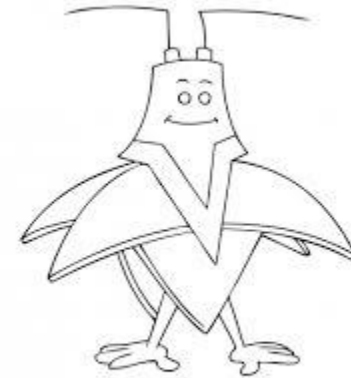


Název: **Protilátky – struktura a jejich význam**

Školitel: Ing. Soňa Křížková, Ph.D
Mgr. Markéta Vaculovičová, Ph.D.

Datum: 23. 5. 2014

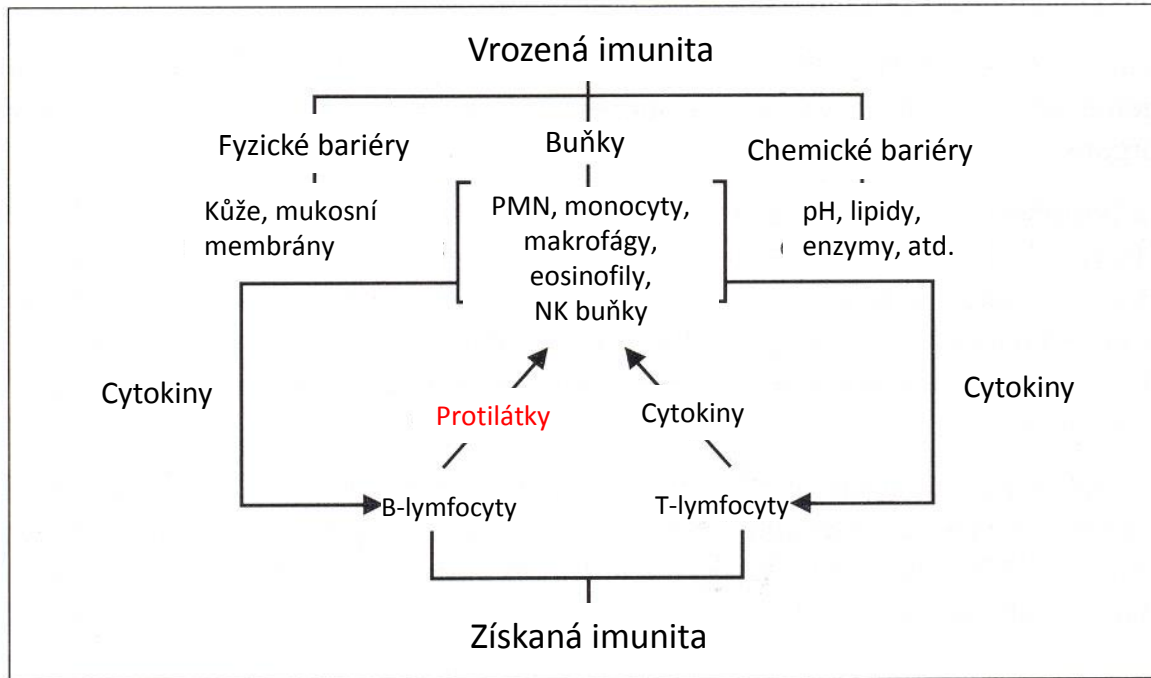


© Procidis



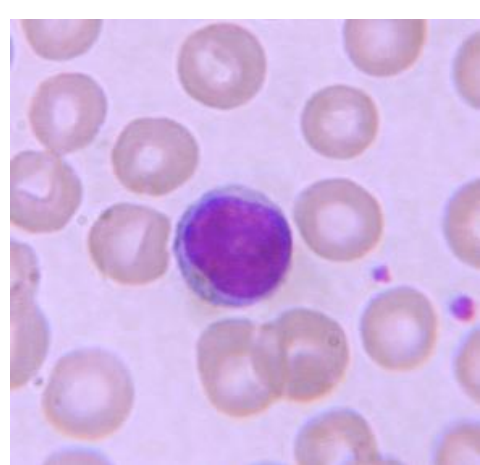
- Protilátka
- Funkce
- Struktura
- Vlastnosti
- Vytváření protilátek a jejich další funkce
- Třídy imunoglobulinů
- Využití protilátek
- Protilátkové inženýrství

Imunitní systém:

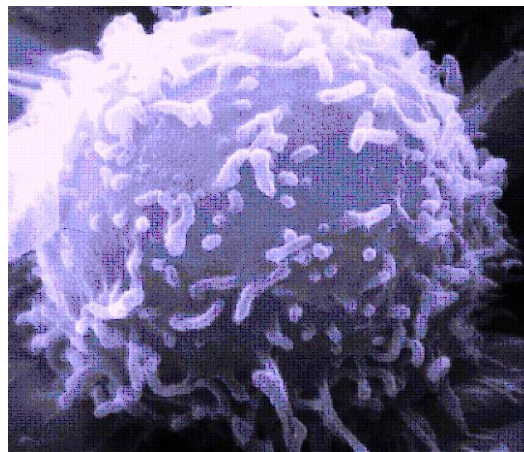


Protilátky

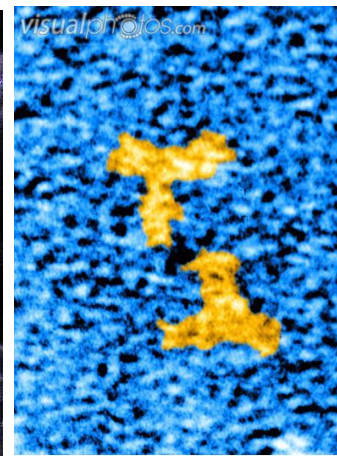
- Immunoglobuliny (Ig)
- Glykoproteiny, $M_r > 150$ kDa
- Zásadní role v obraně organismu.
- Součást specifické imunitní odpovědi humorálního typu (\times buněčná imunita)
- Tvořeny B-lymfocyty a plasmatickými buňkami vzniklými z B-lymfocytů v rámci terminální diferenciacce
- U obratlovců v krevním séru, tělních tekutinách a na povrchu B-lymfocytů.
- Specifická vazba na antigen (Ag) pomocí nekovalentních interakcí.



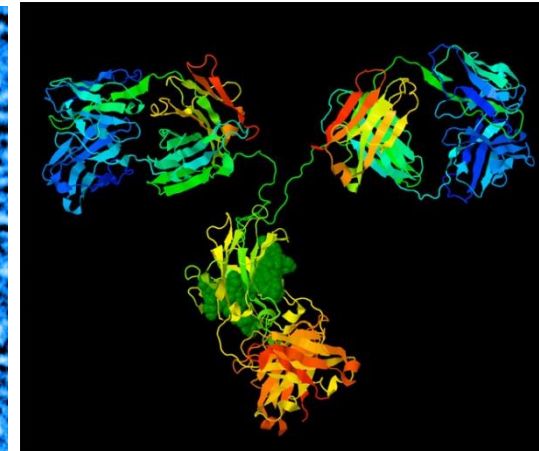
Lymfocyt – krevní nátěr



B-lymfocyt – SEM



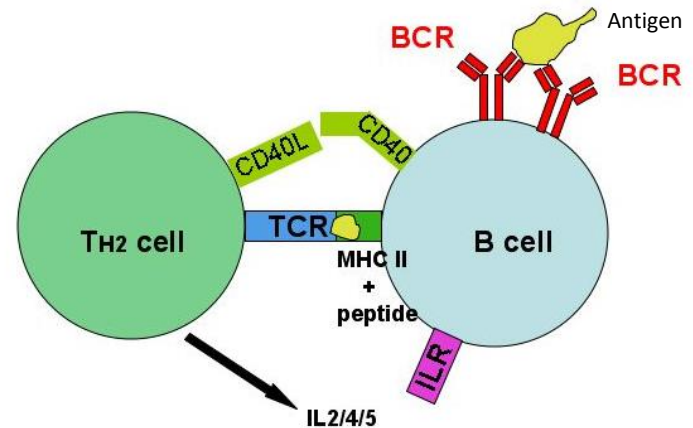
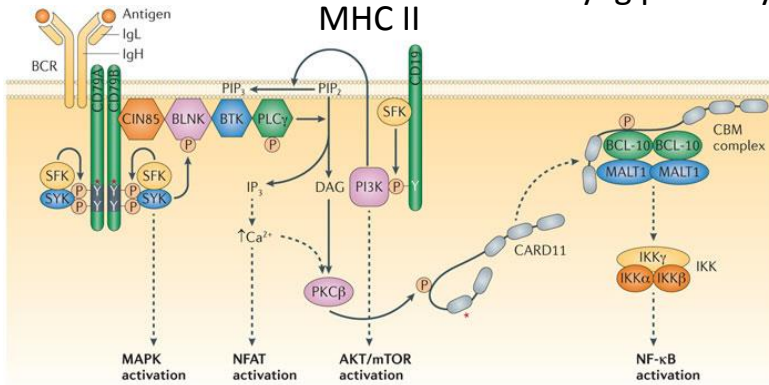
IgG – TEM



IgG – proteinová struktura

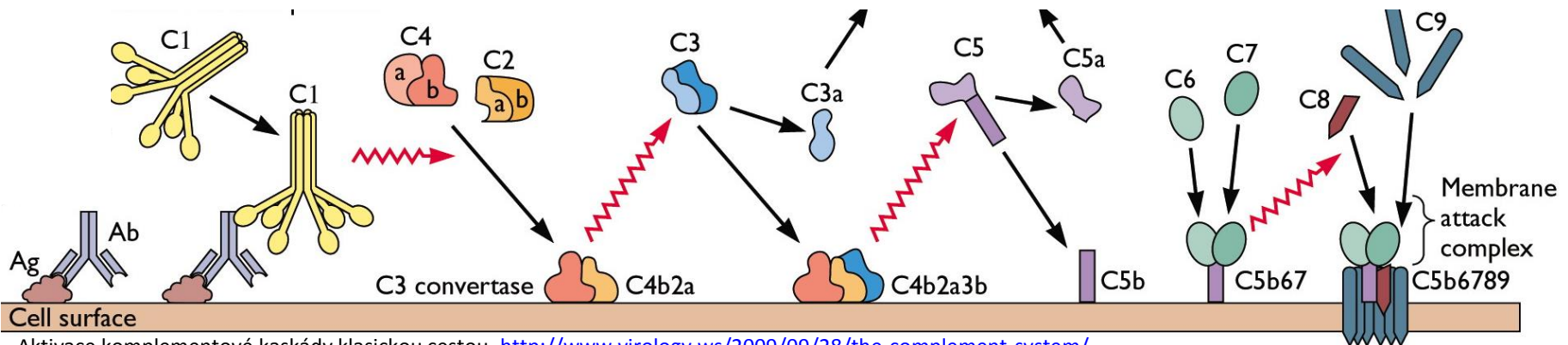
Vytváření protilátek a jejich další funkce

- Variabilita protilátek
 - až 1 000 000 různých protilátek v lidském organismu
 - stovky genů pro H a L řetězce
 - V(D)J rekombinace
 - L řetězec tvořen 3 geny
 - H řetězec tvořen 4 geny
- Funkce imunoglobulinů:
 - Inaktivace mikroorganismů
 - Likvidace opotřebovaných buněk
 - Součásti lymfocytárních receptorů, BCR a TCR:
 - BCR – B-buněčný receptor
 - transmembránový povrchový Ig (nejčastěji IgM či IgD)
 - asociované signalizační molekuly – Igα a Igβ. Propojeny s cytoplazmatickými tyrosinkasami
 - Po vazbě antigenu na alespoň 2 BCR receptory dochází k přenesení signálu dovnitř lymfocytu, endocytóze antigenu, jeho rozložení a vystavení na membránu v MHC II komplexu, což má za následek aktivaci B-lymfocytu T-lymfocylem a zvýšení exprese protilátek
 - TCR- T-buněčný receptor
 - transmembránový Ig podobný modul rozeznávající antigen na povrchu B-lymfocytů v komplexu s MHC II



Funkce imunoglobulinů

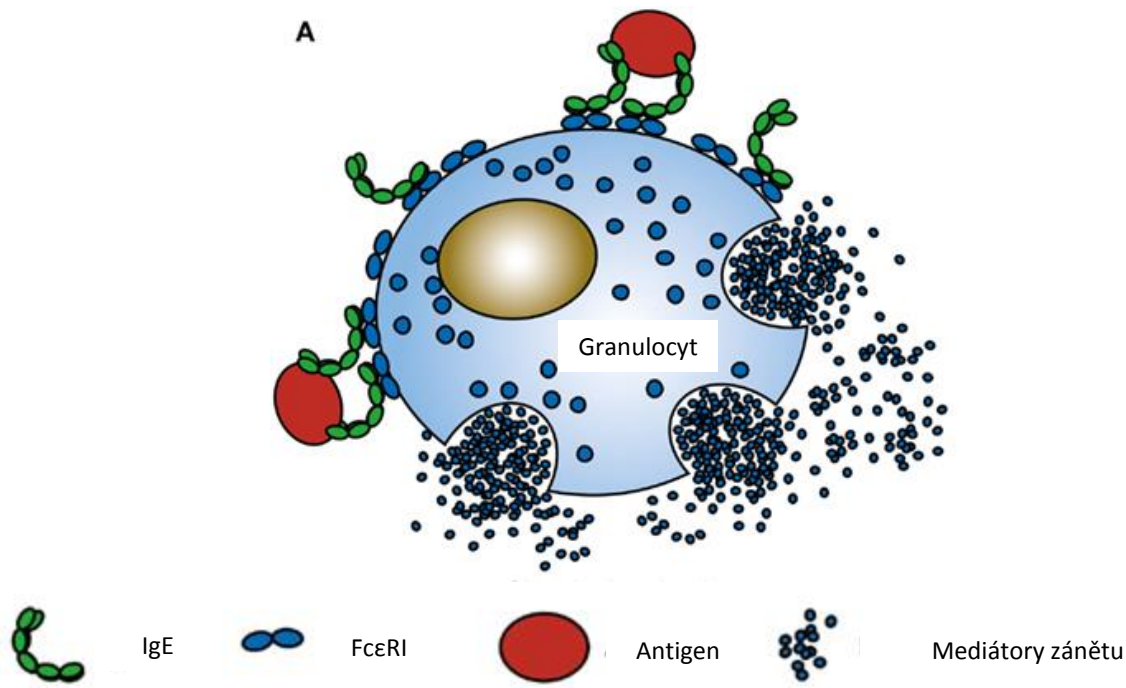
- Obrana proti:
 - bakteriím
 - virům
 - parazitům
 - toxinům – neutralizace toxinu, zabránění adheze mikroorganismu
- Aktivace některých složek imunitního systému:
 - cytotoxické reakce – **aktivace komplementové kaskády** nebo NK-buněk
 - tvorba pórů v cytoplasmatické membráně, lyze bakterie a únik organel
 - zahájení zánětlivé odpovědi
 - opsonizace - navázání protilátky a určitých složek komplementu – označení mikroorganismu a atraktivizace pro fagocyty



Aktivace komplementové kaskády klasickou cestou, <http://www.virology.ws/2009/09/28/the-complement-system/>

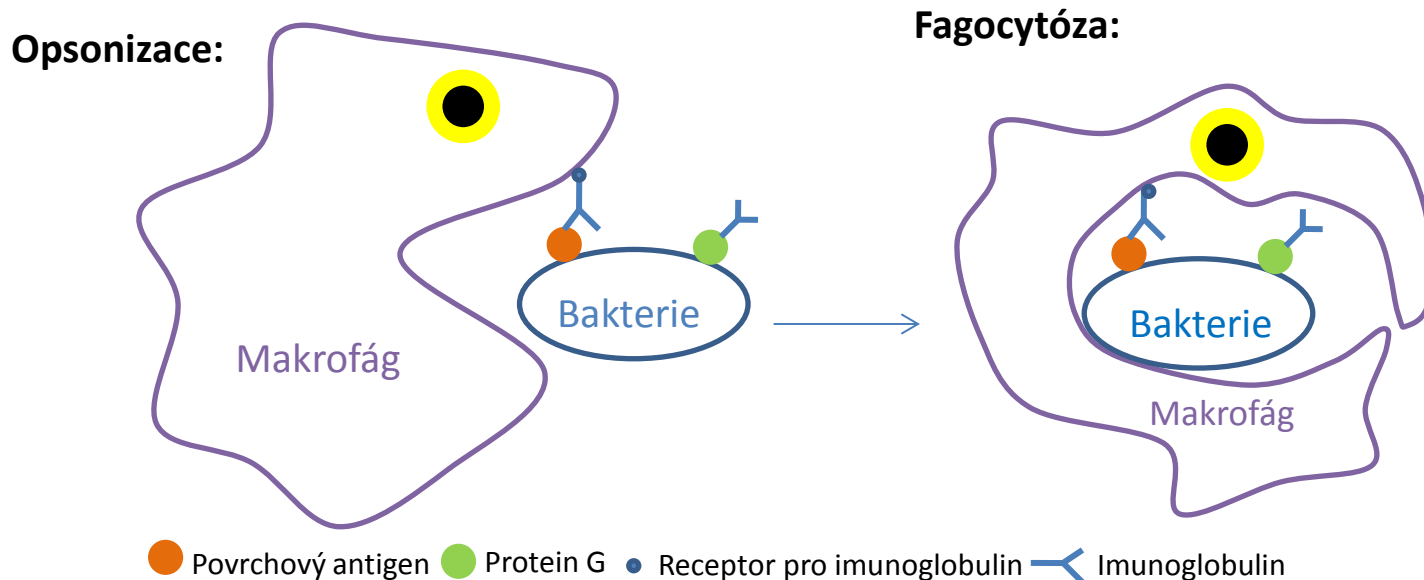
Funkce imunoglobulinů

- Obrana proti:
 - bakteriím
 - virům
 - parazitům
 - toxinům – neutralizace toxinu, zabránění adheze mikroorganismu
- Aktivace některých složek imunitního systému:
 - cytotoxické reakce – aktivace komplementové kaskády nebo NK-buněk
 - **zahájení zánětlivé odpovědi**
 - opsonizace



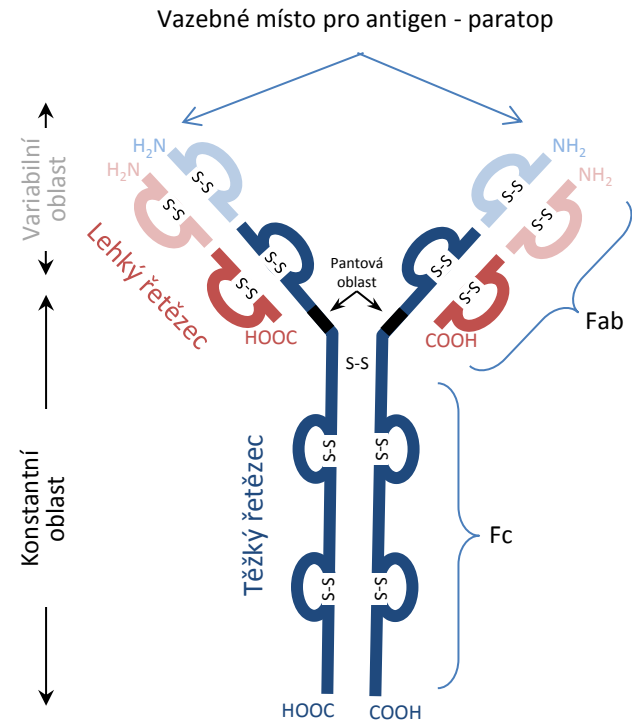
Funkce imunoglobulinů

- Obrana proti:
 - bakteriím
 - virům
 - parazitům
 - toxinům – neutralizace toxinu, zabránění adheze mikroorganismu
- Aktivace některých složek imunitního systému:
 - cytotoxické reakce – aktivace komplementové kaskády nebo NK-buněk
 - zahájení zánětlivé odpovědi
 - **opsonizace**



Struktura imunoglobulinů

- 2 x **Lehký řetězec (L)**
 - 1 x Variabilní doména (VL)
 - 1 x Konstantní doména (CL)
 - 2 typy: κ , λ . Odlišnosti v konstantním úseku
- 2 x **Těžký řetězec (H)**
 - 1 x Variabilní doména (VH)
 - 3 x Konstantní doména (CH 1-3) (IgA, IgD, IgG)
 - 4 x Konstantní doména (CH 1-4) (IgE, IgM)
 - 5 typů: α , δ , ϵ , γ , μ
 - Vazba sacharidových složek
- Disulfidické můstky
 - Kovalentní propojení řetězců
 - Mezi L a H řetězcem – 1 disulfid
 - Mezi H a H řetězci – různý počet dle třídy a podtřídy imunoglobulinu.
- Vazebné místo
 - Hypervariabilní úseky
 - Tvořeno variabilními doménami H a L řetězců
 - Imunoglobulinové domény
- **Pantová oblast**
 - Štěpení papainem (rostlinná proteasa)
 - 2 x Fab fragment – vazba antigenů
 - 1 x Fc fragment – vazba na povrchové receptory leukocytů
 - Štěpení pepsinem (živočišná proteasa)
 - 1 x Fc fragment
 - 1 x bivalentní Fab fragment



Isotypy protilátek - savci

Podle stavby konstantní části těžkého řetězce a zastoupení sacharidů, též třídy

IgG

- 2–3 % sacharidů, **75 % všech Ig v séru**, koncentrace je 10 g/l.
- 4 podtřídy (IgG1–4), které se vzájemně liší svými opsonizačními vlastnostmi, vazbou na komplement a časem, po který jsou aktivní.
- pouze jako monomery
- opsonizace – na neutrofilech a makrofázích se vyskytují receptory FcR pro Fc-fragменты IgG,
- aktivace komplementu klasickou cestou – po vazbě IgG na antigen,
- sekundární imunitní reakce – opakované setkání s antigenem,
- neutralizace toxinů – po navázání IgG dojde k zablokování a neutralizaci toxinu vytvořením imunokomplexu.

IgA

- 5–8 % sacharidů, **slizniční protilátky**. Nejzastoupenější protilátky v těle, v séru koncentrace 1,5 g/l, ovšem celkově v těle jsou to nejzastoupenější protilátky
- monomery (v séru) nebo dimery spojené J-řetězcem (ve sliznicích, ochrana proti štěpení proteasami)
- blokáda adhezních molekul bakterií
- opsonizace
- IgA nemá schopnost aktivovat komplement

IgM

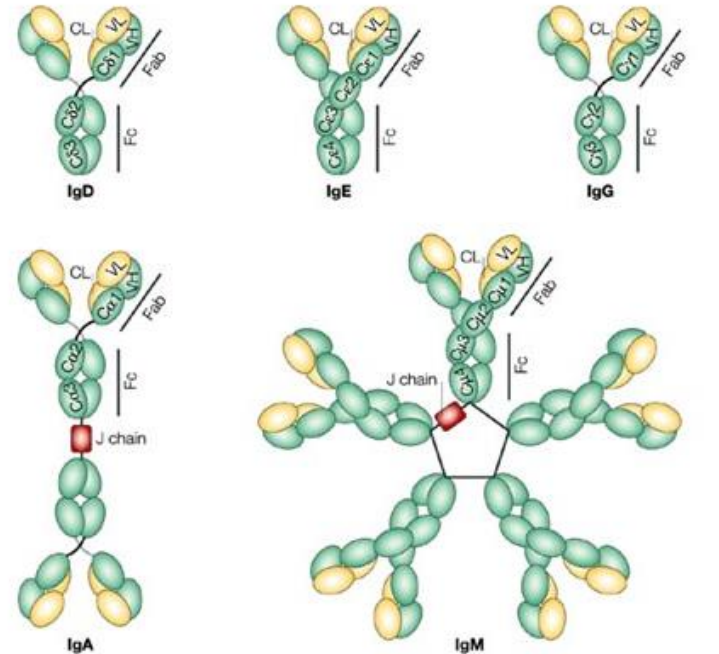
- 12 % sacharidů, 10 % všech protilátek v séru, 1–1,5 g/l.
- Monomer IgM – **součást BCR komplexu**, pentamer, jednotlivé podjednotky spojeny do kruhu cystinovými můstky a j J řetězcem.
- aktivace komplementu
- **tvorí odpověď na polysacharidové antigeny (ABO systém)**
- aglutinace – IgM váže hodně antigenů (teoreticky až 10, obvykle cca 5) a proto snadno tvoří aglutináty.
- **Vytvářeny jako první, jejich produkce nevyžaduje izotypový přesmyk**
- IgM nemá opsonizační funkci.
- pozitivní průkaz IgM proti antigenu poukazuje na **akutní infekci**

IgD

- 9–14 % sacharidů, zastoupen relativně málo, nízké koncentrace v séru
- monomer
- slabá afinita k antigenům, **součást BCR komplexu**
- vyvolává uvolňování histaminu z mastocytů a bazofilních leukocytů,
- **alergie**

IgE

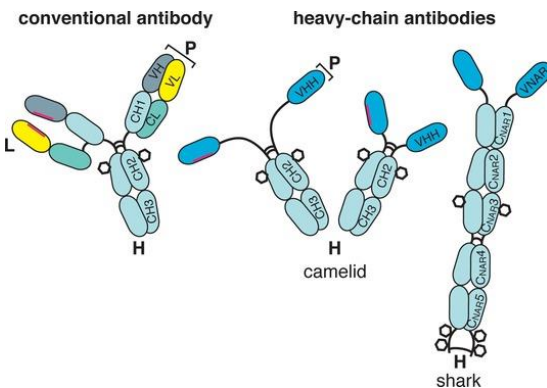
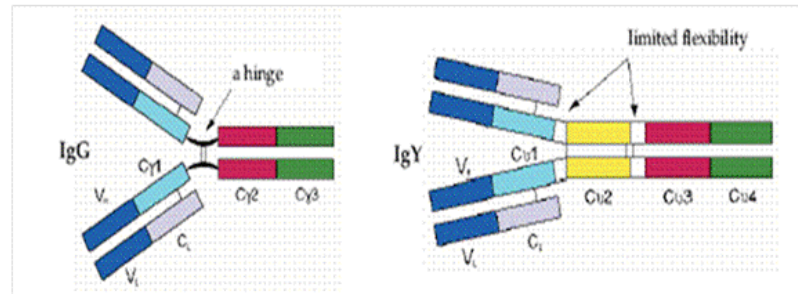
- 12 % sacharidů, nejnížší sérová koncentrace Výskyt: slezina, mandle, mukózní membrána plic a GIT
- uvolňuje mediátory zánětu (histamin, serotonin, prostaglandiny, leukotrieny),
- **alergie**
- **antiparazitární obrana** (stimuluje procesy k vypuzení): mediátory, vazodilatace, vykašlání, vykýchání, zvýšení peristaltiky střev, průjem,



Nature Reviews | Molecular Cell Biology

Isotypy protilátek – ostatní obratlovci

- IgY
 - ptáci a plazi
 - v séru
 - ve vaječném žloutku
- IgW
 - paryby
 - příbuzné se savčími IgD
- IgX
 - obojživelníci
- hIgG
 - 2 těžké řetězce
 - u velbloudovitých
- IgNAR
 - 2 těžké řetězce
 - paryby



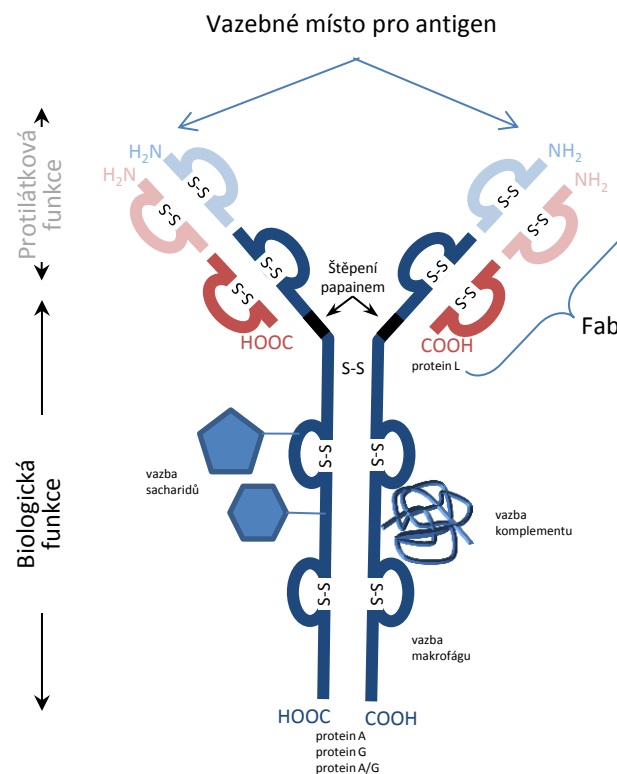
Vertebrate class	Immunoglobulin isotype					Rearrangement, hypermutation, thymus and spleen	Class switch	Germinal-centre formation
100 Mya Placental mammals	IgM	IgD	IgG	IgE	IgA	+	+	+
200 Mya Birds	IgM		IgY or IgG		IgA	+	+	+
360 Mya Amphibians	IgM		IgY		IgX	+	+	-
400 Mya Bony fish	IgM	IgD				+	-	-
460 Mya Cartilaginous fish	IgM				IgW or IgNAR	+	-	-
550 Mya Jawless fish	No immunoglobulins					?	-	-

Využití protilátek

- Vakcíny
- Terapeutické účely
 - Cílená distribuce léčiv
 - IgY
 - Pasivní imunizace
 - Protinádorová léčiva (Rituximab, Transtuzumab...)
- Diagnostika
- Imobilizace proteinů
 - Imunoanalýza
 - Mikročipy
 - Separace a purifikace proteinů

Interakce protilátek

- Antigen
- Ostatní složky imunitního systému
- Ostatními molekulami v organismu - signalizace
- Superantigeny
 - protein A
 - protein G
 - protein A/G
 - protein L
- ... to se nám nemusí vždy hodit
 - velikost ☹️
 - stabilita
 - monospecifita
 - non-humánní původ
 - nízká afinita k antigenu
 - pro daný antigen nelze připravit
 - antigen (možná) neexistuje



Protilátkové inženýrství

Upravení vlastností protilátek tak, aby lépe vyhovovala našim požadavkům metodami genetického a proteinového inženýrství

- Tvorba protilátek proti zadanému antigenu (imunizace)

- Monoklonální protilátky

- hybridomová technologie
- fágový display
- Rekombinantní protilátky

- Glykosylace

- Deglykosylace
- úprava glykosylace

- Částečné protilátky

- scFv
- Fab
- minibody

- Fúzní protilátky

- imaging (GFP)

- Syntetické protilátky

- bioinformatický návrh vazebného místa

- Multivalentní protilátky

- vážou více než 1 antigen
- Bi-, tri- specifické protilátky
 - Fab₂
 - Fab₃
 - Bis-scFv
 - Triabodies

- Minimalizace odpovědi imunitního systému

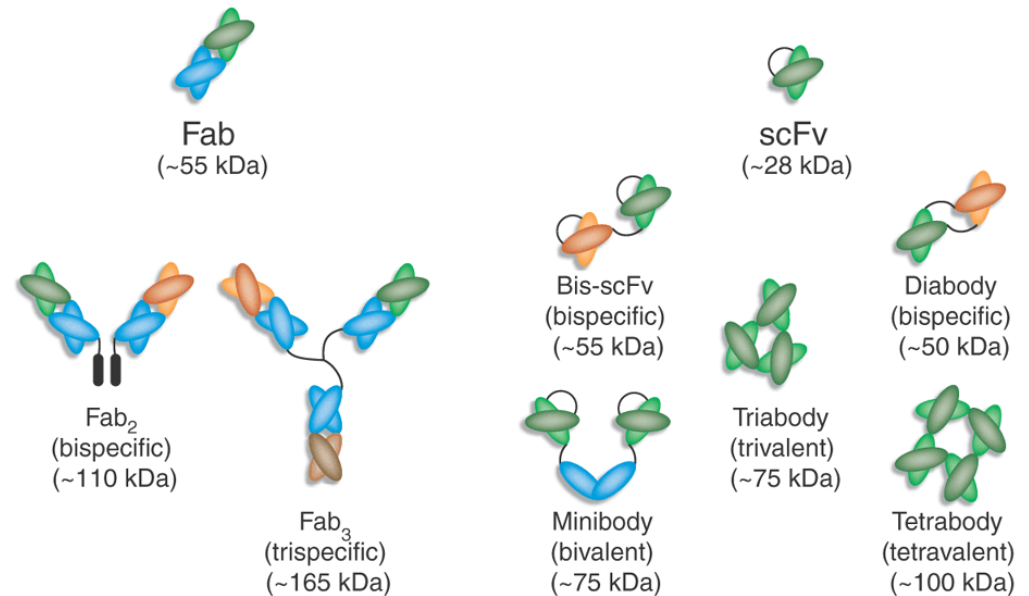
- Humanizované protilátky
- Chimerní protilátky
- Delece nežádoucí domény

- Theranostika

- Imaging

- Cílená distribuce léčiv

- Hledání neznámých struktur

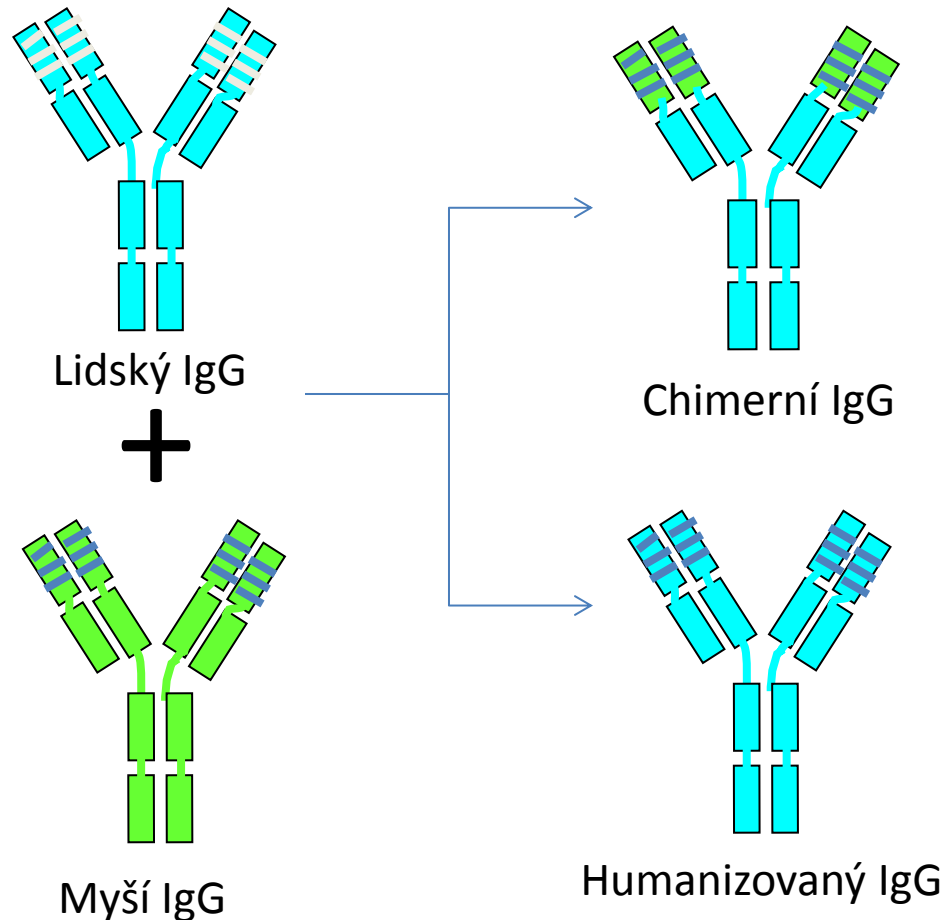


Protilátkové inženýrství

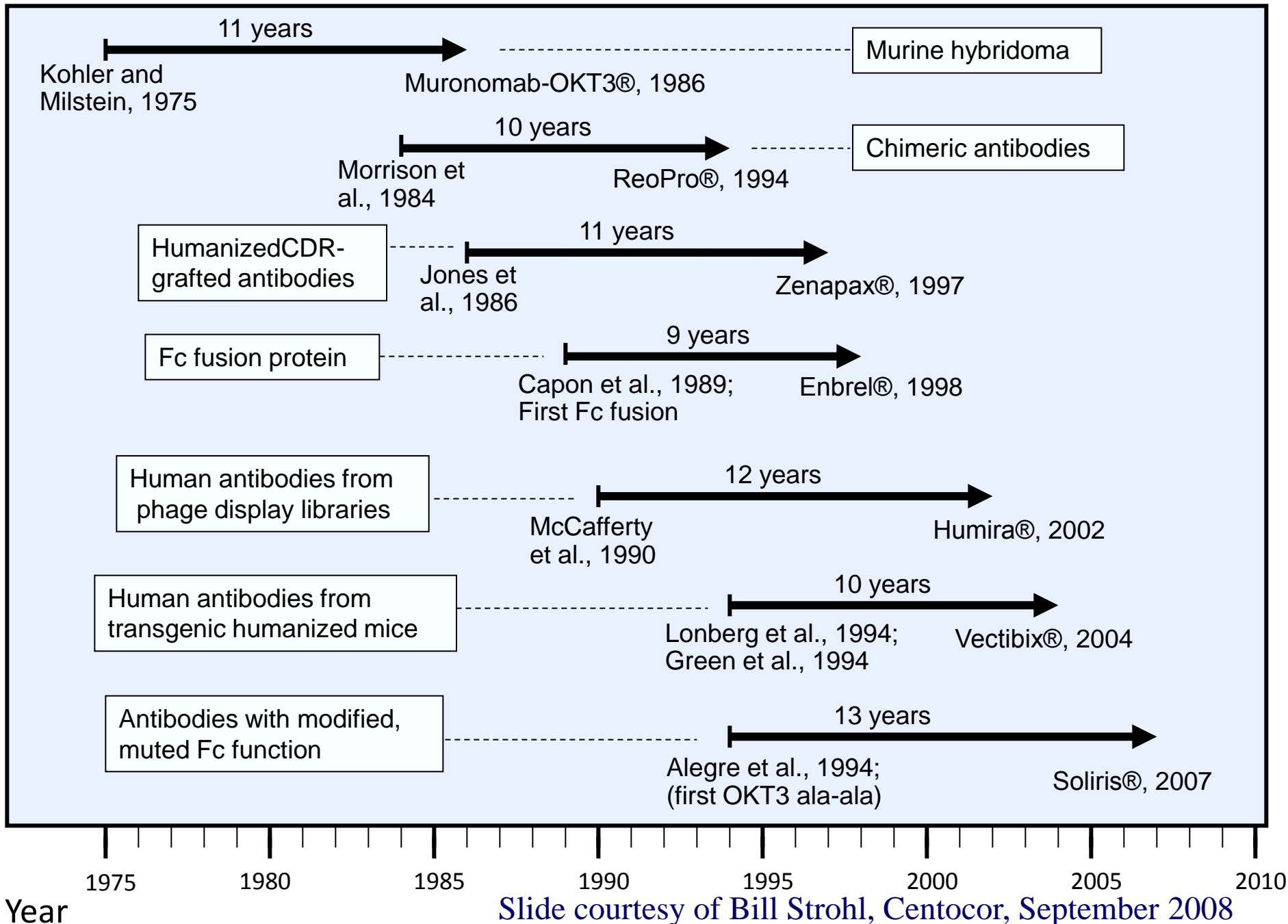
Upravení vlastností protilátek tak, aby lépe vyhovovala našim požadavkům metodami genetického a proteinového inženýrství

- Tvorba protilátek proti zadanému antigenu (imunizace)
- Monoklonální protilátky
 - hybridomová technologie
 - fágový display
 - Rekombinantní protilátky
- Glykosylace
 - Deglykosylace
 - úprava glykosylace
- Částečné protilátky
 - scFv
 - Fab
 - minibody
- Fúzní protilátky
 - imaging (GFP)
- Syntetické protilátky
 - bioinformatický návrh vazebného místa
- Multivalentní protilátky
 - vážou více než 1 antigen
 - Bi-, tri- specifické protilátky
 - Fab₂
 - Fab₃
 - Bis-scFv
 - Triabodies
- Minimalizace odpovědi imunitního systému
 - Humanizované protilátky
 - Chimerní protilátky
 - Delece nežádoucí domény
- Theranostika
- Imaging
- Cílená distribuce léčiv
- Hledání neznámých struktur

Humanizované × chimerní protilátky:



Time Required for Maturity of Technologies

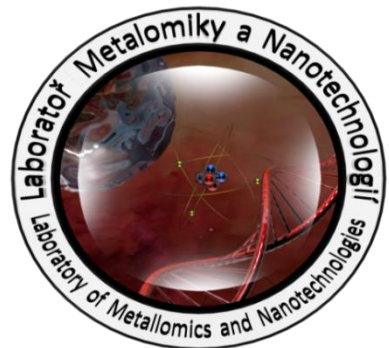


Schválené terapeutické protilátky

Antibody	Target	Indication	Sales (million \$)	Producer
OKT3 Digibind Herceptin	CD3 Digoxin HER- 2	Acute kidney transplantation rejection Digoxin poisoning Metastatic.breast cancer	424.8 (03) 117.7(2Q/04)	(Ortho Biotech/J & J) (Glaxo/Wellcome) (Genentech/MedImmune)
Zenapax Simulect	IL2 R-a IL2 R-a	Kindney transplantation rejection Acute organ rejection		(Protein Design Labs/Roche) (Norvatis)
Rituxan	CD20	Non-Hodgkin's lymphoma	1,489.1 (03) 424.7(2Q/04)	(Genentech/Roche) *
Panorex Remicade Reopro Synagis	CA17-1A TNFa Platelet RSV	Colorectal cancer Crohn's disease & Rheumatoid arthritis Ischemic cardiac complications RSV infection	409.0 (02) 431.0 (02) 849.0 (03)	(GlaxoSmithKline / Centocor) (Centocor/Schering-Plough) * (Centocor/Eli Lilly) * (MedImmune)
Mylotarg Campath Zevalin Humira Xolair	CD33 CD52 CD20 TNF IgE	Relapsed CD33-positive AML (calicheamin) B cell CLL Non-Hodgkin's lymphoma (I111 & Y90) Rhematoid arthritis Asthma	149.0(1Q/04) 30.0(1Q/04)	(Celltech/Wyeth-Ayerst) (Millenium Ph/Schering AG) (IDEC) (Abbot) (Genentech/Novartis)
Bexxar Raptiva Avastin Erbitux	CD20 CD11a VEGF EGFR	Non-Hodgkin's lymphoma (I131) Mod.. severe plaque psoriasis, psoriatic arthritis Metastatic carcinoma of the colon or rectum EGFR-expressing, metastatic colorectal cancer	132.0 (03) 6.3(1Q/04) 133.0(2Q/04) 17.5(1Q/04)	(Corixa/Glaxo-SmithKline) (Xoma/Genentech) (Genetech) (Bristol-Myer-Squibb, Imclone)
Embrel	TNF	RA, Polyarticular juvenile RA, psoriatic arthritis, ankylosing spondylitis, psoriasis	397,0(1Q/04)	(Amgen)

[Murine Antibody](#)
[Chimeric Antibody](#)
[Humanized Antibody](#)

Děkuji za pozornost



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Mendel
University
in Brno

