

# Antigeny z hlediska diagnostiky a pro potřeby imunizace

## Nativní a rekombinantní Ag

Ag – schopna vyvolat I odpověď, komplexní, nekomplexní Ag, haptén ,  
determinanty, nosič

V laboratořích: Stanovení Ab proti:

- a) Autoantigenům
- b) Alergenům
- c) Ag infekčních činitelů

Použití Ag pro diagnostické účely: a) nativní b) rekombinantní

Adb) příprava

- a) chemickou analýzou
- b) genovým inženýrstvím (vnesením genu do vhodné bakterie)

**Nevýhoda:**

- a) Čistota produktu, která není přírodě vlastní
- b) Shodná prim. max sekundární struktura
- c) Jsou –li vyšetřovaná Ab namířena proti konformačnímu epitopu, nejsou v testu detekovatelné

**Závěr:** Testovací systémy by měly mít **A) nativní i B) rekombinantní Ag**

# Antigeny

- **Základní vlastnosti**

**1. Cizorodost** – během vývoje IK b. v kostní dřeni či v thymu se B a T lymfocyty učí rozpoznávat vlastní Ag (klonová delece). Pokud se vlastní Ag během maturace lymfocytů v prim. orgánech neobjevil, nedojde k eliminaci klonu lymfocytů, které by ho rozpoznali a reagovaly na něj. Příklad: Spermie

**Imunogennost** – schopnost indukovat i. odpověď. Čím větší fylogenetická vzdálenost mezi jedinci (při imunizaci), tím větší imunogenosti, například transplantace ledvin dvojčat, nepříbuzného dárce

Příklad: Kolagen, cytochrom evolučně konzervované molekuly – imunogennost nepatrná

**2. Degradovatelnost** – Pokud molekula nemůže být degradovatelná (solubilizovaná), není Ag.

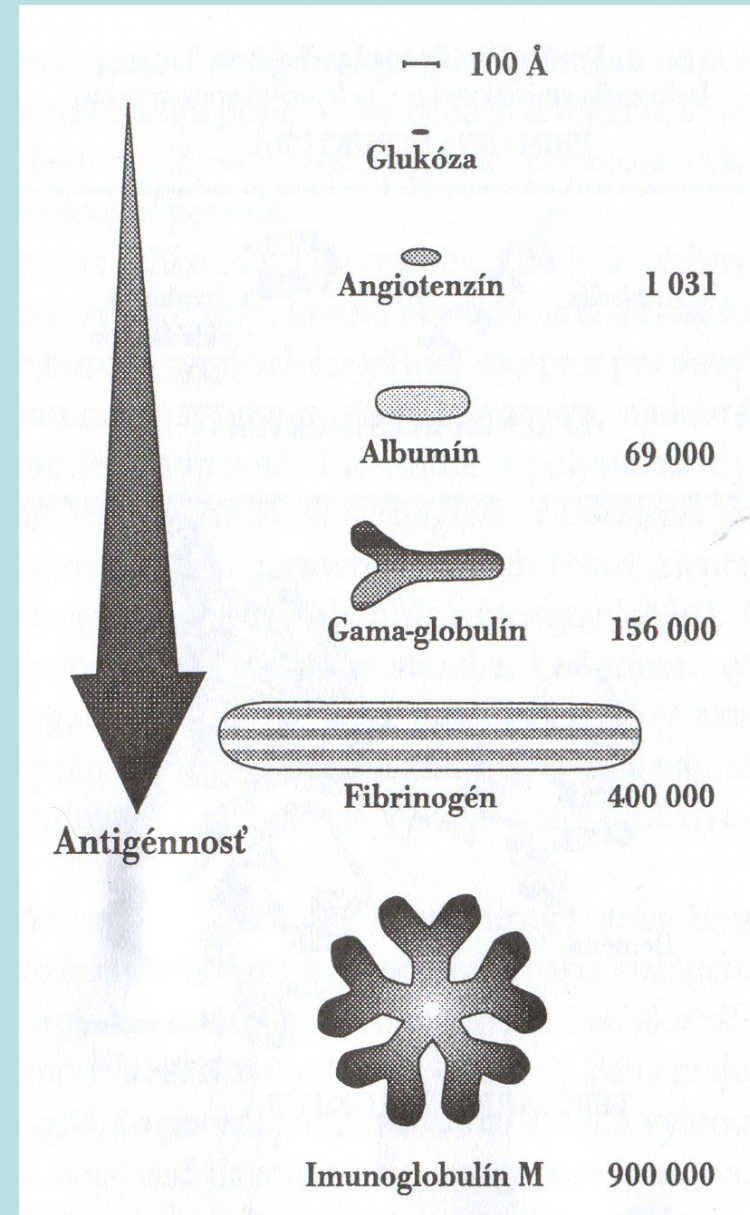
Příklad: Ocelové jehly, klouby z umělé hmoty přijímá organismus bez reakcí. Látka rychle se rozkládající nemá stabilní fragmenty na indukci i. odpovědi

Příklad: D-AK u savců nepřírozené, peptidy v organismu nedegradovatelné, po zabudování peptidu z L-AK vznik pravého Ag

# Vlastnosti Ag

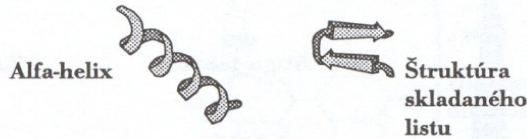
**3. Biochem. struktura** – 1. Peptidy – výborné Ag (komplexnost, velikost, př. toxiny, bičíky) 2. polysacharidy- špatné Ag (škrob) 3. lipopolysacharidy (G-) 4. glykoproteiny (buň. membrány) 5. Lipidy – špatné Ag (strukturní nestabil.) 5. NK – slabé (flexibilita) 6. Nukleoproteiny (stabilizace)

**4. Molek. hmotnost** – čím vyšší, tím lepší Ag  
méně jako 5000kDa - neimunogenní  
5000-10000kDa – slabý Ag  
Nad 5000 – silný Ag , obr.

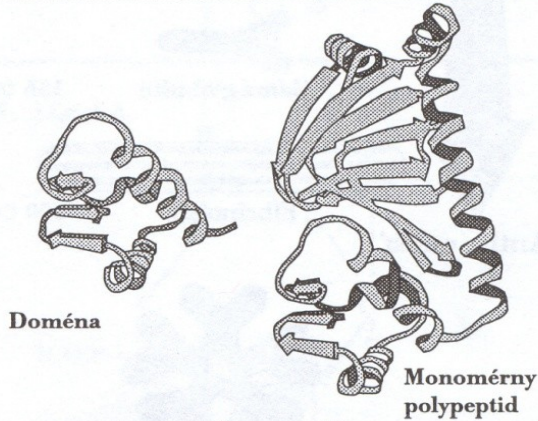


-Lys-Ala-His-Gly-Lys-Lys-Val-Leu-  
(sekvencia aminokyselín v polypeptidovom reťazci)

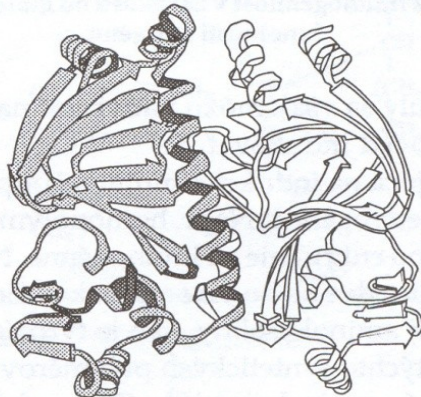
### PRIMÁRNA ŠTRUKTÚRA



### SEKUNDÁRNA ŠTRUKTÚRA



### TERCIÁRNA ŠTRUKTÚRA



Dimérový proteín  
KVARTÉRNA ŠTRUKTÚRA

## Další požadavky:

komplexnosť a heterogennosť: homopolymery-heteropolymery, Pŕ. pridání aromat. AK-zvýšení imunogennosti 4 úrovně organizace proteinů:

**Primární, sekundární, terciální, kvarterní** struktura přispívají k celkové komplexnosti – zvýšení imunog.

# Vlastnosti Ag

**5. Strukturní stabilita** – Ag vysoce flexibilní, bez fixního tvaru  
– špatný Ag př. želatina, po zabudování tyrozinu, try stabilizace

**6. Dávka a cesta vniku Ag do těla** – nedostatečná dávka-stav neodpovídavosti; nízkozónová tolerance, příliš vysoká dávka – vysokozónová tolerance

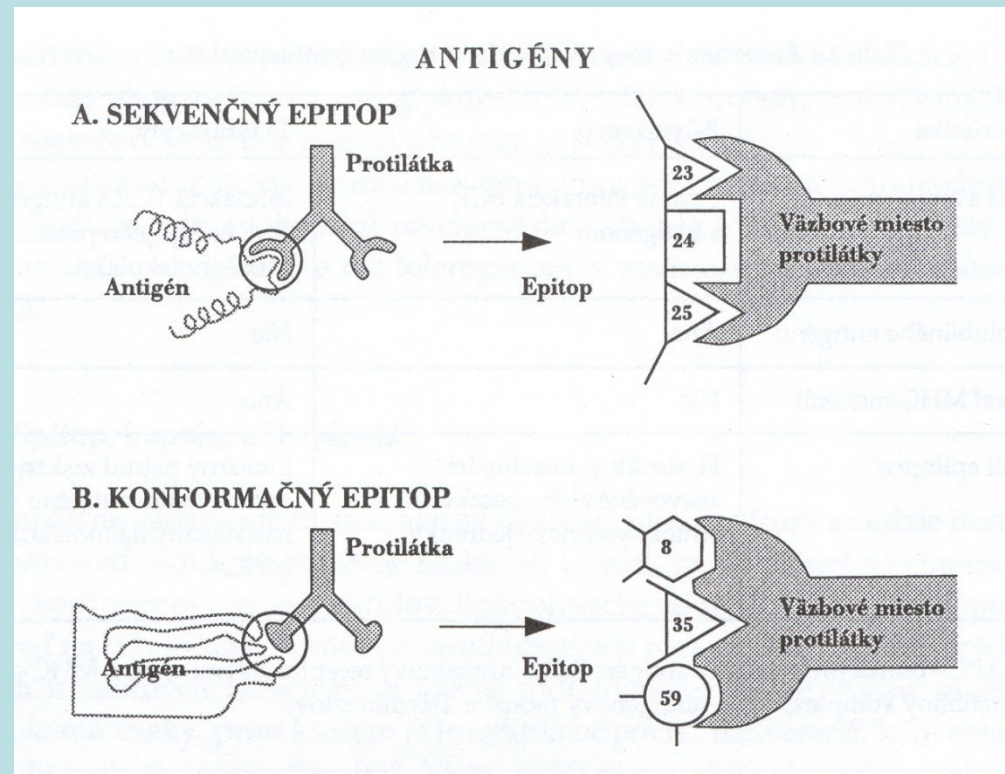
Vícenásobná aplikace na dosažení potřebné i. odpovědi, způsoby vniku Ag do těla rozhoduje, který lymfatický orgán a které populace buněk se zúčastní i. odpovědi

**7. Biologické faktory** – věk, hormony, genetická vybavenost pro i. odpověď, pohlaví. př. pohlaví – ženy: odraz stimulačního vlivu estrogenů –  
1. odolnost proti infekcím – žijí déle 2. vyšší hladiny Ig 3. i. odpověď na stimulaci rychlejší

## Porovnávání rozpoznání Ag lymfocyty B a T

Charakteristika	B-lymfocyty	T-lymfocyty
Interakcia s antigénom	Priama interakcia BCR s antigénom	Interakcia TCR s antigénom si vyžaduje jeho prezentáciu MHC-molekulami
Väzba solubilného antigénu	Áno	Nie

B lymfocyty nebo Ab rozpoznávají sekvenční (pořadí AK) nebo konformační epitop (AK v sekundární struktuře), po denaturaci nerozezná, skryté AK rozezná, hydrofilní rozezná, hydrofobní ne. Globulární proteiny-kontakt s 15-22 AK, závisí na terciální struktuře

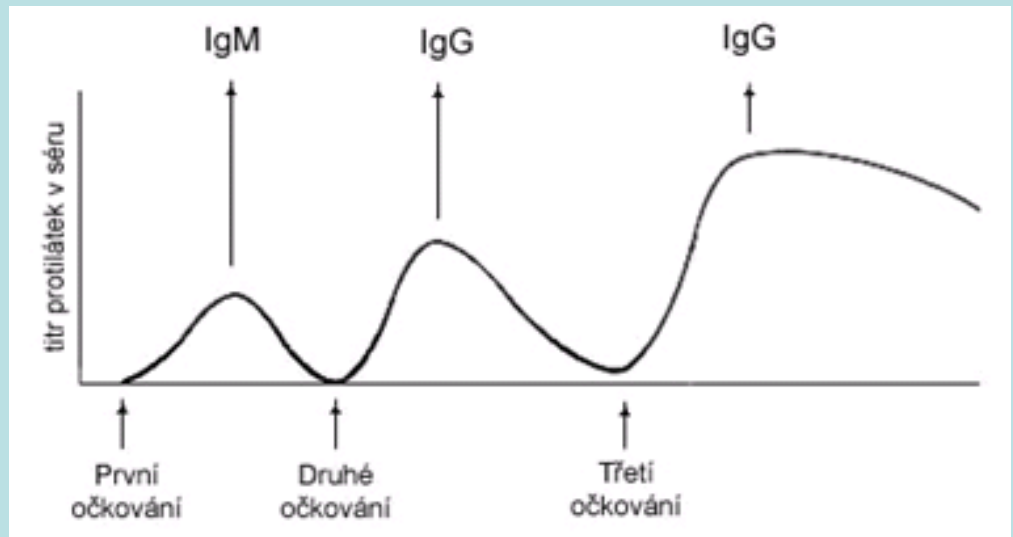


# T lymfocyty

- TCR T<sub>c</sub> lymfocytů rozeznávají jen fragment rozrušené molekuly procesem uvnitř v APC buňce navázaný na MHCI (15-25AK)
- TCR Th-MHCII.
- Peptid – hydrofobní AK musí být ponořené do žlábků MHC, hydrofilní k TCR

# Experimentální imunizace

1. Zjištění dynamiky a výše hladiny tvorby Ig u pokusných zvířat
2. Zjištění koncentrace proteinů očkovací látky
3. Aplikace dávky: při spodní hranici hodnoty množství očkovací látky
4. Aplikace po třech týdnech dle schématu
5. Izolace séra s vytvořenými Ab z pokusných zvířat



Průběh imunitní odpovědi, aplikace po třech týdnech



# Experimentální imunizace

- Literatura udává jako optimální očkovací dávku rozmezí hodnot 5 – 50  $\mu\text{g}$  nerozpustných proteinů v bakteriální suspenzi. Toto množství lze aplikovat:  
a) intraperitoneálně b) subkutánně
- nejběžnější metoda-intraperitoneální očkování, použití: pro vpravení většího množství Ag do myši (Harlow, Lane 1988).
- K očkování se dá použít spodní hranici hodnot Ag:
- možnost sledování dynamiky protilátkové odpovědi:  
Závisí:
  - na množství Ag
  - na jeho specifitě
  - na organismu, který očkujeme.

# Dynamika primární a sekundární protilátkové odpovědi

## Obr. Primární odpověď

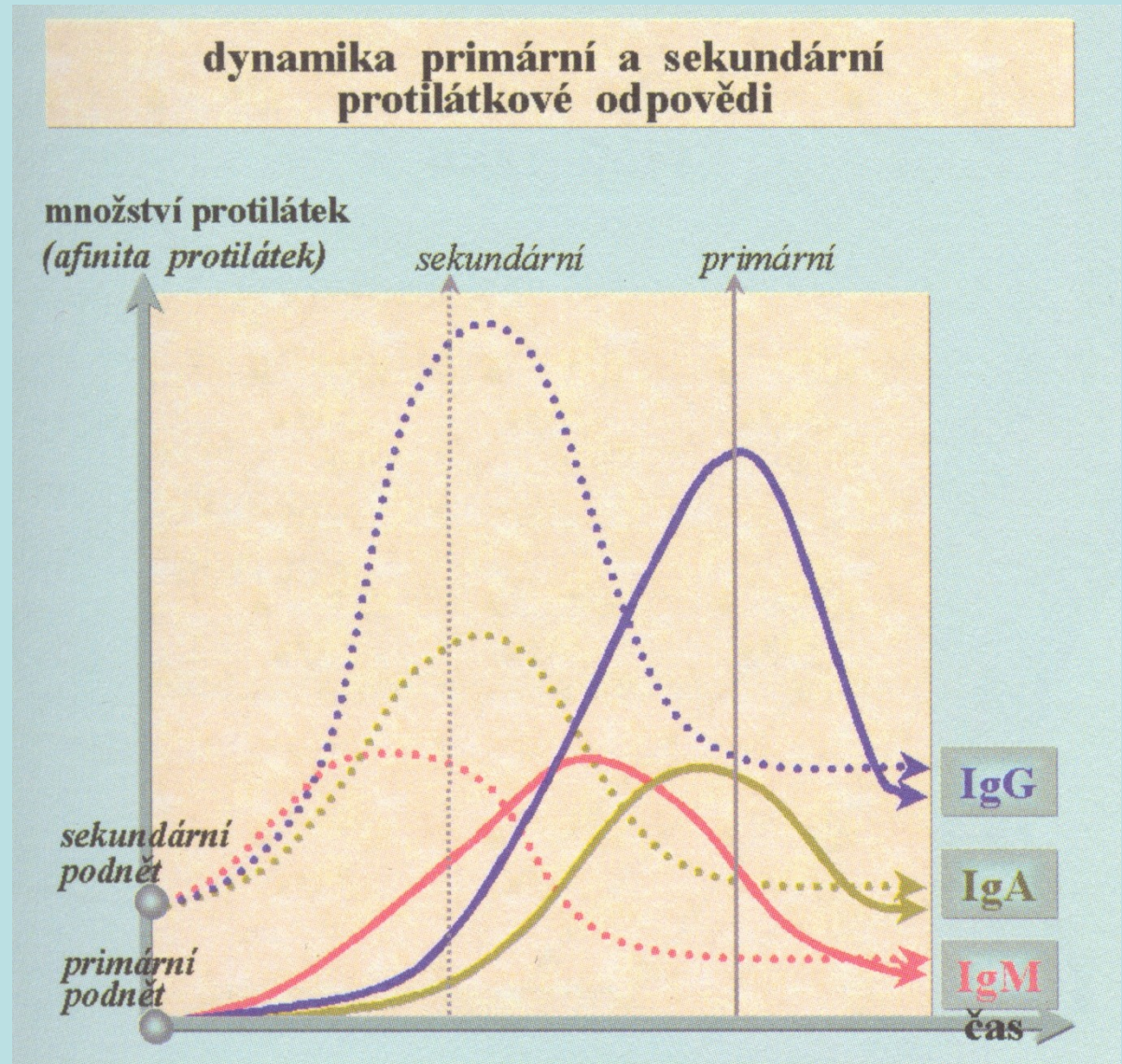
1. Tvorba Ab ve třídě IgM, potom další třídy a podtřídy (IgG, IgA..)

2. Postupné zvyšování afinity Ab podle procesu somatické mutace

## Sekundární odpověď

1. rychlejší a intenzivnější tvorba tříd IgG, IgA, nižší tvorba IgM

2. Vyšší afinita a množství Ab expanzí paměťových buněk, které již prodělaly proces somatické mutace



# Antigeny z hlediska diagnostiky

## Nativní a rekombinantní Ag

Ag – schopna vyvolat I odpověď, komplexní, nekomplexní Ag, haptén , determinanty, nosič

V laboratořích: Stanovení Ab proti:

- a) Autoantigenům
- b) Alergenům
- c) Ag infekčních činitelů

**Použití Ag pro diagnostické účely:** a) nativní b) rekombinantní

Adb) příprava

- a) chemickou analýzou
- b) genovým inženýrstvím (vnesením genu do vhodné bakterie)

**Nevýhoda:**

- a) Čistota produktu, která není přírodě vlastní
- b) Shodná prim. max sekundární struktura
- c) Jsou –li vyšetřovaná Ab namířena proti konformačnímu epitopu, nejsou v testu detekovatelné

**Závěr:** Testovací systémy by měly mít A) nativní i B) rekombinantní Ag

