



Cvičení č. 1

Úvod Biologický materiál Protilátky

RNDr. Jana Nechvátalová, Ph.D.
Mgr. Julie Štíchová

ÚKIA

Ústav Klinické Imunologie a Alergologie

**Alergologická
ambulance**
Alergická onemocnění

**Imunologická
ambulance**
Autoimunity, imunodeficiency

Laboratoř

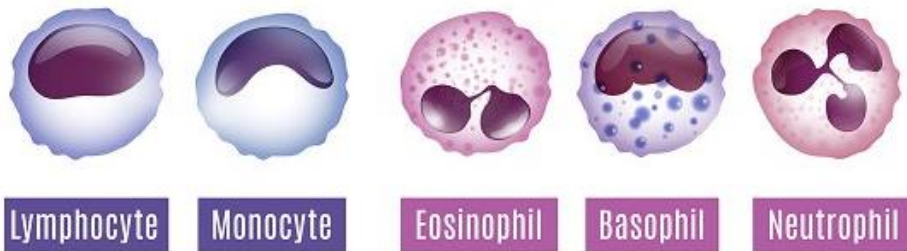
Buněčná část

Serologická část

Rozdělení imunologických laboratorních metod

Buněčná laboratoř

Soustředí se na leukocyty



- Absolutní a relativní počty
- Funkční vlastnosti

Serologická laboratoř

Stanovení proteinů v séru

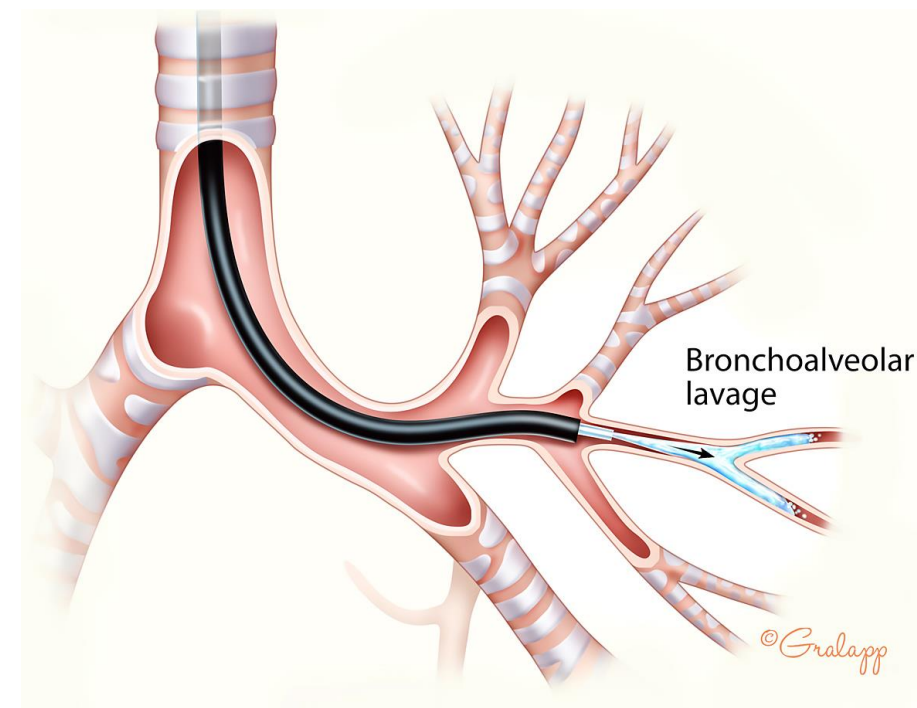
- Autoprotilátky
- Imunoglobuliny
- Proteiny akutní fáze
- Komplement
- Specifické IgE a další ...

Laboratorní vyšetření

- Fáze preanalytická
 - Mimolaboratorní – příprava pacienta, odběr, žádanka, transport
 - Laboratorní – příjem materiálu, centrifugace, vytvoření alikvotů se štítky
- Fáze analytická
 - Vlastní laboratorní vyšetření, kalibrace metody + kontroly, dokonalý technický stav přístrojů
- Fáze postanalytická
 - Laboratorní – skladování vzorku, zisk výsledků → vydání nálezu
 - Mimolaboratorní – účelné využití výsledků k diagnostice/léčbě

Biologický materiál

- **Žilní krev** – uzavřené odběrové systémy
- Méně často BAL (bronchoalveolární laváž)
- Každý biologický materiál doprovází žádanka
- Svoz:
 - V rámci nemocnice – ruční donáška
 - Externí materiál – svoz autem (2krát za den)



Biologický materiál

Plazma

- Z **nesrážlivé** krve
- EDTA – vyvazuje Ca_{2+}
- Heparin – anti IIa/Xa aktivita



Sérum

- Ze **srážlivé** krve
- Zkumavky s gelem – akcelerace koagulace
- Sérum neobsahuje koagulační faktory a fibrinogen



Biologický materiál

Buněčná laboratoř

EDTA



Vyšetření
lymfocytárních
subpopulací

HEPARIN



Funkční testy
leukocytů

Vyšetření z PLNÉ KRVE nebo separovaných bb.

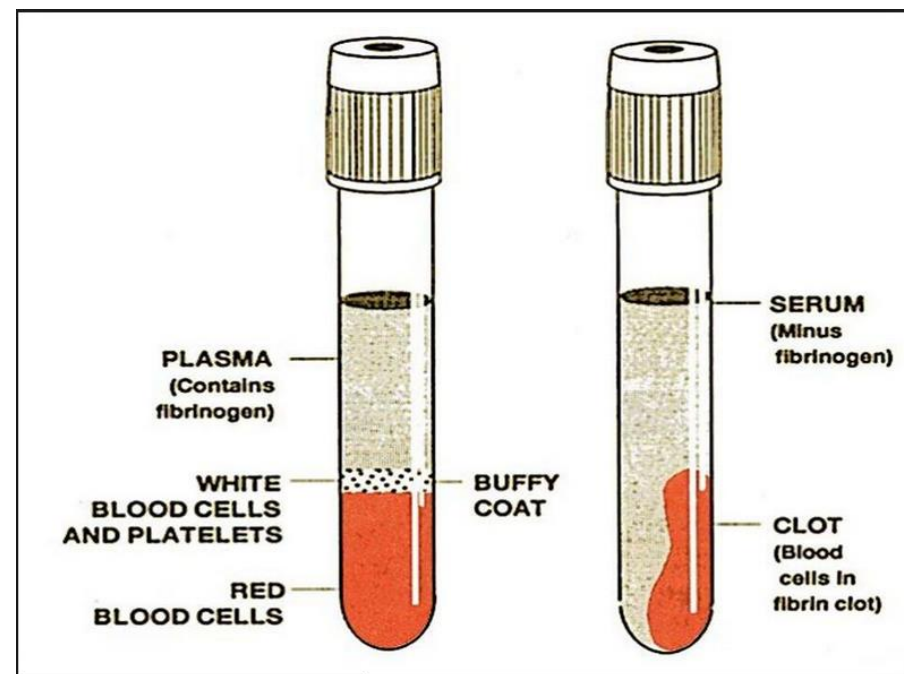
Serologická laboratoř

SERUM-GEL



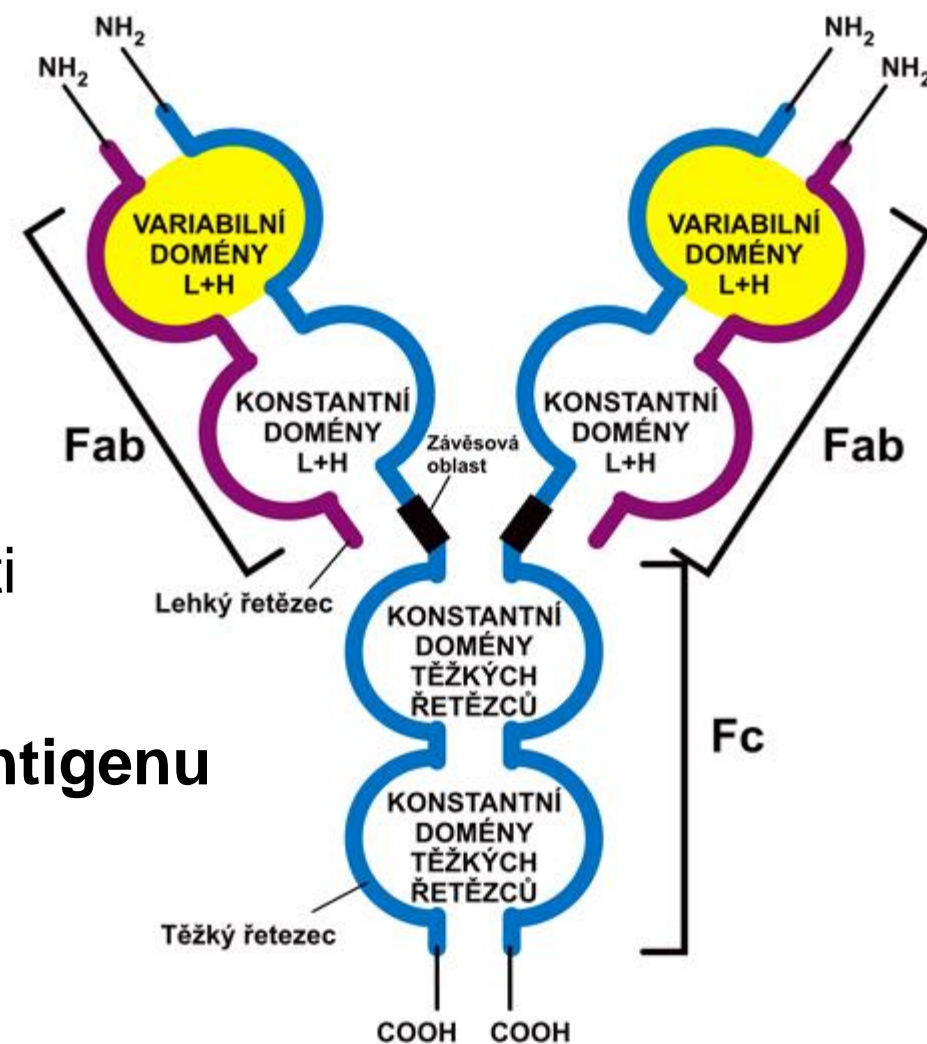
Příjmová laboratoř - sanitáři

- Příprava séra – centrifugace (2000 otáček/min, 10 min)
- Příprava alikvotů pro metody → štítky
- Kontrola, zda je objem séra dostatečný pro všechny požadované metody
- Speciální metody – zamrazení sér



Struktura protilátky (IgG)

- 2 těžké (H) + 2 lehké řetězce (L)
- Spojení – kovalentní disulfidickými můstky
- Pantová oblast - flexibilita
- L řetězec – 1 variabilní + 1 konstantní oblast
- H řetězec – 1 variabilní + 3-4 konstantní oblasti
- 2 Fab fragmenty – variabilní oblasti – **vazba antigenu**
- 1 Fc fragment – **efektorová funkce**



Protilátky

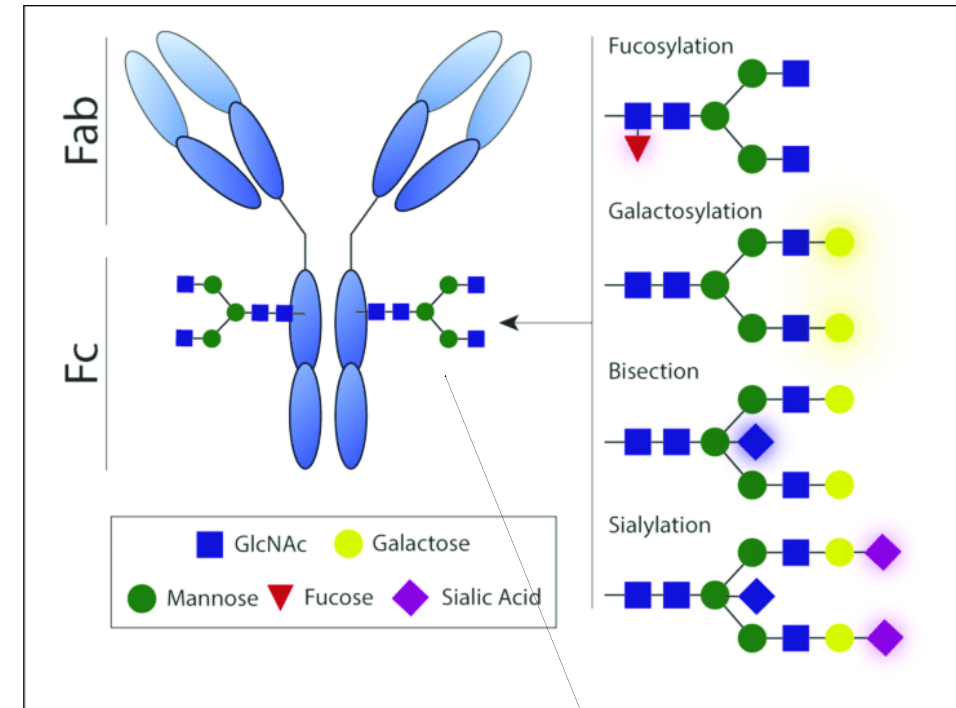
Chemické složení: **glykoproteiny**

Význam pro obratlovce:

- Humorální složka adaptivní imunity
- Ochrana před extracelulárními patogeny
- Neutralizace virů a toxinů
- Odstraňování poškozených struktur

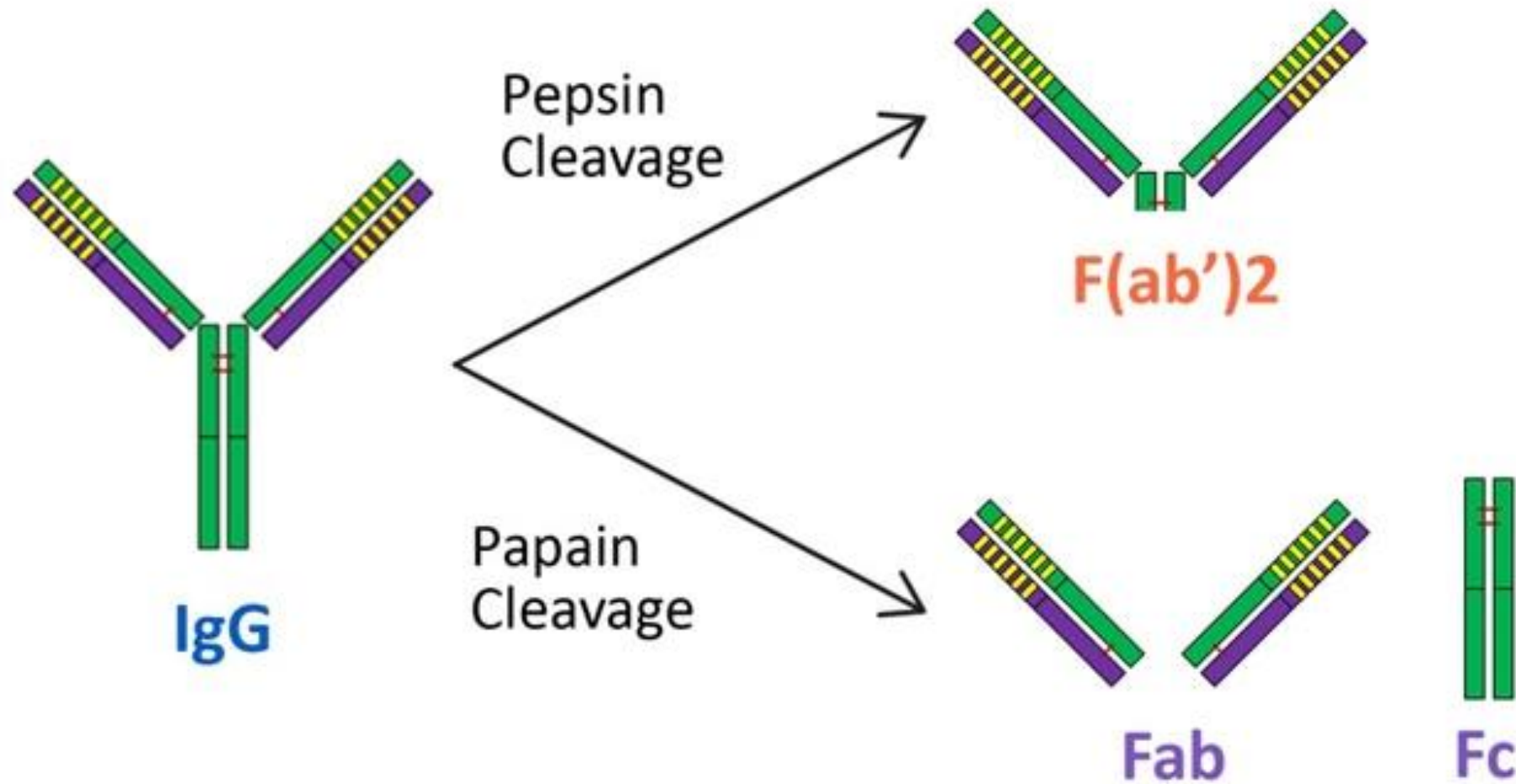
Význam pro medicínu:

- Reakce protilátky s antigenem je základem mnohých laboratorních testů
- Biologická léčba



Glykosylace

Štěpení protilátek enzymy



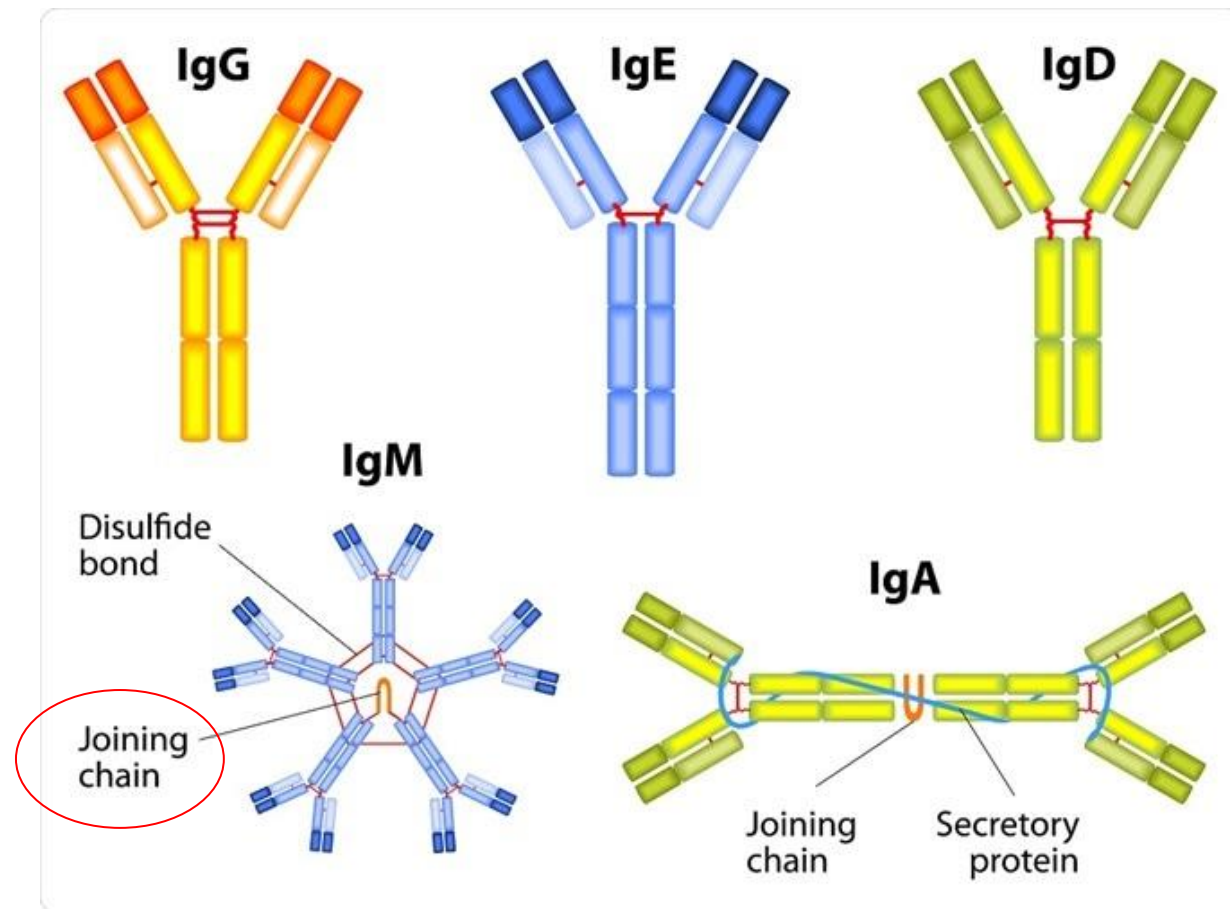
Třídy protilátek

- 5 tříd – podle typu konstantní části těžkého řetězce
- IgG - monomer
 - 4 podtřídy IgG₁-IgG₄
- IgA - monomer, dimer
 - 2 podřidy IgA₁, IgA₂

IgE - monomer

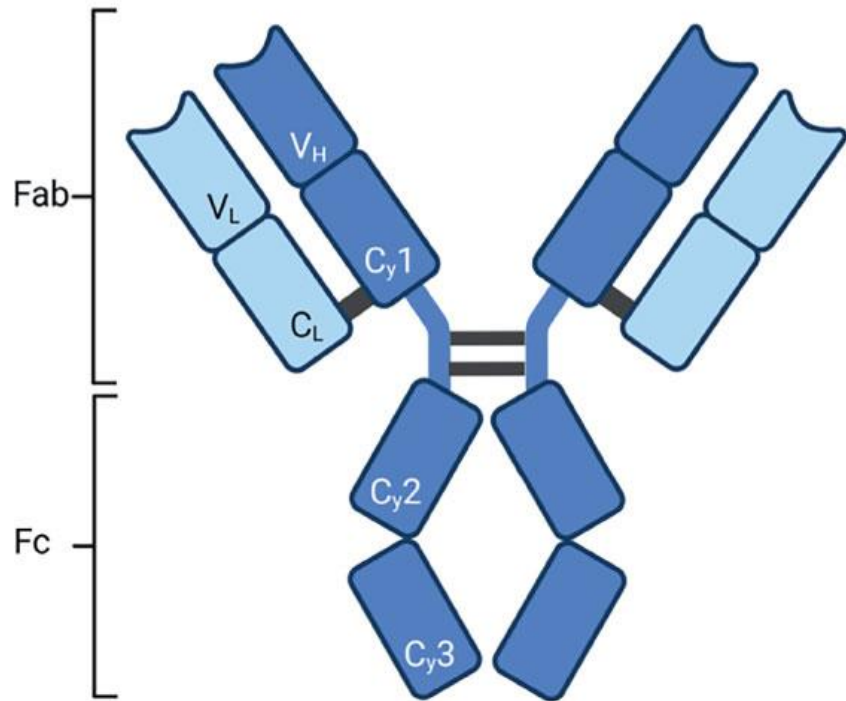
IgD - monomer

IgM - monomer, pentamer – při imunizaci se tvoří jako první

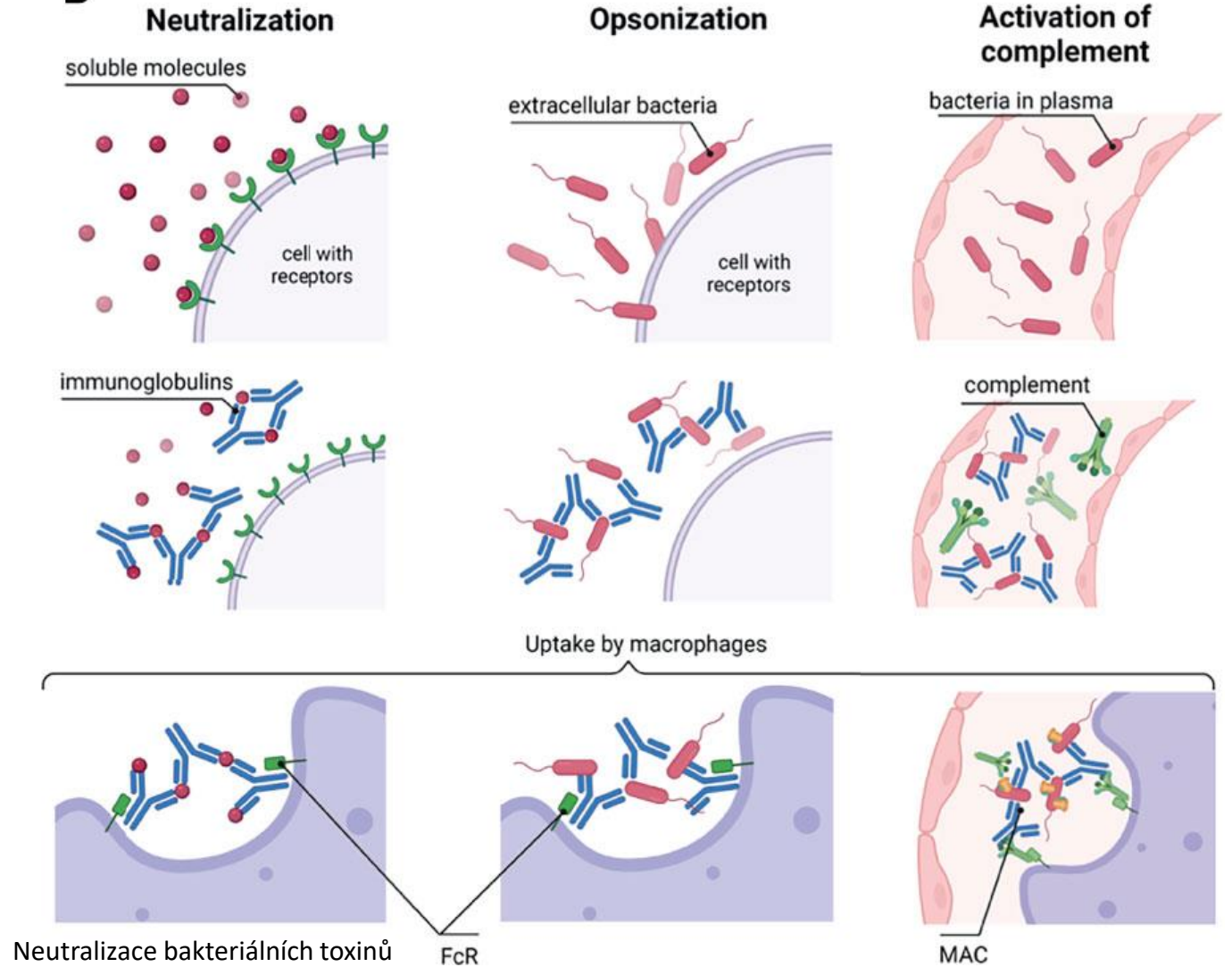


Imunoglobuliny aktivují imunitní systém:

A



B



Protilátky různých tříd mají specifické funkce

efektorové funkce určuje Fc fragment

Functional activity	IgM	IgD	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4	IgA	IgE
Neutralization	+	-	++	++	++	++	++	-
Opsonization	+	-	++	*	++	+	+	-
Sensitization for killing by NK cells (ADCC)	-	-	++	-	++	-	-	-
Sensitization of mast cells	-	-	+	-	+	-	-	+++
Activates complement system	+++	-	++	+	+++	-	+	-

- IgG2 opsonizuje především polysacharidové antigeny (bakterie s polysacharid. pouzdry)
- ADCC - buněčná cytotoxicita závislá na protilátkách

Protilátky různých tříd mají různý biologický poločas

- Protilátky jsou v těle postupně metabolizovány
- Ztráty jsou doplňovány tvorbou nových protilátek

- Nejdéle v těle setrvává IgG – **21 dní**
- IgM a IgA - 6 dní
- IgD – 3 dny
- Nejrychleji se metabolizuje IgE - 2 dny

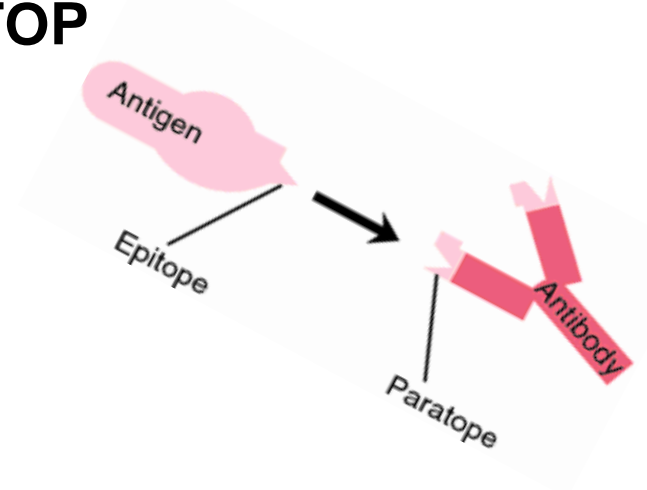
Principy reakce antigen-protilátka

• Antigen (Ag)

- látka, kterou IS rozpoznává a reaguje na ni
- po chemické stránce se jedná o proteiny, polypeptidy, polysacharidy nebo nukleoproteiny
- **imunogen** (uplný antigen) - schopný vyvolat tvorbu **protilátek**
- **hapten** (nekompletní antigen) - nízkomolekulární látka, která nemůže sama navodit tvorbu protilátek, ale specificky reaguje s produkty imunitní odpovědi, se označuje jako
- **všechny imunogeny jsou antigeny, ne všechny antigeny jsou imunogeny**
- konkrétní místo na jeho povrchu, kam se váže protilátka – **EPITOP**

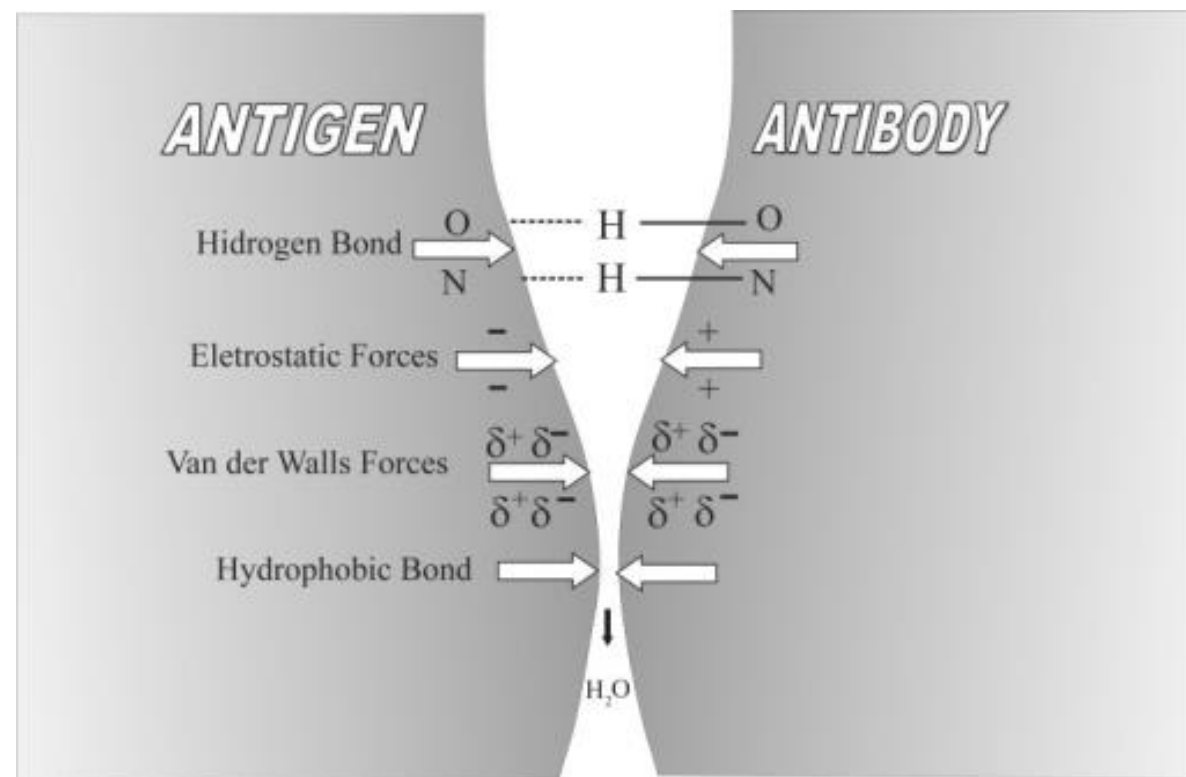
• Protilátka (Ab)

- specifický produkt terminálních vývojových stádií B lymfocytů
- místo, které reaguje s epitopem antigenu – **PARATOP**



Vazba mezi Ag a Ab je reverzibilní

- Slabé nevazebné interakce
- Vazba se vyznačuje určitou rychlostí vzniku a rozpadu
- Jejich poměr:
Rovnovážná konstanta K_{as}
 - rozhoduje o efektivnosti/pevnosti vazby
- Čím je K_{as} vyšší, tím je afinita protilátky k antigenu vyšší



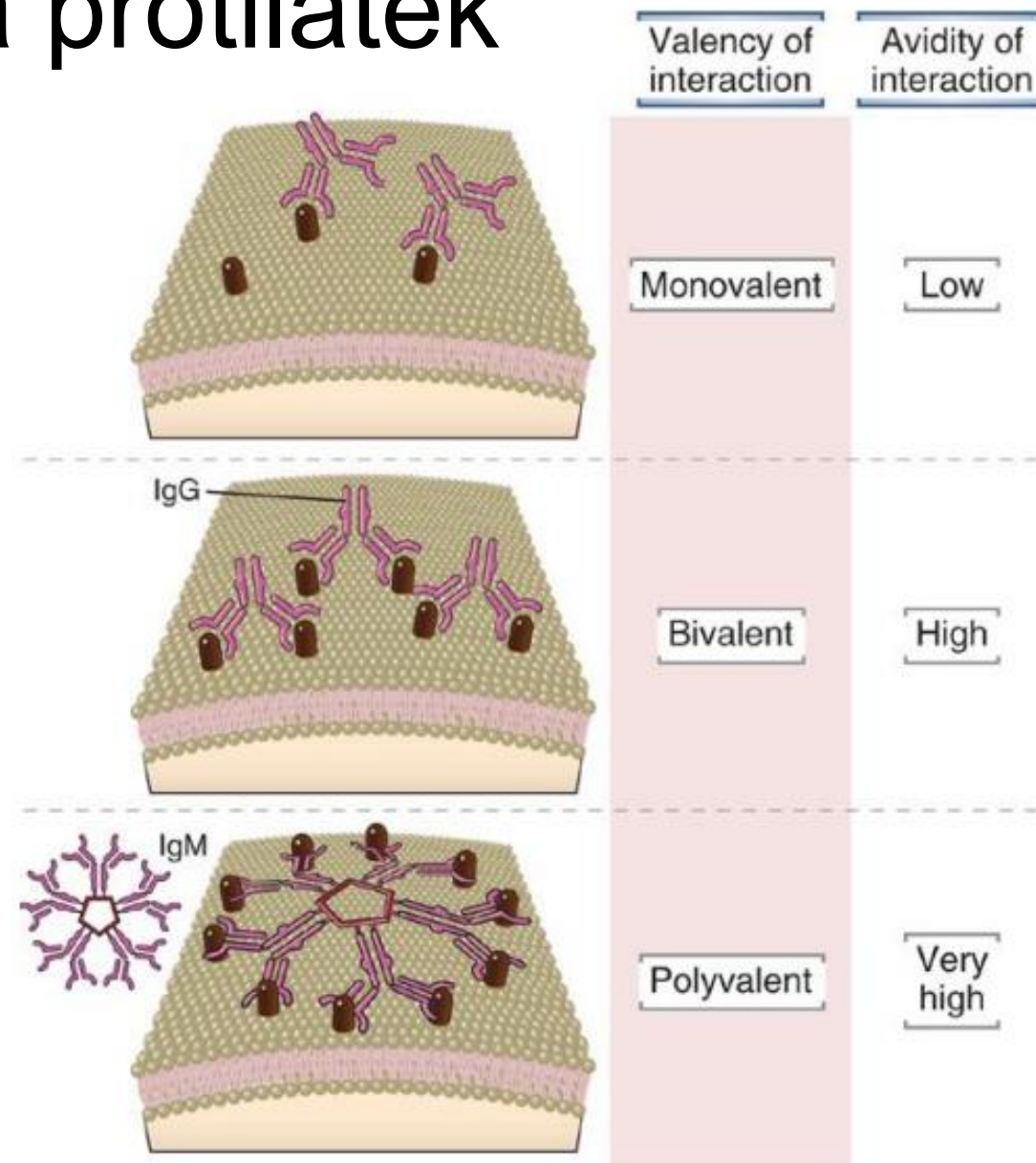
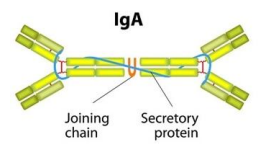
Afinita vs avidita protilátek

- Afinita

- síla interakce mezi 1 epitopem Ag a 1 paratopem Ab

- Avidita

- je dána vícenásobnou interakcí mezi multivalentním antigenem a protilátkou
- IgG – 2 vazebná místa
- Sekreční IgA – 4 vazebná místa
- Pentamer IgM – až 10 míst

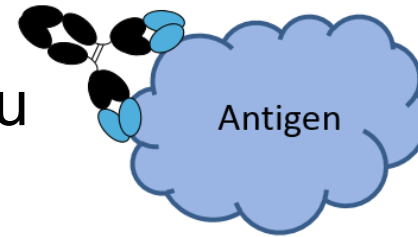


Protilátky mohou být

- Monoklonální

- Produkty jediného klonu B lymfocytů
- namířeny proti 1 epitopu jediného antigenu
- Velmi vysoká specifita

Monoclonal antibody



- Polyklonální

- Namířeny proti více epitopům jednoho či více antigenů
- Pokud byl při imunizaci použit 1 antigen – **monospecifické antisérum**
- Pokud bylo při imunizaci použito antigenů více – **polyspecifické antisérum**

Polyclonal antibody





Výroba polyklonálních protilátek

Výroba polyklonálních protilátek

1. Výběr vhodného antigenu

- Nutná vysoká čistota – přečištění chromatografie, ELFO

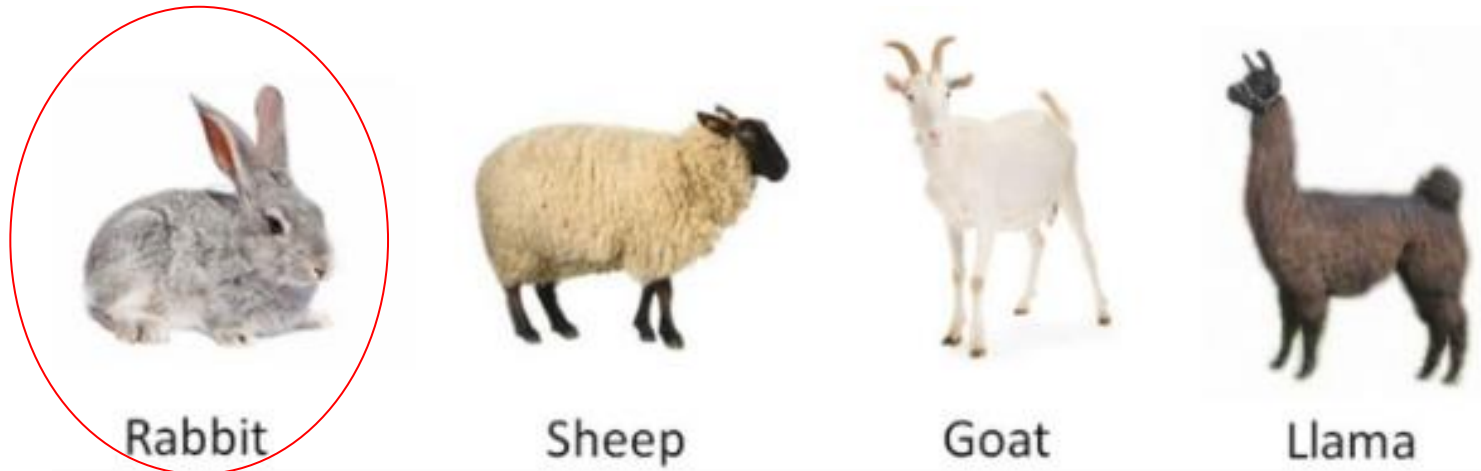
1. Zvýšení afinity antigenu k buňkám imunitního systému

- Problém – solubilní antigeny špatně aktivují imunitní systém
- ADJUVANCIA – zvyšují imunogennost a udržují antigen déle v těle
 - soli Al_2O_3
 - Freudovo adjuvans – adsorpce antigenu na kapičky minerálního oleje (s/bez přídavku usmrcených mykobakterií)

Výroba polyklonálních protilátek

3. Výběr vhodného zvířete

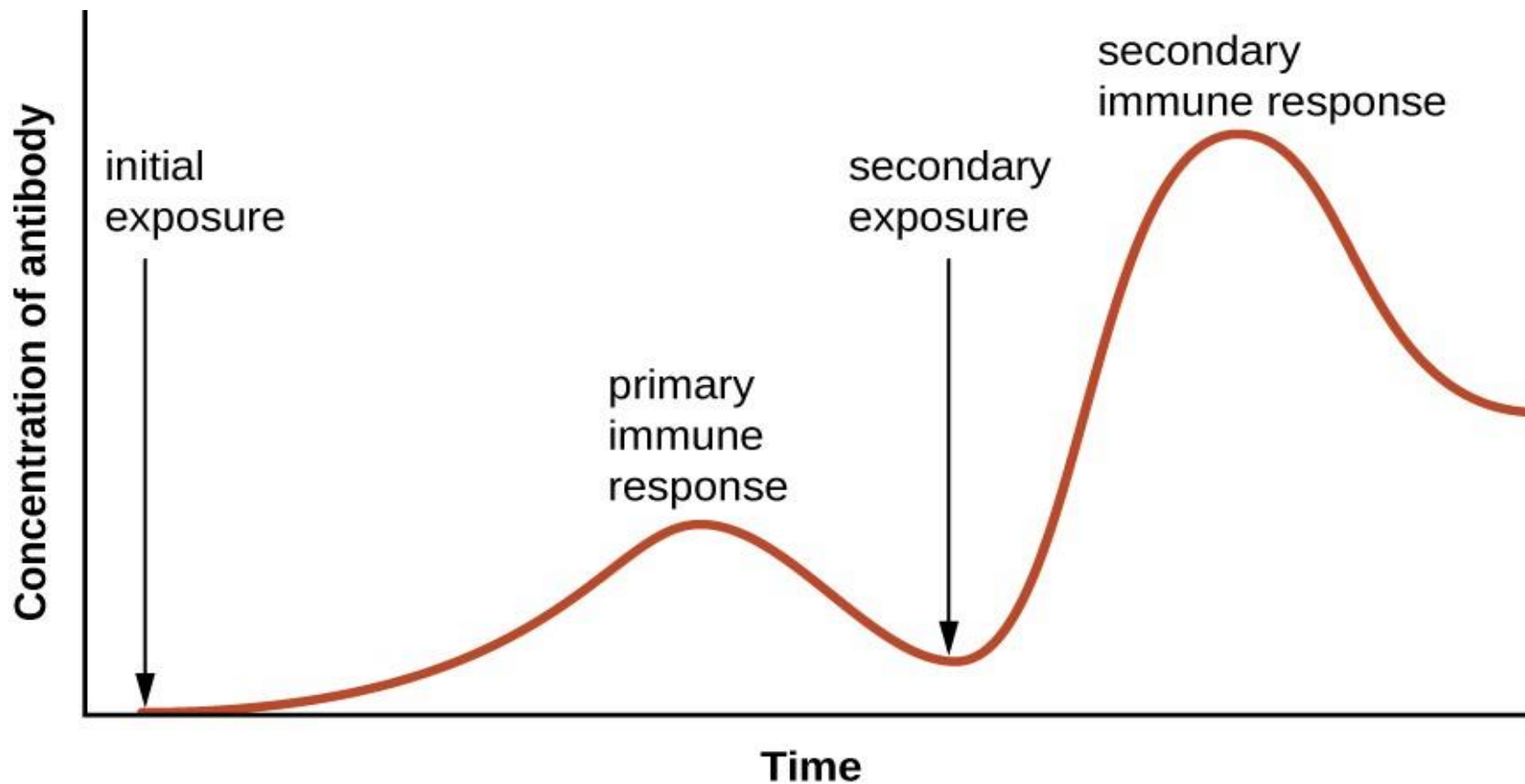
- Fylogeneticky co nejvzdálenější druh vzhledem k povaze antigenu (některý živočišný druh není schopen odpovídat na určitý antigen)



4. Způsob aplikace – nejčastěji intradermálně, subkutánně

- Antigen je vycytán ve spádových lymfatických uzlinách – maximální odpověď

Výroba polyklonálních protilátek



jedna dávka – primární odpověď (nízký titr protilátek)

opakovaná dávka - rozmezí až několika měsíců (vysoký titr protilátek)

Výroba polyklonálních protilátek

5. Sběr krve

- Opakované odběry nižšího množství **krve**
- Kompletní vykrvení zvířete - usmrcení

6. Zisk séra s obsahem protilátek (antisérum)

7. Přechištění protilátek a jejich kvantifikace

- **Nespecifické metody** – izolace protilátek určité třídy
 - Precipitace síranem amonným, elektroforéza, ionexová nebo gelová chromatografie
- **Specifické metody** – izolace protilátek vůči konkrétnímu antigenu
 - Afinitní chromatografie, imunoadsorpce

Polyklonální protilátky - využití

Nefelometrie

- Reakce Ag-Ab → precipitace
- Třídy a podtřídy Ig, C3, C4, CRP

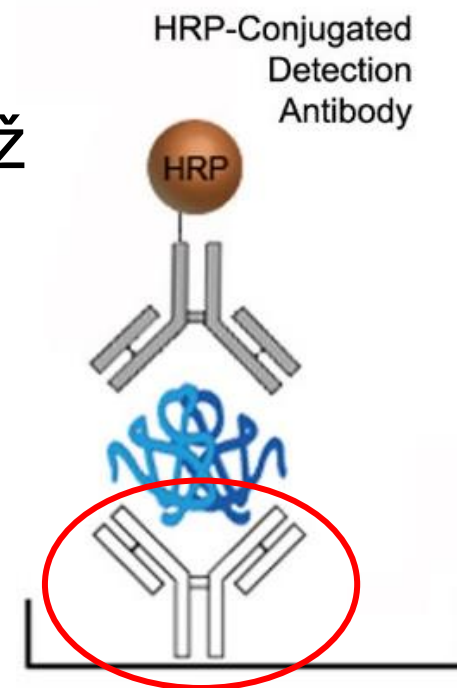
Léčba

- Antiséra proti hadím jedům



ELISA

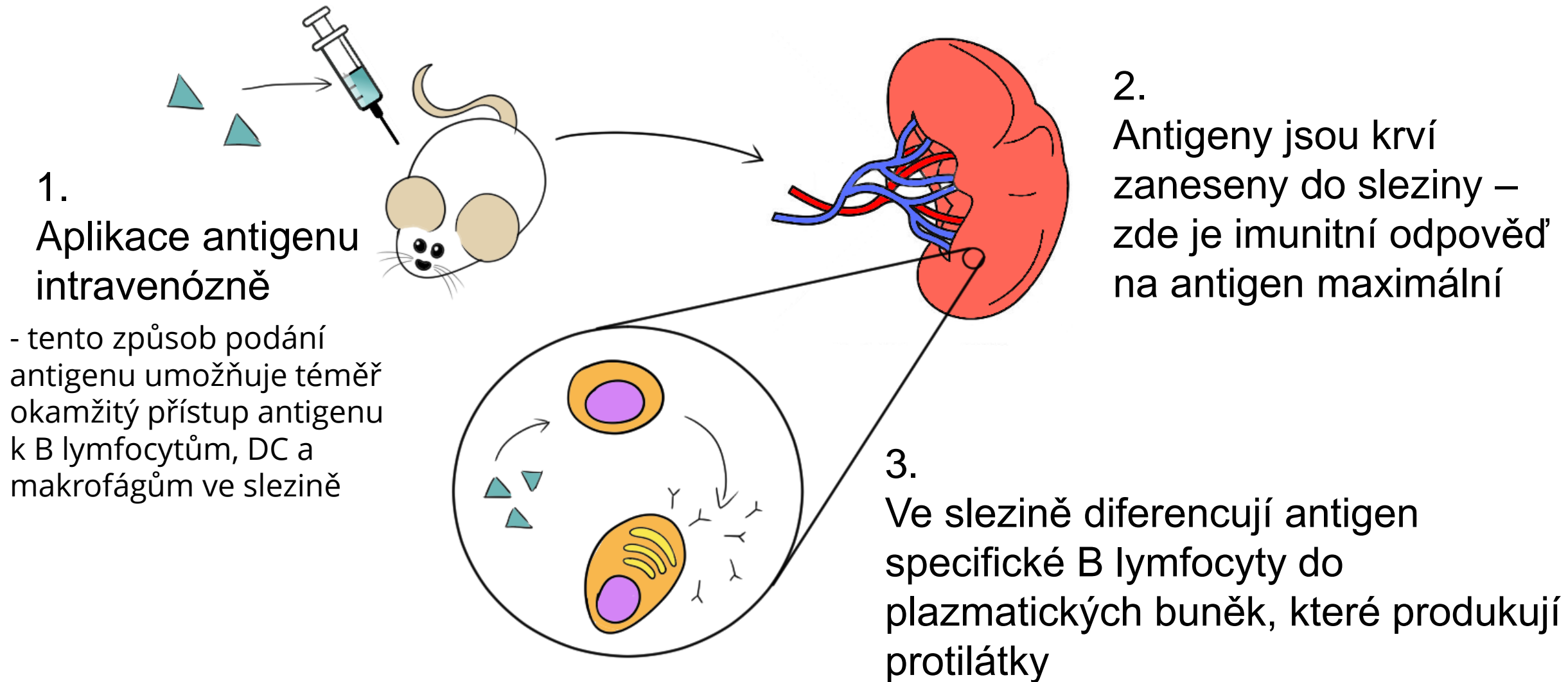
- Záchytné protilátky
- Záchyt různých variant antigenu
- Vyšší senzitivita než monoklonální Ab
- Nižší specifita





Výroba monoklonálních protilátek

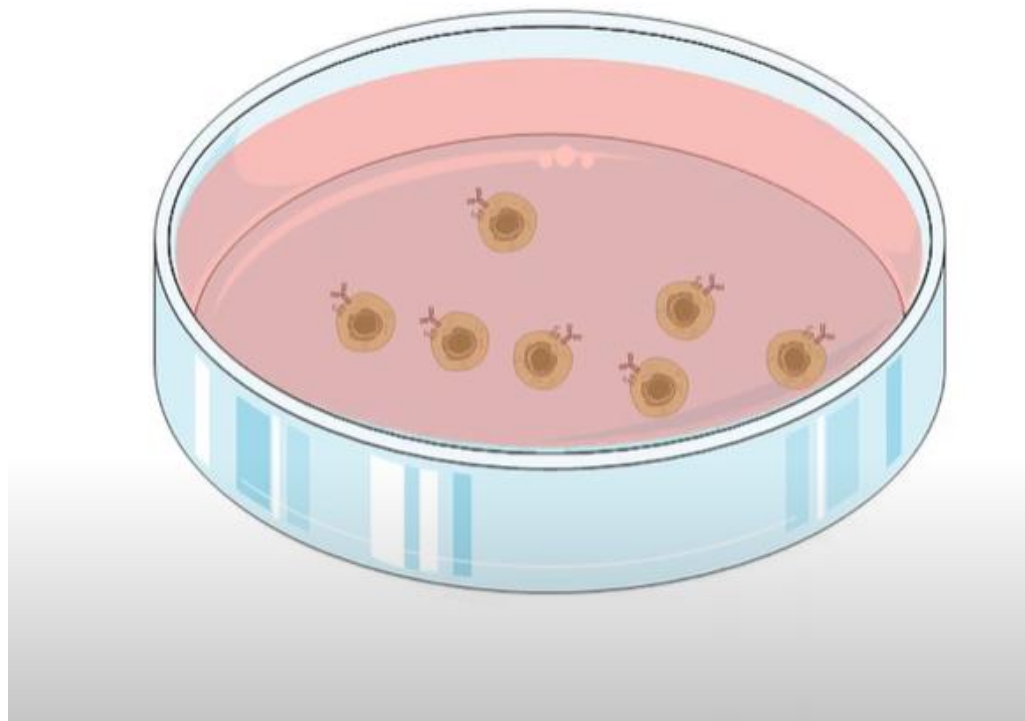
Výroba monoklonálních protilátek



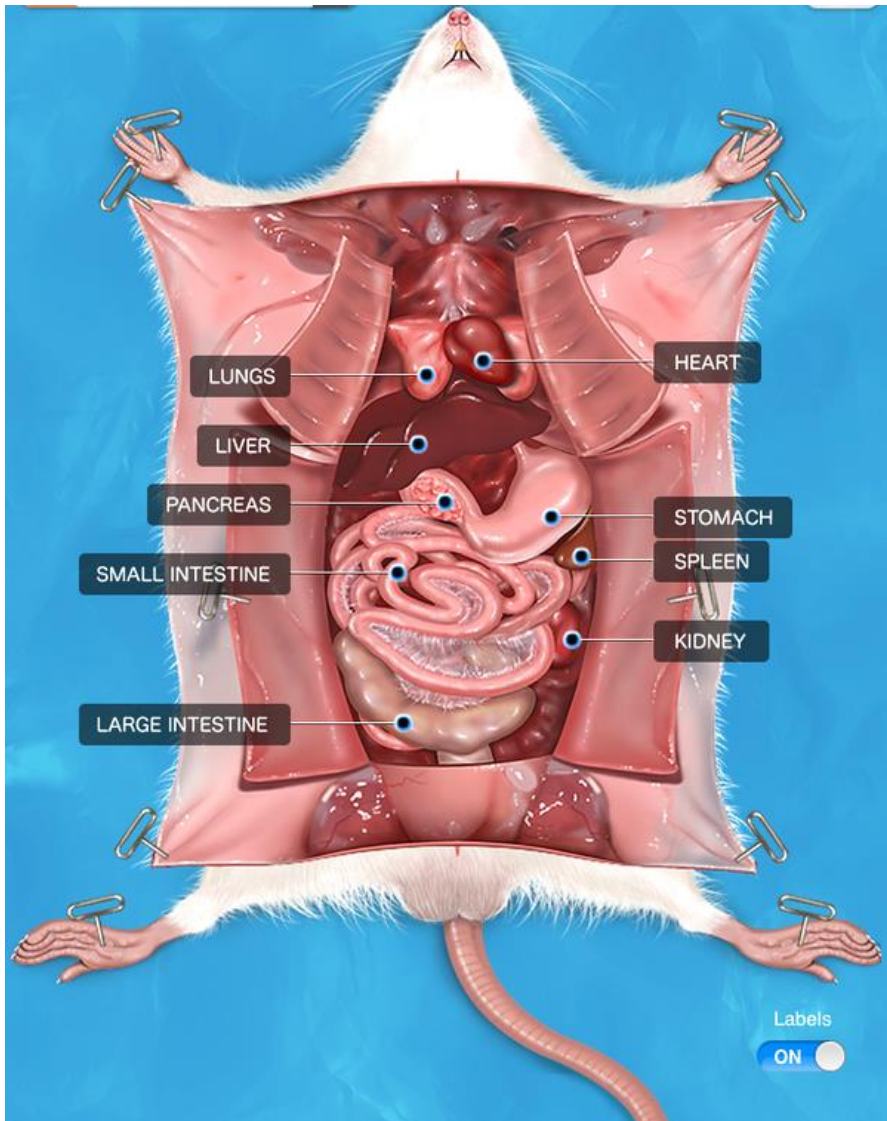
Problém

Izolované B-lymfocyty dlouho nepřežijí
Jak tedy získat dostatek protilátek?

B cells survive for not more than a week!



Výroba monoklonálních protilátek



4. Po několika týdnech je z imunizované myši vyjmuta slezina

5. Izolace plazmatických buněk ze sleziny



Výroba monoklonálních protilátek

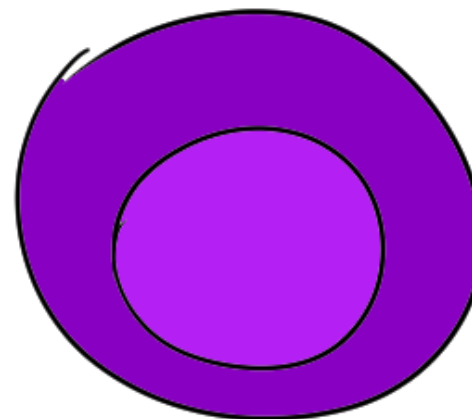
- 1975 – Kohler a Milstein – fúze s myšími myelomovými buňkami

Slezinná plazmatická
buňka



- Produkuje Ag specifické protilátky
- Velmi krátká životnost

Myelomová buňka

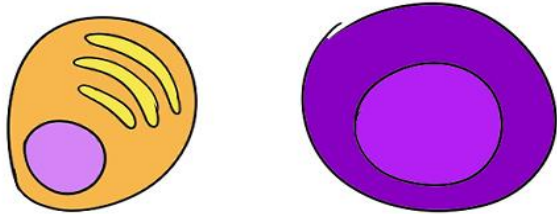


- Neprodukuje protilátky
- Je nesmrtelná

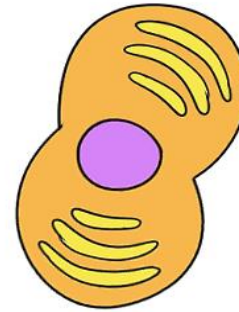
6.Fúze buněk polyethylenglykolem (PEG)

Výroba monoklonálních protilátek

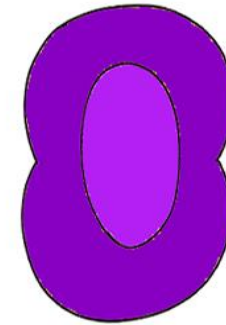
Nezfúzované B lymfocyty
a myelomové buňky



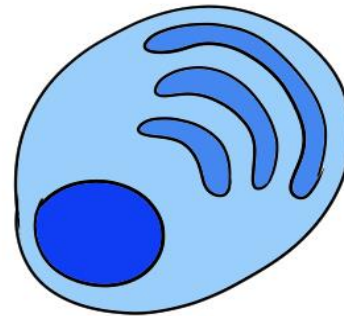
Zfúzované
B lymfocyty



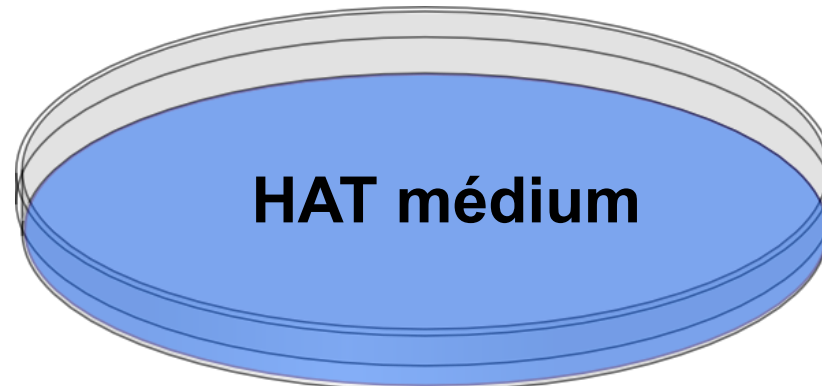
Zfúzované myelomové
buňky



HYBRIDOM



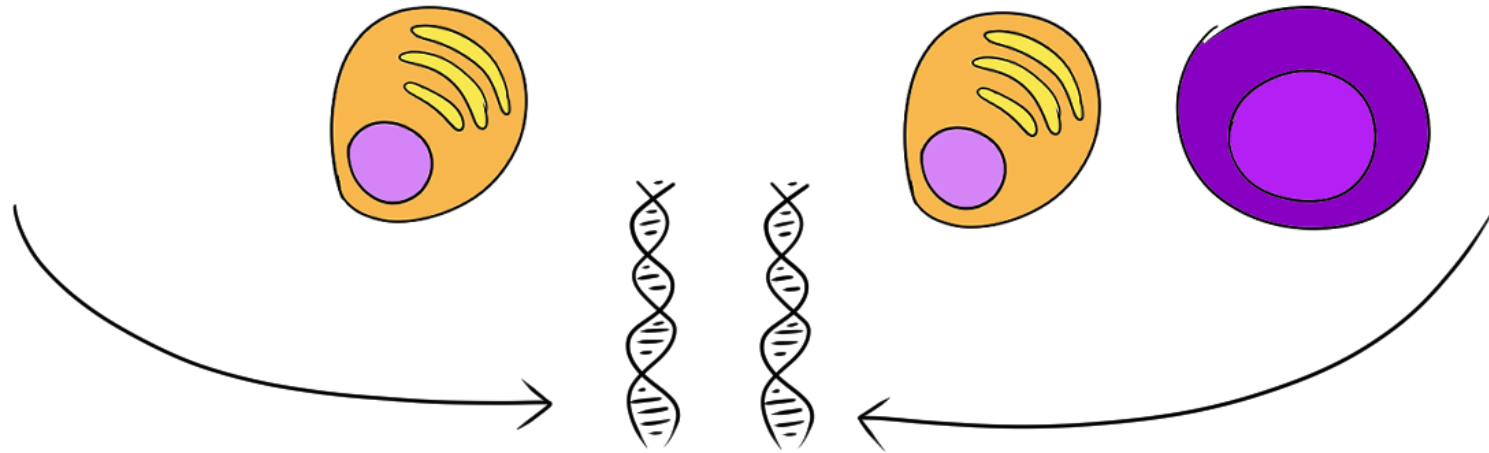
7. Buněčná směs je
kultivována v selekčním
HAT médiu
(**H**ypoxantin, **A**minopterin,
Thymin)



HAT médium

Selekce – enzymatický blok

Pro syntézu DNA a buněčné dělení je důležitá a klíčová syntéza nukleotidů.
V každém typu buňky existují dvě cesty pro syntézu nukleotidů: cesta de novo a cesta záchrany



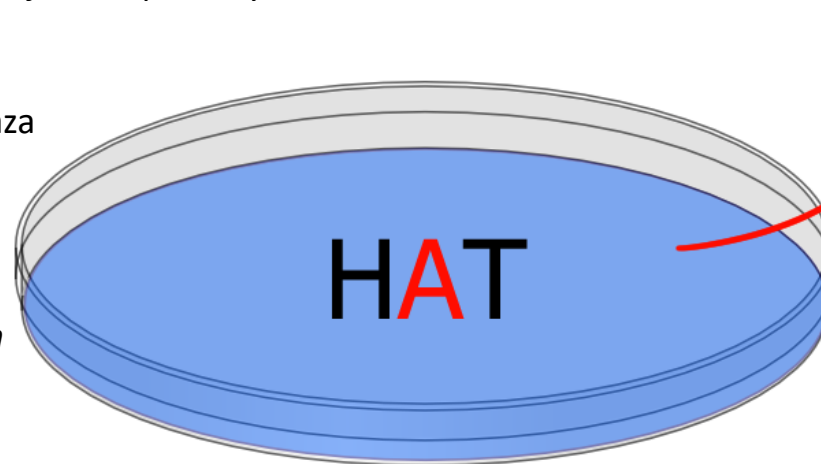
Záchranná dráha
enzym HGPRT
recyklují se existující komponenty

„De novo“ dráha
enzym dihydrofolátreduktáza

*nukleotidy syntetizovány z
jednoduchých prekurzorů*

HGPRT
= Hypoxantin Guanin FosfoRibosyl Transferáza

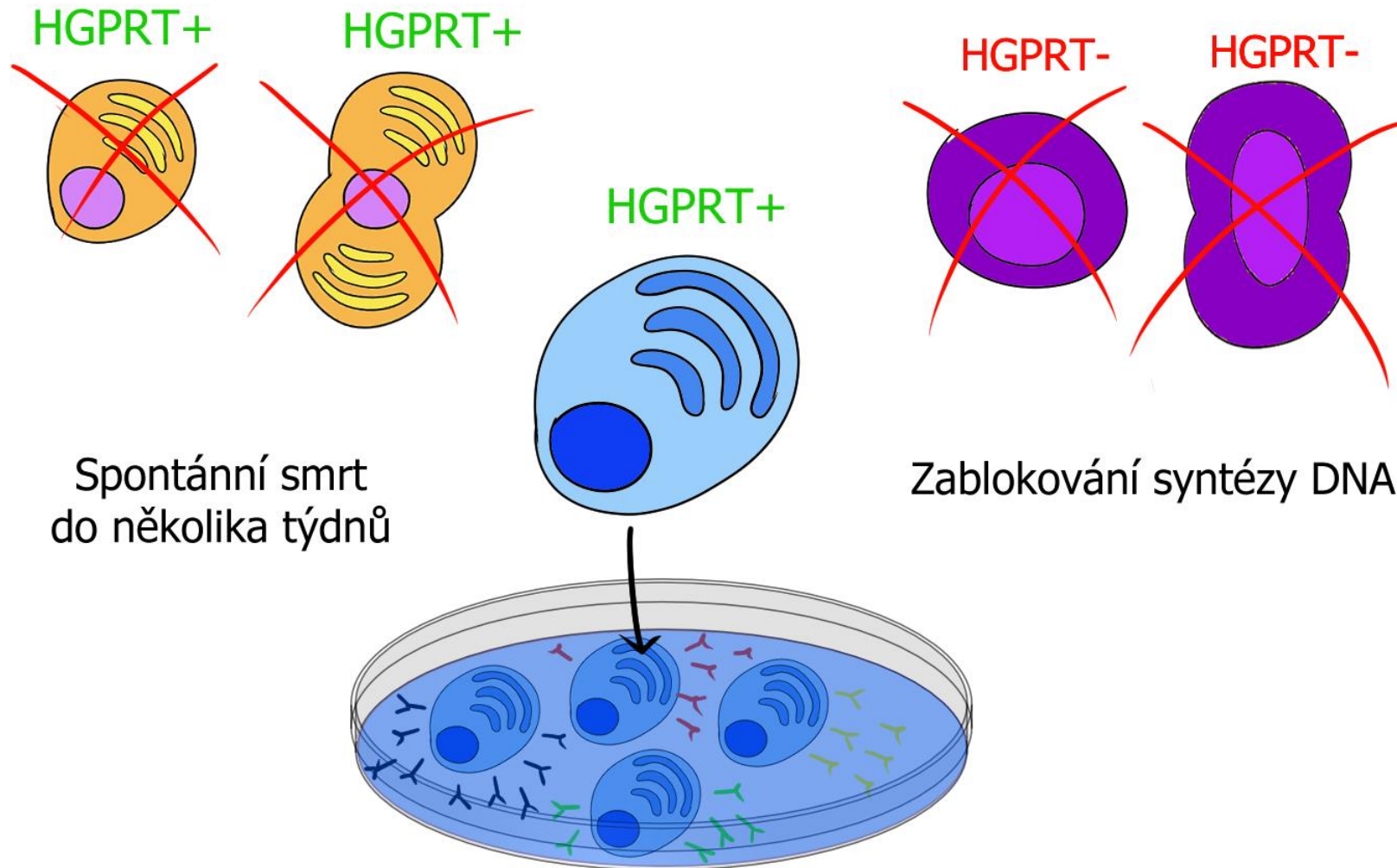
*hypoxantin a thymidin využijí buňky, aby
se vyhnuly blokované cestě; musí mít ovšem
vhodné enzymy („záchranná cesta“)*



**Aminopterin
blokuje
dihydrofolátreduktázu**

*inhibice reakcí, jež
jsou součástí syntézy
nukleotidů*

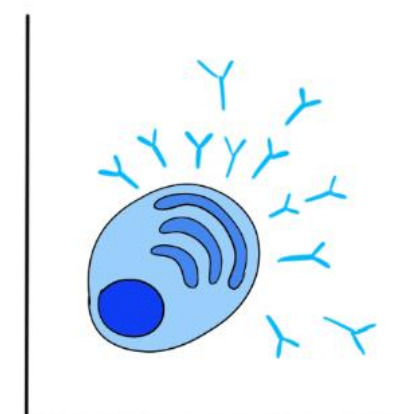
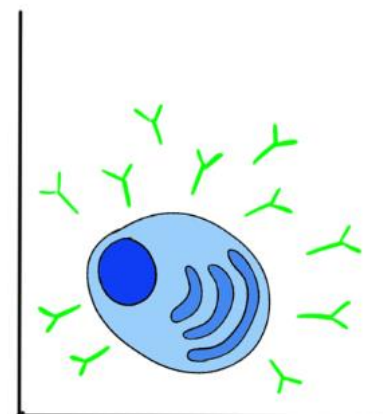
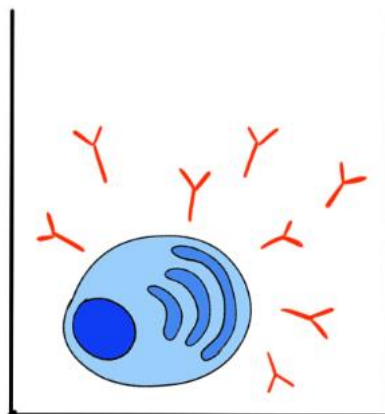
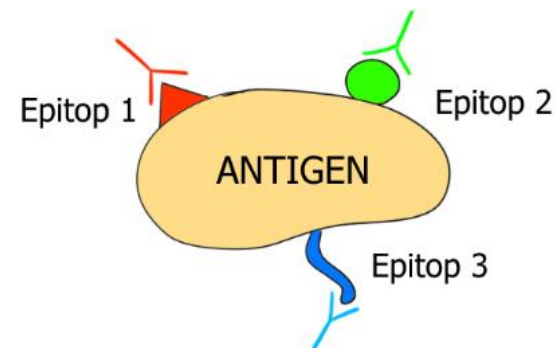
Selekce – enzymatický blok



Výroba monoklonálních protilátek

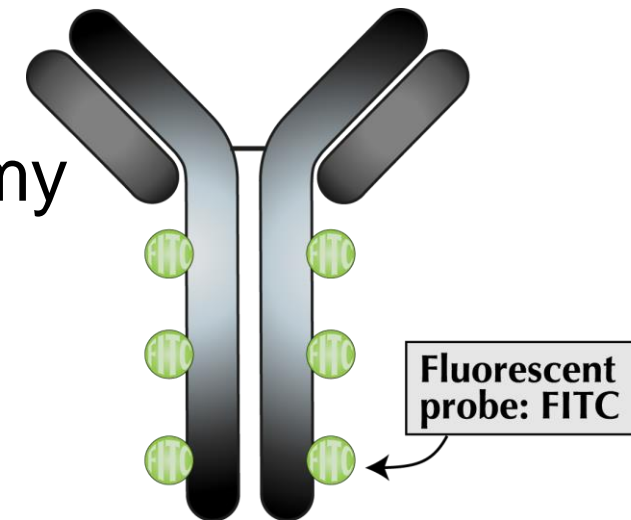
- Hybridomy jsou rozděleny do jednotlivých jamek
- Dále se udržují pouze ty buňky, které produkují Ab proti požadovanému epitopu

10. Přečištění, kvantifikace, validace



Využití monoklonálních protilátek

- Konjugace monoklonálních protilátek s fluorochromy
- Základní reagensie pro imunofenotypizaci



IMUNOFENOTYPIZACE

„stanovení fenotypu buněk na základě imunologické detekce jejich povrchových znaků (markerů) pomocí průtokové cytometrie“

- CD nomenklatura → CD znaky na buňkách
- Některé jsou pro určité typy buněk vysoce specifické
- Detekce pomocí fluorescenčně značených protilátek

Využití monoklonálních protilátek

Příklady využití konjugátů protilátka-fluorochrom jako diagnostik v laboratoři:

- Rozlišení T a B lymfocytárních subpopulací
- Rozlišení klidových a aktivovaných forem leukocytů
- Rozlišení časně/pozdní aktivace buněk
- Rozlišení vývojových stádií buněk
- Proliferace
- Apoptóza
- Imunofenotypizace malignit

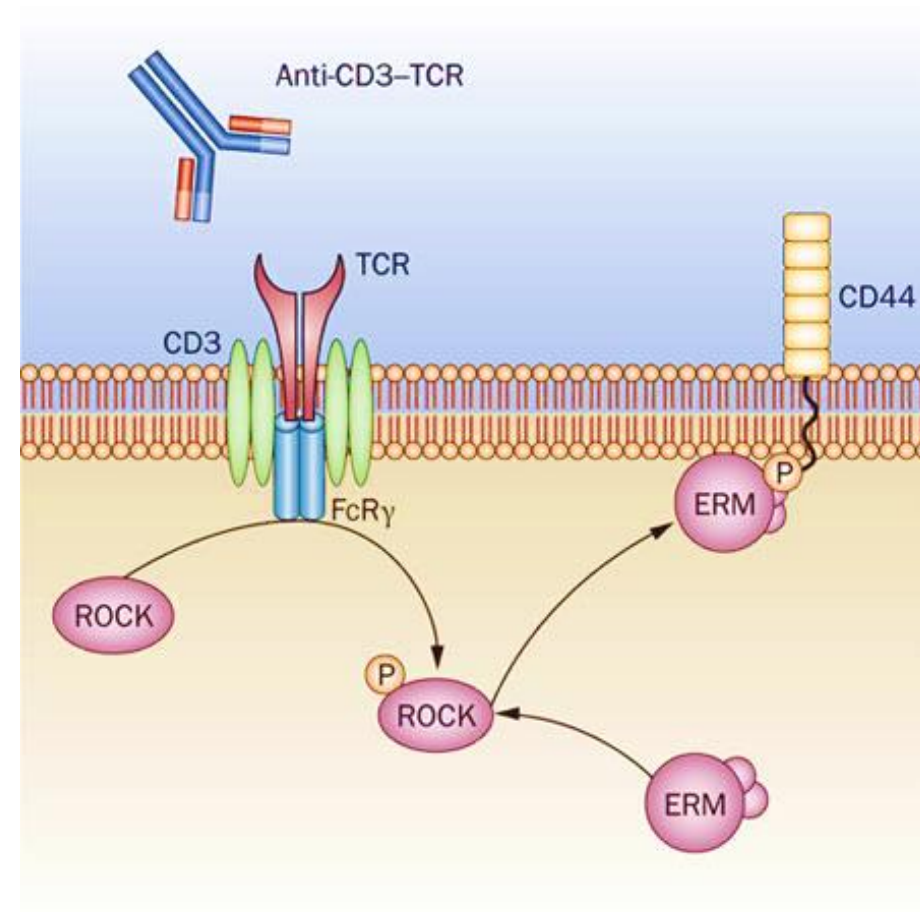
Využití monoklonálních protilátek

Monoklonální protilátky neznačené jako stimulancia buněk:

Příklad:

- Anti CD3/CD28 – váže se na CD3 ko-receptor T lymfocytů a aktivuje je →

- Produkce cytokinů – INF- γ , IL-2
- Proliferace

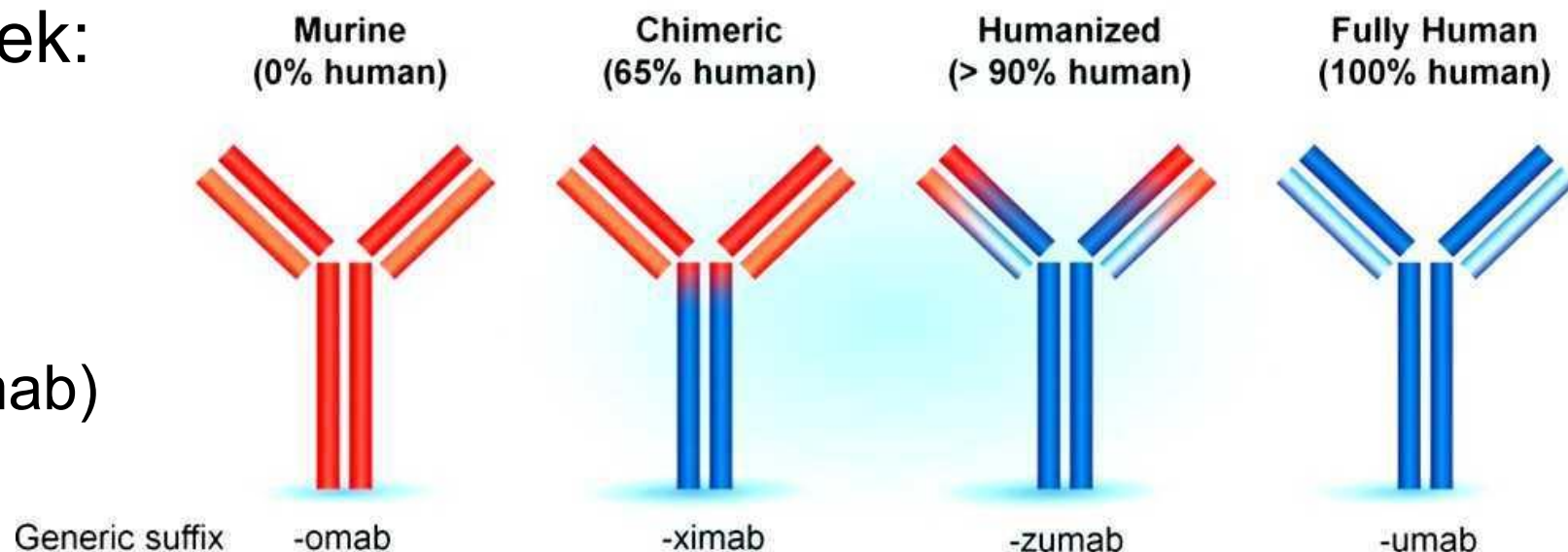


Využití monoklonálních protilátek

- Monoklonální protilátky jako léčiva: BIOLOGICKÁ LÉČBA

- Různé druhy protilátek:

- Myší (omab)
- Chimérické (ximab)
- Humanizované (zumab)
- Lidské (umab)

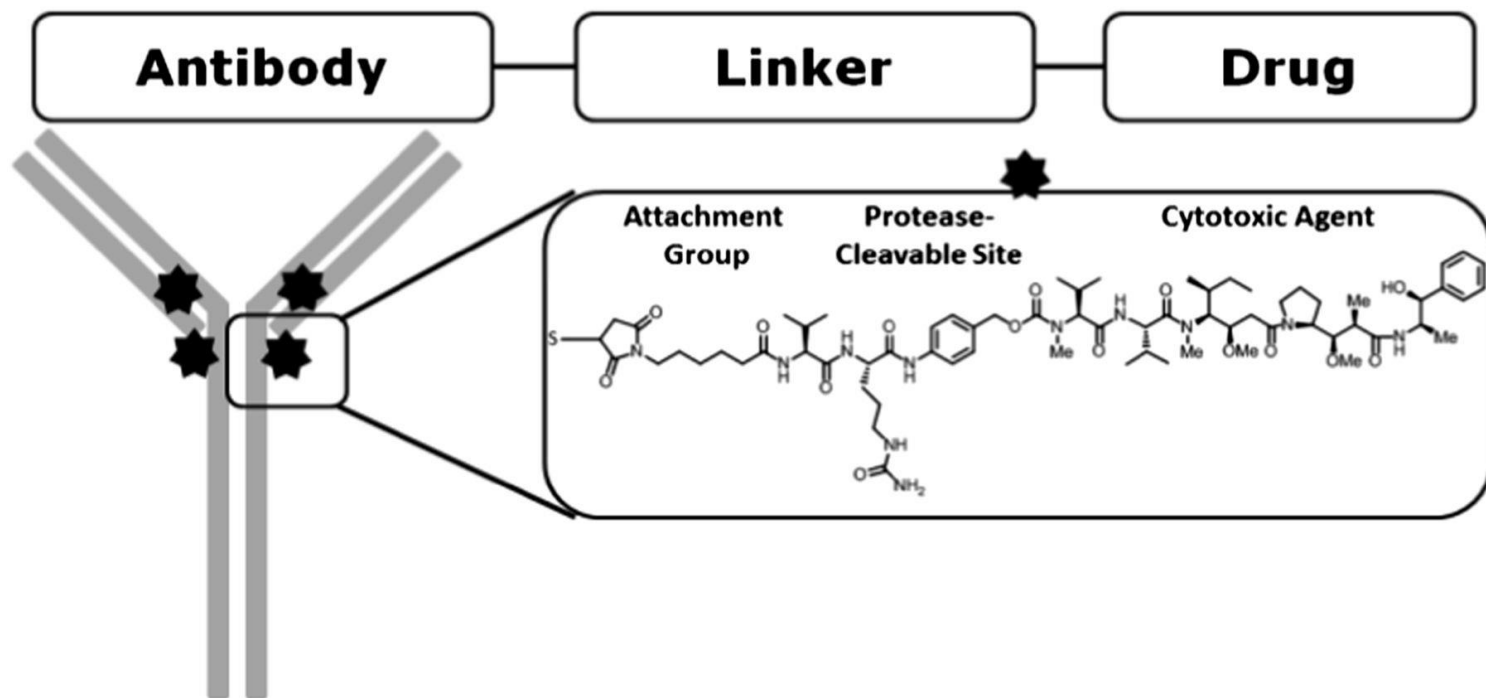
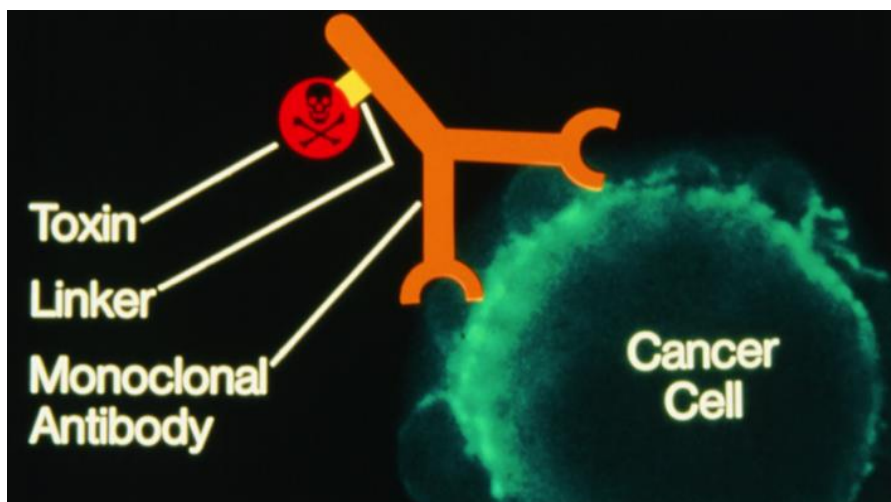


Využití monoklonálních protilátek

- Imunosuprese
 - Anti CD20 (Rituximab): B lymfocytární malignity
- Blokáda prozánětlivých cytokinů
 - Anti TNF- α (Infliximab): léčba Crohnovy choroby, revmatoidní artritidy
- Blokáda adhezivních molekul
 - Anti CD11a (Efalizumab): léčba lupénky
- Protialergická léčba
 - Anti-IgE (Omalizumab): léčba těžkých forem astmatu

Využití monoklonálních protilátek

- Nová generace monoklonálních protilátek určených k biologické léčbě: konjugace s cytostatiky/radionuklidy
- Zesílení cytotoxického účinku na maligní buňky



Shrnutí

Polyklonální protilátky	Monoklonální protilátky
Snadnější výroba	Náročná výroba
Relativně levné	Drahé
Vyšší senzitivita	Nižší senzitivita
Nižší specifita	Vysoká specifita
Vyšší pravděpodobnost zkřížené reaktivity	Nízká pravděpodobnost zkřížené reaktivity

Protokol

- Hlavička:

- Jméno
- Datum
- Úloha č. ...
- Název úlohy

- Protokol:

- Princip
 - Pomůcky
 - Postup
 - Výsledky
 - Závěr
-
- Zpracování na PC nebo ručně
 - Tisk → odevzdání při dalším cvičení