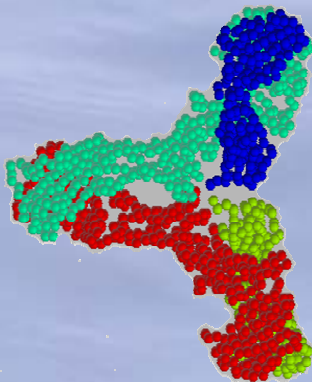
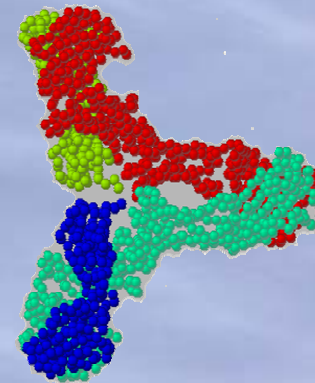


Az ellenanyagok orvos- biológiai alkalmazása



PhD kurzus
2011/2012 II. félév



A kurzus célja

- ◆ Az ellenanyagok széleskörű (diagnosztika, terápia, kutatás) felhasználhatóságának bemutatása, mindennapos orvos-biológiai példák által
- ◆ Ellenanyagokat alkalmazó módszerek összehasonlítása tudományos érték, munka-, infrastruktúra- és költségigény figyelembevételével
- ◆ Interaktív kurzus, felmerülő kérdések előadás közben való megvitatása

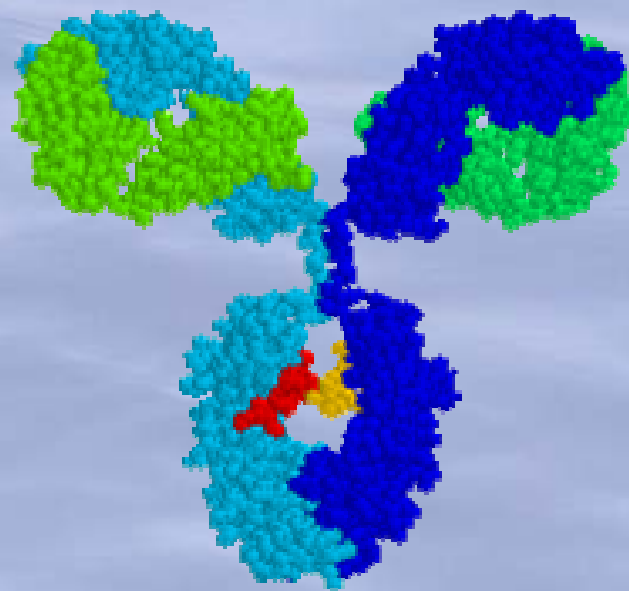
A kurzus tematikája

1. Áttekintés (a kurzus felépítése); az ellenanyagok tulajdonságai (szerkezet, izotípusok, allotípusok, Ab/Ag interakció, affinitás) **Cervenak László**
2. Az ellenanyagok metabolizmusa (génátrendeződés, izotípusváltás, affinitásérés, termelés, elimináció, megoszlás biológiai terekben) **Kacskovics Imre**
3. Az ellenanyagokra épülő immunválasz (neutralizáció, komplement aktiváció, opszonizáció, ADCC) **Varga Lilian**
4. Az ellenanyagok által közvetített patológiás válasz (I., II., III. típusú hiperszenzitivitási reakció, receptor blokkolás/stimuláció) **Füst György**
5. Immunizálás (stratégiák – passzív, aktív, adjuvánsok, lokalizáció, deszenzitizálás – hatékonyság ellenőrzése, buktatók és mellékhatások, példák) **Füst György**
6. Természetes antitestek, autoantitestek, természetes autoantitestek (keletkezés, funkció, affinitás és polireaktivitás, diagnosztikus jelentőség) **Prohászka Zoltán**
7. Ellenanyagok kimutatása diagnosztikai/prognosztikai célból (koncentráció, izotípus megoszlás, vírus/baktérium szeropozitivitás, monoklonális gammaglobulinémia kimutatása, autoimmun antitestek kimutatása – alkalmazott módszerek, releváns betegségek) **Prohászka Zoltán**

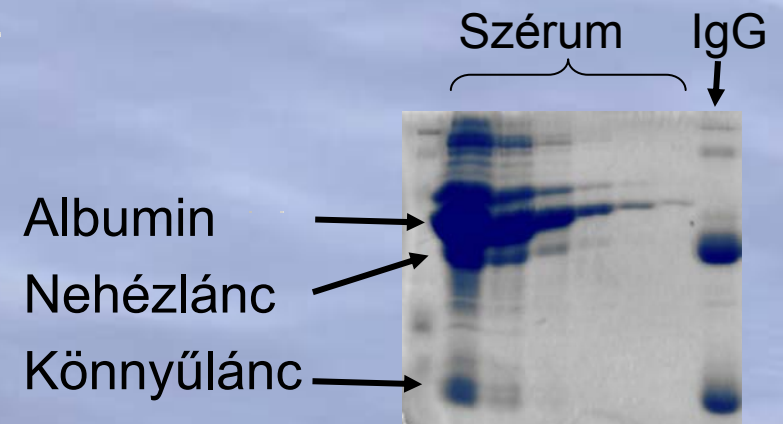
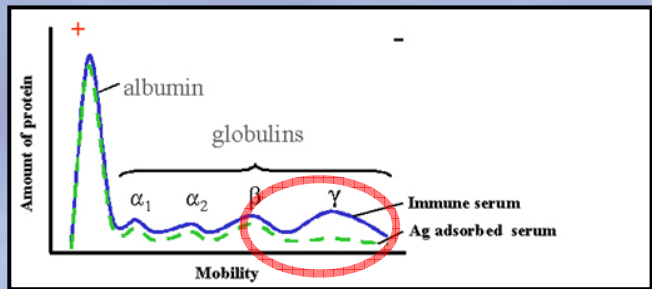
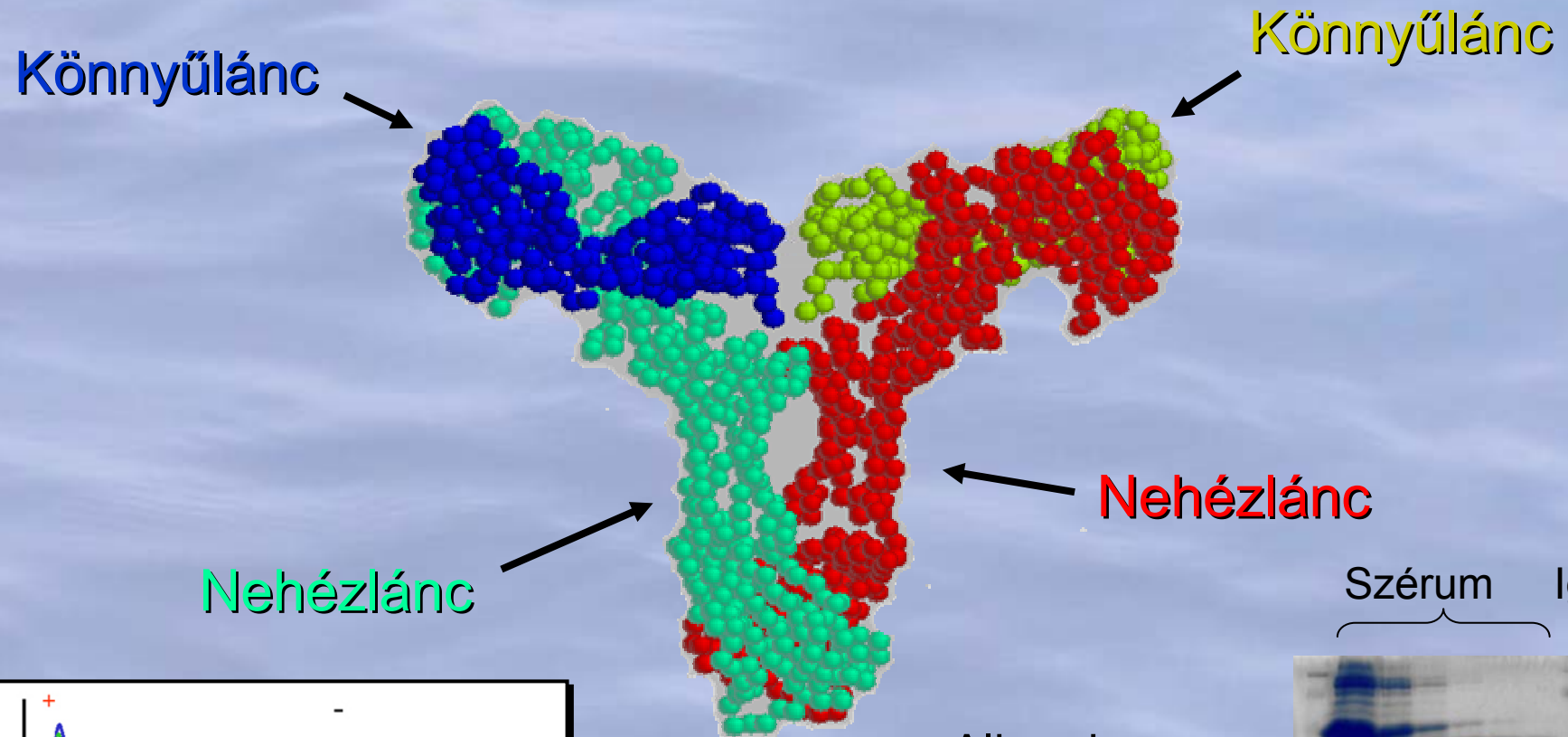
A kurzus tematikája

8. „Immunszcintigráfia” – Antigén-antitest a nukleáris medicinában **Szilvási István**
9. Ellenanyagok manipulálása (termeltetés, tisztítás – ellenőrzéssel, emésztés, jelölés, molekuláris biológiai manipulálás – egyláncú Ab, humanizált Ab) **Cervenak László**
10. Monoklonális vs. poliklonális ellenanyagok (tulajdonságok: felhasználhatóság, előállítás, költségek/idő, reprodukálhatóság, módszerek preferenciája) **Cervenak László**
11. Ellenanyag terápia (jelöletlen ellenanyagok – biológiai effektor funkciók beindítása, kémiai/radioaktív citosztatikumok célbajuttatása, IVIG terápia) **Nagy György**
12. Ellenanyagokkal működő kutatási módszerek (ELISA, WB, Supershift, Manchini, Ouchterlony FACS, xMAP, IF, FRET) **Cervenak László**
13. Teszt

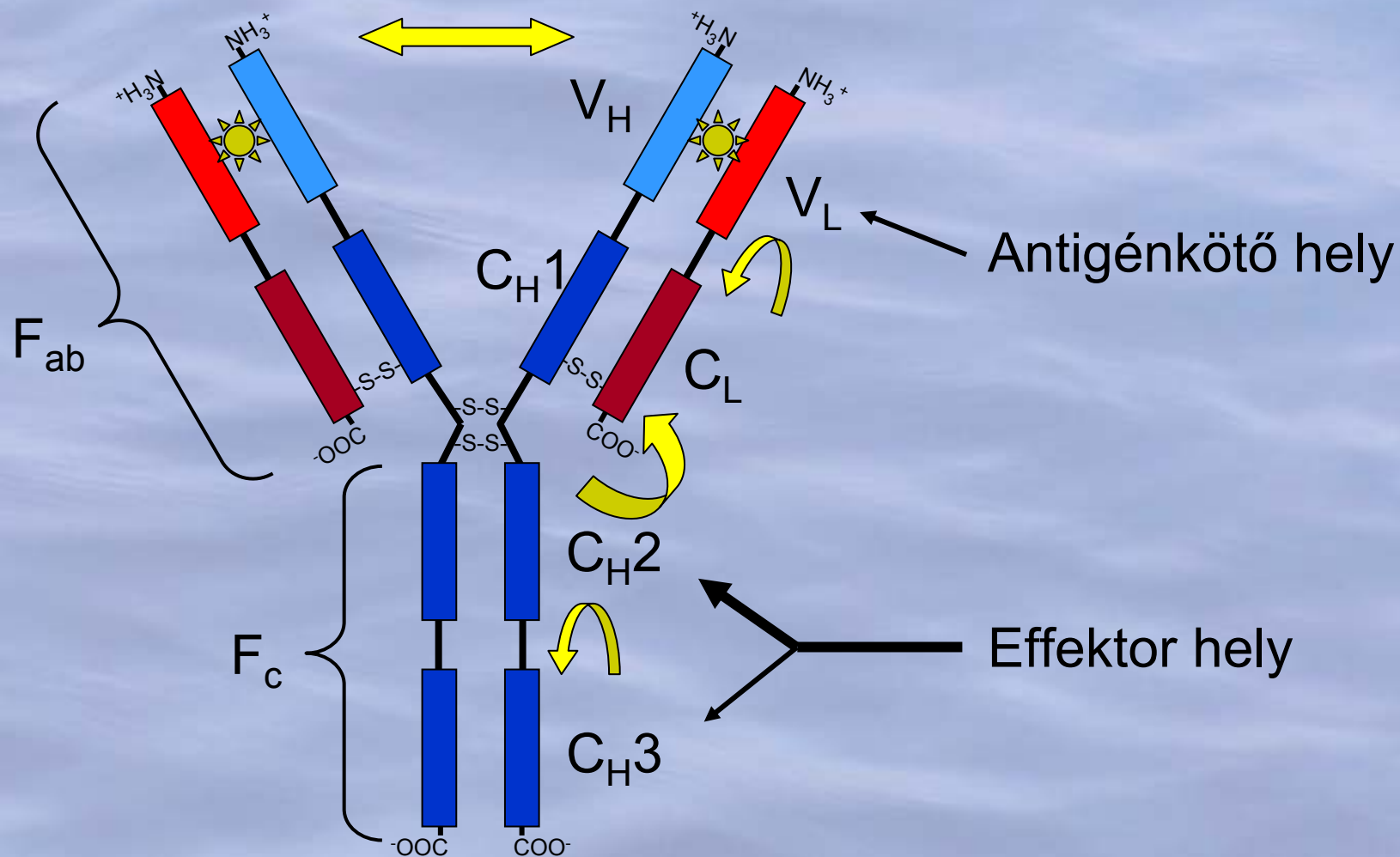
Ellenanyagok



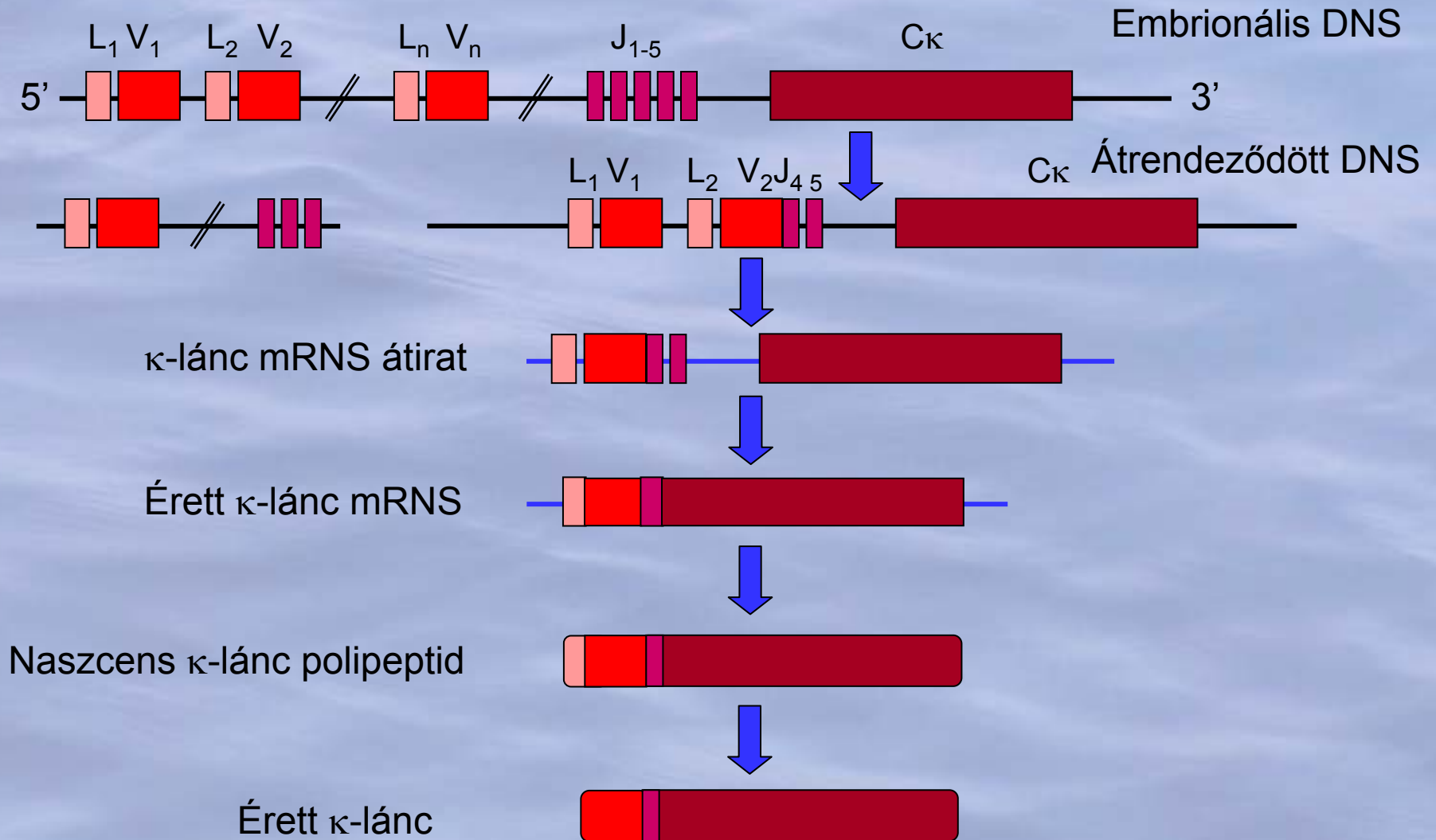
Az ellenanyagok szerkezete



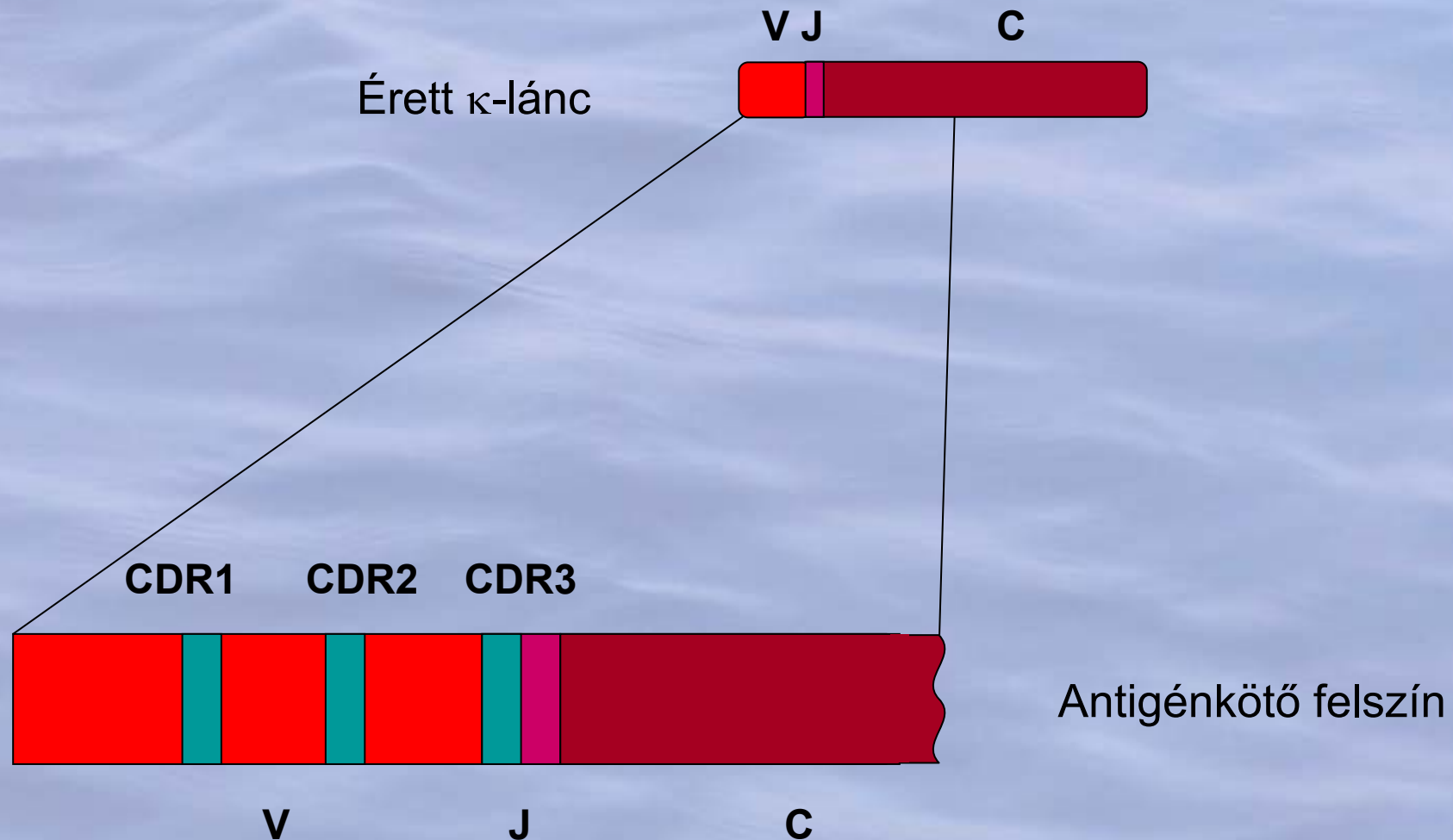
Az ellenanyagok szerkezete



Az ellenanyagok szerkezete

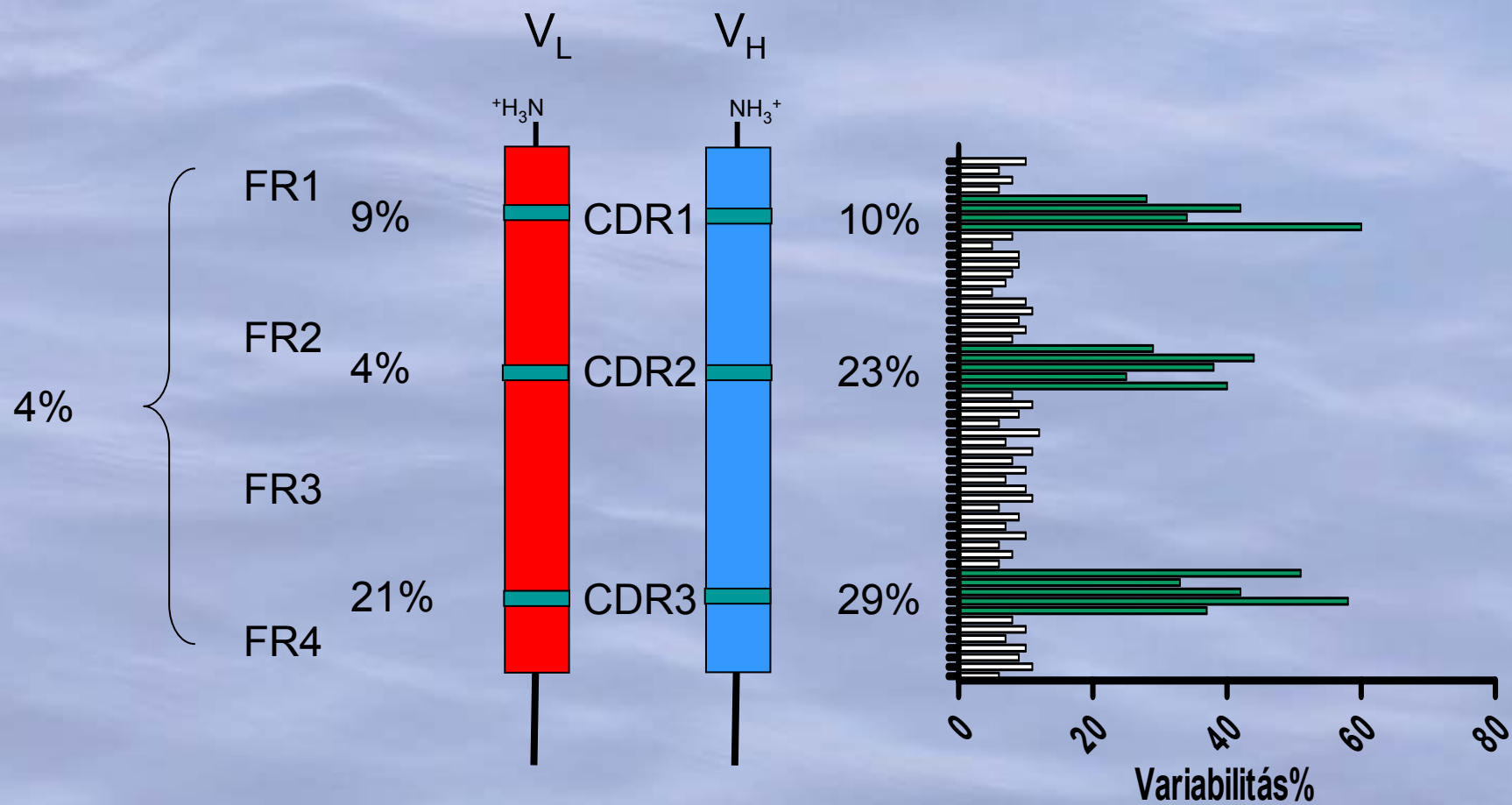


Az ellenanyagok szerkezete

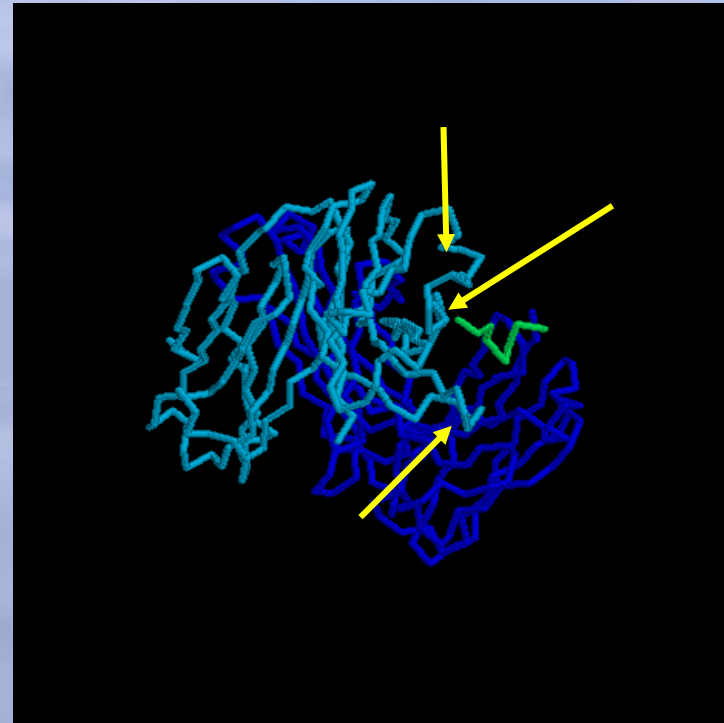
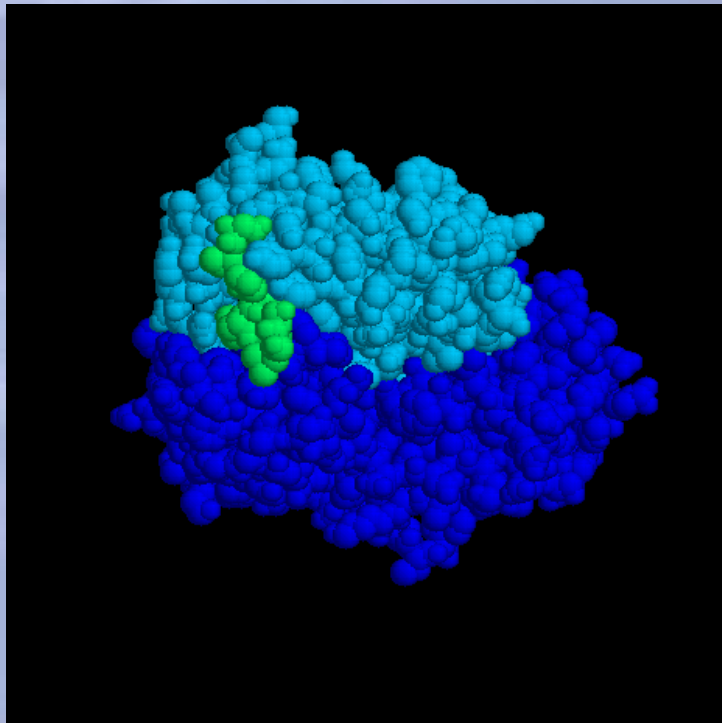


FR1 FR2 FR3 FR4 – V gén családok /klánok: szerkezeti hasonlóság

Az ellenanyagok szerkezete



Az ellenanyagok szerkezete



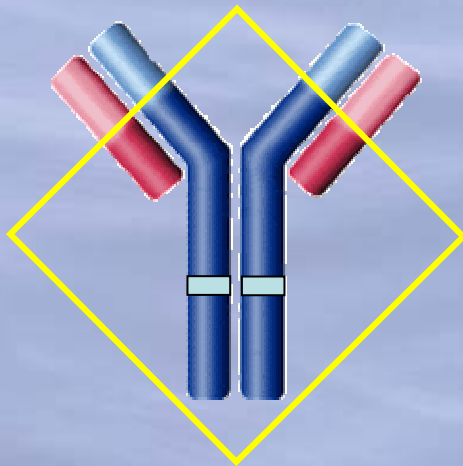
Churchill ME, Stura EA, Pinilla C, Appel JR, Houghten RA, Kono DH, Balderas RS, Fieser GG, Schulze-Gahmen U, Wilson IA [Crystal structure of a peptide complex of anti-influenza peptide antibody Fab 26/9. Comparison of two different antibodies bound to the same peptide antigen](#) J. Mol. Biol. v241, p.534-556

Az ellenanyagok szerkezete

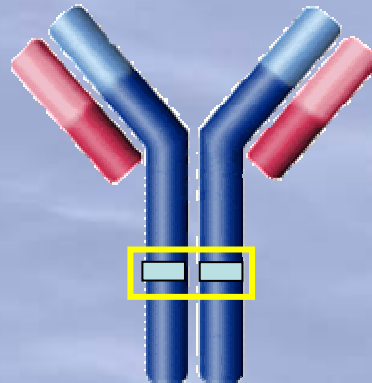
	κ	λ	H	Összesen
V gének száma	40	30	65	
D gének száma	0	0	27	
J gének száma	5	4	6	
N nukleotidok	0	0	0-20	
P nukleotidok	0-6	0-6	0-6	
Összesen	600	240	10^4 - 10^7	10^7 - 10^{10}
Izotípus	1	4	9	

Osztályozás

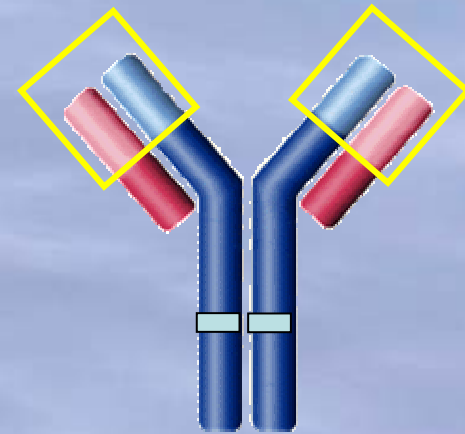
Izotípus



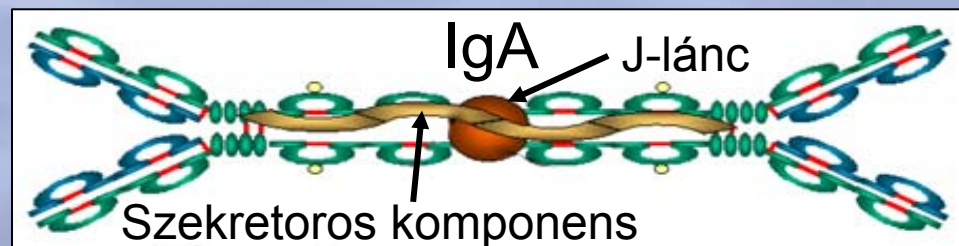
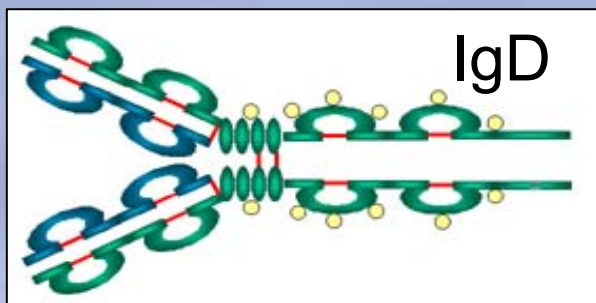
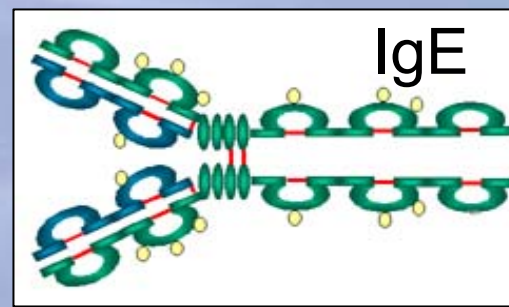
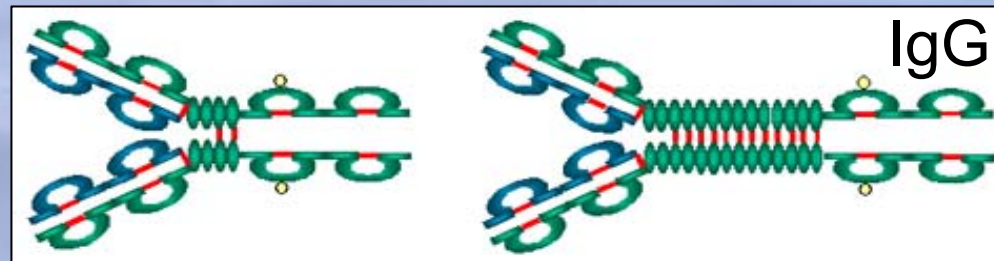
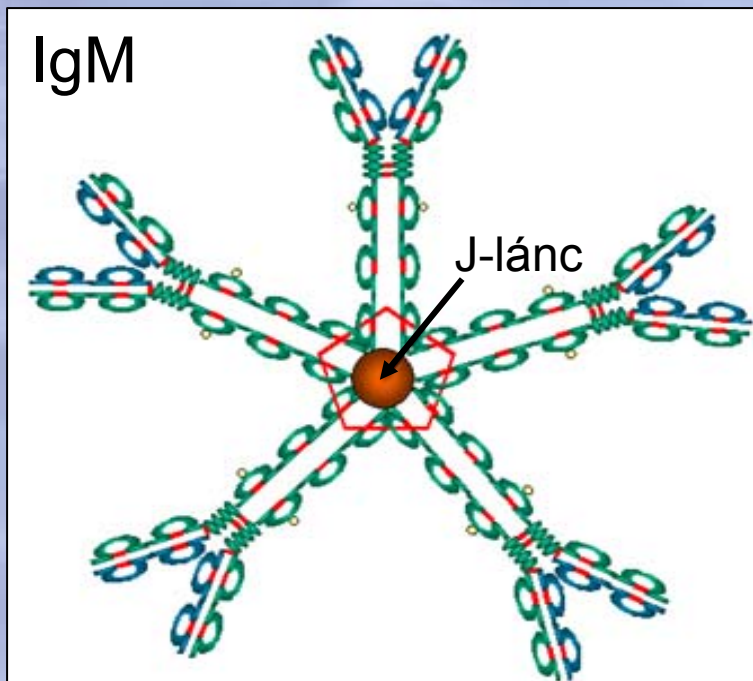
Allotípus



Idiotípus



Izotípusok



Gerincesek különböző izotípusai

Cápa	Béka	Csirke	Egér	Patkány	Ember
IgM	IgM	IgM	IgM	IgM	IgM
IgM1gj	IgD	IgD	IgD	IgD	IgD
IgNAR	IgG	IgY	IgG1	IgG1	IgG1
IgW	IgX	IgA	IgG2a	IgG2a	IgG2
IgX		IgE?	IgG2b	IgG2b	IgG3
			IgG3	IgG2c	IgG4
			IgA	IgA	IgA1
			IgE	IgE	IgA2
					IgE

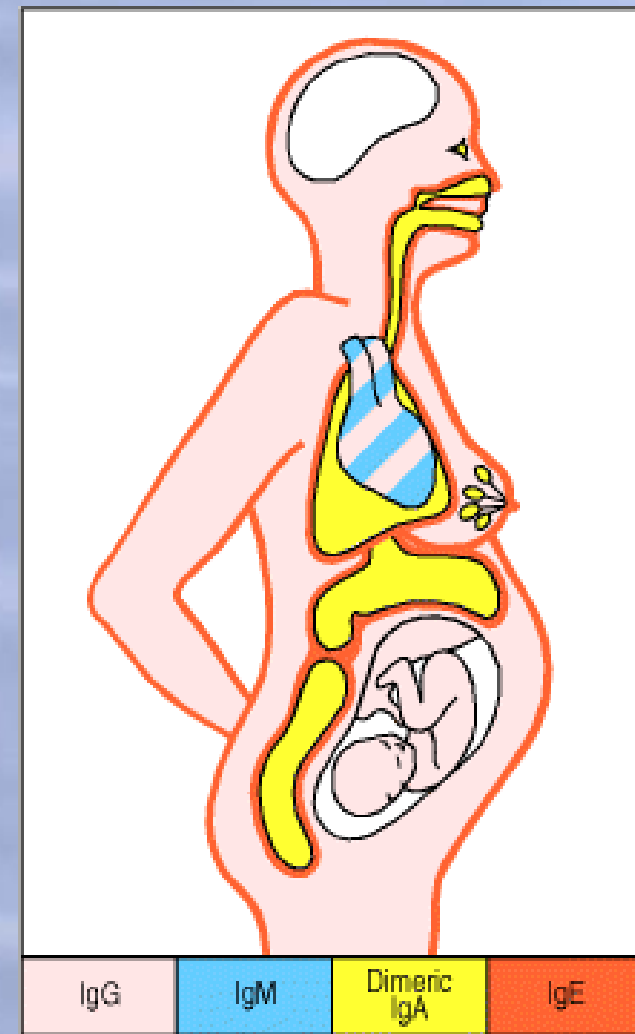
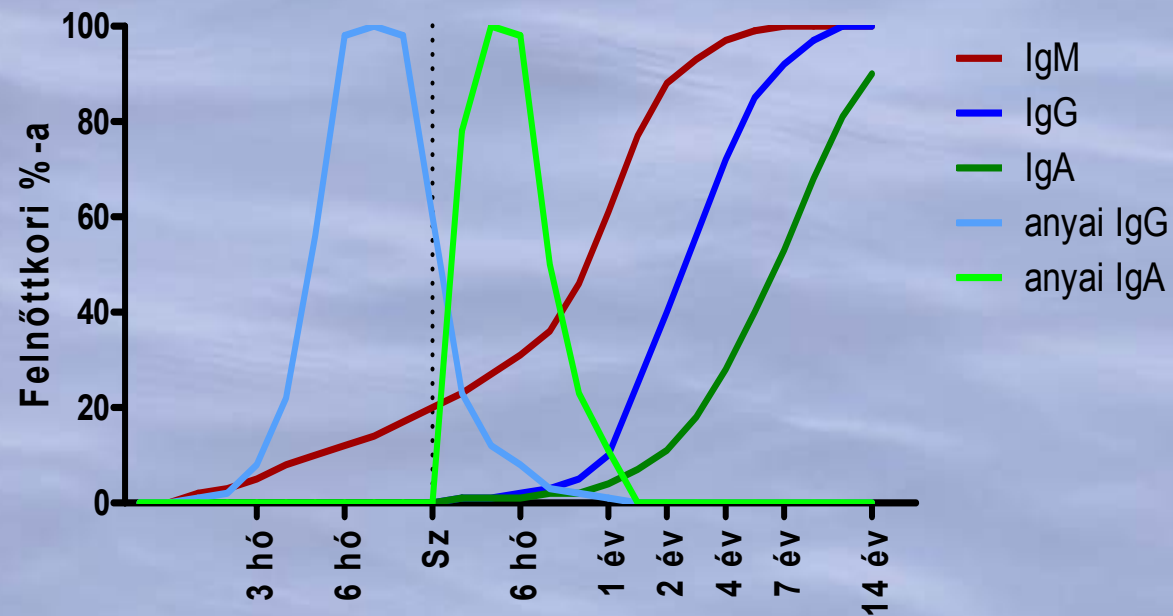
Emberi izotípusok tulajdonságai

	H-lánc	Méret (kD)	Szérum cc. (mg/mL)	Szérum $t_{1/2}$ (nap)	Szekretált forma	Hinge (AS-SS)
IgM	μ	970	1,5	5	pentamer	-
IgD	δ	184	0,003	3	monomer	10 – 2
IgG1	$\gamma 1$	146	9,0	23	monomer	15 – 2
IgG2	$\gamma 2$	146	3,0	23	monomer	12 – 4
IgG3	$\gamma 3$	165	1,0	7	monomer	62 – 15
IgG4	$\gamma 4$	146	0,5	23	monomer	11 – 2
IgA1	$\alpha 1$	160-320-480	3,0	6	mono-, di-, trimer	20 – 4
IgA2	$\alpha 2$	160-320-480	0,5	6	mono-, di-, trimer	20 – 4
IgE	ϵ	188	0,0003	2	monomer	-

Emberi izotípusok tulajdonságai

	H-lánc	Méret (kD)	Szérum cc. (mg/mL)	Szérum $t_{1/2}$ (nap)	Szekretált forma	Hinge (AS-SS)
IgM	μ	970	1,5	5	pentamer	-
IgD	δ	184	0,003	3	monomer	10 – 2
IgG1	$\gamma 1$	146	9,0	23	monomer	15 – 2
IgG2	$\gamma 2$	146	3,0	23	monomer	12 – 4
IgG3	$\gamma 3$	165	1,0	7	monomer	62 – 15
IgG4	$\gamma 4$	146	0,5	23	monomer	11 – 2
IgA1	$\alpha 1$	160-320-480	3,0	6	mono-, di-, trimer	20 – 4
IgA2	$\alpha 2$	160-320-480	0,5	6	mono-, di-, trimer	20 – 4
IgE	ϵ	188	0,0003	2	monomer	-

Emberi izotípusok eloszlása



Allotípusok

- ◆ Minden egyedben 1 (homozigóta) vagy 2 (heterozigóta) allotípus lehet (egy adott B sejtben csak 1!!!)
- ◆ Allélok között általában csak 1-2 aminosavban van különbség
- ◆ Legtöbb allotípusnál az allélok között nincs funkcionális különbség

κ	$\gamma 1$	$\gamma 2$	$\gamma 3$	$\gamma 4$	$\alpha 2$
3	4	1	13	2	1

Néhány humán allotípus

Lánc	Domén	Allotípus	Aminosav	Pozíció
IgG1	C _H 1	G1m(4)	Arg	214
	C _H 1	G1m(17)	Lys	214
	C _H 1	G1m(1)	Arg, Asp, Glu, Leu	355-358
kappa	C _L	Km(1)	Val, Leu	153,191
	C _L	Km(3)	Ala, Val	153, 191

Allotípusok jelentősége

- ◆ Bizonyos allotípusoknál funkcionális különbségek vannak
- ◆ Allotípus specifikus immunreakció (pl. transzfúzió, terhesség)
- ◆ Nyomkövető funkció (igazságügyi orvostani, transzplantációs, és más kutatási felhasználások)
- ◆ B sejt molekuláris genetikai eszköz (allélikus exklúzió molekuláris háttere)

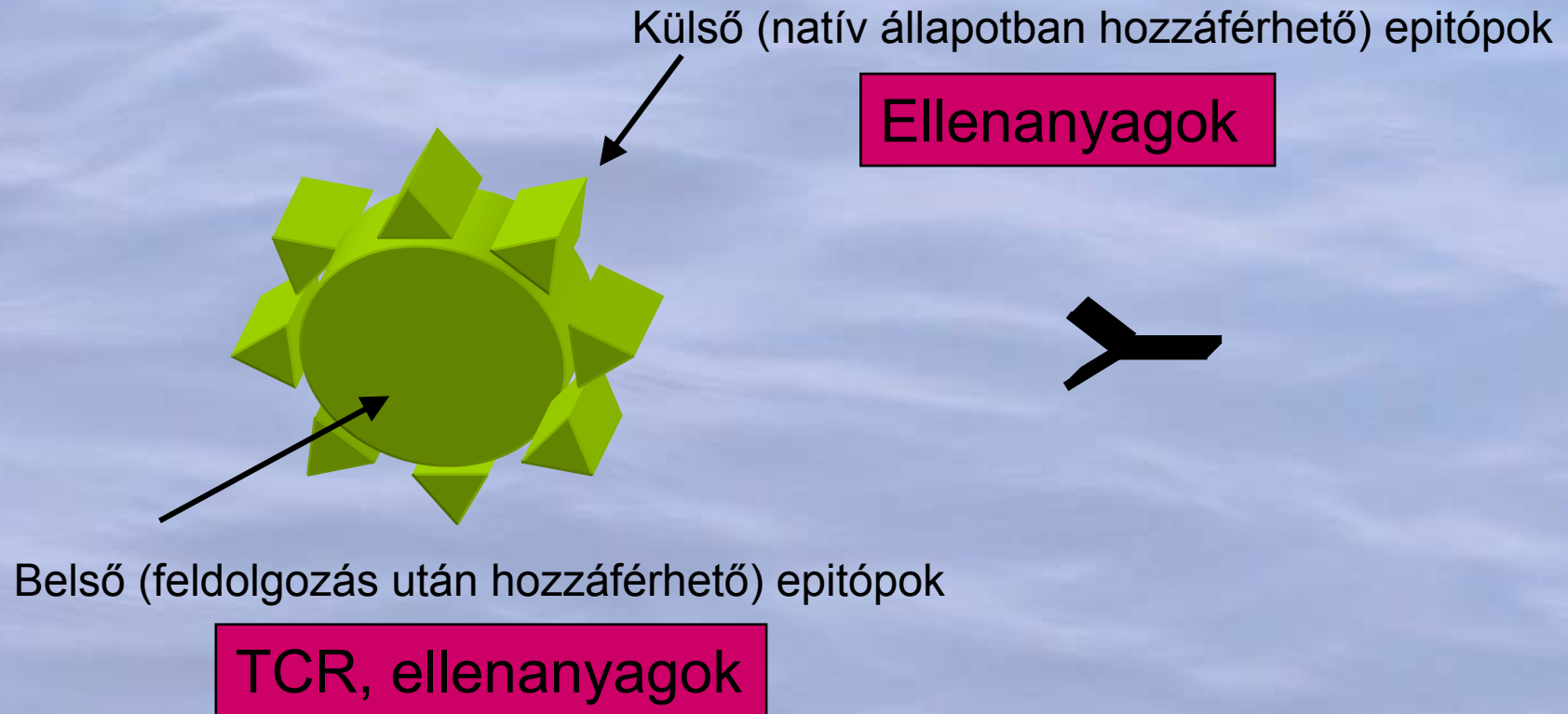
Idiotípusok

- ◆ Az egyedi V-régiókat hordozó ellenanyagok (kb. 10^9)
- ◆ Anti-idiotípus válasz – immunreguláció része
- ◆ Egy adott idiotípusú ellenanyagból kevés van, ezért makroszkópiusan nem jelentős az immunválasz
- ◆ Monoklonális terápia, -hipergammaglobulinémia: egy adott idiotípusból kritikus mennyiség – klinikailag is jelentős lehet a reakció

Antigének

- ◆ Antigén: minden olyan struktúra, amit az immunrendszer felismer (TCR, Ig)
- ◆ Immunogén: olyan antigén, amely kivált immunválaszt
- ◆ Antigén $\neq$ Immunogén
- ◆ Immunogenitás: Antigén+Környezet+Immunrendszer eredője
- ◆ Allergén: Speciális válasz kiváltó immunogén

Antigének



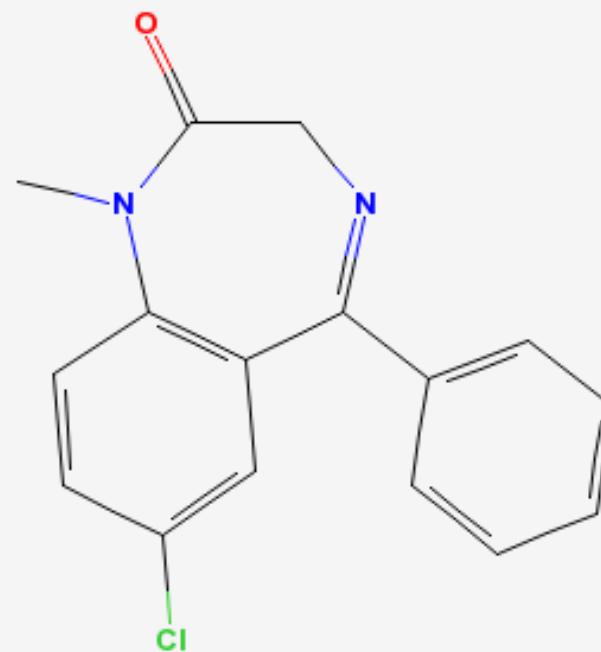
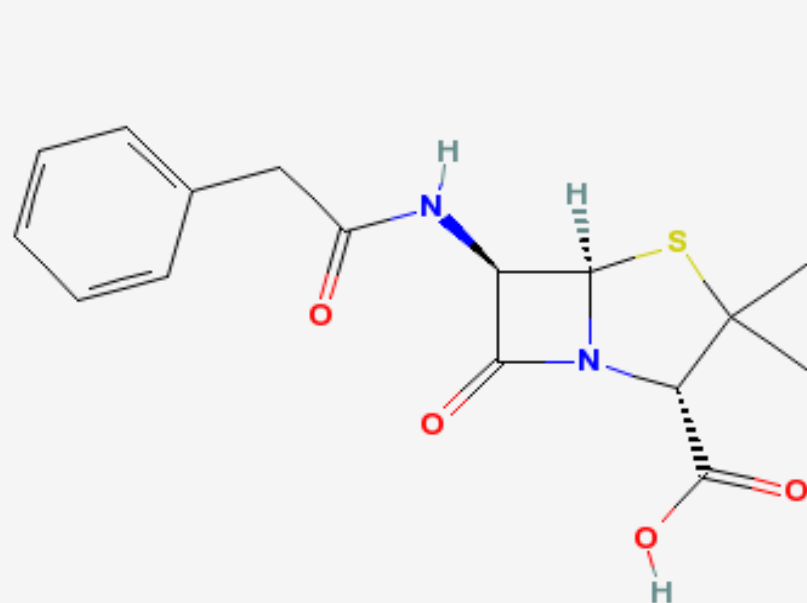
- ◆ ~ 1.5 x 2.0 x 1.2 nm részt ismer fel – antigén determináns (epitóp)
- ◆ Az antigén – antitest kapcsolat maximum 15-20 AS méretű helyre korlátozódik!

Antigének

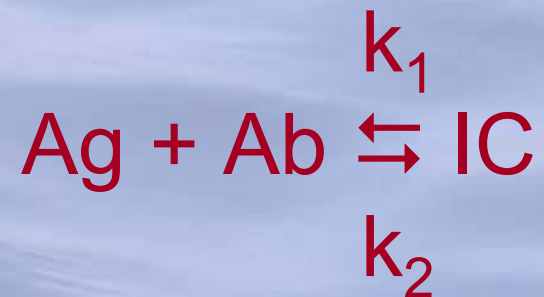


- ◆ Nincs TCR reaktív elem, az ismétlődő szekvenciák egyidejű felismerése jelenti az immunogenitást
- ◆ Nincs T sejt segítség $\Rightarrow$ IgM $\gg$ IgG3

Antigének



Antigén-ellenanyag kölcsönhatás



$$K_d = [\text{Ag}][\text{Ab}] / [\text{IC}] = k_2 / k_1$$



Megközelítés: Termodinamikai Kinetikai

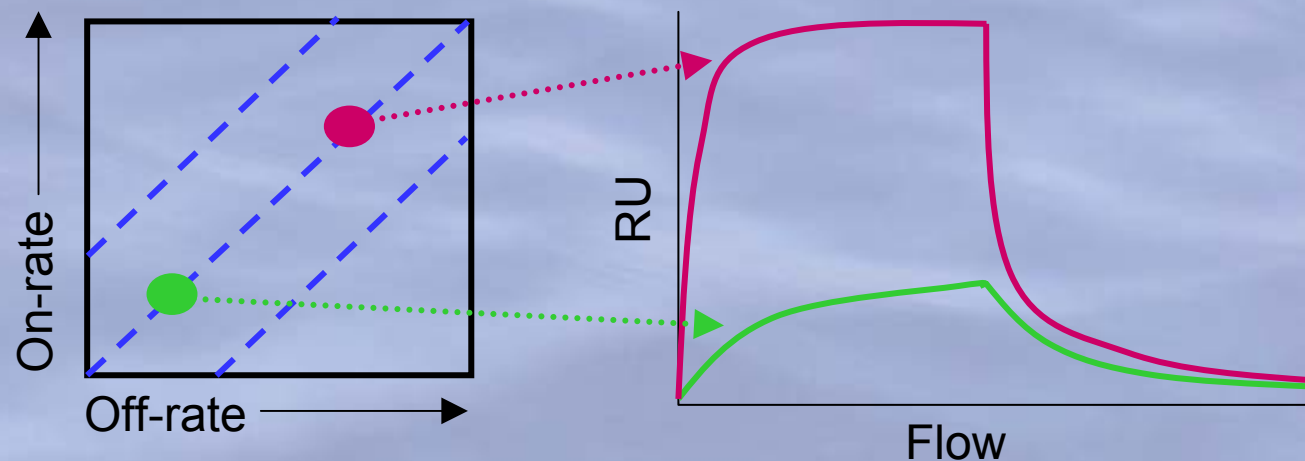
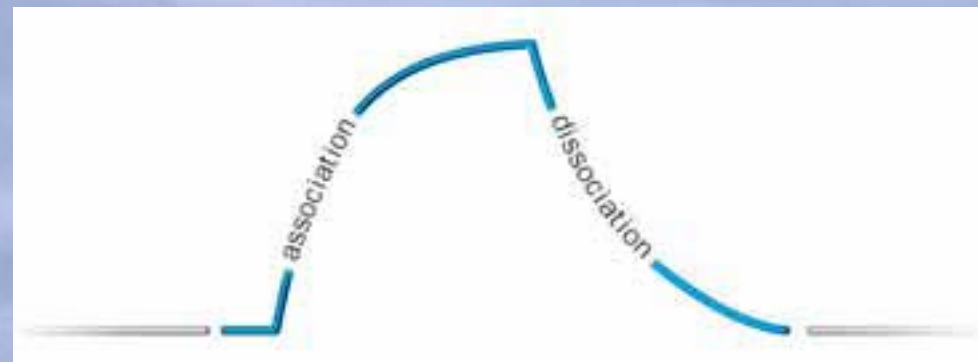
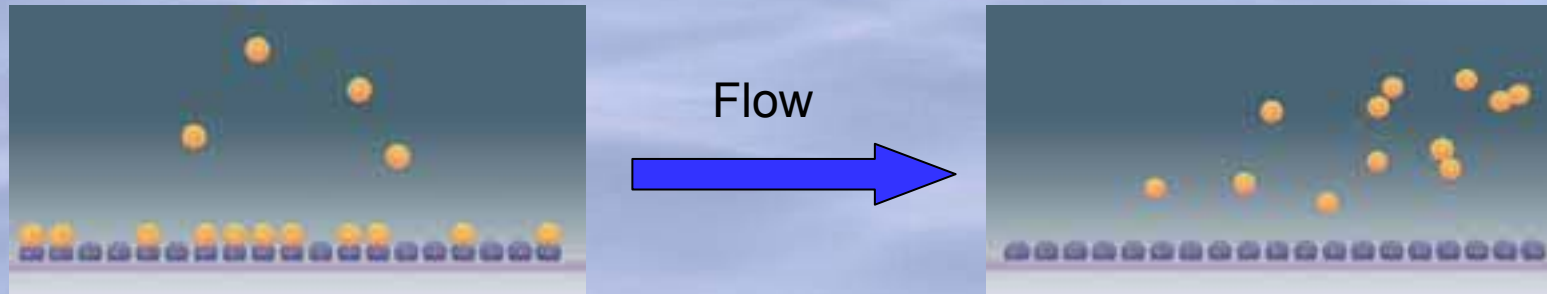
- ⇒ A nagyon kicsi K_d nem jelenti azt, hogy gyorsan megy végbe a reakció!
- ⇒ A gyors reakció nem jelenti azt, hogy nagy az affinitás (kicsi a K_d) !

Antigén-ellenanyag kölcsönhatás

Haptén	A mutáció helye	AS csere	Affinitás növekedés
4-OH-nitrofenil	V _H CDR I	Trp(33)Leu	10x
p-azofenil-arzonát	V _H CDR II	Thr(57)Ile és Lys(58)Thr	3x 8x 4x
2-fenil-oxazonon	V _L CDR I	His(34)Gln vagy His(34)Asn	8x 10x

Uher F.: A legjobban ismert emlős sejt, a B lymphocyta száz arca, 1995 Tempus ITC

Antigén-ellenanyag kölcsönhatás



Antigén-ellenanyag kölcsönhatás

Aviditás: affinitás, valencia, intramolekuláris mobilitás

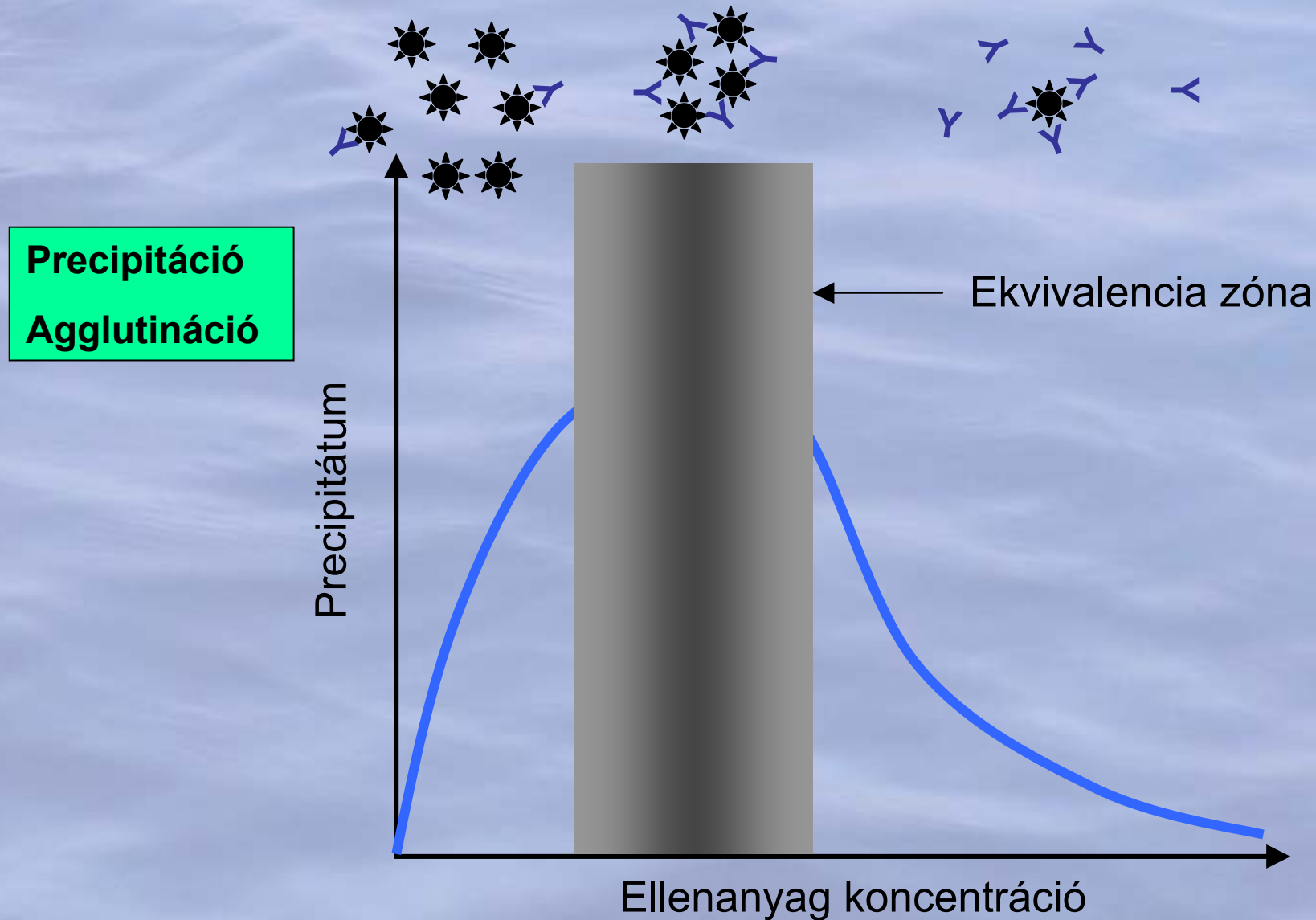


IgM: 10

IgA: 2-6

IgG, IgD, IgE: 2

Antigén-ellenanyag kölcsönhatás



Szuperantigének



- ◆ Nem CDR-hez, hanem Framework régióhoz kötődnek
- ◆ V géncsaládok minden tagjához kötődhetnek, ezért poliklonális választ váltanak ki (T vagy B)
- ◆ Következmény: túlzott reakció, klonális ignorancia vagy klonális deléció
- ◆ T sejt: Phytohaemagglutinin, ConcanavalinA, Staphylococcus enterotoxin B
- ◆ B sejt: *Staphylococcus aureus* protein A (V_H3), HIV gp120 421-433 (V_H3), *Peptostreptococcus magnus* protein L

Katalitikus ellenanyagok (abzyme)

- ❖ Véletlenszerűen létrejövő CDR és FR régiók néha enzimek aktív centrumával erősen homológ struktúrákat formáznak
- ❖ Enzimaktivitás: proteázok, peptidázok (természetes autoantitestek), DNáz, tiroglobulináz (AI betegségek)
- ❖ 1 ellenanyag 1-2 vagy max. 10 antigént tud semlegesíteni, míg 1 abzyme 1000-10000 antigén-szubsztrátot
- ❖ HIV gp120 421-433 szuperantigén helyre specifikus germ-line IgM, IgA – erős szerin-proteáz aktivitás (IgG alig!), legerősebb neutralizáló a mukóza szekretoros IgA

Jövő heti program...

Az ellenanyagok metabolizmusa
Kacskovics Imre