

Struktura protilátek a jejich reaktivita

Štern P.

Mimořská 637/16, 190 00 Praha 9

SOUHRN

Edukační publikace popisuje strukturu protilátek, jednotlivé fragmenty, prostorovou fixaci domén, penty, úlohu disulfidických můstků, β -vláken a hypervariabilních smyček, rozdíly mezi jednotlivými imunoglobuliny a jejich izotypy. Reakce antigenu a protilátky je vysvětlována jak z hlediska komplementarity reaktantů, tak různých vazebných sil, které se na energii imunochemické vazby podílejí. Jsou uvedeny rozdíly mezi vazbou protilátky s imunogenem anebo haptenem a vlastnosti, které přispívají k imunogenicitě antigenu. Je objasněn vztah mezi afinitou a specifitou imunochemické reakce, jakož i reaktivita zárodečných a zralých protilátek.

Klíčová slova: afinita, antigen, imunoglobuliny, protilátka, specifita.

SUMMARY

Štern P.: Antibody structure and its reactivity.

The educational publication describes the antibody structure, various fragments, three-dimensional fixation of domains, the function of disulfide bridges, β -strands and hypervariable loops. It also deals with differences between individual immunoglobulins and their isotypes. The antigen-antibody reaction is interpreted in the aspect of complementarity of reactants, as well as various binding forces participating in the energy of the immunochemical bond. Differences between the antibody bond to immunogen or to hapten and characteristics supporting the immunogenicity of antigen are given as well. Both the relation between the affinity and specificity of immunochemical reaction and the reactivity of naive and mature antibodies are demonstrated.

Keywords: affinity, antibody, antigen, immunoglobulins, specificity.

Úvod

Protilátky (Abs) se používají ve všech laboratorních oborech. Chemická struktura Abs vysvětluje jejich tři funkce: přizpůsobivost vazby, specifitu vazby a biologickou aktivitu [1]. Jejich zjednodušená ypsilonová struktura nám umožňuje pochopit spíše způsob detekce při vazbě s antigenem (Ag), než to jak tato vazba vzniká, jakou má sílu a stabilitu. Abs se při vytvoření vazby do jisté míry ohýbají, ale jsou přitom poměrně stabilní, tedy struktura je fixována a současně má určitou volnost pohybu. Podívejme se podrobněji na jejich prostorovou konfiguraci. Abs neboli imunoglobuliny (Ig) jsou glykoproteiny, které mají v krátkých ramíncích Y lidského Ig lehké řetězce 211 – 217 AA κ (60 %) a λ (40 %) [2]. Řetězce κ a λ se liší sekvencí aminokyselin (AA) v oblasti konstantní domény. Variabilní oblast tvoří polovinu lehkého řetězce na konci ramínka v místě vazby s Ag. Těžké řetězce γ , α , δ mají přibližně 450 AA a ramínka jsou propojena s Fc fragmentem pomocí pantu (Fig. 1), který umožňuje ohyb krátkých ramének (jejich vzájemný úhel je 60 – 180°) a usnadňuje spojení paratopu Ab s epitopem Ag; těžké řetězce μ a ϵ mají asi 550 AA a jejich spojení s Fc fragmentem je rigidní bez pantu – proto je vytvoření vazby Ab-Ag v tomto případě o něco obtížnější [1]. Variabilní oblast tvoří čtvrtinu těžkého řetězce na konci ramínka v místě vazby s Ag. Pro fixaci struktury Ab jsou velmi významné disulfidické můstky (obvykle po 110 AA), které stabilizují domény lehkých i těžkých řetězců, jakož i penty řetězců γ , α , δ , resp. rigidní hrdlo u řetězců μ a ϵ (které mají jednu doménu navíc). Pant obsahuje prolino-vé zbytky a cystein (přibližně 12 AA) [1].

Konce Fab fragmentů umožňují imunochemickou reakci Ig (odtud jejich označení ab = antibody), zatímco Fc fragment zajišťuje biologickou aktivitu reakcí s povrchovými buněčnými receptory (označení c = crystallizable). Fragment Fc obsahuje uvnitř sacharid, a tím je blokován vůči imunochemické reakci [3]. Nicméně fragment Fc lze v Ig nahradit fragmentem bez sacharidu, který má imunochemickou reaktivitu a označuje se Fcab [4]. Tento typ bifunkčních Abs se používá jako léčiva.

V organismu je 10^7 až 10^9 fragmentů vzájemných Ag. Fab fragmenty se mohou odštěpit nad pantem papainem (vznikají jednotlivé Fab), nebo pod pantem pepsinem, kdy vznikají dimery F(ab)₂ [5]. Před imunochemickou reakcí se Ab potřebuje „rozbalit“, aby se obnažily její paratopy. Čím je molekulová hmotnost nižší, tím je obnažování, a tedy i samotná imunoreakce rychlejší. Pokud si fragmenty Fab zachovávají svou imunoreaktivitu (nazývají se fúzní proteiny), je Fc fragment při analytické imunoreakci zbytečný. V moderních soupravách jsou vyžadovány velmi krátké reakční časy (často kolem 10 min nebo i méně) a využití fúzních proteinů jako Abs se stává nutností. Pro imunoreakce s markery lze použít jako Ab fragment Fab, ale pro reakce bez markerů potřebujeme dimer F(ab)₂, aby vznikla makrostruktura a výsledný produkt mohl precipitovat z roztoku (Fig. 2). Cizí Abs mohou při imunoreakci interferovat buď tak, že stericky blokují přístup k paratopu sledované Ab, nebo se mohou na tento paratop navázat, a tím zabránit žádoucí vazbě Ab-Ag.

Komplementaritu Ab při reakci s Ag určují tři hypervariabilní oblasti CDR (complementary determining region) pro variabilní část lehkého řetězce a tři hyperva-

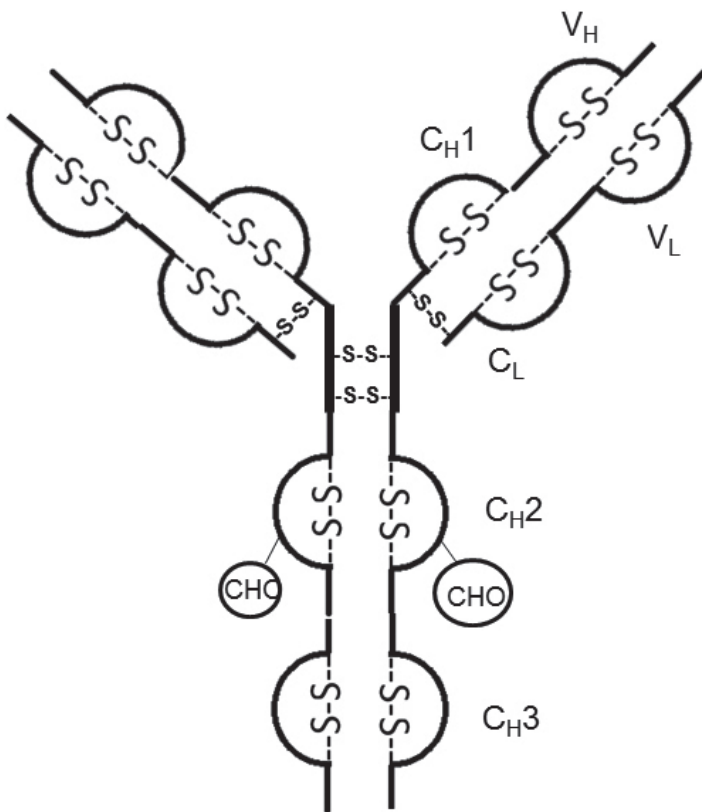


Fig. 1. Disulfide bonds and hinge

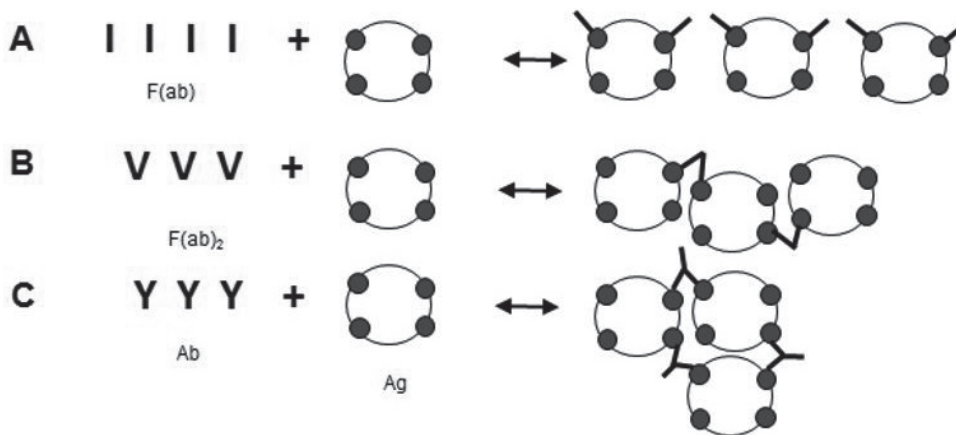


Fig. 2. Binding and crosslinking

riabilní oblasti CDR pro variabilní část těžkého řetězce [1]. Největší variabilita je ve třetí CDR těžkého řetězce. Plocha paratopu je 7 – 9 nm² a prostorově v ní působí 15 – 22 AA, ale kontakt (vazbu) s Ag má jen 2 – 7 AA (jen ony přispívají k vazebné energii). Tyto AA jsou prostorově vždy velmi blízko, ale na řetězci Ig mohou být od sebe dost daleko, protože terciární (kvarterní) struktura Ig bývá dosti pokroucená. Přestože aromatické AA tvoří jen čtvrtinu všech AA, podílejí se na vazbách s Ag polovinou, neboť jejich π-elektrony se významně podílejí na vzniku vazby při imunochemických reakcích.

Konstantní domény lehkých a těžkých řetězců a variabilní domény lehkých a těžkých řetězců mají podobnou strukturu. Každá doména obsahuje zdro-

kové datové soubory na trojici a pětiplátů. Oba soubory plátů jsou spojeny disulfidickým můstkem [1] a doména tvoří pevnou a velmi stabilní strukturu. Variabilní sekvence AA ve variabilní doméně lehkého řetězce jednotlivých Abs zajišťuje diverzitu struktury potřebnou pro imunitní odezvu. Rentgenová krystalografie umožnila odhalit strukturu konstantní a variabilní domény lehkého řetězce [6]. Jednotlivé pláty jsou tvořeny tzv. β vlákny a jejich uspořádání rozhoduje o trojrozměrné struktuře Ig. Tato vlákna také konfigurují tři CDR hypervariabilní oblasti lehkého řetězce. Obdobně je tomu i v oblasti těžkého řetězce, jen variabilita u těchto tří CDR je ještě vyšší.

Imunoglobulin G (IgG)

IgG (m. h. 150000) sestává ze dvou identických lehkých řetězců (m. h. 25000) a dvou identických těžkých řetězců γ (m. h. 50000). Lehké a těžké řetězce jsou spojeny kovalentní vazbou disulfidickými můstky a nekovalentními interakcemi. Při štěpení papainem vznikají dva Fab fragmenty (m. h. 50000) sestávající z celého lehkého řetězce a z části těžkého řetězce a jeden Fc fragment (m. h. 50000). Při štěpení pepsinem vzniká dlouhý fragment (m. h. 100000), označovaný $F(ab)_2$, a současně jsou zbytky těžkých řetězců degradovány na malé kousky. Disulfidické můstky v dimeru $F(ab)_2$ lze redukčními činidly rozštěpit a vznikají dva fragmenty Fab, které jsou podobné Fab, jen jejich těžký řetězec je nepatrně delší [1].

IgG tvoří tři čtvrtiny všech protilátek v séru a vytváří čtyři podtřídy (IgG 1–4), které se vzájemně liší svými opsonizačními vlastnostmi, vazbou na komplement a časem, po který jsou aktivní. Zastoupení je pro IgG1 (γ_1) 65–66 %, IgG2 (γ_2) 23–25 %, IgG3 (γ_3) 5–7 % a IgG4 (γ_4) 4–5 %. Flexibilita Fab ramének je následující: $IgG3 > IgG1 > IgG4 > IgG2$. Podtřídy vykazují 90 % homologie v sekvenci AA a rozdíly jsou jen v oblasti pantu a N-terminální C_H2 doméně. Podtřídy jsou obecně označovány jako izotypy. Každý izotyp může mít několik alelických determinant (alotypů), které se většinou vyskytují v konstantních oblastech těžkých a lehkých řetězců.

IgG1 má konstantní oblast těžkého řetězce vytvořenu ze tří konstantních domén (C_H1 , C_H2 and C_H3) a flexibilního pantu. Lehký řetězec má také konstantní doménu (C_L). Variabilní oblasti těžkých a lehkých řetězců obsahují čtyři úseky základní struktury (FR1, FR2, FR3 a FR4) a mezi nimi tři oblasti určující komplementaritu (CDR1, CDR2 a CDR3) [7]. V oblasti pantu je 15 AA a spojení těžkých řetězců zajišťují dva disulfidické můstky.

IgG2 má stejnou m. h. jako IgG1 (tj. 146000), avšak v oblasti pantu je jen 12 AA, ale spojení těžkých řetězců v pantu zajišťují čtyři disulfidické můstky [9], a proto je flexibilita IgG2 omezená. Vedle převládající izofomy se čtyřmi disulfidickými můstky (A/A) se vyskytují i další izomery se dvěma disulfidickými můstky (B/B) a třemi disulfidickými můstky (A/B).

IgG3 je největší z rodiny IgG (m. h. 170000). V oblasti pantu má až 62 AA a 11 disulfidických můstků, spojujících těžké řetězce. Biologický poločas, který je u všech ostatních IgG 21 dnů, může být u IgG3 kratší (7 – 21 dnů).

IgG4 je do jisté míry podobný IgG2, a to jak m. h. 146000, tak počtem 12 AA v oblasti pantu (i když s jinou sekvencí). Dva disulfidické můstky odpovídají IgG1. IgG4 také tvoří izomery, ale jiného typu než IgG2. Disulfidické můstky zajišťující spojení těžkých řetězců, tzv. inter-vazbu (fixaci pantu) se mohou vázat na AA jen prvního a jen druhého těžkého řetězce – vytvoří tzv. intra-vazbu (pant se rozvolní). Tedy silná kovalentní vazba disulfidických můstků se zruší a molekula IgG4 drží pohromadě jen pomocí slabých nekovalentních vazeb. Za těchto okolností může být polovina molekuly IgG4

nahrazena jinou polovinou klonu IgG4, který generují B-buňky. Z monospecifické molekuly IgG4 vzniká bispecifická IgG4 a může být zafixována disulfidickými můstky (kovalentní inter-vazbou) [8]. Reakce je vratná, takže může opět vznikat monospecifická molekula IgG4. To je významné, protože avidita bispecifického IgG4 vůči Ag je nižší.

Imunoglobulin M (IgM)

IgM je také označován jako makroglobulinová Ab pro svou vysokou m. h. (900000 – 970000) [1]. Molekula IgM je polymer pěti peptidových subjednotek [10] a každá nese vlastní C_H doménu s těžkými řetězci μ . Polymerace subjednotek do konfigurace pentameru (Fig. 3), případně hexameru, závisí na přítomnosti řetězce J, jehož funkcí je stabilizovat sulfhydrylové skupiny fragmentu Fc během syntézy Ig tak, aby zůstaly dostupné pro vznik sítě vazeb mezi jednotlivými subjednotkami. Polymerace probíhá postupně; napřed vzniká dimer a připojováním dalších monomerů až pentamer. Na glykoproteinový řetězec J (m. h. 15000) lze připojit ještě jeden monomer IgM, a tak vzniká hexamer, ale bez řetězce J (patrně ze sterických důvodů) [11]. Volná molekula IgM v roztoku má planární hvězdicovou konformaci (jako kolo vagónu) a nereaguje s komplementem, zatímco po navázání Ag se IgM překlápí do svorkové krabí konformace a může fixovat komplement [12]. I když je valence paratopu IgM 10 antigenů, v případě větších antigenů je to ze sterických důvodů jen 5 antigenů nebo i méně (oblast hrdla IgM neumožňuje flexibilitu jako u IgG) [6]. IgM Abs mají nízkou afinitu vůči haptenům, ale vzhledem k tomu, že umožňují vícenásobnou vazbu, tak mají vysokou afinitu vůči Ag s více epitopy. IgM se může vyskytovat také jako monomer, ale pouze na povrchu B-buněk. IgM má biologický poločas 5 – 10 dnů. Nejistota počtu antigenů, které se vážou na IgM Ab je patrně důvodem proč je povolená tolerance chyby stanovení IgM tak vysoká (30 %).

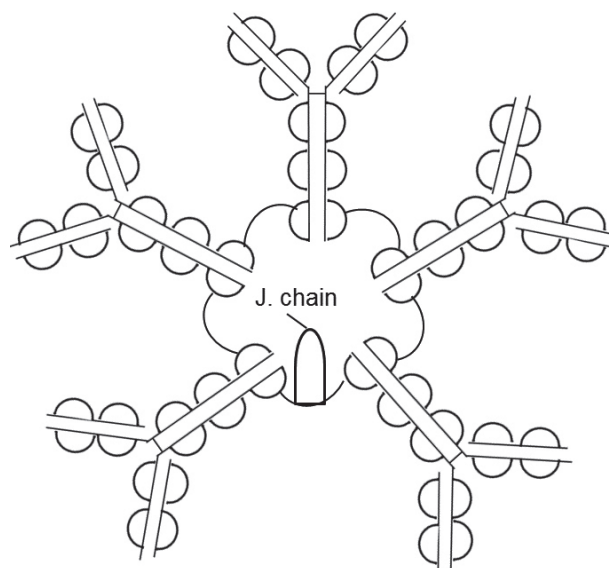


Fig. 3. Structure of IgM

Imunoglobulin A (IgA)

IgA se vyskytuje jako monomer (ale mohou se vyskytovat i dimery, trimery a tetramery [6], tedy m. h. 150000 – 600000) v séru a jako dimer (Fig. 4), stabilizovaný vůči proteolýze v mukosních sekretech. IgA je jednoduchý peptid [10], vytvořený z jedné variabilní a tří konstantních domén, ale má větší počet disulfidických vazeb než IgG. Dva intra-vazebné disulfidické můstky jsou na těžkém řetězci α , a to v doménách C_H2 a C_H3 . Tyto poskytují základ pro vznik mezimolekulární vazby Fc fragmentů v dimeru přes polypeptidovou sekreční složku (chrání před štěpením proteázou) a řetězec J [2], který usnadňuje polymeraci. Polypeptidová sekreční složka má m. h. 70000 a pět domén podobných Ig; může, ale nemusí být vázána na dimer IgA přes disulfidický můstek [1]. Řetězec J je stejný jako u IgM (m. h. 15000). IgA má k dispozici tři místa pro glykosylaci. IgA se vyskytuje ve dvou podtřídách. Monomer **IgA1** (biologický poločas 5 – 7 dnů) je hlavní podtřídou, která se vyskytuje v séru. Dimery IgA1 a **IgA2** (biologický poločas 4 – 6 dnů) se vyskytují v téměř rovnoměrném zastoupení (IgA2 lehce převažuje) v mukosních sekretech. IgA1 má delší pant než IgA2, avšak IgA2 obsahuje navíc disulfidické můstky na C-konci lehkého řetězce [2].

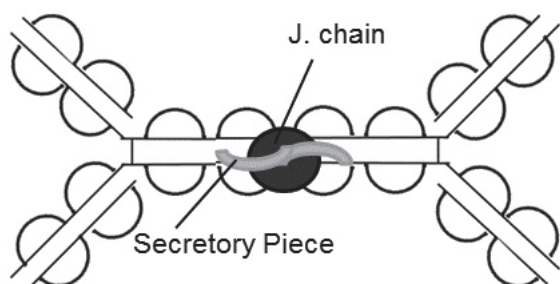


Fig. 4. Secretory IgA (dimer)

Imunoglobulin D (IgD)

Monomer IgD má m. h. 175000 – 184000 [6] (obsahuje těžké řetězce δ se třemi C_H doménami, které jsou delší než γ a α) a biologický poločas 2 – 8 dnů. Mezi těžkými řetězci nejsou žádné disulfidické můstky. IgD má nejrozsáhlejší oblast pantu (64 AA) ze všech Ig, a to ve dvou strukturně odlišných segmentech, což umožňuje maximální flexibilitu při kontaktu s Ag.

Imunoglobulin E (IgE)

Monomer IgE má m. h. 190000 [6] a biologický poločas 1 – 5 dnů [12]. Vyskytuje se v séru v extrémně nízké koncentraci (0,003 %). Obsahuje těžké řetězce ϵ se čtyřmi C_H doménami a má jeden disulfidický můstek v hrdle a další dva můstky spojující Fab raménka.

Reaktivita Abs

Vazebné síly mezi Ab a Ag jsou čtyř typů [13]. Nejsilnější jsou elektrostatické interakce vyvolané přitažlivostí mezi opačnými náboji (nabitě vedlejší řetězce AA – hrají významnou roli při afinitě Ab). Van der Waalsovy síly, způsobené výkyvy v elektronových oblacích opačně polarizovaných sousedních atomů, jsou velmi slabé a uplatňují se až při bezprostředním přiblížení Ab a Ag. Imunoreakce probíhají vždy ve vodném prostředí, a tak se uplatňují ještě vodíkové můstky vytvořené sdílenými elektronegativními atomy vodíku mezi atomy kyslíku (slabší vodíkové můstky se projevují také vazbou na p-elektrony dusíku) a také hydrofobní vazby, které vznikají vzájemným proplétáním hydrofobních skupin (např. AA leucin, izoleucin) při vytlačování vody (čím rozsáhlejší plocha je chráněná před vodou, tím jsou hydrofobní síly větší). Molekuly vody mohou být zachyceny v kapse hypervariabilní smyčky Ab a mohou přispívat k vazbě mezi polárními skupinami AA [14]. Při vzniku vazby Ab-Ag se nejvíce uplatňují slabé nekovalentní Van der Waalsovy síly, takže tato vazba může být snadno rozštěpena vlivem nízkého či vysokého pH, vysokých koncentrací solí, detergenty nebo chaotropními ionty (snižují strukturovanost vody, např. jodidy nebo guanidin). Někdy k tomu může docházet i při vysoké koncentraci epitopů Ag.

Reakce mezi homologickou Ab a Ag je dvoustupňová. Počáteční, neboli primární vazebná reakce není viditelná. Následné zviditelnění této reakce závisí na několika faktorech: izotypu Ab, valenci (mocenství) Ag a podobě Ag (částice nebo rozpuštěná látka). Při reakci Ab s Ag se uplatňují dva typy epitopů, a to konformační a sekvenční [2]. **Konformační epitopy** vyžadují neporušenou přirozenou (původní) trojrozměrnou konfiguraci molekuly, aby se mohla uplatnit. AA, které se uplatňují, jsou blízko sebe v prostoru, ale jejich umístění v primární struktuře Ig může být navzájem dosti vzdálené. Denaturace molekuly rozruší tento typ epitopů a Ab specifická vůči konformačním epitopům se neváže na denaturovaný Ag. Na druhé straně lze připravit Ab proti epitopům denaturovaného Ag, která ale nereaguje s epitopy původního neporušeného Ag. Jiným typem epitopů jsou **sekvenční epitopy**, což jsou krátké úseky 4 – 7 AA, které umožní rozpoznávat oblasti krátkých peptidů se správnou sekvencí uvnitř velkého Ag. Tyto epitopy jsou označovány také jako kontinuální nebo lineární.

K imunogenicitě látek přispívají čtyři vlastnosti: velikost imunogenu (také jeho dávkování a způsob podání), chemické složení, cizorodost a přítomnost adjuvantů (zlepšují dispergační schopnosti imunogenu).

Sloučeniny s m. h. < 1000 nejsou obvykle imunogeny. Látky v rozmezí m. h. 1000 – 6000 mohou, ale nemusí být imunogeny. To záleží zpravidla na jejich struktuře. Lineární molekuly většinou imunogeny jsou, zatímco kulovité obvykle nikoliv, protože většina epitopů není přístupná pro imunoreakci s Ab, neboť je uzavřena uvnitř koule. Molekuly s m. h. > 6000 jsou obvykle imunogenní.

Fyzikálně-chemická různorodost látek je zpravidla potřebná, aby se chovaly jako imunogeny. Homopolymery AA obvykle nejsou imunogeny (např. poly- γ -D-glutamová kyselina s m. h. 50000).

Cizorodost byla dříve uvažována jako bezpodmínečný požadavek pro imunogenicitu. Nyní je zřejmé, že určité vlastní složky mohou být imunogenní vůči vlastnímu individu. Rozštěpené nebo denaturované antigeny mohou mít vyšší imunogenicitu než cizorodé antigeny.

Adjuvanty nejsou samy o sobě imunogenní, ale zvyšují imunitní odezvu tím, že způsobují uvolnění cytokinů nebo transformaci Ag. T-dependentní imunogen musí být degradován enzymem, aby se stal imunogenní. Peptidy D-aminokyselin nejsou imunogenní, zatímco jejich L-izomery obvykle imunogenní jsou.

Haptenu jsou nízkomolekulární sloučeniny, které jsou samy o sobě neimunogenní, ale po konjugaci na vysokomolekulární nosič se stávají imunogenní. Koncepce haptenu je využívána u některých vakcín. Použití vhodných epitopů navázaných na vysokomolekulární nosič je bezpečnější než využívání celých imunogenů.

Makromolekuly obvykle mají více jedinečných anebo opakujících se epitopů. Pokud dochází k imunoreakci mezi mnoha epitopy Ag a mnoha paratopy Ab, označuje se výsledná vazebná síla jako **avidita**, tedy suma všech afinit. Protože se při imunoreakci měří avidita, může být Ab s více paratopy a nižší afinitou (IgM) citlivější než Ab s méně paratopy a vyšší afinitou (IgG). Imunogeny s rozdílnými epitopy vyvolávají heterogenní imunitní odezvu, tj. reakci různých Abs. Oba typy imunogenů mohou tvořit rozsáhlé komplexy, kde je na imunogen navázáno mnoho molekul Abs (rozdílných nebo stejných) a tyto se mohou ukládat, např. v ledvinách.

Specifita Ab při rozpoznávání epitopů Ag je vysoká, ale nikoliv absolutní. Takže na Ab se mohou vázat antigeny, které jsou strukturně velmi podobné (např. α - a β -glukosid); ale strukturně podobné antigeny se váží na Ab s nižší afinitou, než Ag specifický vůči Ab. Obecně platí, že Ab s nízkou afinitou je vysoce specifická, protože může vázat pouze Ag s optimální komplementaritou [15]. Rozhodující pro vznik vazby Ag-Ab jsou Van der Waalovy síly, které závisí na komplementaritě epitopu Ag a paratopu Ab. Ke křížové reaktivitě dochází, mají-li dva různé antigeny identický epitop (nebo dokonce více identických epitopů). V tomto případě může být křížová reaktivita velmi vysoká. Nebo jsou u rozdílných imunogenů podobné epitopy (buď v sekvenci, nebo tvarem) a pak je křížová imunitní reakce nižší. Jestliže je v imunoreakci křížová reaktivita > 10%, je pro analytické účely nepřijatelná. Na druhé straně může docházet k tomu, že dvě Abs mají rozdílné paratopy s odlišnou sekvencí AA (avšak jsou z hlediska třírozměrné struktury velmi podobné) a mohou vázat identický Ag [15].

Afinita Ab se zjišťuje rovnovážnou dialýzou [6], kdy se sleduje ustavení difuzní rovnováhy mezi Ab a radioaktivně značeným Ag. Oba reaktanty jsou před dialýzou v separátních komůrkách, oddělených polopropustnou membránou. Zralá Ab může mít 30000krát vyšší afini-

tu k epitopu Ag (haptenu) než zárodečná Ab. Zralá Ab má poměrně rigidní strukturu a epitop Ag zapadá do paratopu Ab jako klíč do zámku, tedy s vysokou specifitou. Zárodečná Ab má sice nízkou afinitu, ale vyšší flexibilitu ve vazebné oblasti, která se může přizpůsobit různým antigenům [15]. Některé purifikované Abs (obvykle IgM) jsou polyreaktivní (někdy se označují jako přirozené nebo původní) a jejich výskyt je malý i při stimulaci Ag.

Hypervariabilní oblasti

Tyto oblasti, nazývané také CDR, na konci ramének Fab tvoří vazebné místo Ab-Ag. Smyčky oblastí CDR jsou spojeny pomocí β -vláken s variabilními doménami lehkých a těžkých řetězců. Zbývající čtyři části lehkých a čtyři části těžkých řetězců vykazují mnohem menší variabilitu a tyto části Ig se označují jako skelet (framework), který je nosnou konstrukcí šesti hypervariabilních smyček a tvoří 85 % segmentu. Třírozměrná struktura skeletu je pro všechny Abs prakticky stejná. Skelet tvoří kompaktní β -vláknový válcový sendvič s hydrofobním jádrem [12]. Připojené hypervariabilní smyčky (Fig. 5) jsou mnohem flexibilnější než β -vlákna. Hypervariabilní smyčka [1] je velmi ovlivnitelná pořadím AA a sekvence (tzv. idiotypy) jejich variací určuje specifitu Ab vůči Ag. Monoklonální Ab je vždy jen jednoho idiotypu. Variabilita sekvence AA ovlivňuje tvar paratopu, jeho hydrofobicitu a náboj [12]. Pro specifitu Ab-Ag reakce jsou většinou dominantní těžké řetězce [6]. Kontakt Ag-Ab v případě velkého proteinového Ag tvoří vlnitý plochý tvar s komplementárními depresiemi a výstupky [14]. Malé haptenu jsou obvykle uloženy v kapse Ab nebo drážkách mezi těžkými a lehkými řetězci variabilních domén Ab. Lehké a těžké řetězce vytvářejí 3 CDR v každém řetězci a tvoří stěny s drážkou pro vazbu Ag [16]. Při vzniku vazby Ag-Ab se uplatňují konformační změny u epitopů Ag, nebo paratopů Ab, nebo u obou reaktantů, tak aby byly oba reaktanty co nejbližší (obvykle 0,1 nm) a vzniklá vazba byla pevnější. Vazebná síla Van der Waalových sil klesá s šestou mocninou vzdálenosti. Na Ab se obvykle naváží dva antigeny. Rozlehlý kontaktní povrch umožňuje pevné a vysoce specifické spojení Ag-Ab [16]. Bylo zjištěno, že funkční paratopy přirozených Abs obsahují především aromatické vedlejší řetězce (jsou hlavním donorem vazebné energie) a funkční skupinou bývá nejčastěji tyrosyl [17], menší část paratopu tvoří krátké řetězce s hydrofilními skupinami (např. glycin, serin). Tyto hydrofilní skupiny

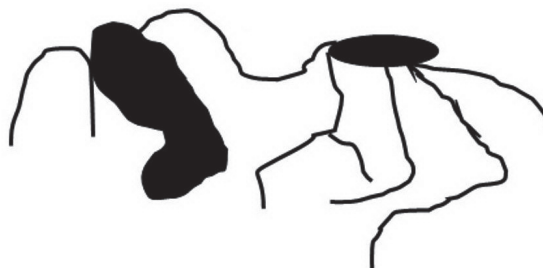


Fig. 5. Hypervariable loops

epitopu Ab zajišťují elektrostatickou interakci s odpovídající polární skupinou epitopu Ag. Ag se připojuje přes polární kontakt z 80 % elektrostatickou vazbou a 40 % z toho tvoří vodíkové můstky, které přispívají ke specifitě vazby Ag-Ab.

Poděkování

Autor velmi oceňuje pomoc Ing. Drahomíry Springer, Ph.D. a Ing. Jaroslavy Vávrové, Ph.D. při přípravě ilustrací v této publikaci.

Literatura

1. **Elgert, K. D.** *Immunology: Understanding the Immune System*, Chpt. 4, Wiley 1998.
2. **Smith, K. C.** *Antibody Structure and Function*. Immunology Syllabus, p. 48 – 71, University of Texas Medical School at Houston 2014.
3. **Alberts, B. et al.** *Essential Biology, 2nd Edition*, Garland Science Publishing 2004.
4. **Wozniak-Knopp, G. et al.** Introducing antigen-binding sites in structural loops of immunoglobulin constant domains: Fc fragments with engineered HER2/neu-binding sites and antibody properties. *Protein Eng. Des.* 2010, Vol. 23, No. 4; p. 289–297.
5. **Smith, K. C.** *Antigen-Antibody Interactions*. Immunology Syllabus, p. 145-160, University of Texas Medical School at Houston 2014.
6. **Goldsby, R. A. et al.** *Immunology, 5th Edition*, Chpt. 4, Freeman and Comp., New York 2003.
7. **Kalsi, J. et al.** *Structure-function analysis and the molecular origins of anti-DNA antibodies in systemic lupus erythematosus*. Expert Reviews in Molecular Medicine p. 1-28, Cambridge University Press 1999.
8. **Vidarsson, G. et al.** IgG Subclasses and Allotypes: From Structure to Effector Functions. *Front Immunol.* 2014, Vol. 5, p. 520.
9. **Parham, P.** *The Immune System, 3rd Edition*, p. 249-288. Garland Science, New York 2009.
10. Immunology and Microbiology. *MSc Programme in Human Biology, Biology Exams 4 U.* University of Copenhagen 2015.
11. **Wiersma, E. J. et al.** Structural and Functional Analysis of J Chain-Deficient IgM. *J. Immunol.* 1998, Vol. 160, p. 5979-5989.
12. **Hewitt, C. R. A.** *Structural Biology and Functions of Immunoglobulins*. University of Leicester 2005-2006.
13. **Smith, K. C.** *Antibody structure and function Part I*. Medic Immunology, University of Texas Medical School at Houston 2014.
14. **Janeway, C. A. Jr. et al.** *The interaction of the antibody molecule with specific antigen*. Immunobiology: The Immune System in Health and Disease. 5th Edition. Garland Science, New York 2001.
15. **Frank, S. A.** *Specificity and Cross-Reactivity*. Immunology and Evolution of Infectious Disease, Chpt. 4. Princeton University Press, Princeton (NJ) 2002.
16. **Lewis, D.** *Antibody structure*. Mofet Institute, Tel Aviv 1998.
17. **Peng, H. P. et al.** Origins of specificity and affinity in antibody-protein interactions. *Biophysics and Computational Biology* 2014, p. E2656-E2665.

Do redakce došlo 21. 1. 2016

Adresa pro korespondenci
Doc. RNDr. Petr Štern, CSc.
Mimoňská 637/16
190 00 Praha 9
e-mail: petr.stern@atlas.cz