

Изменение аффинности антител в ходе развития гуморального иммунного ответа

С. А. Бобровник, М. А. Демченко

Институт биохимии им. акад. А. В. Палладина НАН Украины
Ул. Леонтовича, 9, Киев, 01601, Украина

sab@biochem.kiev.ua

Изучали процесс аффинного созревания антител в ходе развития гуморального иммунного ответа у мышей BALB/c на введение миоглобина мышцы лошади. Для проведения этих исследований использован новый метод определения аффинности высоко- и низкоаффинных антител, присутствующих в смеси. Применение этого метода позволило получить основные характеристики гуморального иммунного ответа в ходе его развития на T-зависимый белковый антиген. Установлено, что аффинность антител, их количество, а также доля высокоаффинных специфических антител постепенно возрастают в процессе развития иммунного ответа.

Ключевые слова: аффинитет, аффинное созревание, нелинейная регрессия.

Введение. Известно, что развитие иммунного ответа на различные белковые антигены сопровождается изменением аффинности антител, которая, как правило, на более поздних стадиях иммунного ответа выше, чем на начальных его этапах [1–5]. Обратный эффект может иметь место только при каких-либо нарушениях развития иммунного ответа, при некоторых заболеваниях или же если организм иммунизируют чрезвычайно высокими дозами антигена, что приводит к истощению соответствующих клонов высокоспецифичных В-лимфоцитов. В иных же случаях аффинность антител обычно возрастает, особенно после повторных иммунизаций.

Необходимо отметить, что определение аффинности антител в сыворотке крови, где находится огромное число клонов сходной специфичности, но разной аффинности, является непростой задачей. Дело в том, что с использованием имеющихся в рас-

поряжении исследователей методов в большинстве случаев возможно найти лишь усредненную величину, по которой нельзя установить, какое именно количество и каких (высоко- или низкоаффинных) антител имеется в исследуемой смеси. Например, метод, предложенный ранее авторами работы [6], и его модификация, описанная Стивенсоном [7], позволяет при помощи ELISA точно определить аффинность только одного клона двухвалентных антител. Если же в исследуемой смеси имеются два или более видов антител, в том числе высоко- и низкоаффинных, то результат определения аффинности будет в значительной степени зависеть от того, каково соотношение каждого из видов антител, присутствующих в смеси, а также какой диапазон концентраций конкурирующего антигена использован в эксперименте [8–11].

Цель представленной работы состояла в определении аффинности двух видов антител, имеющихся в смеси, и нахождении соотношения между количеством высоко- и низкоаффинных антител в иссле-

дуемых образцах. Это позволило нам поставить задачу количественного измерения параметров, отражающих процесс развития иммунного ответа на белковый антиген, в результате чего происходит созревание аффинность антител и изменяется соотношение концентраций высоко- и низкоаффинных антител.

Теория. Чтобы определить аффинность одного вида антител с помощью ELISA Фриге и соавт. [6] разработали метод, быстро ставший чрезвычайно популярным из-за простоты его применения и точности получаемых данных. Авторами показано, что при избытке конкурирующего антигена в смеси антиген–антитело между отношением общего количества антител к количеству антител, заблокированных антигеном, и обратной концентрацией антигена существует линейная зависимость

$$\frac{A_0}{A_0 - A_i} = 1 + \frac{K_d}{l_i}, \quad (1)$$

где K_d – константа диссоциации, т. е. величина, обратная величине аффинности; A_0 – окраска лунок в отсутствие антигена; A_i – окраска лунок в присутствии конкурирующего антигена, концентрация которого равна l_i .

Графиком этой зависимости является прямая линия с углом наклона, равным обратной величине константы аффинности. Таким образом, начертив данный график, можно легко определить аффинность взаимодействия антител с антигеном.

Позднее Стивенс [7] высказал мнение о том, что предложенное Фриге и соавт. уравнение (1) является верным только для моновалентных антител, а чтобы учесть двухвалентность антител, нужно из левой части уравнения (1) взять корень квадратный и, следовательно, правильным соотношением будет

$$\sqrt{\frac{A_0}{A_0 - A_i}} = 1 + \frac{K_d}{l_i}. \quad (2)$$

Действительно, позднее уравнение (2) нами получено строго математически, что подтвердило [8, 9] справедливость поправки Стивенса [7]. Теоретические расчеты (рис. 1, а) и экспериментальные данные также свидетельствуют в пользу правильности уравнения (2).

Вместе с тем, когда в исследуемом образце антител имеется не один, а два вида антител одной специфичности, причем их аффинность в значительной мере отличается друг от друга, то на графике вместо линейной зависимости между величинами $\sqrt{\frac{A_0}{A_0 - A_i}}$ и $1/l_i$, представляемой прямой линией, получится нелинейная зависимость в форме выпуклой кривой (рис. 1, б). Чтобы иметь возможность определить аффинность обоих видов антител и соотношение между их количеством в исследуемом образце, нами предложены новые координаты, представление в которых данных о количестве свободных антител в смеси с разными концентрациями конкурирующего антигена дает вогнутую кривую (рис. 2, а). Отыскав углы наклона асимптот к этой кривой, а также точки пересечения асимптот с осями координат и введя найденные величины в предложенные нами четыре уравнения, возможно решить эти уравнения и, таким образом, определить численные значения искомых параметров, т. е. значения K_1 и K_2 , A_1 и A_2 [8–10].

Недостаток такого метода состоит в том, что для увеличения точности определения искомых характеристик смеси антител необходимо использовать очень широкий диапазон концентраций конкурирующего антигена. Только при достаточном диапазоне концентраций антигена можно начертить экспериментальные кривые связывания, относительно близко приближающиеся к осям координат и, следовательно, позволяющие получать достаточно точные искомые значения аффинности обоих видов антител и соотношение их концентраций. К сожалению, такие опыты технически трудно выполнимы, к тому же при определении окраски лунок с очень низкой интенсивностью точность измерения также значительно снижается.

В связи с этим нами недавно предложен новый метод [11, 12], являющийся достаточно простым, но вместе с тем позволяющим получать более точные данные относительно аффинности двух типов антител и соотношения их количества в образцах. Он основан на использовании метода нелинейной регрессии для вычисления параметров кривой связывания по известному уравнению. Современные методы вычислительной математики позволяют легко сделать это при помощи имеющихся про-

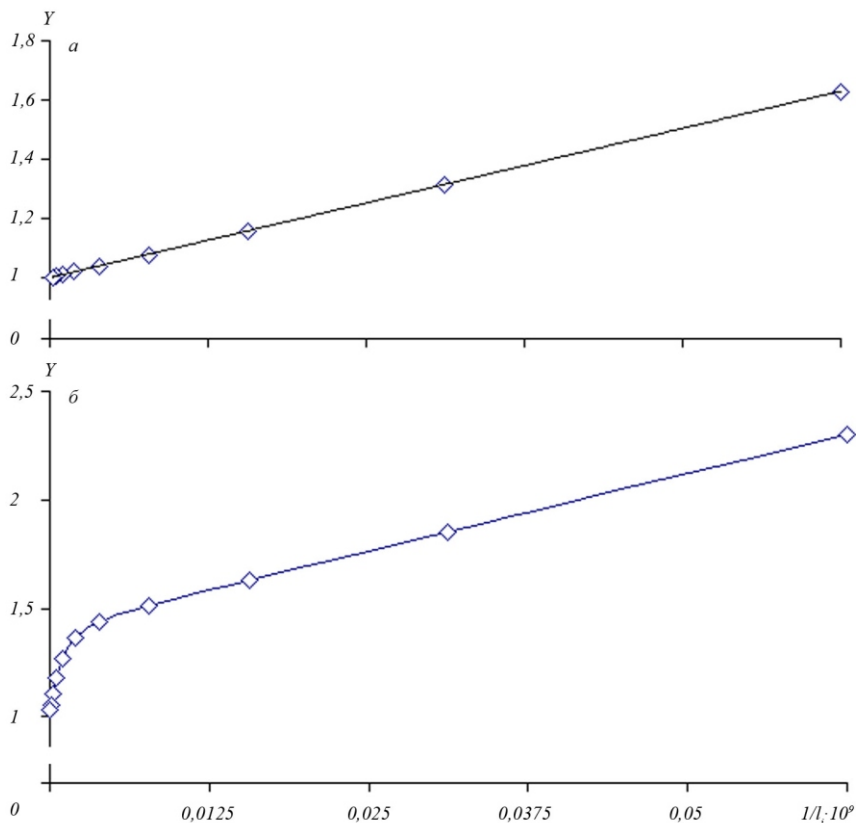


Рис. 1. Теоретические кривые связывания антигена двухвалентными антителами, представленные в координатах $Y = \sqrt{\frac{A_0}{A_0 - A_i}}$ против $1/l_i$; *a* – линейная зависимость между величинами $\sqrt{\frac{A_0}{A_0 - A_i}}$ и $1/l_i$ для одного вида антител, имеющих константу аффинности $K = 1,0 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}$; *б* – нелинейная зависимость между величинами $\sqrt{\frac{A_0}{A_0 - A_i}}$ и $1/l_i$ для двух видов антител в равных концентрациях, имеющих константы аффинности $K_1 = 1,0 \cdot 10^8$

грамм для персонального компьютера, например, с помощью программы Origin 75.

Ранее нами показано, что зависимость интенсивности окраски лунок A_i , определяемая с помощью ELISA (в том случае, если окраска лунок пропорциональна концентрации свободных антител в смеси антиген–антитело), от концентрации конкурирующего антигена l_i представлена следующим уравнением (рис. 2, б):

$$A_i = \frac{A_1 (1 - 2l_i K_1)}{(1 - l_i K_1)^2} - \frac{A_2 (1 - 2l_i K_2)}{(1 - l_i K_2)^2}, \quad (3)$$

где K_1 и K_2 – константы аффинности обоих видов антител; A_1 и A_2 – окраска лунок, которая была бы получена в случае использования каждого вида антител в отдельности, причем при условии отсутствия конкурирующего антигена.

Тогда, отыскав в эксперименте значения A_i при различных известных значениях конкурирующего антигена l_i , можно при помощи метода нелинейной регрессии найти значения K_1 и K_2 , а также A_1 и A_2 , наилучшим образом соответствующие эксперимен-

тальной кривой для ее совпадения с кривой, представленной уравнением (3). Поскольку значения A_1 и A_2 пропорциональны концентрации каждого из антител в смеси, следовательно, таким образом можно определить не только аффинность обоих антител K_1 и K_2 , но и найти соотношение концентраций этих антител, равное отношению A_1 к A_2 , или же часть каждого вида антител, равную $A_1/(A_1 + A_2)$ и $A_2/(A_1 + A_2)$.

Материалы и методы. В качестве антигена в работе использовали миоглобин мышц лошади («Sigma», США). Шесть мышей линии BALB/c (самки массой около 22–25 г) иммунизировали внутривенно 250 мкг/мышь миоглобина, растворенного в физиологическом растворе. Иммунизацию проводили одинаковой дозой указанного антигена трижды с интервалом в три недели. Через 10 дней после каждой иммунизации из хвостовых вен мышей брали около 250 мкл крови для получения сывороток. Сыворотки трех мышей объединяли в два пула, состоящих из трех отдельных сывороток. Затем полученные таким способом антисыворотки к

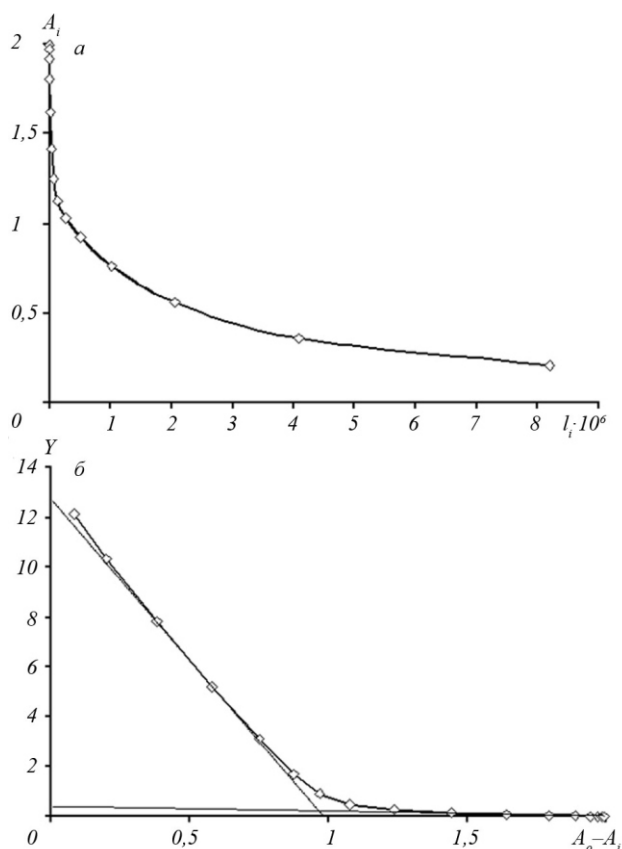


Рис. 2. Нелинейная зависимость количества свободных антител (т. е. антител, у которых один или оба паратопа не заблокированы антигеном), находящихся в смеси с антигеном в состоянии равновесия, от концентрации антигена (*a*) и такая же зависимость, но в координатах $Y = \frac{A_0 - A_i}{l_i} 10^7$ против

величины $A_0 - A_i$ (*б*). Обе теоретические кривые рассчитаны для

следующих параметров взаимодействия антиген–антитело: $K_1 = 1,0 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}$; $K_2 = 1,0 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$; диапазон концентраций антигена $l_i = 1,0 \cdot 10^{-9} - 2,62 \cdot 10^{-4} \text{ M}$, $A_1 = 1,0$; $A_2 = 1,0$; $A_0 = A_1 + A_2$

миоглобину замораживали и хранили вплоть до использования.

На 96-луночных планках Mai Sorp фирмы «Nunc» (Дания) сорбировали миоглобин, инкубируя 110 мкл/луночку раствора миоглобина (30 мкг/мл в 0,1 %-м растворе бикарбоната аммония, pH 8,5) в планках при температуре 4 °С в течение 18 ч. Непосредственно перед использованием планки тщательно отмывали от несвязавшегося миоглобина, в них вносили 100 мкл/луночку исследуемой смеси, состоящей из разведенной антисыворотки и определенного количества миоглобина. Планки инкубировали с исследуемыми образцами антисыворотки и антигена в течение 45–50 мин при непрерывном

встряхивании, затем растворы удаляли из лунок, планки тщательно промывали проточной водой и при помощи ELISA определяли количество антител IgG класса, связавшихся с сорбированным на планке миоглобином. Иными словами, определяли часть антител, у которых один или оба паратопа не связаны с антигеном.

Чтобы установить разведения антисывороток, оптимальные для определения аффинности антител с помощью описанных методов, в предварительном опыте сыворотки титровали в 0,2 %-м растворе БСА в забуференном физрастворе, содержащем 0,1 %-й твин-20 (ТБФ). Те разведения антисыворотки, при которых наблюдалось прямо пропорциональное снижение интенсивности окраски лунок при снижении концентрации антисыворотки, использовали в дальнейшем в опытах по определению аффинности антител [6].

Аликвоты по 0,2 мл разведенных в (1:50)–(1:150) раз антисывороток (в соответствии с данными предварительного опыта по раститровке) смешивали 1:1 с растворами миоглобина различной концентрации (от $2,5 \cdot 10^{-7}$ до $6,4 \cdot 10^{-5} \text{ M}$) в 0,2 %-м растворе БСА в ТБФ. Образцы оставляли инкубироваться при комнатной температуре в течение 18 ч, после чего по 0,1 мл каждого образца смеси (в трех повторностях) вносили в лунки иммунологических плат с сорбированным миоглобином, планки инкубировали с этими образцами на протяжении 45–50 мин при непрерывном встряхивании, после чего образцы удаляли из лунок, планки тщательно отмывали и определяли относительное количество связавшихся антител методом ELISA. Значения яркости окраски для каждого образца находили, рассчитав среднюю величину из трех измерений.

Используя метод нелинейной регрессии, определяли величины K_1 , K_2 , A_1 и A_2 , а затем вычисляли отношения $A_1/(A_1 + A_2)$ и $A_2/(A_1 + A_2)$, т. е. выявляли соотношение концентраций высоко- и низкоаффинных антител в исследуемой смеси.

Результаты и обсуждение. На рис. 3, *a*, представлены результаты титрования с помощью ELISA антисывороток к миоглобину, полученных после одно-, дву- и трехкратной внутривенной иммунизации мышей миоглобином. Как видно из этого рисунка, при разведении более чем в 50 раз возникают

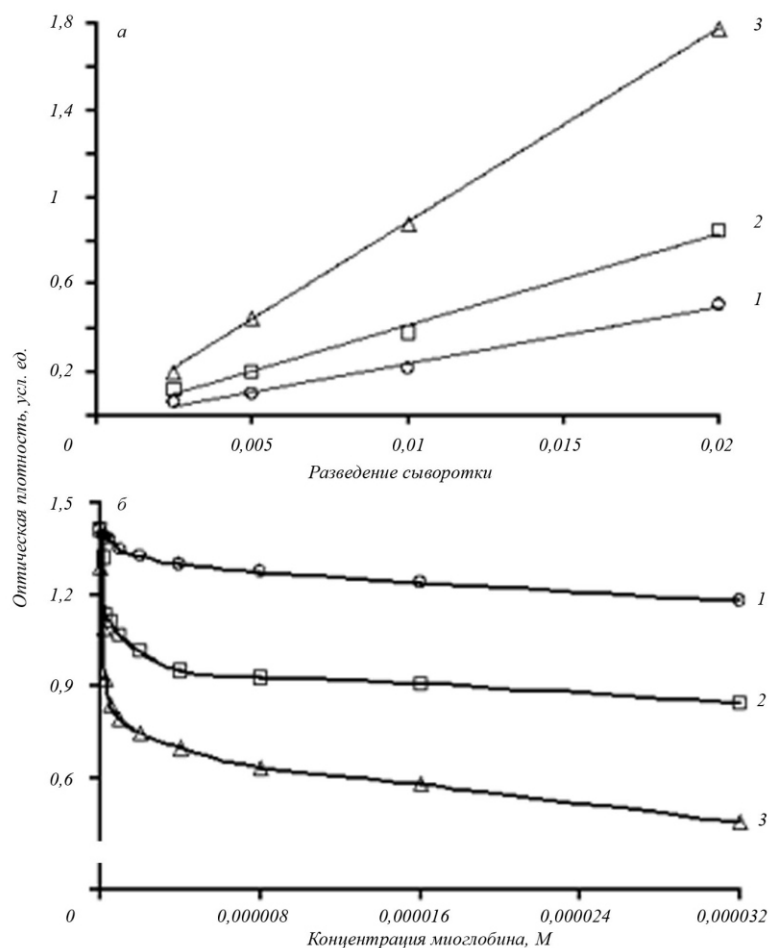


Рис. 3. Экспериментальные кривые зависимости количества свободных IgG антител к миоглобину от разведения сыворотки или от концентрации миоглобина в смеси с антителами: *a* – влияние разведения антисывороток к миоглобину на количество антител, связавшихся с миоглобином, сорбированным на иммунологической плашке (1 – однократное; 2 – двукратное; 3 – трехкратное); *б* – действие концентрации миоглобина в смеси с антисыворотками к миоглобину на количество антител в смеси миоглобин–антисыворотка, у которых один или оба паратопа не связаны с миоглобином и являются свободными (1 – однократная; 2 – двукратная; 3 – трехкратная)

линейные зависимости между концентрацией антисыворотки и интенсивностью окраски лунок. Вместе с тем, концентрация IgG антител в антисыворотке после двукратной иммунизации примерно в 1,5 раза выше, чем после однократной, а после трехкратной иммунизации концентрация антител в ~ 2 раза выше, чем после двукратной. Поэтому для эксперимента по определению аффинности IgG антител антисыворотки разводили в 50, 75 и 150 раз, чтобы концентрации антител в полученных образцах были примерно равны между собой.

На рис. 3, б, приведены результаты, показывающие, как количество свободных IgG антител в смеси с антигеном зависит от концентрации антигена. Поскольку каждая из представленных на этом рисунке кривых описывается уравнением (3), то, используя программу Origin 75, можно определить значения K_1 и K_2 , а также A_1 и A_2 , наилучшим обра-

зом соответствующие подгонке полученных экспериментальных кривых к теоретической кривой, описываемой уравнением (3). Значения искомых величин представлены в таблице.

Как следует из данных таблицы, в проведенных экспериментах получены подтверждения того, что в процессе развития иммунного ответа на белковые Т-зависимые антигены происходит постепенное усиление аффинности образующихся IgG антител. Такая закономерность не является неожиданной, поскольку давно известно, что аффинное созревание иммунного ответа включает в себя вначале преклонение синтеза антител с IgM класса на IgG [8], а затем постепенно происходит отбор клонов В-лимфоцитов, продуцирующих все более аффинные антитела [2–5, 13, 14].

Этот процесс, названный созреванием аффинности антител, состоит как из соматических мута-

Значения констант аффинности высоко- и низкоаффинных антител к миоглобину в сыворотках мышей линии BALB/c через 10 сут после внутривенной иммунизации мышей миоглобином лошади

Иммунизация	K_1	K_2	$A_1/(A_1 + A_2)$, %	$A_2/(A_1 + A_2)$, %
Однократная	$1,62 \cdot 10^6$ ($\pm 3,22 \cdot 10^5$)	$1,17 \cdot 10^4$ ($\pm 9,49 \cdot 10^2$)	9,9	90,1
Двукратная	$8,74 \cdot 10^6$ ($\pm 2,17 \cdot 10^6$)	$1,62 \cdot 10^4$ ($\pm 4,71 \cdot 10^3$)	33,3	66,7
Трехкратная	$1,23 \cdot 10^7$ ($\pm 1,37 \cdot 10^6$)	$4,49 \cdot 10^4$ ($\pm 4,68 \cdot 10^3$)	46,5	53,5

ций генов, ответственных за структуру распознающего центра антитела, так и из последующего отбора клонов, продуцирующих более аффинные антитела [5, 15–18]. По этой причине подобный процесс считают сходным с эволюцией по Дарвину, поскольку вначале происходит мутация соответствующего гена, а затем – селекция клонов с наиболее благоприятными мутациями [19].

Следует отметить, что применение предложенного нами метода позволяет не только обнаружить тенденцию к усилению сродства между антителами и антигеном в процессе иммунного ответа, но и проследить динамику появления более аффинных антител, а также соотношение их количества с низкоаффинными антителами. Так, из таблицы видно, что через 10 дней после однократной иммунизации миоглобином лошади в сыворотках мышей появляется только около 10 % относительно высокоаффинных антител ($K_1 = 1,62 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$) и около 90 % – низкоаффинных ($K_2 = 1,17 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$).

После повторной иммунизации мышей миоглобином количество высокоаффинных антител достигает одной трети всех антител, причем аффинность этих высокоаффинных антител увеличивается до $8,74 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$, т. е. примерно в пять раз превышает таковую высокоаффинных антител после однократной иммунизации. Аффинность низкоаффинных антител ($K_2 = 1,62 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$) также выше, чем после первой иммунизации, хотя в этом случае разница составляет всего около полутора раз.

И, наконец, после третьей иммунизации часть высокоаффинных антител еще более возрастает и приближается к 50 %. При этом их аффинность ($K_1 = 1,23 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$) также выше, чем аффинность ан-

тител после двукратной иммунизации. Низкоаффинные антитела после трехкратной иммунизации ($K_2 = 4,49 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$) имеют примерно в три раза высшую аффинность к миоглобину, чем аналогичные антитела после двукратной иммунизации. Таким образом, в процессе развития иммунного ответа происходит не только увеличение доли высокоаффинных антител по сравнению с низкоаффинными, но и возрастают абсолютные значения аффинности как у пулов низкоаффинных, так и высокоаффинных антител.

Очевидно, что полученные нами результаты находятся в полном соответствии с многочисленными данными [1–5, 13–20] относительно постепенного качественного изменения характеристик продуцируемых антител в ответ на повторную иммунизацию организма чужеродным белковым антигеном. Помимо этого, использование разработанного нами метода оценки аффинности высоко- и низкоаффинных антител, находящихся в смеси, позволило получить количественные характеристики данного процесса. Учитывая также данные рис. 3, а, из которых следует вывод об увеличении общего количества миоглобин-специфичных антител, появляющихся в кровотоке в процессе иммунного ответа на внутривенные иммунизации миоглобином, и полученные нами дополнительные сведения по характеристике продуцируемых антител, появляется возможность более полно объяснить происходящие события в ходе развития гуморального иммунного ответа на белковые антигены.

Результаты нашего исследования демонстрируют также, насколько важно определять аффинность не менее двух видов антител одной специфичности,

когда они присутствуют в смеси, а также находить соотношение между концентрациями этих антител. Представленная работа свидетельствует и о значимости разработанного нами метода оценки аффинности высоко- и низкоаффинных антител, находящихся в смеси в неизвестных пропорциях.

S. A. Bobrovnik, M. A. Demchenko

Affinity maturation of antibodies in the course of humoral immune response

Summary

The process of affinity maturation in the course of humoral immune response of BALB/c mice against horse muscle myoglobin was studied. For this purpose we used the method of determination of the affinity constants for high- and low-affinity antibodies, present in the mixture. Application of this method allowed us to determine the main characteristics of humoral immune response change in the course of the immune response against T-dependent protein antigen. It was shown that the affinity of antibodies, their quantity, and the proportion of high-affinity specific antibodies gradually increased during immune response development.

Keywords: affinity, affinity maturation, non-linear regression.

С. А. Бобровник, М. О. Демченко

Зміна афінності антитіл у ході розвитку гуморальної імунної відповіді

Резюме

Вивчали процес афінного визрівання антитіл при розвитку гуморальної імунної відповіді у мишей BALB/c на введення міоглобіну м'язів коня. Для проведення цих досліджень використано новий метод визначення афінності високо- і низькоафінних антитіл, наявних у суміші. Застосування цього методу дозволило одержати основні характеристики гуморальної імунної відповіді в ході її розвитку на T-залежний білковий антиген. Встановлено, що афінність антитіл, їхня кількість, а також частка високоафінних специфічних антитіл поступово зростають при розвитку імунної відповіді.

Ключові слова: афінність, визрівання афінності, нелінійна регресія.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Ройт А.* Основы иммунологии.– М.: Мир, 1991.– 327 с.
2. *Azur Z., Mazor G., Meilijson I.* Maturation of the humoral immune response as an optimization problem // *Proc. Biol. Sci.*–1991.–**245**.–P. 147–150.
3. *MacLennan I. C., Liu Y. J., Johnson G. D.* Maturation and dispersal of B-cell clones during T cell-dependent antibody responses // *Immunol. Rev.*–1992.–**126**.–P. 143–461.
4. *Forsdyke D. R.* The origins of the clonal selection theory of immunity as a case study for evaluation in science // *FASEB J.*–1995.–**9**.–P. 164–166.

5. *Kelsoe G.* Life and death in germinal centers (redu) // *Immunity*.–1996.–**4**.–P. 107–111.
6. *Friguet B., Chaffotte A. F., Djavadi-Ohanian L., Goldberg M. E.* Measurements of the true affinity constant in solution of antigen-antibody complexes by enzyme-linked immunosorbent assay // *J. Immunol. Meth.*–1985.–**77**.–P. 305–319.
7. *Stevens F. J.* A modification of an ELISA-based procedure for affinity determination: correction necessary for use with bivalent antibody // *Mol. Immunol.*–1987.–**24**.–P. 1055–1060.
8. *Бобровник С. А.* Определение аффинности антител с помощью ELISA // *Укр. биохим. журн.*–1999.–**71**, № 6.–С. 90–102.
9. *Bobrovnik S. A.* ELISA-based method for determining the affinity of bivalent antibodies of two specificities in a mixture // *Ukr. biokhem. zh.*–2000.–**72**, N 3.–P. 133–141.
10. *Bobrovnik S. A.* Determination of antibody affinity by ELISA. Theory // *J. Biochem. and Biophys. Meth.*–2003.–**57**.–P. 213–236.
11. *Бобровник С. А.* Определение аффинности высоко- и низкоаффинных антител, находящихся в смеси, при помощи ELISA и метода нелинейной регрессии // *Укр. биохим. журн.*–2005.–**77**, № 3.–С. 155–161.
12. *Bobrovnik S. A., Stevens F. J.* Deconvolution of antibody affinities and concentrations by non-linear regression analysis of competitive ELISA data // *J. Immunol. Meth.*–2007.–**328**.–P. 53–58.
13. *Cauerhff A., Goldbaum F. A., Braden B. C.* Structural mechanism for affinity maturation of an anti-lysozyme antibody // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*–2004.–**101**.–P. 3539–3544.
14. *Adams C. L., MacLeod M. K. L., Milner-White E. J., Aitken R., Garside P., Scott D. I.* Complete analysis of the B-cell response to a protein antigen, from *in vivo* germinal centre formation to 3-D modelling of affinity maturation // *Immunology*.–2003.–**108**.–P. 274–287.
15. *Celada F., Seiden P. E.* Affinity maturation and hypermutation in a simulation of the humoral immune response // *Eur. J. Immunol.*–1996.–**26**.–P. 1350–1358.
16. *MacLennan I. C. M.* Germinal centre // *Annu. Rev. Immunol.*–1994.–**12**.–P. 117–139.
17. *Berek C., Berger A., Apel M.* Maturation of the immune response in germinal centres // *Cell*.–1991.–**67**.–P. 1121–1129.
18. *Neuberger M. S., Milstein C.* Somatic hypermutation // *Curr. Opin. Immunol.*–1995.–**7**.–P. 248–254.
19. *Kelsoe G.* V(D)J hypermutation and receptor revision: coloring outside the lines // *Curr. Opin. Immunol.*–1999.–**11**.–P. 70–75.
20. *Furukawa K., Akasako-Furukawa A., Shirai H., Nakamura H., Azuma T.* Junctional amino acids determine the maturation pathway of an antibody // *Immunity*.–1999.–**11**.–P. 329–338.

УДК 577.27:616.097
Надійшла до редакції 27.04.07