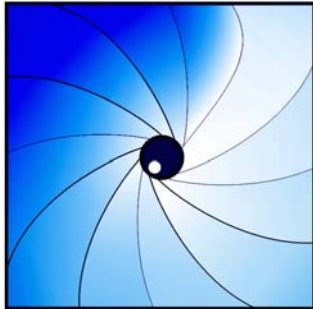


Természetes antitestek, autoantitestek, természetes autoantitestek (keletkezés, funkció, affinitás és polireaktivitás, diagnosztikus jelentőség)



Prohászka Zoltán,
Semmelweis Egyetem, III. Sz. Belgyógyászati Klinika
Kutatólaboratórium
SE-MTA Gyulladásbiológiai és Immungenomikai Kutatócsoport

prohoz@kut.sote.hu

EA Kurzus, 2012-03-20



antigén
(fertőzés, oltás)



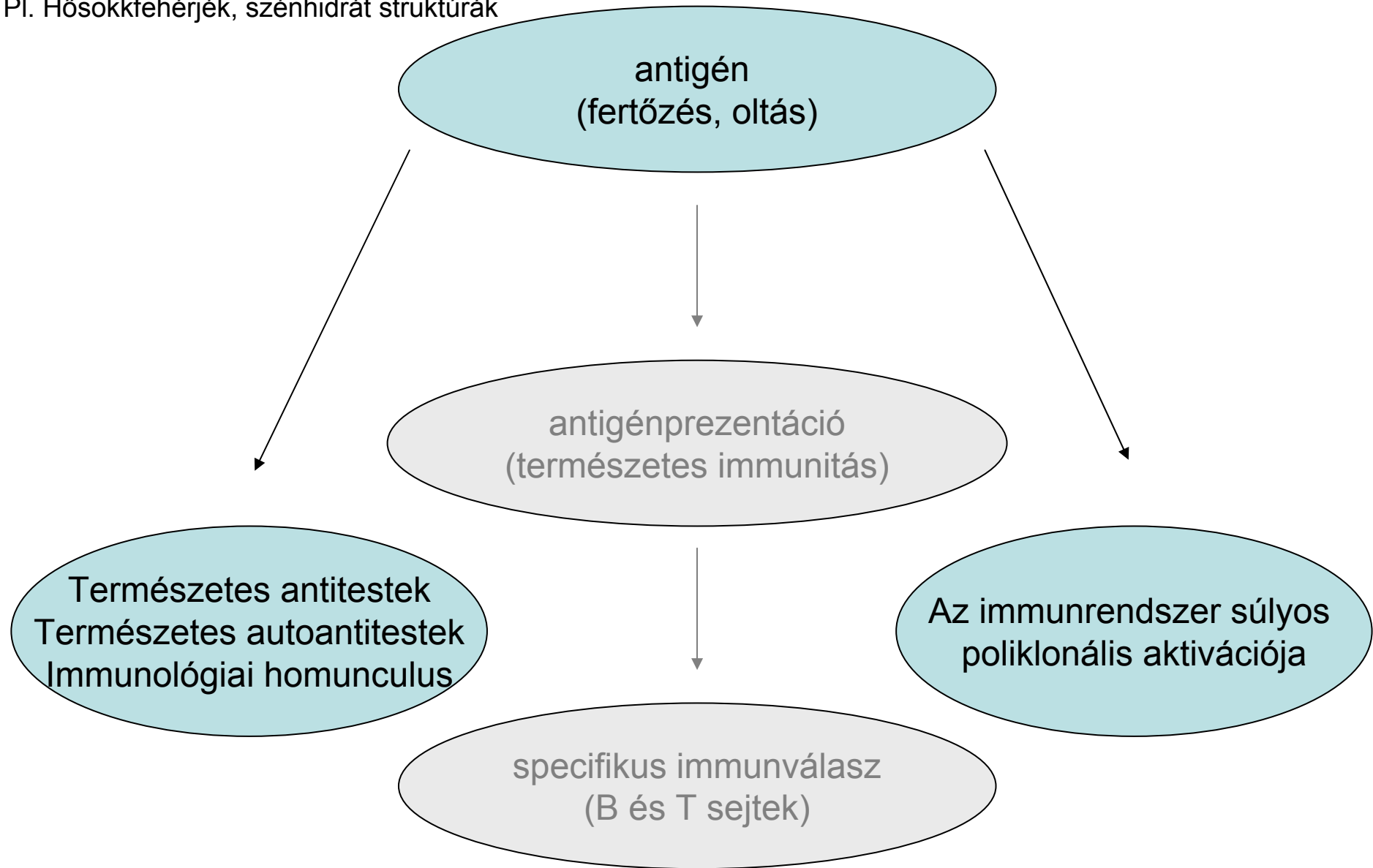
antigénprezentáció
(természetes immunitás)



specifikus immunválasz
(B és T sejtek)

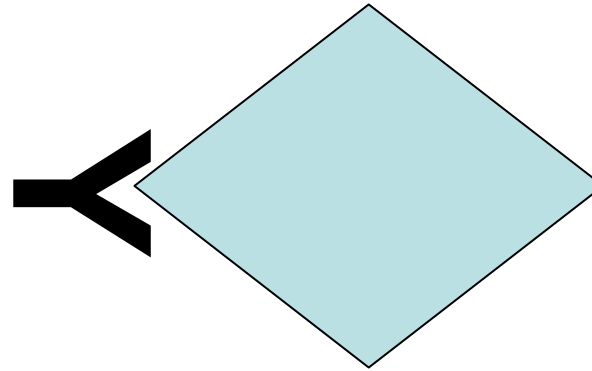
Evolúciós értelemben konzervált molekulák
PI. Hőszokkfehérjék, szénhidrát struktúrák

Szuperantigének



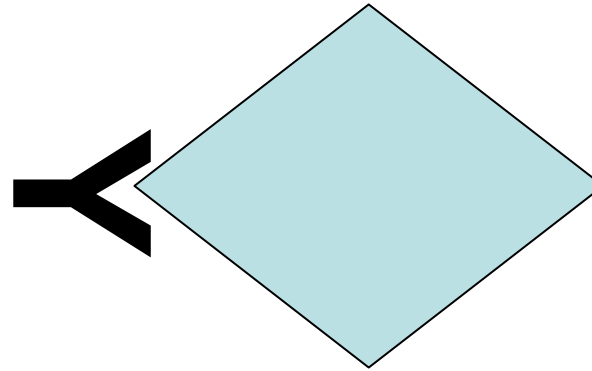
Antitestek

- Klasszikusan:
 - Szeretünk az antitestekre úgy gondolni, hogy van egy „jó” antitestünk az általunk szeretett egyetlen molekula ellen



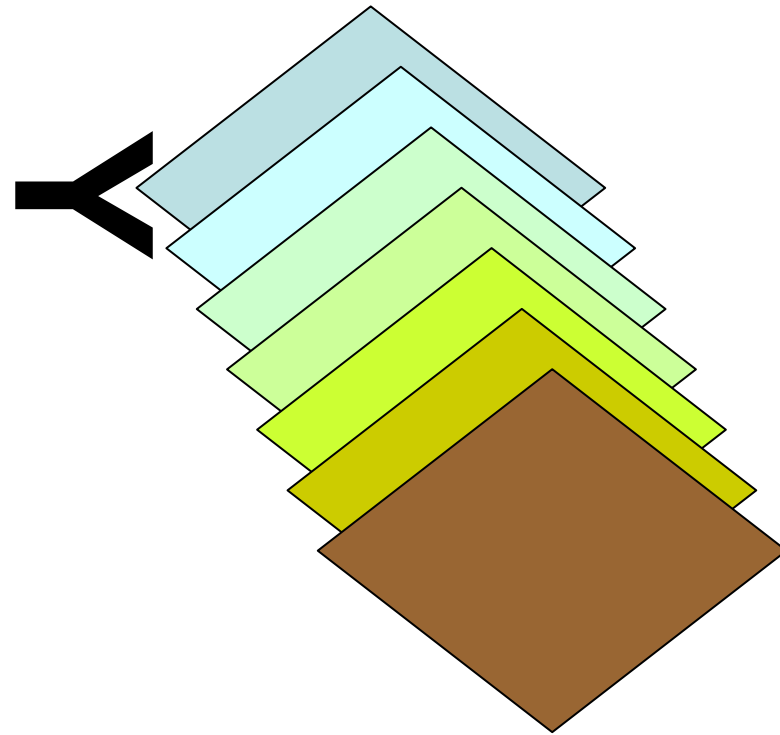
Antitestek

- Valójában:
 - Még ha az antitestünket tisztított antigénnel való immunizálással állítottuk is elő, és tisztítottuk a végeredményt, akkor sem lehetünk biztosak abban, hogy egyetlen „antitest” lesz jelen a végtermékben, és az egyetlen antigént fog felismerni



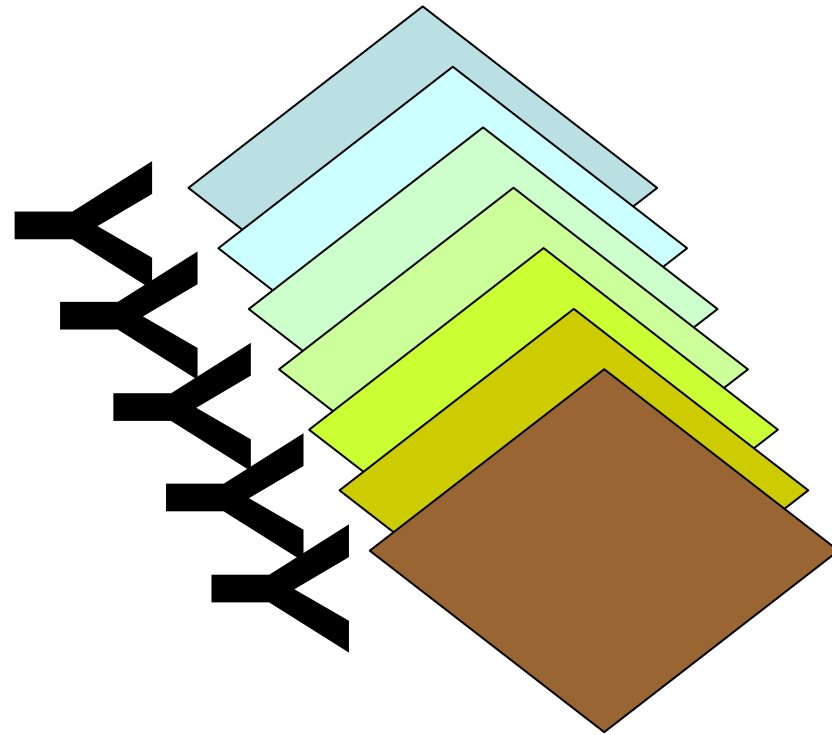
Antitestek

- Mert:
 - Az immunizálásra
használt
preparátumunkban
jelen lehetett módosult
antigén és biztosan
jelen volt adjuváns



Antitestek

- Mert:
 - Az immunizálásra használt preparátumunkban jelen lehetett módosult antigén és biztosan jelen volt adjuváns
 - És az ezek hatására keletkezett anyag alklónokból áll és polireaktív lehet



Az in vivo szituáció ennél természetesen sokkal bonyolultabb

- Antitestek mint diagnosztikumok
 - Amit mérünk
 - Amivel mérünk
- Antitestek mint terapeutikumok
 - Amire hat
 - Amilyen hatást vált ki
 - Ami történik vele

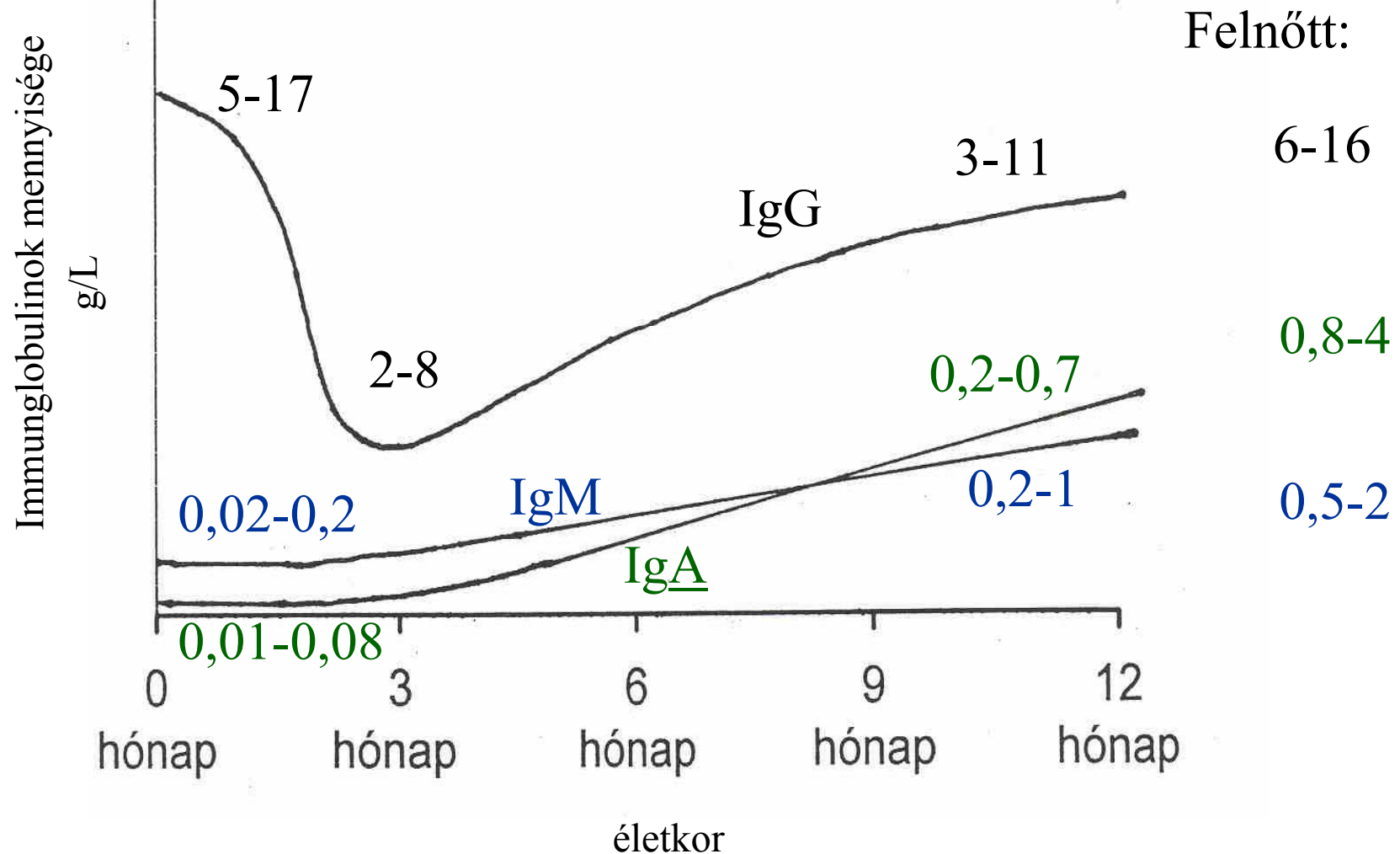
Antitestek és immunitás: humán vonatkozás

- Az antitestek szintjének, hatásainak értékelésekor figyelembe kell venni, hogy az adott szervezet
 - Immunológiailag dinamikus (ontogenezis, patogenezis, öregedés)
 - Nem steril és antigénmentes környezetben helyezkedik el
 - Folyamatosan immunizálódik (apatogén és patogén mikrobák)
 - Genetikailag nem beltenyésztett

Kiemelt felismerési mechanizmusok a veleszületett (?) immunitásban

- Humorális
 - Komplement
 - Természetes antitestek
- Sejtes
 - Fagocitózis (neutrofilek, makrofágok, dendritikus sejtek, B sejtek)
 - TLRs, NOTCH, komplement receptorok, BCR

Az immunglobulinok mennyiségének változása az életkor függvényében (g/L)



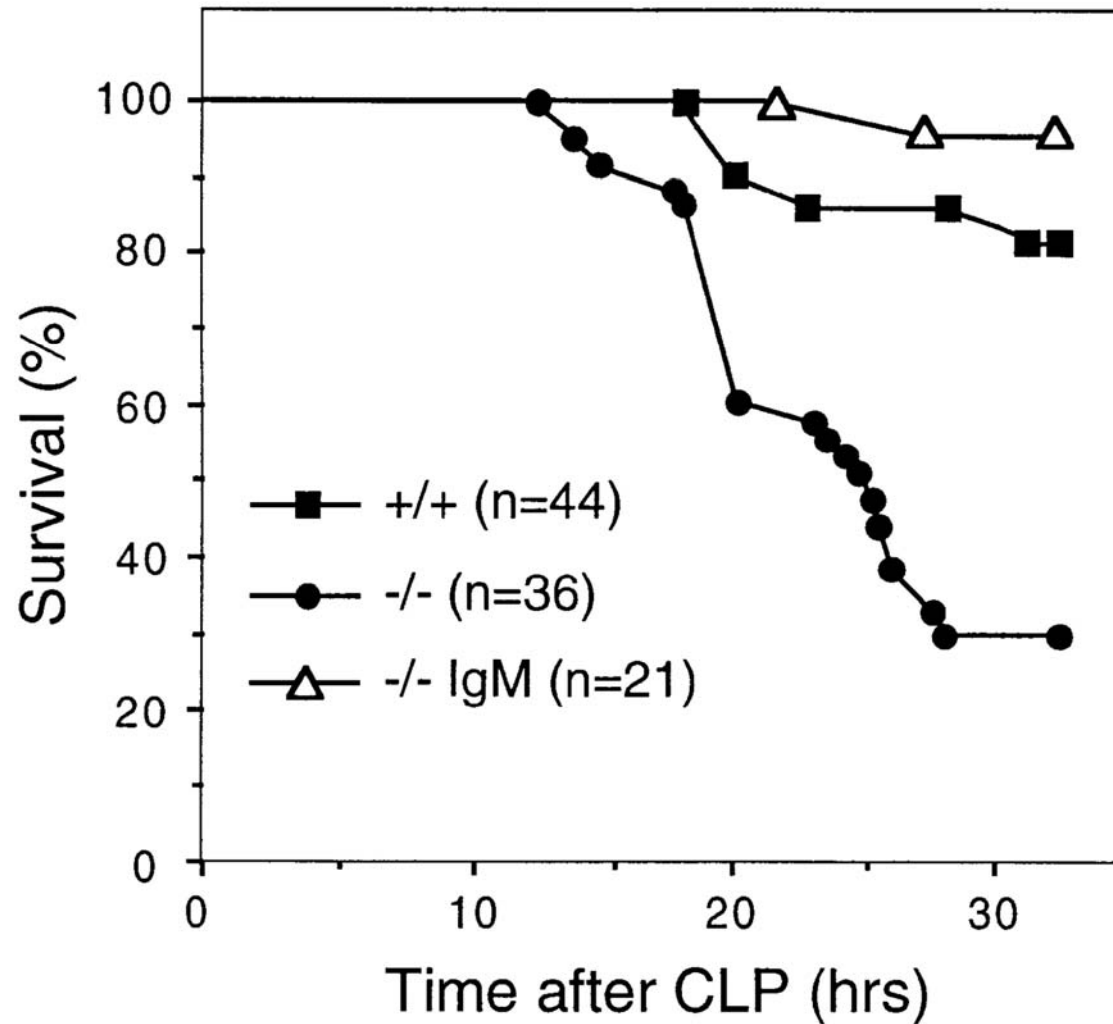
A természetes antitestek

- A természetes antitestek emberek vagy állatok szérumból kimutatható olyan antitestek, amelyek olyan antigénekkkel reagálnak, amelyekkel az adott szervezetet nem immunizálták (vagy a szervezet nem immunizálódott fertőzés során).
- A természetes antitestekről elérhető információk többsége egér modellből származik.
- Egérben a CD5+ B1-sejtek által termelt repertoár tartalmaz nagy mennyiségben természetes antitesteket
- A B-1 sejtek elsősorban a peritoneumhoz és pleurához asszociálódva fordulnak elő, de feltehetően később a lépbe vándorolnak működésük során

A B-1 sejtek és az általuk termelt antitestek jellegzetességei

- Sok esetben „germ-line” szekvenciát tartalmazó klónok
- Fejlődésük az ontogenezis során korán elkülönül a klasszikus B-2 sejtektől (Btk, Bruton's-tyrosine kinase)
- Az antigének meghatározott csoportjaival reagálnak elsősorban
 - Nukleinsavak, hisztonok, hősokkfehérjék, szénhidrátok, foszfolipidek (alapvetően konzervált molekulacsaládok)
- Alacsony affinitású antitestek
- Polireaktivitást mutató antitestek
- Izotípusuk alapvetően IgM
- Funkcionális aktivitásuk jelentős, hiszen pl. bakteriális vagy virális challenge esetén védő szereppel bírnak

Natural IgM confers resistance to CLP. sIgM-deficient (-/-) and wild-type (+/+) mice at 6-8 wk of age were subject to CLP

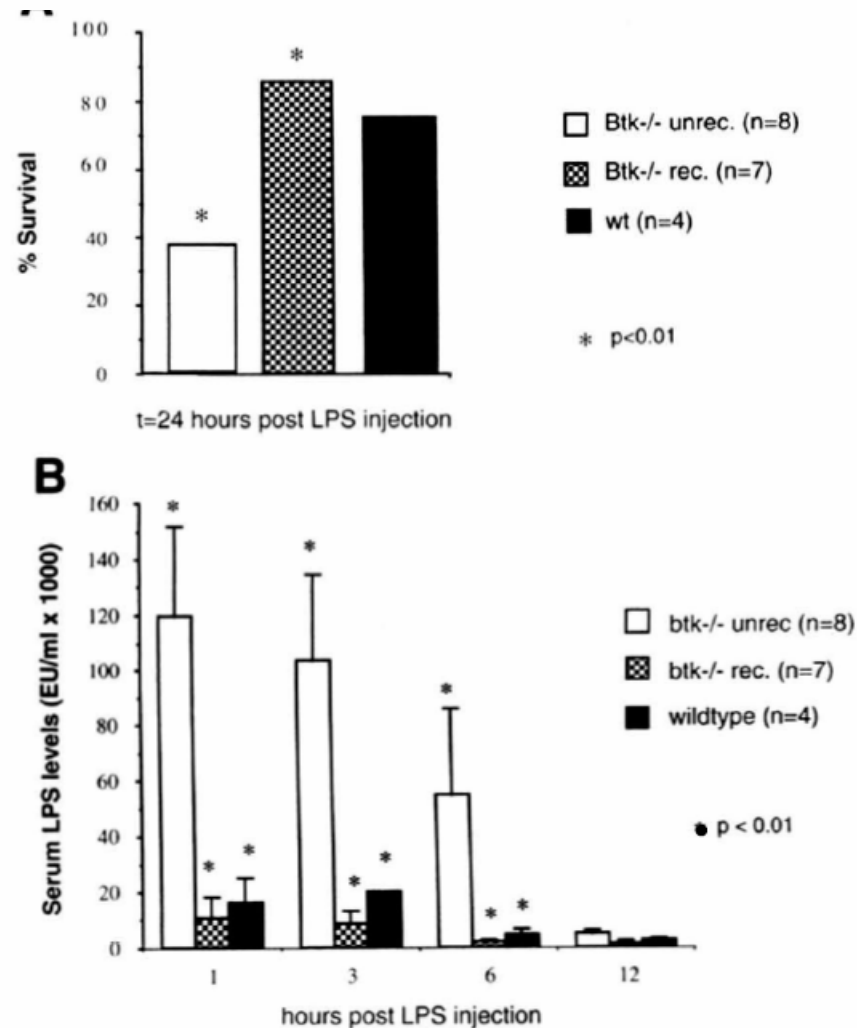


Boes et al. Journal of Experimental Medicine
2009;188:2381-2386

Endotoxin Shock in Antibody-Deficient Mice

Unraveling the Role of Natural Antibody and Complement in the Clearance of Lipopolysaccharide¹

Russell R. Reid,^{*} Andrey P. Prodeus,^{*,†} Wasif Khan,^{†,‡} Tom Hsu,^{*} Fred S. Rosen,^{†,‡} and Michael C. Carroll^{2*}

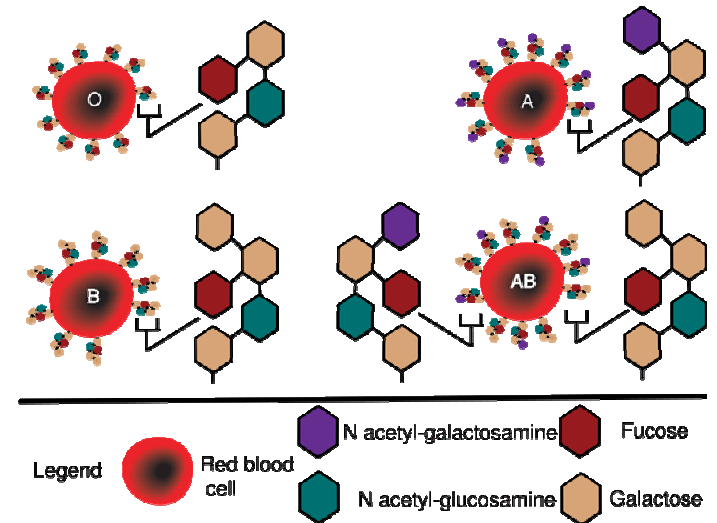


Természetes antitestek: humán bizonyítékok és funkciók

- A természetes antitestek patogén vagy fontos más szerepét több emberi betegség és kórállapot vonatkozásában is bizonyították:
 - ABO vércsoport inkompatibilitás
 - Apoptózis
 - I/R károsodás

Az ABO antitestek

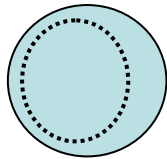
- Feltehetően a legismertebb és leggyakrabban vizsgált természetes antitestek (reguláris antitestek)
- Irreguláris vércsoport antitestek: nem természetes antitestek, mert immunizálás hatására keletkeznek, pl. Rh(-) anyában anti-D
- Funkcionális relevanciájuk óriási
- Az ABO fővércsoport-antigének terminális állású cukormolekuláival reagáló antitestek, melyek a saját bélflóra antigénjei hatására keletkeznek



	Group A	Group B	Group AB	Group O
Red blood cell type				
Antibodies present	Anti-B	Anti-A	None	Anti-A and Anti-B
Antigens present	A antigen	B antigen	A and B antigens	None

Az apoptotikus testek eltávolítása

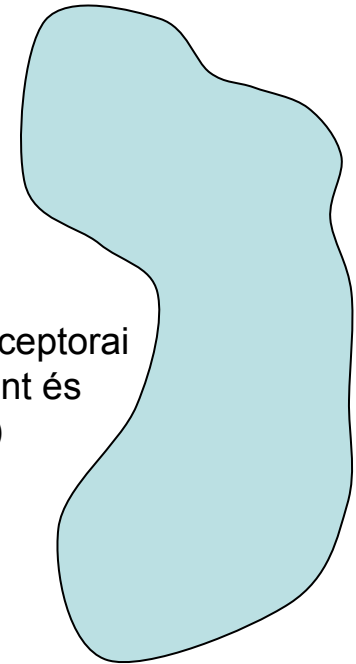
Apoptotikus sejt



'Eat-me' signals

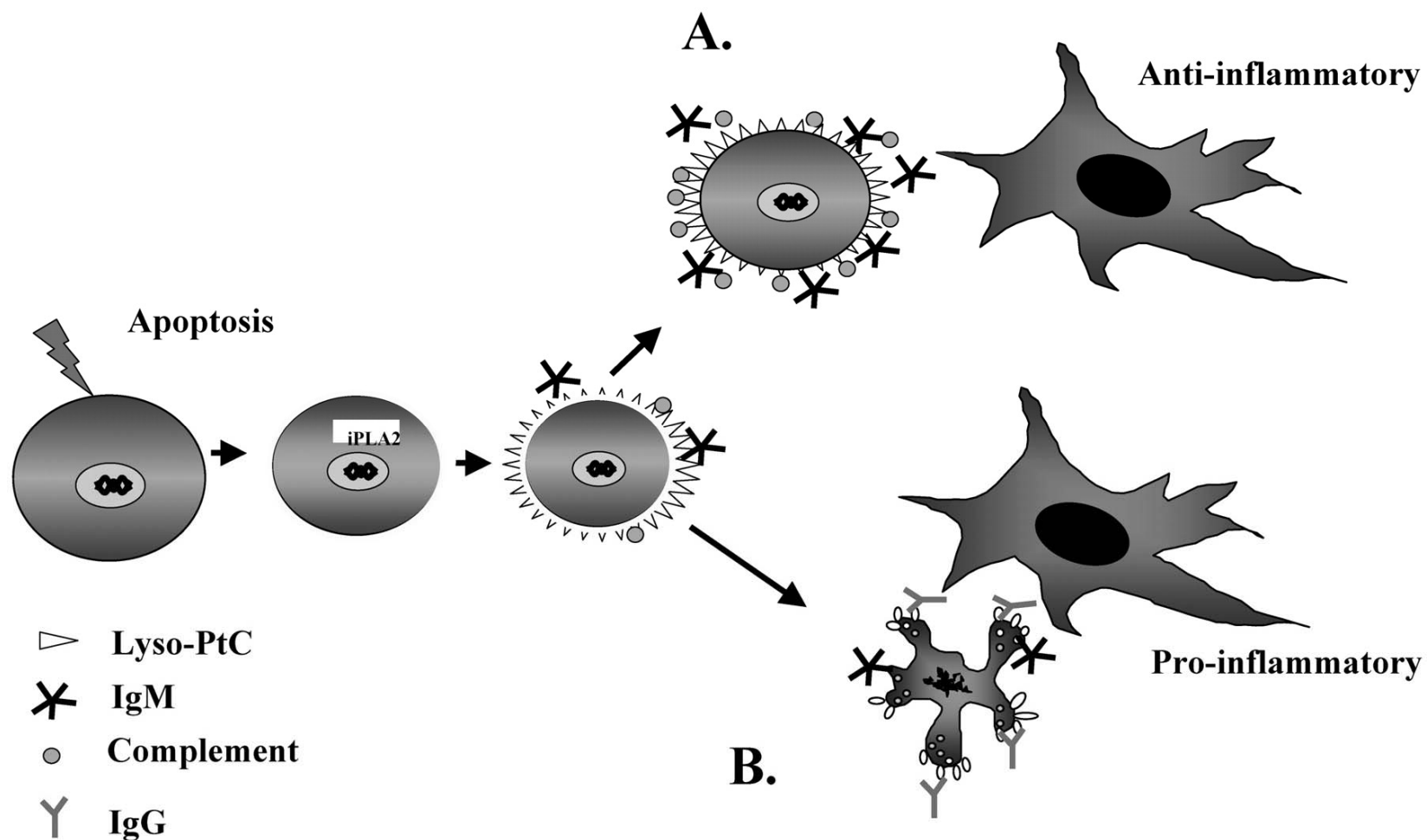
'Bridging' molekulák

Endocitózis receptorai
(PI. komplement és
Fc receptorok)



- A folyamat hatékonysága alapvetően meghatározza a szervezet sérülékenységét (autoimmunitás)
- Az eltakarítás kitüntetett résztvevői:
 - Antitestek (NAB)
 - Komplement (opszonizáció)
 - Akut-fázis fehérjék (pentraxinok)
 - Fagocita sejtek (komplement receptorok)
- Az eltakarítás sérülése a károsodott saját tartós jelenlétét és túlzott gyulladásos válasz beindítását eredményezheti

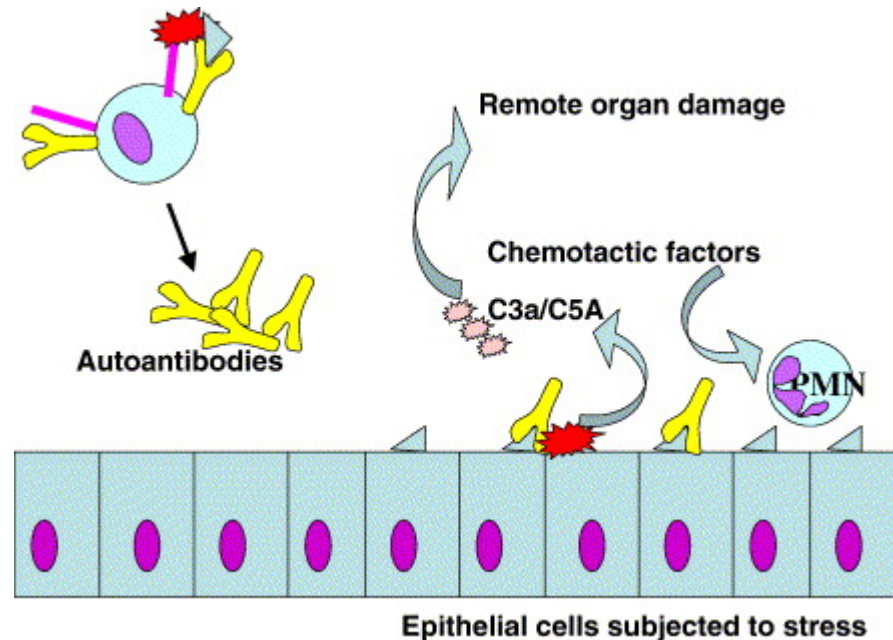
Proposed role of IgM in the binding and clearance of apoptotic cells



Kim et al. Journal of Experimental Medicine 2009;196:655-665

Természetes antitestek és a megváltozott saját (I/R)

- A természetes antitest repertoár olyan antitesteket tartalmaz, melyek képesek kötődni a stressznek kitett saját sejtekhez (módosult saját), komplementet aktiválnak és a saját fokozott károsodását okozzák
- PAMP ~ DAMP 'Danger associated molecular pattern'



Mi a módosult saját?

- El nem érhető antigének (membrán lipidek>> sejten belüli anyag >>apoptótikus test >> nekrotikus anyag)
- Expressziós változások, post-transzlációs változók (főleg szénhidrát)
- Kovalens módosulatok (főleg oxidáció, vagy glikálás, acetilálás, nitrozilálás)
- Mutációs változások, misfolding, denaturálódás (gén mutációk okozta betegségek II. típusa: 'van fehérje de nem működik')

Reperfusion Injury of Ischemic Skeletal Muscle Is Mediated by Natural Antibody and Complement

By Martin R. Weiser,*§ Julian P. Williams,*§ Francis D. Moore, Jr.,*§
Lester Kobzik,†§ Minghe Ma,‡ Herbert B. Hechtman,*§
and Michael C. Carroll‡

- Rag1 -/- és C3 -/- egerek
- Hindlimb ischemia model (permeabilitás változás mérése)

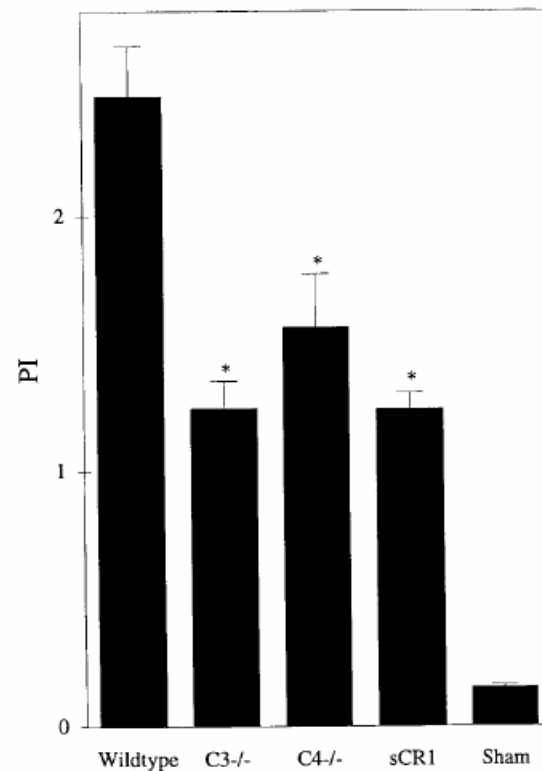


Figure 1. Ischemia/reperfusion injury is mediated by classical pathway of complement. Mice underwent 2 h of hindlimb ischemia and 3 h of reperfusion. Hindlimb P.I. was reduced significantly ($P < 0.05$) in C3-/-, C4-/- and sCR1 treated compared to complement sufficient littermates. The group treated with sCR1 received 20 mg/kg before tourniquet release. The hindlimb permeability index (P.I.) was determined by the ratio (CPM/g dry muscle)/(CPM/g blood). Error bars represent the standard error of the mean and significance at $P < 0.05$ is indicated by an asterisk.

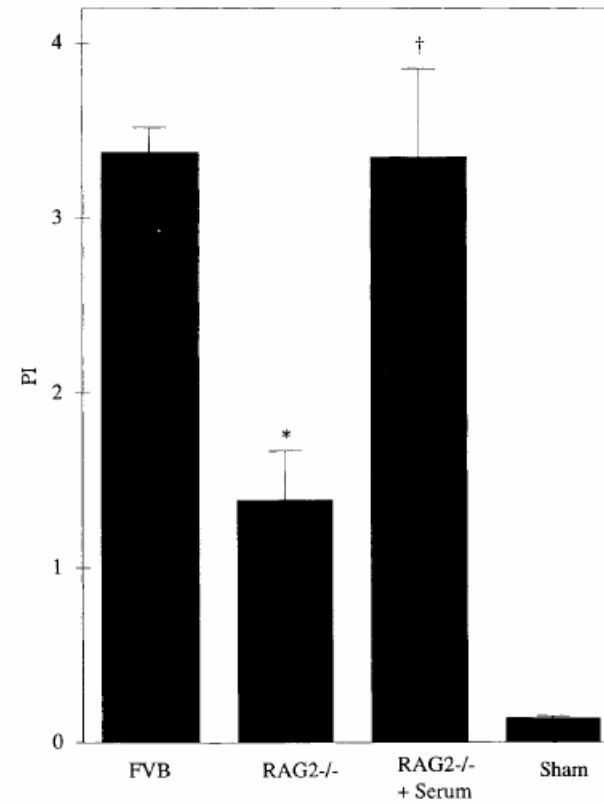
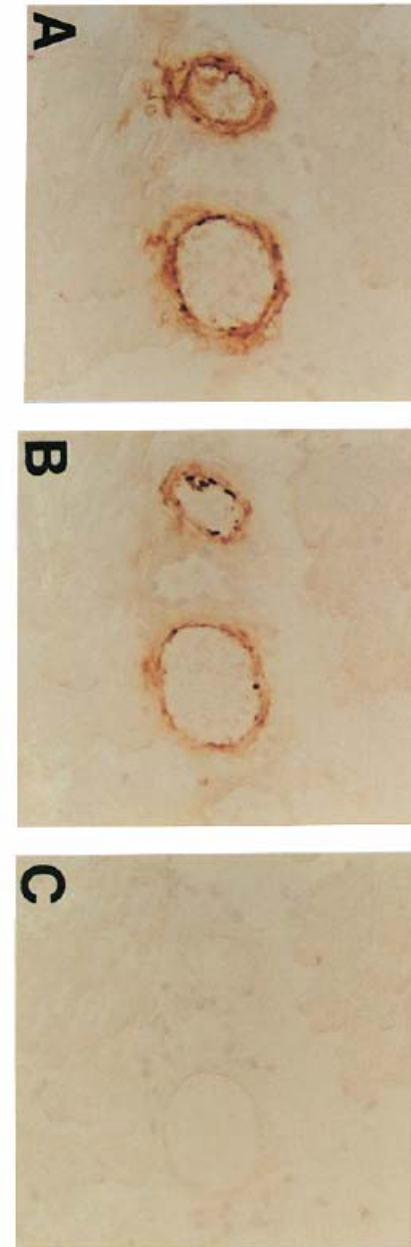


Figure 2. Antibody is important in ischemia/reperfusion injury. Ischemia/reperfusion injury was induced in RAG2-/- or control mice as described in Fig. 1. RAG2-/- mice (strain FVB background) were reconstituted by i.v. administration of 0.5 ml of pooled serum from control mice (strain FVB) 15 h before ischemia. RAG2-/- mice had a significant reduction in P.I. ($P < 0.05$) (indicated by asterisk) which was reversed by addition of normal serum ($P < 0.05$).

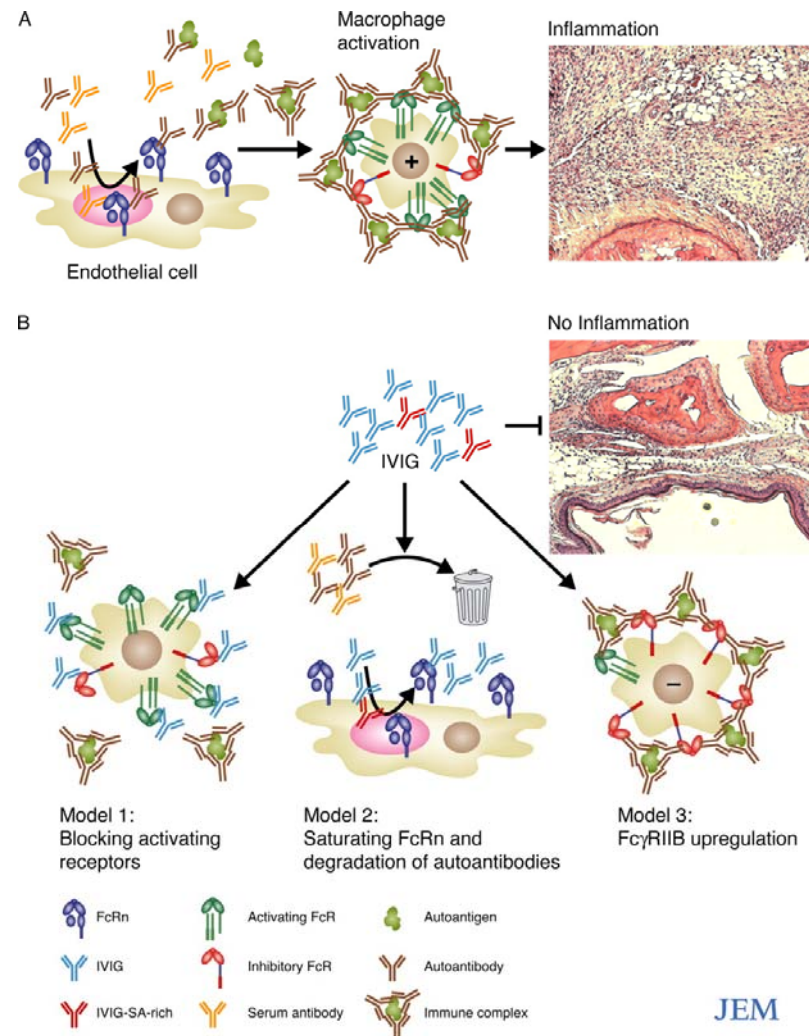


Az intravénás immunglobulin készítmények

- Több ezer véradó plazmájából készített immunglobulin (IgM és IgG valamint más fehérjék is)
- Felfogható, mint a teljes humán természetes antitest repertoár
- A specificitáson és az egyéb „antitest” jellegzetességeken kívül alapvetően fontos az IVIG immunglobulinjainak glikoziláltsági mintázata

- A gyulladásos válaszreakció nem specifikus gátlása

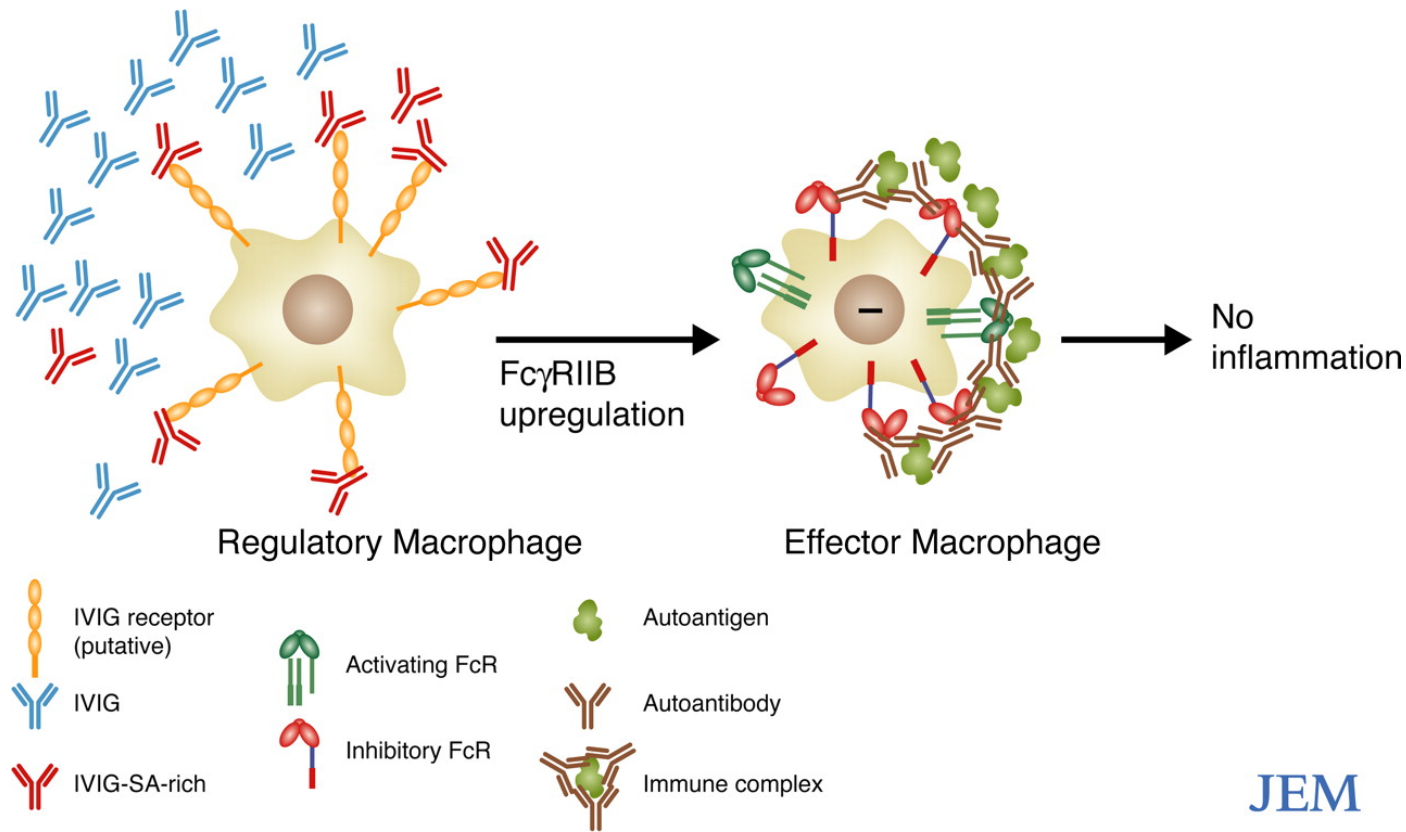
Figure 1. Models for the mechanism of IVIG-mediated antiinflammatory activity



Nimmerjahn, F. et al. J. Exp. Med. 2007;204:11-15

JEM

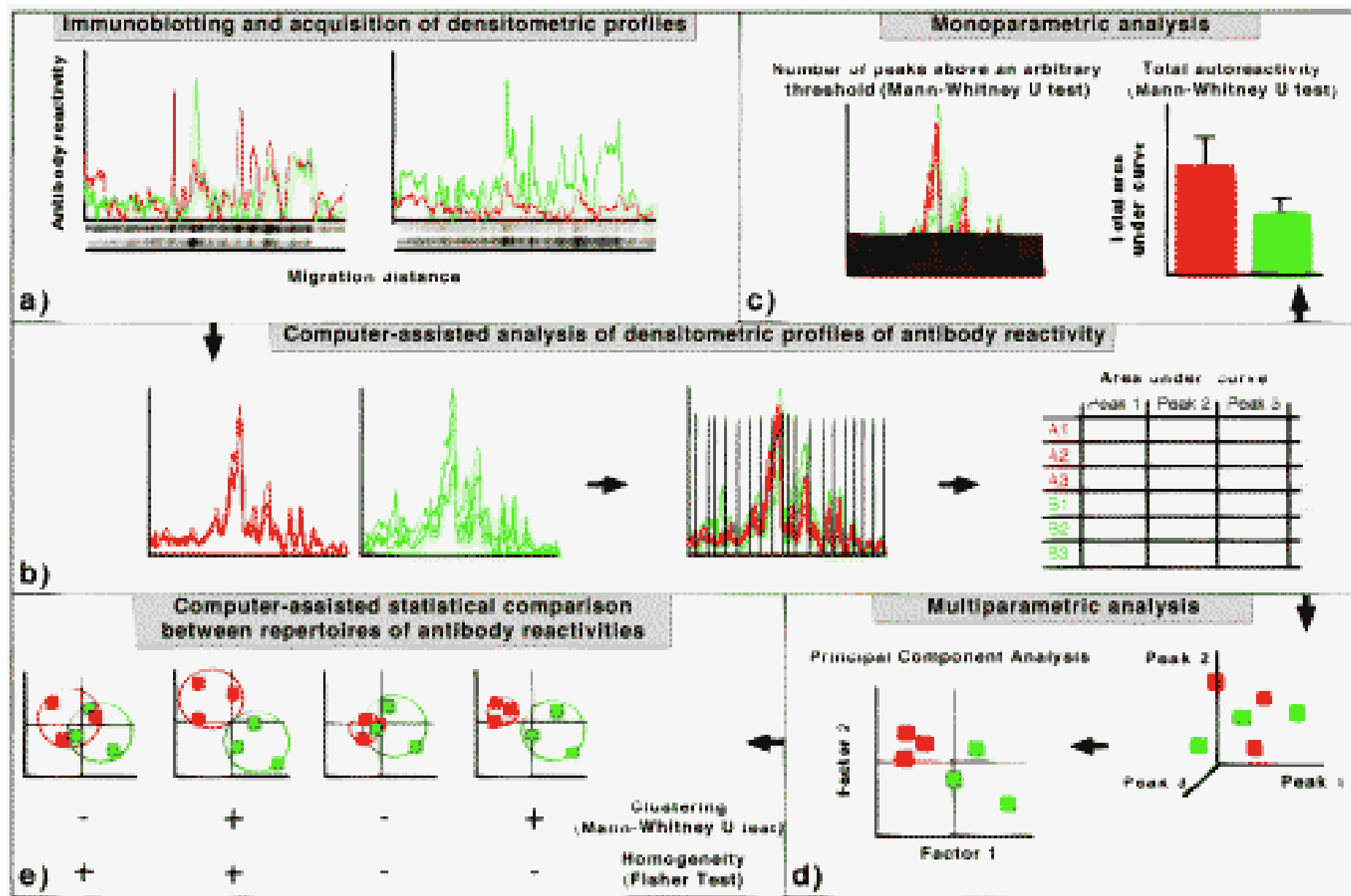
Figure 2. Two-cell model for the mechanism of IVIG activity



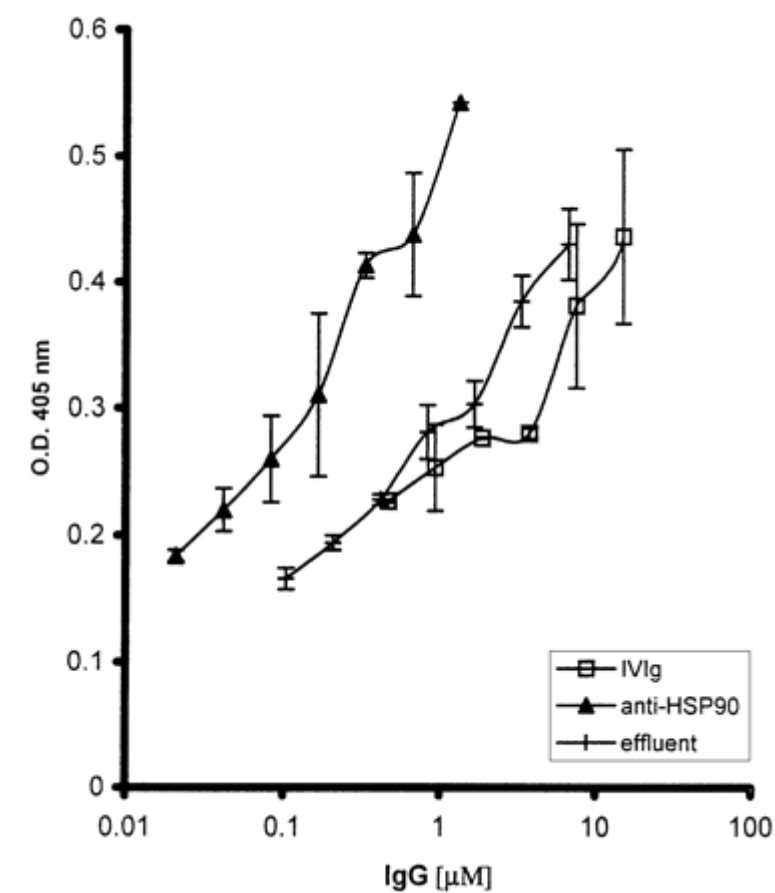
Nimmerjahn, F. et al. *J. Exp. Med.* 2007;204:11-15

A természetes autoantitest repertoár humán vizsgálata

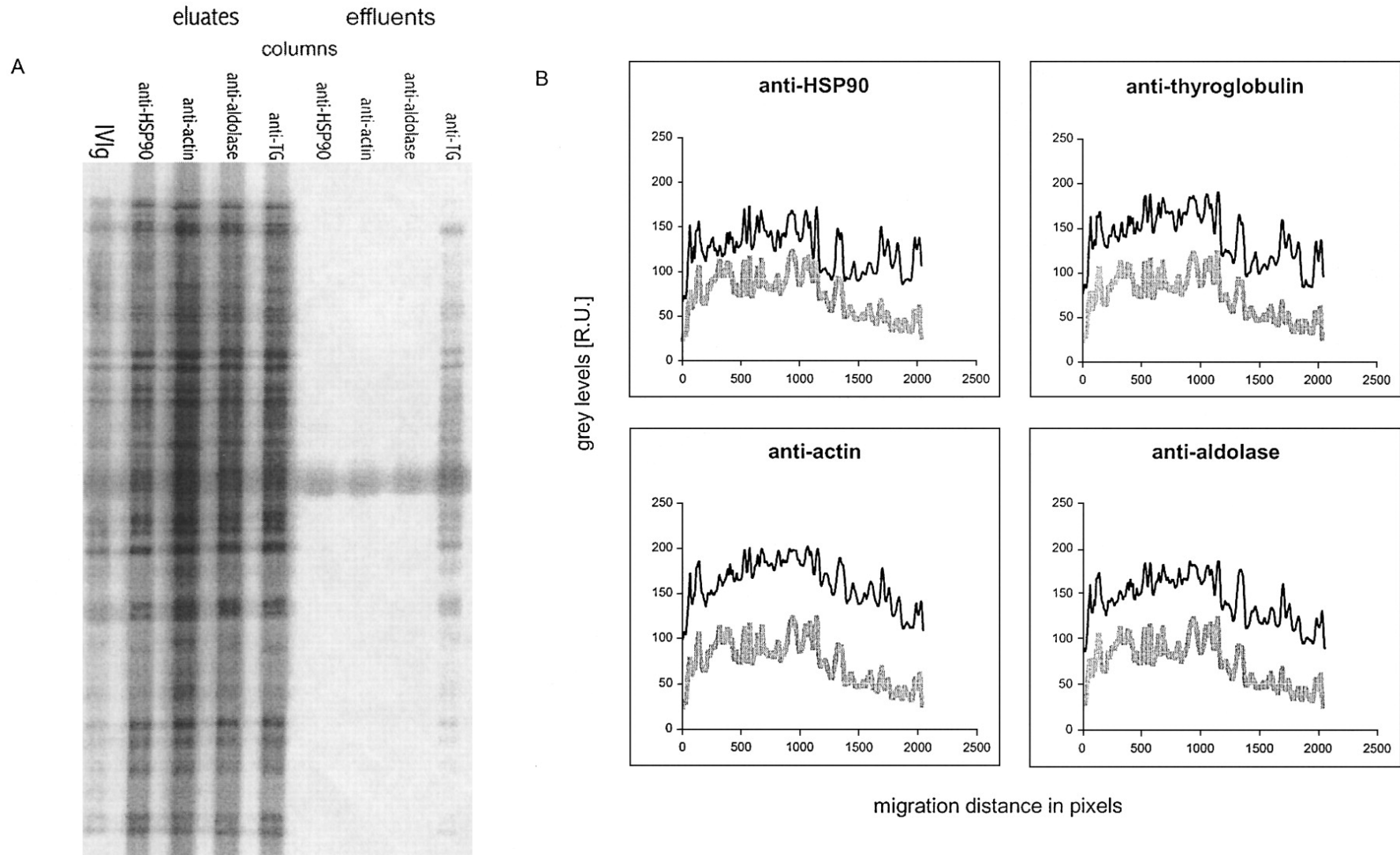
- Sok évtizedes megfigyelés, hogy az emberi szérum is tartalmaz természetes antitest jellegű tulajdonságokkal bíró autoantitesteket (natural autoantibodies)
- Ezek jellemzése kevésbé tökéletes, mint az egér modell
- A legtöbb megfigyelés az ún. kvantitatív immunoblot technikával keletkezett

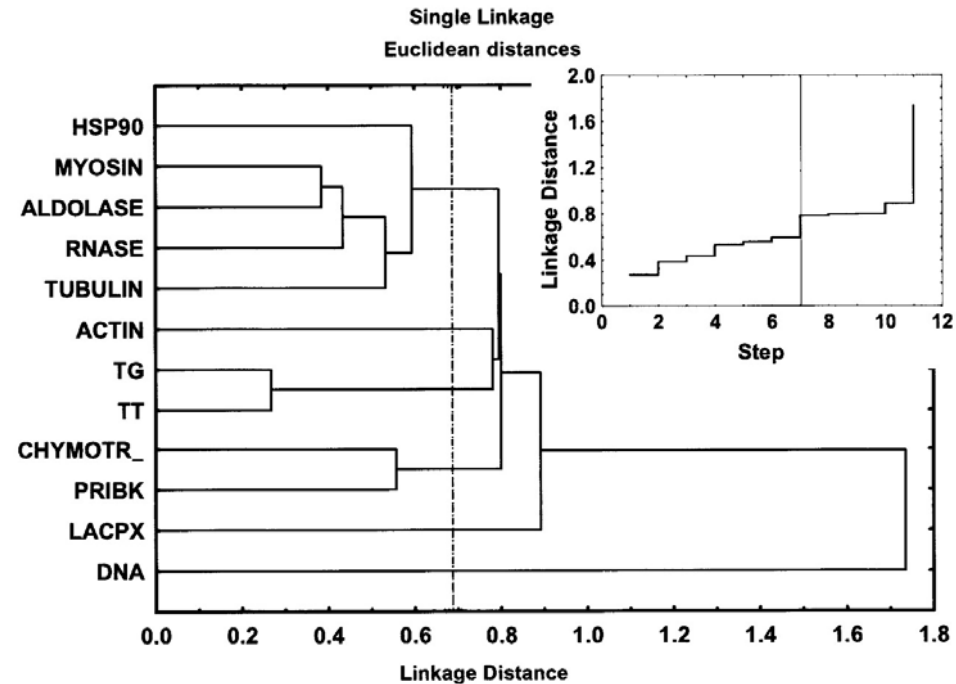


Binding of anti-HSP90 isolated from IVIg to HSP90

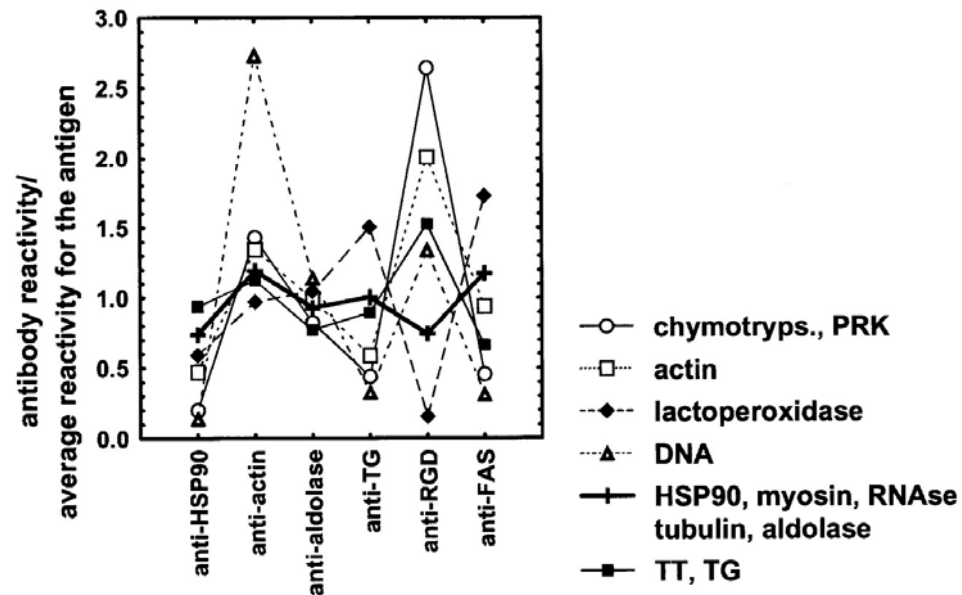


Immunoblot analysis of the reactivity of antibody repertoire of IVIg, anti-HSP90, anti-actin, anti-aldolase and anti-TG antibodies isolated from IVIg, and of the corresponding effluent fractions towards antigens extracted from liver tissue.





- The analysis shows the existence of one cluster of similar antigens as opposed to the rest of the antigens studied, which are diverse. This cluster, containing HSP90, myosin, RNase, tubulin and aldolase, is characterized by uniform binding of all antibodies used.

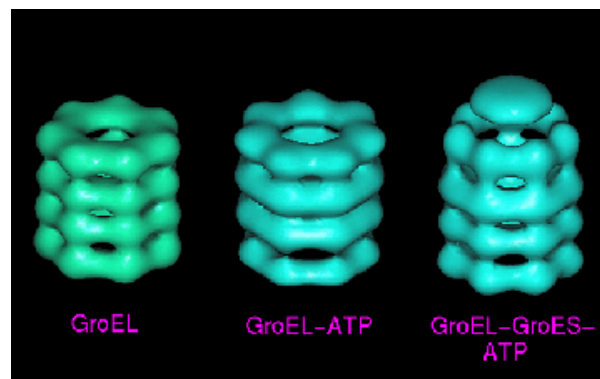
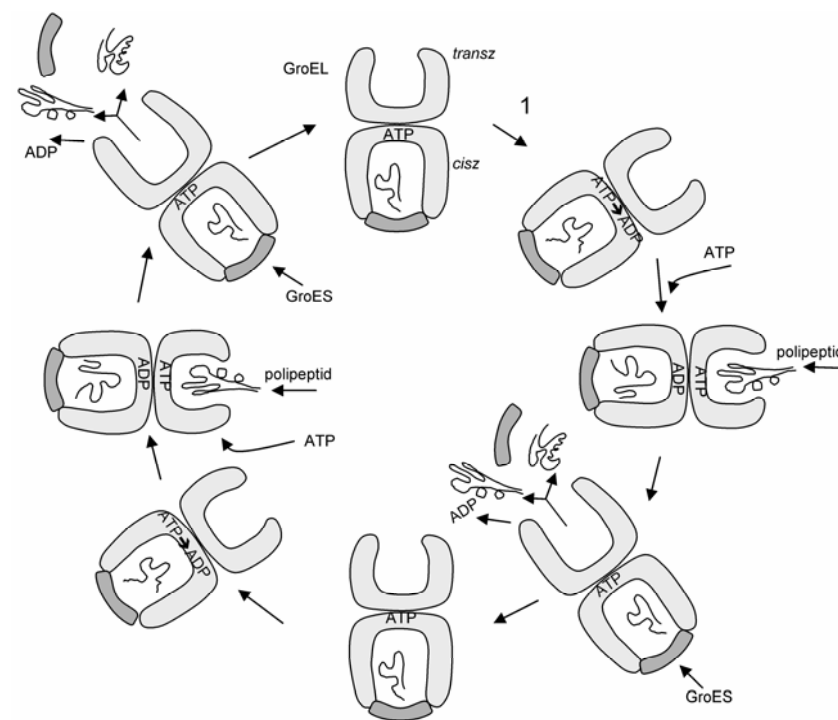


Néhány következtetés Kazatchkine és Coutinho munkái alapján: a humán természetes autoantitestek

- Az emberi természetes antitest repertoár tartalmaz autoantitesteket is
- Ezek az antitestek polireaktívak, specificitásuk azonban kitüntetett konzervált antigének irányában
- Ezek azok az antigének, melyekkel szemben speciális védelem, aktív tolerancia szükséges, mivel az élet során a szervezet többször is ki van téve a mimkri-indukálta autoimmunitás veszélyének
- Védő autoimmunitás szükséges a kitüntetett antigének épségének biztosításához

A 60 kDa-os hősokkfehérje

- Rendkívül konzervált felépítésű dajkafehérje, melynek működése elengedhetetlen a sejtek számára
- Immundomináns tulajdonságú molekula, homológ működésű és felépítésű molekulák minden prokaryotában kimutathatók (Hsp65)
- Stresszfehérje, celluláris szintje megnő stresszhatásra és lokalizációja megváltozik (sejtfelszínre vándorol)
- Klinikai vizsgálatunkat az a megfigyelés indította el, hogy anti-Hsp65 antitestek emelkedett szintjét találták carotis atherosclerosisban (Georg Wick és mtsai).



Vizsgálataink célja az emberi szérumban kimutatható anti-Hsp60 autoreaktivitás jellemzése volt.

**Az anti-hsp60 antitestek
a természetes antitestek közé tartoznak emberekben?**

IgM anti-hsp60 meghatározása köldökzsinór vérben

Az anti-Hsp60 polireaktivitásának igazolása

Az anti-hsp60 állandó, karakterisztikus szintjének bemutatása



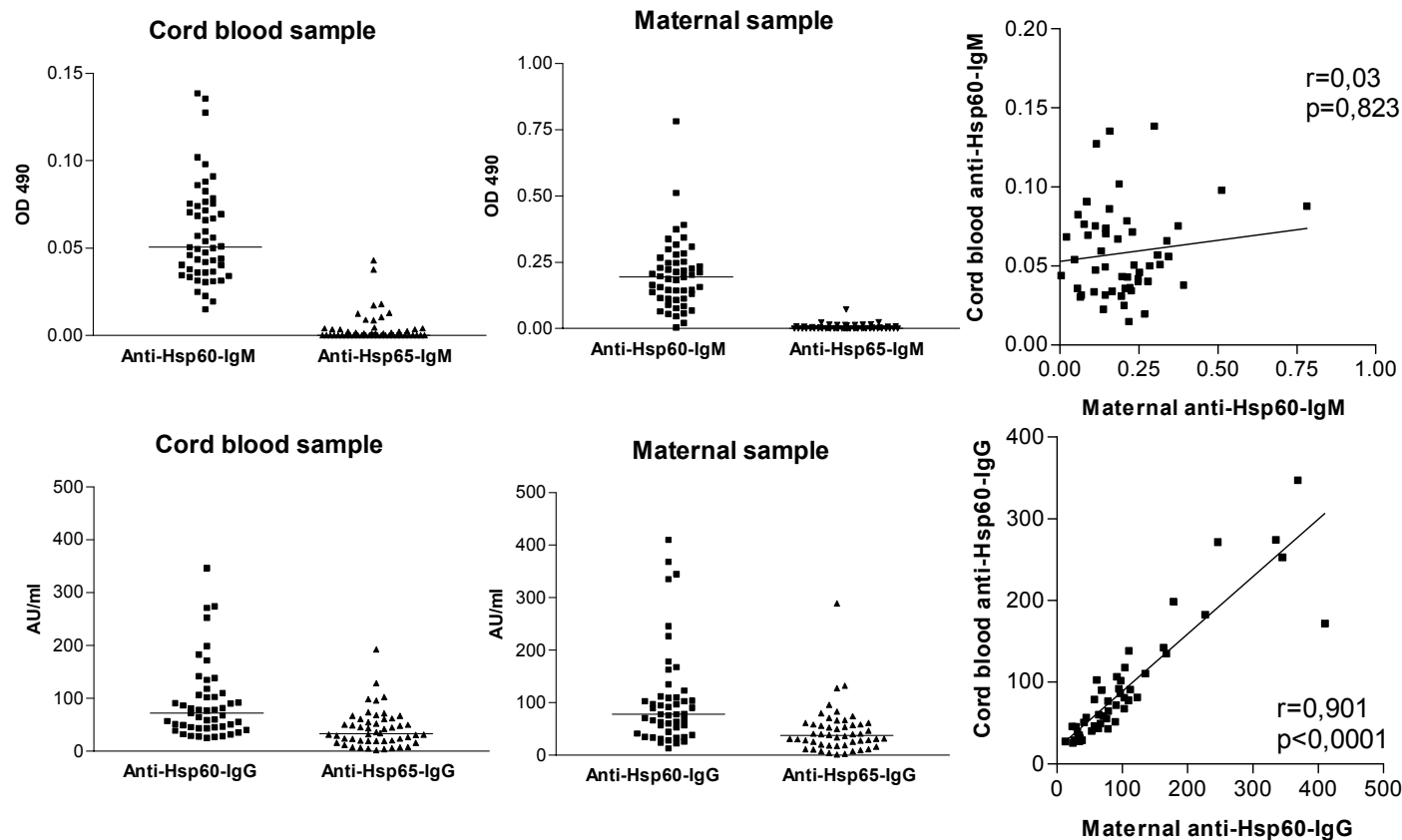
**Szabályozás antigén-eredetű
tényezők által**

Komparatív epitóp-analízis
Összefüggés fertőzésekkel

**Szabályozás genetikai
tényezők által**

Az antitesttermelést szabályozó
faktorok vizsgálata

Anti-hsp60 antitestek jelenléte a köldökzsinór vérben



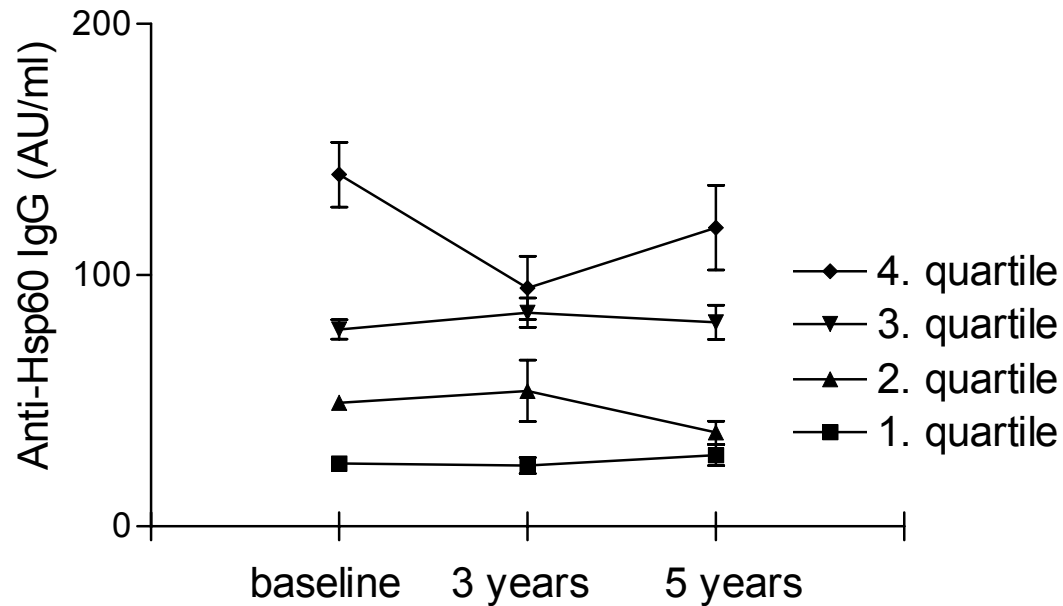
- Anti-humán Hsp60 IgM antitestek igen, de anti-Hsp65 IgM nem volt jelen
- Mind anti-Hsp60 és Hsp65 IgG is jelen volt (anyai transzfer).

Az anti-hsp60 antitestek polireaktivitása

Klón	TNP-BSA	FITC-BSA	BSA	DNS	Actin	Cholestrol	Hsp60	Total positive
1/1								4
1/4								4
1/5								5
1/11								4
2/3								6
2/5								4
2/13								5
2/15								4
2/21								5
3/9								5
3/17								6
3/25								3
4/5								3
4/6								5
4/12								3
4/20								2
4/21								7
6/17								3
6/26								5
6/34								6
7/1								3
7/8								4
7/16								5
7/20								6
8/8								7
8/14								5

- Egér hibridóma panel vizsgálata
- A klónok többsége polireaktív
- A klónok 20%-a reagált hsp60-al is

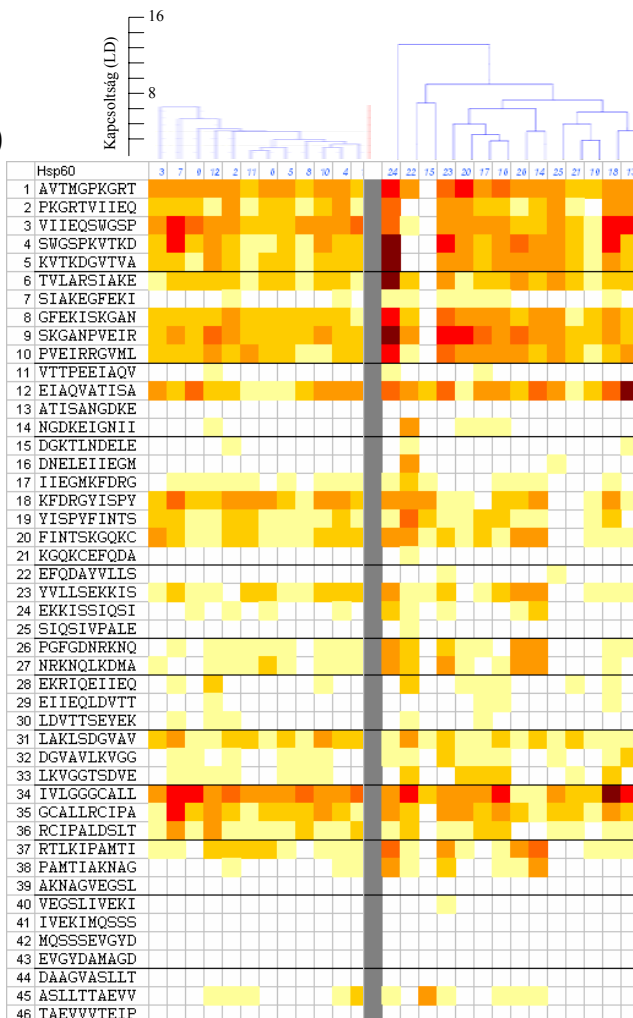
Az anti-hsp60 antitestek szintjének állandósága



- A természetes antitestek egyik jellegzetessége, hogy szintjük egyedileg jellegzetes és állandó
- Vizsgálatunk szerint emberekben az anti-hsp60 IgG szintje 5 év távlatában nem változik lényegesen

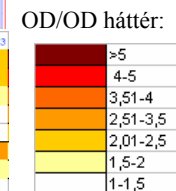
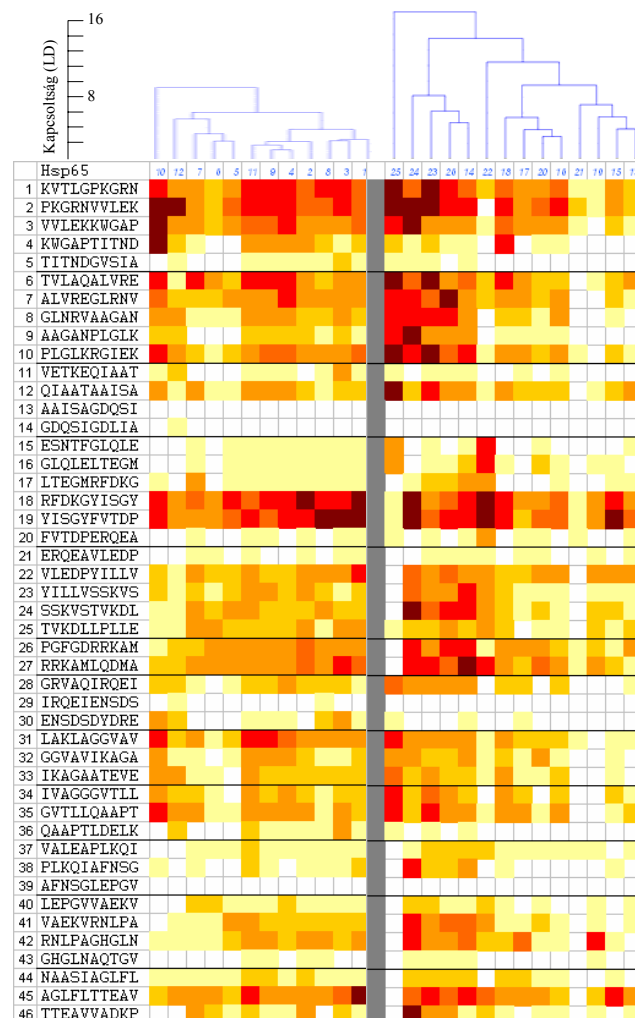
Hsp60

- 1: AA 52-81
- 2: AA 117-146
- 3: AA 162-186
- 4: AA 203-238
- 5: AA 239-262
- 6: AA 303-317
- 7: AA 368-387
- 8: AA 394-413
- 9: AA 436-455
- 10: AA 470-484
- 11: AA 485-509
- 12: AA 531-550



Hsp65

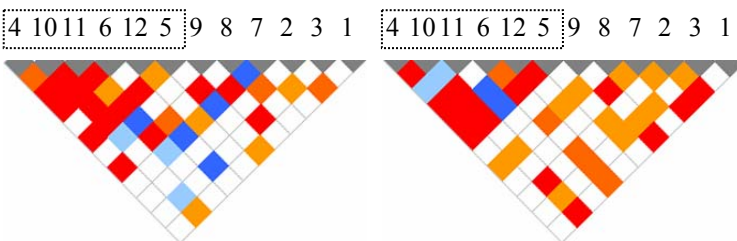
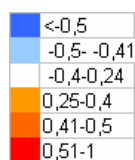
- 1: AA 26-55
- 2: AA 91-120
- 3: AA 136-160
- 4: AA 176-211
- 5: AA 212-235
- 6: AA 276-290
- 7: AA 341-360
- 8: AA 366-385
- 9: AA 408-427
- 10: AA 441-455
- 11: AA 456-580
- 12: AA 502-521



Kontroll, n=12

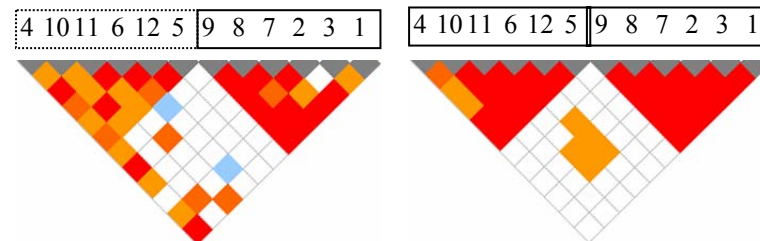
ISZB, n=14

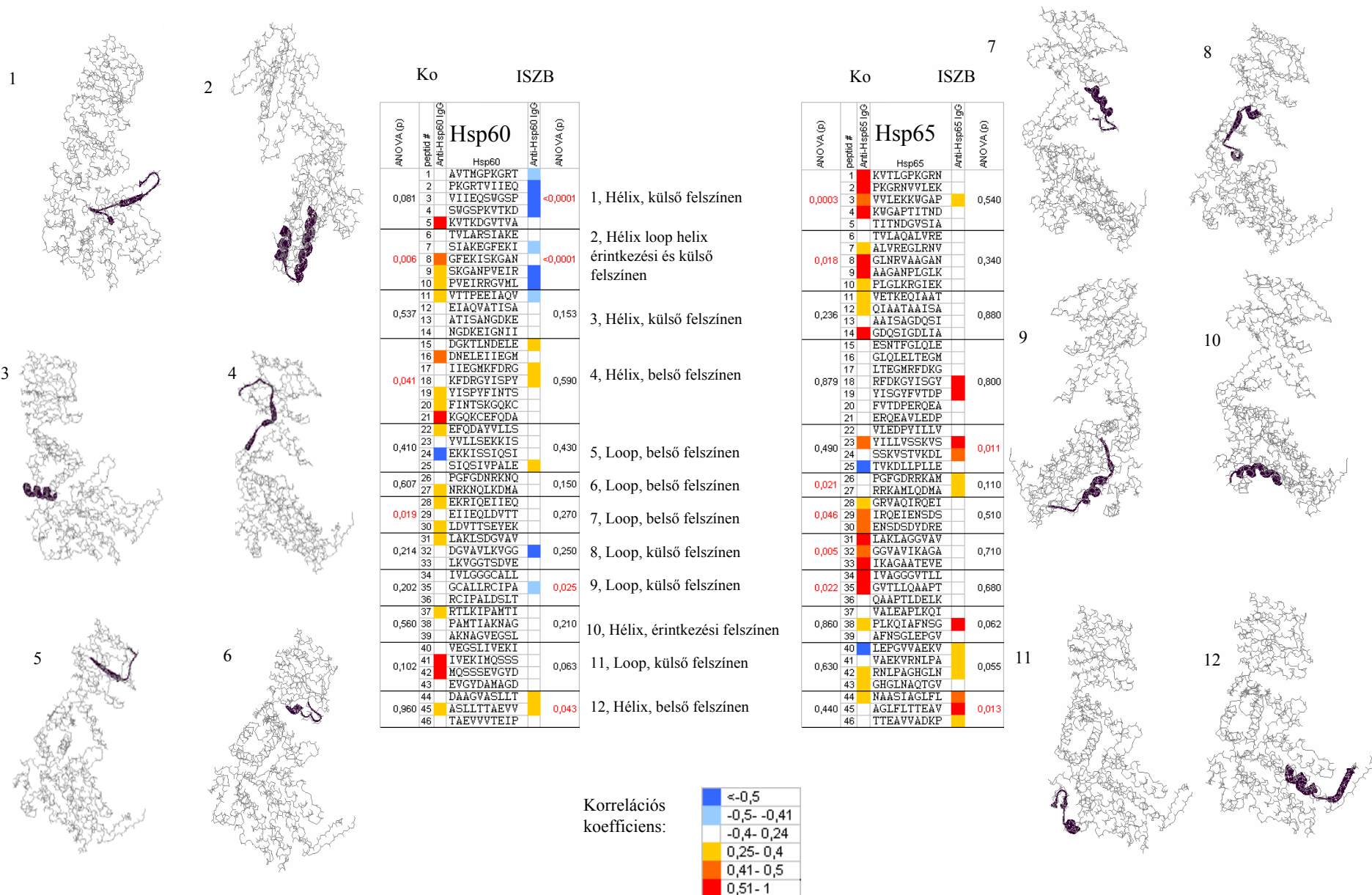
Korrelációs
koefficiens:



Kontroll, n=12

ISZB, n=14





- Az azonosított 12 epitóprégió többsége mindkét molekulán előfordul
- Egészségesekben dominálnak az oligomer Hsp60 molekula külső felszínével reagáló antitestek
- Coronariabetegségben megjelennek a belső felszínt vagy érintkezési pontot felismerő antitestek

Az anti-hsp60/65 antitestek összehasonlító epitóp analízise

- Mindamellett, hogy a hsp60 és a hsp65 molekulák között 45-55%-os aminosav homológia mutatható ki, lényeges különbségeket találtunk az epitóptérkép vonatkozásában.
- A 'keresztreakáló' epitópok mellett „bakteriális” és „humán” specifikusak is léteznek.
- A keresztreakáló epitópok a tetradekamer molekula külső felszínén vannak jelen (mind egészségesekben, mind koronária betegekben kimutathatók).
- A „bakteriális” specifikus hsp65 epitópok a molekula belső oldalán találhatók, az ellenük irányuló antitestek dominálónan CAD betegekben fordulnak elő
- A többszörös epitópokkal reagáló antitestek előfordulásának valószínűsége fokozott a betegekben. (epitope spreading)

Az anti-Hsp60-autoantitestek szintje emelkedett coronariabetegek szérumában

- Betegcsoport: 357, coronaria by-pass operáción átesett személy
- Beteg-kontrollok: 67, negatív coronarogrammal rendelkező személy, stabil angina-pectorissal vagy pozitív ergometriás lelettel
- Egészséges kontrollcsoport: 321 véradó
- Elsőként végeztünk összehasonlító jellegű klinikai vizsgálatokat anti-Hsp60-autoantitestek és anti-*M. bovis* Hsp65 antitestek vonatkozásában

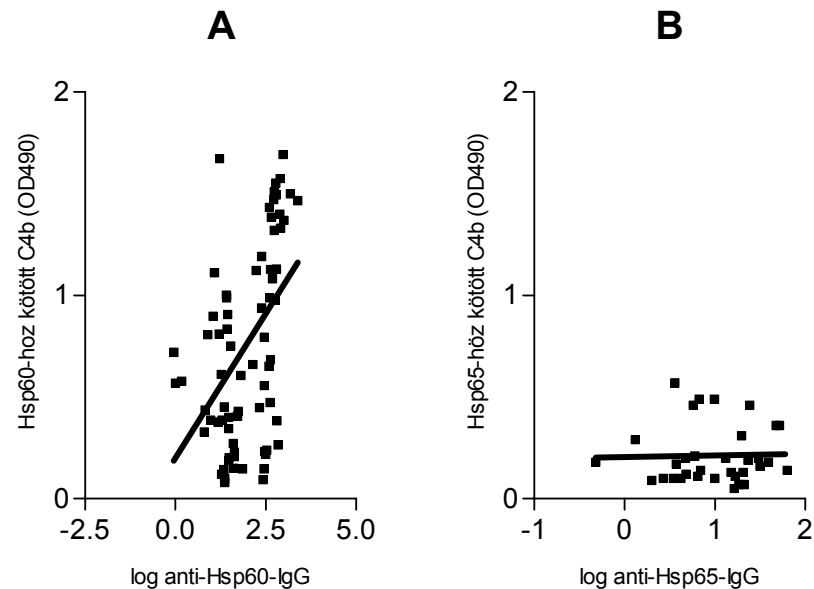
Változó	By-pass	Beteg-kontroll	p-érték
Életkor (év)	58 (52–64)	61 (54–67)	0,027
Nem (férfi/nő)	273/84	46/21	0,228
Testtömegindex (ttkg/m ²)	28 (26–31)	26 (25–30)	0,077
Szérumkoleszterin-szint (mmol/l)	6,2 (5,5–7,3)	6,35 (5,5–7,3)	0,747
HDL-koleszterin-szint (mmol/l)	1,27 (1,1–1,3)	1,3 (1,27–1,32)	0,001
LDL-koleszterin-szint (mmol/l)	3,96 (3,2–4,8)	4,2 (3,2–4,8)	0,505
Trigliceridszint (mmol/l)	2,1 (1,4–3,1)	1,6 (1,3–2,1)	0,01
Soha nem dohányzott	30,3%	42,9%	0,106
Dohányzik v. dohányzott	60,7%	57,1%	–

Változó*	p-érték
Anti-humán Hsp60	0,0073
Anti- <i>M. bovis</i> Hsp65	0,918
Anti- <i>E. coli</i> GroEL	0,957
Életkor	0,179
Testtömegindex	0,951
Dohányzás	0,249
HDL-koleszterin	0,006
Triglicerid	0,941

Többszörös logisztikus regressziós analízis

Az anti-Hsp60-autoantitestek és az anti-*M. bovis* antitestek összehasonlító vizsgálata

- **Funkcionális** (komplement-aktiváció) és **strukturális** (epitóp analízis) különbségeket találtunk a kétféle antigénnel mért antitestek vonatkozásában
- A Hsp60 (A) autoantitestek erős komplement aktivátorok míg az anti-Hsp65 antitestek (B) ilyen tulajdonsággal nem rendelkeznek



Az anti-Hsp60 autoantitest szintek genetikai meghatározottsága

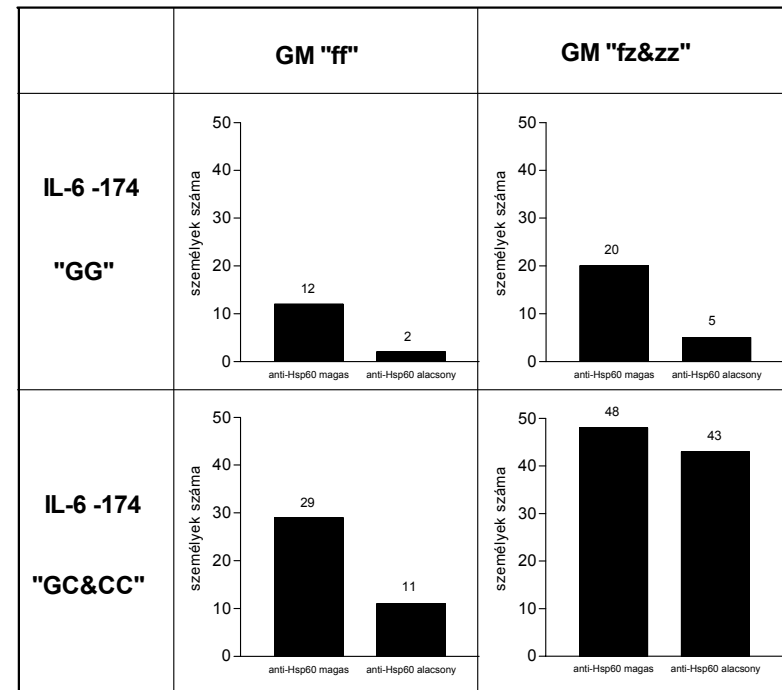
Genotípus	Összes személy, n=320		Férfiak, n=118		Nők, n=202	
	Anti-Hsp60-IgG	p-érték	Anti-Hsp60-IgG	p-érték	Anti-Hsp60-IgG	p-érték
IL-6 –174 GG	41,8 (23,3–82,1)	0,0026	37,5 (24,5–53,9)	0,0343	48,2 (23,6–112,9)	0,064
IL-6 –174 GC	46,4 (29,8–77,9)		44,9 (28,4–77,1)		47,6 (31,7–79,6)	
IL-6 –174 CC	30,0 (18,6–50,0)		27,7 (16,8–43,9)		38,6 (19,8–51,8)	
IL-6 –174 G hordozó	44,9 (28,4–78,8)	0,0013*	40,5 (27,4–69,6)	0,018	48,1 (28,7–88,2)	0,022

* IL-6 -174 GG+GC vs. CC

- Az anti-Hsp60-autoantitest-szintek IL-6 –174 genotípus szerinti megoszlása egészséges magyar populációban:
 alacsony antitestszintek az alacsony IL-6 termeléssel összefüggést mutató genotípust (-174 CC) hordozókban találhatók

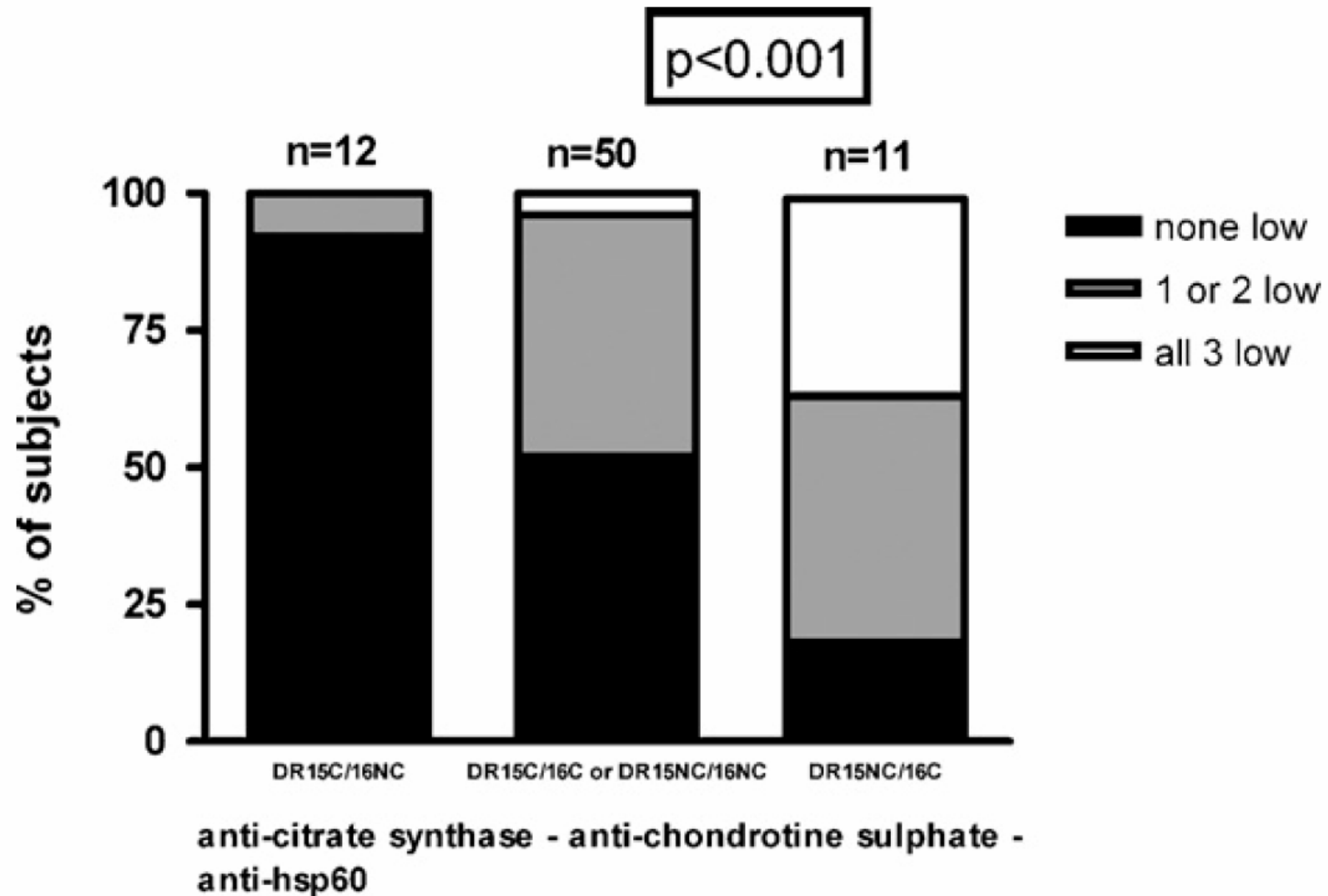
Episztatikus kölcsönhatás az IL-6 és az Ig-GM lókuszok között az anti-Hsp60 szintek vonatkozásában

- Az Ig-GM „f” allél jelenléte és a magas anti-Hsp60 szintek közötti kapcsolatot az IL-6 -174 „C” allél jelenléte képes elfedni
- Ez a kölcsönhatás „GC” heterozygótákban is érvényes
- Feltehetően számos genetikai tényező együttesen határozza meg az autoantitest szinteket



IL-6 Genotípus	Ig-GM f/z genotípus	Alacsony anti-Hsp60 szint	Magas anti-Hsp60 szint
IL-6 -174 CC	f f f z z z	7 7 3	13 13 4
IL-6 -174 GC	f f f z z z	4 21 12	16 23 8
IL-6 -174 GG	f f f z z z	2 5 0	12 12 8

HLA-association of serum levels of natural antibodies (Mol. Immunol, in press)



Összefoglalás az autoantitestekről

- Az autoantitestek keletkezésének meghatározói:
 - Az antigén (elérhetőség, módosulás)
 - A szervezeti válaszreakció (pl. HLA-shared epitóp, RA, vagy egyéb genetikai meghatározottság, pl. antigénprezentáció, immunkomplex-clearance, B-sejt működés, stb....akár az egész immunrendszer működését is fel lehetne írni)
 - Környezeti tényezők (pl. dohányzás, fertőzések)
- Emiatt az autoantitestek esetleges manipulálásának (patogén klónok kiírtása vagy a patogén antitestek eltüntetése) folyamata is összetett, nem feltétlenül a leghatékonyabb eljárás lesz jó egy adott szituációban (mert az a helyesen működő védő, szabályozó immunitást-autoimmunitást is kiírhatja).
- Hasonló a szituációs a bélcsatorna kolonizálódásához pl. Salmonellával, ahol járhatatlan út a teljes sterilizálás.

RASSEGNA

- Az autoantitestek keletkezése komplex

Citrullination: the loss of tolerance and development of autoimmunity in rheumatoid arthritis

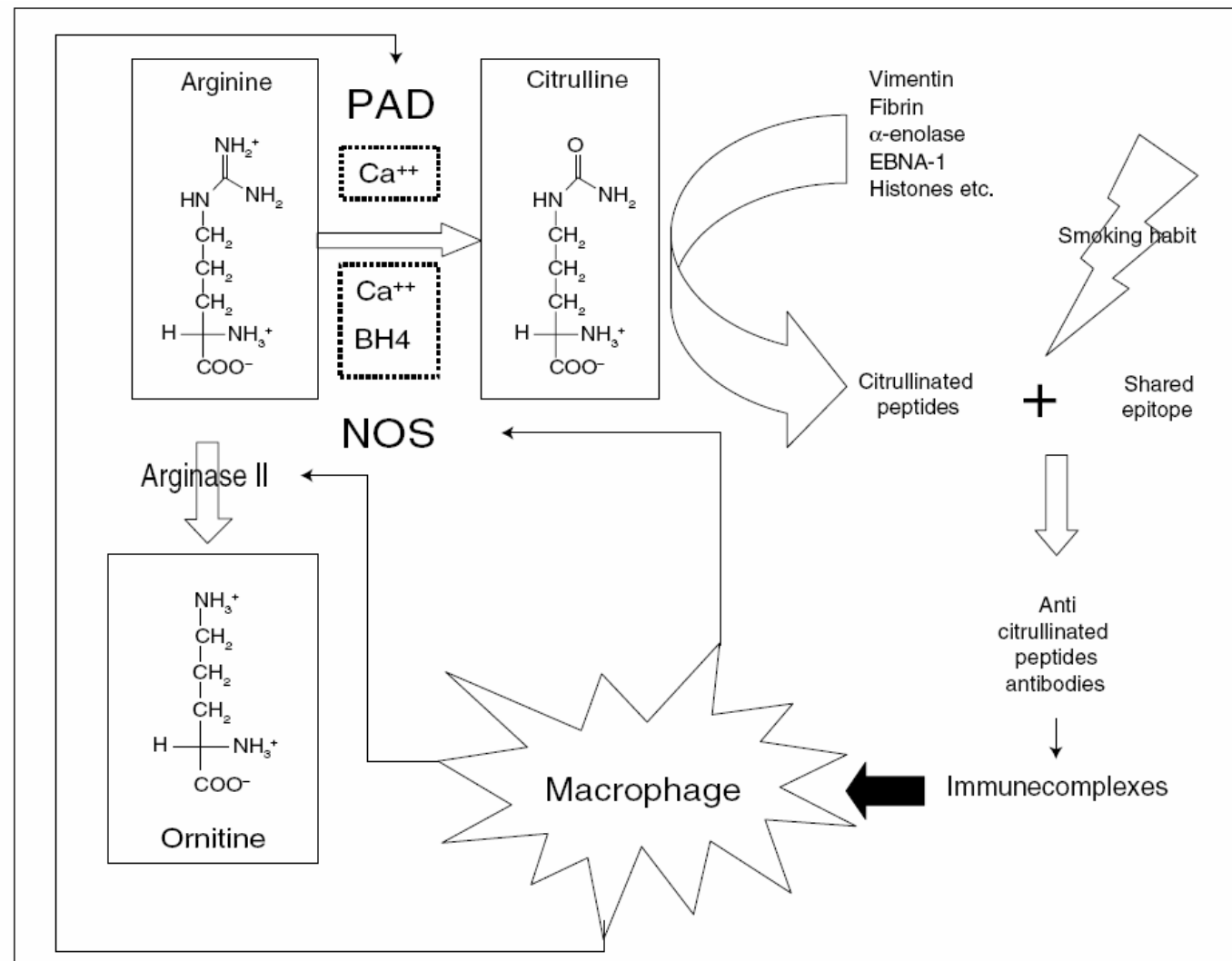
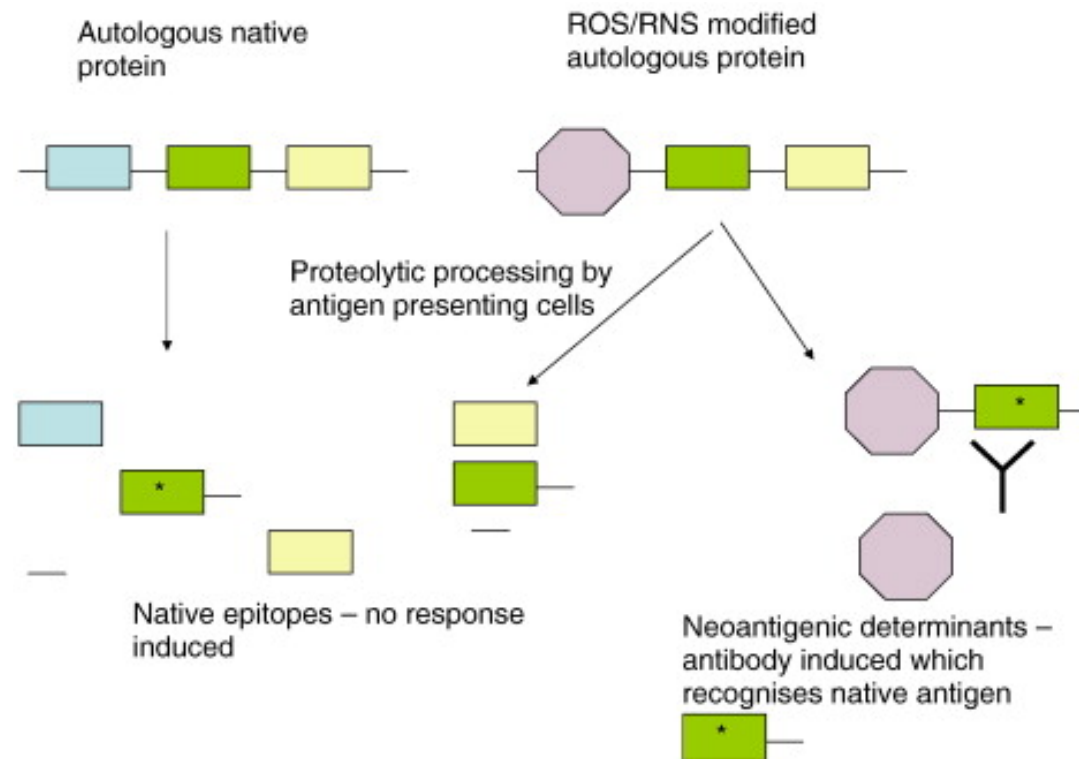


Figure 1 - Loss of tolerance to citrullinated proteins in RA: possible biological mechanisms.

A tolerancia áttörésének egyik alapmechanizmusa az epitope-spreading

- Transplantation >> early graft damage >> loss of tolerance, auto-AB formation



Egyes betegségek, ahol igazolható volt a módosult antigének szerepe

Oxidatively modified antigens associated with autoimmune diseases

Oxidized antigen involved	Diseases
Oxidized LDL and 8-oxodeoxyguanine	SLE
HNE-modified 60 kD Ro	Animal model of SLE
Oxidized LDL	Atherosclerosis
IgG modified with advanced glycation end product; pentosidine	Rheumatoid arthritis
Oxidatively modified glutamic acid hydroxylase	Type I diabetes mellitus
Oxidized LDL	Behcet's disease

Példák a betegségaktivitás és B-sejt funkció direkt kapcsolatára

- SLE (anti-DNA)
- Rheumatoid arthritis (anti-citrullin)
- Scleroderma (anti-EC, anti-centromer, anti-PDGFR...)
- T1DM (anti-GAD65)
- Multiplex Sclerosis (anti-MBP)
- Atípusos HUS (anti-komplement H faktor IgG)

Autoantitestek és emberi betegségek

- Határozott különbséget kell vonni a következő lehetőségek között
 - AutoAb mint funkció nélküli kísérőjelenség
 - AutoAb mint diagnosztikai marker
 - AutoAb mint betegségaktivitás marker
 - AutoAb mint prognosztikai marker
 - AutoAb mint patogenetikai tényező