

Praktikum 2

Imunoglobuliny – struktura a funkce; protilátky

Imunizace a získávání antisér

Monoklonální protilátky

Tomáš Freiburger

Ústav klinické imunologie a alergologie

FN u sv. Anny v Brně

NOBELOVY CENY ZA IMUNOLOGII

1901 - E.A. Von Behring (*Germany*) for the work on serum therapy especially its application against diphtheria.

1905 - R. Koch (*Germany*) for the investigations concerning tuberculosis.

1908 - E. Metchnikoff (*Russia*) and P. Ehrlich (*Germany*) for their work on immunity (respectively, phagocytosis/cellular theory and humoral theory).

1913 - C.R. Richet (*France*) for the work on anaphylaxis.

1919 - J. Bordet (*Belgium*) for the discovery of complement.

1930 - K. Landsteiner (*Austria/USA*) for the discovery of blood groups.

1951 - M. Theiler (*South Africa*) for the discovery of the virus of yellow fever.

1957 - D. Bovet (*Italy/Switzerland*) for the discovery of the action of histamine and other substances on the vascular system and the skeleton muscles.

1960 - Sir F.McFarlane Burnet (*Australia*) and Sir P.B. Medawar (*Great Britain*) for the discovery of acquired immunological tolerance.

1972 - G.M. Edelman (*USA*) and R.R. Porter (*Great Britain*) for their discovery concerning the chemical structure of antibodies.

1977 - R. Yalow (*USA*) for the development of radioimmunoassays of peptide hormones.

1980 - B. Benacerraf (*USA*), J. Dausset (*France*) and G.D. Snell (*USA*) for their discoveries concerning genetically determined structures on the cell surface (major histocompatibility complex) that regulate immunological reactions.

1982 - S. K. Bergstrom (*Sweden*), B. I. Samuelsson (*Sweden*) and J. R. Vane (*UK*) for their discoveries concerning prostaglandins and related biologically active substances.

1984 - N.K. Jerne (*Denmark/Switzerland*) for theories concerning the specificity in development (lymphocyte clonality) and control of the immune system; + G.J.F. Köhler (*Germany/Switzerland*) and C. Milstein (*Argentina/Great Britain*) for the discovery of the principle for production of monoclonal antibodies.

1987 - S. Tonegawa (*Japan/USA*) for the discovery of the genetic principle for generation of antibody diversity.

1990 - J.E. Murray and E.D. Thomas (*USA*) for their discovery concerning organ and cell transplantation in the treatment of human diseases.

1996 - P.C. Doherty (*Australia/USA*) and R.M. Zinkernagel (*Switzerland*) for their discoveries concerning the specificity of the cell mediated immune defense ("dual recognition").

1997 - S.B. Prusiner (*USA*) for the discovery of prions as a new biological principle of infection.

1999 - G. Blobel (*USA*) for discoveries concerning signal transduction.

2011 – J. Hoffmann, B. Beutler – mechanisms of innate immunity; R. Steinman – discovery of dendritic cells

IMUNOGLOBULINY

- Struktura
- Třídy, podtřídy
- Vazba s antigenem, afinita, avidita
- Antiidiotypová síť
- Tvorba imunoglobulinů, protilátková odpověď
- Biologické funkce protilátek
- Polyklonální a monoklonální protilátky

IMUNOGLOBULIN = PROTI LÁTKA

- strukturálně příbuzné glykoproteiny produkované B lymfocyty
- vázané na membránu B lymfocytu – receptory zprostředkující aktivaci B lymfocytu
- sekretované (rozpustné) – mediátory specifické humorální imunity

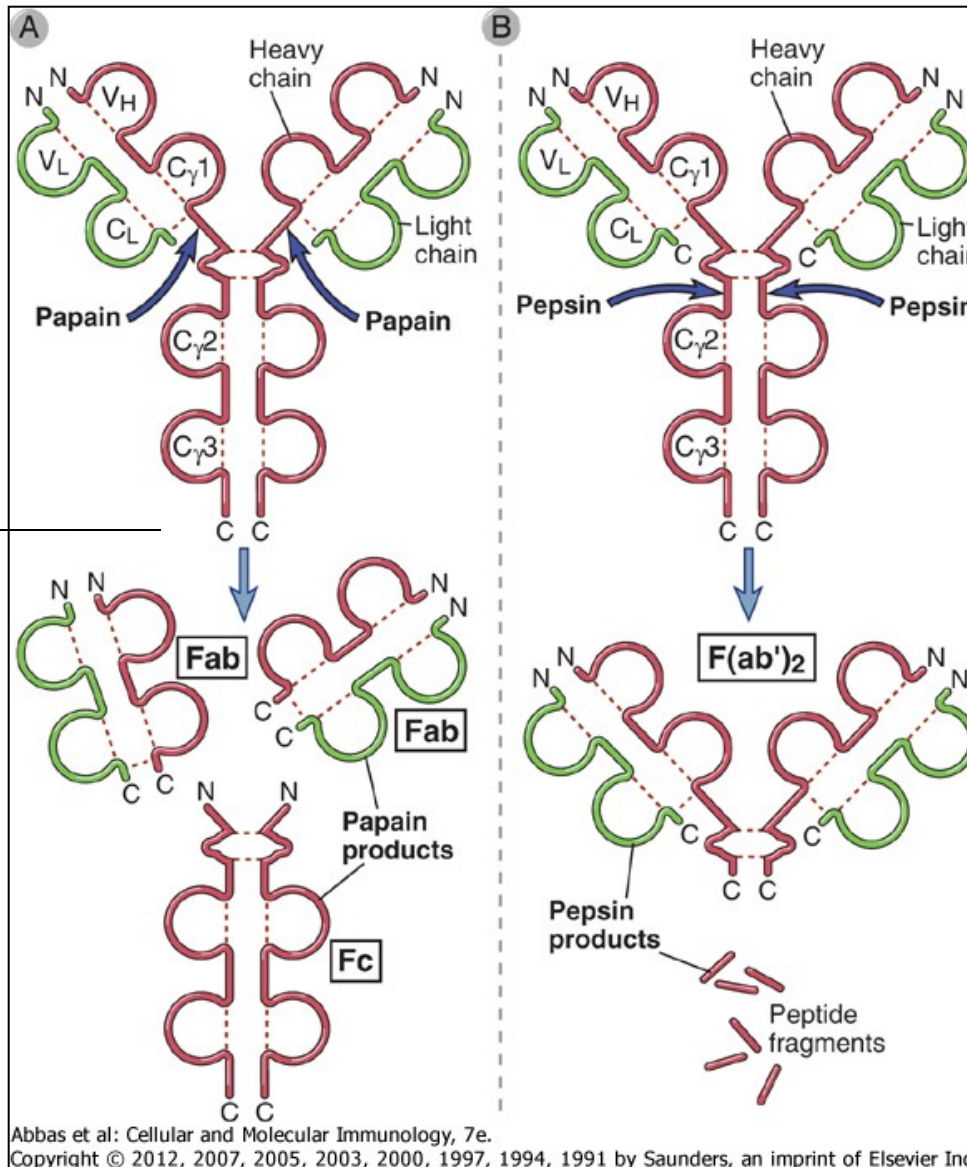
Struktura molekuly protilátky

- 2 identické těžké řetězce (H) a 2 identické lehké řetězce (L) spojené disulfidickými můstky
- strukturně podobné domény (110-120 AK): 2 u lehkých řetězců, 4-5 domén u těžkých řetězců
- lehký i těžký řetězec
 - **variabilní oblast** (VH a VL); N-konec
 - každá oblast obsahuje 3 hypervariabilní úseky (6-10 AK)
 - **vazba antigenu**
 - **konstantní oblast** (CL, CH1-CH3/CH4); C-konec
 - CL - izotyp kappa, lambda
 - CH - izotyp (třída) protilátky (IgG, M, A, E, D), podtřídy
 - membránově vázaná nebo sekretovaná forma
 - **biologické (efektorové) funkce** protilátky
- flexibilita vazebné části – pantová oblast mezi CH1 a CH2

Struktura molekuly protilátky

amino-
konec

karboxy-
konec



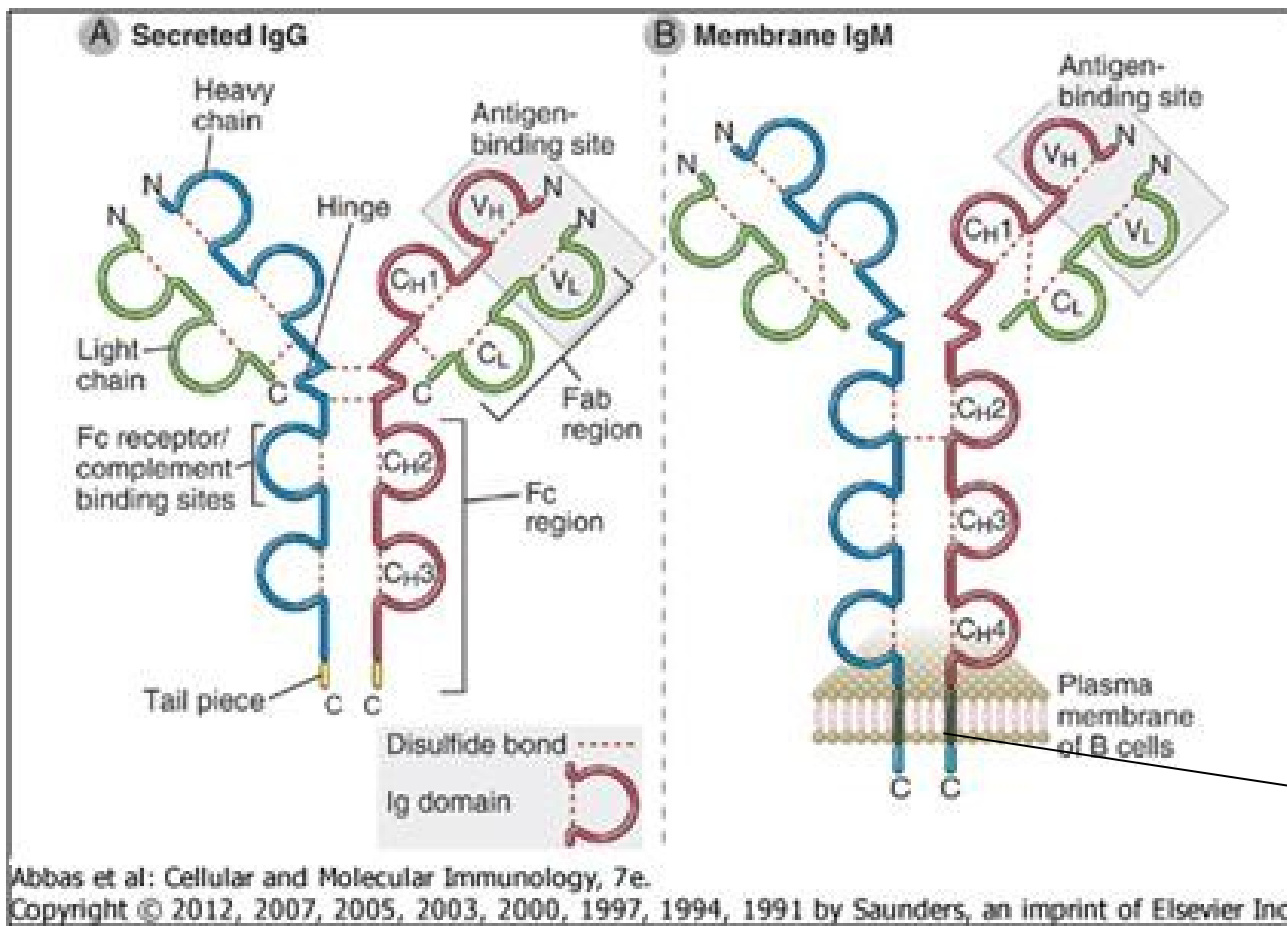
vazba
antigenu

efektorová
část

proteolýza
papainem:
2x Fab (antigen
binding)
+ 1x Fc (constant)
fragment

Abbas et al: Cellular and Molecular Immunology, 7e.
 Copyright © 2012, 2007, 2005, 2003, 2000, 1997, 1994, 1991 by Saunders, an imprint of Elsevier Inc.

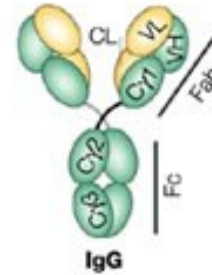
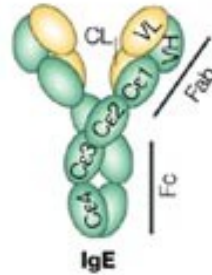
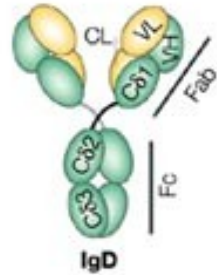
Schematické zobrazení sekretované a povrchově vázané molekuly protilátky



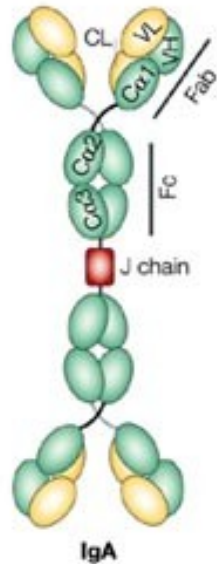
Třídy a podtřídy imunoglobulinů

Izotyp	Podtřídy	Koncentrace v séru	Biol. poločas	Funkce
IgM	-	0,9-2,5 g/l	6 d	Receptor pro antigen (naivní B lymfocyty); primární odpověď; aktivace komplementu
IgD	-	Stopa	3 d	Receptor pro antigen (naivní B lymfocyty)
IgG	IgG1-4	8-18 g/l (převaha IgG1)	21 d	Sekundární odpověď; neonatální imunita; aktivace komplementu; opsonizace; neutralizace
IgA	IgA1,2	0,9-3,5 g/l	6 d	Slizniční imunita; opsonizace
IgE	-	0,0003 g/l	2 d	Obrana proti parazitům; reakce časně přecitlivělosti

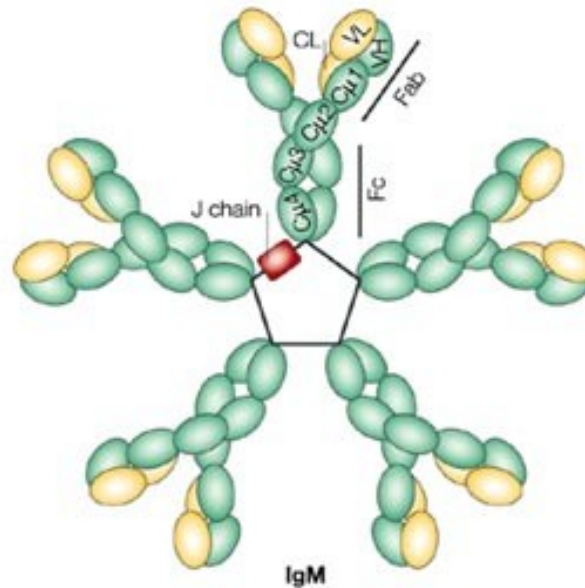
Třídy imunoglobulinů, formy výskytu



IgG, IgE, IgD
monomery



IgA dimer
(monomer,
trimer)



IgM pentamer
(hexamer)

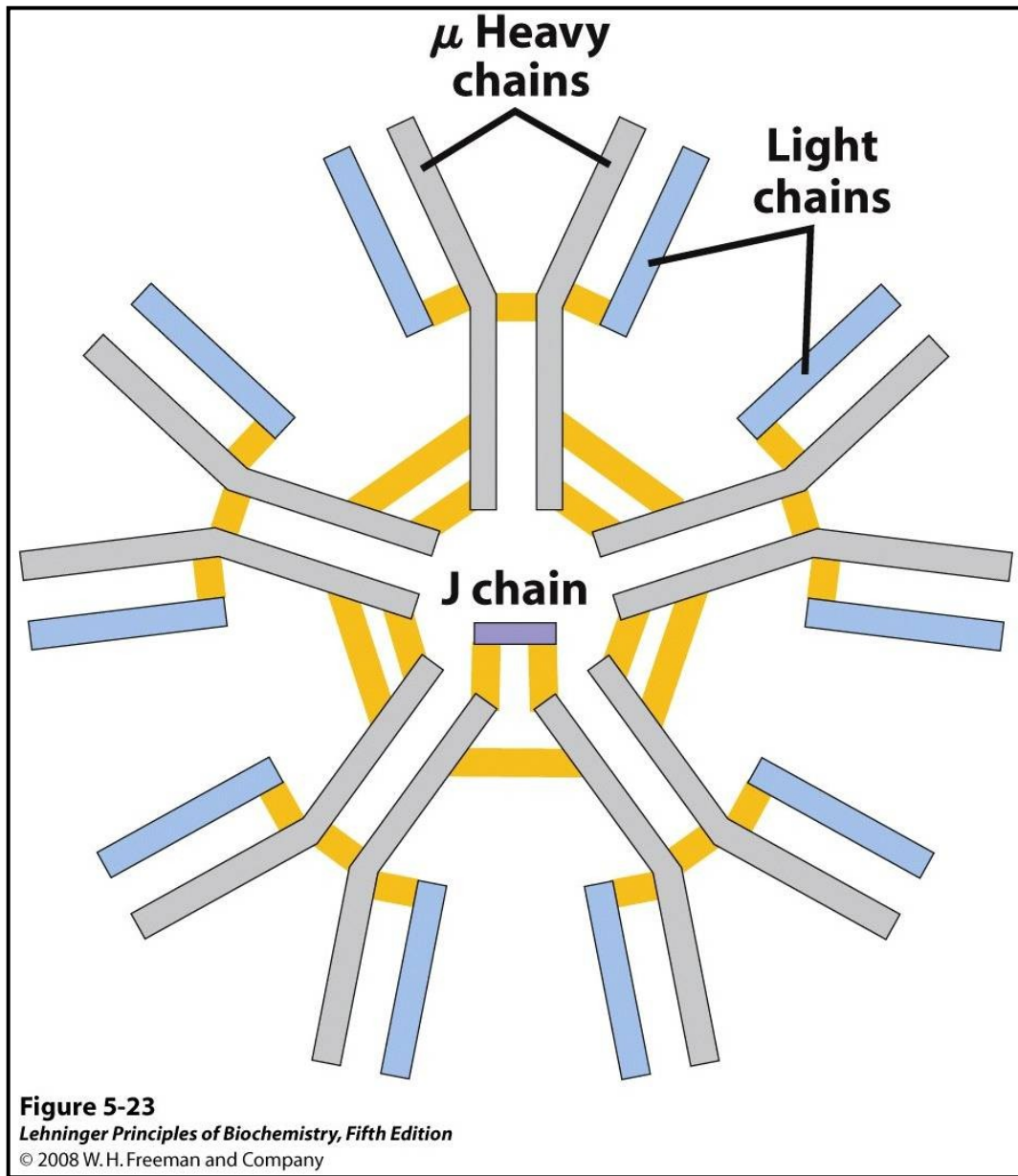
Nature Reviews | Molecular Cell Biology

Oligomery jsou spojeny J řetězcem.
Membránové formy vždy jako monomer.

IgM

- vázaný na membránu ve formě monomeru – receptor na B lymfocytech – po navázání antigenu zprostředkuje aktivaci B lymfocytů, důležitý pro **vývoj B lymfocytů**
- rozpustný ve formě pentameru (hexameru) – 10 (12) vazebných míst
- zajišťuje **primární imunitní odpověď**
- **účinná aktivace komplementu**

IgM sekretovaná forma



IgG1-4

- nejhojnější protilátka v séru, intersticiální tekutině
- největší zastoupení má podtřída IgG1
- výskyt ve formě monomeru
- nejdelší poločas (21 d)
- přestup přes placentu

- klíčová úloha v sekundární imunitní odpovědi
- aktivace komplementu, opsonizace, neutralizace

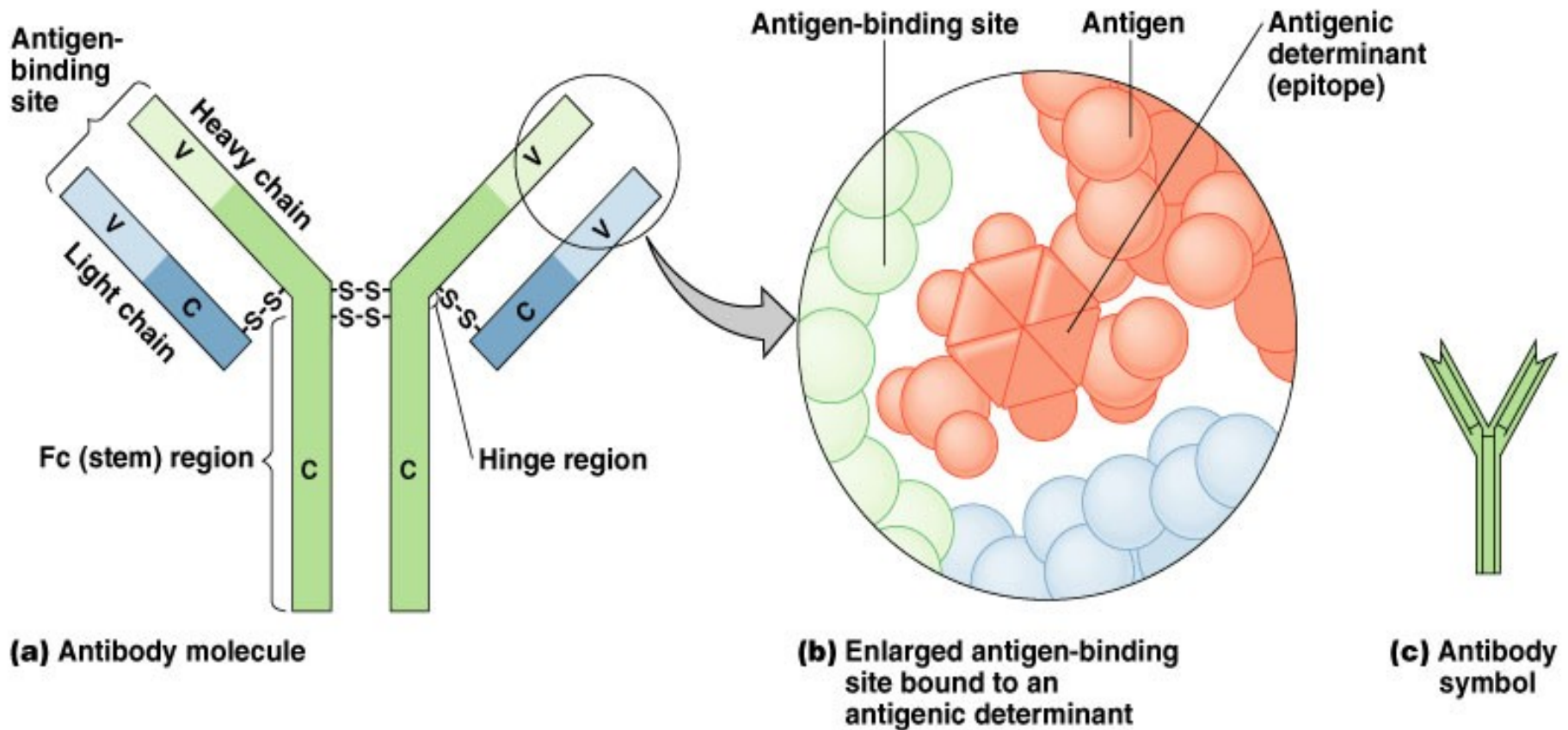
IgA1,2

- slizniční forma (dimer) – významná úloha ve **slizniční imunitě** (neutralizace, opsonizace; neaktivuje C)
 - produkován plazmatickými buňkami a B lymfocyty v submukóze
 - transportován na slizniční povrch pomocí transportního Fc receptoru (poly-Ig-receptor)
 - transport přes epitel transcytózou: endocytóza – přeprava v transportním váčku – fúze s luminální membránou – odštěpení z receptoru proteolýzou
 - část poly-Ig-receptoru zůstává po uvolnění na slizniční povrch součástí dimeru IgA = sekreční komponenta – zajišťuje rezistenci vůči proteázám
- sérová forma (monomer, dimer, trimer) – opsonizace

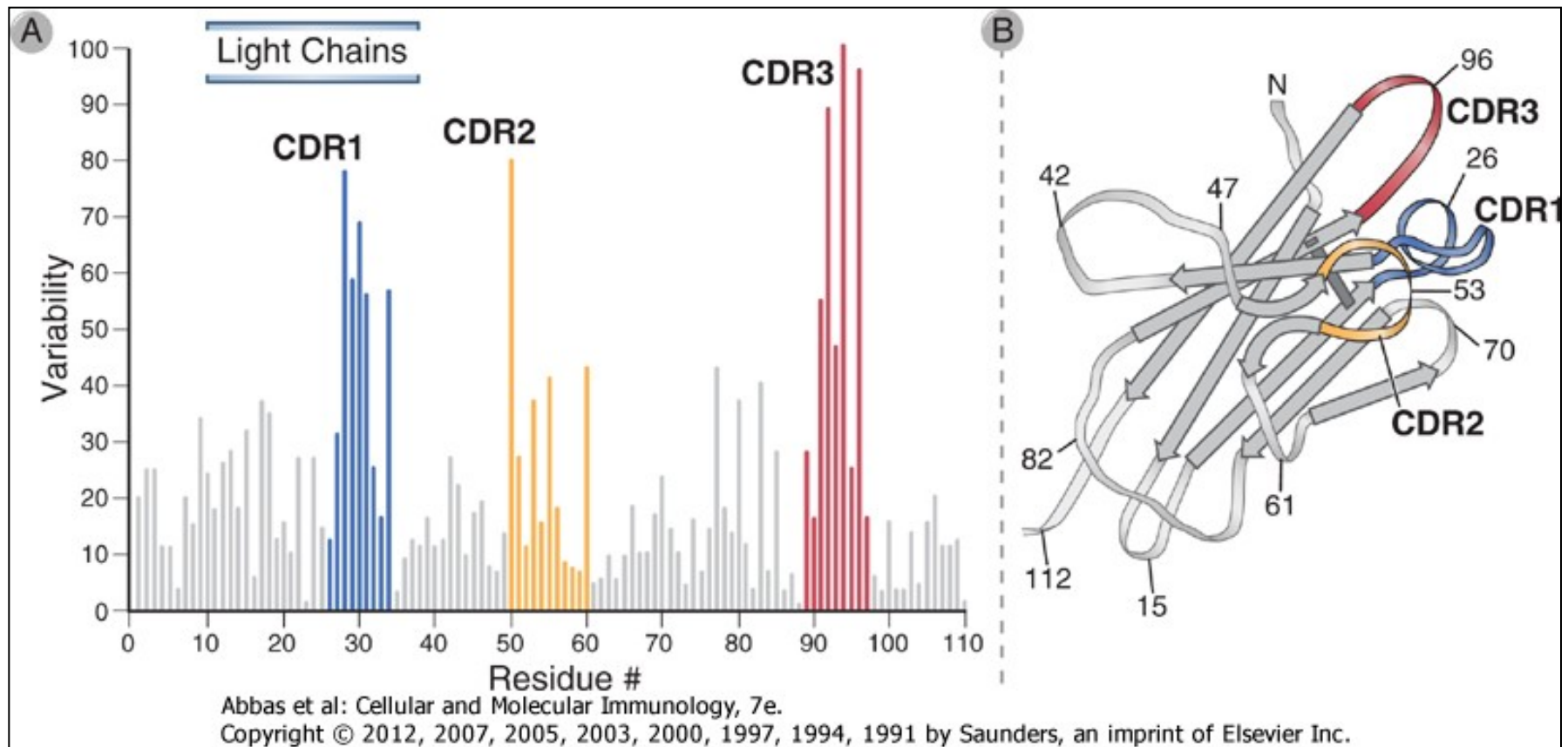
Vazba antigenu a protilátky

- nekovalentní komplexy (iontové, hydrofobní, van der Waalsovy síly, vodíkové můstky)
- vazba je reverzibilní
- vysoká diversita protilátek: $> 10^{11}$ různých vazebných míst
- komplementarita vazebného místa protilátky s epitopem antigenu
 - hypervariabilní oblasti VL a VH (CDR1-3 – complementarity determining regions)
 - jedinečnost vazebného místa dána procesem VDJ (VJ) rekombinace a somatickými hypermutacemi
- přístupnost epitopů v závislosti na konformaci antigenu

Variabilní oblast Ig molekuly váže antigenní epitop



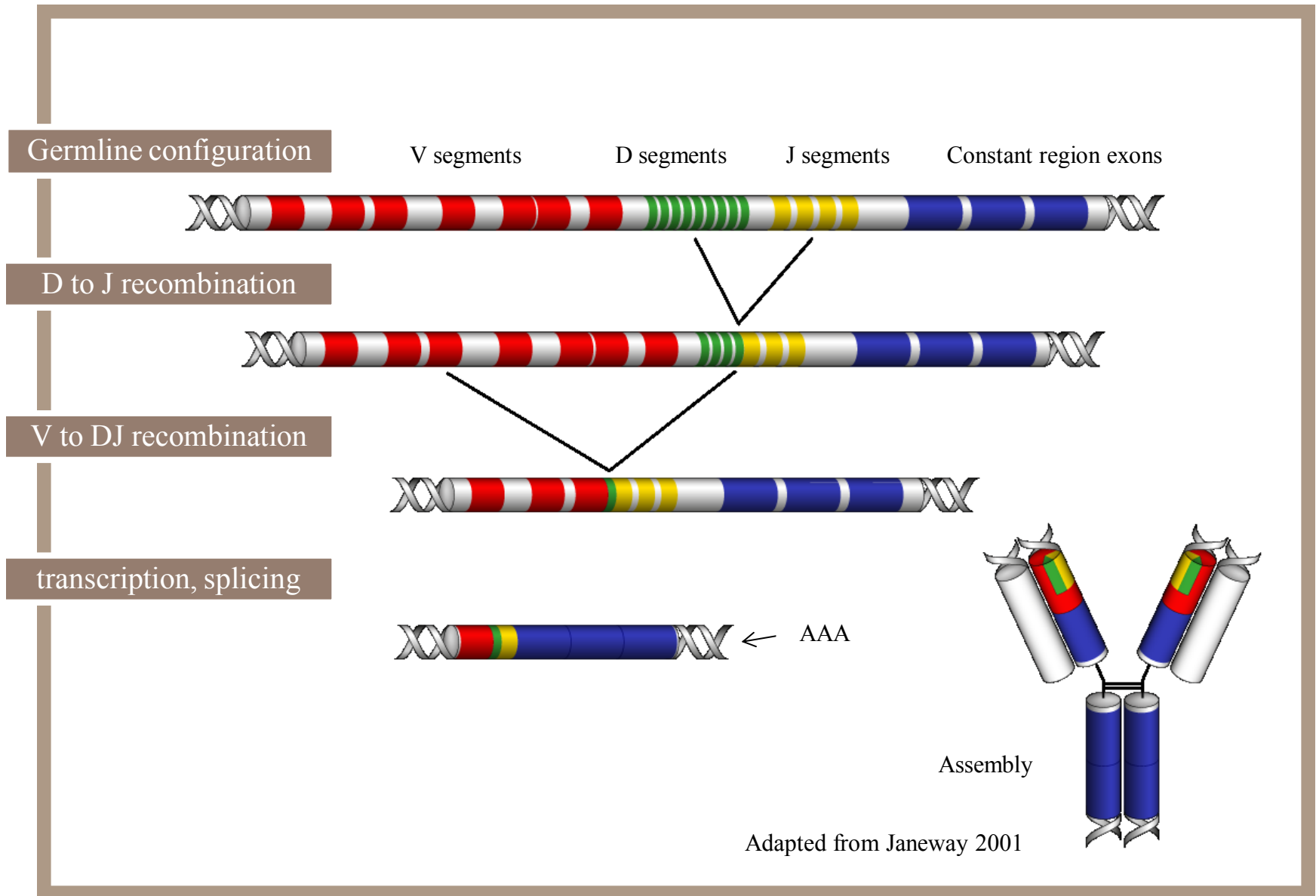
Variabilní oblast imunoglobulinové molekuly



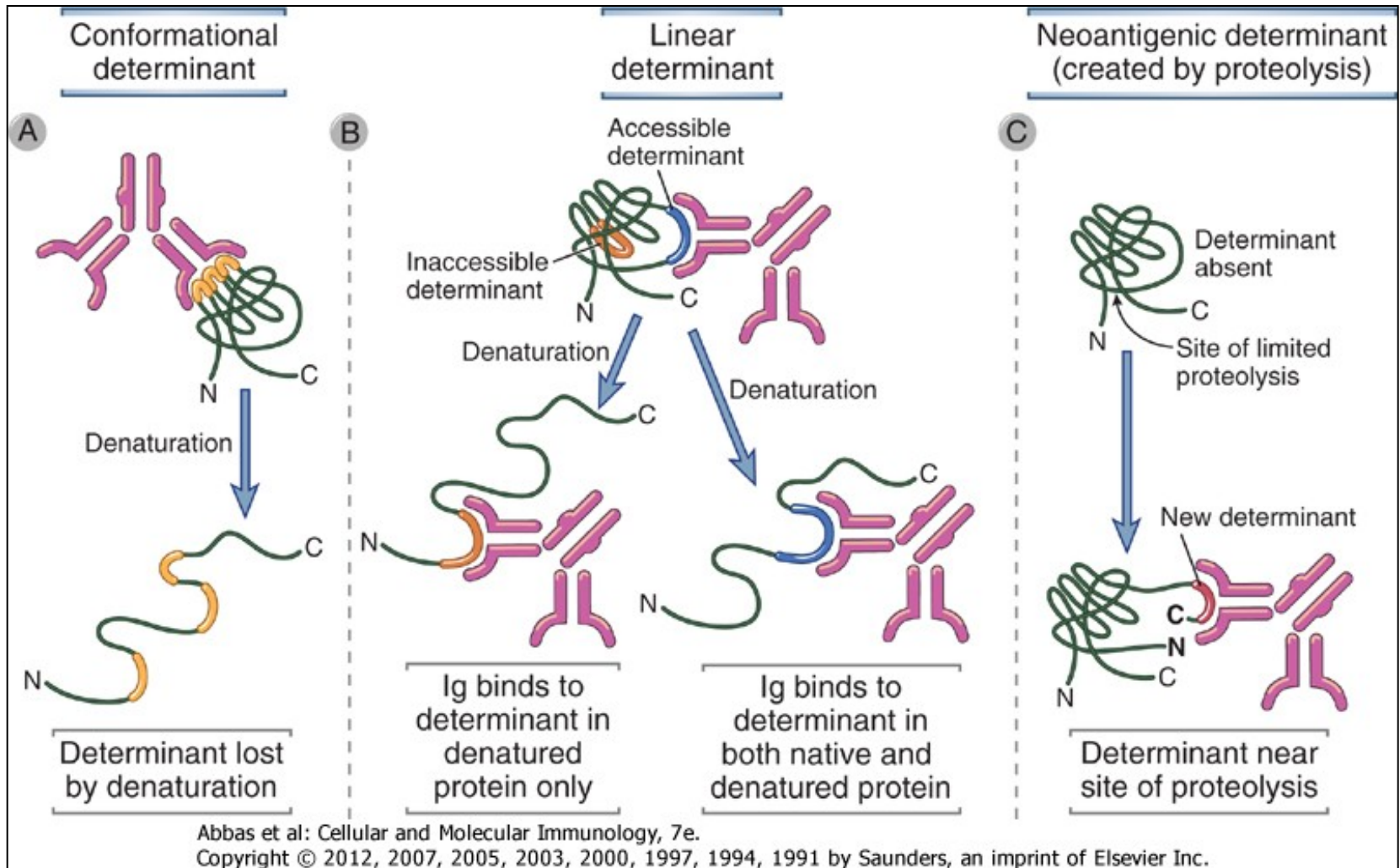
Abbas et al: Cellular and Molecular Immunology, 7e.

Copyright © 2012, 2007, 2005, 2003, 2000, 1997, 1994, 1991 by Saunders, an imprint of Elsevier Inc.

VDJ rekombinace při vzniku variabilního místa

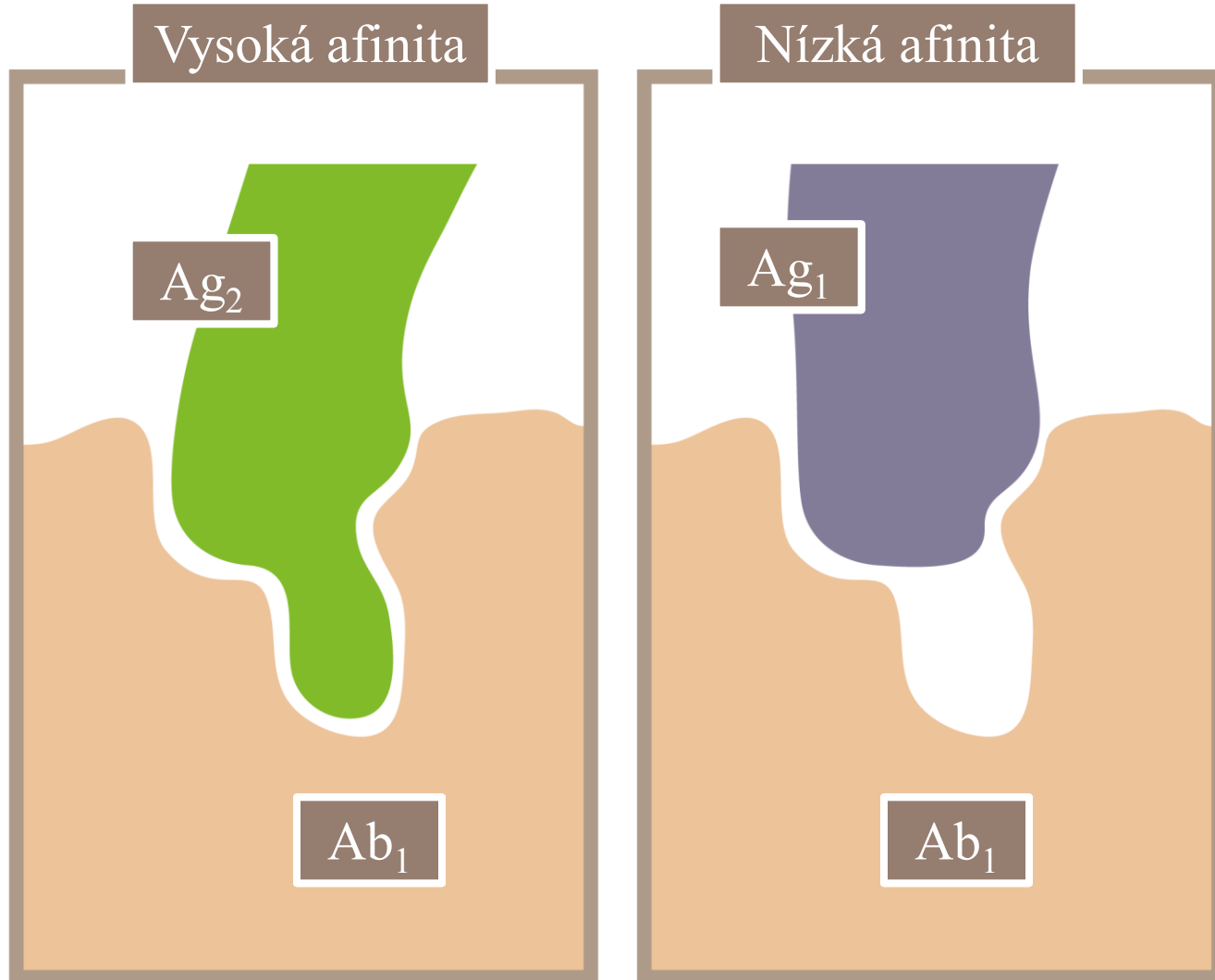


Vliv konformace antigenu (přístupnosti epitopu) na vazbu s protilátkou



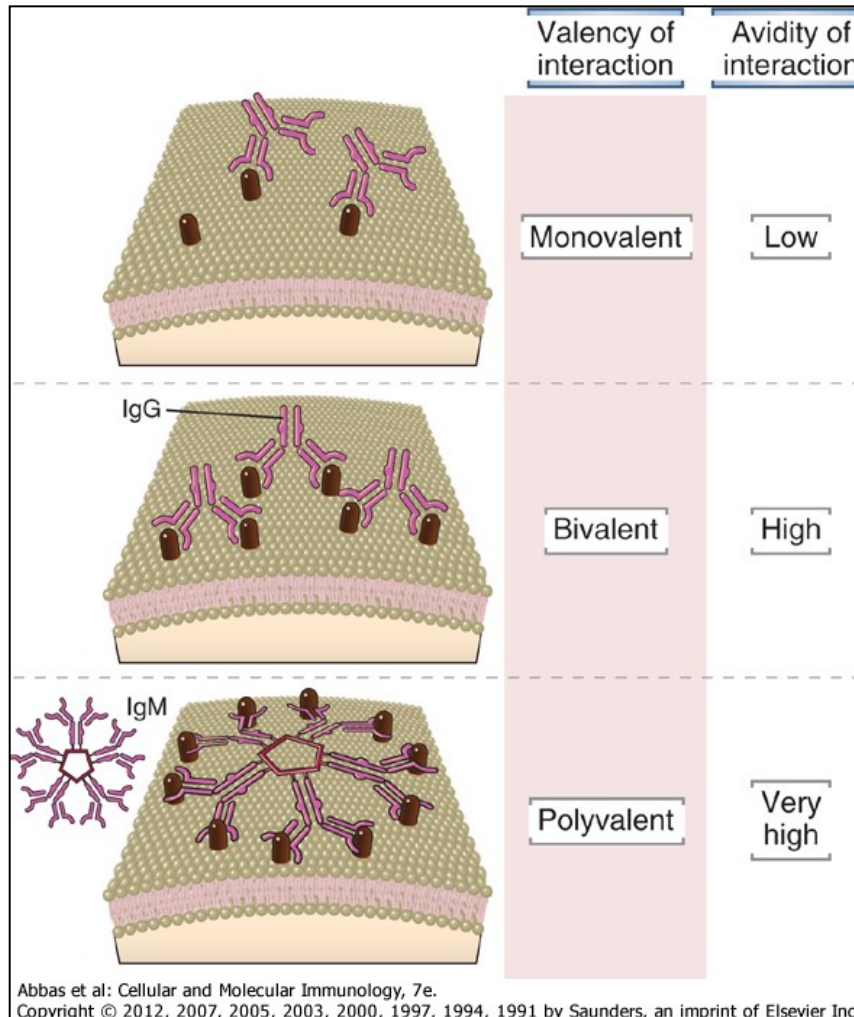
Afinita protilátek

- vyjadřuje sílu interakce mezi 1 epitopem daného antigenu a vazebným místem protilátky



Avidita protilátek

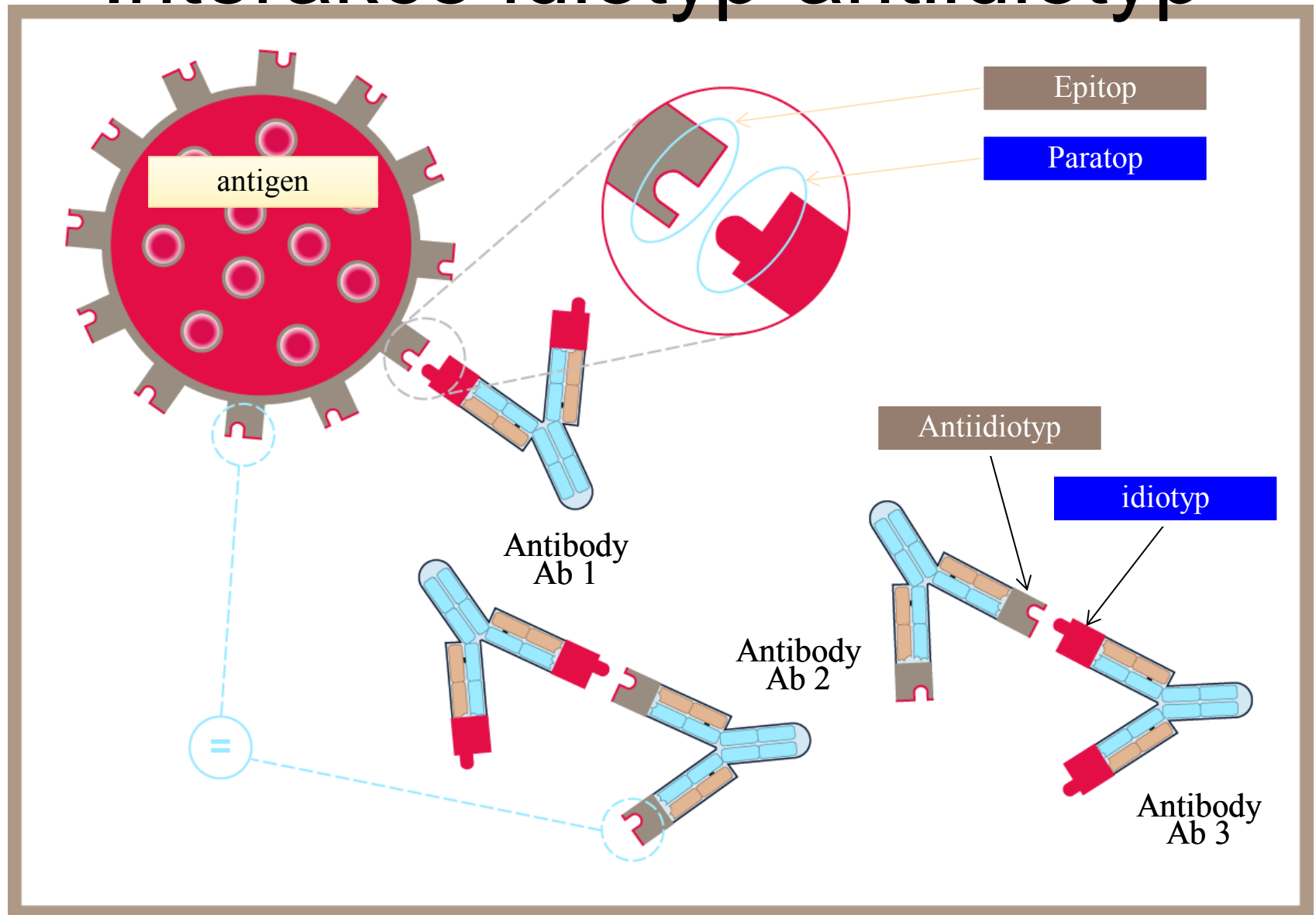
- vyjadřuje sílu interakce polyvalentní protilátky s polyvalentním antigenem (obsahuje více identických epitopů)



Antiidiotypová síť

- **idiotop** – specifická část molekuly imunoglobulinu zodpovědná za rozpoznání příslušného antigenu (část vazebného místa)
- **idiotyp** – souhrn idiotopů – identické imunoglobulinové molekuly jsou charakterizovány určitým společným idiotypem
- vazebné místo protilátky (idiotyp) vytvořené proti antigenu (protilátka 1. generace) je rozpoznáno jinou protilátkou (protilátka 2. generace, antiidiotypová protilátka)
- **idiotypová (antiidiotypová) síť** následných generací protilátek může mít úlohu **v regulaci imunitní odpovědi**

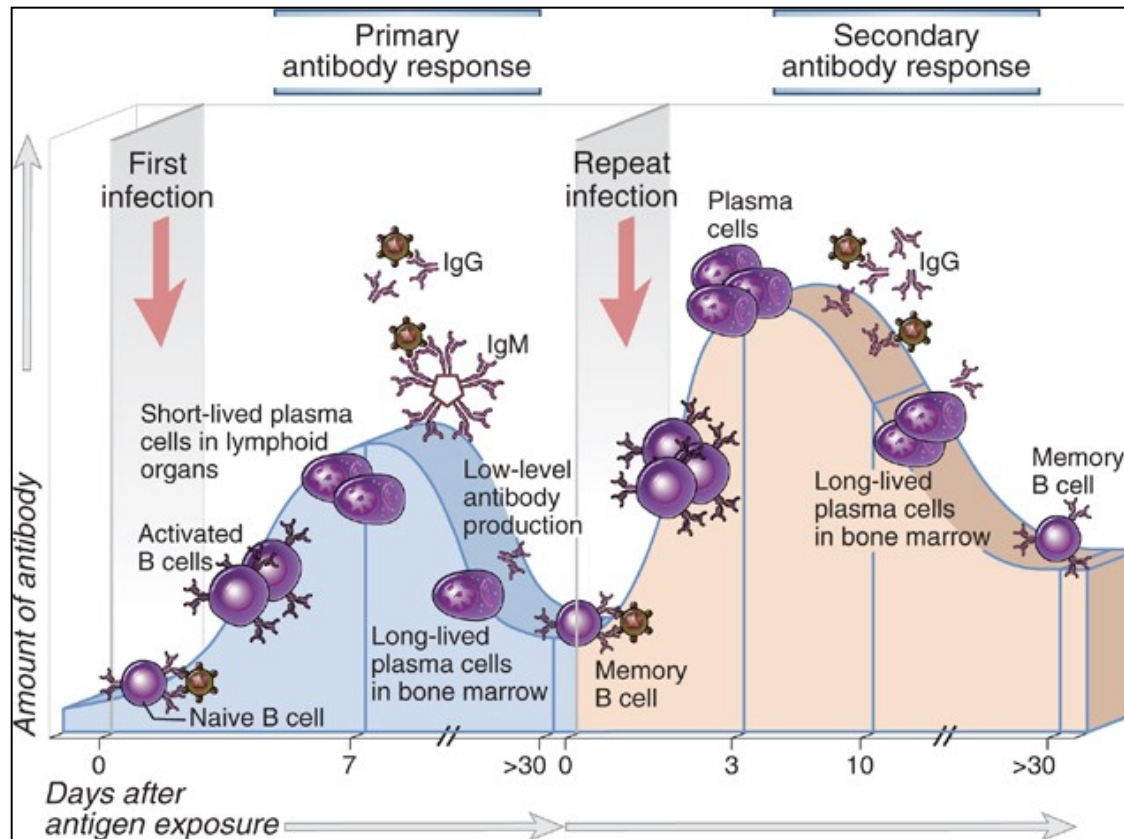
Interakce idiotyp-antiidiotyp



Vývoj B lymfocytů, tvorba protilátek

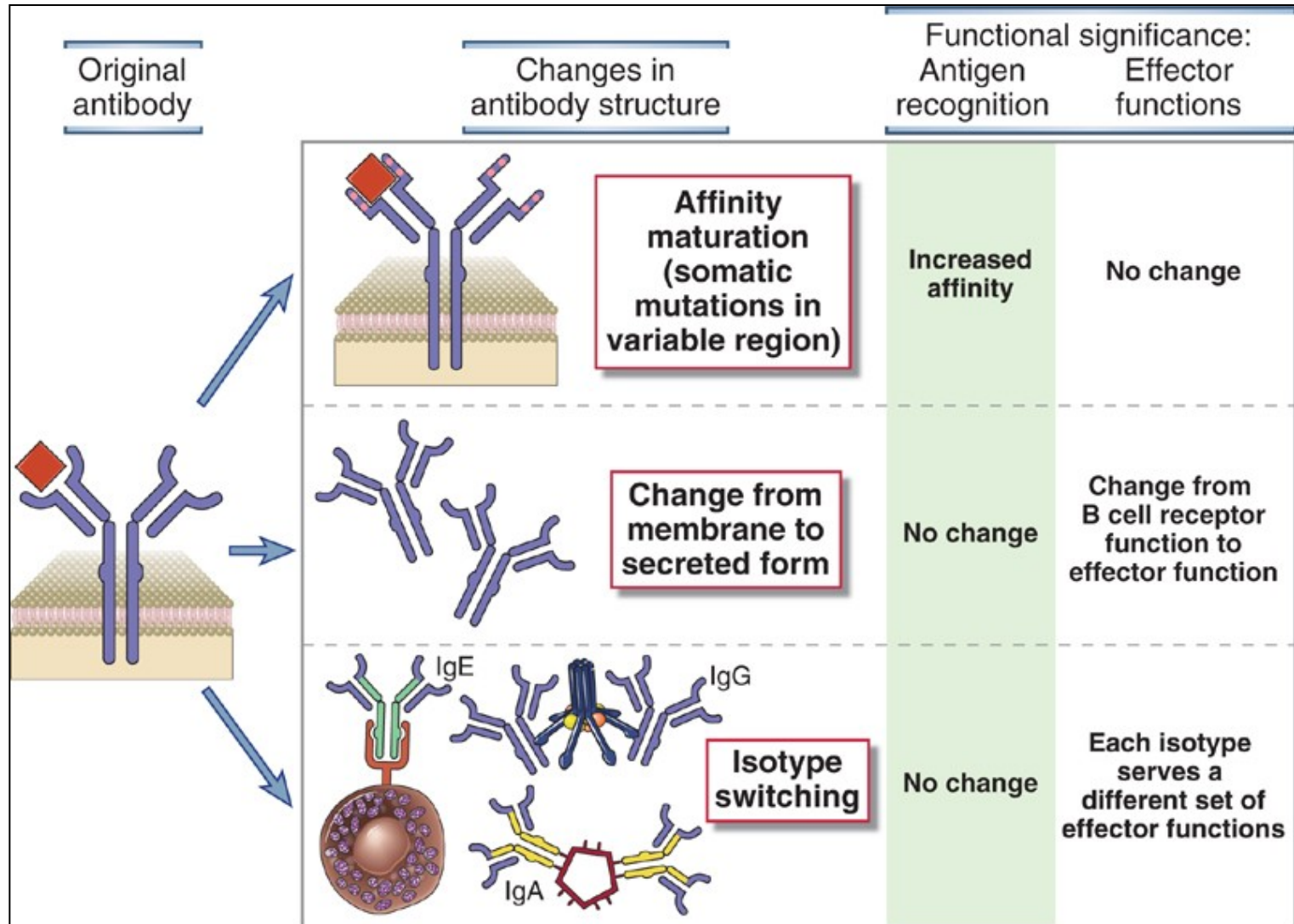
- pre-B lymfocyty: syntéza H řetězce IgM, VDJ rekombinace – pre-B receptor
- nezralé B lymfocyty: syntéza H i L řetězců IgM, VDJ (VJ) rekombinace, B-cell receptor (BCR)
- zralé B lymfocyty: exprese IgM a IgD na povrchu (BCR)
- vazba antigenu na BCR – aktivace a postupná diferenciaci B lymfocytů do plazmatických buněk produkujících protilátky, vznik paměťových B lymfocytů
 - vyžívání afinity – somatické hypermutace
 - izotypový přesmyk
 - převaha sekretované formy

Protilátková imunitní odpověď



Feature	Primary response	Secondary response
Peak response	Smaller	Larger
Antibody isotype	Usually IgM > IgG	Relative increase in IgG and, under certain situations, in IgA or IgE
Antibody affinity	Lower average affinity, more variable	Higher average affinity (affinity maturation)
Induced by	All immunogens	Only protein antigens

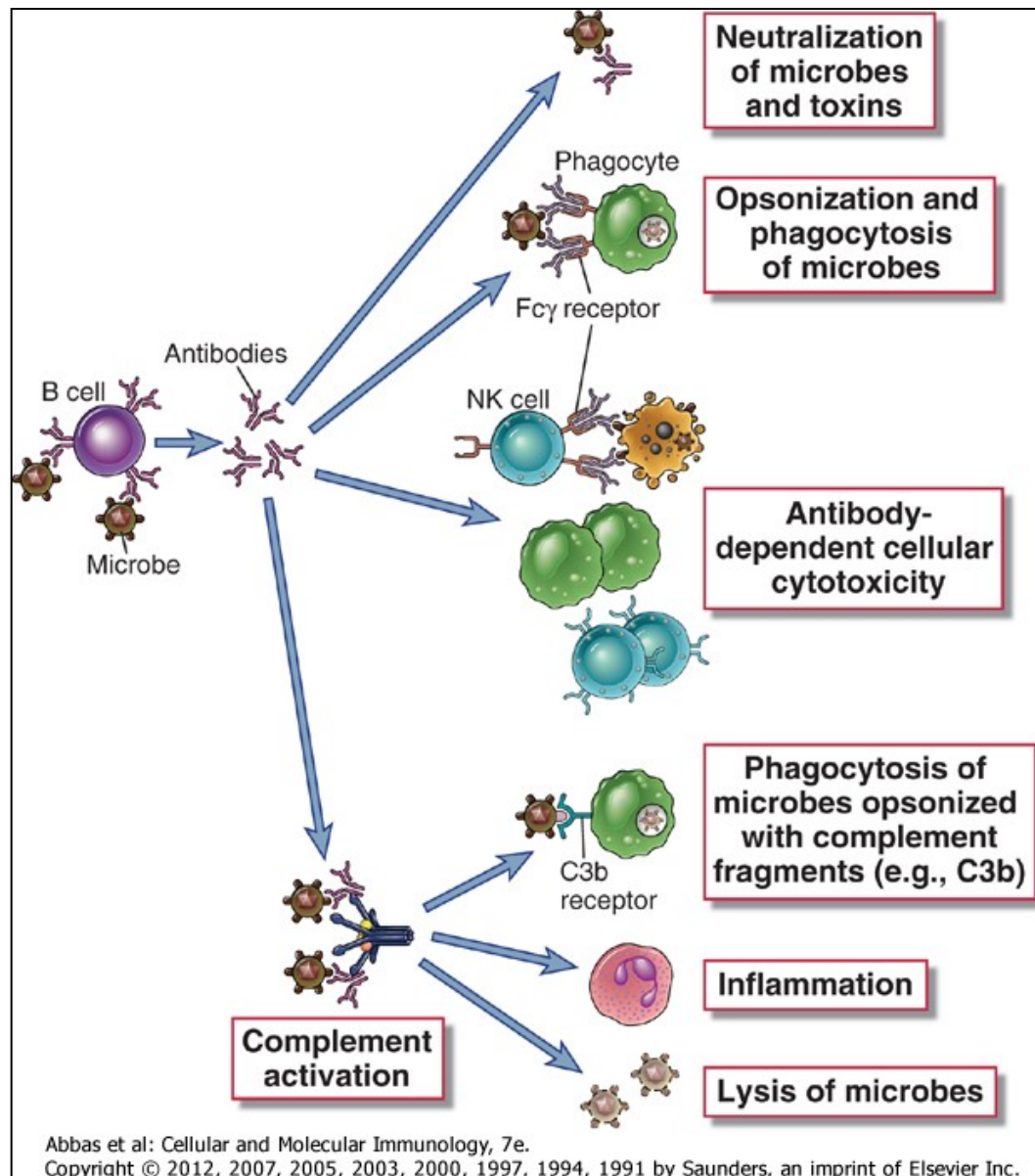
Změna struktury protilátek v průběhu imunitní odpovědi



Biologické funkce imunoglobulinových molekul

- Aktivace komplementového systému (IgG, IgM)
- Opsonizace (zejména IgG, též IgA)
- Neutralizace antigenů (IgG, IgA, IgM)
- Zábřana adherence (IgA, IgG)
- Aglutinace, precipitace (IgG, IgM)
- Degranulace žírných buněk (IgE)
- Přechod placentou (IgG)
- Imunoregulace (zejména IgG)

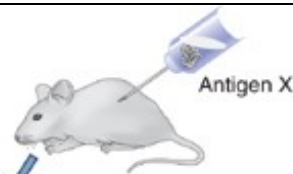
Biologické funkce imunoglobulinových molekul



Polyklonální a monoklonální protilátky

- polyklonální (séra)
 - směs imunoglobulinových molekul s různou specificitou (zpravidla proti různým epitopům 1 antigenu)
 - příprava imunizací zvířat
- monoklonální
 - produkt 1 klonu B lymfocytů s jedinečnou specificitou
 - produkce nádorem z plazmatickým buněk (myelom)
 - příprava hybridomovou technologií

Isolate spleen cells from mouse immunized with antigen X

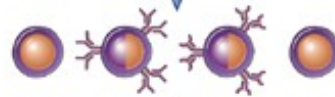


Mixture of spleen cells, including some producing anti-X antibody

Mutant myeloma line; unable to grow in HAT selection medium; does not produce antibody

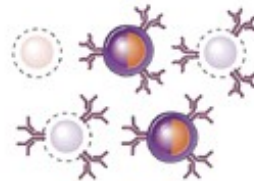
Fusion

Mixture of fused and unfused cells



In vitro selection in HAT medium

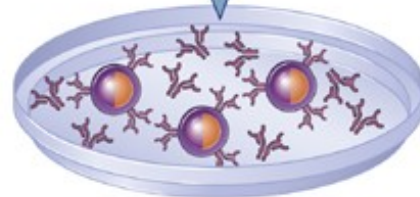
Only fused cells (hybridomas) grow



Isolate clones derived from single cells



Screen supernatants for each clone of anti-X antibody and expand positive clones

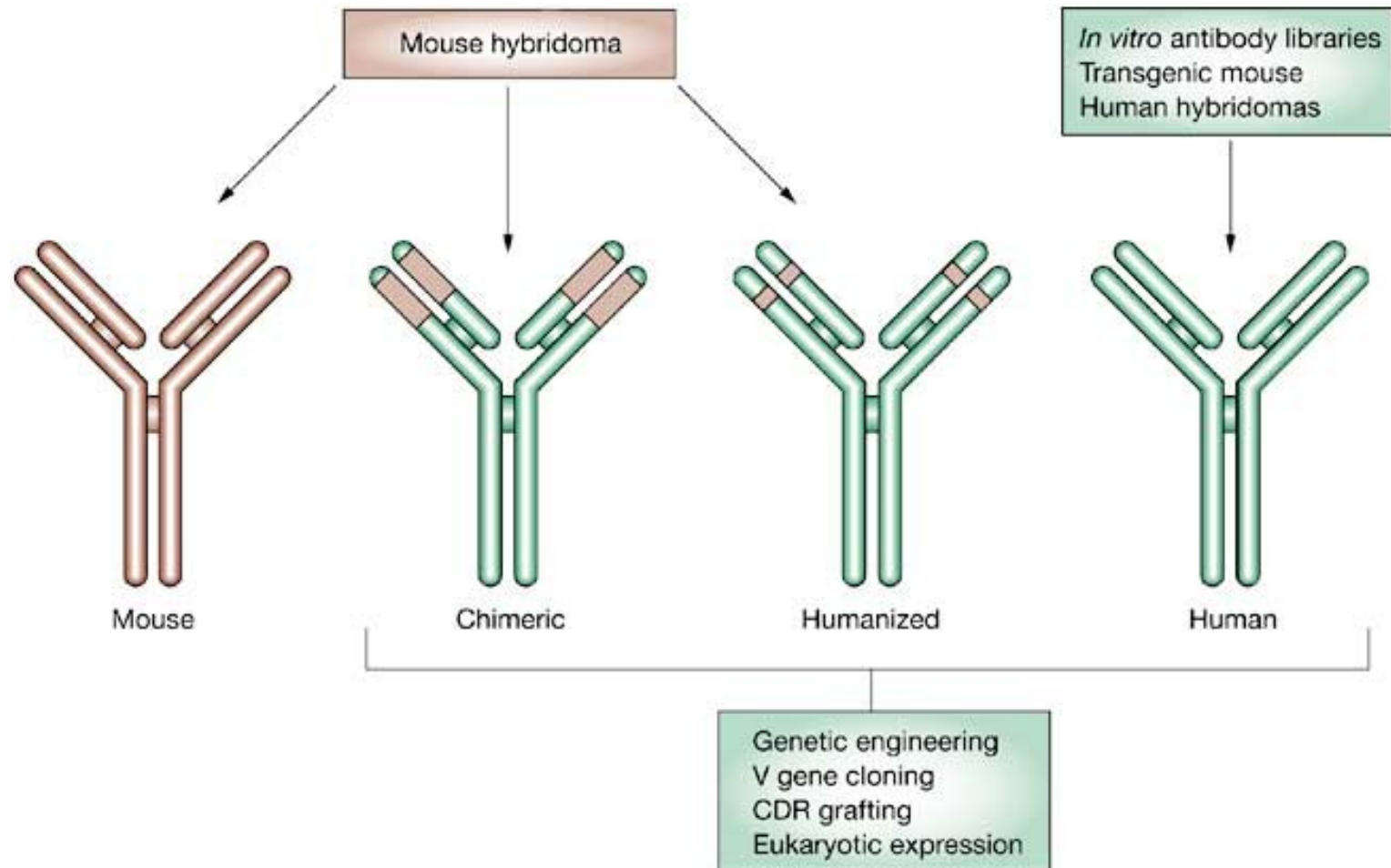


Hybridomas producing monoclonal anti-X antibody

Využití monoklonálních protilátek

- v diagnostice ke klasifikaci lymfocytů a jiných leukocytů (CD markery, průtoková cytometrie)
- v diagnostice infekčních či systémových onemocnění nebo nádorů, pokud jsou známy specifické antigeny (protilátky) vyskytující se u těchto onemocnění (bez ohledu na příčinnou souvislost; imunoanalýzy, průtoková cytometrie)
- **v terapii**, k zacílení buněk a molekul důležitých v patogenezi nemocí
- ve výzkumu

Typy monoklonálních protilátek používaných k terapii



Hohlfeld R *et al.* (2005) Drug Insight: using monoclonal antibodies to treat multiple sclerosis; *Nat Clin Pract Neurol* 1 34-44 [doi: 10.1038/ncpneuro0016]

nature
CLINICAL
PRACTICE

NEUROLOGY

Příklady klinického využití monoklonálních protilátek v léčbě imunopatologických chorob

- **Imunosuprese:** anti-CD3 (OKT3),
 - anti CD25 (basiliximab, daclizumab),
 - anti CD20 (rituximab)
- **Blokáda prozánětlivých cytokinů:**
 - anti –TNF- α (infliximab, adalimumab) – revmatoidní aritida, Crohnova choroba,
- **Blokáda adhezivních molekul:**
 - anti integrin α 4 β 1 (natalizumab) – roztroušená mozkomíšní skleróza
 - Anti-CD11a (efalizumab) - psoriáza
- **Protialergická léčba:**
 - anti-IgE (omalizumab): těžké formy astmatu

Příklady využití monoklonálních protilátek v léčbě zhoubných nádorů

- Protilátky proti anigenům bílých krvinek:
 - anti CD-20 (rituximab) léčba lymfomů,
 - anti-CD52 (Alemtuzumab) – léčba lymfomů
- Anti-receptorové protilátky:
 - anti-epidermal growth factor (receptor HER-2) (trastuzumab) – mamární karcinom
 - anti-epidermal growth factor (receptor EGFR) (cetuximab) – kolorektální karcinom

Další příklady využití monoklonálních protilátek v medicíně

- Antiagregační léčba:
 - trombocytární receptor gpIIb/IIIa (abciximab)
- Antivirová léčba:
 - RS virus (palivizumab)