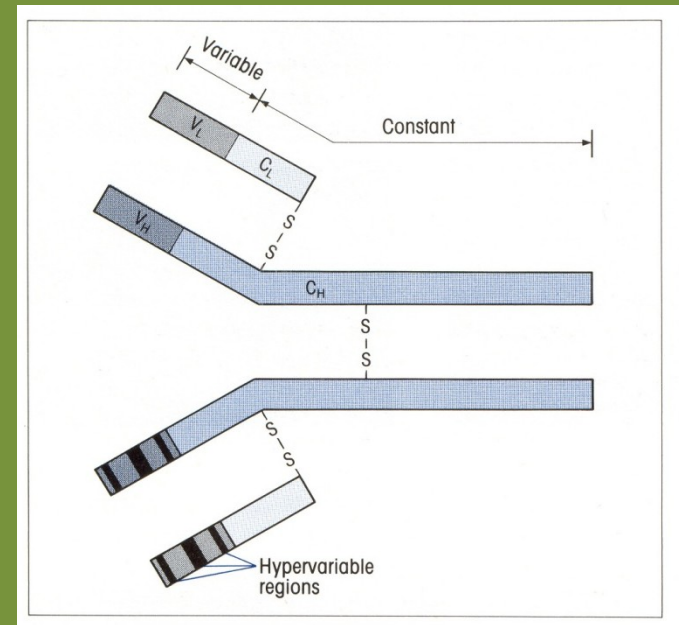
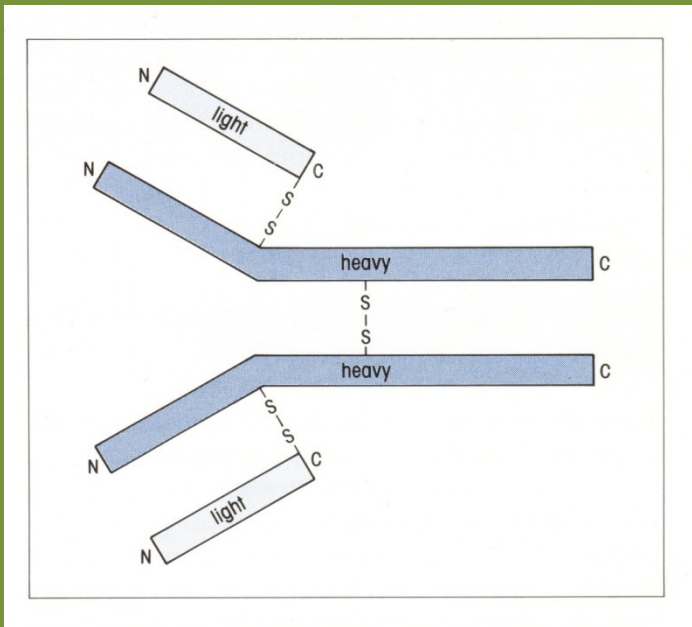


Protilátky

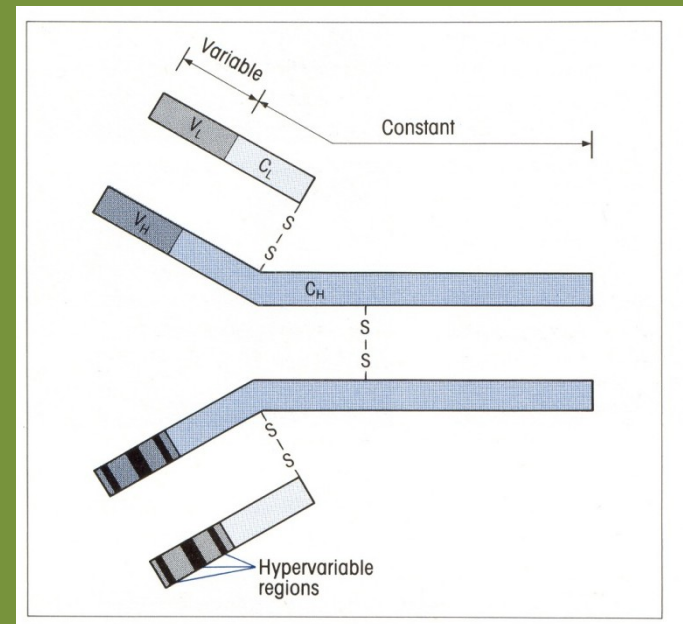
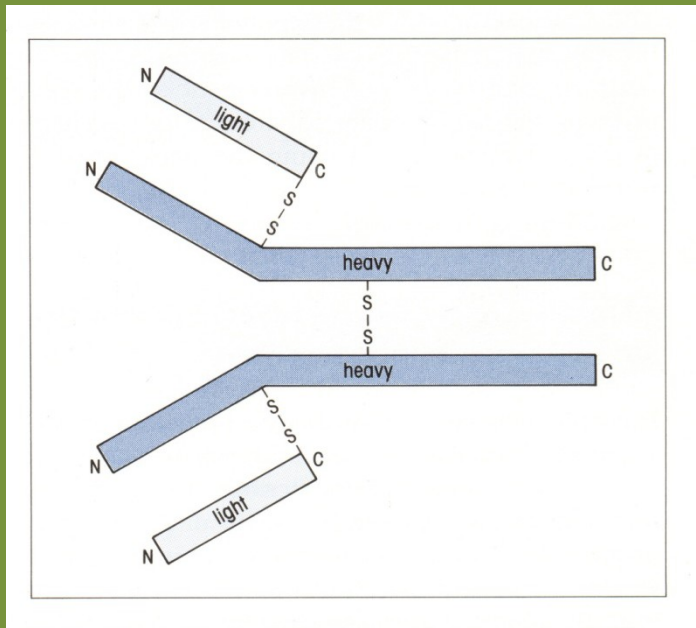
Nejdůležitější Vlastnosti:

Patří do gama frakce krevních bílkovin (gamaglobuliny), přítomnost některých úseků na bílkovinném řetězci-immunoglobulinové domény – konstantní a variabilní (110AK zbytků), je prototypem rozsáhlé imunologické rodiny molekul (800 důležitých molekul)



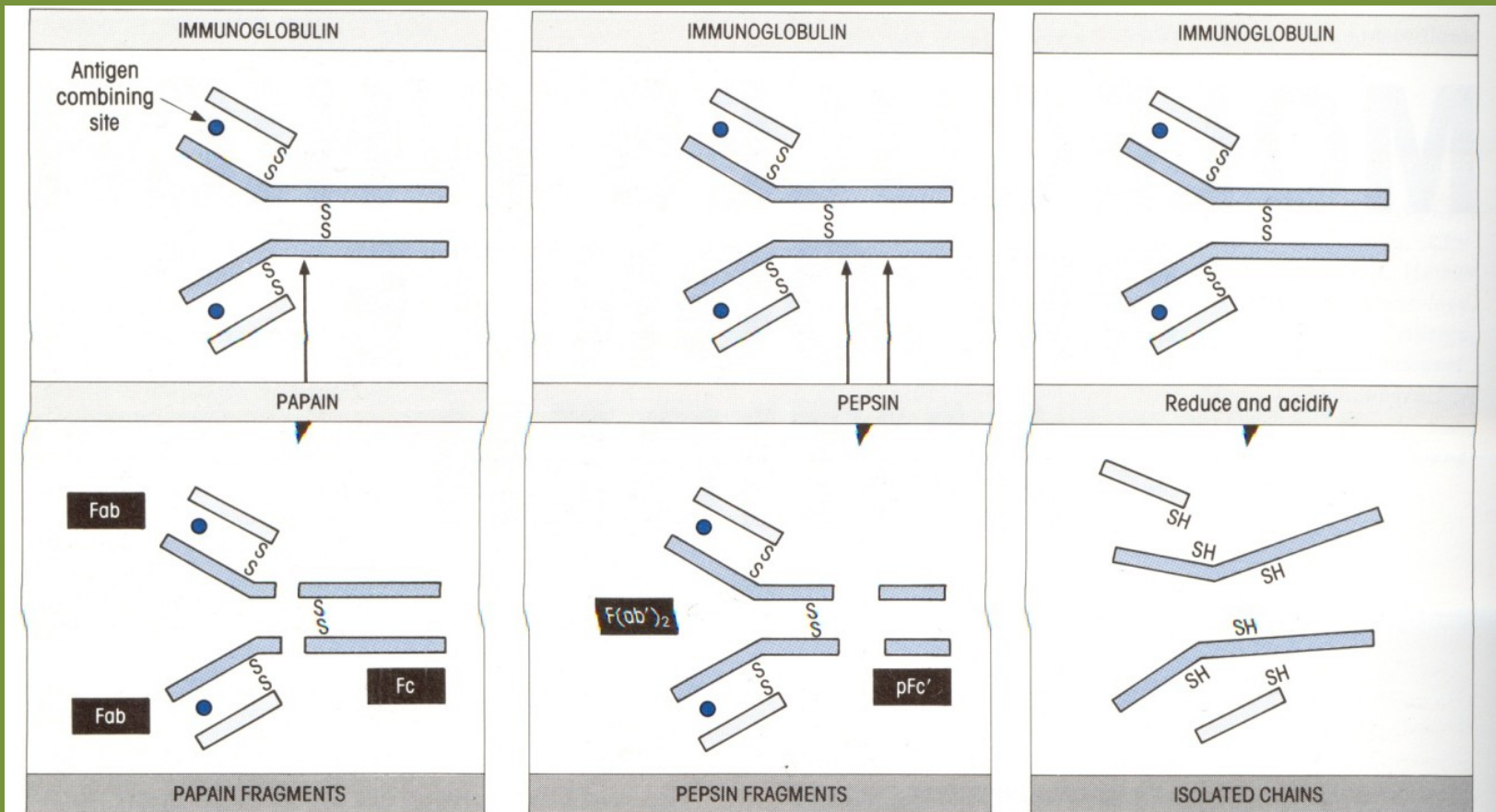
Ab model se dvěma těžkými (určují třídu a izotyp Ig) a 2 lehkými polypeptidickými řetězci (kappa, lambda) spojené interakcí disulfidických můstků, N terminální zbytky

variabilní úseky mají odlišné AK složení u různých plazmatických buněk, konstatní úseky-primární struktura je obdobná u různých molekul Ig, tvar molekuly Y odpovídá schopnosti vázat se na Ag struktury, pantovou oblastí (disulfidické můstky) se přizpůsobuje tvar vazebného místa molekule Ag (zodpovědné za prostorové uspořádání, řetězce Ig jsou glykosylovány, a to umožňuje biologické vlastnosti Ab



Působením proteolytických enzymů je štěpena Ab pod (pepsin) nebo nad (papain) disulfidickými můstky

Vzniklé proteolytické fragmenty ukazují divalenci (váží se se dvěma Ag) pepsinu a univalenci papainu. pFc reprezentuje C-terminální konec Fc oblasti a je tvořen nekovalentními vazbami



Variabilní a konstantní domény spolu asociují a vytváří globulární struktury, např Y

Dinitrofenol - Hapten s králičími Ab
vytváří

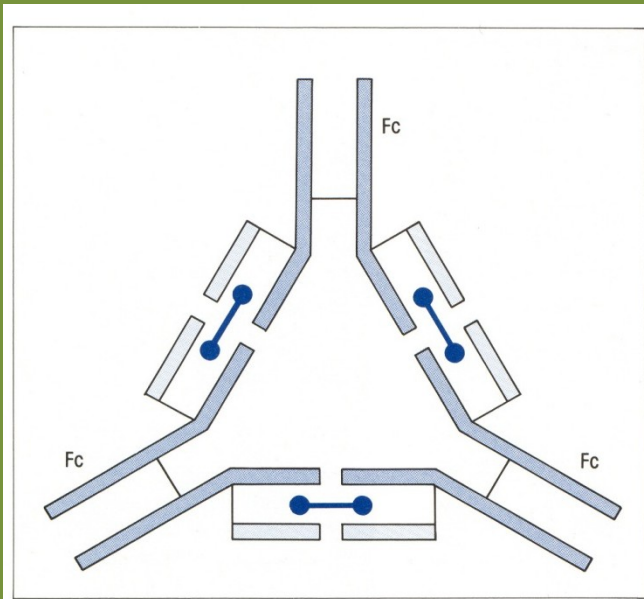
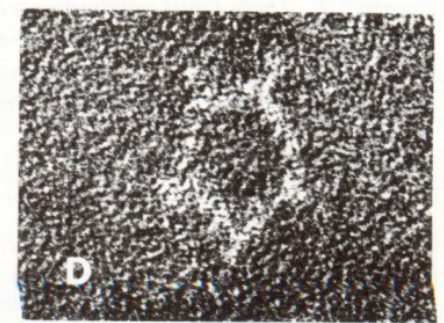
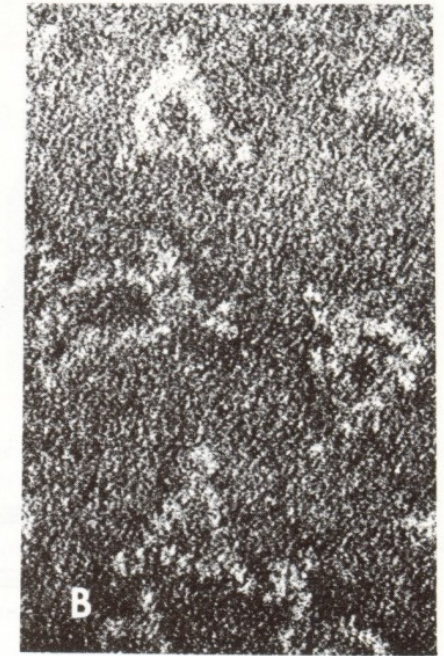
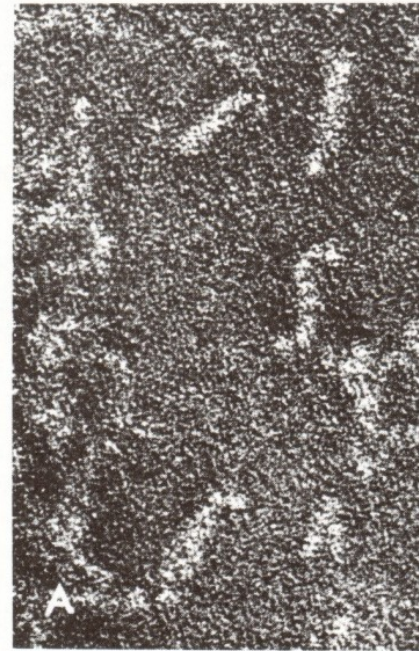
A) dimery B) trimery

C) Tetramery D) pentamery

Obr. A flexibilita v pantové oblasti

Obr. E Fc fragmenty byly natráveny
pepsinem, nelze je zde pozorovat
jako u obr. A-D v každém rohu

Zvětš. 1.000.000x



Trimer s Fc fragmenty

Idealizovaná dvojrozměrná struktura Ag

a) Vazbové místo tvoří peptidické smyčky,

které tvoří

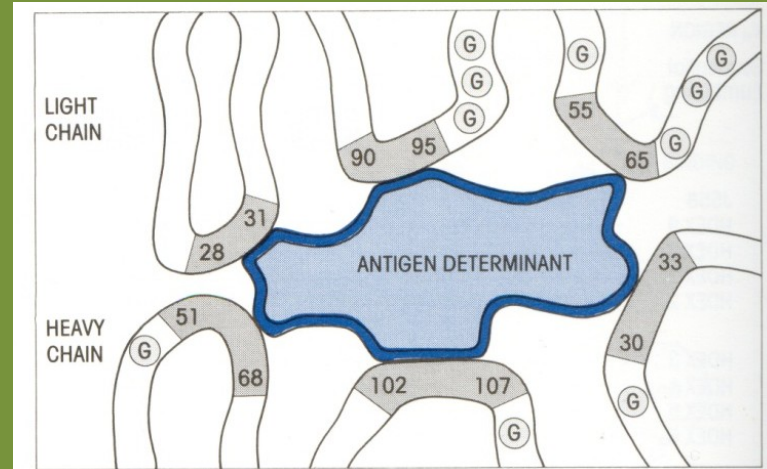
hypervariabilní úseky na lehkém i těžkém řetězci

(číslo znamená počet zbytků AK) a G cukerné zbytky.

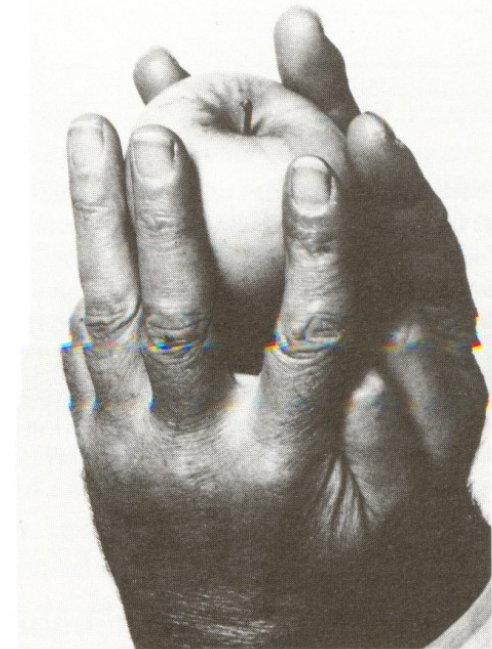
Cukerné zbytky jsou důležité pro zpětné poskládání peptidických řetězců a tvorbu beta struktury skládaného listu. Ta umožňuje, aby hypervariabilní úseky ležely těsně u sebe. Díky vazbě k různým kombinacím hypervariabilních úseků a různým zbytkům uvnitř každé z této oblasti, každá z Ab může tvořit komplex s různými antigenními determinanty.

b) Simulované kombinační místo tvoření třemi prsty každé ruky

Každý prst představuje hypervariabilní smyčky



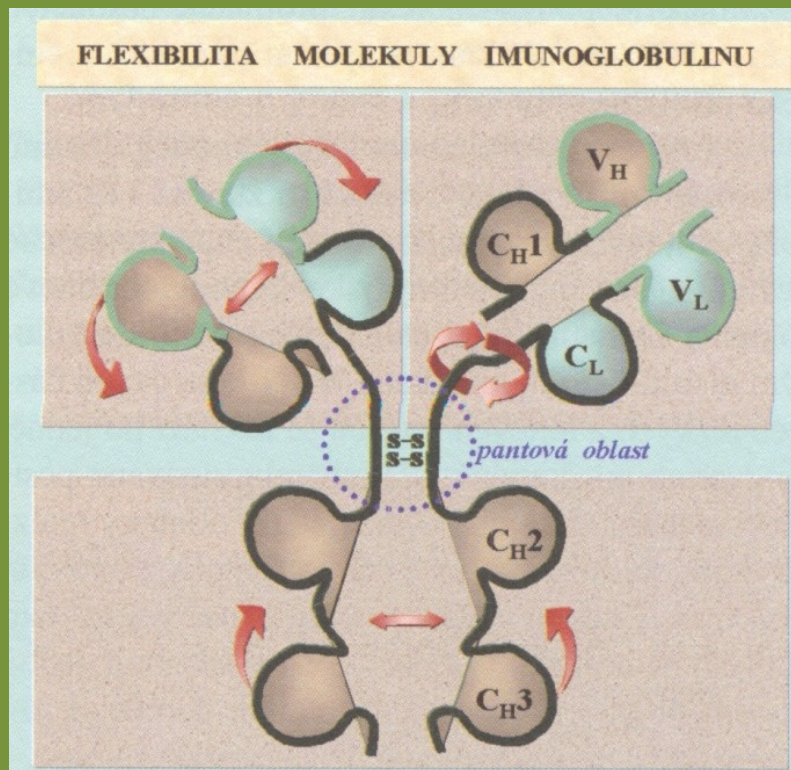
(a)



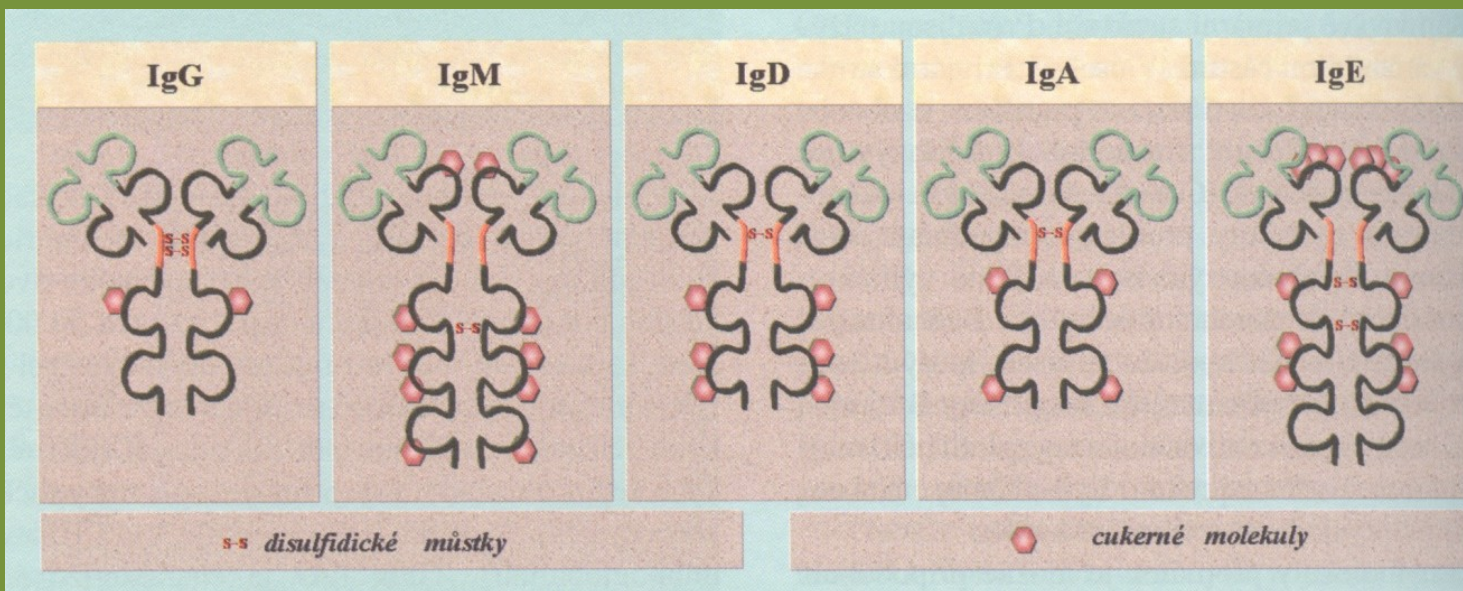
(b)

Obr. Pantová oblast se přizpůsobuje tvarem vazebného místa na Ag konkrétní Ag struktuře. Část Ab molekuly se **a) rozvívá**
b) otáčí

Obr. Naznačuje možnosti změn prostorového uspořádání částí molekul Ab

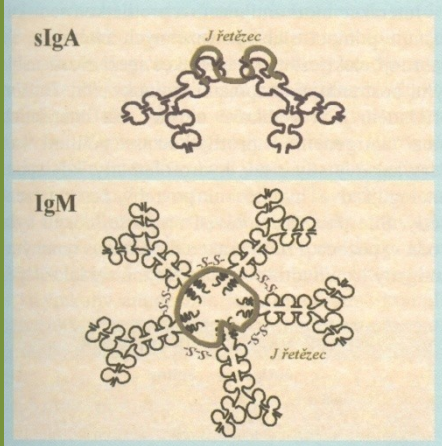


Obr. Počet konstantních domén je různý pro různé typy těžkých řetězců, úroveň glykosylace, počet a umístění disulfidických můstků u různých Ig tříd

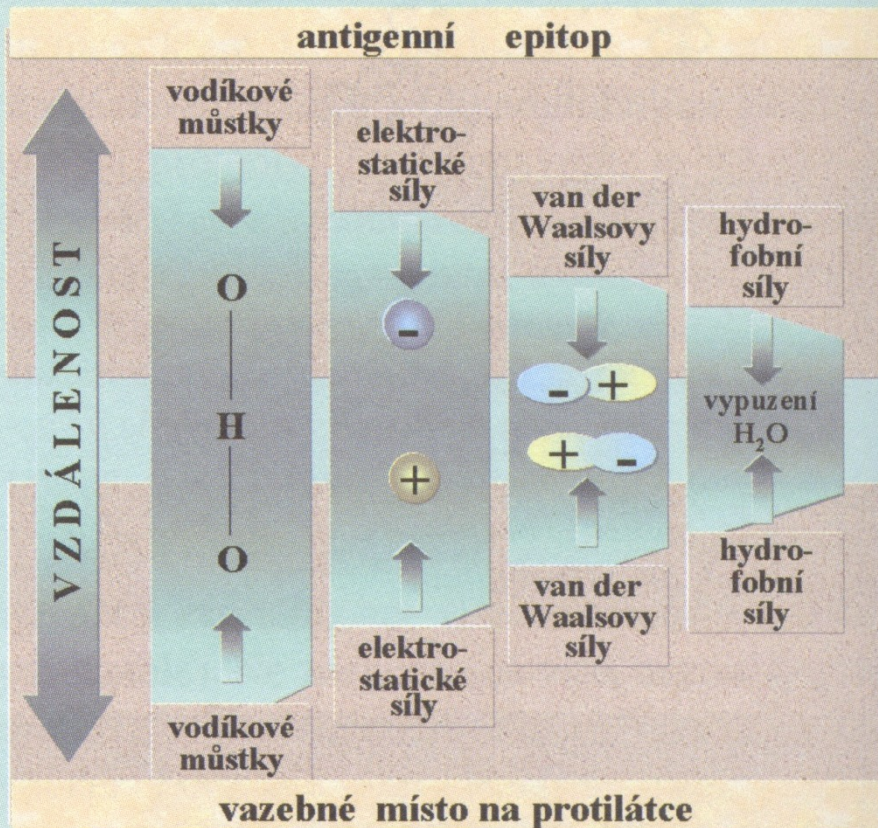


Obr. Multimerní Ab

Monomery jsou spojeny polypept. řetězcem J, produkovaný plazmatickou b., disulfidické můstky: spojuje řetězec monomerů a těžké řetězce



SLABÉ VAZEBNÉ INTERAKCE



Obr. Slabé vazebné interakce

Hydrofobní síly pro mnohé vazby nejdůležitější, u Ab s podílem aromatických AK se uplatňují zejména **van der Waalovy síly, hydrofobní interakce, H můstky**. Vazby působí jen na krátkou vzdálenost. **Sila vazby mezi vazebným místem Ab a Ag determinantnou označujeme afinita, celková síla mezi všemi vazebnými místy komplexní Ag struktury - avidita protilátky**

Afinita

- Je vyjádřena **asociační konstantou K**
- Je poměr mezi koncentrací komplexu Ag-Ab a koncentrací volného Ag v násobku s koncentrací volné Ab
- Platí pro monoklonální Ab
- Polyklonální Ab jsou ve své afinitě heterogenní. Afinita se vyjadřuje jako rovnovážná konstanta reakce Ab a Ag v definovaných podmínkách pro definované reaktanty

Praxe: afinita při infekčním onemocnění viz dynamika protilátkové odpovědi.

V počáteční fázi infekčního onemocnění:

spec. Ab k Ag infekčního agens – není pevná vazba, afinita, avidita nízká

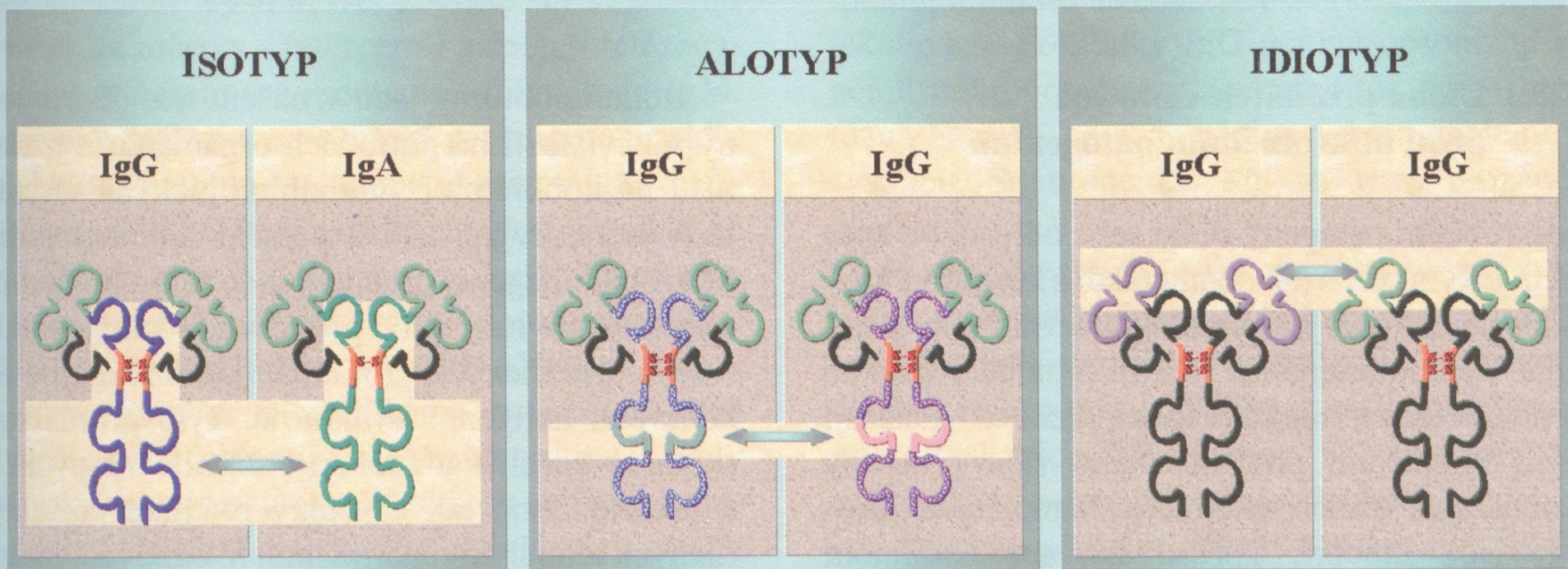
Průběh infekce - avidita narůstá

Stanovení afinity a avidity v klinické praxi – určení fáze různých onemocnění

Obr. Izotypové rozdíly - rozdíly v AK složení konstantních částí řetězců (příslušnost k třídě)

Alotypové – odlišnosti v konstantní části těžkých řetězců podmíněné genet. Polymorfismem

Idiotypové – odlišnosti ve variabilní části molekul Ig podmíněné přeskupením genových segmentů – **unikátní vazebné vlastnosti každé Ab**



TŘÍDY, PODTŘÍDY IMUNOGLOBULINŮ

IgM	IgG ₁	IgG ₂	IgG ₃	IgG ₄	IgA ₁	IgA ₂	IgD	IgE
-----	------------------	------------------	------------------	------------------	------------------	------------------	-----	-----

fyzikálně-chemické vlastnosti

těžký řetězec	μ	γ_1	γ_2	γ_3	γ_4	α_1	α_2	δ	ϵ
mol. hmotnost	970	150	150	170	150	160	160	180	190
sérová hladina (g/l) <i>dospělé osoby</i>	1,5 - 3	3 - 9	1,5 - 6	0,2 - 1	0,01 - 1,0	0,5 - 3,8	0,05 - 0,85	0,01 - 0,2	< 200 IU/ml
poločas rozpadu <i>(dny)</i>	10	21	20	7	21	6	6	3	2

distribuce v tkáních

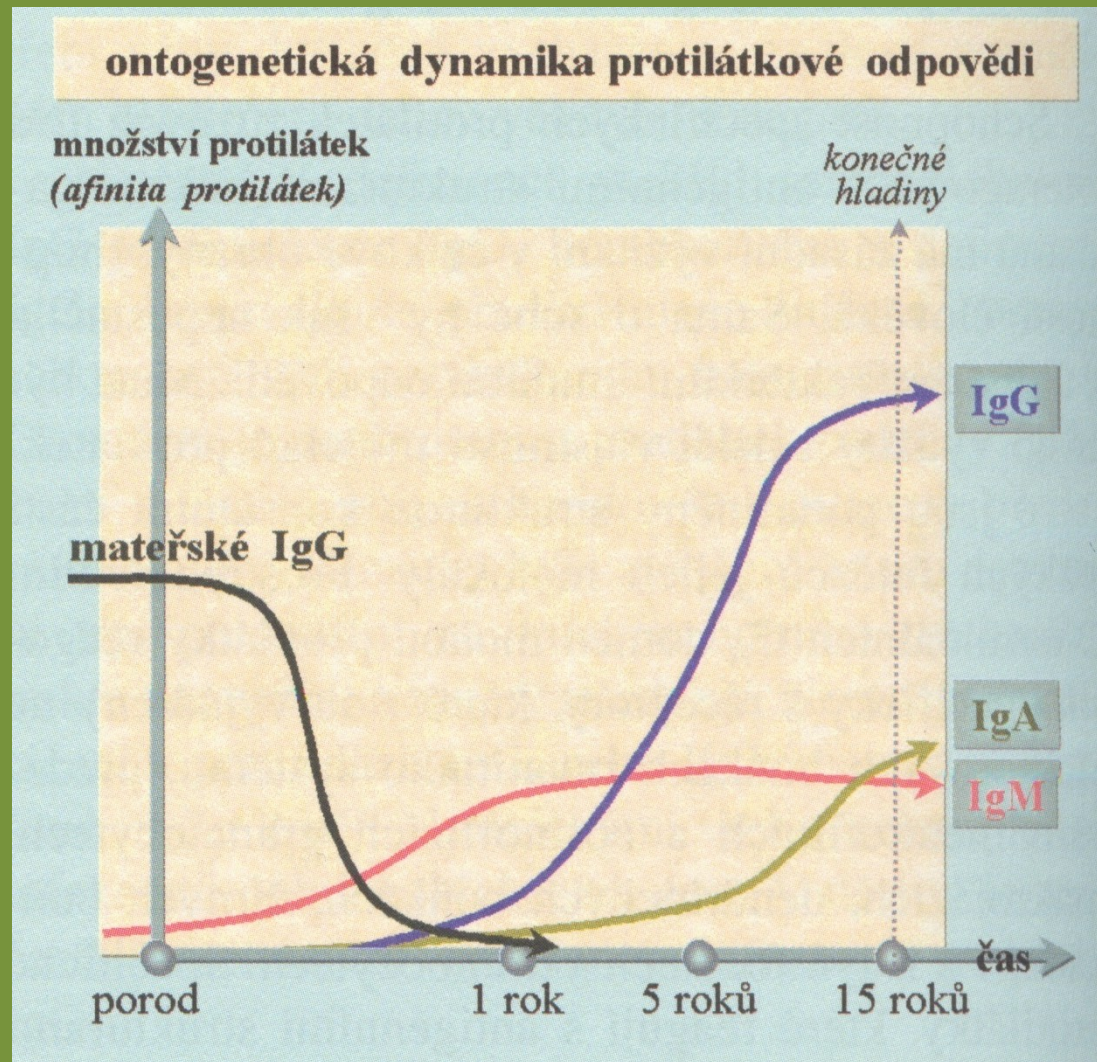
difúze do tkání	-	+++	+++	+++	+++	++ <small>monomer</small>	-	-	+
prostup přes epitel	+	-	-	-	-	-	+++	-	-
prostup přes placentu	-	+++	+	++	+-	-	-	-	-

funkční aktivita

neutralizace	+	++	++	++	++	++	++	-	-
opsonizace	-	+++	-	++	+	+	-	-	-
vazba na receptory fagocytů	-	+	-	+	+-	+	+	-	+
vazba na receptory mastocytů	-	-	-	-	-	-	-	-	+++
klasická cesta aktivace kompl.	+++	++	+	+++	-	-	-	-	-
alternativní cesta aktivace kompl.	-	-	-	-	-	+	-	-	-

Charakteristika vlastností tříd a podtříd Ig

Obr. Ig v ontogenezi: přes placentu pasivně IgG do porodu, v pozdních fázích těhotenství tvorba vlastních IgM, IgA pasivně v kolostru a mléku, ostatní či zvýšené hladiny značí intrauterinní infekce (od matky, poškození plodu)



Dynamika primární a sekundární protilátkové odpovědi

Obr. Primární

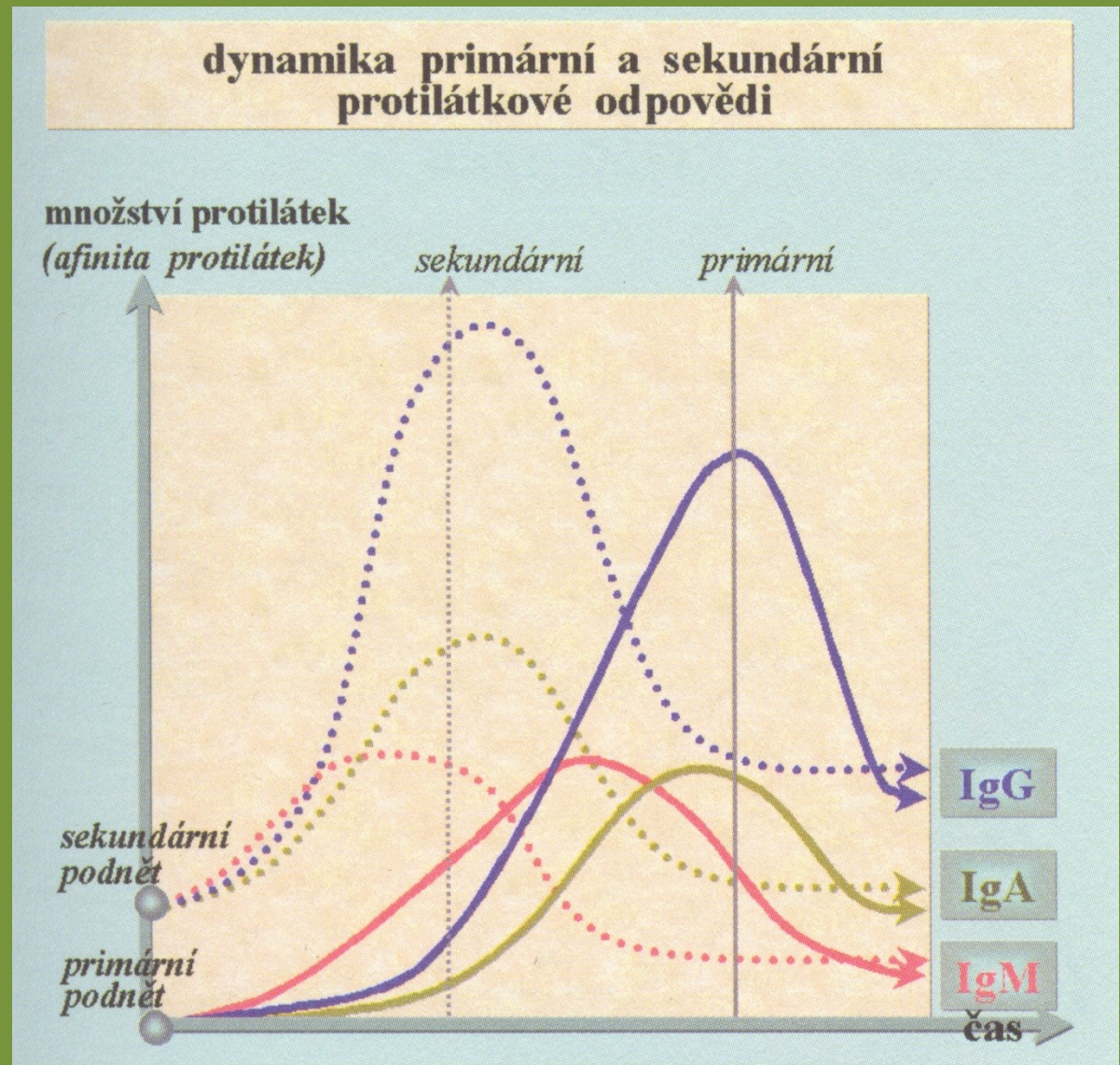
odpověď 1. Tvorba Ab ve třídě IgM, potom další třídy a podtřídy (IgG, IgA..)

2. Postupné zvyšování afinity Ab podle procesu somatické mutace

Sekundární odpověď

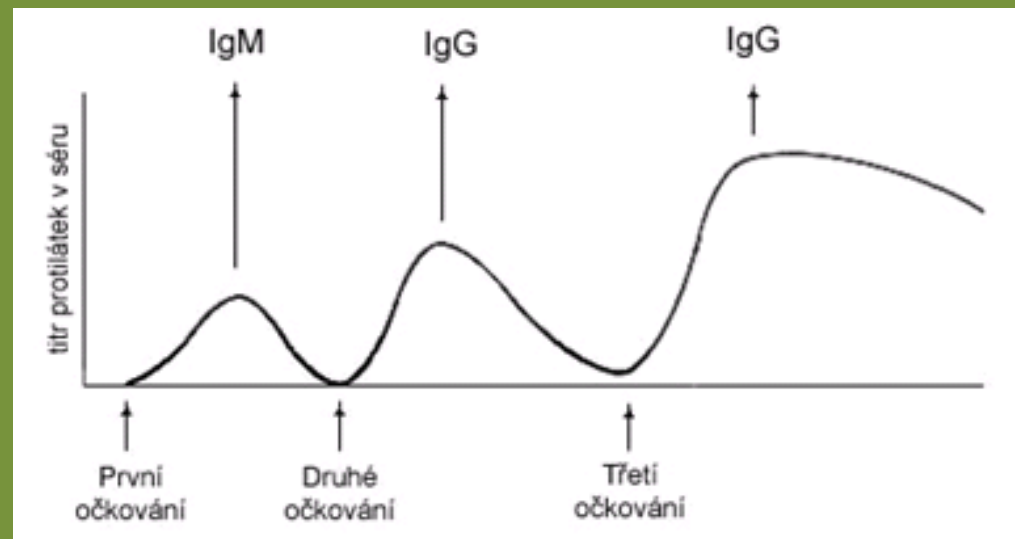
1. rychlejší a intenzivnější tvorba tříd IgG, IgA, nižší tvorba IgM

2. Vyšší afinita a množství Ab expanzí paměťových buněk, které již prodělaly proces somatické mutace



Experimentální imunizace

1. Zjištění dynamiky a výše hladiny tvorby Ig u pokusných zvířat
2. Zjištění koncentrace proteinů očkovací látky
3. Aplikace dávky: při spodní hranici hodnoty množství očkovací látky
4. Aplikace po třech týdnech dle schématu
5. Izolace séra s vytvořenými Ab z pokusných zvířat



Průběh imunitní odpovědi, aplikace po třech týdnech

Experimentální imunizace

- Literatura udává jako optimální očkovací dávku rozmezí hodnot 5 – 50 μg nerozpustných proteinů v bakteriální suspenzi. Toto množství lze aplikovat: a) intraperitoneálně b) subkutánně
- nejběžnější metoda-intraperitoneální očkování, použití: pro vpravení většího množství Ag do myši (Harlow, Lane 1988).
- K očkování se dá použít spodní hranici hodnot Ag:
- možnost sledování dynamiky protilátkové odpovědi: Závisí:
 - na množství Ag
 - na jeho specifitě
 - na organismu, který očkujeme.

Stanovení Ab u infekčních chorob