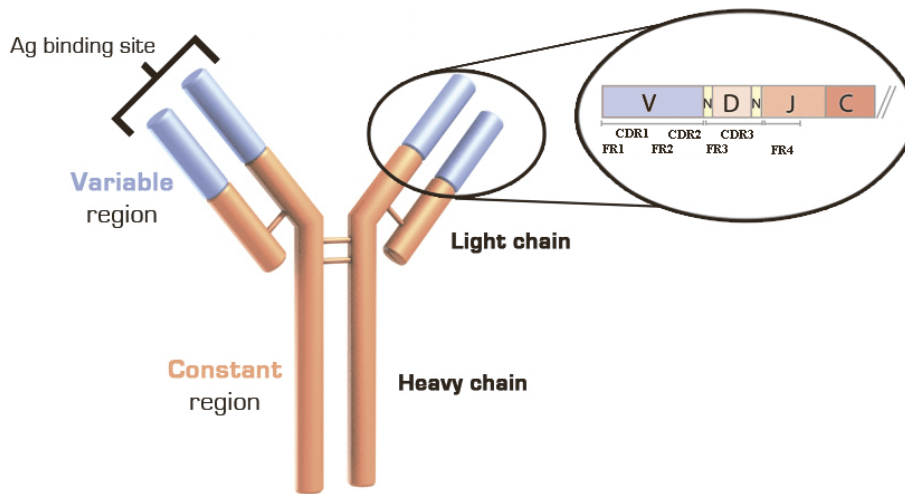
Imunologija i imunogenetika
Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb
2025/2026

Humoralna imunost

- temelji se na proizvodnji protutijela
- protutijela: širok spektar specifičnosti
- odraz prilagodbe organizma okolišu



Protutijela



- građena od teških (H) i lakih (L) lanaca

varijabilni (V) dijelovi

→ specifičnost

konstantni (C) dijelovi

→ funkcionalna stabilnost

- spajanje V + C dijelova =
osnova genske varijabilnosti

D segment – raznolikost, samo u teškim lancima

J segment - spojni

LAKI LANAC → V + J;

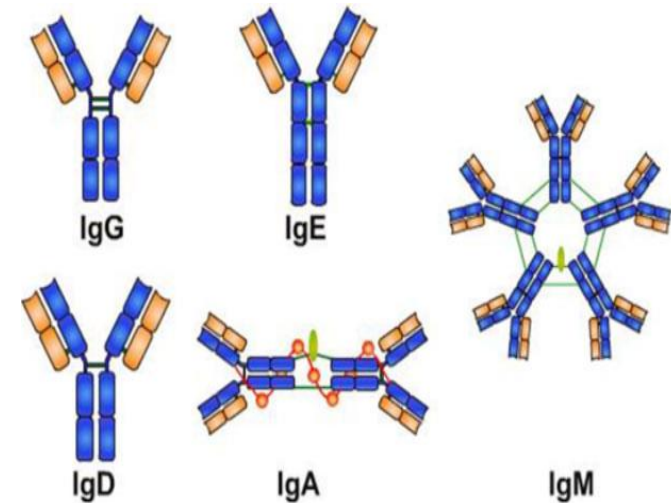
TEŠKI LANAC → V + D + J

- ispred svakog V → Leader sekvenca (L, kodira vodeći peptid) + promotori (TATA, oktamer)

Genska pozadina stvaranja imunoglobulina

teorija zametne loze → genom sadrži sve gene potrebne za različita protutijela

teorija somatske mutacije → mutacije stvaraju raznolikost, genom sadrži manji broj imunoglobulinskih gena koji su u somatskim stanicama podložni mutacijama, koje su, uz dodatak rekombinacija, rezultat različitosti



MODEL SOMATSKE REKOMBINACIJE

- **više gena = jedan polipeptidni lanac**
- nije svaki lanac kodiran jednim genom → više gena sudjeluje
- manje informacija, ali stvaranje velikog broja funkcionalnih raznovrsnih protutijela

- Mendelovi zakoni = iznimka!

- primjer:

C_k → nasljeđivanje po Mendelovim zakonima koji vrijede za jedan strukturni gen (nema crossing-overa), ti dijelovi lanca kodirani samo jednim genom

V_k → varijabilni dijelovi lanca kodirani većim brojem različitih gena

- imunoglobulini krše dosadašnja pravila genetike

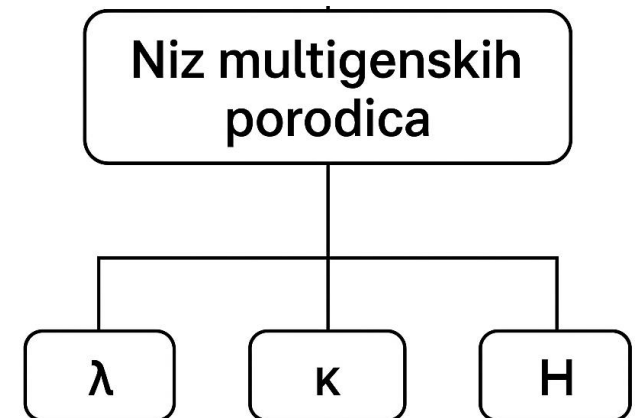
ne vrijedi 1 gen = 1 polipeptid

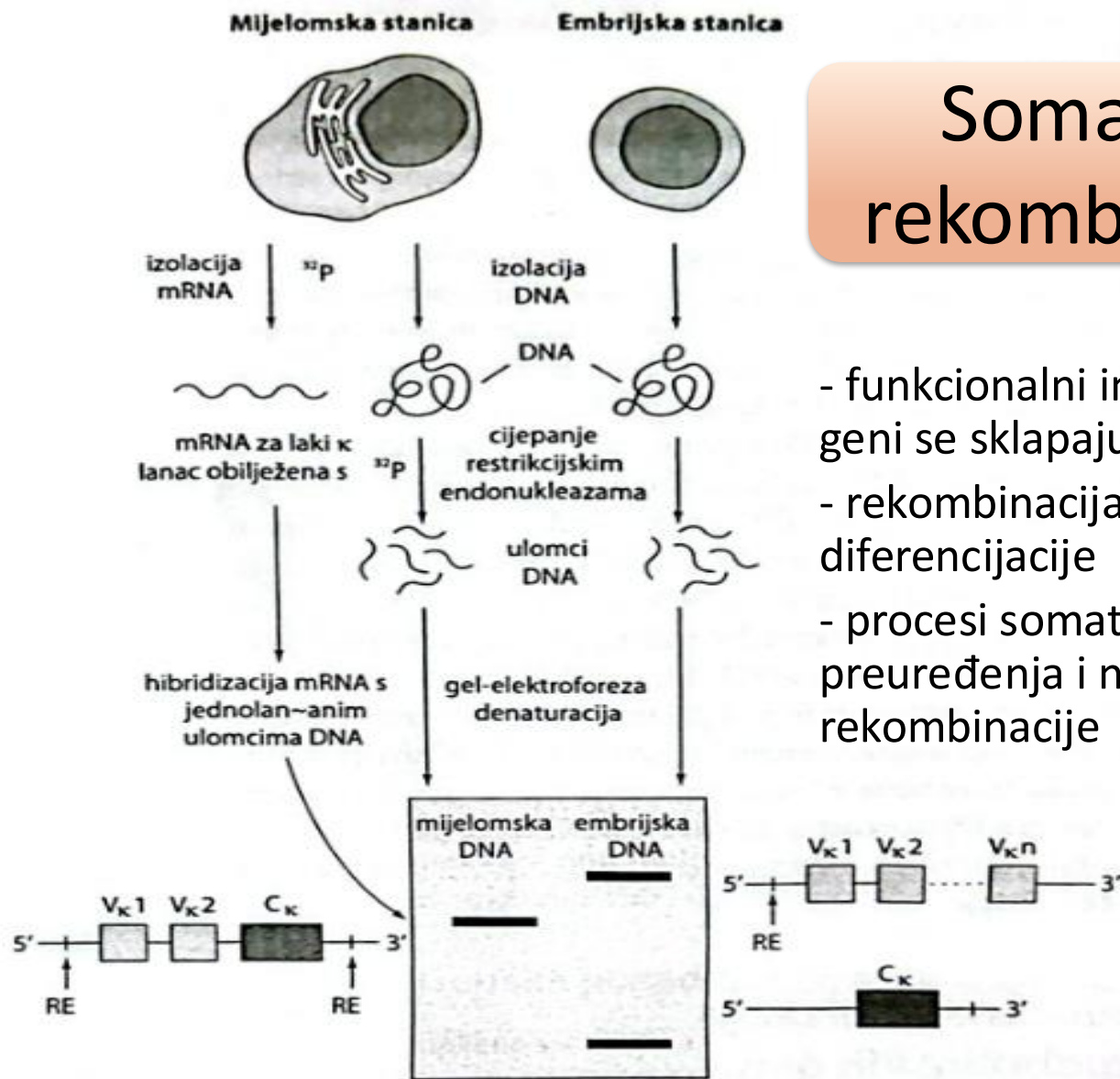
namanje 2 gena = 1 polipeptid

Organizacija imunoglobulinskih gena

- **supergenska imunoglobulinska porodica**
- obuhvaća više **multigenskih porodica**: κ (kappa), λ (lambda), H (heavy)
- geni smješteni na kromosomima 2, 14 i 22

- EGZONI su isprekidani INTRONIMA
→ između kodirajućih dijelova strukturnih gena se nalaze nekodirajući umetci
- strukturni dijelovi gena se izravno prevode u slijed aminokiselina, a introni imaju ulogu u prekrajanju i izražavanju egzona





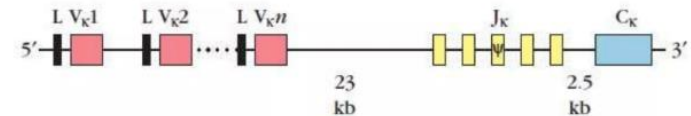
Somatska rekombinacija

- funkcionalni imunoglobulinski geni se sklapaju tek naknadno
- rekombinacija tijekom diferencijacije
- procesi somatskog DNA preuređenja i nasumične rekombinacije

Slika 4-1. Eksperimentalni dokaz da odgovarajući geni za regiju V_κ i C_κ u embrijskoj DNA nisu zajedno na istome ulomku DNA, dok u mijelomskim stanicama oba gena u susjedstvu na istome ulomku. DNA je pocijepana mnogim restrikcijskim endonukleazama (RE), a zatim su elektroforezom u gelu izolirani ulomci. Denaturacijom su razdvojene dvije niti DNA, a dobiveni jednolančani ulomci hibridizirani s mRNA za laki lanac koja je obilježena radioaktivnim fosforom (^{32}P). Dobivena je samo jedna traka za mijelomsku DNA, a dvije za embrijsku.

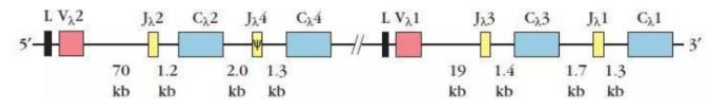
Multigenaska porodica lanca κ

- smještena na kratkome kraku 2. kromosoma u čovjeka, sastoji se od triju skupina gena
- kod ljudi postoji oko 40 V_K gena, ispred svakog je L (leader sekvenca)
- nizvodno (prema 3 kraju DNA) slijedi 5 veznih J_K gena te jedan strukturni gen C_K
- varijabilna regija: veći dio kodiran nekim od gena V_K , samo osmina kodirana J_K
- razne kombinacije V_K - J_K što pridonosi heterogenosti varijabilne regije



Multigenska porodica lanaca λ

- smještena na dugome kraku 22. kromosoma u čovjeka, tri skupine gena
- V_λ kod miša čine 2 gena, a kod ljudi oko 30 gena
- Nakon V_λ nalazi se 4 J_λ gena te niz strukturnih gena C_λ
- V_K-J_K



Multigenska porodica lanaca H

- smještena na dugome kraku 14. Kromosoma
- uz gene V_H i J_H nalazimo i D_H = gen za različitost
- 100 gena V_H , 6 gena J_H , 30-ak gena D_H
- Varijabilna regija: kombinacija V_H - D_H - J_H
- $C_\mu, C_\delta, C_\gamma, C_\alpha, C_\epsilon$  Određuju vrstu antitijela
- vrste antitijela: **IgM, IgD**, IgG, IgA, IgE
- gen S za prekapćanje (engl. *switch*)
 - Nalazi se ispred svakog C gena (osim C_δ)
 - Omogućuje da B-limfocit promijeni vrstu antitijela npr. IgM $\rightarrow$ IgG, IgA, IgE
 - Kod zrelih B-limfocita dolazi do promjene konstantne regije(C) kako bi se promijenila vrsta antitijela, varijabilna regija ostaje ista
 - Rekombinacija/delecija
 - Prekapćanjem specifičnost za određeni antigen ostaje ista (jer se varijabilna regija ne mijenja)



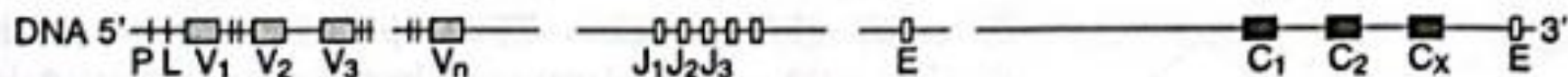
Sklapanje funkcionirajućih gena za varijabilnu regiju

- sklapanje funkcionirajućih gena za varijabilnu regiju lanca provodi se spajanjem gena V, D i J.
- cilj je stvoriti golemu heterogenost protutijela na osnovi ograničena niza gena zametne loze
- imunoglobulinski geni ostaju u konfiguraciji zametne loze u svim stanicama osim u lozi limfocita B.
- tijek diferencijacije limfocita(koštana srž) kod teških lanaca/lakih
 - Povezivanje odabranog gena iz D_H i jednog gena iz J_H te se nastala kombinacija povezuje s V_H /povezivanje odabranog gena V_L s odabranim genom J_L
 - Stvorena kombinacija $V_H-D_H-J_H$ / V_L-J_L prekapča se uz neki od gena za C
- proces preslagivanja gena za varijabilni dio lanca je način kako se stvaraju imunokompetetni limfociti B

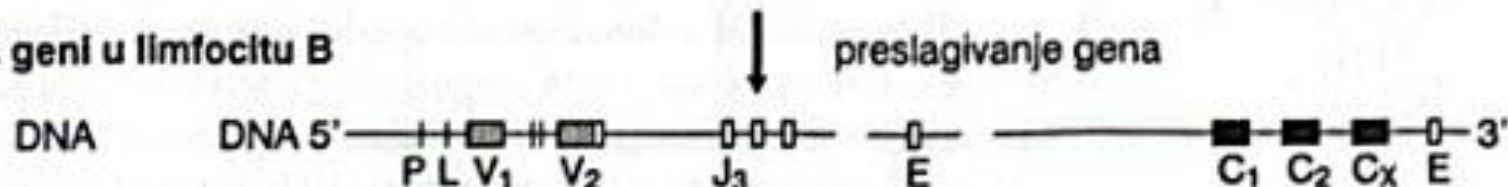
Preslagivanje gena V_L - J_L za lake lance

- preslagivanje gena kako bi išli ovim redoslijedom:
5' Vodeći niz (L) - nekodirajući intron – odabrani
varijabilni gen (V_L) - odabrani vezni gen (J_L), drugi intron I
odabrani gen (C_L) - stop signal 3'
- RNA polimeraza prepisuje slijed, primarni transkript RNA
se prerađuje izrezivanjem introna te nakon toga mRNA
napušta jezgru
- translacijom nastaju laki lanci koje njihova leader
sekvenca usmjerava prema hrapavom endoplazmatskom
retikulumu gdje se savijaju i spajaju u funkcionalno
antitijelo

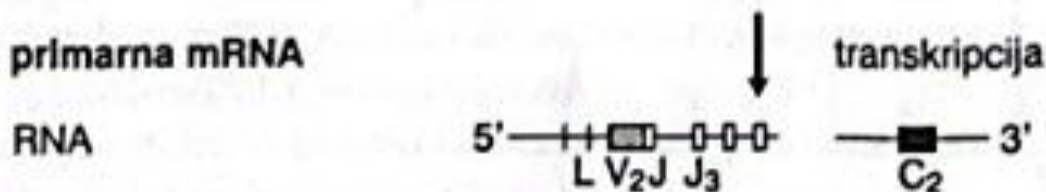
1. geni u konfiguraciji zametne loze



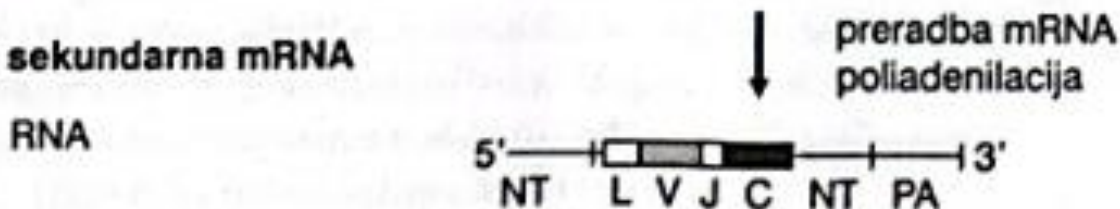
2. geni u limfocitu B



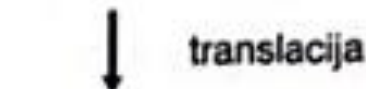
3. primarna mRNA



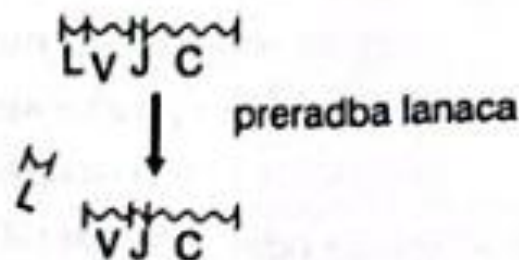
4. sekundarna mRNA



5. prvotni polipeptidni lanac



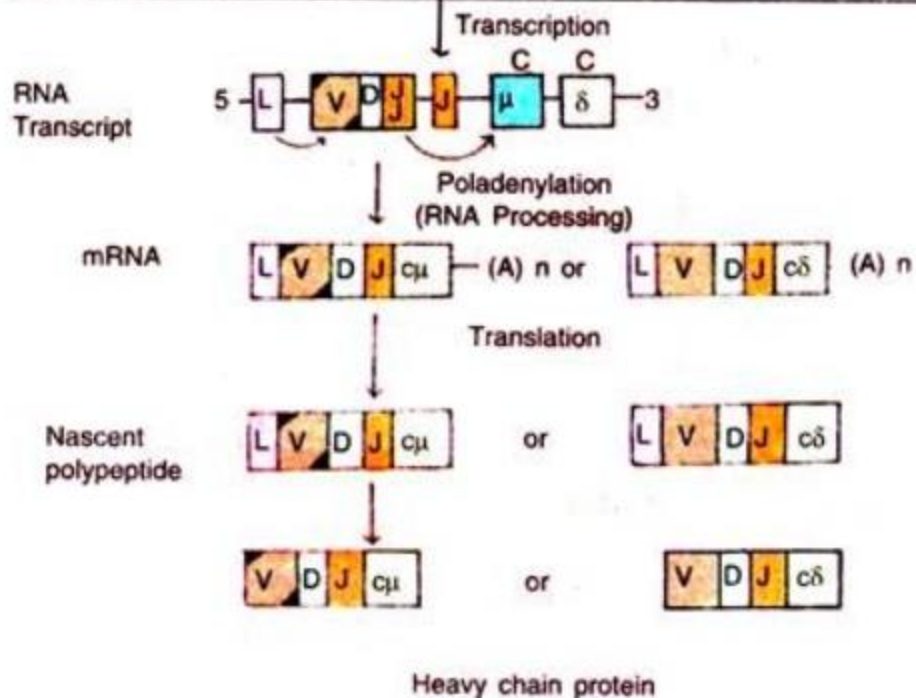
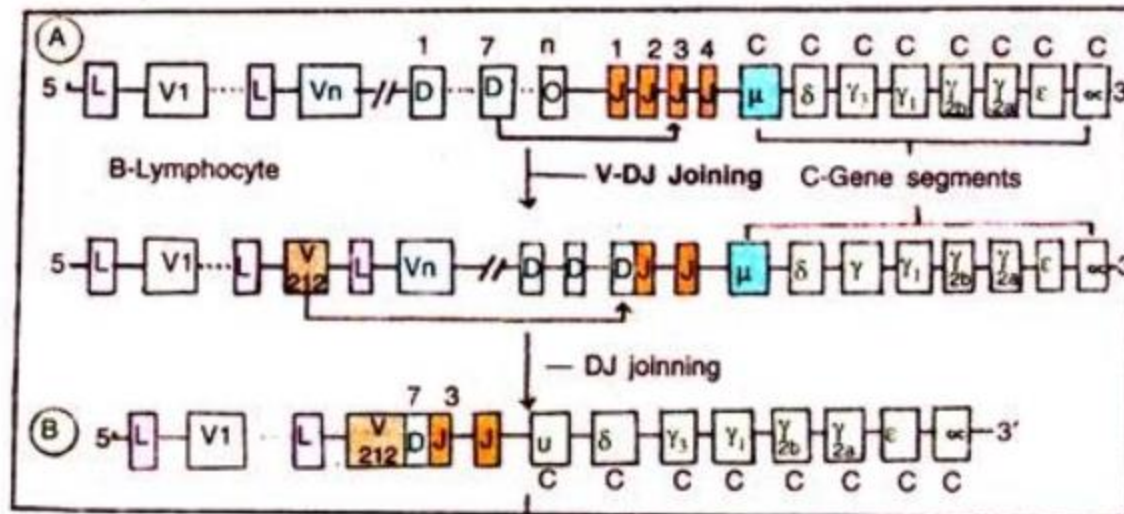
6. polipeptidni lanac



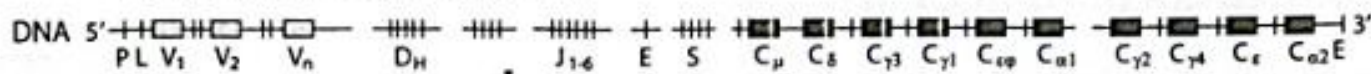
4. Shematski prikaz preslagivanja gena za lake lance te stvaranja mRNA i gotovih lanaca.

Preslagivanje gena $V_H-D_H-J_H$ za teške lance

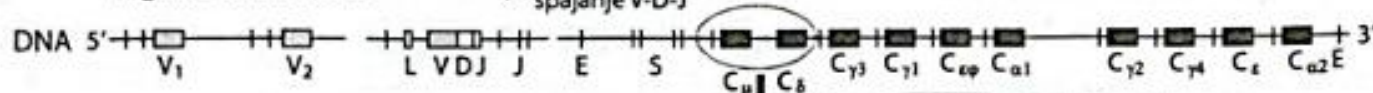
- vodeći niz (L), nekodirajući intron, odabrani varijabilni gen (V_H), odabrani gen za različitost (D_H), odabrani vezni gen (J_H), drugi intron i cijeli niz gen (C_H)
- nastali primarni transkript RNA prerađuje se isjecanjem introna, a nastala mRNA napušta jezgru.
- mogu nastati dvije mRNA, jedna s C_μ , druga s C_δ
- one daju kod za dva teška lanca koji se nakon odsjecanja leader sekvence udružuju s lakim lancima I pojavljuju na površini kao antigenski receptori koji imaju istu antigensku specifičnost



1. geni u konfiguraciji zametne loze



2. geni u limfocitu B



3. primarna mRNA

transkripcija

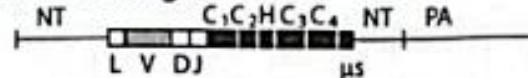


preradba mRNA

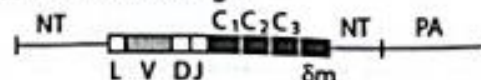
4. a) sekundarna mRNA za membranski IgM



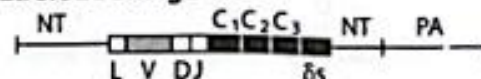
b) sekundarna mRNA za slobodni IgM



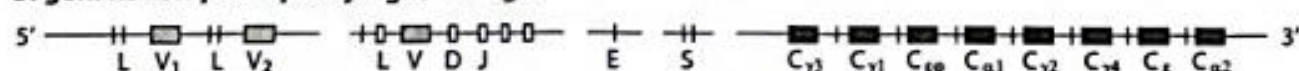
c) sekundarna mRNA za membranski IgD



d) sekundarna mRNA za slobodni IgD



5. geni nakon prekapčanja IgM → IgG

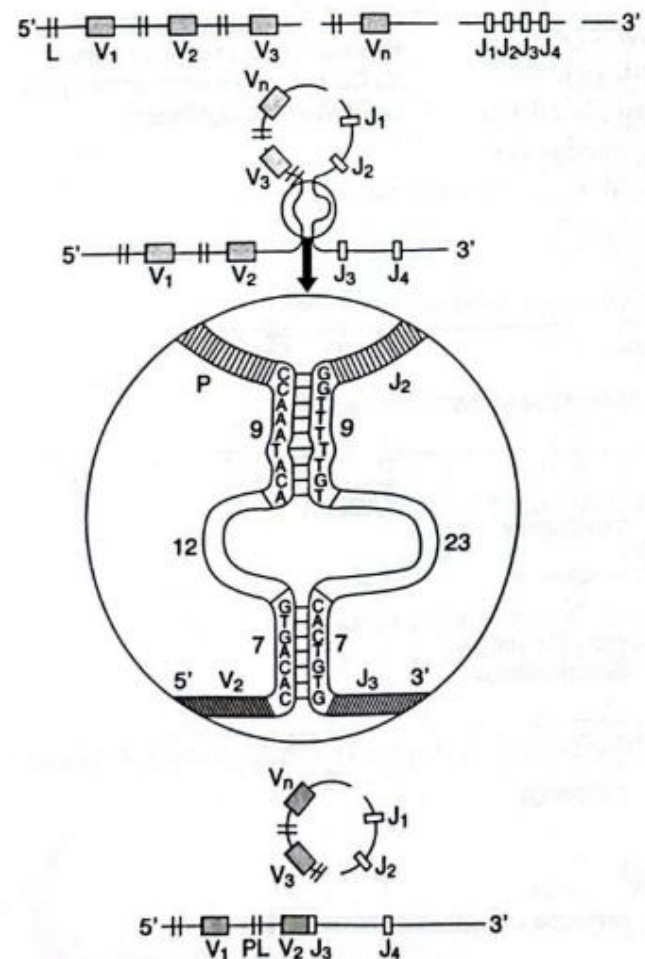


Slika 4-3. Shematski prikaz preslagivanja gena za teške lance te stvaranja mRNA i gotovih lanaca.

Mehanizam preslagivanja gena za varijabilnu domenu

- Geni V, D i J
- RSS slijedovi (engl. *Recombination signal sequence*) - nekodirajući signalni slijedovi koji se odnose kao palindromi
- Svaki se sastoji od heptamera, razmaknice od 12 ili 23 pb i nonamera
- VDJ rekombinaze – prepoznaju RSS i dovode ih jedne drugima, oni se potom zatvaraju kao patentni zatvarač

- Razmaknice odgovaraju jednostrukom (12 Nu) ili dvostrukom zavoju (23 Nu) dvostruke zavojnice DNA
- Preciznost procesa očuvana pravilom 12/23 (RSS s jednim zavojem može se povezati samo sa segmentom od dva zavoja)
- RSS raspored je pravilan i osigurava pravilan slijed preslagivanja
- Npr. V_K ima jednozavojnicu nizvodno, a J_K ima dvozavojnicu uzvodno

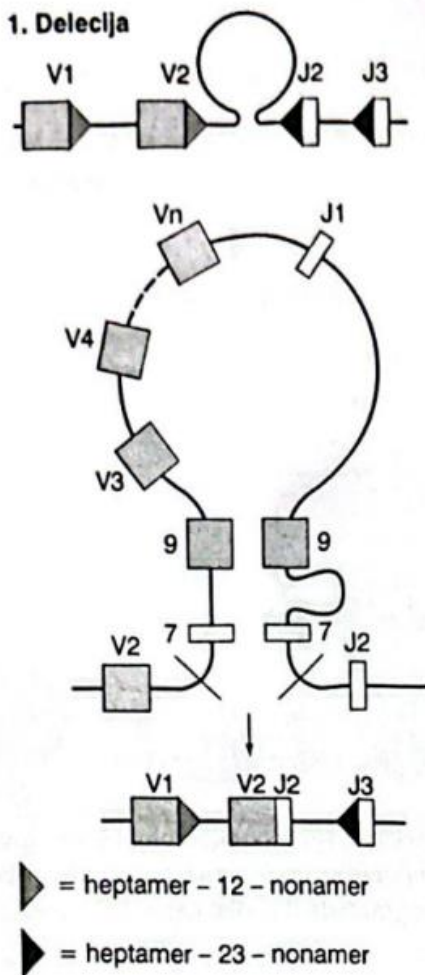


Slika 4-5. Model preslagivanja gena za stvaranje određene kombinacije gena, uz ireverzibilnu deleciju dijela kromosoma između odabranih gena (radi primjera odabrani su geni V_2 i J_3). Vidi se pravilo 12/23.

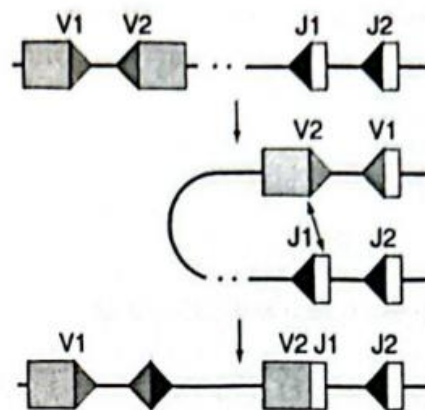
3 mehanizma

- Sudbina ovisi o transkripcijskoj orijentaciji
 1. delecija – ako su geni V istosmjerno transkripcijski orijentirani kao i gen J, nastaje petlja koja puca
 - DNA ligaza- spaja egzone i petlju koja se odvaja kao kružna DNA i nepovratno gubi
 2. inverzija – ako su geni V i J transkripcijski suprotno orijentirani
 - Dolazi do spajanja RSS slijedova inverzijom DNA te ostaje kodirajući "vez" i signalni "vez", a spojeni strukturni geni mijenjaju svoju orijentaciju
 3. Crossing over između sestrinskih kromatida
 - Dolazi do nejednolikog c.o.
 - dio između V i J se ne gubi, nego se predaje drugoj kromatidi
- U svim trima slučajevima rekombinacija na krajeve eksona se može dodati ili oduzeti nekoliko nukleotida pomoću enzima deoksinukleotidil-transferaze
- nepreciznost može biti poželjna kao izvor varijabilnosti protutijela (osim NONSENSE mutacija)

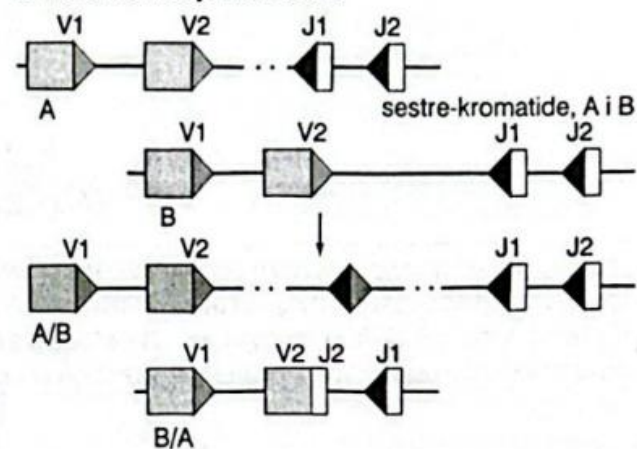
1. Delecija



2. Inverzija



3. Rekombinacija kromatida



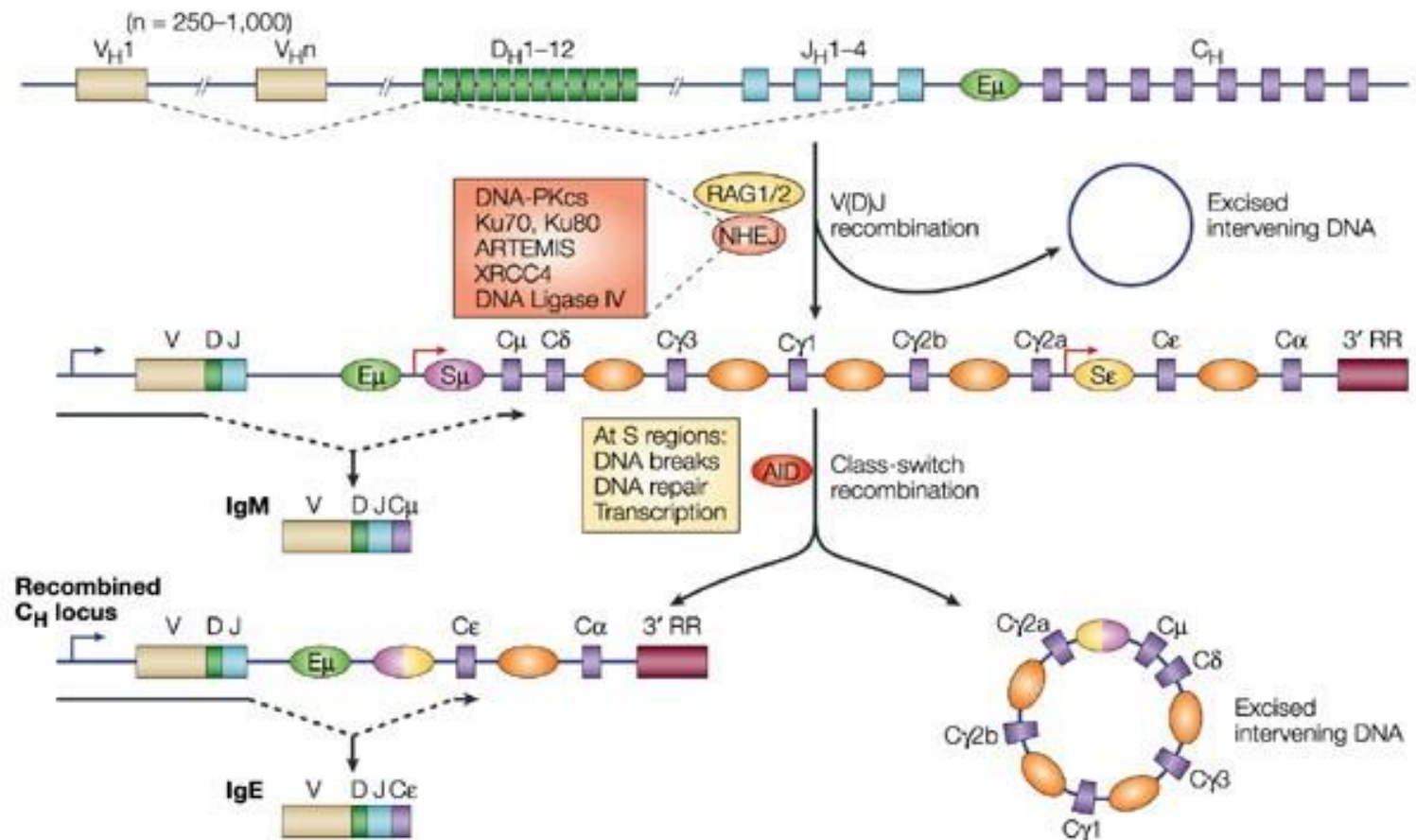
Slika 4-7. Tri opća modela rekombinantnog preslagivanja imunoglobulinskih gena prikazana na primjeru spajanja gena V i J za lake lance. Geni L i P nisu prikazani zbog jasnoće prikaza.

Preslagivanje
konstantnog
dijela lanca

- Konstantni dio lanca određuje izotip antitijela tj. imamo li IgA, IgM, IgE, IgD ili IgG
 - CSR (Class switch recombination) je proces u kojem limfociti B proizvode antitijela bez promjene specifičnosti za antigen
 - Događa se u limfnim čvorovima i slezeni
- 

CSR i mehanizam preslagivanja

- Aktivacija limfocita B - pomagački limfociti T aktiviraju limfocite B interakcijama CD40-CD40L i citokinima
- Citokinski signal određuje klasu antitijela
(npr. IL-4 određuje ili IgE ili IgG1)
- AID enzimi- deaminiraju C u U unutar S regija koje se nalaze ispred konstantnih gena za teški lanac
- Deaminacija uzrokuje dvolančani lom
- Pomoću enzima za popravak dvolančanih lomova (MMR ili BER) spajaju se S regije te nastaju specifični tipovi antitijela



Specijalizacija
klona
limfocita B za
određenu
specifičnost

- Limfociti B su ključne stanice **adaptivnog imunološkog sustava**.
- Njihova glavna uloga je **stvaranje protutijela (imunoglobulina)** koja se vežu na antigene i neutraliziraju ih.
- Svaki limfocit B nosi **jedinstveni B-stanični receptor (BCR)**, koji prepoznaje samo jedan specifičan antigen.
- Ta jedinstvenost nastaje **preslagivanjem genskih segmenata** tijekom sazrijevanja u koštanoj srži.
- Proces je **nasumičan i neovisan o kontaktu s antigenom**.

Geni za imunoglobuline

- Svako protutijelo sastoji se od **dva teška (H)** i **dva laka (L)** lanca.
- Geni za imunoglobuline raspoređeni su u **segmente**:
- **V (varijabilni)** – određuje specifičnost vezanja antigena
- **D (diverzitetni)** – prisutan samo u teškom lancu
- **J (spajajući)** – povezuje V i D segmente
- **C (konstantni)** – određuje klasu protutijela (IgM, IgG, IgA...)
- Kombinacija ovih segmenata stvara **različite varijabilne regije** i time nebrojene mogućnosti za vezanje antigena.

Rekombinacija gena

- Rekombinacija se odvija **tijekom sazrijevanja limfocita B u koštanoj srži**.
 - 1) Najprije se preslaguju geni za **teški lanac (VH + DH + JH)**.
 - 2) Ako je rekombinacija uspješna → sintetizira se **μ lanac** (dio IgM).
 - 3) Nakon toga slijedi rekombinacija **lakog lanca (VL + JL)**, najprije κ (kappa), a ako ne uspije, λ (lambda).
- Ako su oba preslagivanja uspješna → stvara se **funkcionalni IgM** koji se pojavljuje na površini stanice.
- Ako rekombinacija zakaže → stanica **propada apoptozom**.

Alelsko isključivanje

- Svaka stanica posjeduje **dva para kromosoma** s imunoglobulinskim genima.
- Međutim, aktivan je **samo jedan** kromosom za teški i **jedan** za laki lanac.
- Taj mehanizam se naziva **alelsko isključivanje**.
- Cilj: spriječiti stvaranje više vrsta protutijela u istoj stanici → **svaki limfocit B proizvodi samo jedno jedinstveno protutijelo**.
- Na taj način postiže se **specifičnost i stabilnost imunološkog odgovora**.

Negativna selekcija

- U završnoj fazi sazrijevanja, limfociti B prolaze kroz **negativnu selekciju** u koštanoj srži.
- Ako njihov BCR prepozna **vlastite (autoantigene)**, stanica pokreće **apoptozu**.
- Ovim se sprječava razvoj **autoimunih bolesti**.
- Samo oko **10 % svih limfocita B** uspješno prolazi selekciju i napušta koštanu srž kao **zrele, neautoimune stanice**.

Izvor različitosti protutijela

Različitost protutijela proizlazi iz više mehanizama:

1. Kombinacija različitih genskih segmenata (V, D, J) → osnovna razina raznolikosti.

2. Vezna fleksibilnost – male varijacije u točkama gdje se geni spajaju.

3. Dodavanje P i N nukleotida pri rekombinaciji → stvara dodatne kombinacije.

4. Somatska hipermutabilnost – mutacije u varijabilnim regijama povećavaju afinitet.

5. Kombiniranje teških i lakih lanaca – svaki par može tvoriti novu kombinaciju protutijela.

Somatska hipermutabilnost i afinitetno sazrijevanje

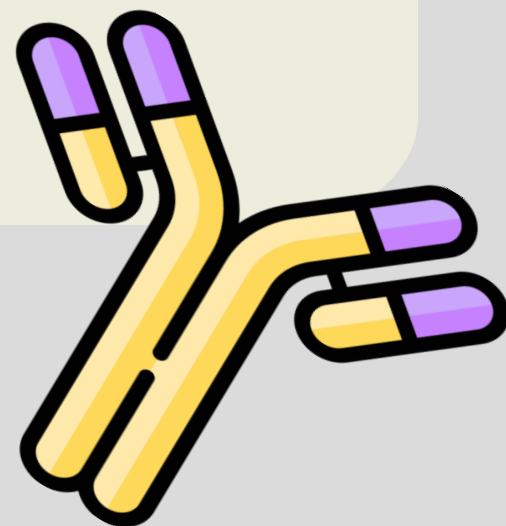
- Nakon što limfocit B prepozna antigen, aktivira se proces **somatske hipermutabilnosti**.
- U genima za varijabilne regije javljaju se **točkaste mutacije**.
- Mutacije mogu povećati ili smanjiti sposobnost vezanja za antigen.
- Stanice s **većim afinitetom** selektiraju se i **umnožavaju** u **zametnim središtima limfnih čvorova**.
- Rezultat je stvaranje **visoko specifičnih protutijela** – proces nazvan **afinitetno sazrijevanje**.

Rezultat procesa

- Ukupni potencijal stvaranja različitih protutijela: $10^8 - 10^{11}$ varijanti!
- Svaki limfocit B ima:
- jedinstvenu **kombinaciju gena** za receptor,
- **specifičnost** za jedan antigen,
- sposobnost **klonske ekspanzije** nakon aktivacije.
- Samo **neautoimune i funkcionalne** B stanice ulaze u cirkulaciju i sudjeluju u imunološkoj obrani.

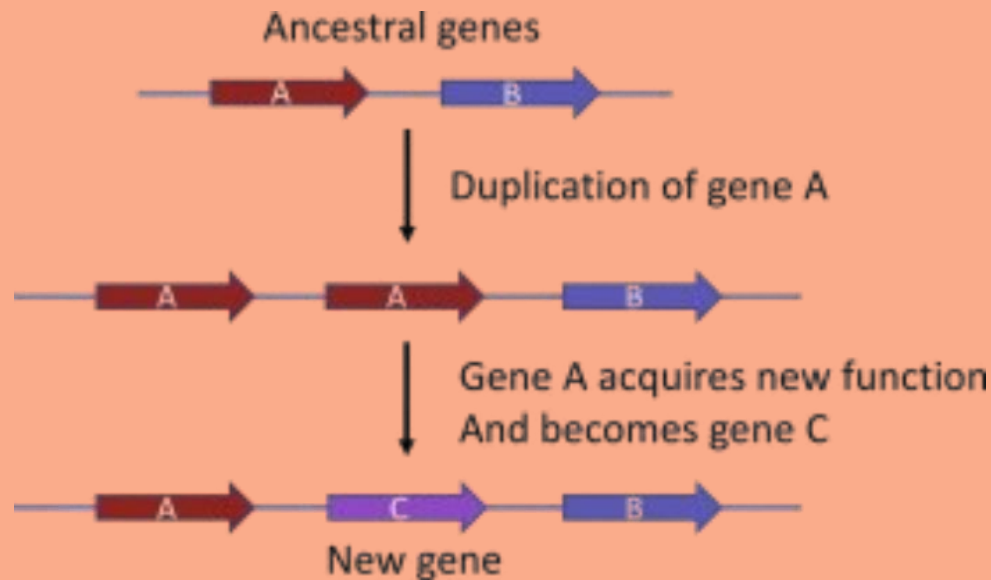
Evolucija imunoglobulinskih gena

- Početak: prije cca 400 milijuna godina
- Hipotetski pragen – kodirao domenu od 110 aminokiselina
- Struktura: dvije petlje povezane disulfidnim mostom
- Temelj današnjih imunoglobulinskih gena



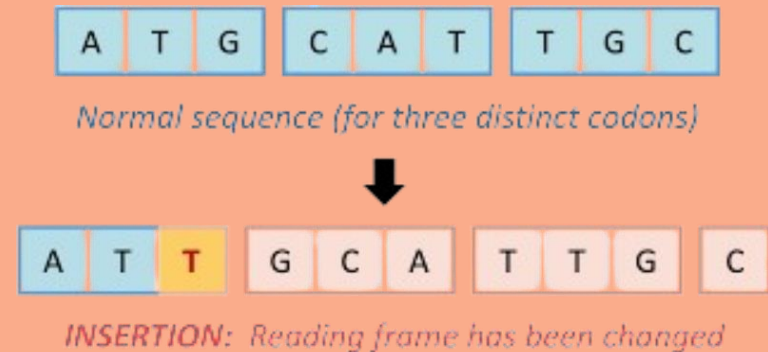
Mehanizmi evolucije

- Duplikacija – umnožavanje gena



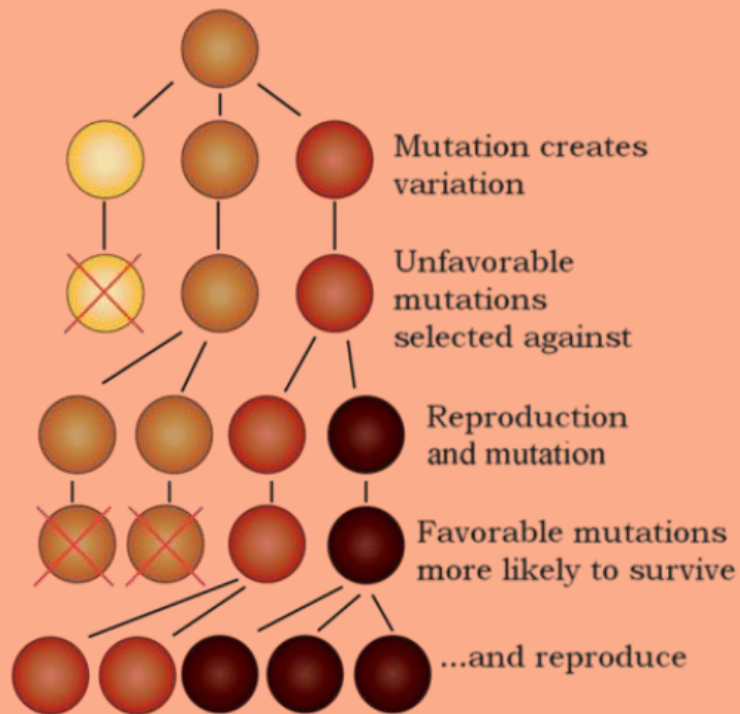
Mehanizmi evolucije

- Točkasta mutacija – promjena u jednom baznom paru



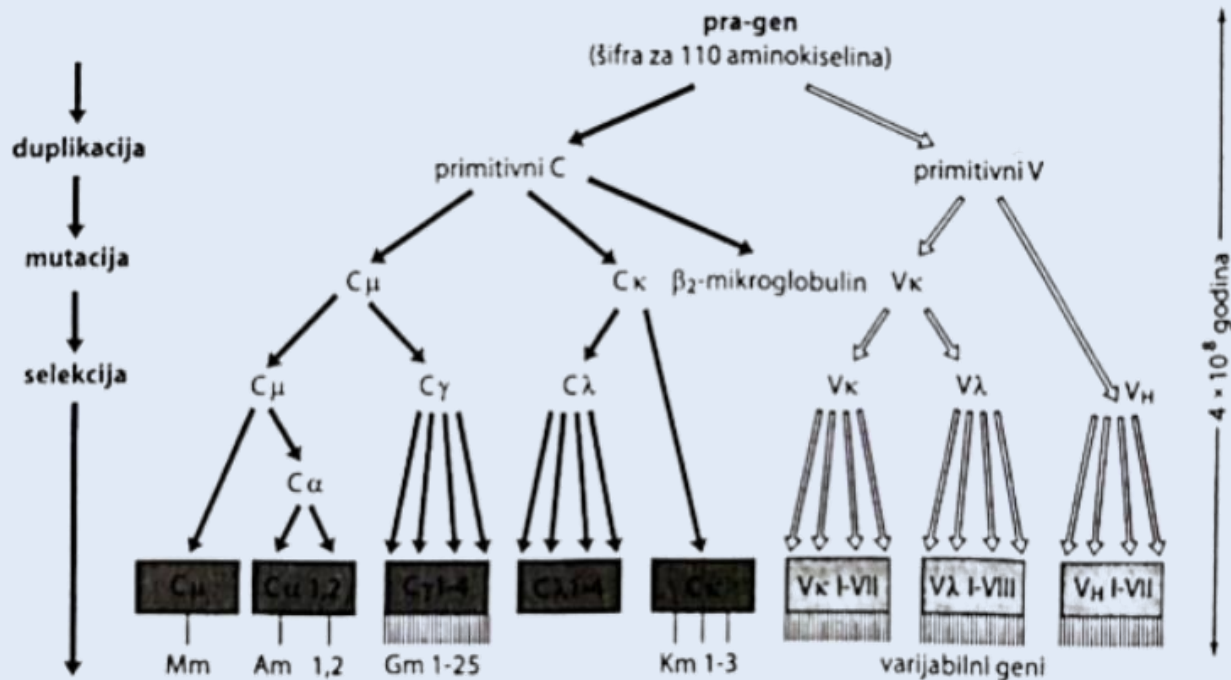
Mehanizmi evolucije

- Selekcija - očuvanje korisnih varijanti



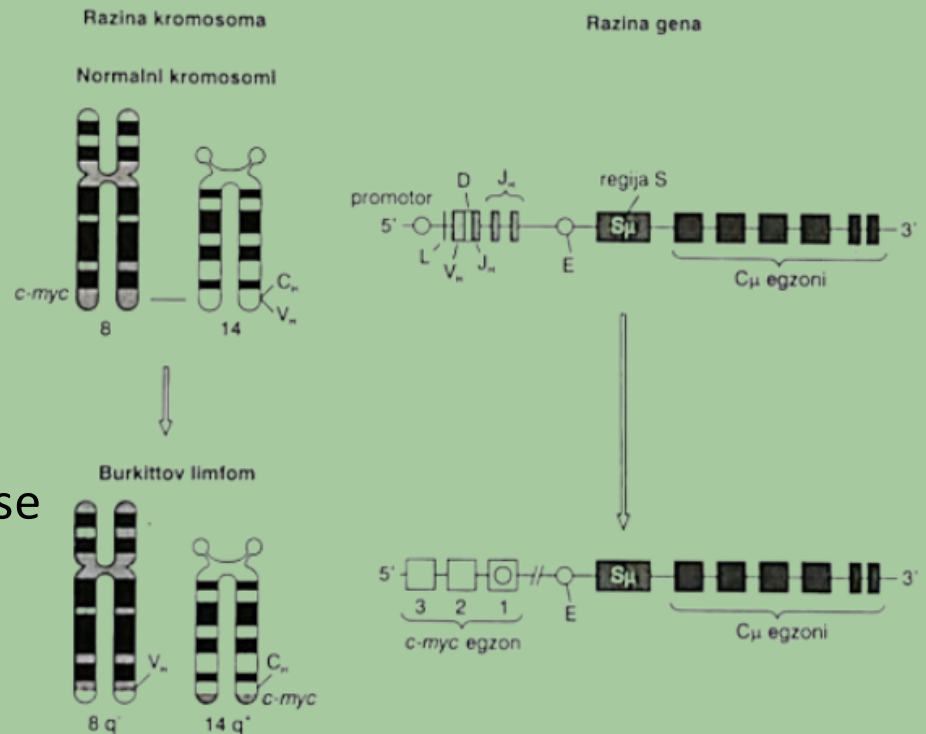
Evolucijsko granjanje gena

- Pragen se duplicirao → nastali V (varijabilni) i C (konstantni) geni
- Iz gena C → različiti teški i laki lanci (μ , γ , α , κ)
- Iz gena V → varijabilni segmenti: V_{κ} , V_{λ} , V_H



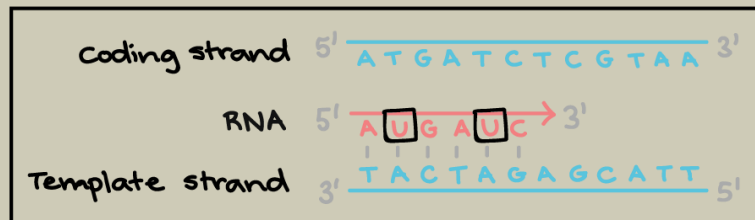
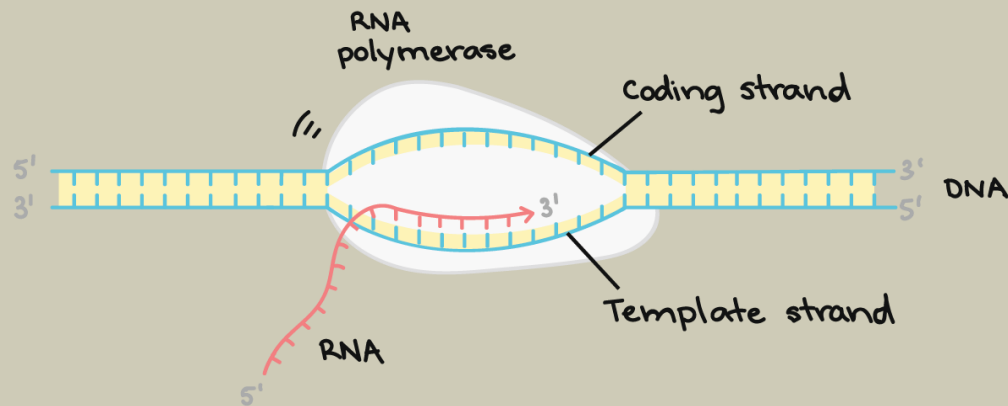
Pogreške preslagivanja gena

- Translokacija između 8. i 14. kromosoma
- 8. kromosom: onkogen *c-myc* → regulira diobu i rast stanica
- 14. kromosom: gen za teški lanac imunoglobulina (IgH)
- Pogrešno preslagivanje → *c-myc* se premješta uz pojačivače imunoglobulinskog gena



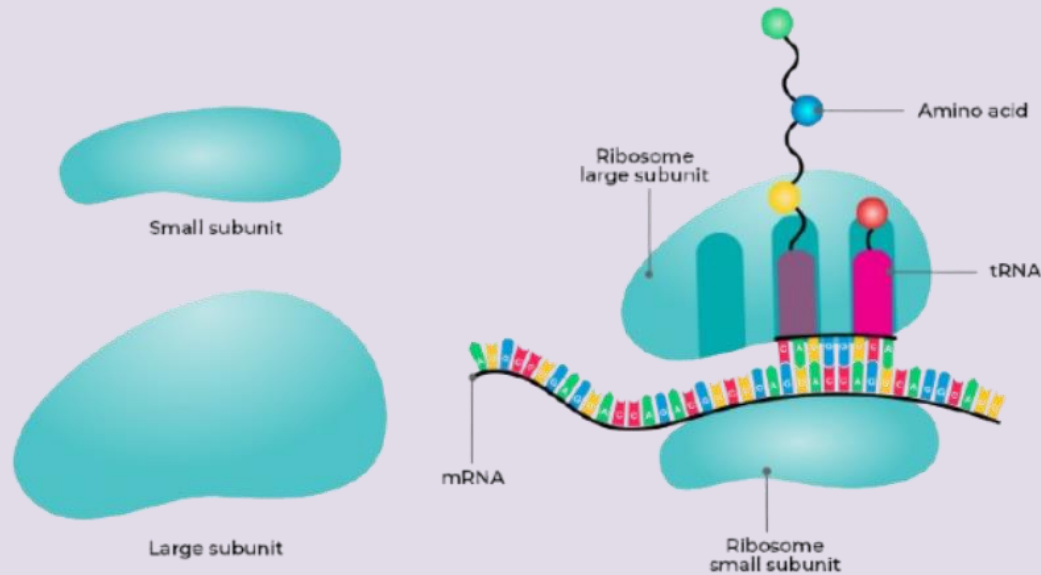
Sinteza lanaca

- Transkripcija: RNA-polimeraza prepisuje DNA u mRNA (za teški i laki lanac)
- *Splicing*: uklanjanje introna i spajanje egzona
- Dodavanje poli(A) repa – stabilizira mRNA i omogućuje izlazak iz jezgre
- mRNA prenosi informaciju do ribosoma u citoplazmi



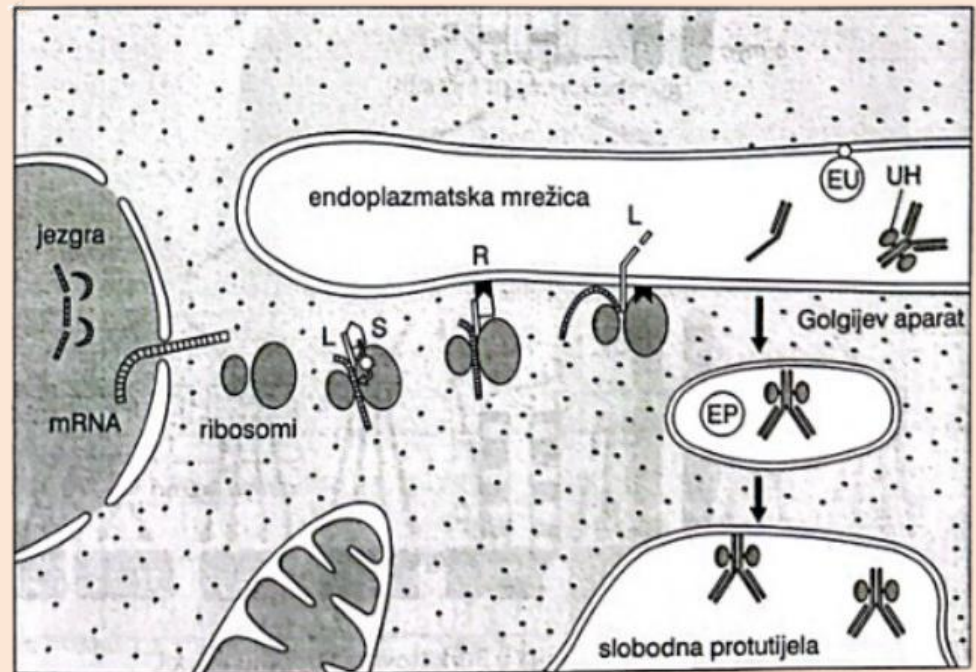
Translacija

- Translacija: stvaranje polipeptidnog lanca prema mRNA
- Odvija se na hrapavom endoplazmatskom retikulumu (ER)
- Laki i teški lanci se prevode neovisno



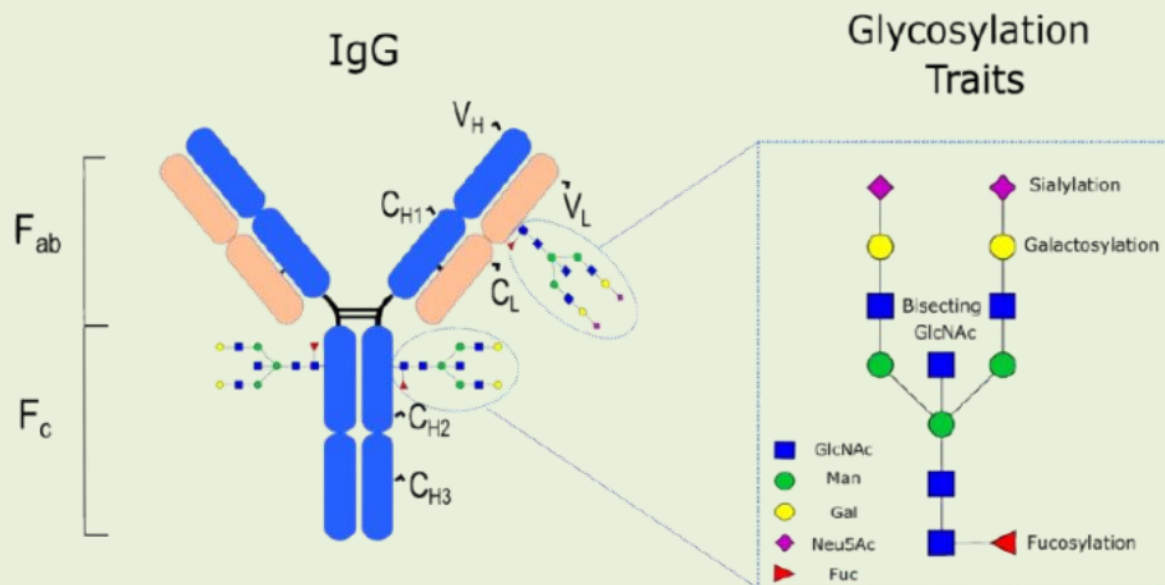
Usmjeravanje i spajanje lanaca

- Početak sinteze: signalni peptid vodi ribosom do ER membrane
- Polipeptidi ulaze u lumen ER
- Formiraju se disulfidne veze između lanaca
- Nastaje stabilna struktura: 2 teška + 2 laka lanca
- Uključuje kontrolu pravilnog savijanja i sastavljanja



Glikolizacija i sekrecija

- Dodatak ugljikohidratnih lanaca
- Osiguravaju stabilnost i funkcionalnost protutijela
- Molekule se pakiraju u sekrecijska zrnca
- Izlučuju se egzocitozom → protutijela ulaze u cirkulaciju



Kontrola

- Kontrolni mehanizmi sprječavaju izlučivanje pogrešno sastavljenih molekula
- Samo ispravna, funkcionalna protutijela napuštaju stanicu