

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 vyšetřované Ab namířeny 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 neobjeví, nedojde k eliminaci klonu lymfocytů, které by ho rozpoznali a reagovaly na něj. Příklad: spermie

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

Příklad: kolagen, cytochrom evolučně konzervované molekuly – imunogennost nepatrná

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

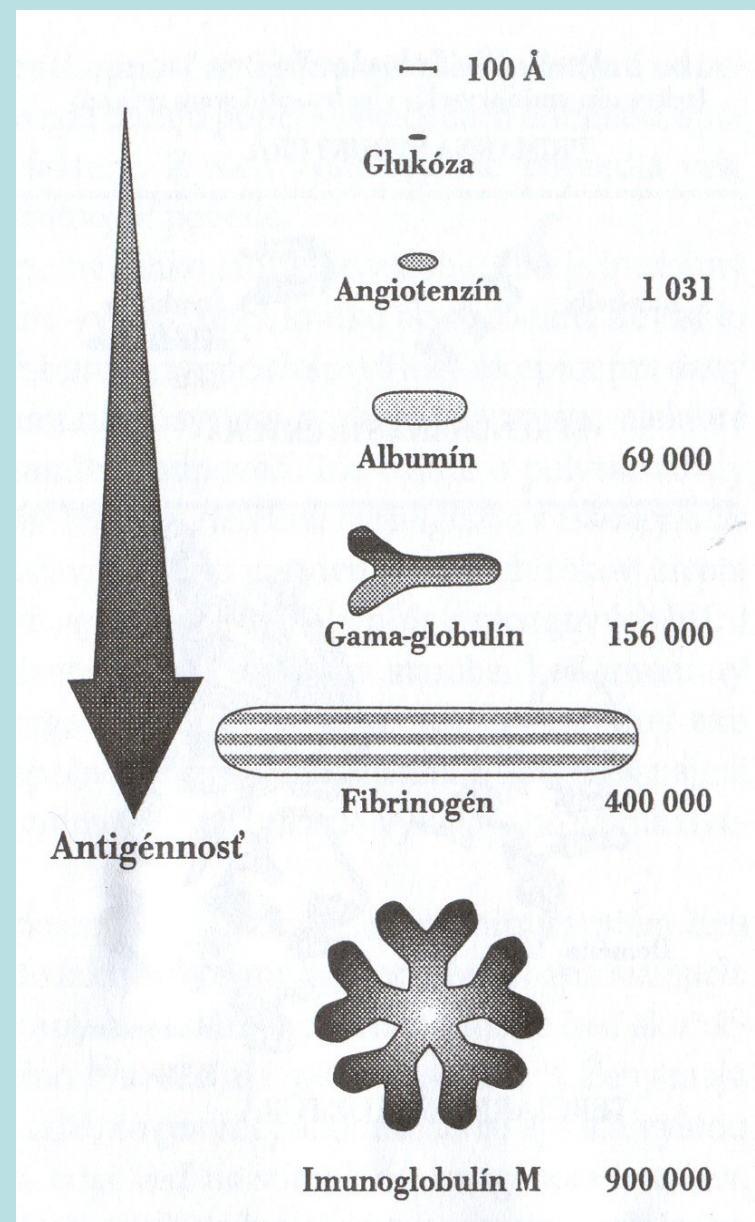
Příklad: Ocelové jehly, klouby z umělé hmoty přijímá organismus bez reakcí. Látka rychle se rozkládající nemá stabilní fragmenty na indukci im. odpovědi

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

Vlastnosti Ag

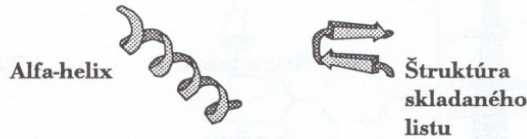
3. Biochem. struktura – 1. Peptidy – výborné Ag (komplexnost, velikost, př. toxiny, bičičky) 2. polysacharidy- špatné Ag (škrob) 3. lipopolysacharidy (G-) 4. glykoproteiny (buň. membrány) 5. Lipidy – špatné Ag (strukturní nestabil.) glykolipidy 5. NK – slabé (flexibilita) 6. Nukleoproteiny (stabilizace)

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

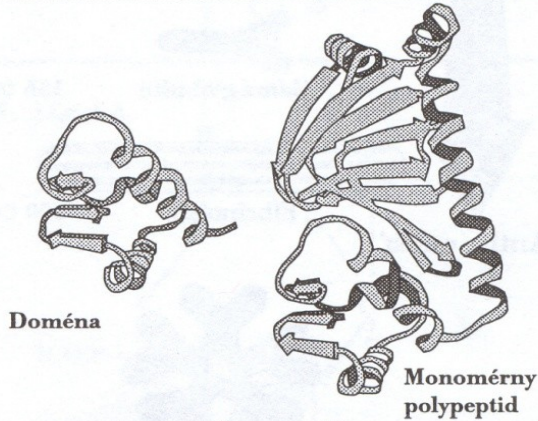


-Lys-Ala-His-Gly-Lys-Lys-Val-Leu-
(sekvencia aminokyselín v polypeptidovom reťazci)

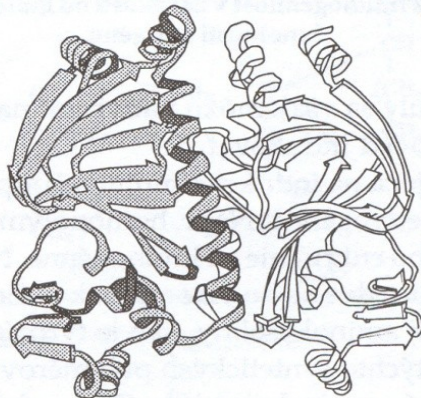
PRIMÁRNA ŠTRUKTÚRA



SEKUNDÁRNA ŠTRUKTÚRA



TERCIÁRNA ŠTRUKTÚRA



Dimérový proteín
KVARTÉRNA ŠTRUKTÚRA

Další požadavky:

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

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

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

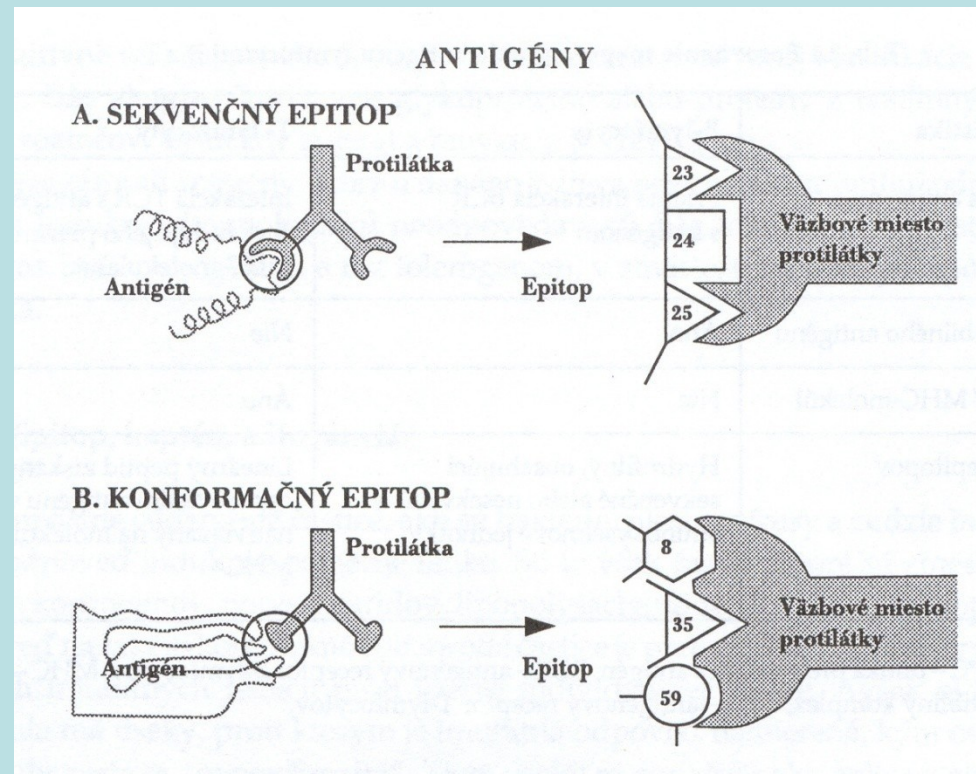
Vícenásobná aplikace na dosažení potřebné i. odpovědi, **způsoby vniku Ag** do těla rozhoduje, který lymfatický orgán a které populace buněk se zúčastní i. odpovědi

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

Porovnání 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

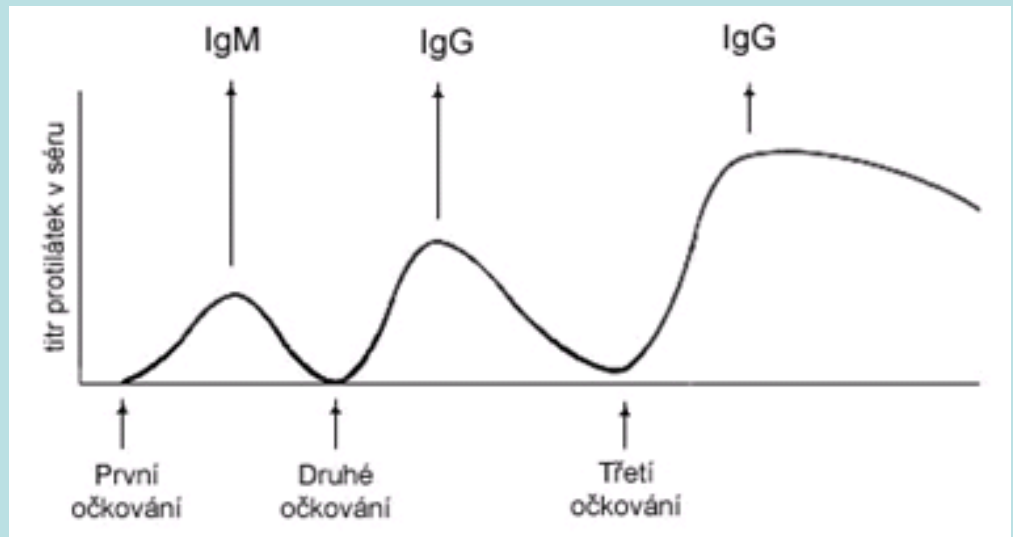


T lymfocyty

- TCR T_c 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 μg 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

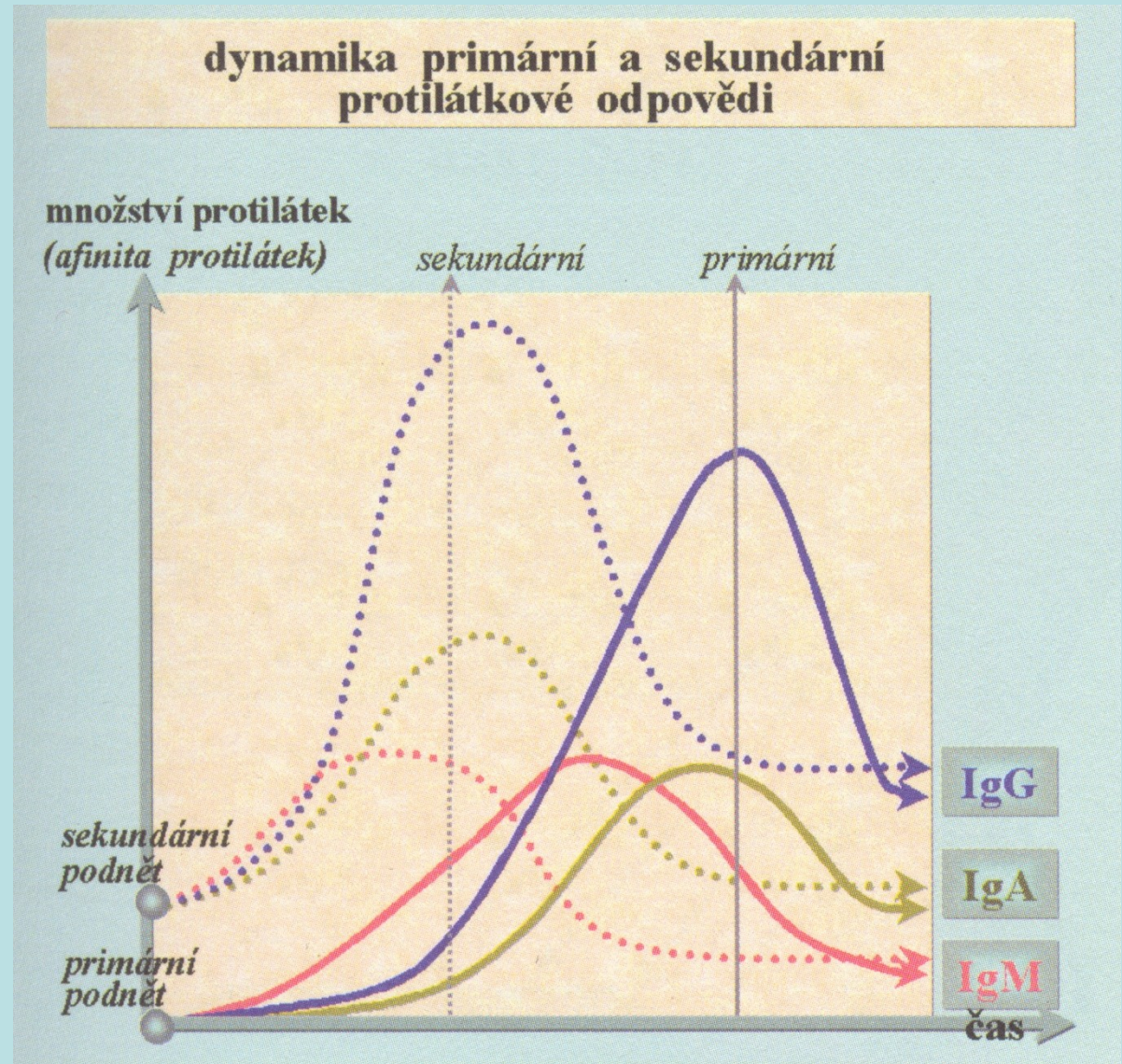
1. Tvorba Ab ve třídě IgM, potom další třídy a podtřídy (IgG, IgA..)

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

