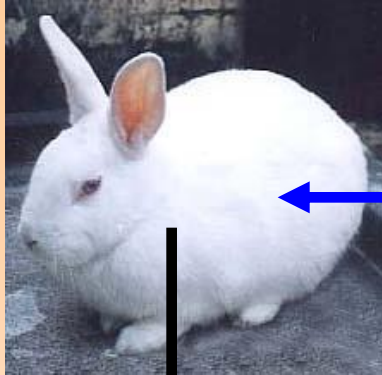


PROTILÁTKY

IMUNOGLOBULINY



Antigen
náš budoucí
analyt

Imunitní odpověď

humorální

buněčná

PB

(plazmatické buňky)

PB

(efektorové b.)

Protilátky

$T_{H/I}$, T_S , T_C , lymfokiny

Imunoglobuliny

- ❖ proteiny živočišného původu
- ❖ protilátkovou aktivitu
- ❖ antigenovou specifitu

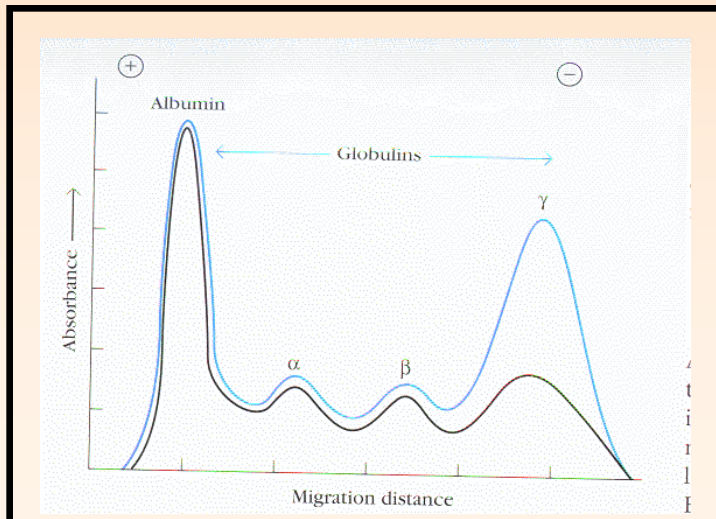
Imunoglobuliny \neq Protilátky

Imunoglobuliny

- ✓ neúplné
- ✓ chybné molekuly protilátek:
Benceho-Jonesovy proteiny- L-řetězce
 β_2 -mikroglobulin
 α_1 -mikroglobulin
nemají protilátkovou aktivitu
- ✓ protilátky s protilátkovou aktivitou

Historie protilátek

- sérum člověka a zvířat po uzdravení z nemoci obsahuje látky: **aglutininy, precipitiny antitoxiny** (aglutinují mikrobi, neutralizují toxiny)
- **P. EHRLICH (1891)** – slovo **protilátky** (německy: Antikörper) nebyla známa chemická podstata (chyběly metody) jen biologické funkce (látky působící proti cizím látkám)
- **Chemickou strukturu protilátek:**
TISELIUS A. (švédský chemik, nositel Nobelovy ceny)
KABAT E.A. (Američan slovenského původu)



Tiselius (1930-1935)

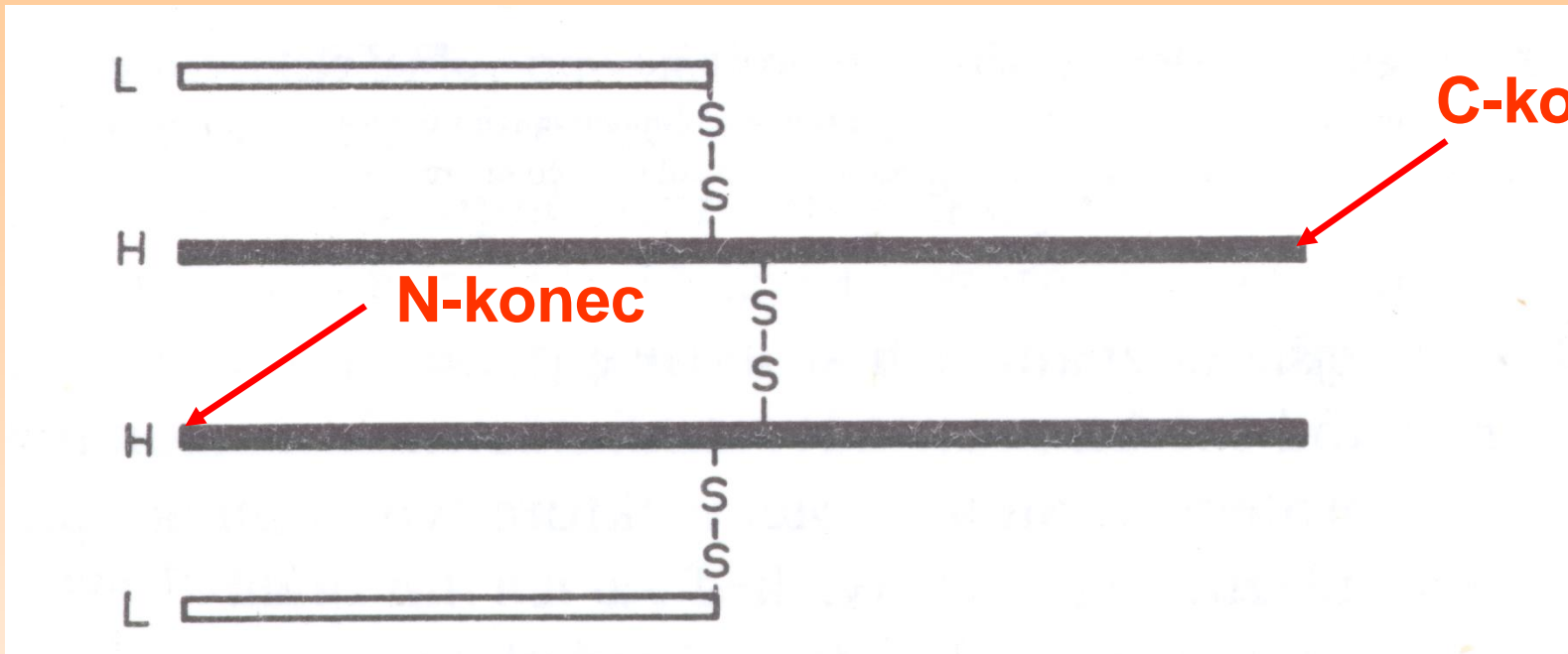
Zařízení pro volnou elektroforézu krevního séra

pohybují nejpomaleji (γ -globuliny) (stejnoseměrný proud)

Dokonalejší poznání struktury imunoglobulinů

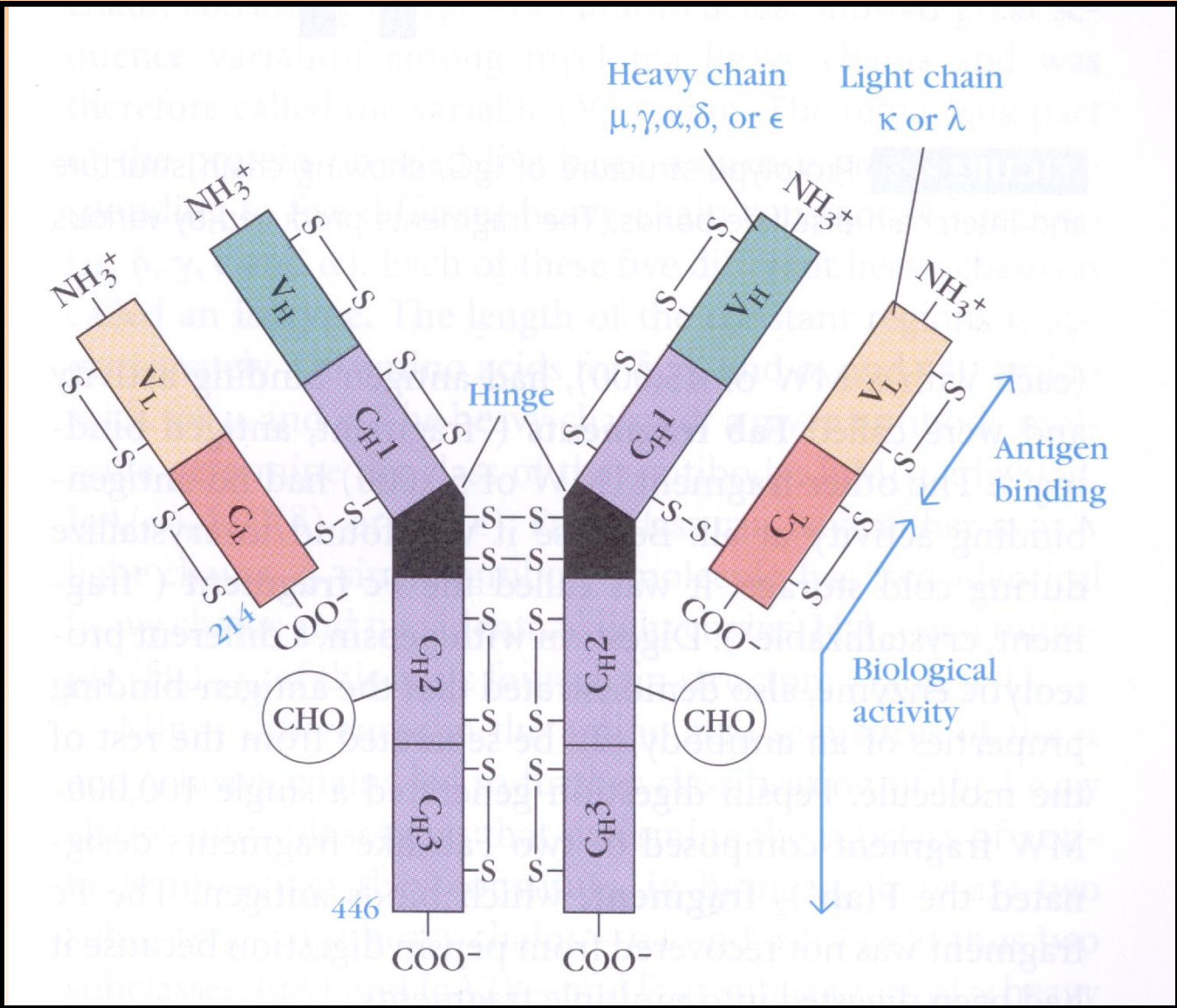
- **rozvoj separačních metod**
- **existence myelómových proteinů (1845- Bence-Jones - L)**
1944 Waldenström makroglobulinémie (IgM)
(buňky produkující protilátky-B-lymfocyty se zvrhnou na nádorový růst a začnou produkovat jeden druh protilátky se stejnou strukturou)
umožnilo určit chemické složení protilátkových molekul
- **PORTER 1950** rozštěpení molekuly protilátky pomocí enzymu papainu na 3 fragmenty
- **EDELMAN 1960** molekula protilátky se skládá z více polypeptidových řetězců
- **PORTER** na zkušenosti Edelmana vypracoval **4-řetězový model protilátky**

Porterův model molekuly protilátky



L - lehký řetězec
H- těžký řetězec

- 4 polypeptidové řetězce
- 2+ 2 identické
- spojení: disulfidickými můstky
- redukce disulfidických můstků = disociace na 4



Protilátky mají **stejnou základní strukturu**

malé rozdíly:

rozdílné fyzikálně chemické a biologické vlastnosti
izolace protilátek – označování různými symboly

- **1964 Označování protilátek**

Praha komise expertů Světové zdravotnické organizace:
Imunoglobuliny: Ig

(IgG, IgM, IgA, IgD (1965) a IgE (1966))

- **Edelman + 6 (1965 -1969) Sekvence AK** (myolemový IgG)

primární struktura γ -řetězce IgG1 (★Slapy u Prahy 1969)

- **1972 Porter a Edelman**

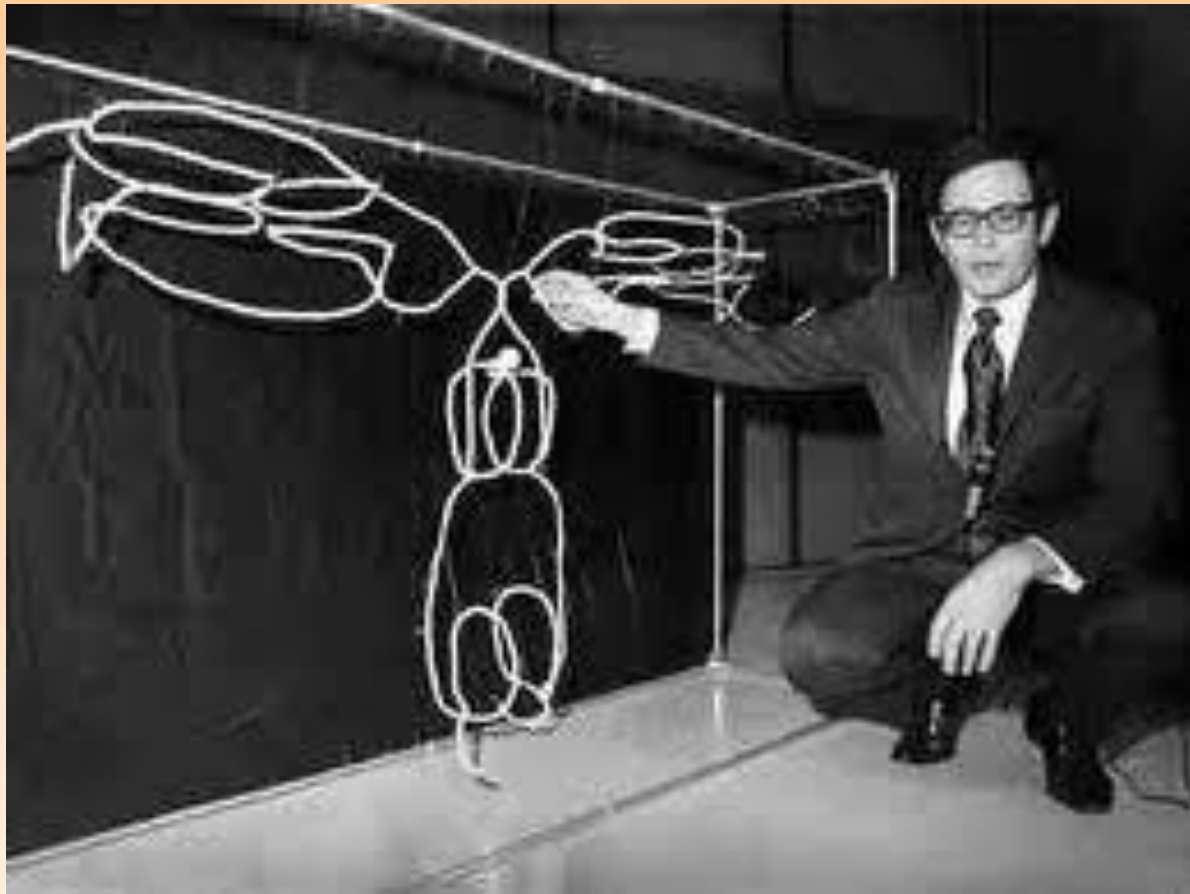
(poznání struktury protilátek)

Nobelova cena za fyziologii a medicínu

(Moore, Stein- Automatický analyzátor aminokyselin

Nobelova cena za chemii)





**Gerald Edelman s modelem gamma globulinové molekuly
1972**

Protilátky

Chemické hledisko

Imunoglobuliny = glykoproteiny
(složené z AK a sacharidové části)

Biologické hledisko

Imunoglobuliny mají protilátkovou aktivitu
v molekule je vazebné místo, které může specifickým
způsobem navázat determinantní skupiny antigenu,
který jejich tvorbu vyvolal.

Imunoglobuliny jsou výkonné molekuly humorálních
imunitních procesů

Chemická struktura Ig

**2 druhy řetězců: lehké
 těžké**

Patologické (myelomové) Ig může vytvářet jen jeden druh řetězce nebo jeho část.

Lehké řetězce

M_r asi 23 000 (lidské)

215 aminokyselinových jednotek (AK)

označení **L** (z anglického *light* = lehký)

všechny známé Ig obsahují dva typy L řetězců:

κ (kappa) a λ (lambda)

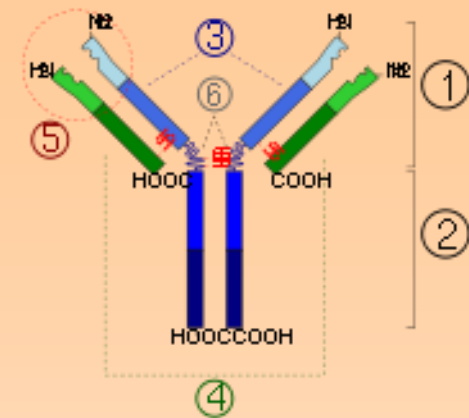
Každá molekula Ig může obsahovat jen jeden typ L

Poměr řetězců $\kappa : \lambda$ pro určitý druh typický

člověk: 65 : 35 myš: 97 : 3

typ: IgGK

IgGL



Trieda	Podtrieda	Reťazec L	Reťazec H	Relatívna molekulová hmotnosť reťazca H	Iný reťazec	Molekulový vzorec
IgG	IgG1 IgG2 IgG3 IgG4	κ, λ	γ	50 000		$L_2\gamma_2$
			γ_1			
			γ_2			
			γ_3 γ_4			
Sérový IgA Sekrečný IgA ^s	IgA1 IgA2	κ, λ	α	55 000		$L_2\alpha_2$
			α	55 000	SC, J	$(L_2\alpha_2)_2SCJ$
			α_1 α_2			
IgM		κ, λ	μ	70 000	J	$(L_2\mu_2)_5J$
IgD		κ, λ	δ	65 000		$L_2\delta_2$
IgE		κ, λ	ϵ	70 000		$L_2\epsilon_2$

L — ľahký reťazec,

H — ťažký reťazec,

SC — sekrečný komponent (relatívna molekulová hmotnosť 70 000),

J — spojovací reťazec (relatívna molekulová hmotnosť 15 000).

Velikost řetězců H

stoupá v pořadí:

IgG IgA IgD IgE IgM

Objasnění sekvence aminokyselin

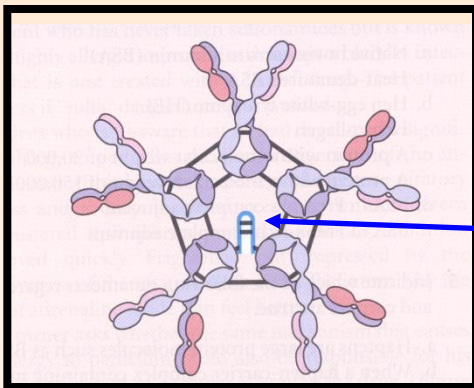
v L-řetězcích κ a λ :

- Putnam 1966-67 214 AK (myelómové proteiny)

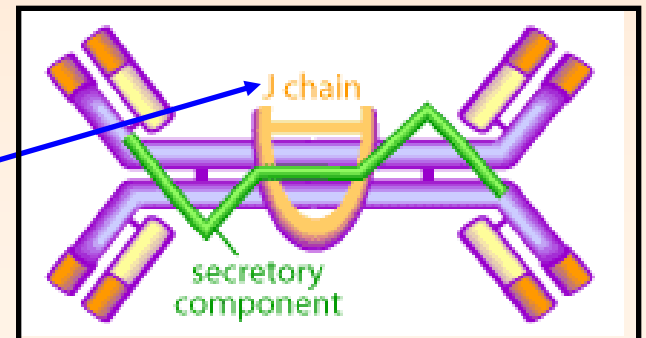
v H řetězcích:

- Edelman 1969 γ -řetězec-myelomový 445 AK
- Frank W. a Putnam 1973 μ -řetězec 576 AK
- Liu a Putnam 1976 α_1 řetězec 472 AK (M_r 54 000)
- Takahashi a Putnam 1982 δ -řetězec 512 AK (M_r 56 213) 7 oligosacharidových součástí
 M_r 65 000
řetězce μ a ε mají podobné M_r a také počet AK

- ❖ Molekula Ig obsahuje jen jeden typ H řetězce
- ❖ IgM a IgA obsahují kromě L a H ještě:
J-řetězec (z anglického *joining* = spojovací)
- ❖ sekreční IgA má ještě **SEKREČNÝ KOMPONENT SC**
(z anglického *secretory component*) M_r 70 000

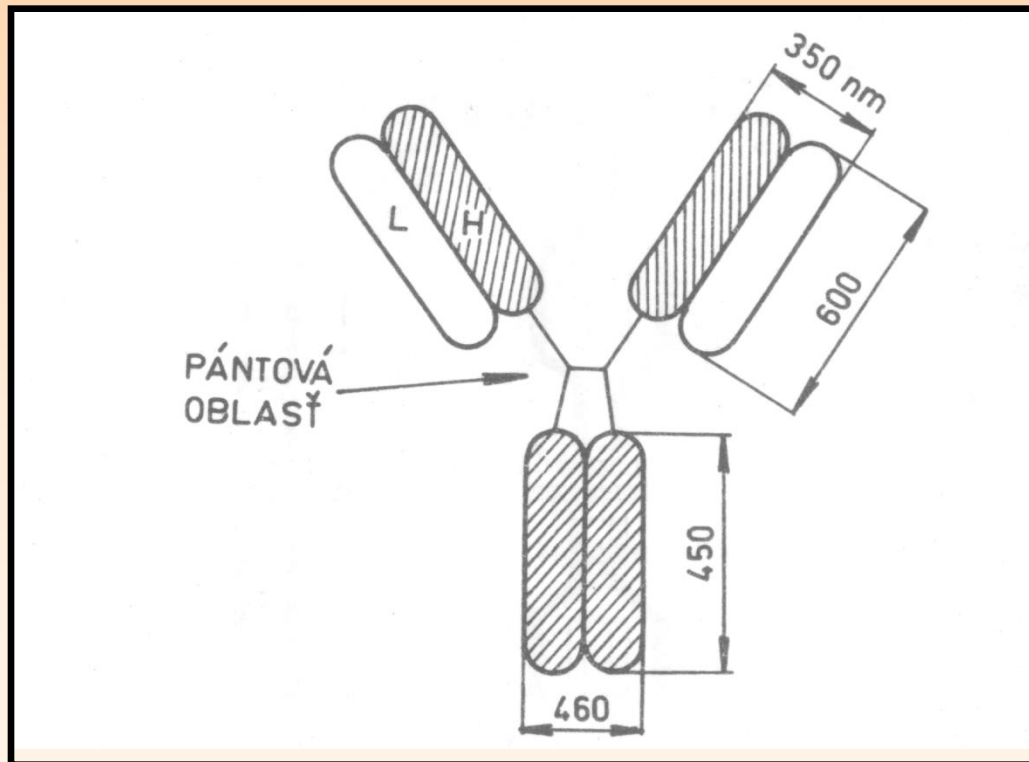


J-řetězec



Struktura imunoglobulinů

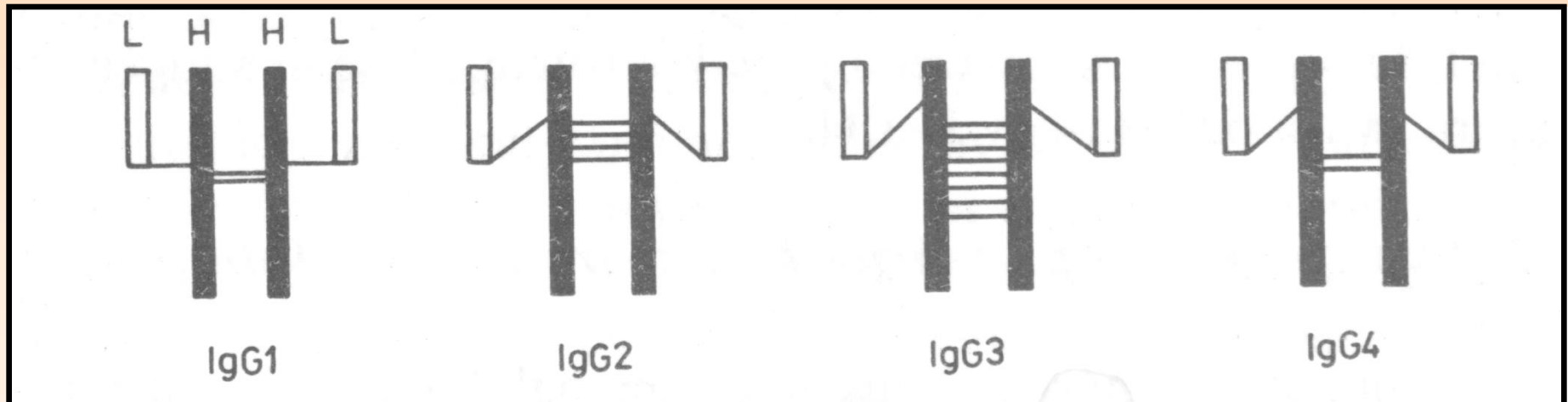
- ✓ podobná struktura (kromě sekrečního IgA a IgM)
- ✓ dva identické H a dva identické L
- ✓ ypsilonová struktura v elektronovém mikroskopu T a Y
- ✓ pantová oblast: (anglicky hinge)



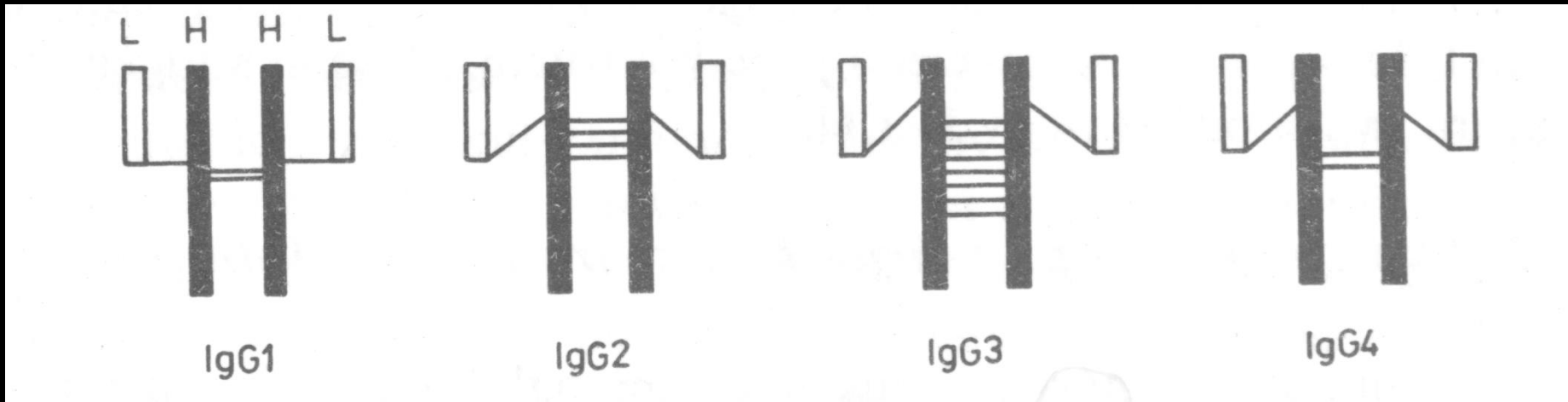
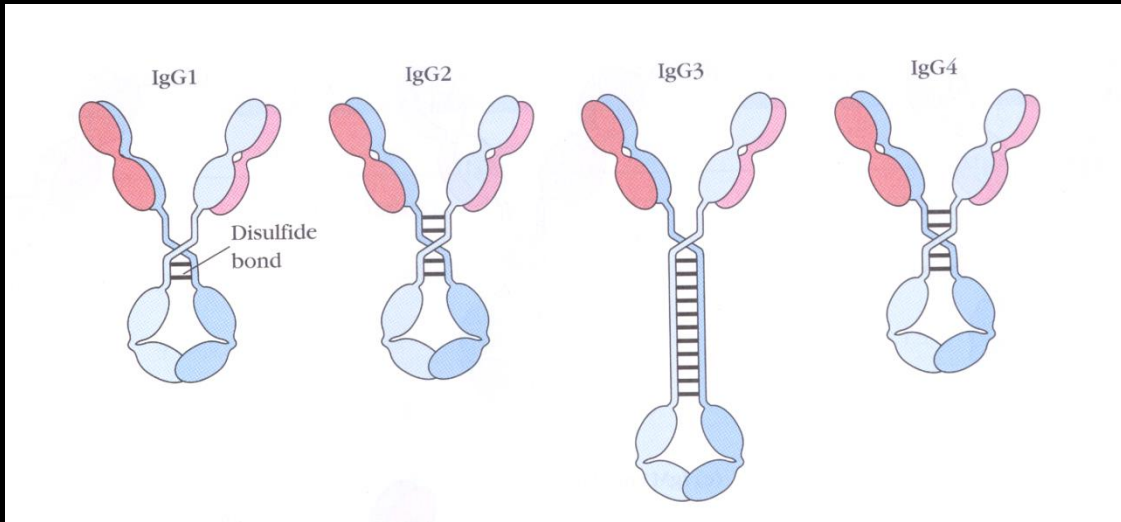
**Model imunoglobulinu
podle elektronoptických
výzkumů**

Rozdíly v prostorovém uspořádání Ig mezi třídami a podtřídami:

- ✓ způsobeny v rozdílném umístění disulfidických můstků mezi jednotlivými řetězci nebo různými částmi téhož řetězce
- ✓ redukcí disulfidických můstků dochází ke ztrátě protilátkové aktivity



IgG3 má až 15 disulfidických můstků mezi řetězci



Struktura IgA

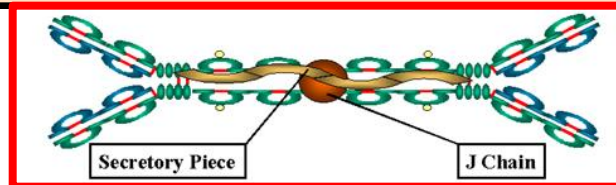
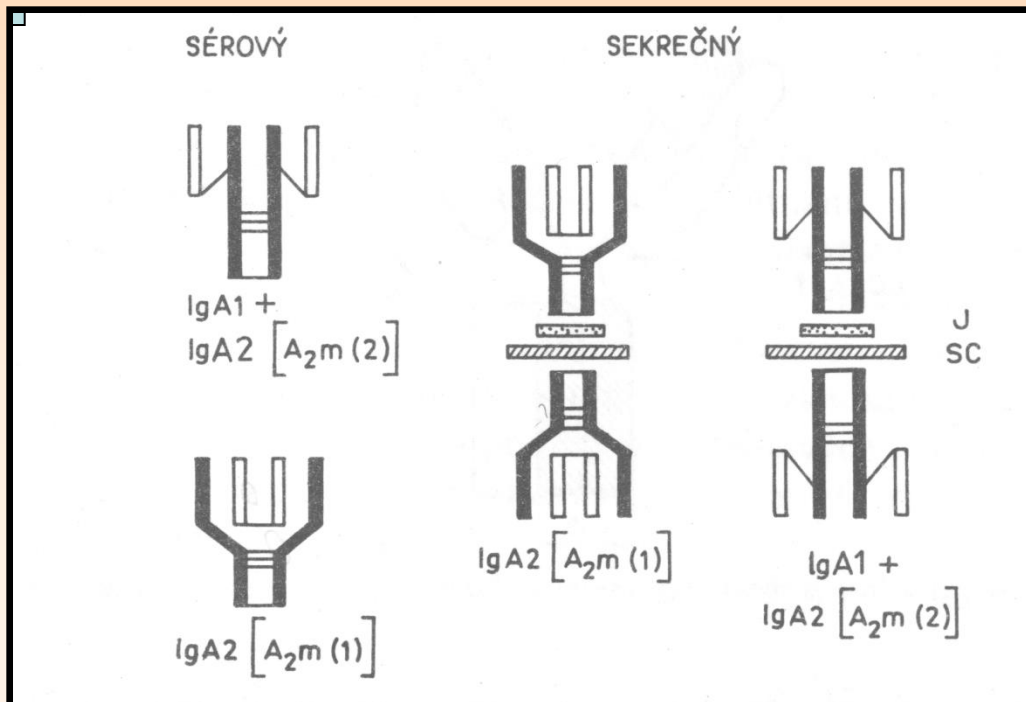
☐ sérový

(dva L a dva H)

☐ sekreční (4 L, 4 H, J a SC)

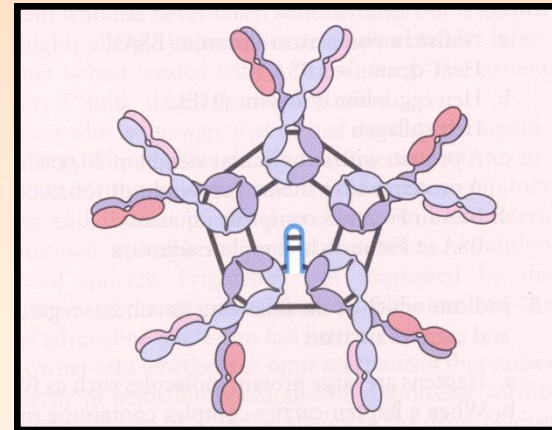
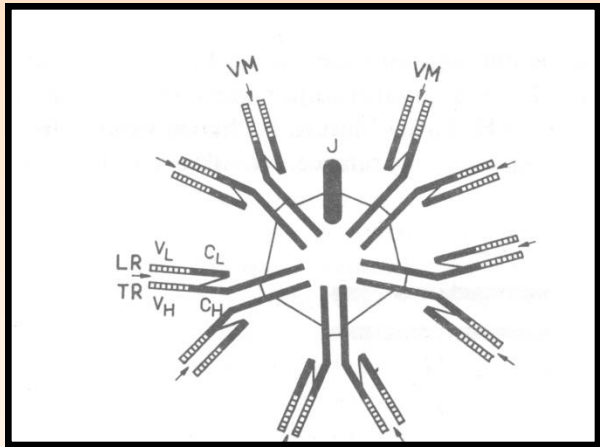
dimér IgA SIgA

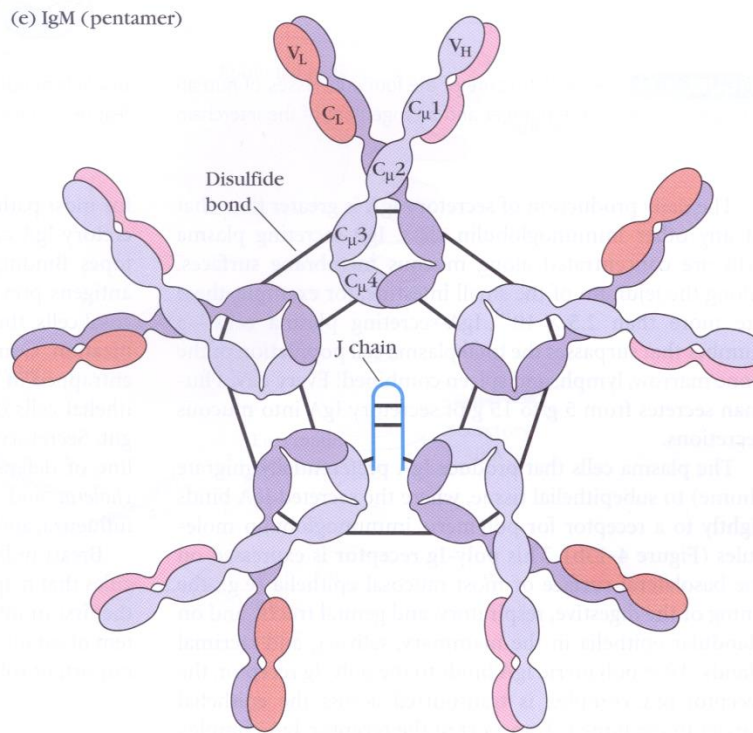
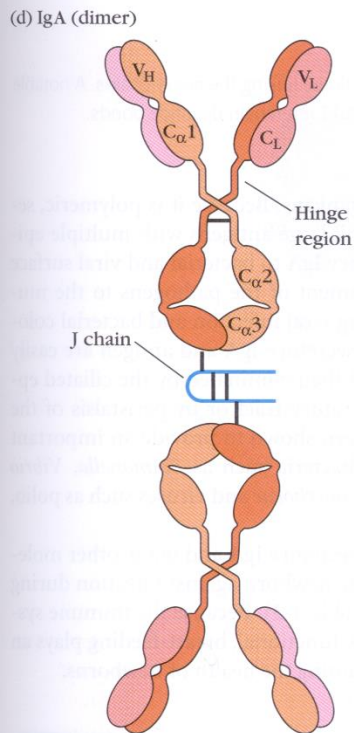
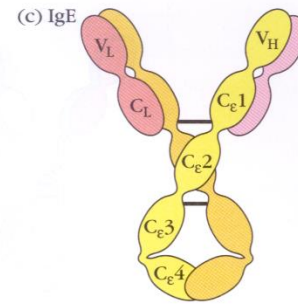
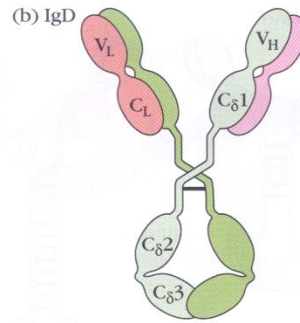
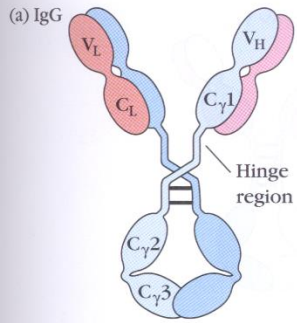
tetramér (malé množství v séru)



Struktura IgM

- ✓ pentamérem základní jednotky
- ✓ 10 L, 10 H a jeden J
- ✓ řetězec J má M_r 15 000 a 119 AK
- ✓ J řetězec je glykoprotein, antigenová struktura se liší od řetězců L a H





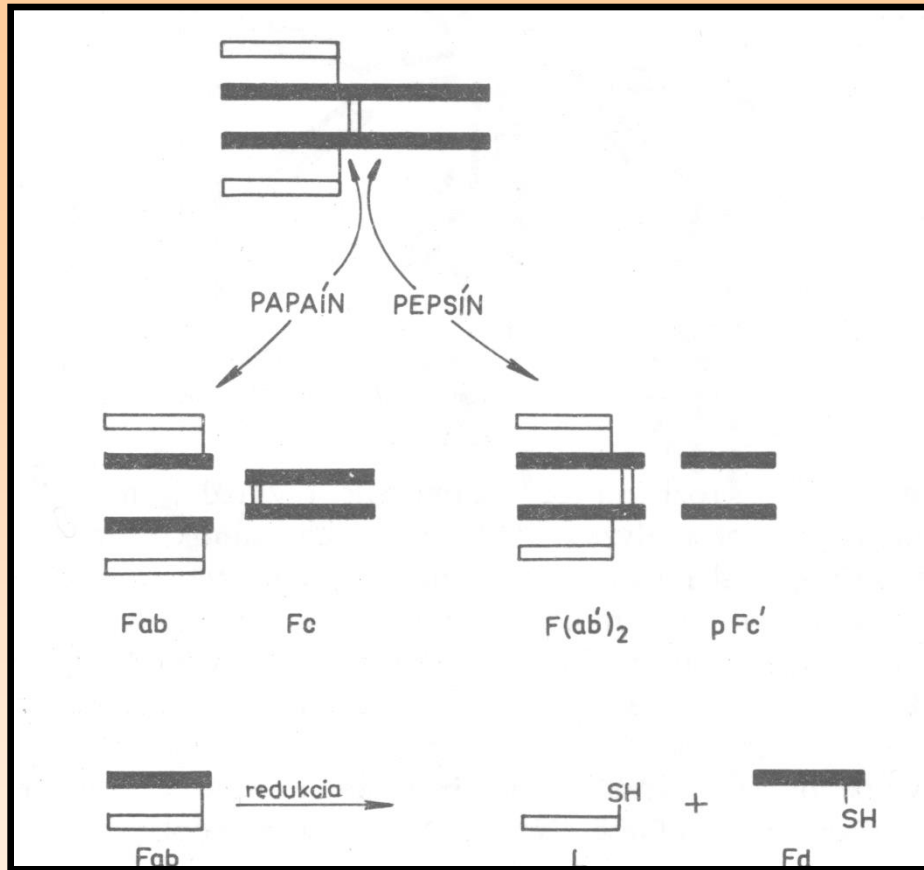
Jak se zkoumá primární struktura Ig?

- ✓ polypeptidové řetězce rozložit na jednotlivé peptidy – fragmenty
- ✓ v jednotlivých peptidech zkoumat sekvenci AK
- ✓ znovu rozštěpit na jiných místech a znovu zkoumat sekvenci AK a porovnat s předchozí sekvencí

Degradace molekuly Ig

- ❖ enzymaticky (papain, trypsin)
- ❖ chemicky (redukcí a sulfitolýzou)

Enzymové štěpení:



Papain a trypsin štěpí Ig
na fragmenty:

✓ fragment vázající antigen

Fab

Fragment antigen binding

✓ krystalizovaný fragment

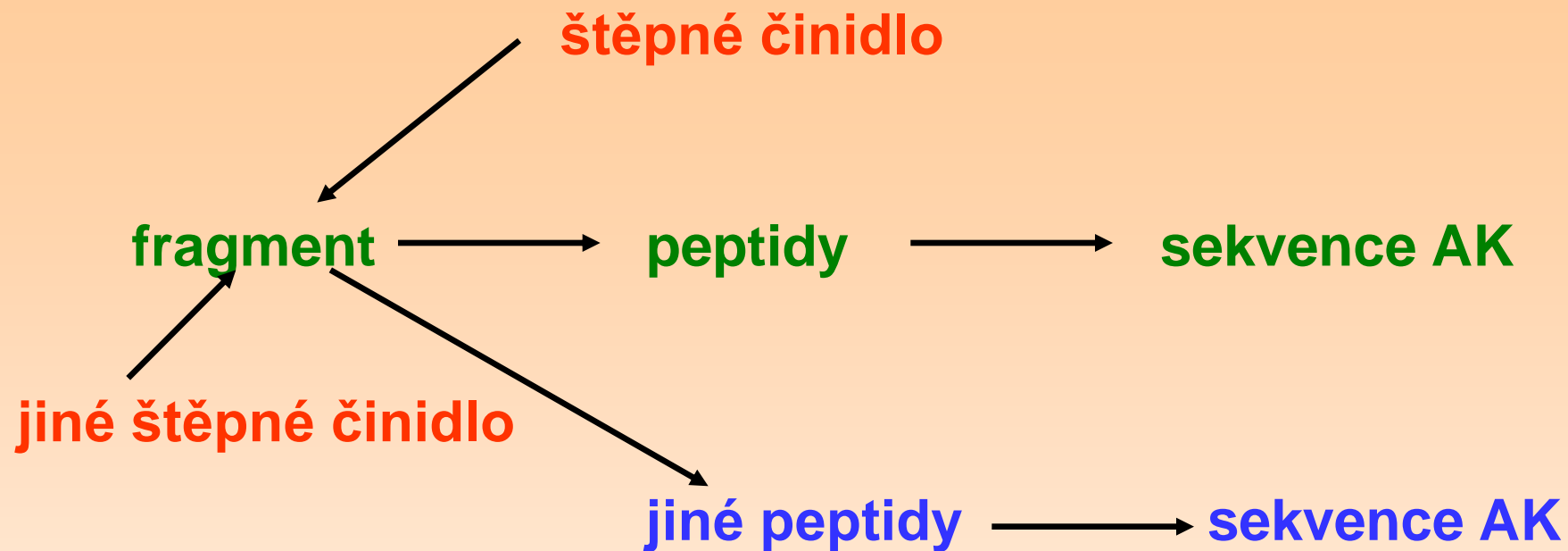
Fc

Fragment crystallizable

Pepsin štěpí na fragmenty:

F(ab')₂ a pFc'

Enzymy hydrolyzují vazby v pantové oblasti H řetězce v blízkosti disulfidických můstků, které spojují oba řetězce H



pořadí peptidů, jak jdou za sebou

Chemické štěpení

Ize rozštěpit:

- ✓ **disulfidické vazby**
- ✓ **peptidové vazby**

Disulfidické vazby

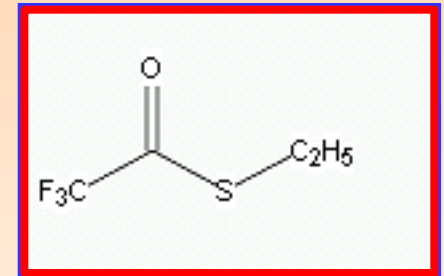
- ✓ redukci
- ✓ sulfitolýzou

**vzniklé sulfhydrylové skupiny lze pomocí alkylačních činidel převést na snadno rozpoznatelné deriváty
(lehko rozpoznat a izolovat fragmenty)**

Peptidové vazby

✓ bromkyanem (CNBr)

štěpí peptidový řetězec na místě **methioninu** (ten se přemění na lakton homoserinu a stává se C-koncovou aminokyselinou fragmentu)
řidký výskyt methioninu v proteinech (selektivita štěpení)



✓ S-ethyltrifluoroacetát (maskuje ϵ -aminokyseliny lysinu) po reakci s polypeptidem vzniká N-trifluoroacetylový derivát, který působením **trypsinu** štěpí vazby u argininu (specifičtější než při obyčejné hydrolýze trypsinem)

Variabilní a konstantní část L a H řetězců

1965 Hilschman N.a Craig L.C.v Bence-Jonesových
sekvence AK: konstatní (C)
 variabilní (V)

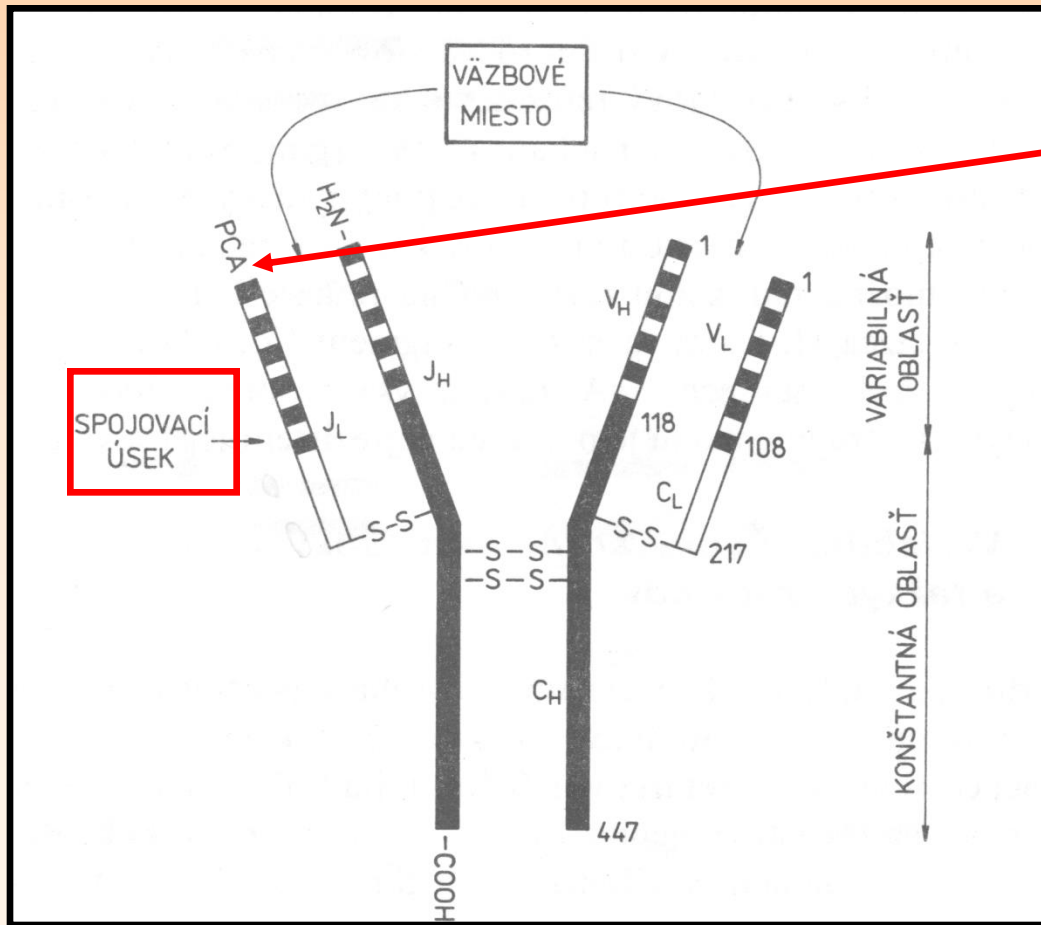
lehký řetězec:	variabilní: V_L	108 - 109 AK (1/2)
	konstantní: C_L	
těžký řetězec	variabilní: V_H	118 (γ) -129 (δ) (1/4)
	konstantní: C_H	

Spojovací oblast = spojovací úsek

anglicky *junction region*

13 - 17 posledních AK z variabilní oblasti

označení: J_L nebo J_H



Počítání AK od N-konce AK s volnou -NH₂ řetězec na konci pyrolidénkarboxylová skupina (PCA), která vzniká cyklizací glutaminu

POZOR úsek J a řetězec J strukturně i funkčně rozdílné součásti Ig-molekuly

Chemická variabilita

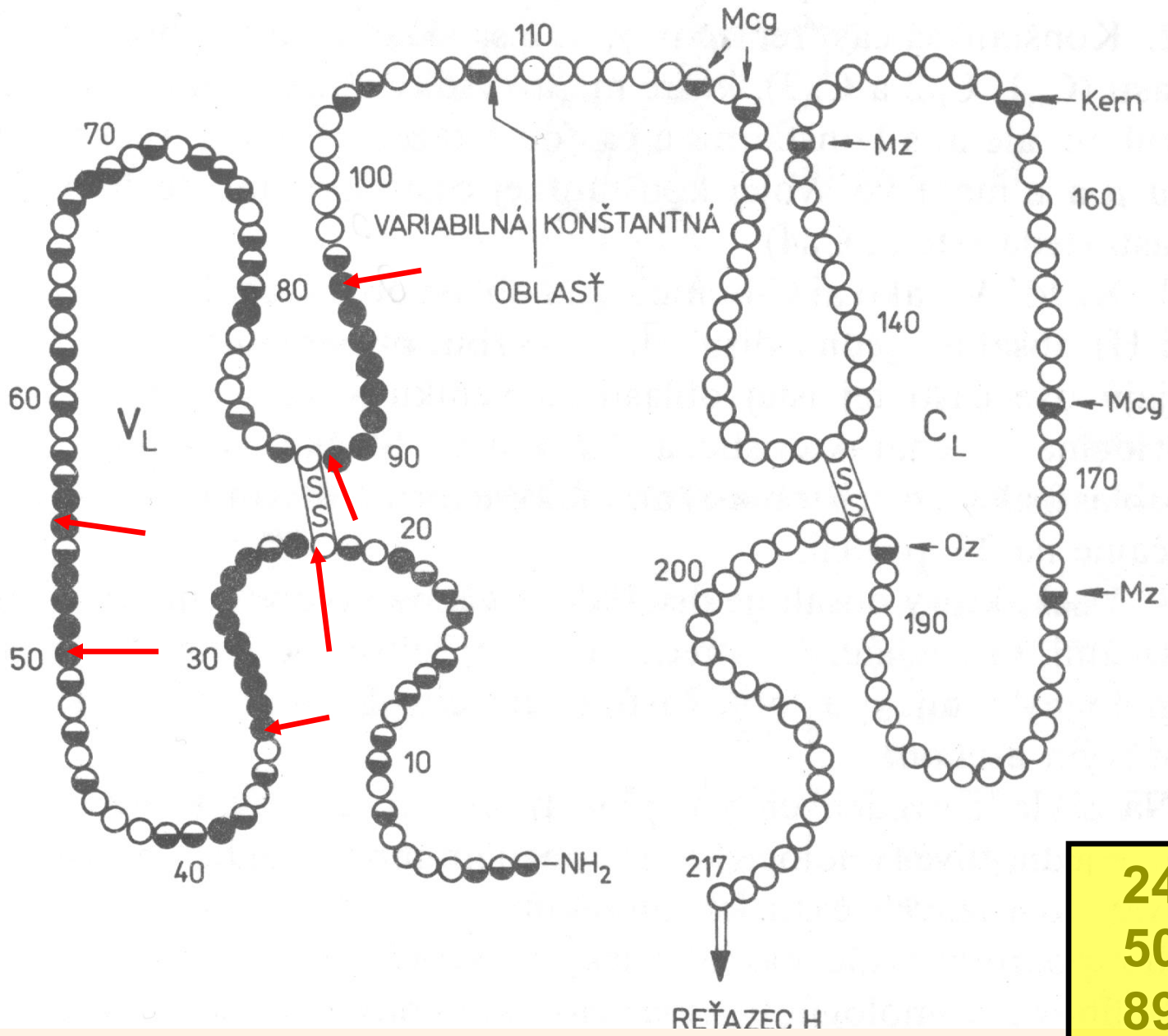
- ✓ výměna jedné AK za druhou- změni vazebné místo
- ✓ variabilní L lidský 65-70 AK
- ✓ jedno místo 2-3 záměna (ne z 20 AK)
- ✓ variabilní část L obsahuje asi **25** hypervariabilních pozic, které jsou spojeny do 3 variabilních úseků:

24 až 34

50 až 55

89 až 96

podobně v těžkých řetězcích

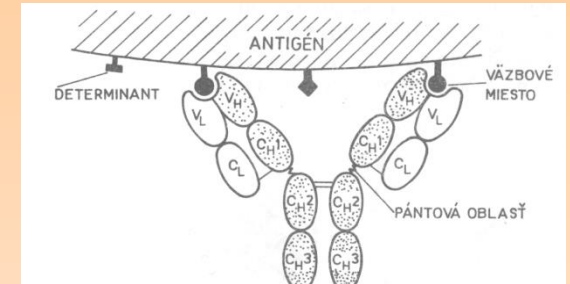


24 až 34
50 až 55
89 až 96

Primární struktura lidského řetězce λ

Prostorové uspořádání Ig

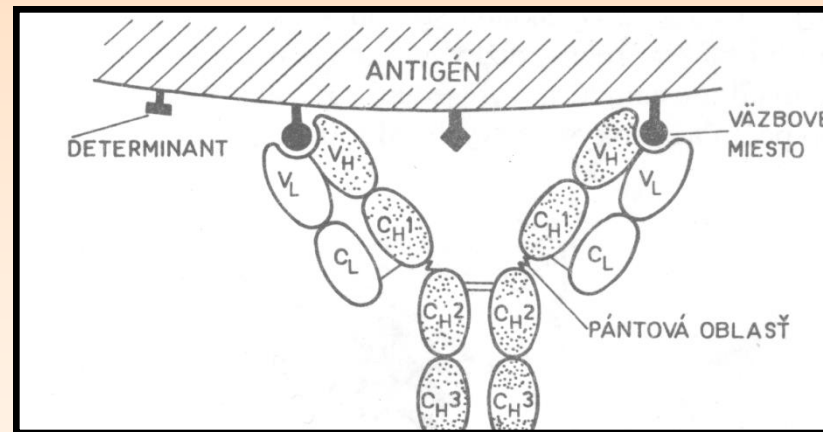
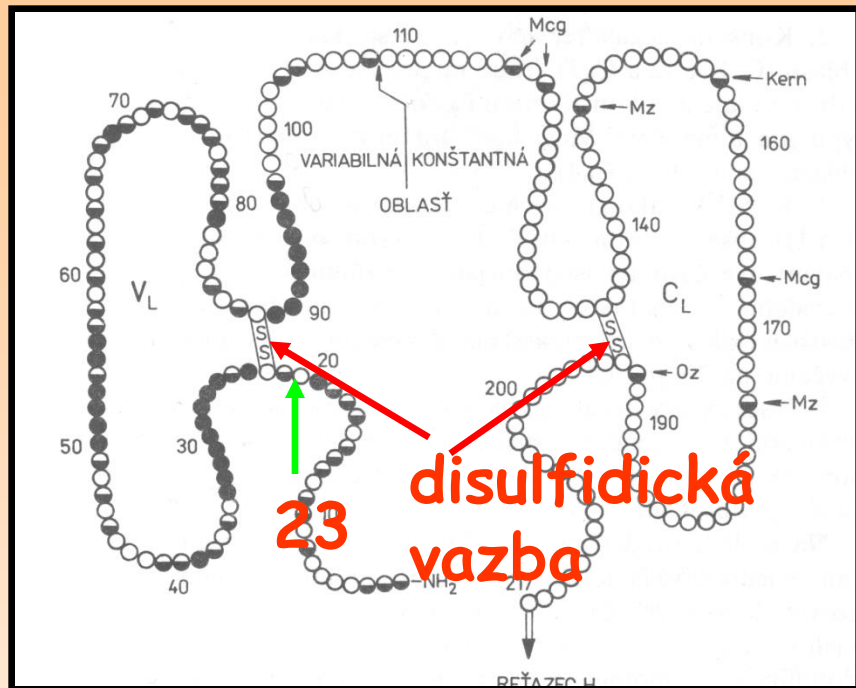
✓ variabilní části L a H jsou homologní (stejné AK)
menší homologie i mezi variabilní a konstantní částí



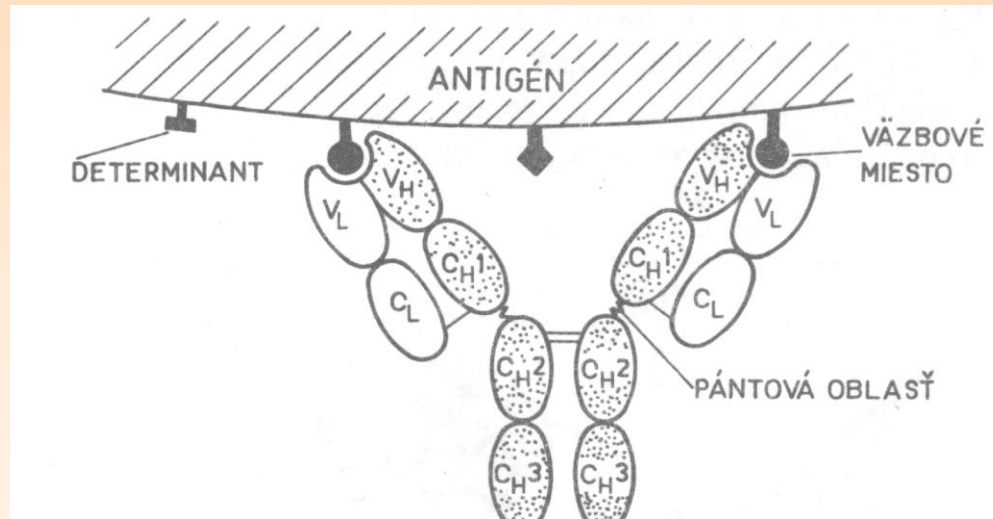
✓ konstantní část γ , α , δ se skládá z homologních oblastí (C_H1, C_H2 a C_H3)
homologie i s konstantní C_L

✓ každá V a C homologní oblast (obou řetězců L,H) má jednu disulfidickou vazbu, spojuje dvě oblasti za vzniku kličky (60 AK) (C) nebo 67 AK (V) počátek na 23 pozici

Prostorové uspořádání Ig



- ✓ Úsek, který obsahuje disulfidické vazby mezi různými řetězci, se nachází uprostřed lineární sekvence H řetězců, není homologní s žádnou částí řetězců L a H a nazývá se **PANTOVÁ OBLAST**



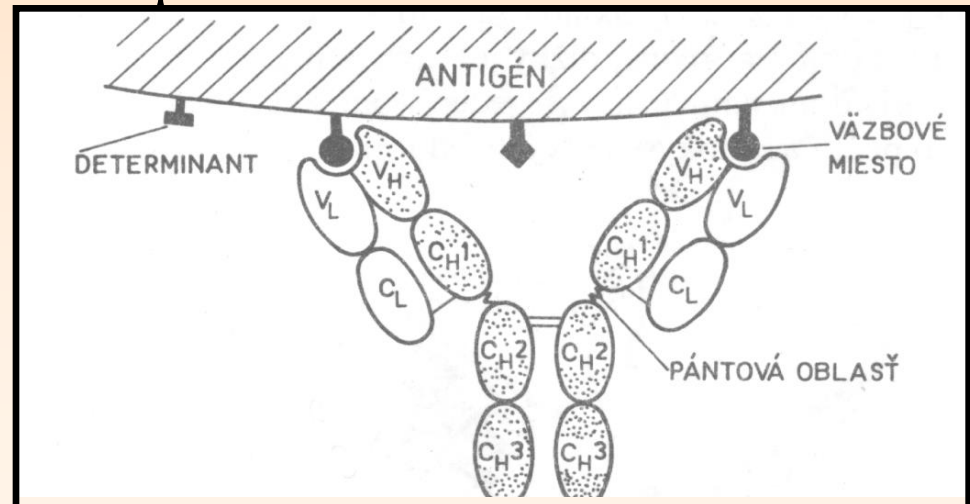
Domény

- ✓ Fyziologické vlastnosti Ig lze lokalizovat do různých jejich částí.
Tyto úseky polypeptidového řetězce Ig s homologní sekvencí nazvány: **DOMÉNY**

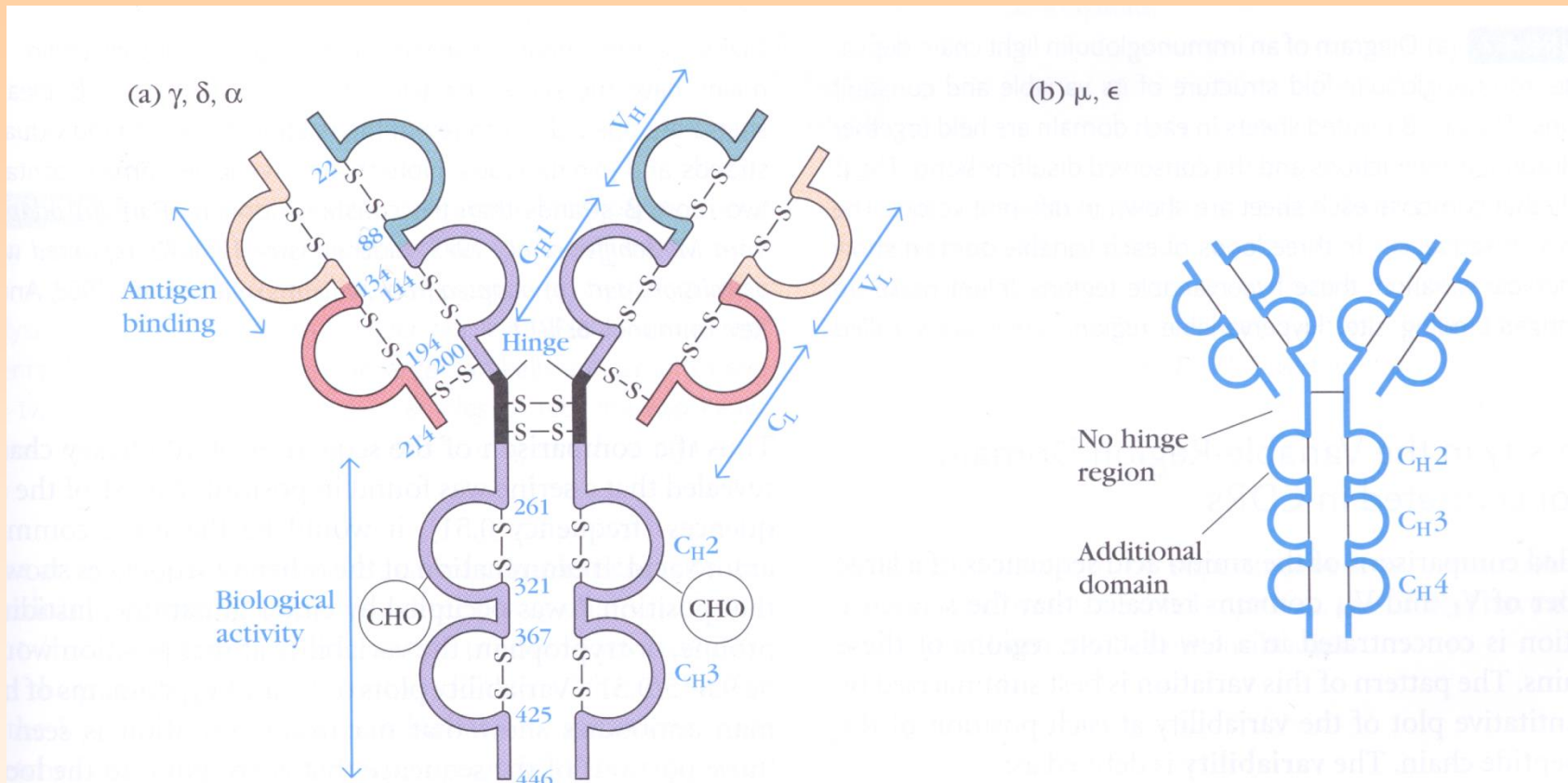
IgG má 6 různých domén:

V_L , V_H , C_L , C_H1 , C_H2 a C_H3

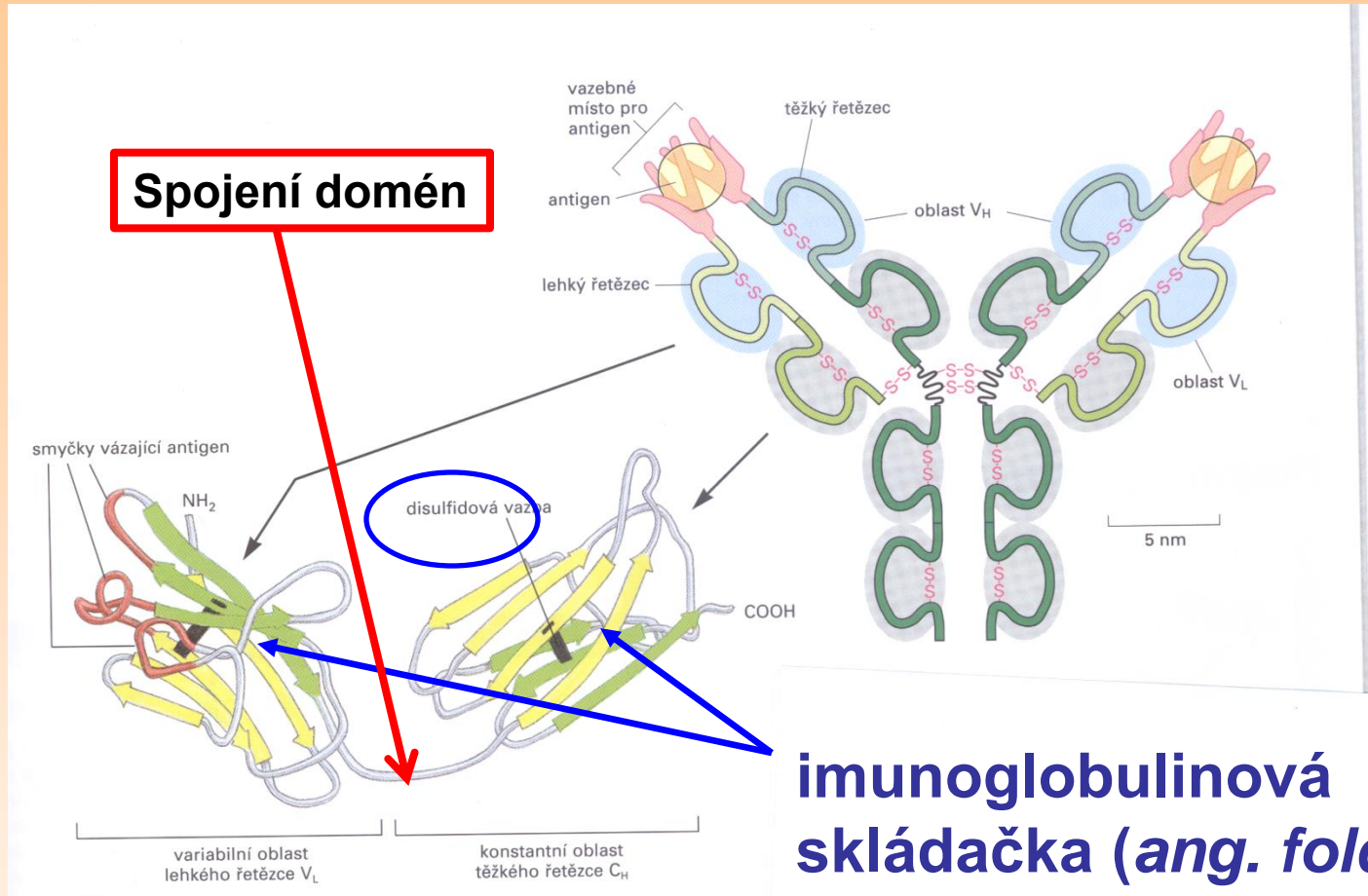
IgM ještě navíc C_H4 v řetězci μ



Domény



Terciální struktura domén



delší segmenty spojené oblouky různého tvaru a délky

Rengenostrukturní analýza Fc-, Fab fragmentu a celých Ig
1975 Poljak, Davies, Edmunson, Huber
Každá doména z L i H má stejné trojrozměrné uspořádání

- ✓ Domény V mají v porovnání s doménami C navíc jeden segment s oblouky, což je způsobeno větším počtem AK.
- ✓ Každou doménu stabilizuje jedna disulfidická vazba uvnitř řetězce.
- ✓ Jednotlivé domény se spojují pomocí kratších méně zprohýbaných řetězců.
- ✓ Sousední segmenty vytvářejí strukturu skládaného listu (β -struktura)
- ✓ Na C_H2 doménu –navazují rozvětvené oligosacharidové jednotky

Interakce mezi doménami

interakcí mezi doménami vzniká definitivní trojrozměrná struktura.

Interakce mezi doménami:

- ✓ **boční (LATERÁLNÍ)**
- ✓ **podélné (LONGITUDINÁLNÍ)**

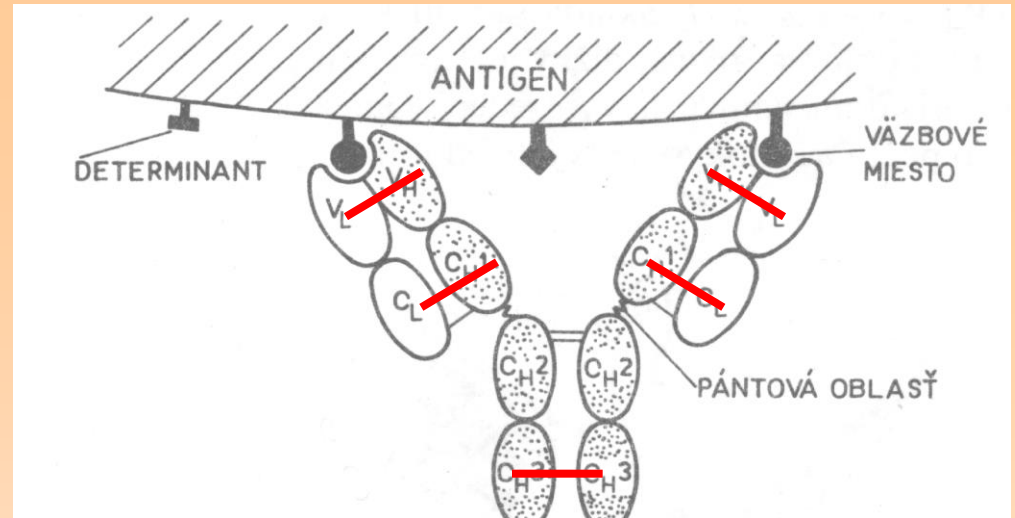
Laterální interakce

vznikají moduly:

$V_L - V_H$

$C_L - C_H1$

$C_H3 - C_H3$



domény C_{H2} jsou izolované, interakci brání oligosacharidové řetězce, které se tu váží neboli

interakce se tu uskutečňují jen prostřednictvím těchto oligosacharidových řetězců

Longitudinální interakce

podél řetězce H nebo L jsou slabší než boční
ovlivňují konformační změny protilátek

Výsledkem podélných kontaktů domén

$V_H - C_H1$ a $V_L - C_L$ je ohýbání modulů:

$V_L - V_H$ a $C_L - C_H1$

ze společné osy o úhel 10 až 45°

Orientace $C_H2 - C_H3$ ovlivňují vnější síly
o úhel $\pm 6^\circ$

Vazebné místo protilátky

- ✓ antigen a protilátka nereagují celým svým povrchem (prostorové důvody)
- ✓ vazebné místo se nachází mezi variabilními úseky H a L řetězce

Historie:

- 1963 **Franěk, Nezlin** přítomnost obou řetězců
- 1970 **Wu, Kabat** hypervariabilní úseky (velká obměna AK)
- **Franěk**: hypervariabilní úseky tvoří vazebné místo protilátky

Hypervariabilní úseky

CDR (z anglického *Complementarity Determining Region*)
(*oblast určující komplementárnost*)

nevariabilní úseky,

které jsou mezi nimi

označení **FR**

(z anglického *Framework Region* =*kostrová oblast*)

Diverzita protilátek

- ✓ změna v primární struktuře protilátek vede ke změně struktury (terciální sféra)
- ✓ změna jedné AK může teoreticky vyvolat změnu v prostorovém uspořádání vazebného místa = změna specifčnosti Ig
- ✓ variabilní části L a H = 25 pozic AK
= 50 pozic
- ✓ v každé pozici možnost 5 AK (ne všech 20)
- ✓ z toho vyplývá množství kombinací
- ✓ organismus člověka 10^6 až 10^7 kombinací (pokryjí všechny potenciálně potřebné Ab)

Velikost vazebného místa

Krystalografickým výzkumem vazebné místo IgG vytváří žlábek nebo vydutost 150 x 60 x 60 nm

Afinita protilátky

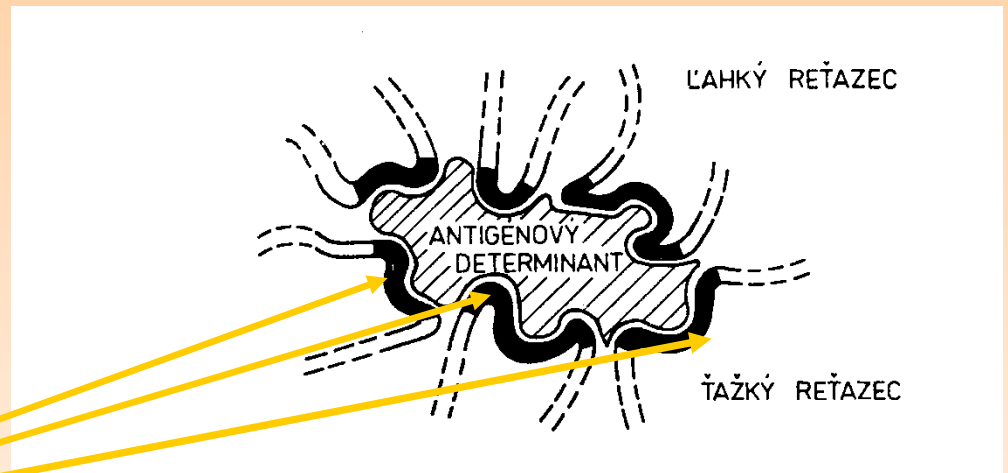
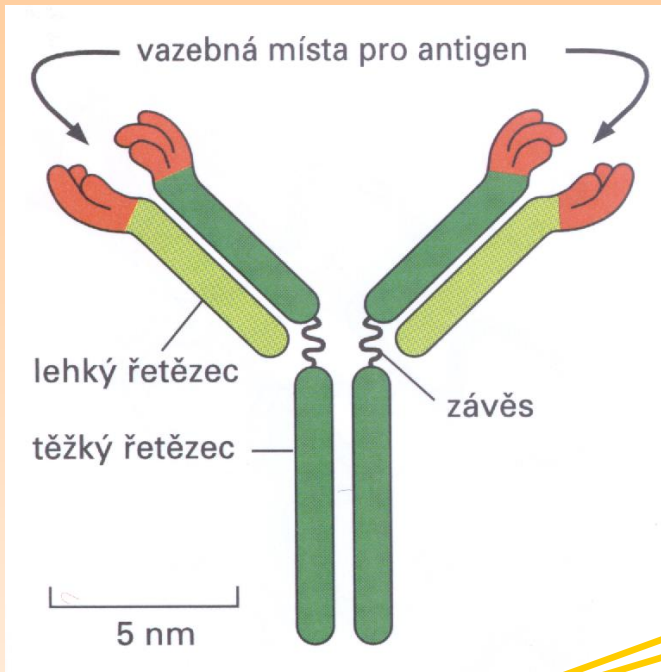
- ✓ na každé vazebné místo se může vázat 1 AD nebo haptén
síla této vazby: afinita protilátky
- ✓ podmiňuje komplementárnost prostorového uspořádání antigenového determinantu a vazebného místa protilátky.

Avidita protilátky

Protilátky mají 2 a více vazebných míst.

Síla vazby mezi celou molekulou protilátky a antigenu: avidita protilátky

Vazebné místo pro antigen



Oblasti CDR vytvářejí v terciální struktuře domén V klíčky blízko sebe na povrchu modulu VL - VH dutina nebo vypouklina mezi hypervariabilními úseky L a H je vazebné místo protilátky

Počet vazebných míst v molekule Ig

- ❑ bivalentní IgG, IgD, IgE, sérový IgA
- ❑ čtyřvalentní sekreční IgA (dimér)
- ❑ desetivalentní IgM

**Počet účinných vazebných míst je menší
(stérické důvody)**

IgM pět vazebných míst

Střední vzdálenost mezi vazebnými místy IgM

Je 1000 nm

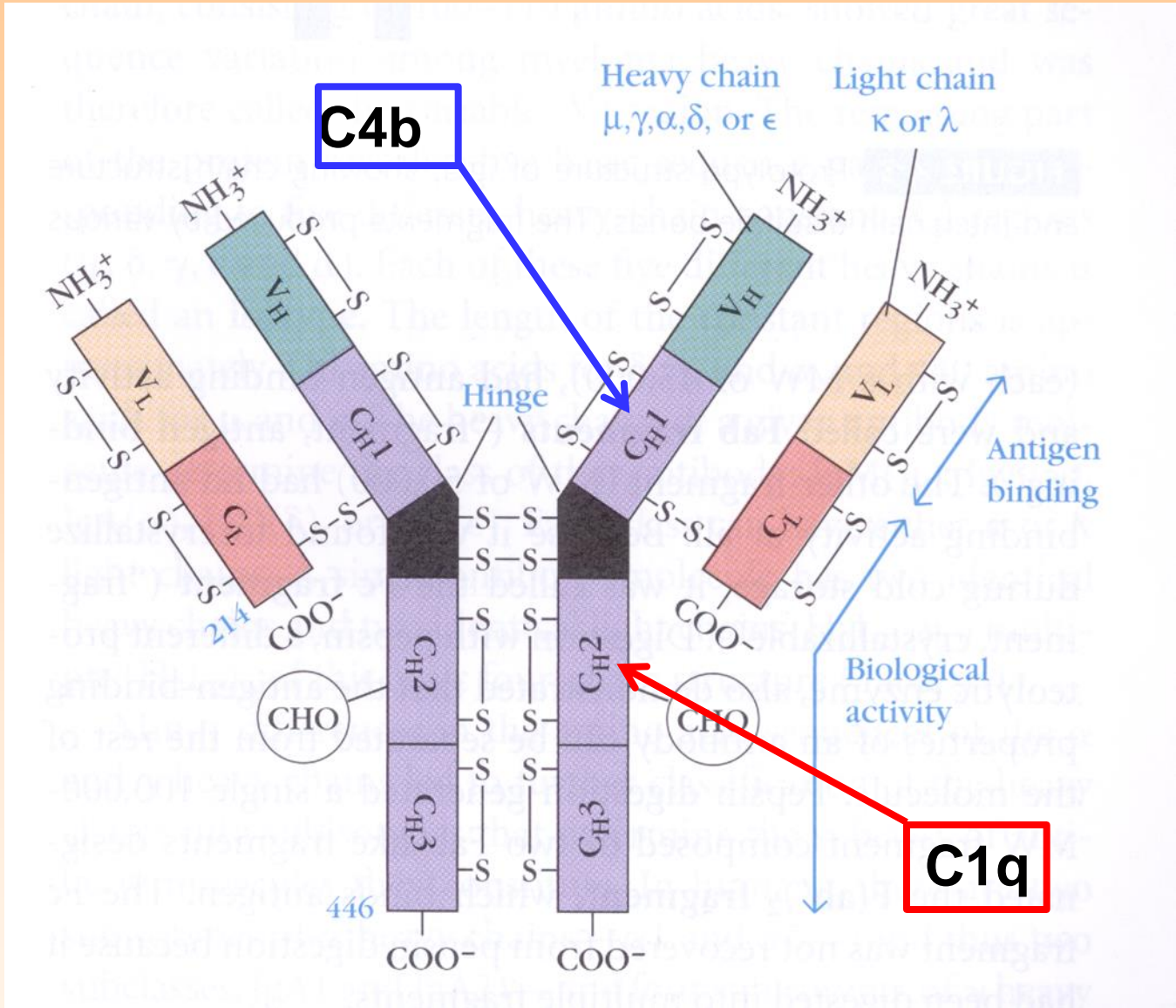
Dvě funkce protilátkové molekuly

- ✓ rozpoznávací **rozpoznat** látku cizího původu
- ✓ efektorová (výkonná) spouští se reakcí s antigenem, zodpovídá za ně jiná část Ig než vazebné místo a její funkcí je **eliminovat** cizí antigen a očistit vnitřní prostředí od cizích a cizorodých složek

Specifické funkce domén

Domény v **Fab** rozpoznávací funkce protilátek
Domény v **Fc** odpovědné za **výkonné** funkce

- ✓ Reakce vazebného místa se specifickým antigenem vyvolá informační signál, který se šíří prostřednictvím bočních nebo podélných mezidoménových interakcí až do oblasti Fc
- ✓ signál vyvolá konformační změny v doméně C_H2 tím se vytvoří vazebné místo pro 1. složku komplementu C1q
- ✓ tím se vyvolá aktivace celé komplementové kaskády, následuje kovalentní vazba fragmentu C4b na doménu C_H1



Jak se usmrcují mikroorganismy, které vnikly do organismu?

- ❖ protilátky tuto schopnost nemají
- ❖ musí se spojit s komplementovým systémem
fagocyty
dalšími imunitními mechanizmy
- ❖ komplement aktivují:
 - klasickou cestou: IgM, IgG1, IgG3, (IgG2 -míň)
schopnost lokalizována v doméně C2 a C3
(Fc oblast)
 - alternativní cesta komplement se navazuje
v jiné části protilátky (H, v pantová oblast)
jiné než IgG nebo IgM

Katabolismus imunoglobulinů

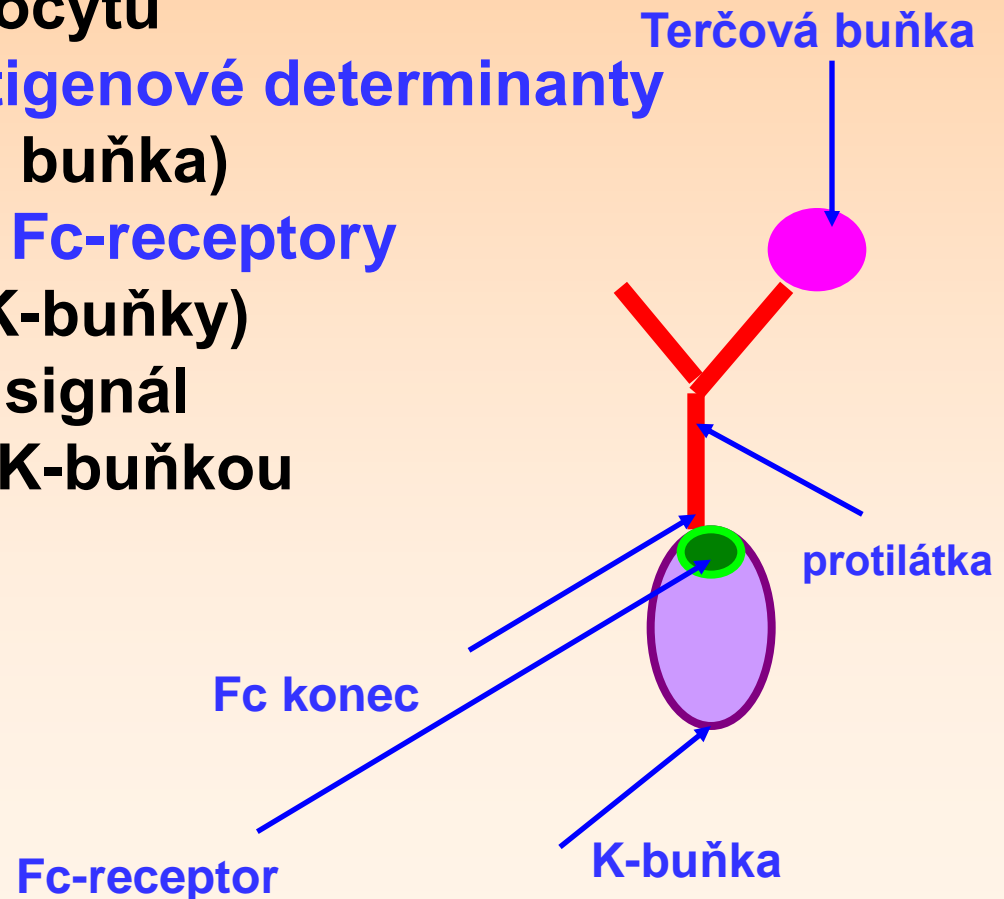
- ✓ **pantová oblast přenáší signál mezi Fab a Fc je místem, kde limitovanou proteolýzou lze rozštěpit IgG a IgD**
- ✓ **IgA (pantová oblast je rezistentní na proteinasy) (obsahuje proliny obalené oligosacharidy)**
- ✓ **IgM a IgE nemají pantovou oblast, 1 doména navíc**
- ✓ **IgM proteinasy štěpí na Fab a kruhový Fc fragment, který může vázat C1q**
- ✓ **proteinasy štěpí Ig-řetězce i na jiných místech**
- ✓ **počátek katabolismu může podnítit vznik imunoregulačních peptidů**

Imunoregulační peptidy

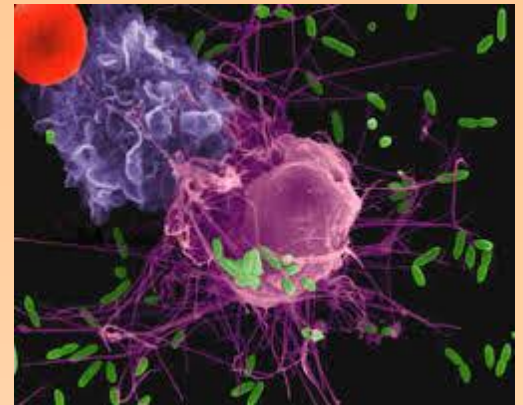
- ✓ **tuftsin** tetrapeptid (Thr-Lys-Pro-Arg)
z C_H2 domén všech 4 podtříd IgG
účastní se regulace fagocytosy
pozice 289-292 v γ_1
- ✓ **rigin** tetrapeptid (Gly-Gln-Pro-Arg)
také stimuluje fagocytosu
v C_H3 doméně těžkých řetězců
všech 4 podtříd IgG
340-343 v γ_1 (první 4 AK)

Cytotropní reakce

- ✓ výkonná funkce imunoglobulinů
C-koncová část řetězce H se navazuje na Fc-receptory na povrchu fagocytů, K-buněk, NK-buněk, T-buněk a mastocytů
- ✓ Protilátka se naváže na **antigenové determinanty** jedné buňky (např. terčová buňka) a Fc-koncem se naváže na **Fc-receptory** na povrchu druhé buňky (K-buňky)
- ✓ vytvoří se **spojující most** = signál k usmrcení terčové buňky K-buňkou



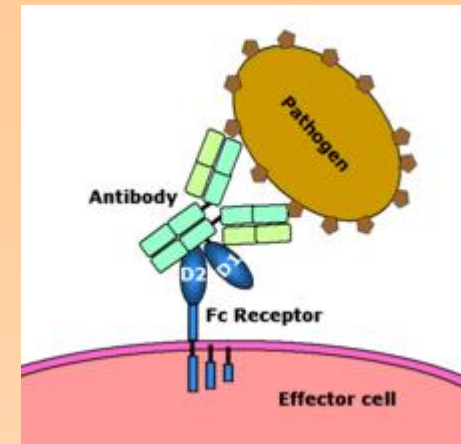
Fagocytosa



- Existence Fc-receptorů na povrchu fagocytů umožňuje rychlé vychytávání cizích částic a molekul z těla.
- Vytvoření imunokomplexů (determinanty + Ig) urychluje fagocytosu.
- Fagocytosa čistého antigenu je pomalejší.
- Domény v Fc oblasti je třeba aktivovat reakcí s antigenem.
- Jen malá část IgG má dostatečnou vazebnou energii, aby mohly spontánně vázat fagocyty to jsou **cytofilní protilátky**.

- ✓ Cytotropní reakce ulehčují fagocytosu **IgG** a **IgM** (IgM ve spolupráci s komplementem).
- ✓ Makrofágy mají na povrchu i Fc-receptory pro **IgE** (obrana proti parazitním infekcím).

Obr. 1



Fc-receptory

polypeptidový řetězec

2 nebo více domén podobných Ig

3 receptory pro Fc domény IgG

FcRI receptor pro IgG1 a IgG3 méně pro IgG4

FcRII a **FcRIII** jen pro IgG1 a IgG3

FcRI –glykoprotein s M_r 50 000 až 60 000.

Nachází se na neutrofilech,

NK-buňkách, eozinofilech a tkáňových

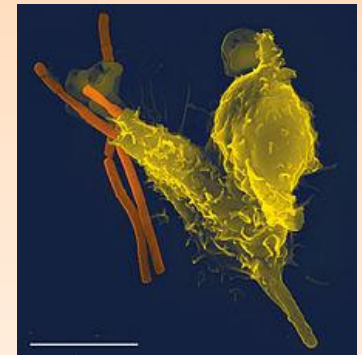
makrofágech

Prostřednictvím tohoto receptoru NK-buňky

uskutečňují cytotoxicitu

a neutrofilny imunitní fagocytosu

Obr. 2



Polypeptidový řetězec
2-3 domény podobné Ig

Obr. 2: Neutrofil v kontaktu s bakterií *Bacillus anthracis*

Fc-receptor pro IgE (Fc_εRI) VÝJIMKA

3 polypeptidové řetězce

- ✓ α -řetězec váže IgE, 227 AK, 30% sacharidů
 M_r 37 000
- ✓ β -řetězec M_r 33 000
- ✓ γ -řetězec M_r 7 000 (2x)

Receptory jen na mastocytech a bazofilech

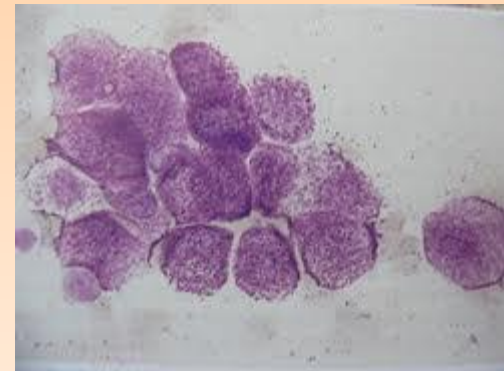
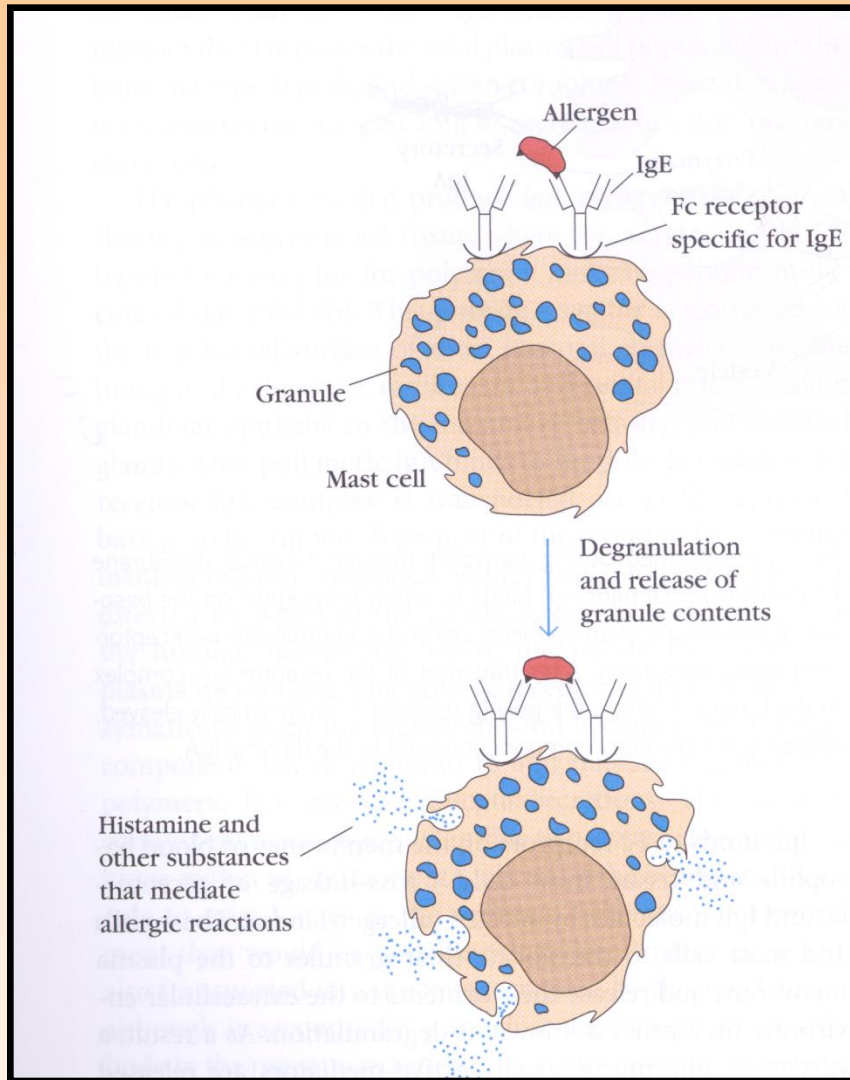
mechanismus:

IgE se Fc koncem naváže na receptor
když dojde k reakci s antigenem, uvolní se
z bazofilů a mastocytů **histamin**

(indikátor přecitlivělosti organismu, který
vyvolá alergickou reakci)

IgE = reagíny

IgE - reaginy



Mastocyty obsahující granula histaminu

Sacharidová složka imunoglobulinů

- ✓ na H řetězec sacharidová složka
- ✓ na γ -řetězec 1 oligosacharid
- ✓ na ostatní několik oligosacharidů

2 typy oligosacharidů:

- Glukosamin G1cN**, váže N-glykosidickou vazbou na asparagin, který má signální sekvenci: Asn-X-Ser/Thr (M_r 2500-3000)
manosové jednotky (dvoj až trojrozměrné)
navazují se na domény řetězců H
- Galaktosamin Ga1N**
váže se na serin nebo threonin O-glykosid.vaz.
pantová oblast IgA1 a IgD na několik míst
vedle sebe (M_r 750)

IgG jen jeden G1cN-oligosacharid (300. pozice γ)
další třídy: 2-5 G1cN-oligosacharidů
 α_1 a δ mají v pantové oblasti 4-5 Ga1N-oligosacharidů

IgG (3 % molekulové hmotnosti)

IgE (13 % molekulové hmotnosti)

Biologické funkce oligosacharidů

- ✓ ulehčují sekreci
- ✓ zvyšují rozpustnost
- ✓ působí jako prostorová mezera mezi doménami
- ✓ ovlivňují přenos signálu z vazebného místa k efektorovým buňkám (oblast Fc)
- ✓ zúčastňují se některých efektorových funkcí (vazba C1q)
- ✓ regulují katabolismus (ochrana před vlivem proteinas)

Vliv sacharidové složky na oběh Ig v organismu

- ✓ **kompletní sacharidová složka- Ig –koluje v těle**
- ✓ **odštěpení posledního sacharidu z Ig, organismus pozná jako cizí a začne celou molekulu Ig odbourávat**
- ✓ **degradace probíhá v játrech (buňky hepatocyty rozpoznají předposlední sacharid jako cizí, stávají se neplnohodnotné a hepatocyty a makrofágy je z oběhu vychytávají)**

Předposlední sacharid:
D-galaktosa a D-manosa

Poslední sacharid:
kyselina sialová a L-fukosa

Kde se v organismu Ig nacházejí?

- tělesné tkáně
- tělesné tekutiny (krev, mozkomíšní mok, sliny)

zastoupení jednotlivých tříd

nejvíce IgG (78 %)

nejméně IgE (0,002 %)

hladiny jednotlivých tříd poskytují obraz o celkové imunologické reaktivitě organismu

výkyvy pod normální hodnoty mají

diagnostický význam (infekce, imunopatologické stavy)

Průměrné hodnoty Ig

Jednotky: g/l nebo IU (mezinárodní jednotky)
Světová zdravotnická organizace doporučila tyto
přepočítávací faktory:

IgG	100 IU/ml	=	8,00 g/l
IgA	100 IU/ml	=	1,42 g/l
IgM	100 IU/ml	=	0,83 g/l
IgD	100 IU/ml	=	0,14 g/l
IgE	100 IU/ml	=	0,0003 g/l

Různé laboratoře a různí výrobci mají přepočítávací
faktory různé, hodnoty v IU/ml jsou porovnatelné.

Kdy se začínají tvořit protilátky?

- Novorozenec má pouze IgG (pasivně přechází přes placentu od matky).
- Plod na konci prenatálního vývinu má vyvinut imunitní systém, ale vyvíjí se ve sterilním prostředí.
- Pro biosyntézu Ig je třeba přítomnost Ag, které stimulují antigensenzitivní buňky.
- V séru novorozence se nacházejí jen IgG od matky.
- Vlastní Ig se syntetizují až po narození, až mikroflóra osídlí sliznice.
- Hladina IgG po narození se snižuje (IgG od matky se rozkládají, vlastní je ještě nestačí nahradit)
- Nejnižší hladina Ig je mezi 3-5 měsícem života.
- Pak dochází ke zvýšení (vlastní biosyntéza), hodnoty se zvyšují, normální hodnoty až v dospělosti.

Gnotobiologie

- Jedinec po porodu by se vyvíjel ve sterilních podmínkách, tak by se tvořilo mnohem méně Ab.
- Jednotlivec = **gnotobiont**.
- Věda, která se tím zabývá **gnotobiologie**.
- Když se gnotobiontonovi vyloučí antigeny z potravy, (krmí se sterilní stravou – nízkomolekulární látky) a zamezí se přítomnosti virusových antigenů, tak se prakticky nebudou syntetizovat Ig.
- Modely gnotobiologických zvířat se využívají v experimentální imunologii a uplatnění nacházejí i v lékařské praxi.

Metabolismus imunoglobulinů

	IgG	IgA	IgM	IgD	IgE
<u>Syntetická rychlost (mg/kg za den)</u>	33	24	6,7	0,4	0,02
Denná syntéza (% z celkového množství nacházejícího se v organizme)	3	12	14	28	65
Katabolická rychlost (% za den)	6,7	25	18	37	89
<u>Polčas biologického rozkladu v dnech</u>	21	5,9	5,1	2,8	2,3
Rozdělení cirkulujících imunoglobulinů (%):					
intravaskulární prostor	50	40	76	75	50
extravaskulární prostor	50	60	24	25	50

Hladiny Ig se určují biosyntetickými a katabolickými procesy za fyziologických podmínek existuje rovnováha.

PŘÍKLAD:

člověk 70 kg:

2310 mg IgG

1 mg = $3,75 \cdot 10^{15}$ molekul IgG

za 1 sekundu vznikne $1 \cdot 10^{14}$ IgG

stejně množství se rozloží

KATABOLICKÉ ODBOURÁVÁNÍ:

- ✓ proteolytické enzymy – intracelulární proteinasy
vzniknou fragmenty – peptidy – aminokyseliny
- ✓ glykosidasy
štěpí sacharidovou složku

Při odbourávání Ig vznikají:

- **L – řetězce:** životnost 0,8 až 1,6 hod
malé množství se nachází v séru a moči
větší množství při onemocnění ledvin
nebo nádor (pak je to syntéza –
Benceho-Jonesovy bílkoviny – monomery
nebo dimery L jen λ nebo κ , nejedná se
o katabolit ale de novo)
odbourávání L v ledvinách
- **celá molekula Ig** v játrech
- **Fab a F(ab)2:** životnost 3,5 – 5 hodin
- **Fc** životnost 11 dní

H a Fc se u zdravých lidí (v séru a moči)
nevyskytují (u pacientů s maligním růstem)
choroba z těžkých řetězců.

Izotypy, alotypy a idiotypy

Ig **podobná struktura**
 některé stejné vlastnosti
ale liší v **protilátkové specifičnosti** mezi nimi je
velká heterogenost
(rozdíly v primární struktuře Ig).

Rozdělení na:

- ✓ třídy
- ✓ podtřídy
- ✓ typy
- ✓ skupiny

rozdílná sekvence aminokyselin
v konstantní nebo variabilní části peptidového řetězce

Řetězec Ig má charakteristické antigenové determinanty. Změna aminokyseliny = změna specificity determinantů. Molekula protilátky (má charakteristické determinanty) může být zároveň **antigenem**.

To znamená, že každá molekula protilátky může mít imunizací protilátky = „**antiprotilátku**“

„antiprotilátku“ = antigenem

imunizací „antiprotilátky“ = „**anti-antiprotilátka**“

Protilátky proti protilátkám dovolují:

- ✓ rozlišit jemné rozdíly mezi původními protilátkami
- ✓ rozdělit Ig na základě antigenových vlastností.

Antigenové determinanty na protilátce

- ✓ izotypové
- ✓ alotypové
- ✓ idiotypové

Změny v pořadí AK konstantních částech těžkých řetězců:

Rozdělení na: třídy
podtřídy

Změny v pořadí AK v konstantních částech lehkých řetězců:

Rozdělení na: typy
podtypy

Změny v konstantní části protilátky

✓ **těžký řetězec:**

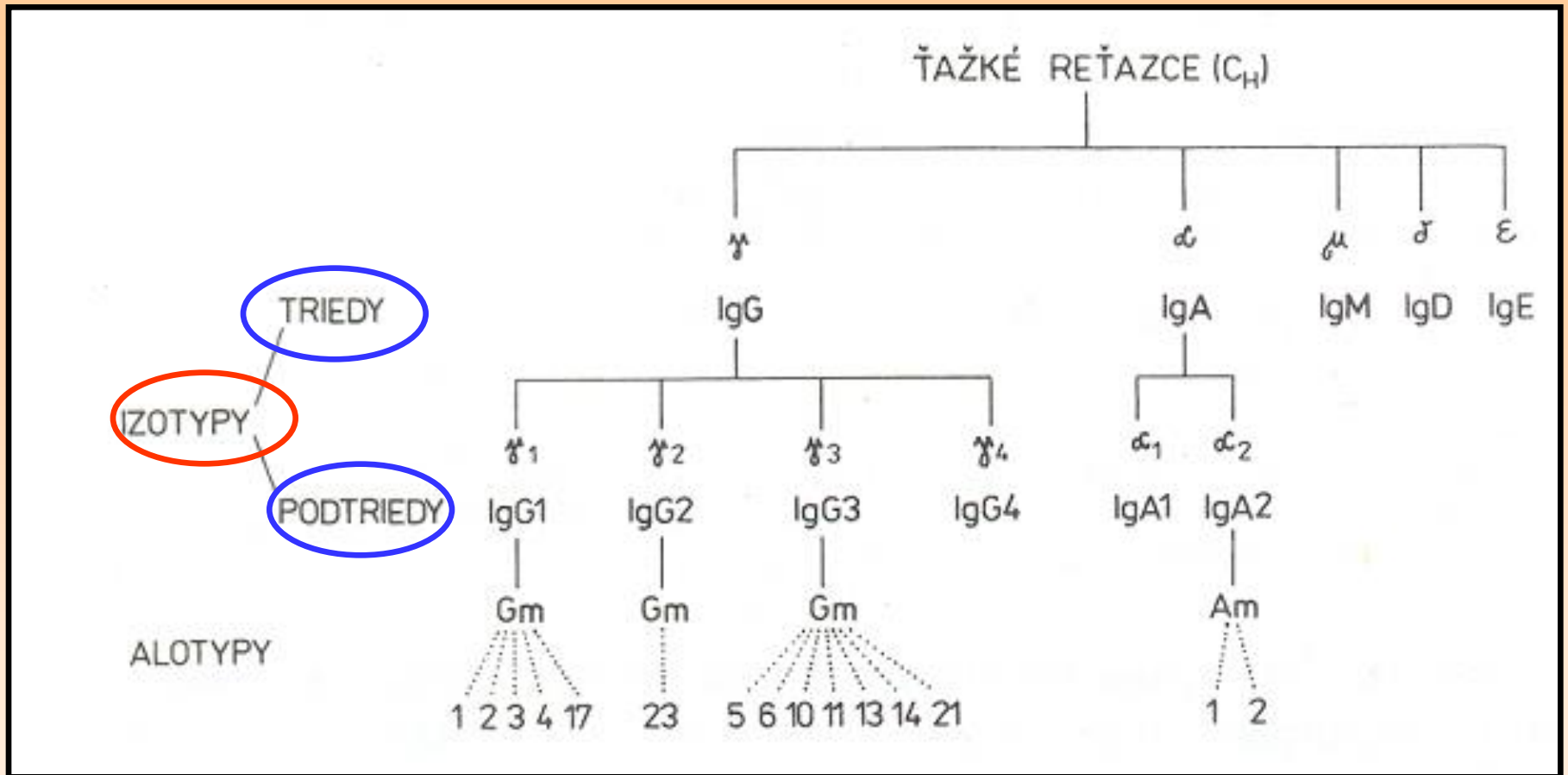
TŘÍDY (IgG, IgA, IgM, IgD, IgE)

PODTŘÍDY (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4,
IgA1, IgA2)

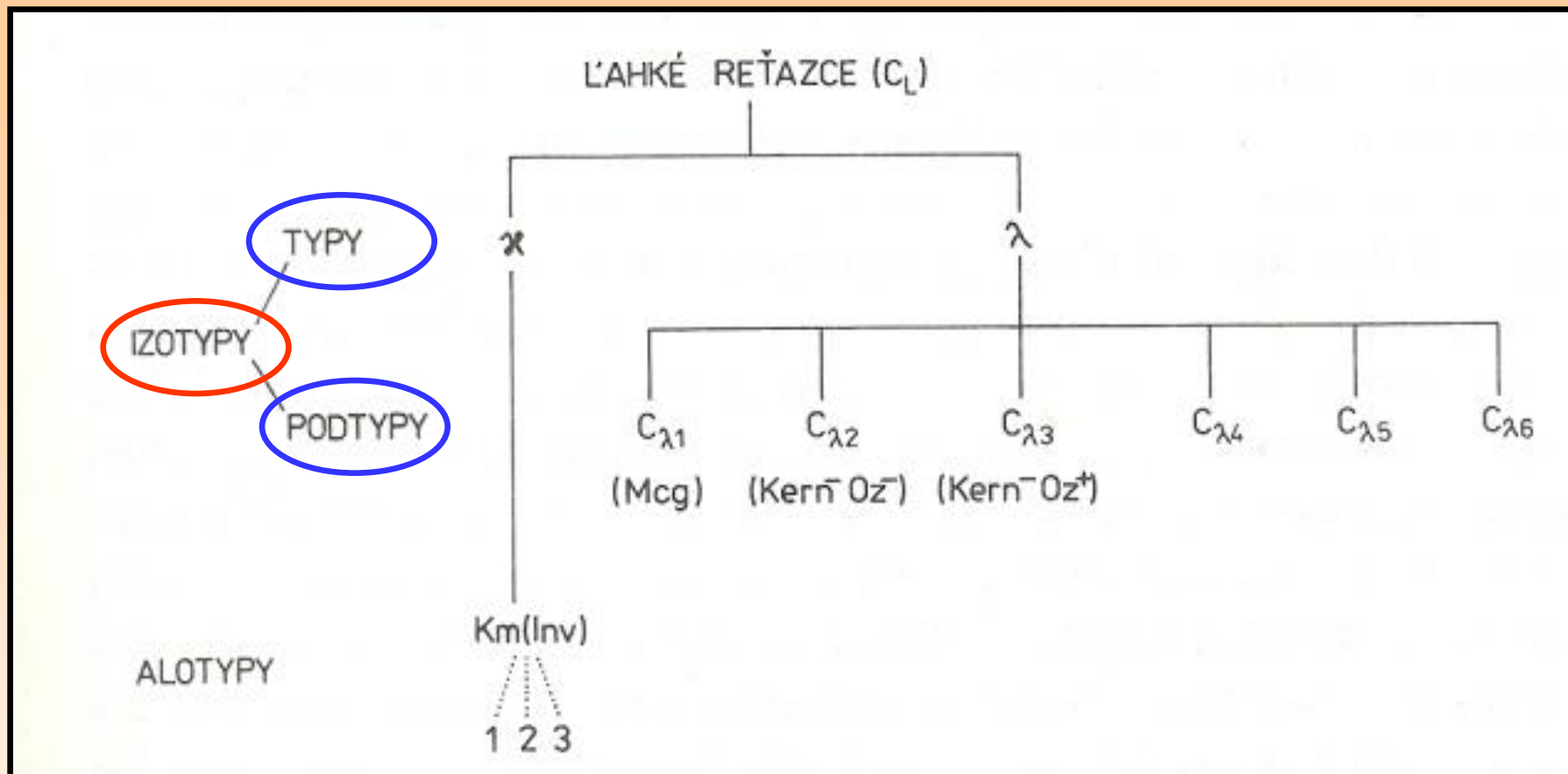
✓ **lehký řetězec:**

TYPY λ a κ

PODTYPY ($C_{\lambda 1}$, $C_{\lambda 2}$, $C_{\lambda 3}$, $C_{\lambda 4}$, $C_{\lambda 5}$, $C_{\lambda 6}$)



změny v konstantních částech těžkých řetězců



změny v konstantních částech lehkých řetězců

Izotypy

Antigenově odlišné varianty Ig, které jsou společné jednotlivcům určitého biologického druhu.

Každý druh má v molekule Ig charakteristické izotypové determinanty, které jsou produkty různých strukturních genů (dokazují se xenogenními antisery).

PŘÍKLAD: králičí sérum proti těžkému řetězci γ lidského IgG specificky reaguje s IgG všech normálních lidských sér ale nereaguje s IgG jiných živočišných druhů.

Alotypy

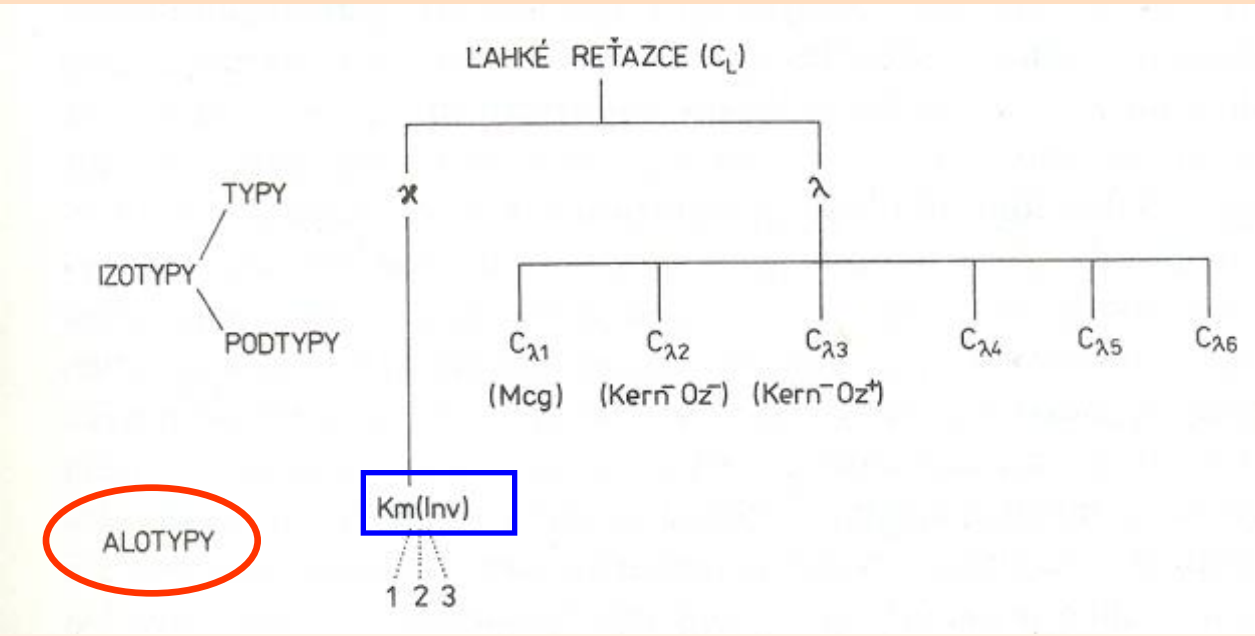
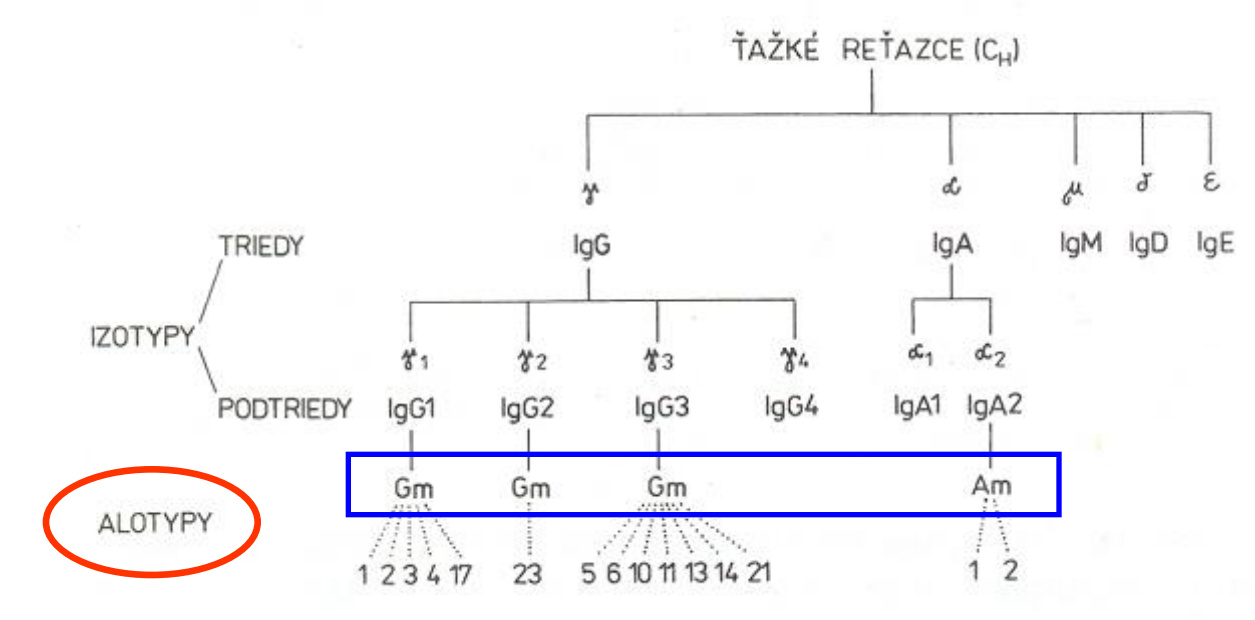
Nejsou přítomné u všech jednotlivců určitého druhu, ale **jen u některých**. Jsou to produkty **jednotlivých alel** určitého strukturního genu. Ve skupině příbuzných jednotlivců se přenášejí jako **genetické znaky** (význam pro imunogenetické charakterizace jednotlivce).

PŘÍKLAD: Ig u člověka:

24 alotypů Gm (spojení z řetězcem γ)

2 alotypy Am (spojení z řetězcem α_2)

3 faktory Km (spojení z řetězcem κ) faktory Inv



Změny ve variabilních částech Ig

Rozdíly ve struktuře variabilních částí řetězců H a L je základem pro rozdělení Ig na:

SKUPINY

PODSKUPINY

IDIOTYPY

Skupiny a podskupiny patří mezi izotypové a alotypové varianty. Charakterizují je determinanty, které jsou specifické pro určitý živočišný druh nebo skupinu jedinců.

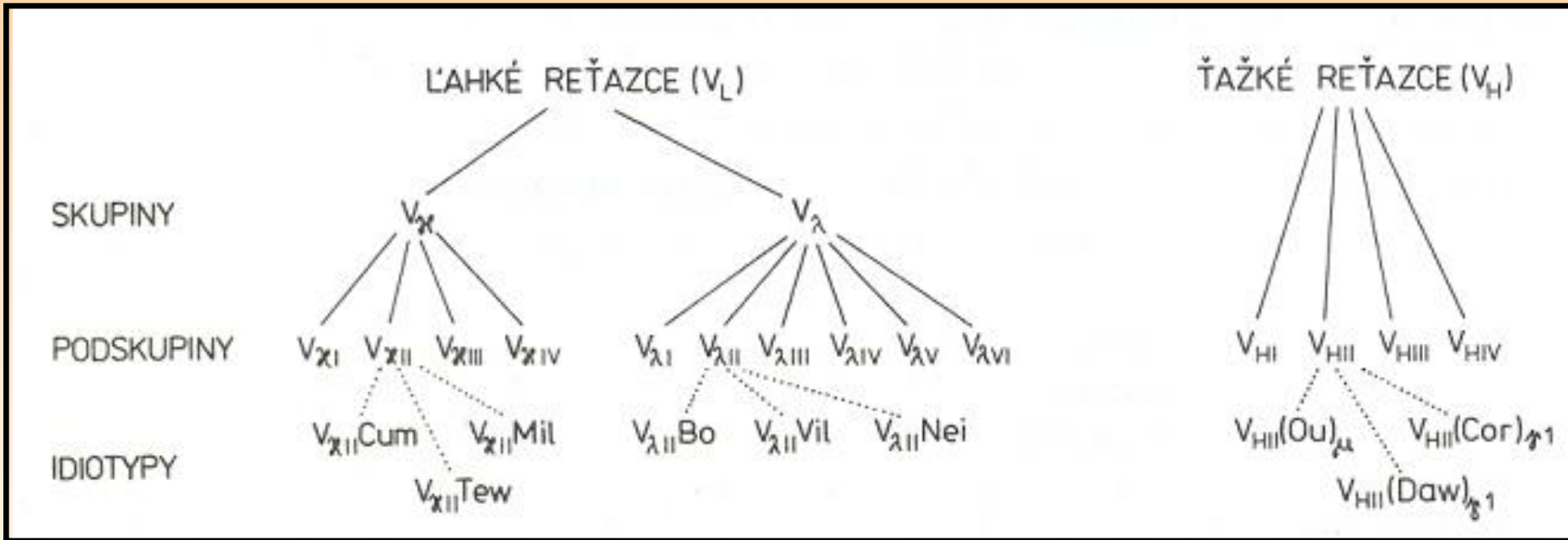


Schéma skupin, poskupin a idiotypů lidských Ig

Idiotyp

Idiotyp soubor determinant v hypervariabilních úsecích Ig.

Antigenový determinant = epitop (podle JERNEHO)

Epitop v hypervariabilních úsecích Ig = **idiotop**

Soubor idiotopů = **idiotyp**

Jednotlivec má soubor idiotypů, které odráží jeho **kontakty s určitými antigeny**, ale je také pod **vlivem genotypu**.

Idiotopy se nacházejí.

- ✓ v hypervariabilních úsecích
- ✓ FR oblasti (kostrová oblast)
- ✓ i úseky z konstantní části řetězce

Poznámka:

Idiotypy vytváří prostorové uspořádání řetězců a jejich vzájemná interakce, tedy komplex konformačních determinantů.

Molekuly stejného idiotypu mohou mít různý izotyp (patří k různým třídám Ig)

a také určitý idiotyp může být společný Ig více druhům nebo jednotlivcům.

Rozdělení idiotypů


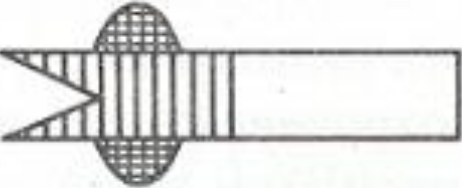
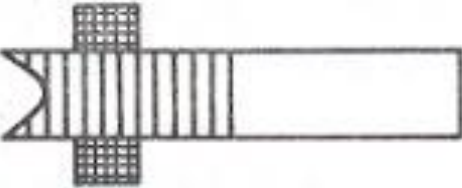
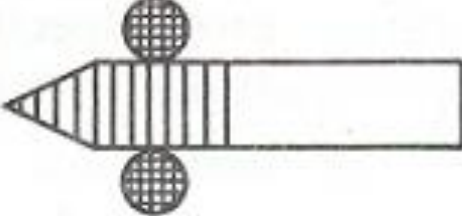
- ✓ **dominantní veřejné**, jsou společné protilátkám různých jednotlivců a druhů (křížově reagující idiotypy)
- ✓ **individuální privátní**, se nacházejí jen na jednotlivých protilátkách nebo malém množství molekul
- ✓ **regulační**, které určují idiotopy nacházející se mimo vazebné místo protilátky

Proti-protilátky

Každý **idiotop** může rozpoznat komplementární **paratop** (vazebné místo) na molekule protilátky, které se nazývá anti-idiotypová protilátka, je to zrcadlový obraz idiotypu = proti-protilátky.

Dva typy proti-protilátek:

- ✓ α , má paratop, který specificky rozpozná idiotop nacházející se v jiné části variabilní oblasti jako je vazebné místo
- ✓ β , má paratop specificky komplementární vazebnému místu první protilátky, má stejnou prostorovou strukturu jako měl původní antigenový determinant

ANTIGÉN Ag	PROTILÁTKA Ab1	PROTI - PROTILÁTKA Ab2
 <p data-bbox="189 686 285 725">NOSIČ</p> <p data-bbox="471 686 697 768">ANTIGÉNOVÝ DETERMINANT</p> <p data-bbox="471 815 606 853">HAPTÉN</p> <p data-bbox="471 896 595 935">EPITOP</p>	 <p data-bbox="710 686 904 768">VARIABILNÁ ČASŤ</p> <p data-bbox="962 686 1188 768">KONŠTANTNÁ ČASŤ</p> <p data-bbox="710 815 846 853">IDIOTYP</p> <p data-bbox="710 896 846 1006">VÄZ- BOVÉ MIESTO</p> <p data-bbox="710 1049 846 1159">V-ANTI- GÉNOVÝ ZNAK</p> <p data-bbox="710 1220 826 1292">PARA- TOP</p>	 <p data-bbox="1304 549 1651 635">α - ANTI - IDIOTYPOVÁ PROTILÁTKA</p>  <p data-bbox="1304 1006 1651 1092">β - ANTI - IDIOTYPOVÁ PROTILÁTKA</p> <p data-bbox="1304 1135 1632 1163">„HOMOPROTILÁTKA“</p> <p data-bbox="1304 1220 1632 1306">„VNÚTORNÝ OBRAZ ANTIGÉNU“</p>

- ❖ β -anti-idiotypové protilátky mají paratop specificky komplementární vazebnému místu první protilátky,
- ❖ vazebné místo β -anti-idiotypové protilátky má stejnou prostorovou strukturu jako antigenový determinant, který navodil vznik první protilátky.
- ❖ nazývá vnitřním obrazem antigenu
- ❖ β -anti-idiotypové protilátky se mohou použít k přípravě umělých vakcín (když není k dispozici původní antigen).

antigen

protilátka

β -protiprotilátka

mají stejné vazebné místo (stejná specifičnost)