

Лекция 4

Иммуноглобулины – молекулярная основа гуморального адаптивного иммунного ответа

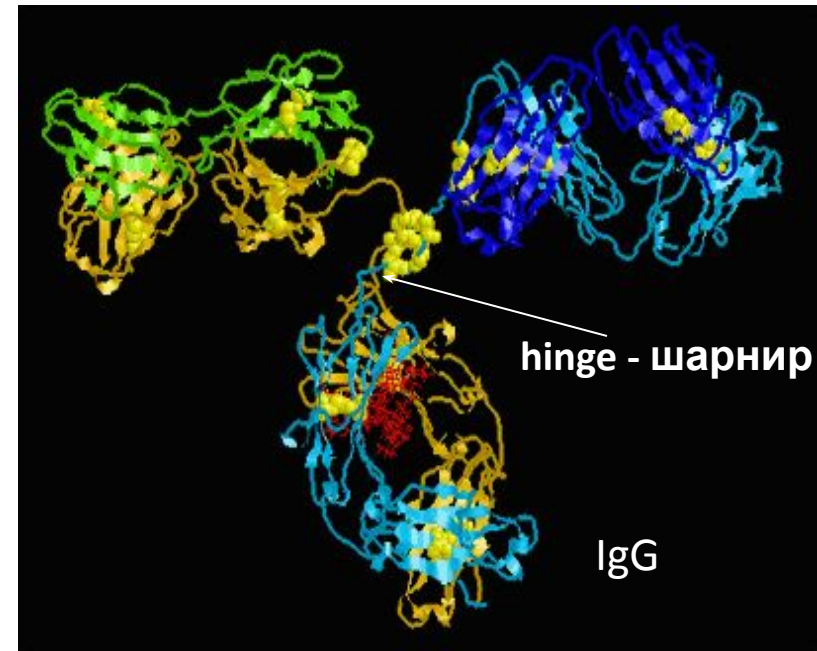
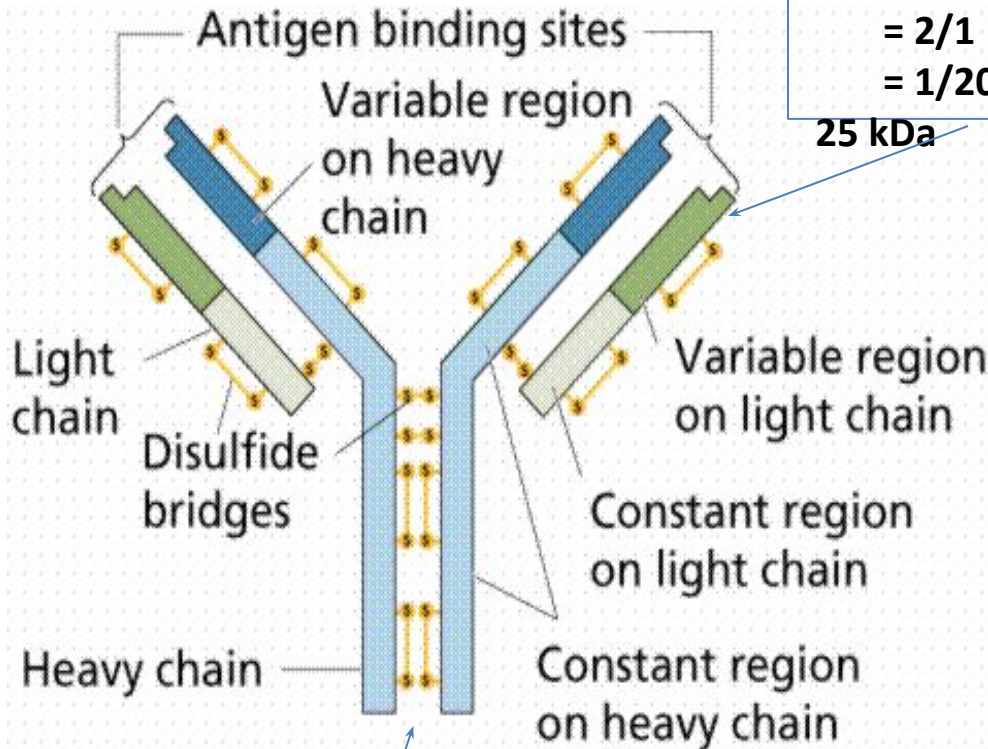
Лимфоциты адаптивного иммунитета распознают, в отличие от клеток врожденного иммунитета, огромное разнообразие антигенов бактерий, вирусов и других патогенов

- Иммуноглобулины Ig/антитела – АГ-распознающие молекулы В-клеток
- В-клетки организма продуцируют антитела ко всем возможным АГ
- Индивидуальная В-клетка продуцирует АГ одной АГ-специфичности
- Ig, связанный с мембраной В-клеток, служит рецептором для АГ и называется **BCR** – B-cell receptor - В-клеточный рецептор. Ig той же самой АГ- специфичности, что и BCR, секретируется на конечной стадии дифференцировки данной В-клетки с данным BCR – плазматической клеткой.
- Секреция АГ, связывающих АГ или их продукты во внеклеточном пространстве организма, - главная эффекторная функция В-клеток.
- Две функции АГ – распознавать и связывать АГ (V-область), рекрутировать другие молекулы и клетки для разрушения связанного АГ (C-область).
- У BCR нет эффекторных свойств АГ, его функция – активировать данную В-клетку и стимулировать ее размножение и дифференцировку в соответствующий клон плазматических клеток, секретирующих соответствующие первоначальному BCR специфические АГ.

Структура молекулы иммуноглобулина G (150 kDa)

2 типа легких цепей: κ и λ

$\kappa/\lambda = 20/1$ - мышь
= 2/1 - человек
= 1/20 - корова



Рентгеноструктурный анализ молекулы IgG

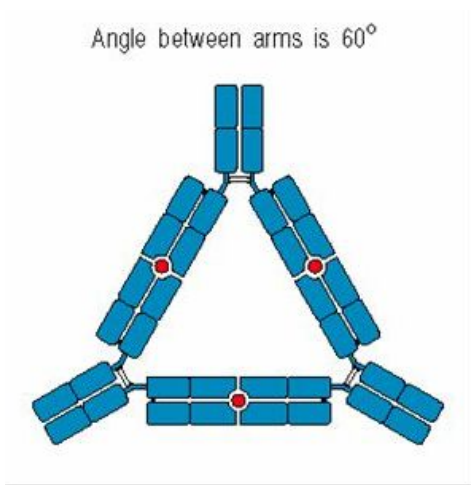
5 типов тяжелых цепей $\mu, \delta, \gamma, \alpha, \epsilon$ 50 kDa

5 классов или изотипов ИГ: IgM, IgD, IgG, IgA, IgE

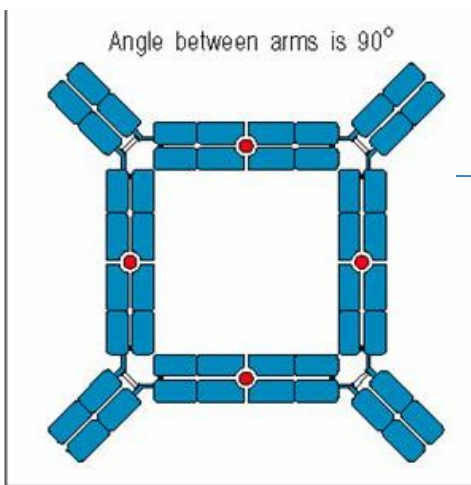
4 подкласса IgG: IgG1, 2, 3, 4 – у человека

C-конец - гидрофобный у BCR,
- гидрофильный у AT

«Шарнирный» участок (Hinge) придает молекуле антитела гибкость



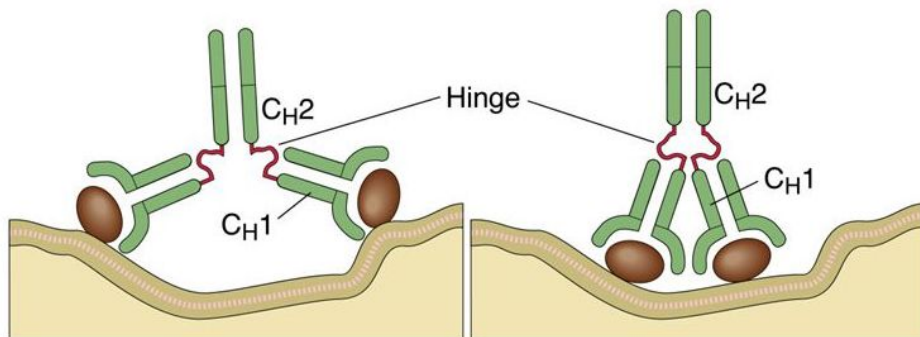
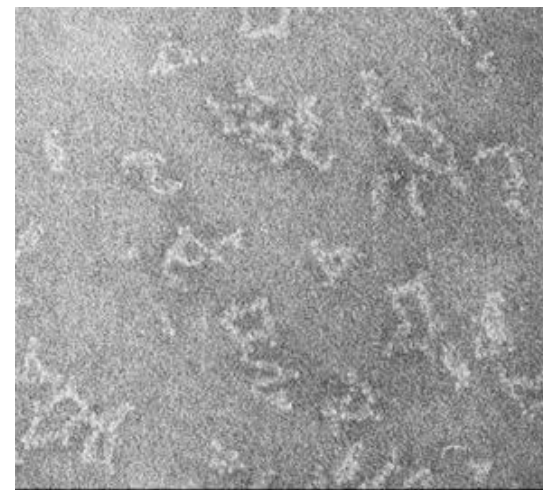
A Widely spaced cell surface determinants



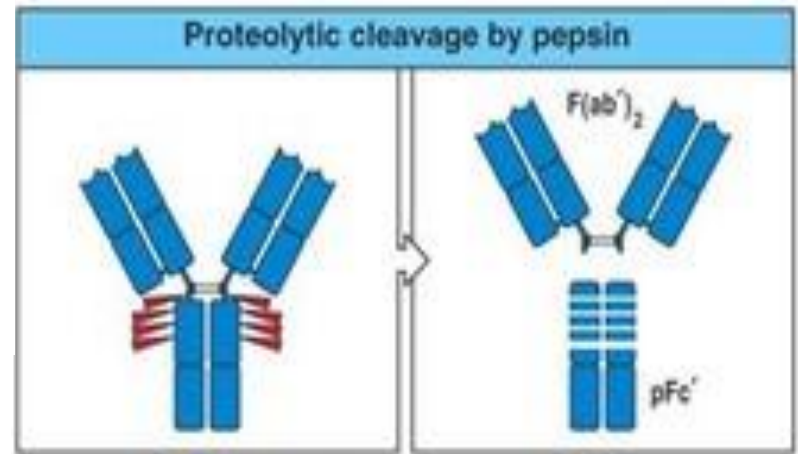
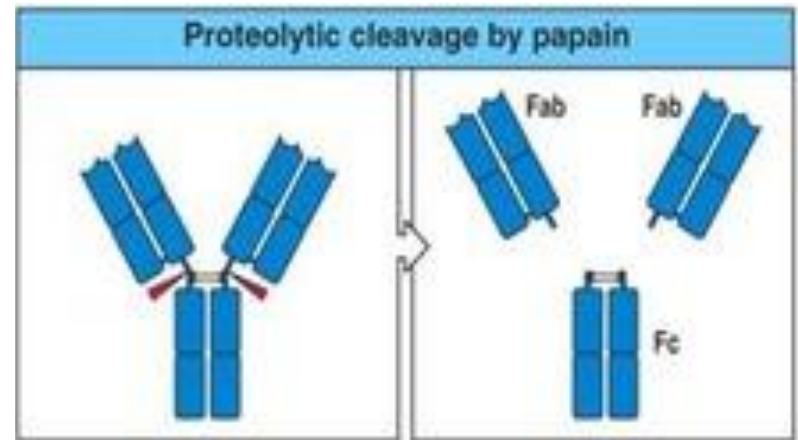
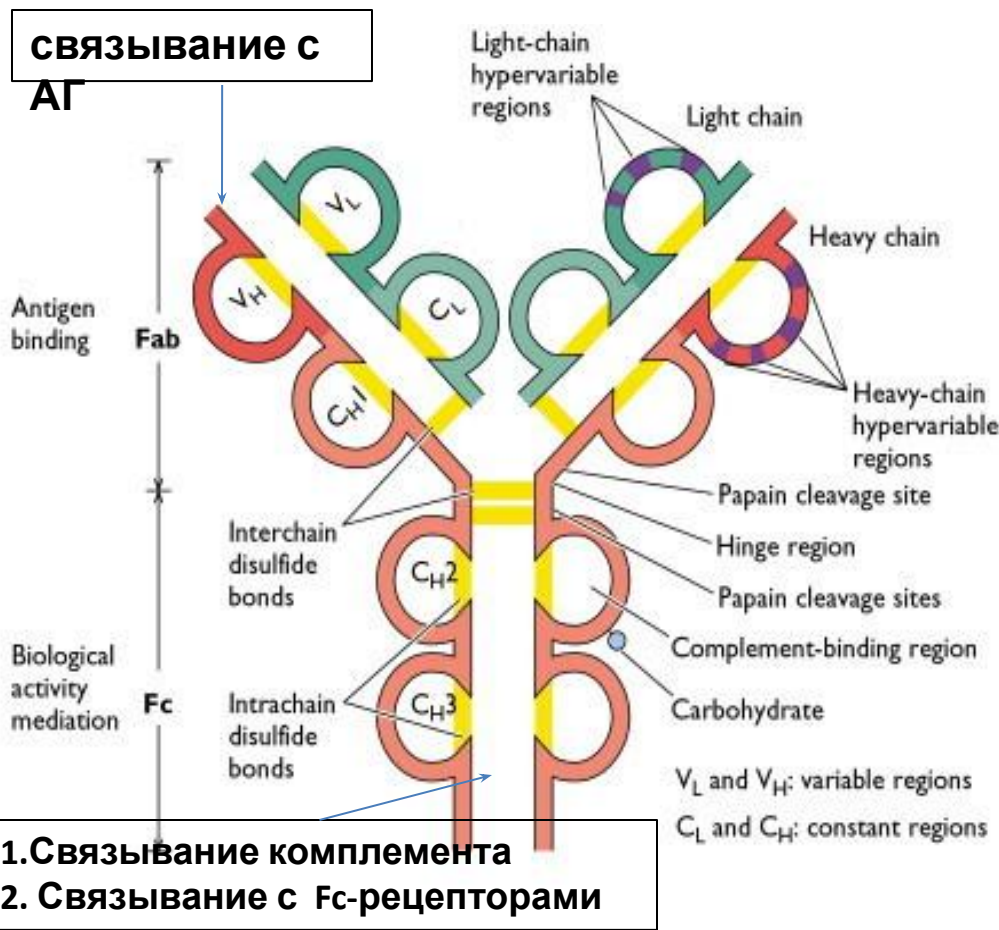
B Closely spaced cell surface determinants



Образование иммунных комплексов в случае димерного



Тяжелые и легкие цепи ИГ состоят из константных и переменных ИГ-доменов. ИГ домены (около 110 а.к.) имеют похожую структуру. ИГ – результат последовательных дупликаций предкового гена, кодирующего ИГ-домен



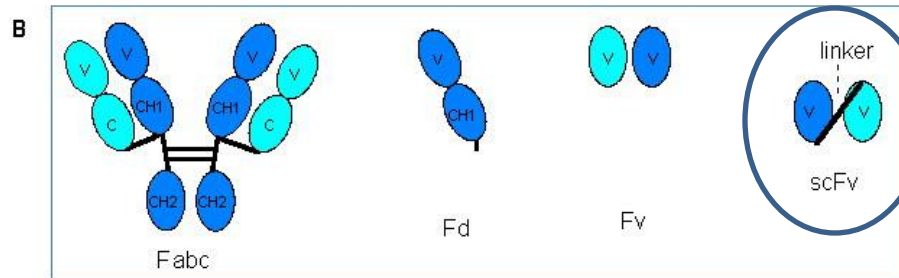
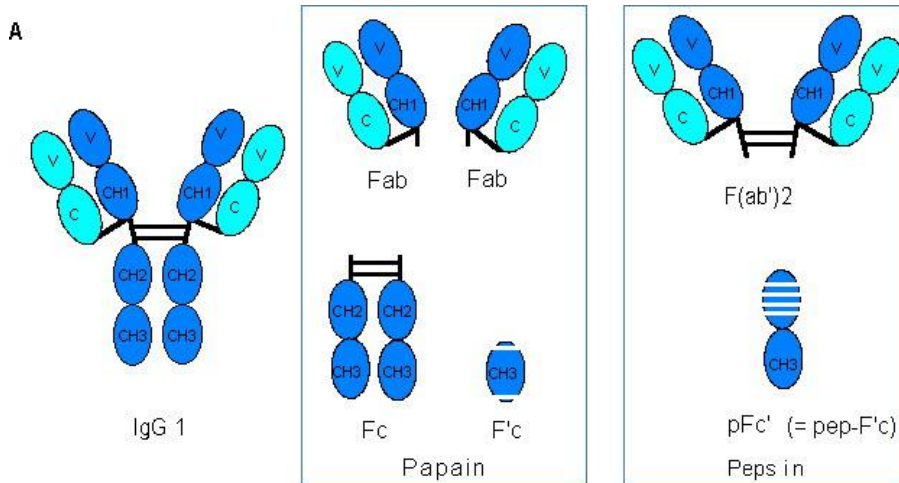
Fab – **F**ragment **a**ntigen **b**inding
Fc – **F**ragment **c**rystallizable

F(ab)₂ антитела – нет связывания с клетками через Fc-рецепторы, нет запуска эффекторных функций, небольшой – лучшая проницаемость в тканях

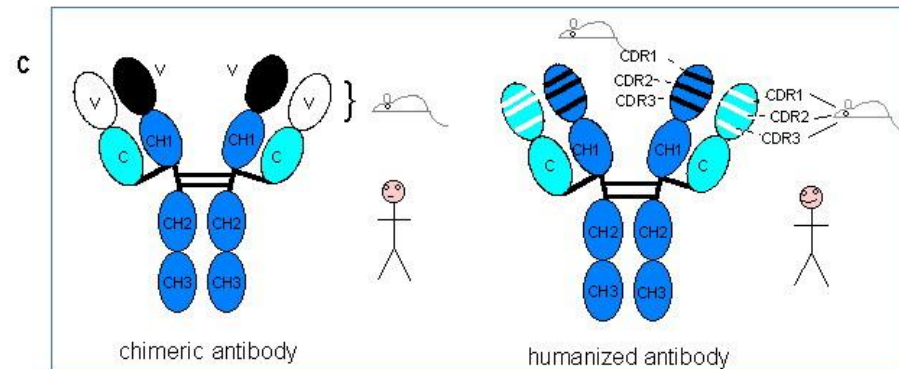


лучший результат в иммуноцитохимическом окрашивании /использование в терапии

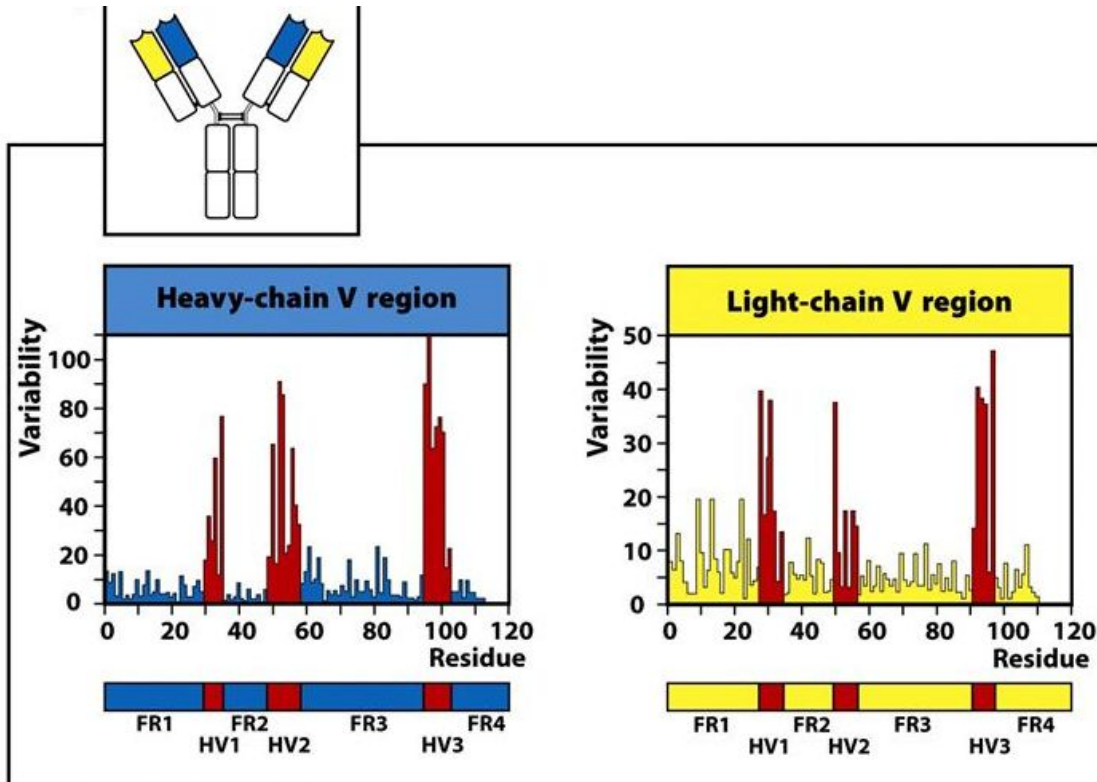
scFv-антитела в составе иммунотоксинов или в виде CAR (chimeric antigen receptors) используются для иммунотерапии опухолей



scFv – single chain Fragment variable, продукт технологии рекомбинантных АТ, linker – для ковалентного связывания V-домена тяжелой и легкой цепи и для правильного фолдинга молекулы



Взаимодействие молекулы антитела с антигеном



Сравнение
аминокислотных
последовательностей
нескольких десятков
антител

Вариабельность аминокислот не «размазана» по V-области молекулы ИГ, а сосредоточена в трех фиксированных по позиции гипервариабельных участках (HV1, HV2, HV3) V-области L- и H-цепей. Гипервариабельные участки разделены рамочными (FR – framework), менее вариабельными участками.

Взаимодействие молекулы антитела с антигеном

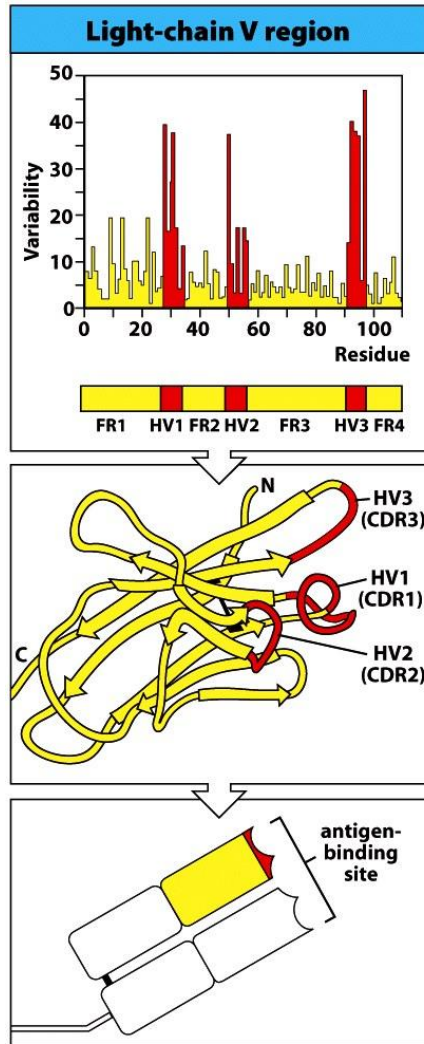
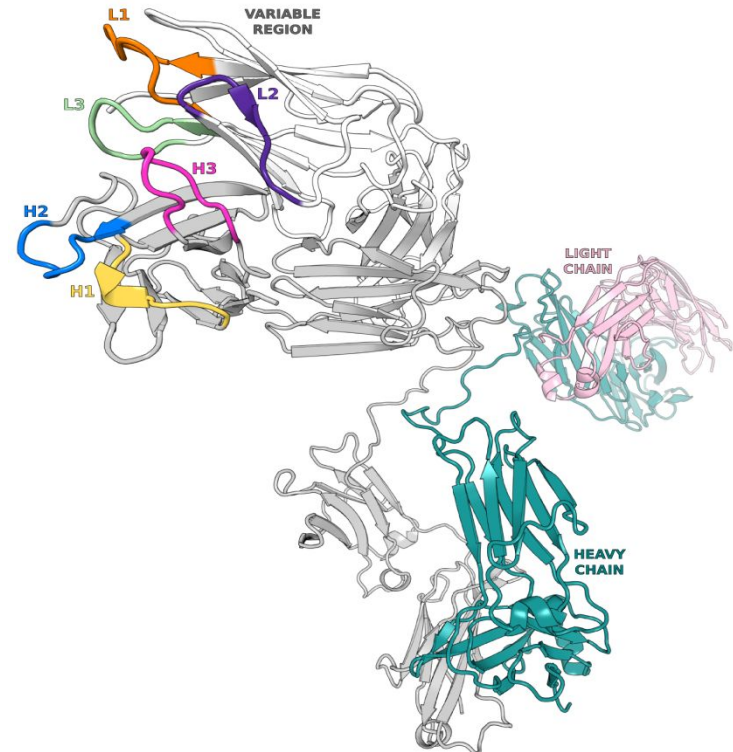


Figure 4.8 The Immune System, 3ed. (© Garland Science 2009)

Гипервариабельные области HV1, HV2, HV3 образуют три CDRs (complementarity-determining regions) на концах петель V_L и V_H -доменов. CDR3 – наиболее вариабельный. При объединении V-областей тяжелой и легкой цепи образуют на конце каждой «руки» молекулы ИГ поверхность АГ-связывающего сайта, комплементарную к поверхности АГ. АГ-специфичность определяется одновременно CDRs как тяжелой, так и легкой цепи. CDRs – один из источников комбинаторного разнообразия АТ, образуемого в данном случае разными комбинациями V-доменов тяжелых и легких цепей.



Задача АТ – распознать и связаться с патогеном (АГ).

Как АТ делает это? – Распознавая комплементарную поверхность

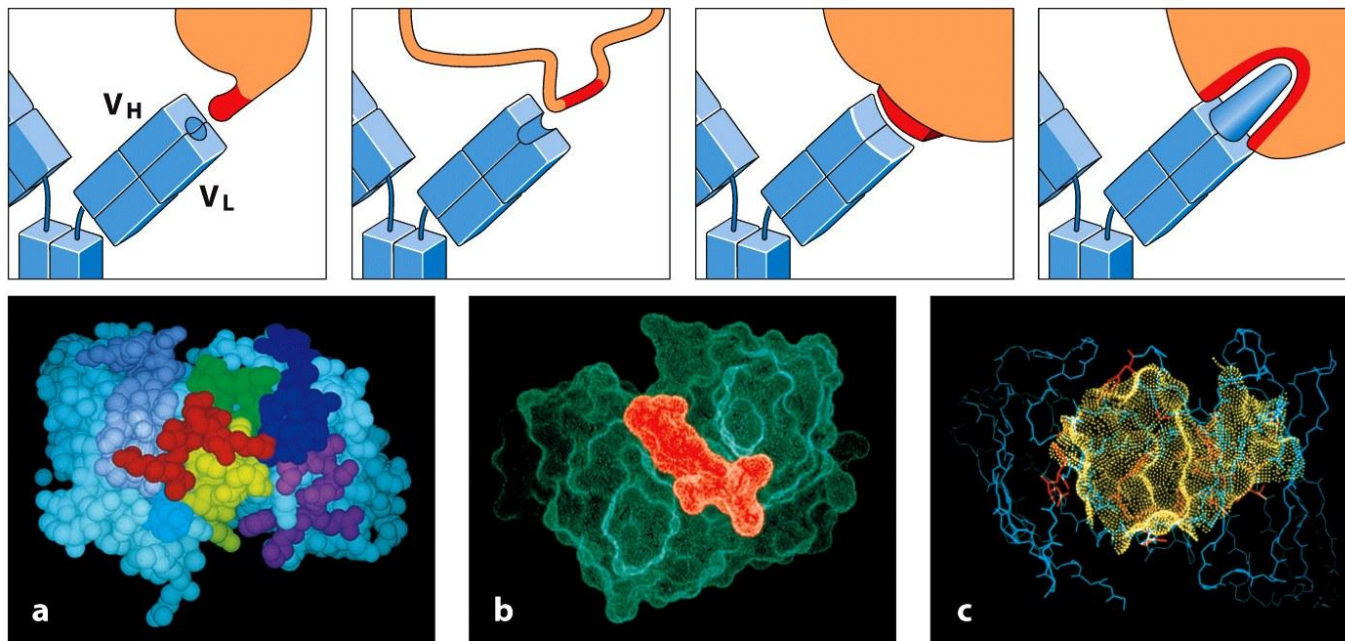
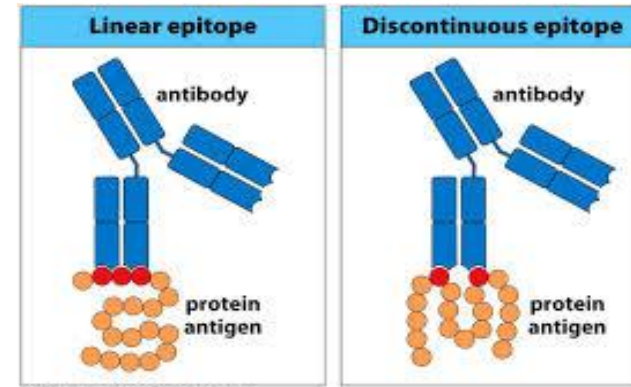
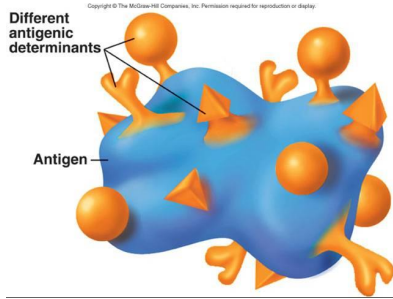


Figure 4.11 The Immune System, 3ed. (© Garland Science 2009)

Поверхность молекулы АТ, образованная CDRs, имеет форму, комплементарную форме «своего» АГ. В случае совпадения этих форм АГ и АТ происходит их связывание. Для небольшого АГ это может быть «карман» или «желоб», для большего – протяженная поверхность или «шишка».

Молекула АТ распознает небольшую область на поверхности антигена.

Участок АГ распознаваемый молекулой АТ – антигенная детерминанта или **эпитоп**.



Эпитопы – белковые (до 22 аминокислот), полисахаридные, гликопротеиновые, липопротеиновые.

Взаимодействие АГ-АТ – не ковалентное и обратимое (высокое содержание соли, рН, детергенты) образованное электростатическими, гидрофобными взаимодействиями, водородными связями, силами Ван-дер-Ваальса. Менее сильное, чем ковалентное.

Аффинность антитела – сила взаимодействия отдельного эпитопа со своим АГ-связывающим сайтом. K_A = affinity constant

$[Ab]$ = molar concentration of unoccupied binding sites on the antibody

$[Ag]$ = molar concentration of unoccupied binding sites on the antigen

$[Ab-Ag]$ = molar concentration of the antibody-antigen complex

$$K_A = \frac{[Ab-Ag]}{[Ab][Ag]}$$

Авидность антитела – кооперативная сила всех аффинных взаимодействий комплекса АГ-АТ, определяется а) аффинностью АГ-АТ, б) валентностью АГ и АТ, в)

пространственной структурой АГ, создающей стерические препятствия для создания комплекса. Аффинно-очищенные антитела (использование обратимости связывания АГ-АТ) – the best!

Генерирование разнообразия иммуноглобулинов

Потенциальный репертуар иммуноглобулинов или число вариантов специфичностей антител в организме человека – 10^{11} вариантов или больше.

В реальном организме – меньше, ограничен количеством В-клеток и историей встречи с антигенами.

Как генерируется это разнообразие?

Две теории:

- 1) «Зародышевая» - Все варианты наследуются множественными зародышевыми генами.
- 2) «Соматическое разнообразие» - Генерируется из небольшого числа наследуемых вариантов последовательностей V-областей в ходе индивидуального развития В-клетки.

Разнообразие ИГ генерируется из довольно большого количества наследственных вариантов, кодирующих сегменты V-области, которые подвергаются перестройке при сборке гена, кодирующего V-область.

Number of gene segments in human immunoglobulin loci			
Segment	Light chains		Heavy chain
	κ	λ	H
Variable (V)	31–36	29–33	38–46
Diversity (D)	0	0	23
Joining (J)	5	4–5	6
Constant (C)	1	4–5	9

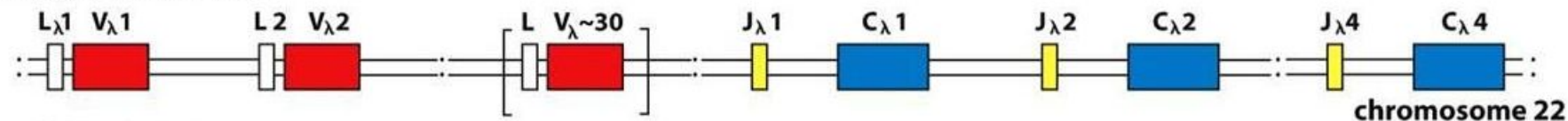
V_L ген – V+J сегменты
 V_H ген – V+D+J сегменты

Организация ИГ-генов тяжелых и легких цепей в геноме человека .

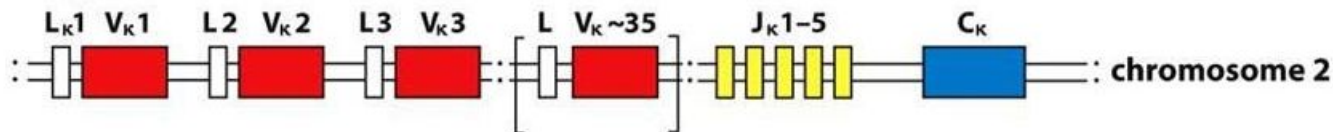
В ДНК не-В-клеток множественные генные сегменты V-области пространственно удалены от генов C-области

Immunoglobulin heavy- and light-chain loci

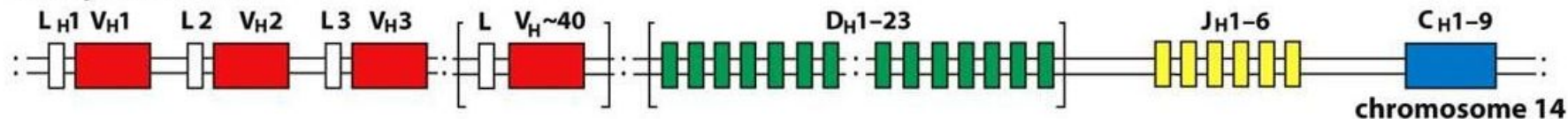
λ light-chain locus



κ light-chain locus

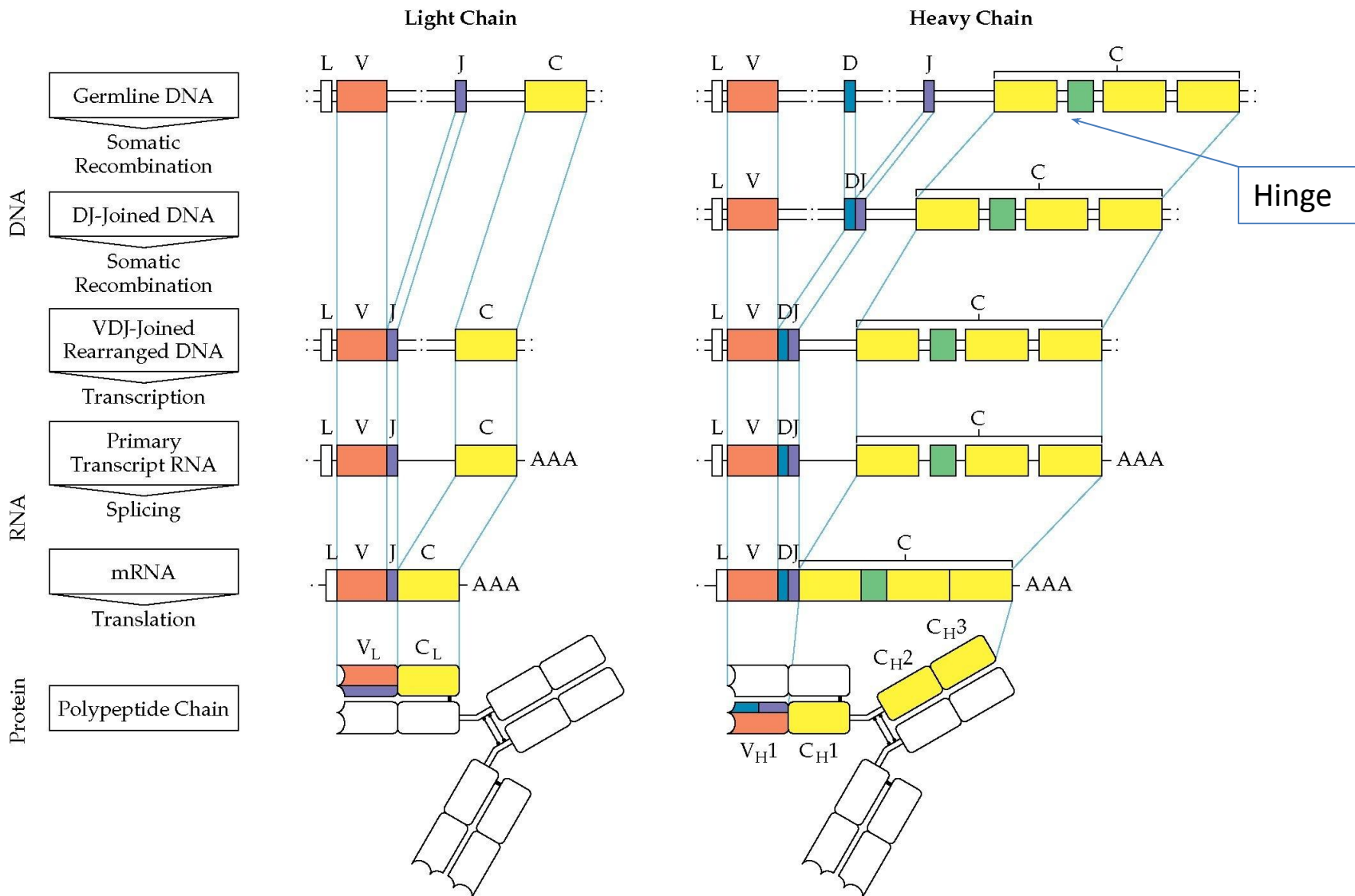


heavy-chain locus



V – variable, J – joining, D – diversity, C - constant

Гены иммуноглобулинов перестроены в В-клетках, но не в остальных клетках организма. Процесс сборки V-гена из отдельных сегментов в В-клетке – соматическая рекомбинация.



Мыши *RAG1*- или *RAG2*- = SCID (severe combined immune deficiency) – для ксено-трансплантации

Правильная перестройка V-, D- и J-сегментов определяется консервативными некодирующими последовательностями RSS, фланкирующими эти сегменты

Recombination Signal Sequences (RSSs) Flank Rearranging Gene Segments

RSS=heptamer, spacer and nonamer


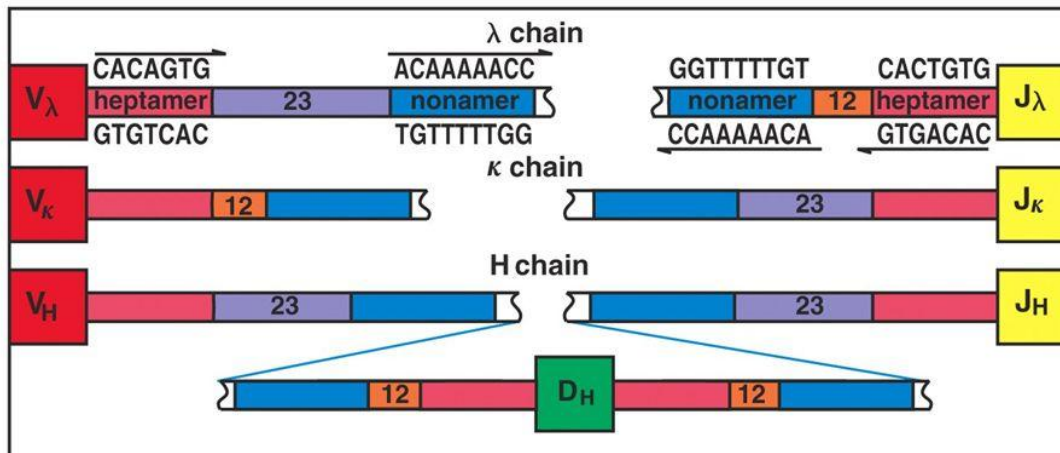



Figure 4-5 Immunobiology, 6/e. (© Garland Science 2005)

Правило **12/23**:
Сегмент со
спейсером 12 может
объединиться
только с сегментом,
имеющим спейсер
23.

V(D)J recombinase – комплекс ферментов для V(D)J-рекомбинации. **RAG-1** and **RAG-2** – специфичные для лимфоидных клеток ферменты

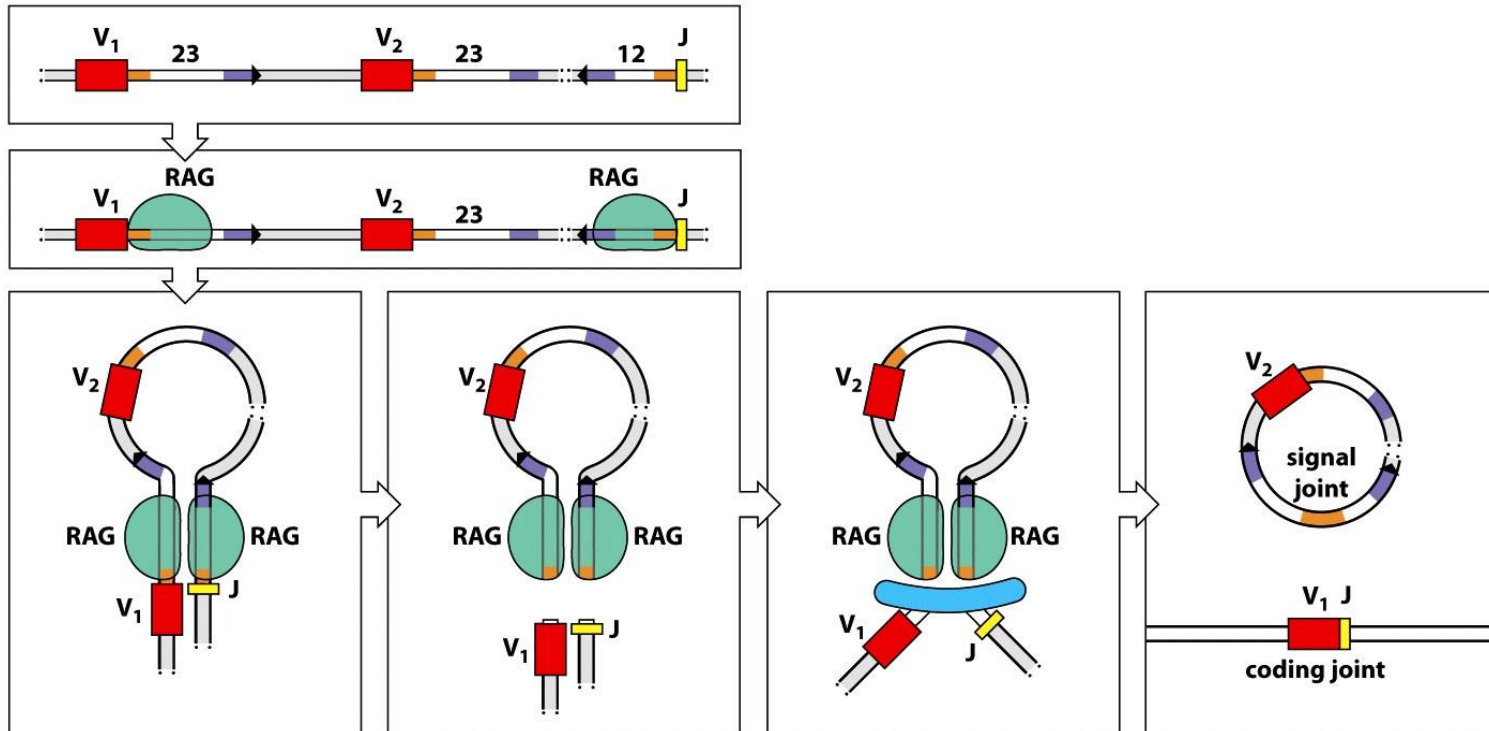

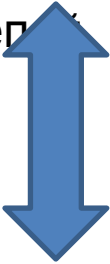


Figure 4.20 The Immune System, 3ed. (© Garland Science 2009)

V(D)J recombinase – комплекс ферментов для V(D)J-рекомбинации. **RAG-1 and RAG-2** – специфичные для лимфоидных клеток ферменты, принадлежат к комплексу **V(D)J recombinase**, начинают процесс рекомбинации. RAG-1 узнает нонамер RSS + эндонуклеазная активность.

Мыши *RAG1*- или *RAG2*- = **SCID (severe combined immune deficiency)**, нарушение развития Т- и В-лимфоцитов – для ксено-трансплантации опухолей.

Четыре главных процесса генерируют разнообразие молекул антител:

1. Экзон V-области образуется от комбинации двух V-J (L-цепи) или трех V-D-J (H-цепи) наследуемых генных сегментов, существующих не в одном, а в нескольких вариантах  **комбинаторное разнообразие.**
2. **Junctional diversity** – случайное добавление или удаление нуклеотидов в процессе рекомбинации при образовании экзона V-области (в CDR3, который кодируется стыком V-и J- сегментов)
3. Разные комбинации наследуемых вариантов V-областей тяжелых и легких цепей  Первичный репертуар ИГ (костный мозг)
Вторичное разнообразие ИГ вторичные лимфоидные органы)
4. **Соматический гипермутагенез** вносит точечные мутации в перестроенные функциональные гены V-областей в активированных В-клетках зародышевых центров и обуславливает **аффинное созревание (увеличение аффинности)** популяции антител к данному АГ.

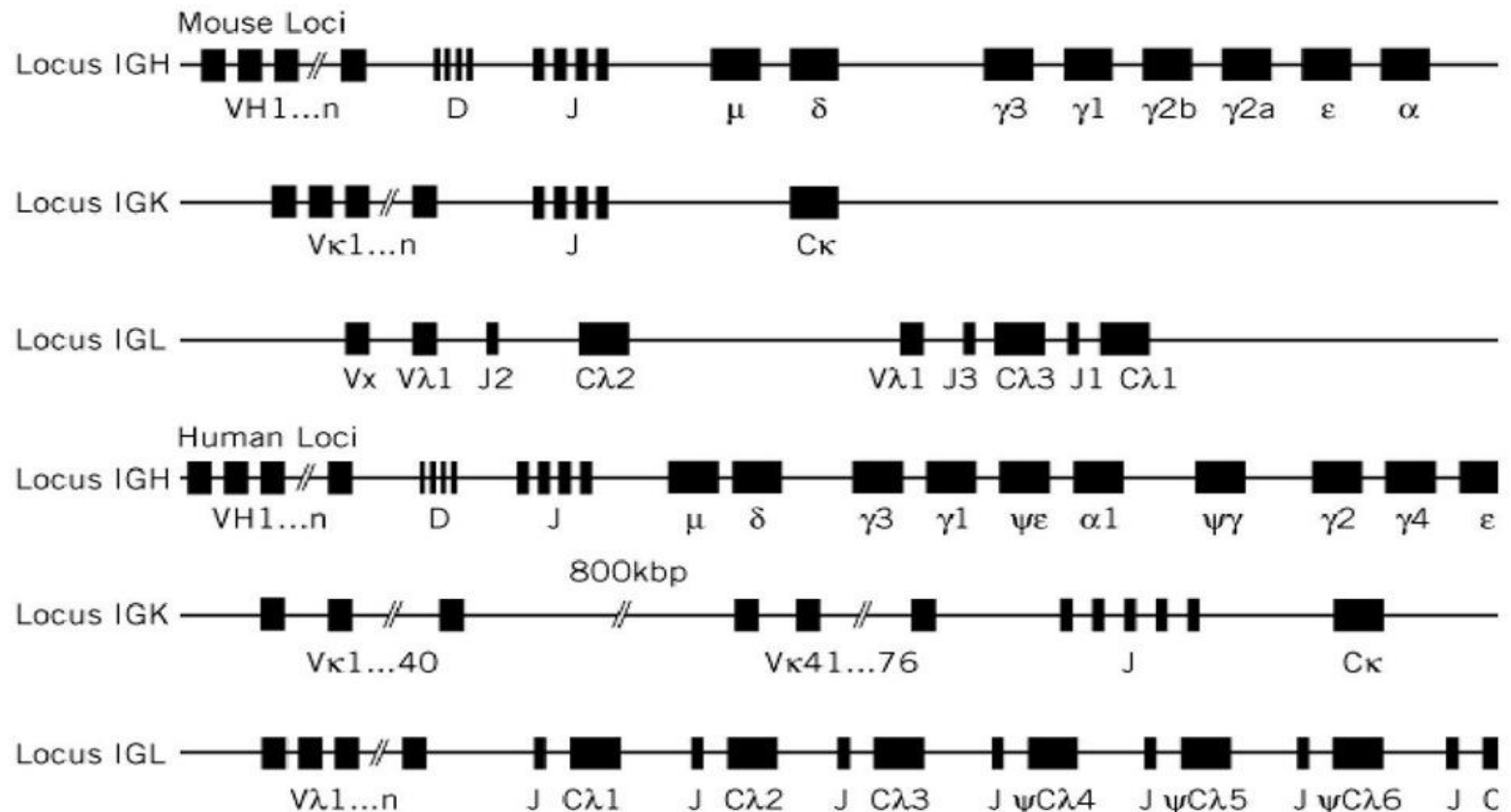
+ **5. Класс-переключение**

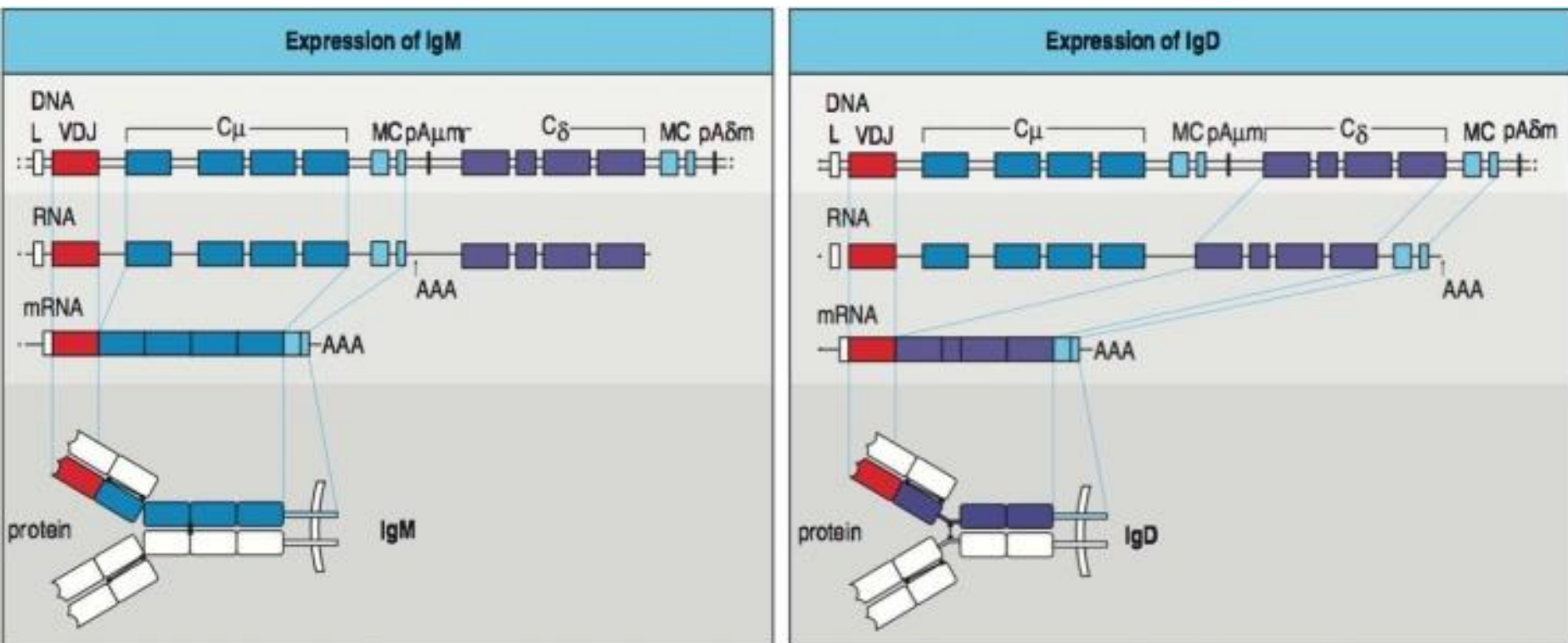
– разнообразие C-областей = функциональное разнообразие антител

Структурные вариации в С-области иммуноглобулинов

Один и тот же V_H экзон может ассоциироваться с различными C_H генами в ходе иммунного ответа.

$V(D)J$ перестройка в костном мозге, далее – IgM на поверхности незрелой В-клетки в виде BCR, на поверхности зрелой – IgM+IgD+, далее после стимуляции АГ в активированной В-клетке – соматическая рекомбинация = **класс-переключение** на другие изотипы.



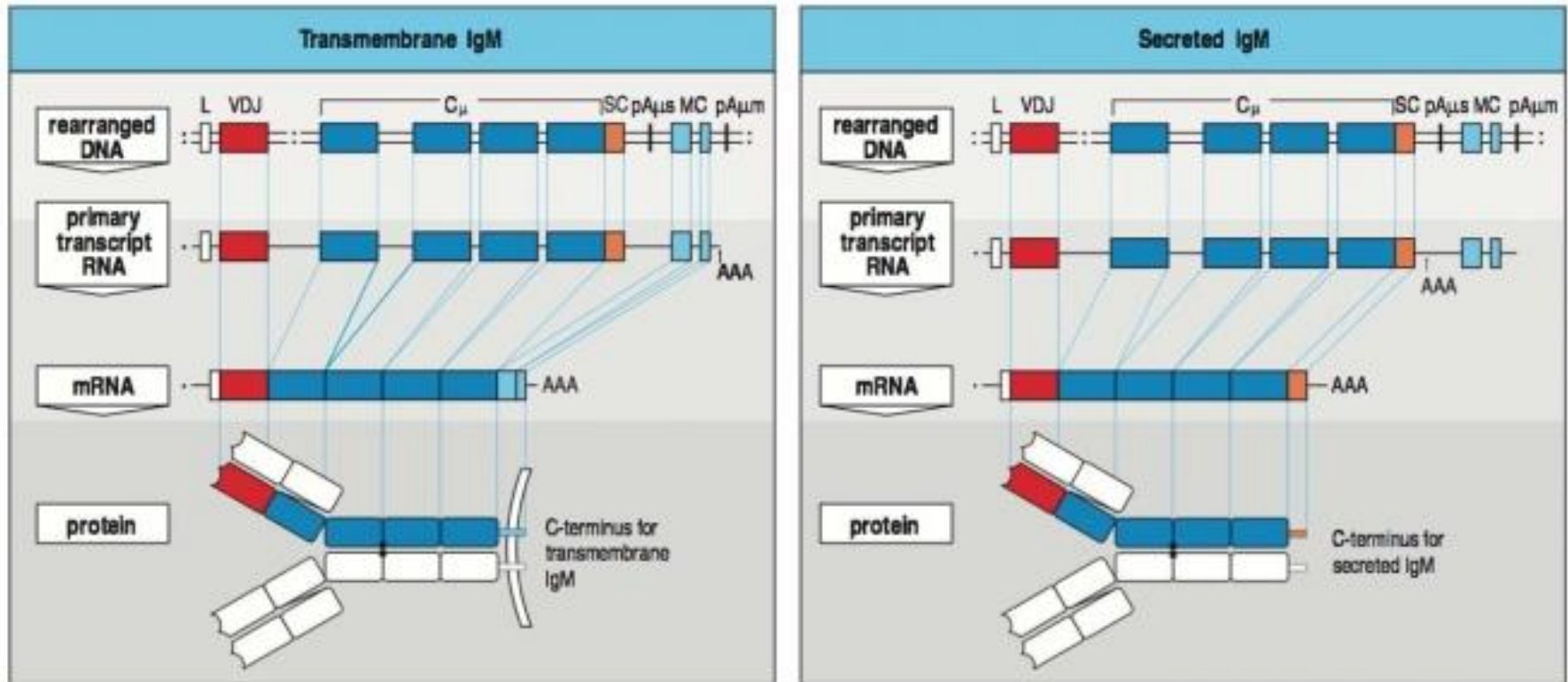


Ко-экспрессия IgM и IgD на поверхности зрелой В-клетки. Это – **не** класс-переключение.

Это – альтернативный сплайсинг.

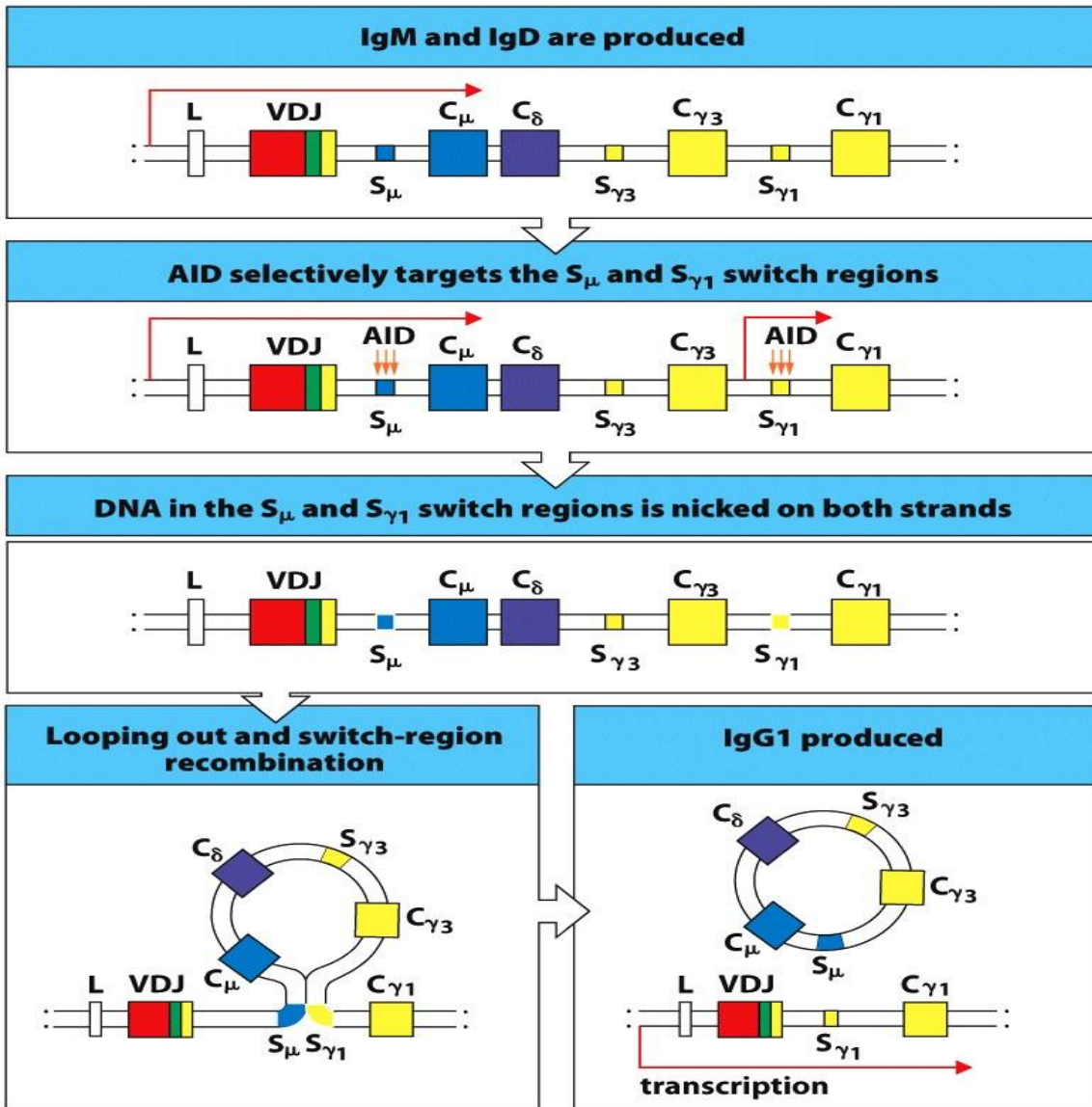
В незрелой (immature) В-клетке – только IgM, в зрелой – IgM+IgD. Считывается один **длинный первичный транскрипт** с обоих экзонов - Cμ и Cδ. В зависимости от сайта рестрикции и полиаденилирования образуется mRNA для IgM или для IgD – процесс регулируется в ходе дифференцировки В-клетки. Далее при активации В-клетки - или класс-переключение на IgG, IgA или IgE, или прекращение транскрипции IgD и образование секреторируемой формы IgM.

Трансмембранная и секретируемая форма ИГ появляются за счет **альтернативного сплайсинга** первичного транскрипта тяжелой цепи.



Каждый изотип может быть в виде мембранной и секретируемой формы. У мембранной формы – гидрофобный трансмембранный домен из 25 а.к. на С-конце (кодируется экзоном MC), у секретируемой – гидрофильный домен (SC-экзон). Выбор формы (мембранной или секретируемой зависит от выбора сайта polyA, по которому проходит расщепление и полиаденилирование РНК. При дифференцировке В-клетки в плазматическую – меньше мембранной формы, больше – секретируемой, процесс – регулируемый.

Класс-переключение изотипов иммуноглобулинов



Происходит в **активированной АГ В-клетке** через негомологичную рекомбинацию ДНК с **безвозвратной потерей** участка ДНК. В интронах – switch regions с повторяющимися консервативными последовательностями. Фермент **AID (Activation-Induced Cytidine Deaminase)** экспрессируется только в активированных В-клетках, режет ДНК (одноцепочечную) в switch regions, кусок ДНК с C_μ и C_δ делетируется из хромосомы, замещаясь на экзоны C_γ, C_α или C_ε. В-клетка продуцирует только один из этих изотипов в каждый момент времени. **AID** – также инициатор процесса соматического мутагенеза в активированных В-клетках

Figure 4.30 The Immune System, 3ed. (© Garland Science 2009)

Эффекторные свойства разных классов иммуноглобулинов определяются их константными областями – способностью связываться с Fc-рецепторами и КОМПЛЕМЕНТОМ

Function	IgA1 IgA2							
	IgM	IgD	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4	IgA	IgE
Neutralization	+	-	+++	+++	+++	+++	+++	-
Opsonization	-	-	+++	*	++	+	+	-
Sensitization for killing by NK cells	-	-	++	-	++	-	-	-
Sensitization of mast cells	-	-	+	-	+	-	-	+++
Activation of complement system	+++	-	++	+	+++	-	+	-

Property	IgM	IgD	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4	IgA	IgE
Transport across epithelium	+	-	-	-	-	-	+++ (dimer)	-
Transport across placenta	-	-	+++	+	++	++	-	-
Diffusion into extravascular sites	+/-	-	+++	+++	+++	+++	++ (monomer)	+
Mean serum level (mg/ml)	1.5	0.03	9	3	1	0.5	2.5	5×10^{-5}

Figure 4.32 The Immune System, 3ed. (© Garland Science 2009)

The physical properties of the human immunoglobulin isotypes

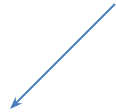
		Immunoglobulin								
		IgG1	IgG2	IgG3	IgG4	IgM	IgA1	IgA2	IgD	IgE
Heavy chain		γ_1	γ_2	γ_3	γ_4	μ	α_1	α_2	δ	ϵ
Molecular weight (kDa)		146	146	165	146	970	160	160	184	188
Serum level (mean adult mg ml ⁻¹)		9	3	1	0.5	1.5	3.0	0.5	0.03	5×10^{-5}
Half-life in serum (days)		21	20	7	21	10	6	6	3	2

Figure 4-17 part 1 of 2 Immunobiology, 6/e. (© Garland Science 2005)

Образует
пентамеры
при секреции

Образует димеры
при секреции

Антитела – важный инструмент в биологическом эксперименте, медицинской диагностике и терапии.

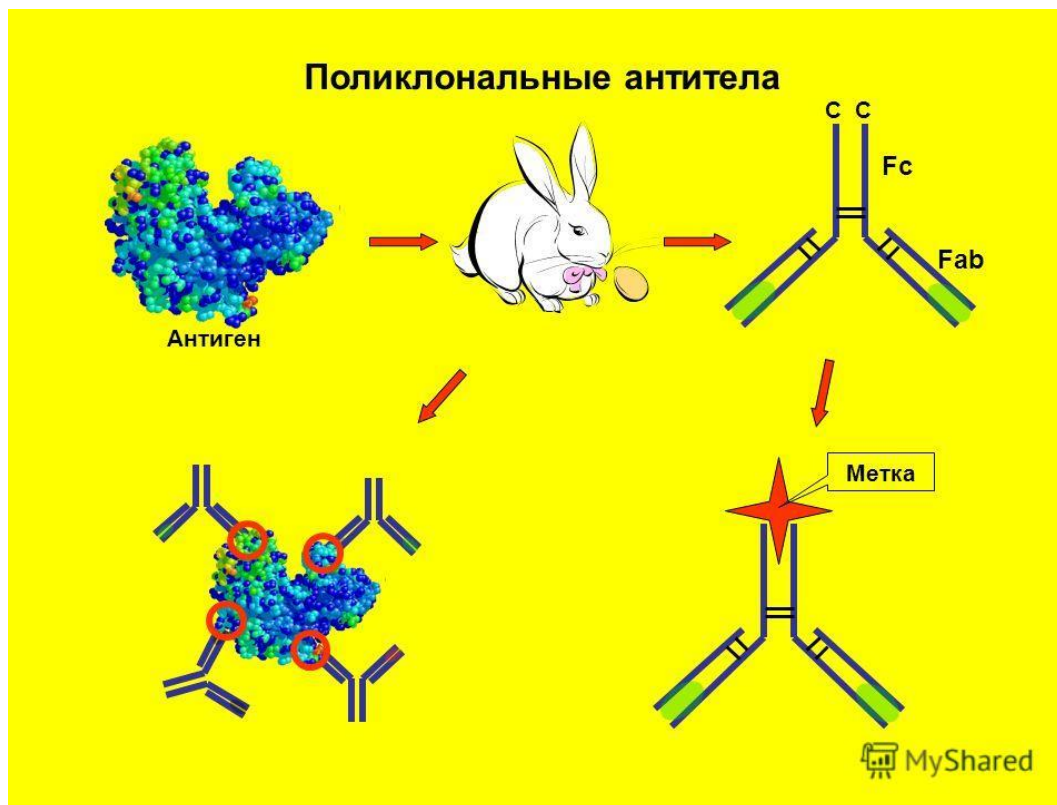


Поликлональные
антитела



Моноклональные
антитела

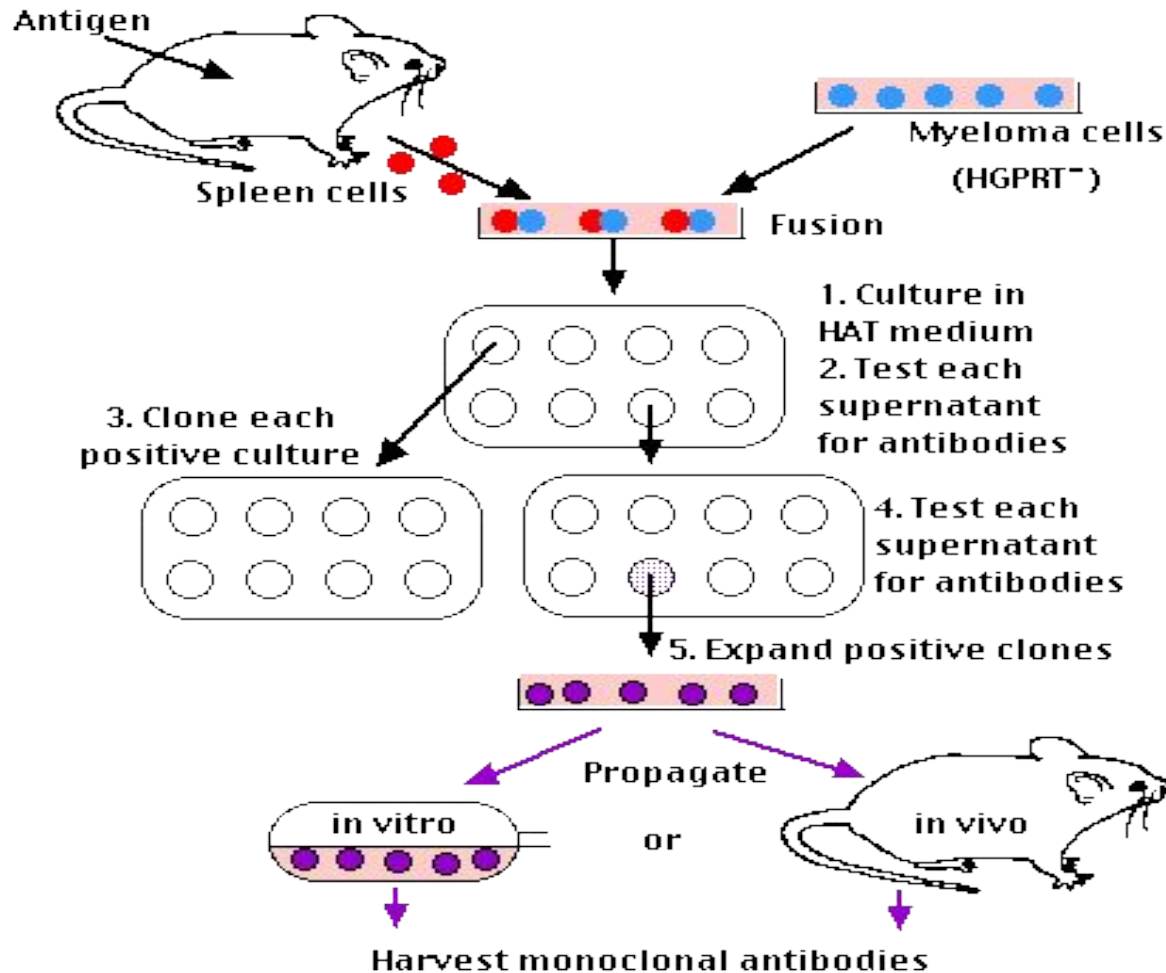
Получение кроличьих поликлональных антител



Достоинства – простой, быстрый и дешевый способ получения антител

Недостатки – гетерогенность препарата антител (специфичность к разным эпитопам, разные изотипы), невозможность стандартизовать препарат и обеспечить его воспроизводимость в точно таком же виде, конечность источника антисыворотки (один кролик)

Получение моноклональных антител



Достоинства – гомогенный препарат антител с одной специфичностью к одному эпитопу и одного изотипа, неограниченность источника.

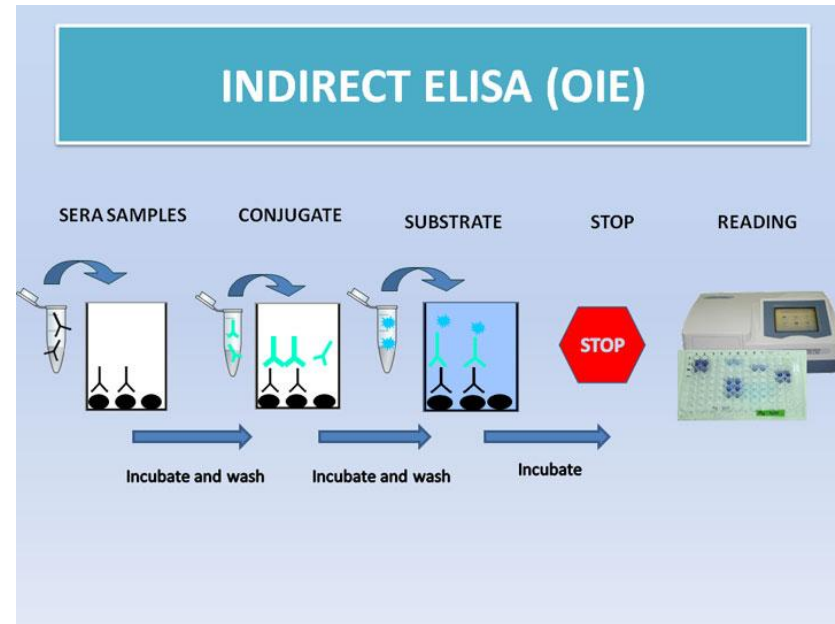
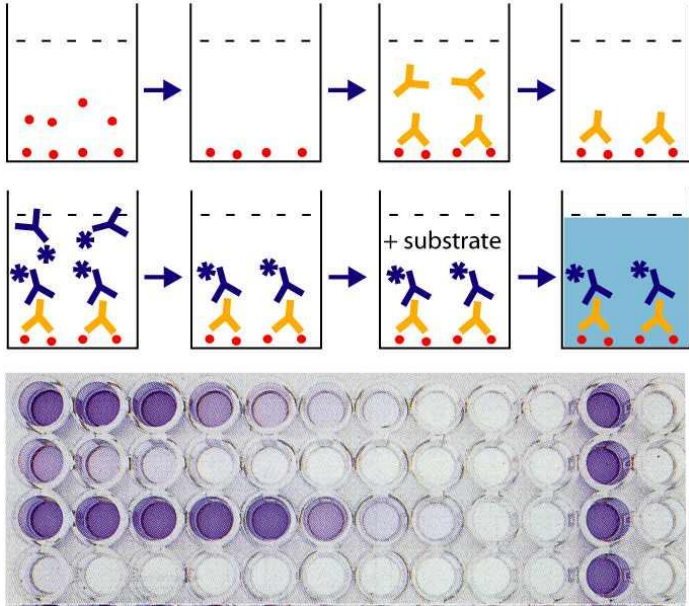
Недостатки - высокая цена первоначального получения, иногда – низкая аффинность и ограниченная работоспособность в разных методах иммуноанализа

Методы иммуноанализа:

1. ELISA (ИФА)
2. Иммуноблоттинг – dot-blot (дот-блот), Western blotting
3. Иммуногистохимия + иммуноцитохимия
4. Flow Cytometry

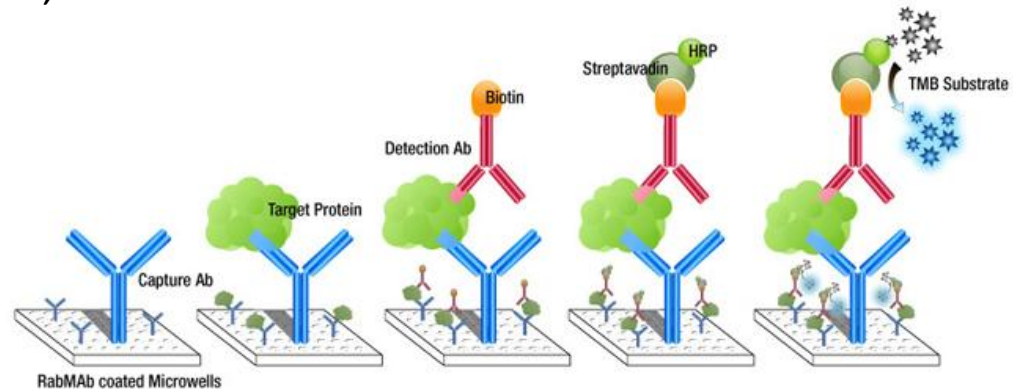
ИФА – **количественный** метод для определения антигена или антитела в жидком образце (например, в сыворотке крови)

Непрямой ИФА

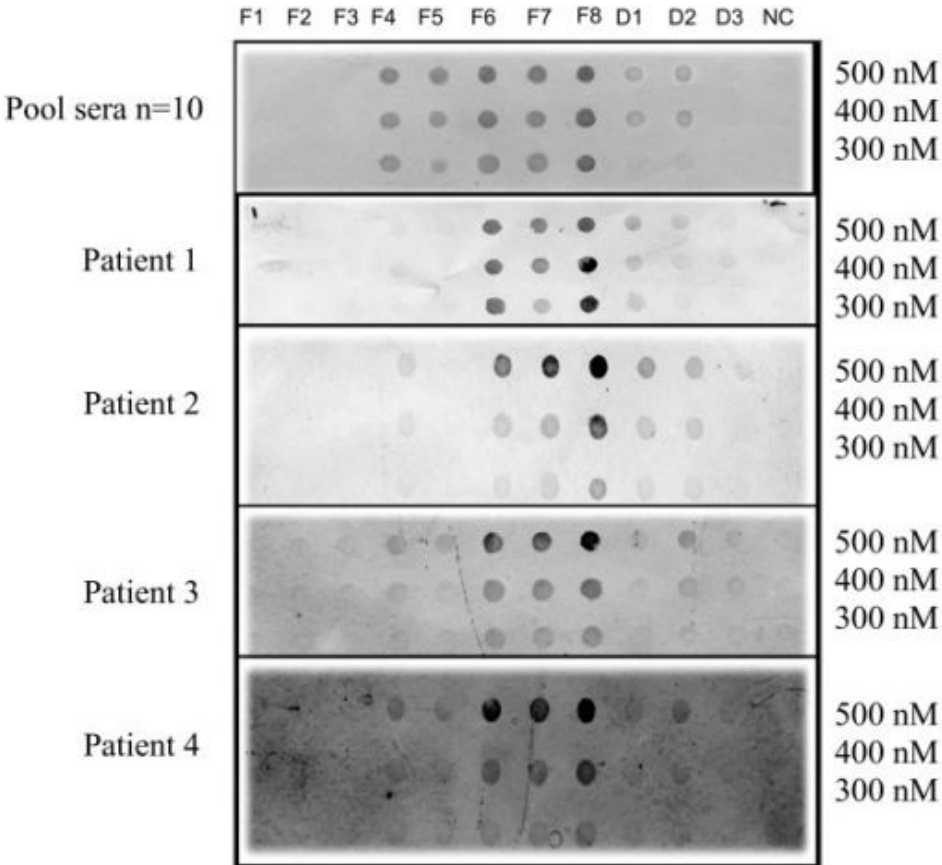


Ферменты – пероксидаза хрена,
щелочная
фосфатаза

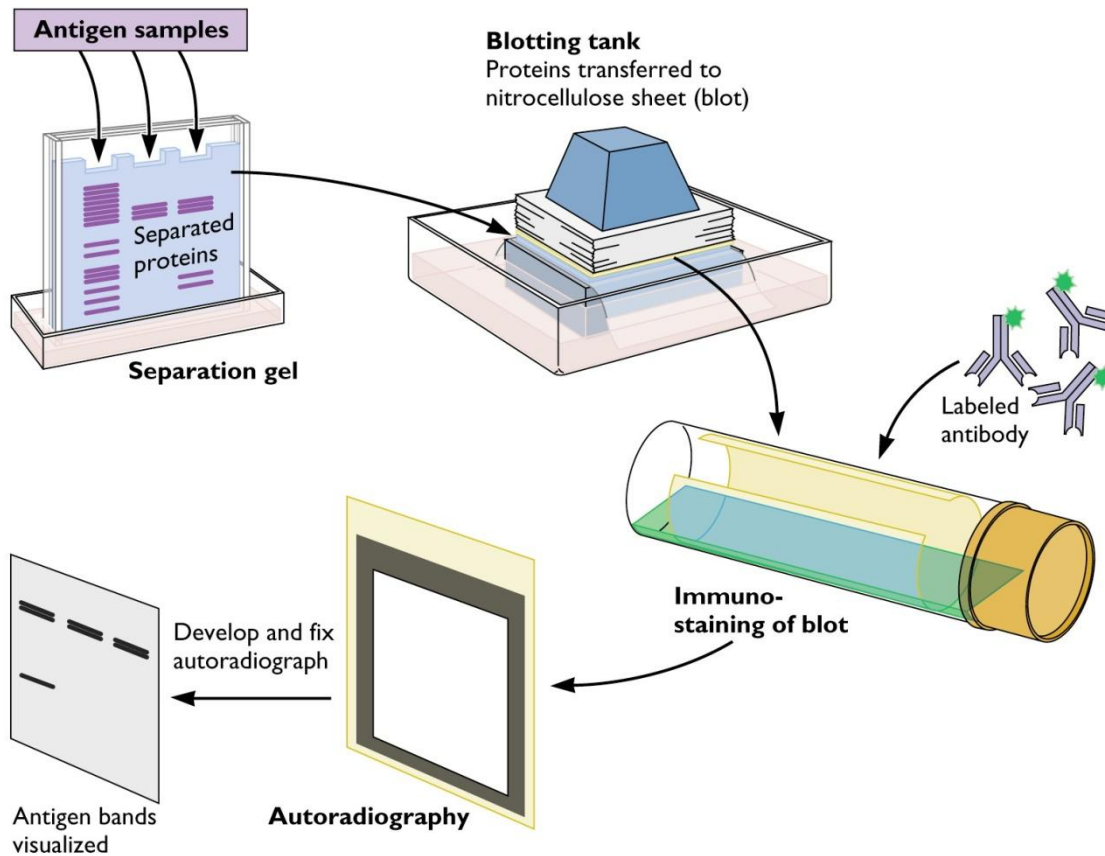
Sandwich ELISA



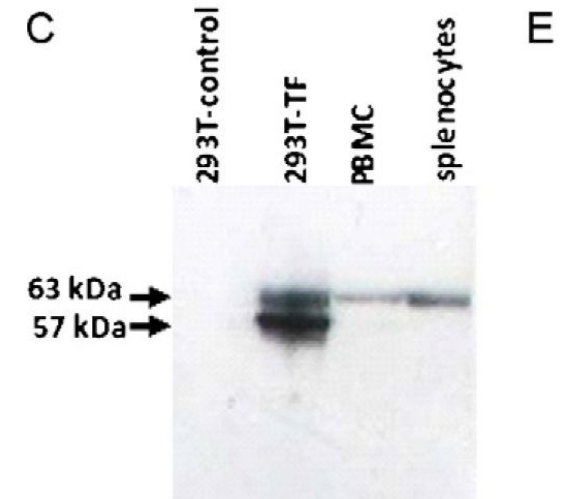
Dot-blot анализ на нитроцеллюлозной мембране



Western blotting – наиболее точный метод иммуноанализа целевого белка



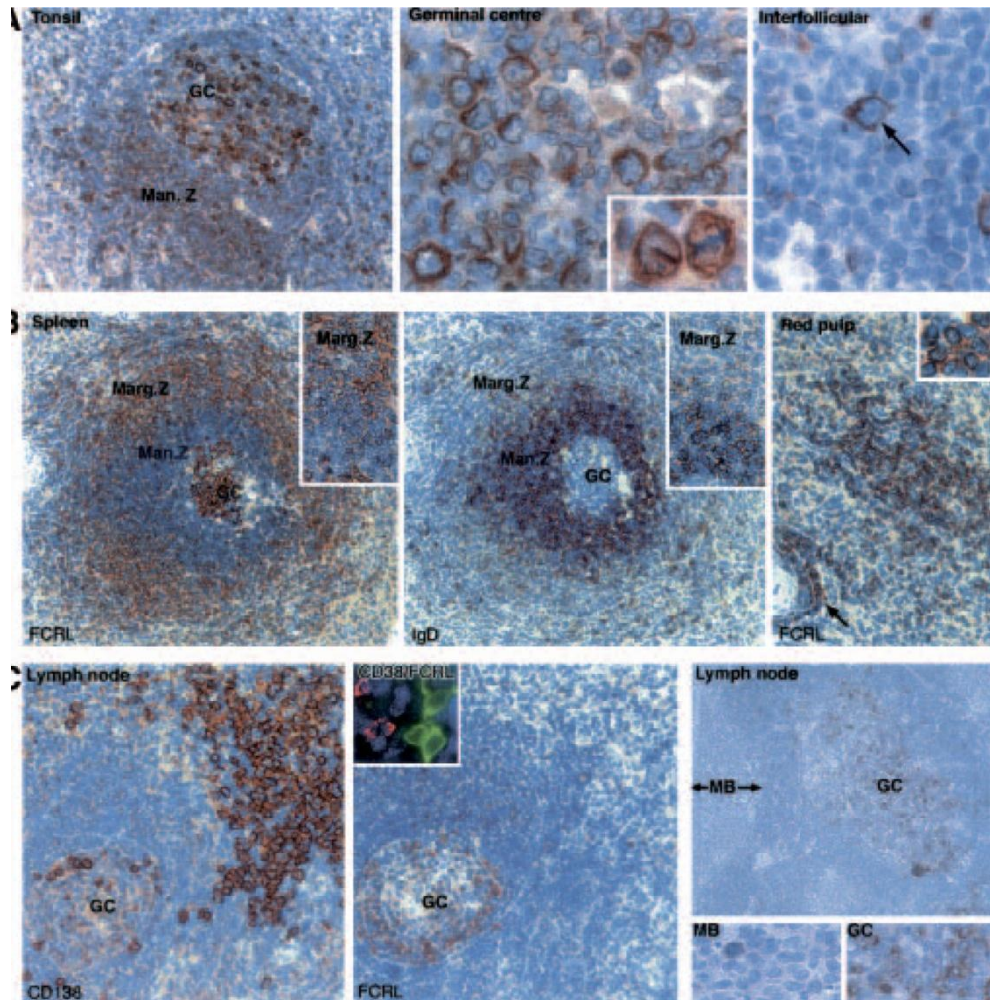
Иммуноблоттинг с использованием моноклональных антител к FCRL6 человека



FCRL6 63 kDa
обнаруживается в клетках селезенки и лейкоцитах человека. *Kulemzin et al., Immunol. Lett., 2011*

Иммуногистохимическое окрашивание

- Для локализации белка в тканях – Tissue arrays
- Для локализации белка внутри тканевого компартмента

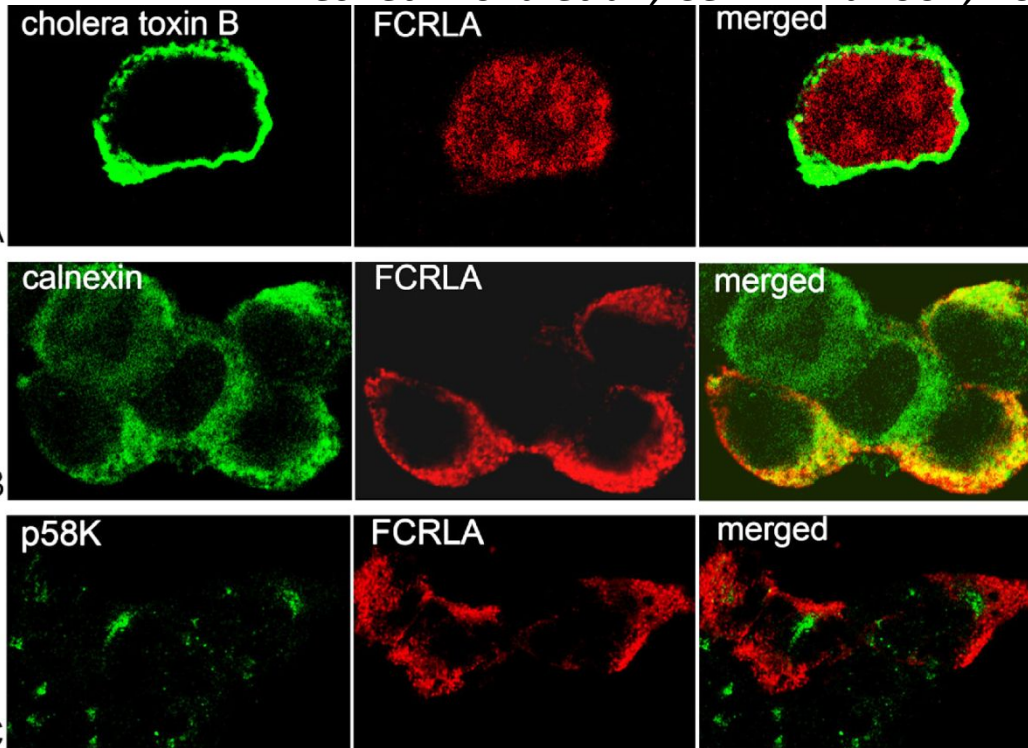


**Зародышевый цент
и маргинальная
зона – основные
места локализации
FCRLA-
экспрессирующих
клеток**
*Masir et al., Br. J.
Haematol. 2004*

Иммунофлуоресцентное окрашивание (обычно совместное окрашивание на маркерный белок)

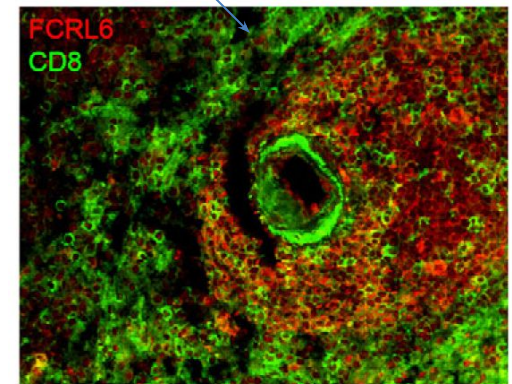
- Для локализации белка на отдельных типах клеток
- Для локализации белка во внутриклеточных компартментах

Reshetnikova et al., Cell Immunool., 2012



FCRLA человека – белок эндоплазматического ретикулума, но не мембраны и не комплекса Гольджи

Kulemzin et al., Immunol. Lett., 2011



Spleen

FCRL6 экспрессируется CD8+Т-клетками селезенки человека

Flow Cytometry and Sorting – для анализа индивидуальных клеток сразу по нескольким маркерам и для выделения гомогенных по маркеру/маркерам популяций клеток.

