

VZTAH ANTIGEN-PROTILÁTKA

Reakce antigenů s Ab:

- ✓ ***in vivo*** - reakce prospěšná (vznik imunity)
 - reakce škodlivá (imunopatologická)
 - reakce indiferentní (neodpovídá)

- ✓ ***in vitro*** – základ imunochemických metod

Základem reakcí v imunochemii

je vznik biospecifické vazby

mezi vazebnými místy protilátky a determinantními skupinami antigenu za vzniku protilátkově-antigenních komplexů (imunokomplexů)

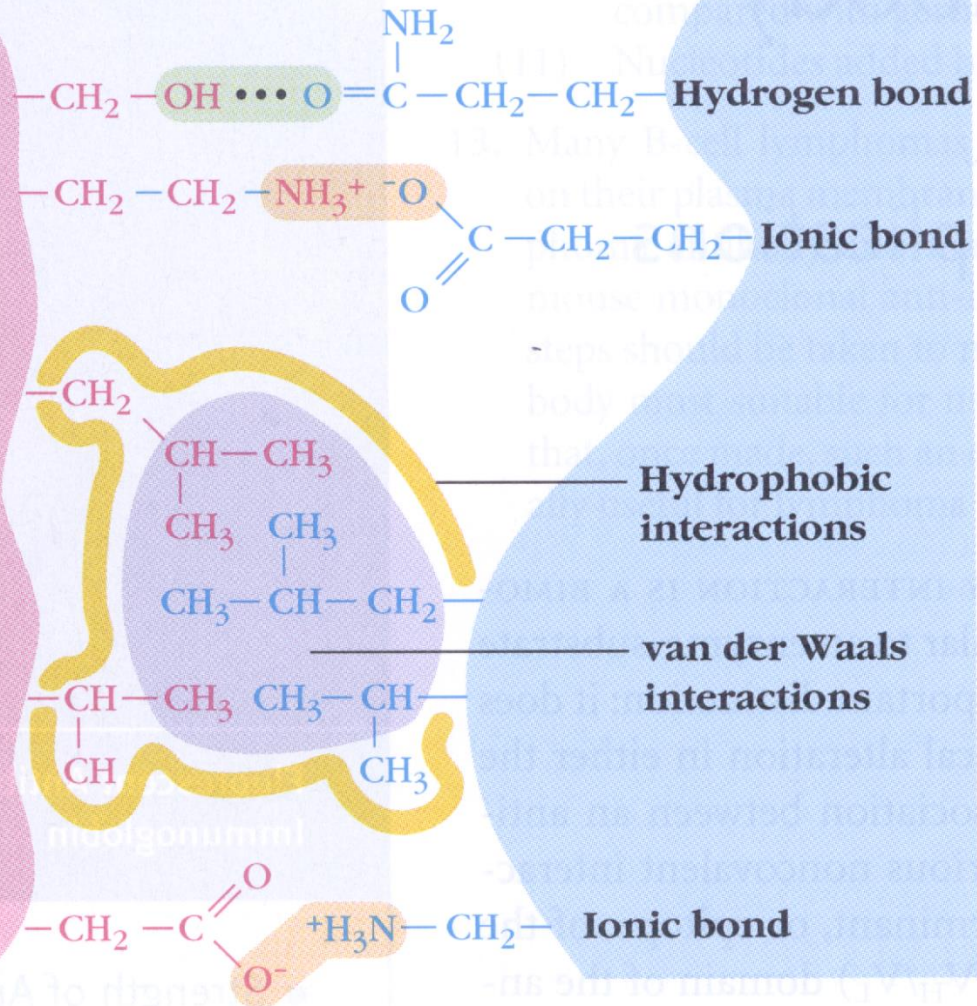
- ✓ **nekovalentní interakce (podobně enzymy, hormony)**
- ✓ **struktura antigenu se nemění irreverzibilně**

Síly, které se uplatňují při interakci Ag-Ab

- ✓ **vodíkové vazby**
- ✓ **nepolární hydrofobní interakce**
- ✓ **Coulombovy síly**
- ✓ **van der Waasovy síly**
- ✓ **Londonovy disperzní přitažlivé síly**
- ✓ **stérické odpudivé síly**

ANTIGEN

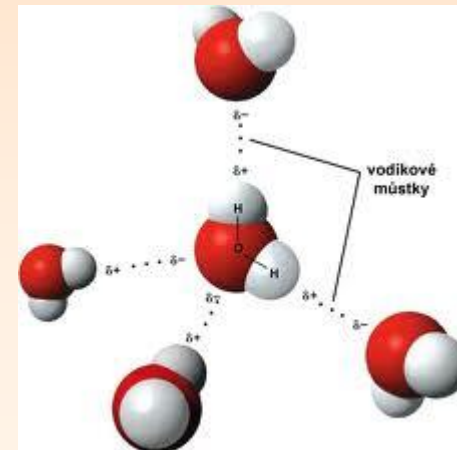
ANTIBODY

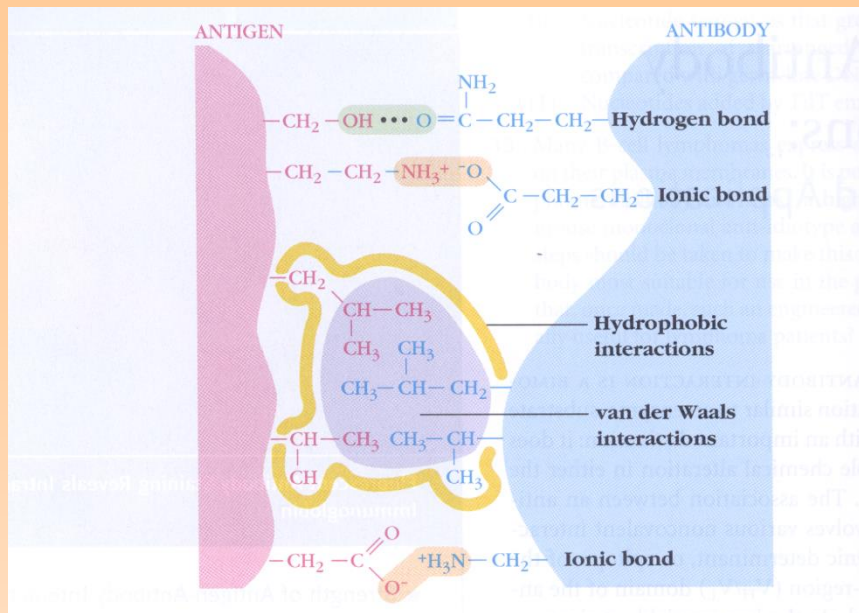


Vodíkové vazby

interakce elektronově deficitního protonu se dvěma atomy s velkou elektronovou hustotou

V případě proteinů se vodíkové můstky tvoří mezi hydrofilními skupinami (-OH, -NH₂, -COOH)





Hydrofóbní interakce

- ✓ při dostatečném přiblížení dvou hydrofóbních povrchů
- ✓ účast aminokyselin (leucin, izoleucin, valin a fenylalanin)
- ✓ molekuly proteinů ve vodném prostředí se snaží zaujmout takovou polohu, aby jejich hydrofóbní skupiny byly co nejbližší sobě, čímž se vyloučí nebo omezí kontakt s molekulami vody.
- ✓ tím dostávají do energeticky výhodnějšího stavu (entropie)
- ✓ hydrofóbní interakce patří v reakcích antigenů a protilátek k nejvýznamnějším

Coulombovy síly

- ✓ vznik na základě vzájemného přitahování opačně nabitých funkčních skupin nebo molekul
- ✓ koncové aminokyselinové jednotky (lysin, arginin, histidin, kyselina asparagová a kyselina glutamová)
- ✓ mají menší vliv než hydrofóbní interakce.

Proti kladně nabitým hapténům vzniknou záporně nabitě protilátky

VAN DER WAALSOVY SÍLY

- ✓ Náboj na jedné molekule nebo atomové skupině může indukovat vznik dipólu na druhé molekule.
- ✓ Vzájemné ovlivňování elektronových oblaků **dvou polárních** skupin atomů.
- ✓ Výsledkem působení jednoho elektronového oblaku na druhý je vznik oscilujících dipólů na obou skupinách.
- ✓ Vzniklé dipóly se vzájemně přitahují na místech, kde mají opačně nabitě náboje.

VAN DER WAALSOVY SÍLY se uplatňují hlavně při **stabilizaci imunokomplexů**

LONDONOVY DISPERZNÍ SÍLY

- ✓ Při interakci elektronových oblaků **dvou nepolárních skupin** atomů vznikají podobné přitažlivé síly.
- ✓ Disperzní síly jsou podmíněné fluktuacemi elektronů, uplatňují bez vzniku permanentních dipólů

Síla vazby se zvyšuje se zmenšováním vzdálenosti mezi reagujícími skupinami:

Coulombovy interakce $F = 1/d^2$

disperzní síly $F = 1/d^7$

F... přitažlivá síla

d... vzdálenost mezi náboji

coulombovské síly působí na větší vzdálenost než disperzní síly

- ✓ **Síla vazby se výrazně zvyšuje se zmenšováním vzdálenosti mezi reagujícími skupinami.**
- ✓ **Požadavek na co nejtěsnějšího přiblížení obou reagujících skupin, aby se mohly přitažlivé síly uplatnit.**
- ✓ **Ale, aby se mohly uplatnit, musí překonat stérické odpudivé síly**

STERICKÉ (PROSTOROVÉ) ODPUDIVÉ SÍLY

- ✓ Vznikají mezi dvěma atomy, které nejsou spojené chemickou vazbou na základě vzájemného prolínání jejich elektronových oblaků.
- ✓ Čím větší komplementárnost mají oba typy oblaků, tím menší odpudivé síly jsou mezi nimi.
- ✓ Základní faktor, podle kterého se protilátka vybírá vhodný antigen pro interakci.
- ✓ Nespecifické antigenové determinanty nemají vazebná místa na molekule protilátky, velké odpudivé síly mezi nimi, brání nebo omezují tvorbu vazby na minimum (křížové reakce).
- ✓ Elektronové obaly determinantu a vazebného místa Ab komplementární, odpudivé síly jsou malé, mohou převládnout přitažlivé síly, které pak realizují imunspecifickou vazbu.

Protilátka má pro antigen vysokou afinitu.

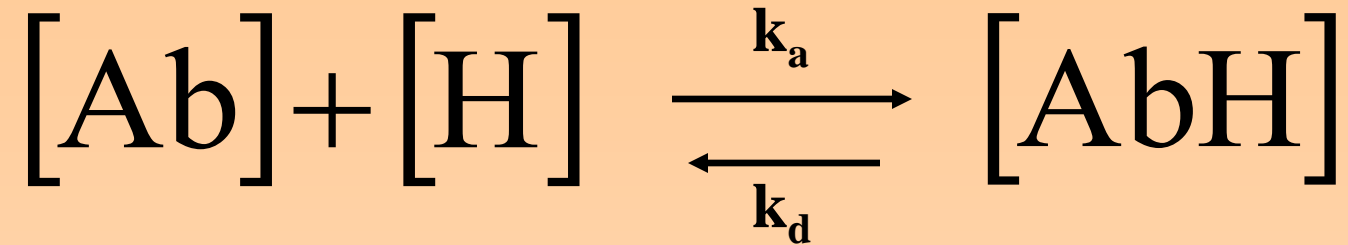
**Při reakci Ab a Ag nevznikají kovalentní vazby ,
ale jen ty výše zmíněné.**

Rovnovážné konstanty

antigenový determinant + vazebné místo Ab

H + Ab

vzniká rovnovážný vztah



Hranaté závorky: rovnovážné molární koncentrace

k_a asociační konstanta

k_d disociační konstanta

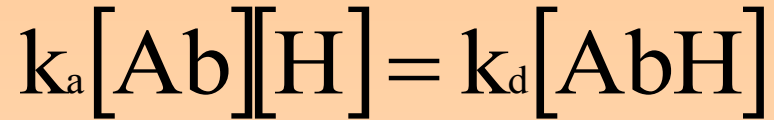
Guldbergův-Waagův zákon:

rychlost tvorby komplexu je úměrná koncentraci obou reagujících složek

rychlost asociace: $k_a [Ab][H]$

rychlost disociace: $k_d [AbH]$

Při rovnováze se rychlost asociace = rychlosti disociace



nebo

$$\frac{k_a}{k_d} = K = \frac{[AbH]}{[Ab][H]}$$

Kde K je rovnovážná **asociační konstanta** charakterizuje efektivnost vazby a její hodnoty při reakci antigenů a protilátky se pohybují v rozsahu 10^5 až 10^{11} mol/l.

Termodynamické stanovení K:

Zjednodušení: předpoklad:

- monovalentní haptén
- monoklonální Ab (nebo konveční)

Provedení:

- smíchání H a Ab, po ustálení rovnováhy se změří konc. H volného a vázaného v komplexu
- hodnoty se dosadí do Scatchardovy nebo Langmuirovy rovnice a z ní se určí K
- rovnice lze odvodit Guldberrwaagova zákona

$$\frac{[\text{AbH}]}{[\text{Ab}]} = r = \frac{nK[\text{H}]}{1 + K[\text{H}]}$$

r jsou moly hapténu vázaného jedním molem protilátky

[H] molová koncentrace volného hapténu

n valence protilátky

z toho vztahu vyplývá:

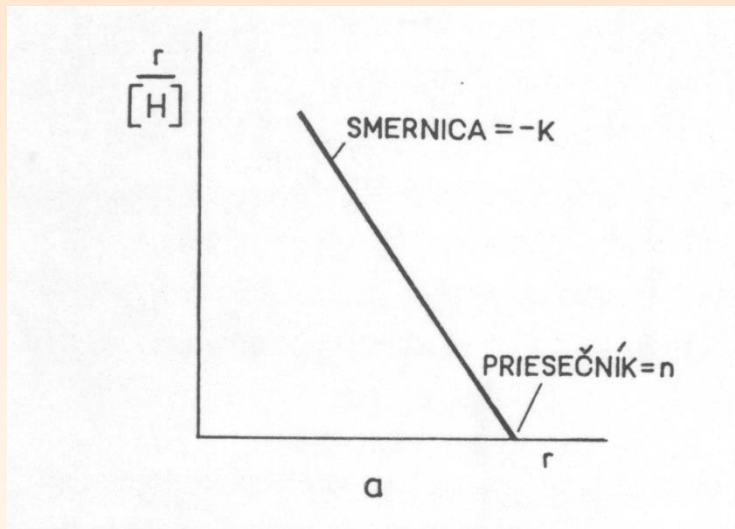
$$\frac{r}{[\text{H}]} = nK - rK$$

$$\frac{r}{[H]} = nK - rK$$

SCATCHARDOVU rovnici lze graficky znázornit jako:

závislost $\frac{r}{[H]}$ **na** **r**

Ze získané přímky lze spočítat K a také n



SCATCHARDOVA a LANGMUIROVA rovnice

- charakterizuje obecně jakoukoliv vazbu ligandu na specifické vazebné místo (také enzym-substrát atd.)
- enzym-substrát jsou rovnice přímky
- protilátky a haptény odchylky od přímky

Příčina: heterogenita protilátek nerovnocennost vazebných míst

- všechny molekuly protilátek nemají stejnou afinitu k hapténu
- výsledkem je křivka místo přímky, která nedovoluje určit K .

Vyřešení problému pomocí GAUSSOVY nebo SIPSOVY DISTRIBUČNÍ FUNKCE

Afinita

intenzita interakce mezi vazebným místem protilátky a determinantem antigenu (haptenem)
Afinita je termodynamické vyjádření primární vazebné energie pro jeden determinant antigenu.

Standardní chemická afinita $A^\circ =$ afinita
(termodynamika) (v imunologické terminologii)

$$A^\circ = -\Delta G^\circ$$

(Gibbsova energie)

$$-\Delta G^\circ = RT \ln K$$

R je plynová konstanta

T je teplota

K rovnovážná asociační konstanta

$$-\Delta G^{\circ} = RT \ln K$$

Čím má protilátka vyšší afinitu, tím zápornější bude hodnota ΔG° .

GIBBSOVA energie má dvě složky: - ENTALPII (H)
- ENTROPII (S)

$$\Delta G = \Delta H - T \Delta S$$

ΔH je změna entalpie, teplo absorbované nebo uvolněné při asociaci

záporné hodnoty ΔH = exotermická reakce
(uvolnění tepla)

kladné hodnoty ΔH = endotermická reakce
(absorpce tepla)

- ✓ Standardní **změnu entalpie** lze vypočítat z tepelné závislosti asociační konstanty

$$\frac{d \ln K}{dT} = \frac{\Delta H^\circ}{RT^2}$$

- ✓ změřit se kalometricky

Entropie vyjadřuje stupeň uspořádanosti systému:
čím je větší (neuspořádanost systému)
tím je větší je její pravděpodobnost

Vznik vodíkové vazby

-záporná ΔH° a ΔS°

Hydrofóbní interakce

-slabě kladná ΔH° a

-silně kladná ΔS°

Coulombovské interakce

**-kladná ΔS° (rozrušení
uspořádanosti molekul vody)**

**Přítomnost nepolárních látek zvyšuje sílu CI
a snižuje sílu hydrofóbních interakcí.**

**Zvýšení iontové síly prostředí zvyšuje sílu
hydrofóbních interakcí (snižuje sílu CI).**

Avidita

Antigeny obsahují **několik** determinantů, proto se zavádí pojem avidita, který charakterizuje vazebnou energii mezi komplexním antigenem a protilátkou.

Avidita je závislá na afinitě, ale bere v úvahu **valenci** antigenu a protilátky i **nespecifické faktory**, které ovlivňují vazby mezi antigenem a protilátkou.

Valence protilátky.

počet vazebných míst na její molekule,
která jsou schopna reagovat
s determinantami určitého antigenu

Valence antigenu:

počet determinantních skupin, které se mohou
vázat s protilátkou

Nespecifické faktory:

interakce jiných částí molekul, než je vazebné
místo protilátky a antigenový determinant

Při reakci kompletního antigenu s protilátkou se uskutečňují **multivalenční interakce** (ne jen specifická reakce mezi vazebným místem a determinantní skupinou)

afinita \neq avidita

IgM vazebná místa mají **stejnou afinitu** pro antigen jako IgG, ale pro multivalenční antigen budou mít **vyšší aviditu** jak IgG
Protilátky IgM jsou víc avidické (mají víc vazbových míst a větší molekulu a tím i větší schopnost vázat antigen)

Jak se měří afinita protilátek?

Mírou afinity je rovnovážná konstanta mezi Ab a Ag
Při několika koncentracích antigenu se změní množství volného a vázaného antigenu po dosažení rovnovážného stavu.

Komplikace:

sekundární jevy:

- ✓ precipitace
- ✓ aglutinace
- ✓ nespecifické interakce imunoglobulinů s Fc-receptory a složkami komplementu

Metody stanovení afinity:

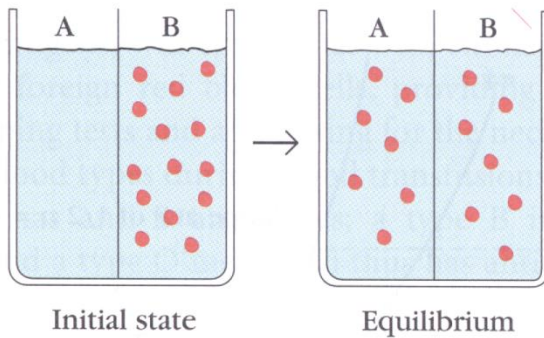
- ✓ rovnovážná dialýza
- ✓ srážení síranem amonným
- ✓ membránová filtrace
- ✓ spektrofluorimetrická metoda (zhášení fluorescence)
- ✓ separační metody (gelová a afinitní chromatografie, elektroforéza)

Metoda rovnovážné dialýzy

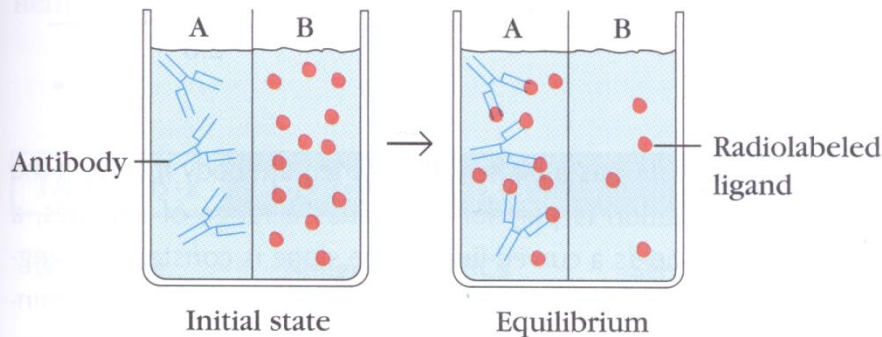
předpoklad:
neprůchodné pro Ab
průchodné pro haptén

(a)

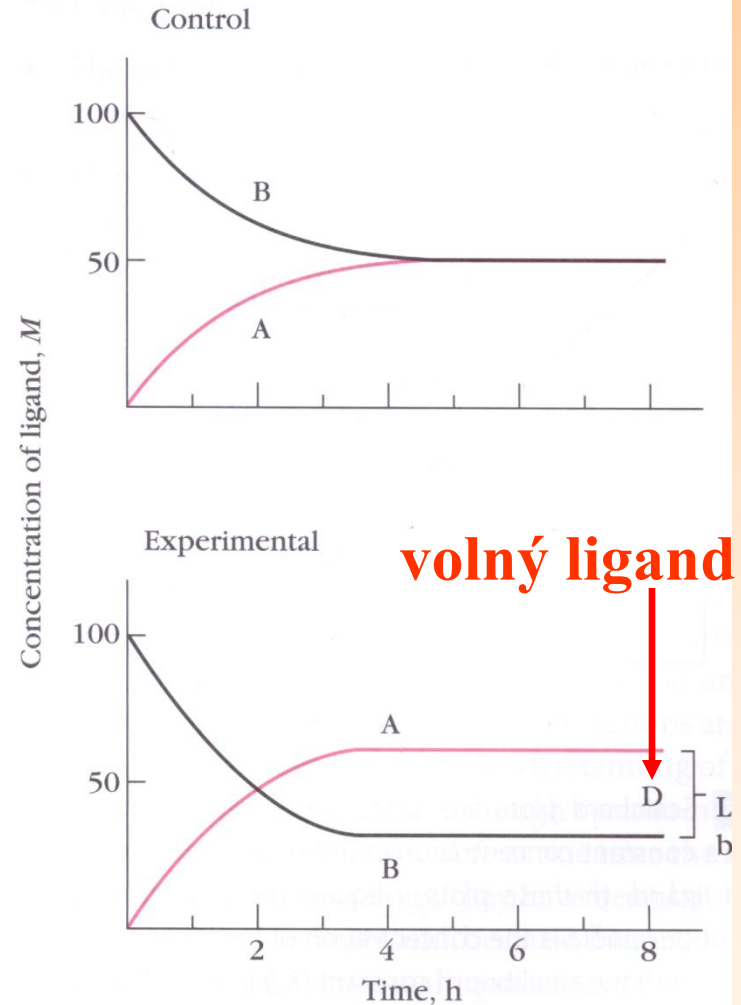
Control: No antibody present
(ligand equilibrates on both sides equally)



Experimental: Antibody in A
(at equilibrium more ligand in A due to Ab binding)



(b)



- samotný hapten: v obou částech stejná koncentrace
- do jedné části Ab: část H se váže na Ab, volný H stejný
- jiná konc. H, stejné množství Ab (několik konc. H)
- ze získaných hodnot se vypočítá afinita po dosazení do Langmuirovy nebo Sipsovy rovnice.

Nevýhoda: dlouhá doba než dojde k ustálení rovnováhy
(16-48 hodin)

Metoda srážení síranem amonným

čisté protilátky nebo imunitní sérum
při 50 % nasycení $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ precipitace
protilátek i jejich imunokomplexů s hapténem,
haptén radioaktivně značený

radioaktivita v precipitátu:

množství vázaného hapténu,

radioaktivita v supernatantu

množství volného hapténu

Podmínka: haptén musí být rozpustný
v 50 % síranu amonném.

Sekundární jevy

Sledování kinetiky reakcí antigenu s protilátkou komplikují další interakce tzv. sekundární jevy.

- ✓ **precipitace imunokomplexů**
- ✓ **aglutinace částic**
- ✓ **vazba složek komplementu**
- ✓ **vazba cytofilních protilátek a imunokomplexů na buňky**
- ✓ **nespecifické interakce protilátek a jejich komplexů s různými látkami**

Imunoprecipitace

Rozpustný antigen + rozpustná protilátka = precipitát
(sraženina)

Precipitát je výsledkem tvorby trojrozměrné mřížkové struktury. Polyvalentní antigen a polyvalentní protilátka.

Dvě fáze precipitace

- ✓ Rychlá fáze: tvoří se rozpustné komplexy
(detekce jen speciálními metodami)
- ✓ Pomalá fáze: agregace rozpustných imunokomplexů
se tvoří nerozpustné komplexy
(reakce několik hodin až dní)

antigeny: precipitogeny

protilátky: precipitiny

Protilátky, které neprecipitují antigen

monovalentní nebo univalentní

konvenční protilátky:

mají jen jedno vazebné místo
existence se nepotvrdila,
jedno místo mají fragmenty Fab,
ale ne celé molekuly imunoglobulinů

Příčina neprecipitace:

nízká afinita protilátek
musí se přidat velký nadbytek
antigenu, aby mohl reagovat
aspoň s některými vazebnými
místy, nadbytek brání, aby
proběhla druhá fáze precipitace:
agregace malých komplexů

monoklonální protilátky

Neprecipitace monoklonálních protilátek

Nesouvisí s nízkou afinitou (ta je vysoká)
ale s vysokou specifitou - schopností reagovat jen s
jedním determinantem na molekule komplexního antigenu

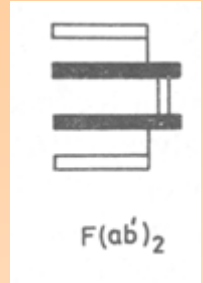
Vliv izotypu na precipitaci:

IgM obvykle špatně precipitují nebo neprecipitují
vůbec.

IgG jsou dobré precipitanty

Agregace rozpustných imunokomplexů na nerozpustné

- ✓ Nespecifické hydrofóbní vazby mezi jinými částmi protilátkové a antigenové molekuly (také účast Fc) x F(ab)₂ nemá schopnost precipitovat
- ✓ Následkem hydrofóbních změn se snižuje rozpustnost molekuly a tím i celého komplexu.



Vliv teploty na precipitaci

- ✓ rychlost precipitace je přímo úměrná teplotě
- ✓ rychlost precipitace stoupá v rozsahu 0 až 56°C
- ✓ množství precipitátu se stoupající teplotou klesá

Vliv pH na precipitaci

rozsah 6,5 až 8,2

Poměr množství Ag:Ab

Má vliv na množství vznikajícího precipitátu

Sledování množství precipitátu

- | | |
|---------------------|---------------------|
| ✓ kapalně prostředí | serologické metody |
| ✓ gelové prostředí | imunodifúzní metody |

Kapalně prostředí:

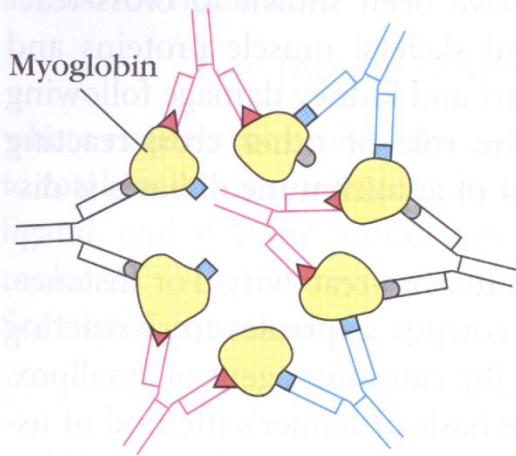
- ✓ měření množství precipitátu (vážení, stanovení proteinů)
- ✓ změna optických vlastností (turbidimetrie, nefelometrie, spektrofluorimetrie)
- ✓ antigen radioaktivně značení (množství volného a vázaného v komplexu)

Gelové prostředí:

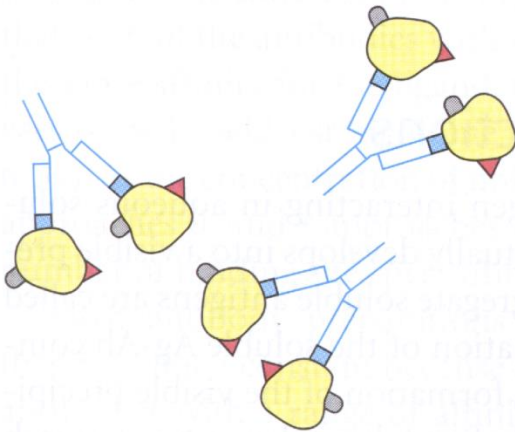
Množství precipitátu (velikost plochy)

(a)

POLYCLONAL ANTISERUM



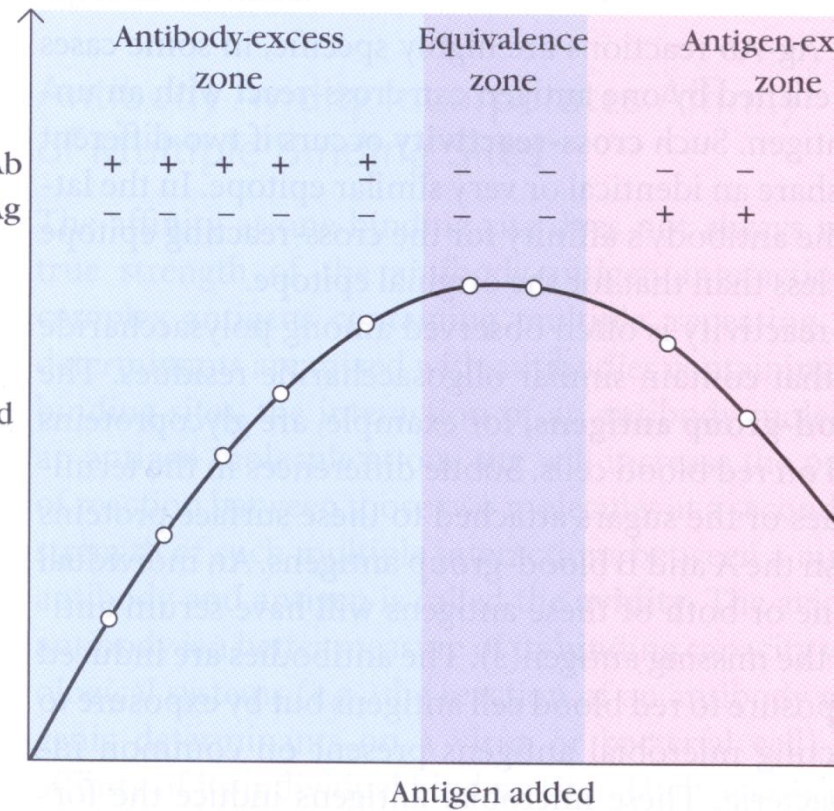
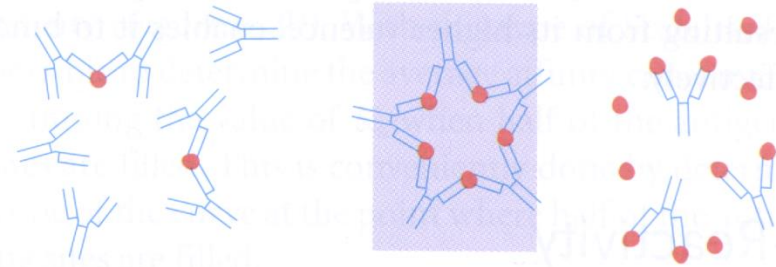
MONOCLONAL ANTIBODY



(b)

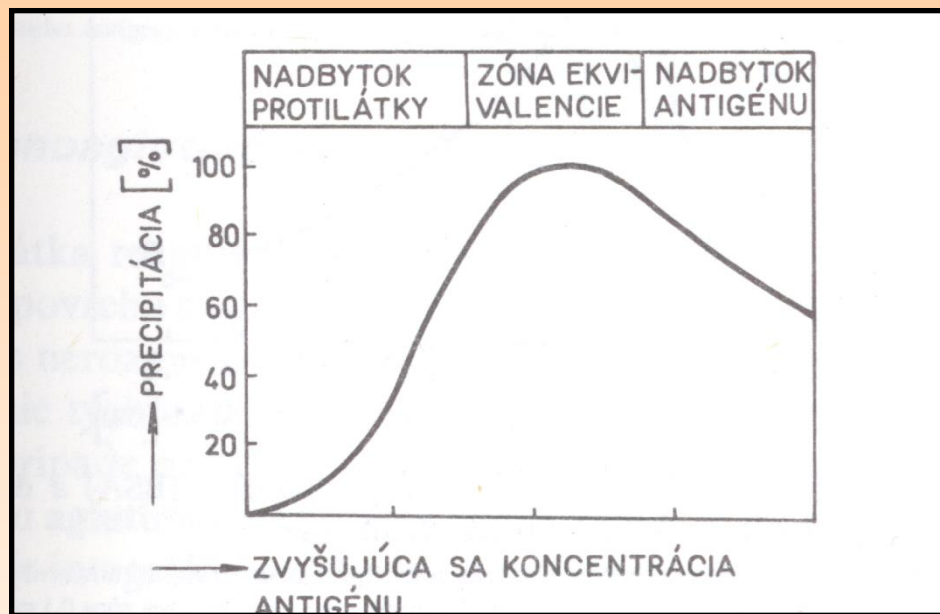
Supernatants { excess Ab
excess Ag

Antibody precipitated



Kvantitativní precipitace

Precipitační křivka



Makrometoda (0,5 ml)

Mikrometoda (1-10 μ l)

Řada zkumavek:

stejné množství Ab

různé množství Ag

1-2 h stát při 37°C

2-10 dní v ledničce

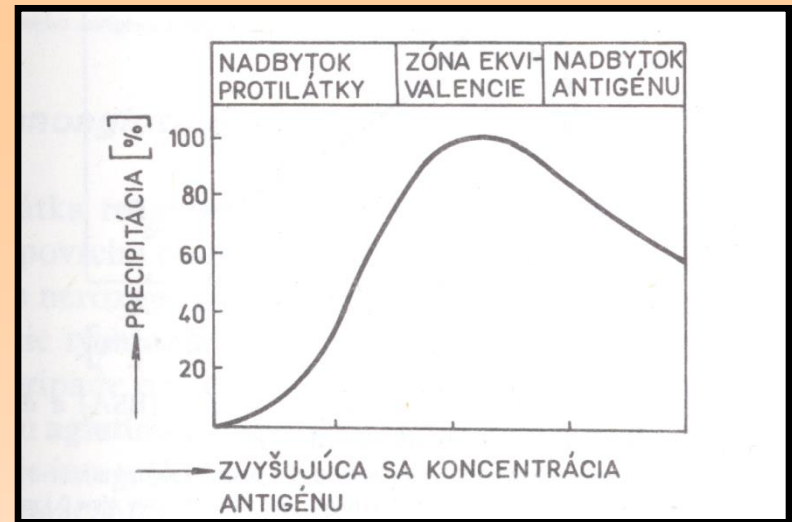
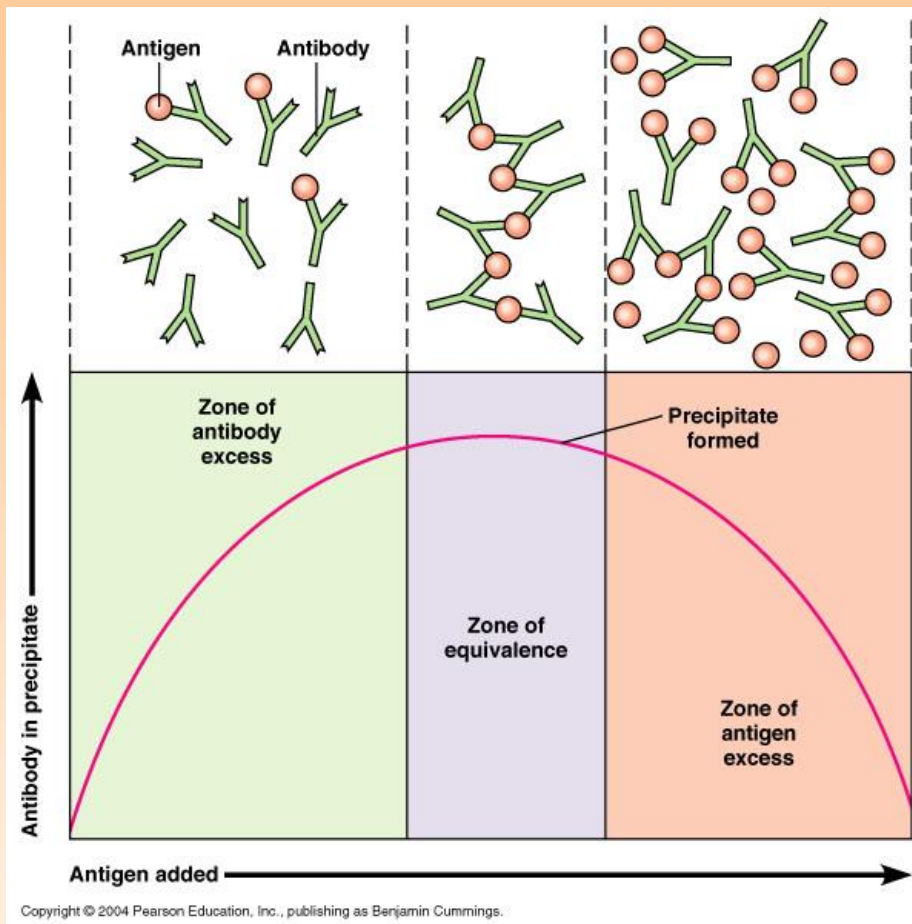
Čas precipitace

zkrátit v prostředí 2% polyethylenglykolu ($M_r = 6000$)

Precipitát odstředit, promýt PBS, rozpustit v 0,2 M NaOH

a analyzovat množství bílkovin metodou LOWRYHO

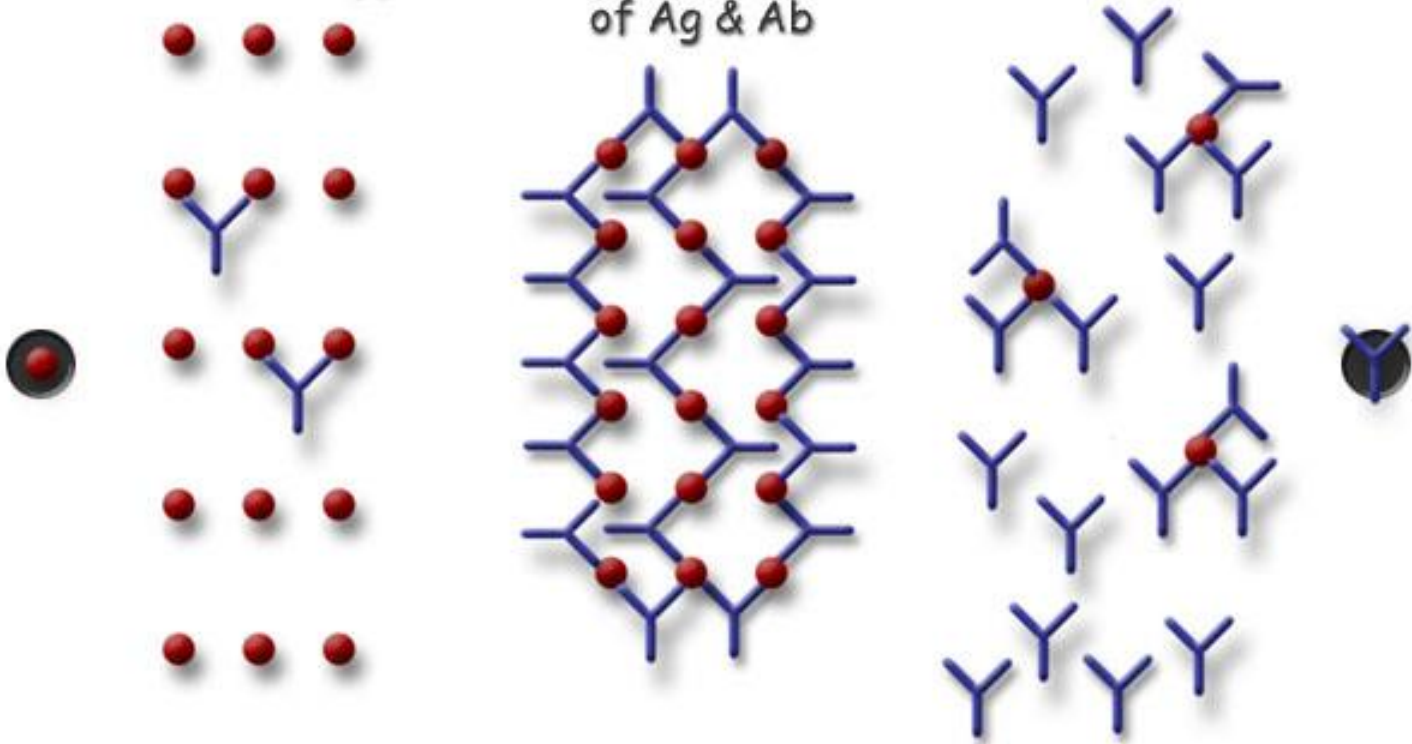
nebo měřit absorbanci při 280 nm



- ✓ **oblast nadbytku protilátky**
- ✓ **zóna ekvivalence**
- ✓ **oblast nadbytku antigenu**

Ag & Abs combine

large aggregates form
at approximately equimolar concentrations
of Ag & Ab



Tvar precipitační křivky

- ✓ Závislý na druhu antigenu
- ✓ Proteinové Ag s $M_r = 40$ až 160 tisíc dávají precipitační křivky s ostrými vrcholy v zóně ekvivalence
- ✓ Denaturované proteiny a polysacharidy dávají křivku s širokými vrcholy.
- ✓ Některé antigeny a protilátky těžko precipitují a metodu kvantitativní precipitace u nich není možné provést.

Vazebnou schopnost Ab

vyjadřuje se jako množství antigenu, které se může v zóně ekvivalence vázat na 1 mg protilátky nebo 1 ml antiséra.

Některé **iontové detergenty** (dodecylsíran sodný) mohou při nízkých koncentracích inhibovat precipitační reakci **neionogenní detergenty** (Triton X 100) neovlivňují.

Imunoaglutinace

Protilátka reaguje s antigenními determinantami, které se nacházejí na povrchu částice (erythrocyty, bakterie nebo jiné buňky)
tj. **nerozpustný korpuskulární antigen**

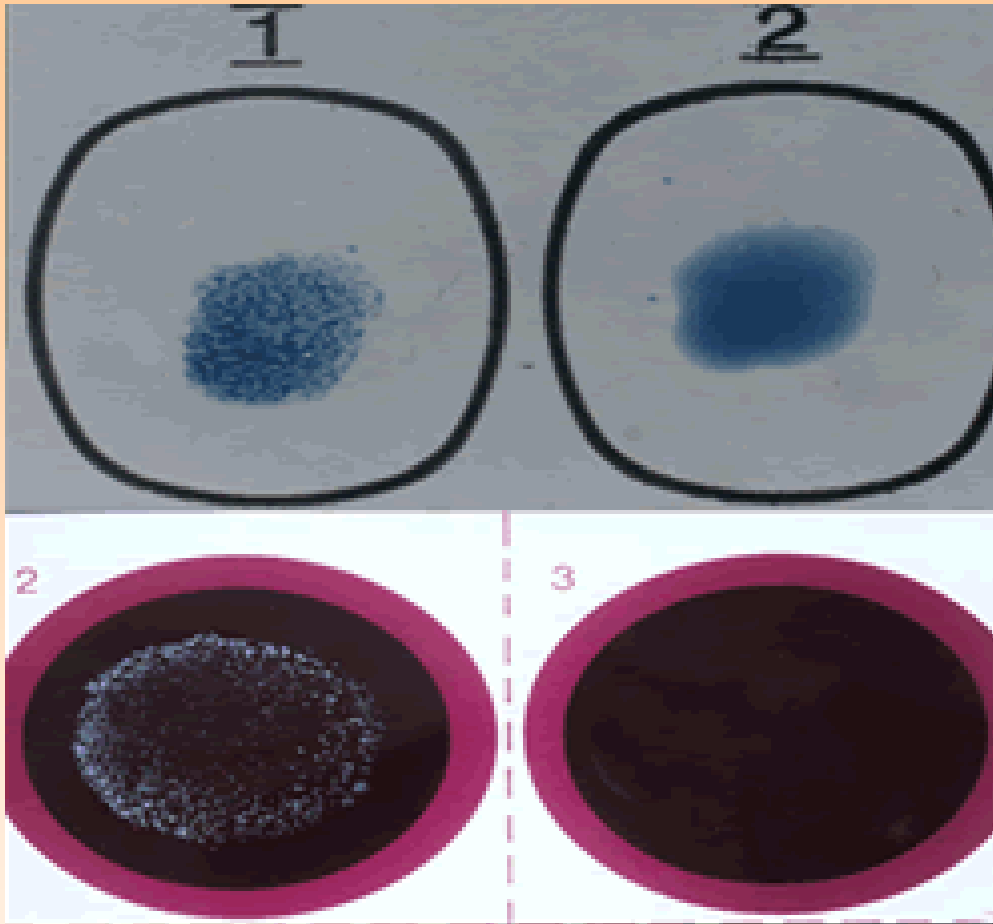
Výsledek: shlukování těchto částic **aglutinace**

nerozpustný antigen	aglutinogen
protilátky	aglutininy
komplex částic	aglutinát

Aktivní přímá aglutinace

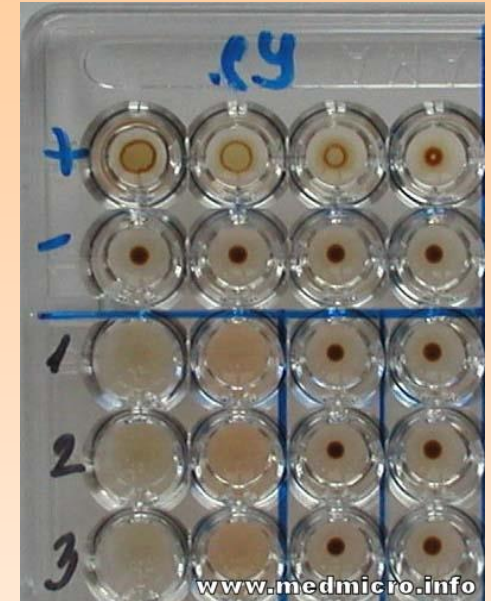
Aglutinogen je integrální součástí povrchu částice

Imunoaglutinace



pozitivní

negativní



Agglutination on carriers
Treponema pallidum haemagglutination
test (TPHA) for syphilis diagnostics,
erythrocytes carry the T.pallidum antigen

PASIVNÍ (NEPŘÍMÁ) AGLUTINACE

Inertní částice (latex), buňky, erythrocyty se mohou určitým antigenem obalit pasivně. Pak se přidá protilátka proti tomuto antigenu a částice se budou aglutinovat.

- ✓ propojování polyvalentní antigenové částice molekulami protilátek, které musí být alespoň dvojvalentní.
- ✓ jednovalentní fragmenty protilátek Fab neaglutinují, ale mohou inhibovat
- ✓ fragment F (ab)₂ je při aglutinaci stejně účinný jako celá IgG (neuplatňuje se Fc konec)

- ❖ **inhibice aglutinace nadbytkem protilátky nebo nadbytkem korpuskulárního antigenu.**
- ❖ **částice s malým počtem determinantů aglutinují hůře, než částice s větším počtem**
- ❖ **podle počtu vazebných míst protilátky IgM jsou při aglutinaci účinnější než IgG.**