



IMMUNOLÓGIAI ÉS
BIOTECHNOLÓGIAI
INTÉZET



13. gyakorlat: Autoantitest diagnosztika

Az immunológia alapjai

PTE-KK, Immunológiai és Biotechnológiai Intézet
Pécs, 2024.

TOLERANCE & AUTOIMMUNITY

- Upon encountering an antigen, the immune system can either develop an immune response or enter a state of unresponsiveness called tolerance.
- Immunological tolerance is thus the lack of ability to mount an immune response to epitopes to which an individual has the potential to respond.
- Targeting type and tolerating type immune responses composed by the same cellular and molecular components, the differences are in the effector phase only.
- Targeting type immune response or tolerance needs to be carefully regulated since an inappropriate response – whether it be autoimmune reaction to self-antigens or tolerance to a potential pathogen – can have serious and possibly life-threatening immunodeficiencies.

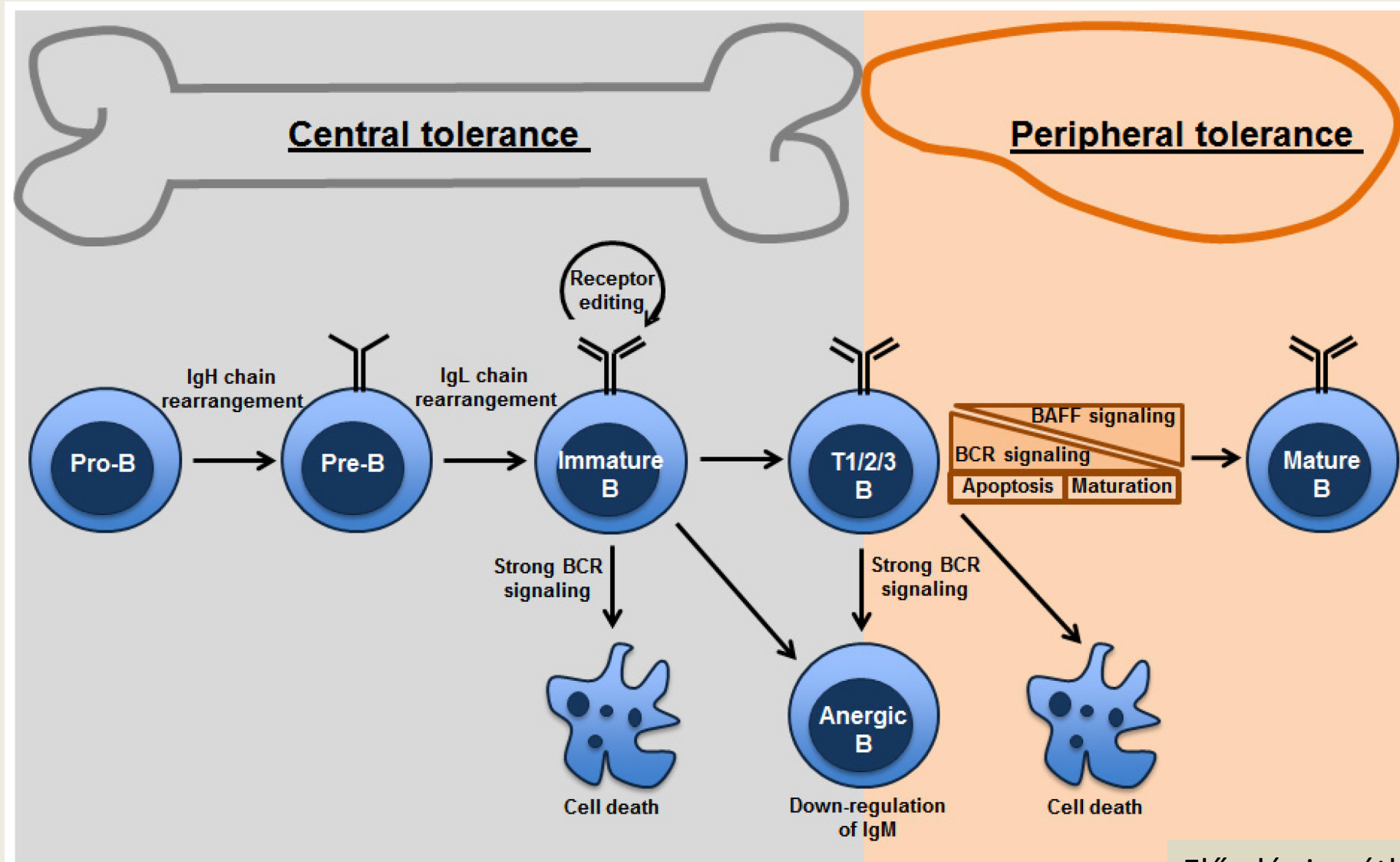
T-cell tolerance

Central Tolerance (selection in the Thymus)

Peripheral Tolerance

- **Lack of co-stimulation**
- **Receipt of death signal (high dose of antigen)**
- **Control by regulatory T cells**

Mechanisms of B-cell tolerance in bone marrow and periphery



ACTIVE TOLERANCE

Anti-idiotypic network

- Anti-idiotypic antibodies against T cell and B cell receptors and immunoglobulins
- Antigen-specific inhibition and induction of memory

Natural immune system (*“Immunological homunculus”*)

- Low affinity IgM, IgG or IgA natural autoantibodies produced by CD5+ B1B cells
- γ/δ T, $i\gamma/\delta$ T, ILCs1,2,3, MAIT, IEL, iNKT cells

AUTOIMMUNITY

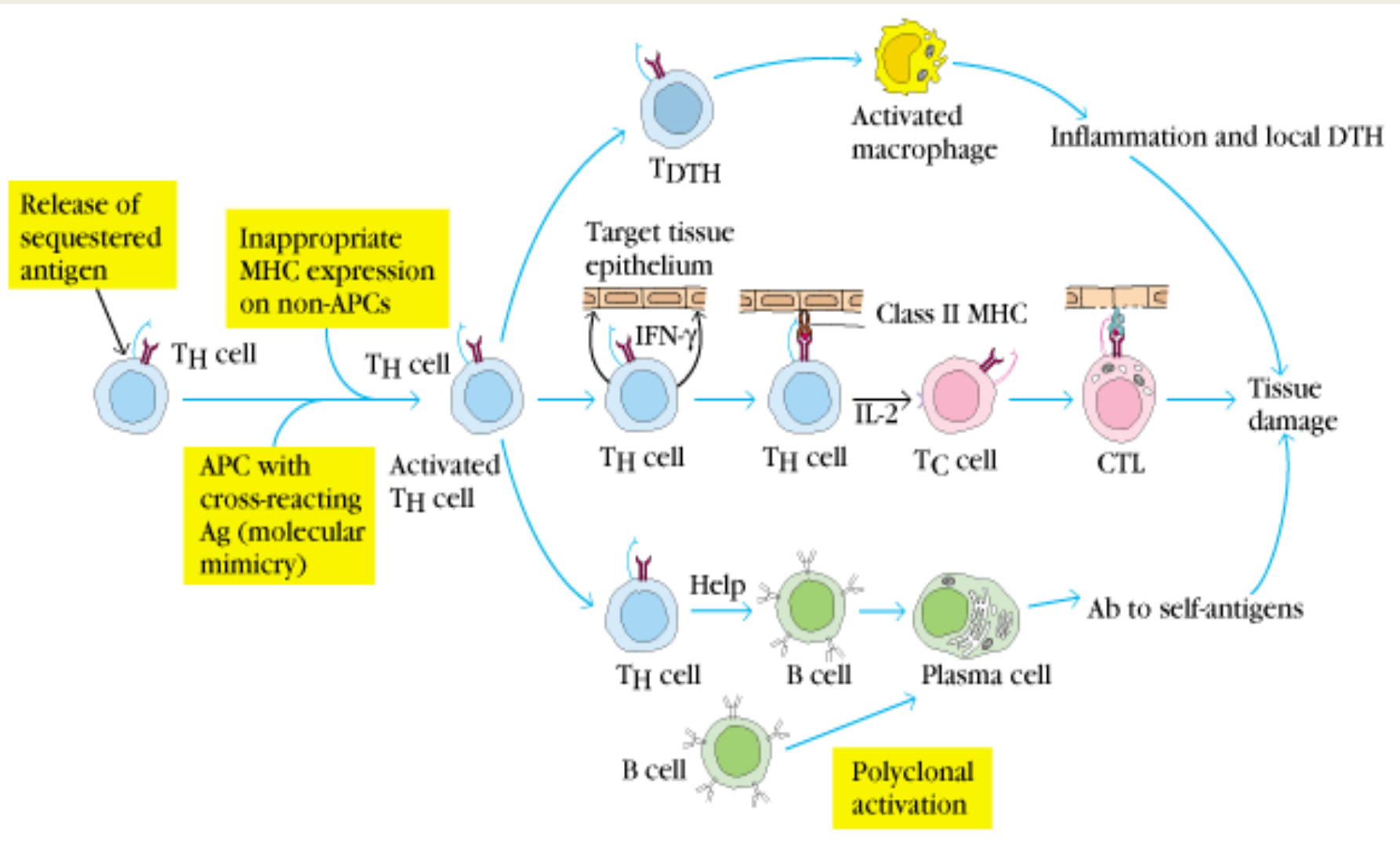
- **Physiological autoimmunity:** part of the normal immunological regulation
- **Pathological autoimmunity:** diseases caused by self reacting inflammatory immune responses with permanent tissue/organ injury

Pathomechanism of autoimmunity

- Multifactor mechanism

(general catastrophe of bio-regulation caused by external and internal factors)

- **Autoimmune “*steady state*”** (failure of dynamic balance on self tolerance and autoimmunity)
- **Role of infections** (molecular mimicry or inefficient natural antibody network)



Az autoimmunitás

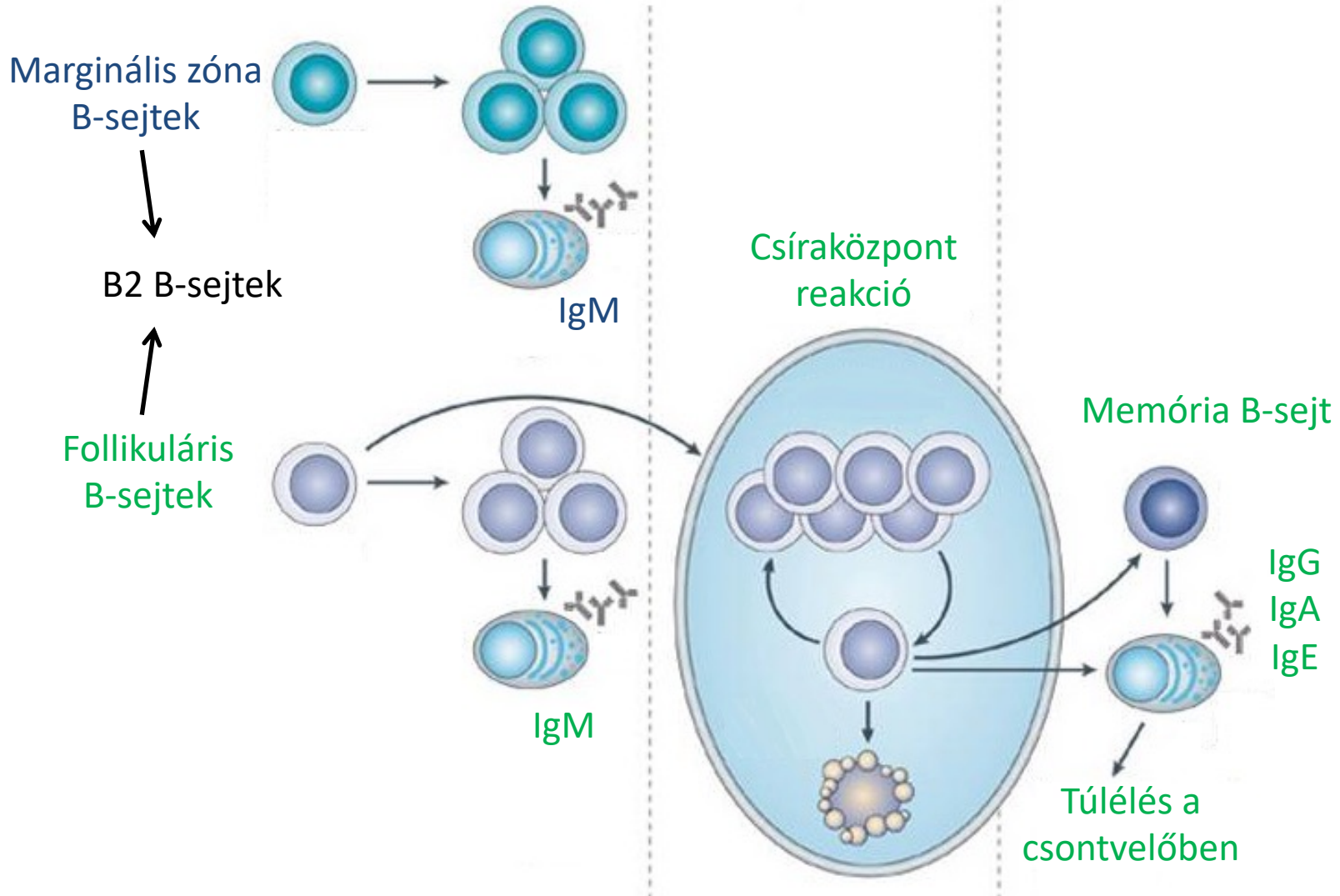
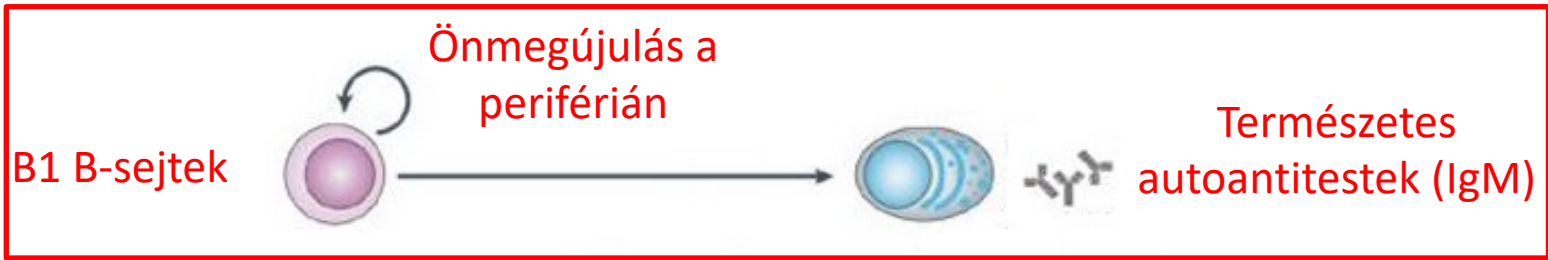
- Autoimmunitás: Az immunrendszer **saját struktúráját ismer fel** és azzal reagál.

Természetes autoimmunitás

- Immunregulációban vesz részt
- Külső stimulus nélküli antitest termelés
- **Természetes autoantitestek:**
 - **Alacsony affinitású**
 - **Polispecifikus**
 - Zömmel **IgM**
 - Alacsony szérum koncentráció
 - **B1 B-sejtek** termelik

Patológias autoimmunitás

- Valamilyen kórfolyamatot eredményez vagy azzal társul
- **Patológias autoantitestek:**
 - **Nagy affinitású**
 - **Monospecifikus**
 - Zömmel **IgG**
 - Magas szérum koncentráció
 - **B2 B-sejtek** termelik

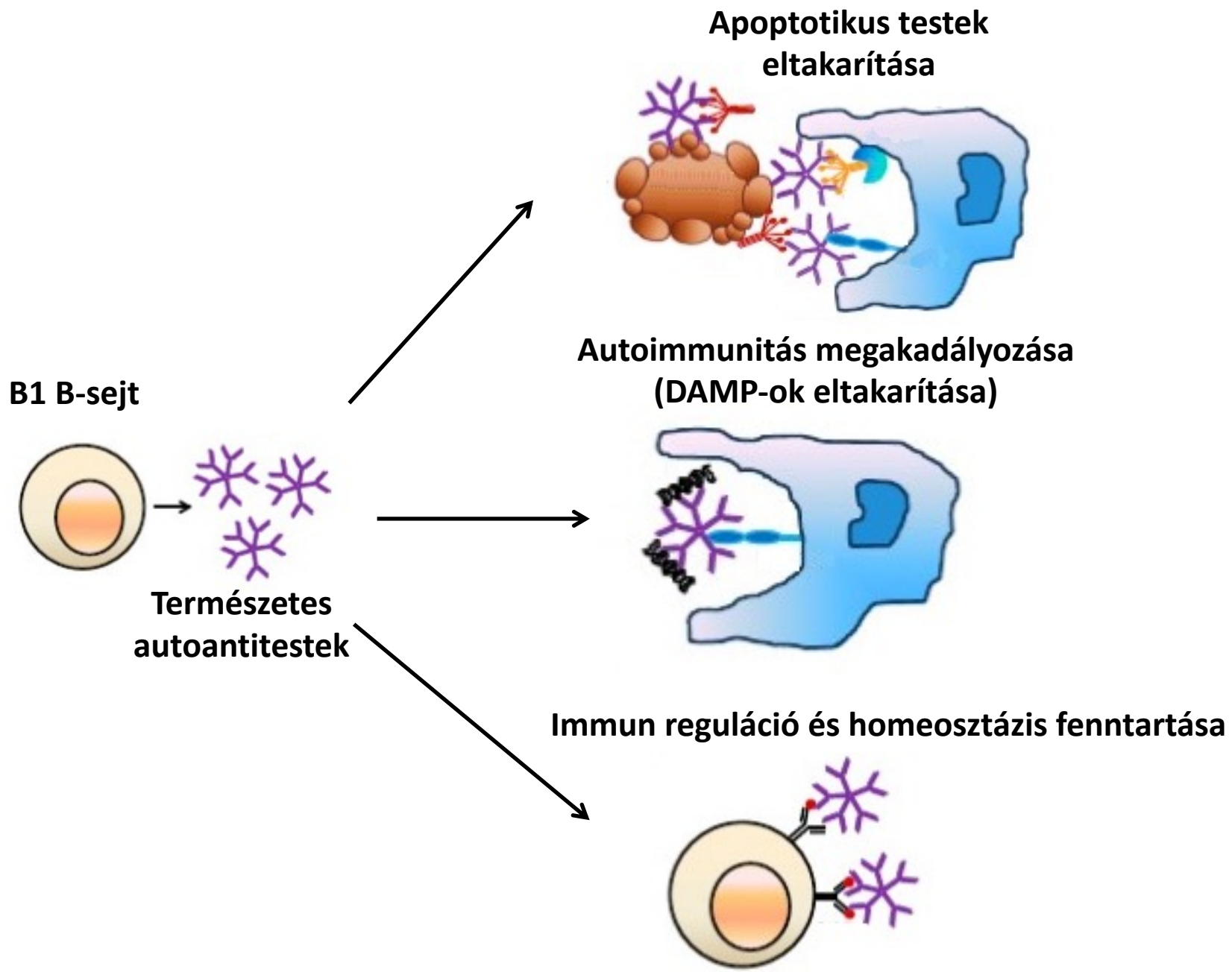


Természetes autoantitestek célpontjai

- **Evolucionálisan konzervált**, szinte az összes sejtben megtalálható struktúrák ellen, pl.:
 - Hősokk fehérjék
 - Cytoskeleton fehérjéi
 - Fontos metabolikus enzimek
 - Sejtmagi struktúrák
- Feltételezett szerep: **Immuntolerancia fenntartása**, saját antigének eltakarítása (pl. DAMP: Damage-associated molecular pattern), patológiás autoimmunitás megakadályozása
- Az egyes egyénekből előforduló természetes autoantitestek folyamatosan jelen vannak, repertoárjuk kortól és nemtől függetlenül konstans, az **egyénre jellemző**.

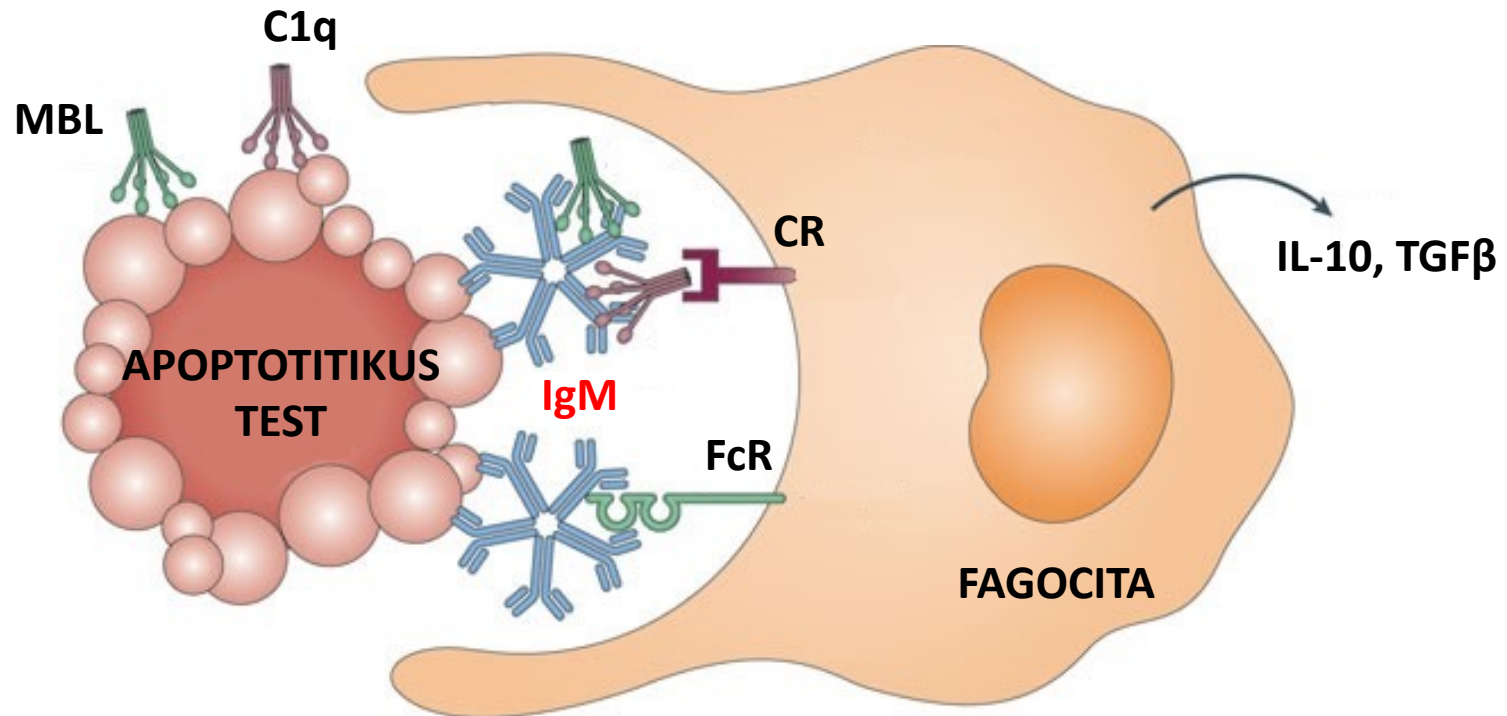


Immunológiai homunculus vagy más néven **Immunculus**



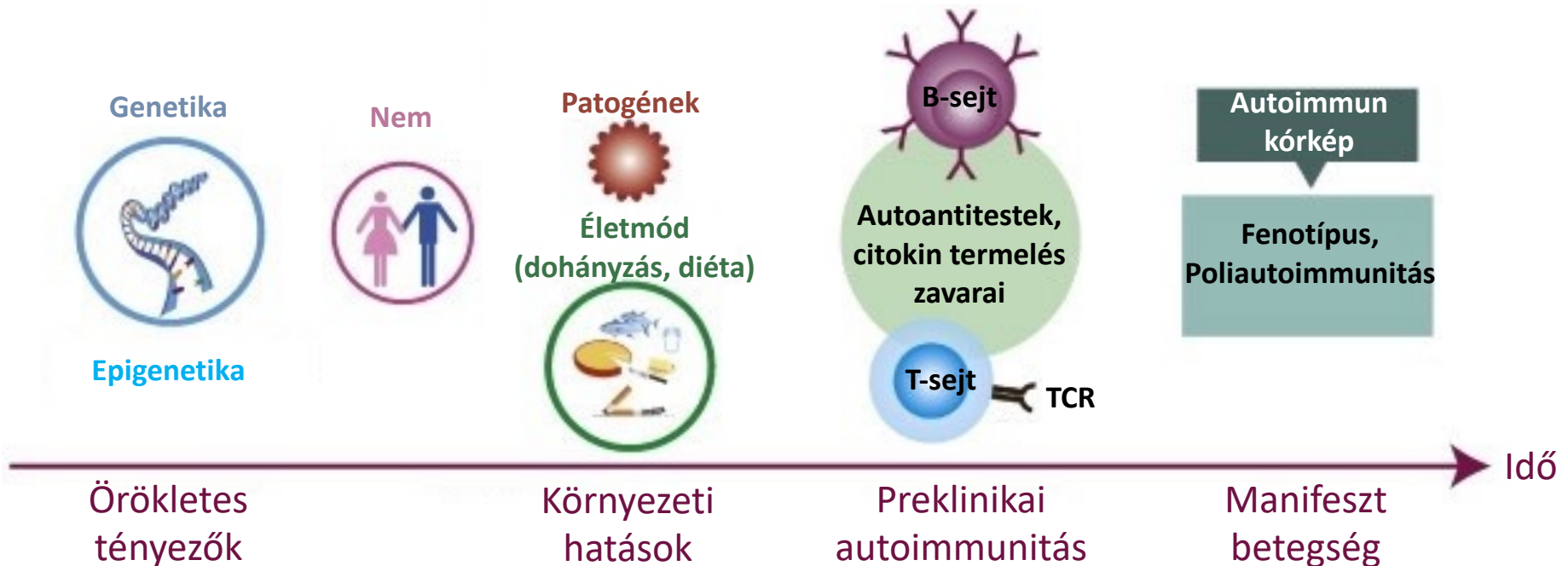
Apoptotikus testek eltakarítása

- Apoptotikus sejtek opsonizációja, fagocitózis Fc és komplement receptorokon keresztül.



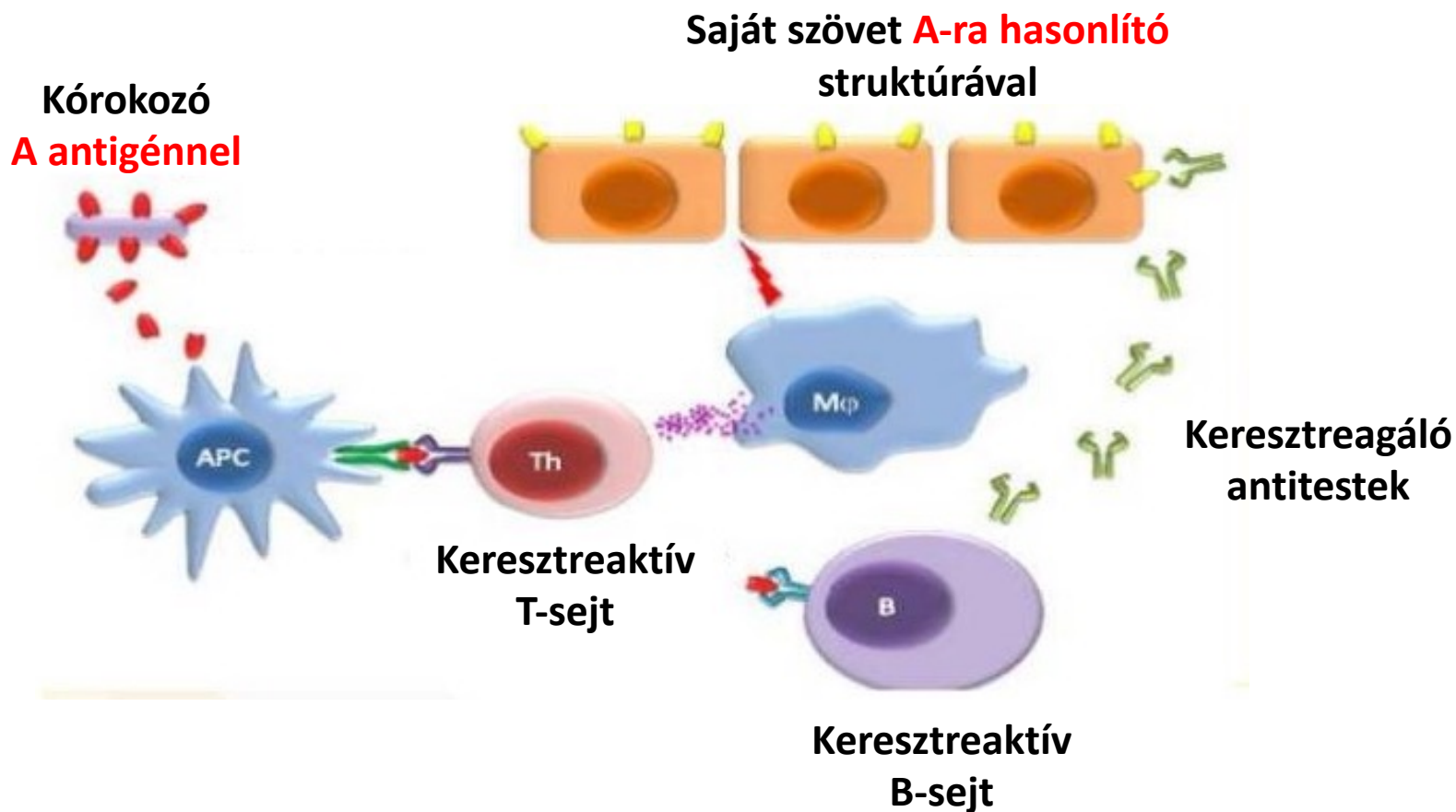
Autoimmun betegségek

- A teljes lakosság 7-8 százalékában fordulnak elő.
- Többségükre erős **női dominancia** jellemző. (pl. SLE-ben 1:9 a férfi:nő arány)
- Sokuk jellemzően **fiatal, munkaképes korban** jelentkezik.
- Gyakran halmozottan fordulnak elő. → **Poliautoimmunitás** (pl. SLE 41 százalékban társul valamilyen másik autoimmun betegséggel)
- **Krónikus betegségek!**
- Kialakulásuk:

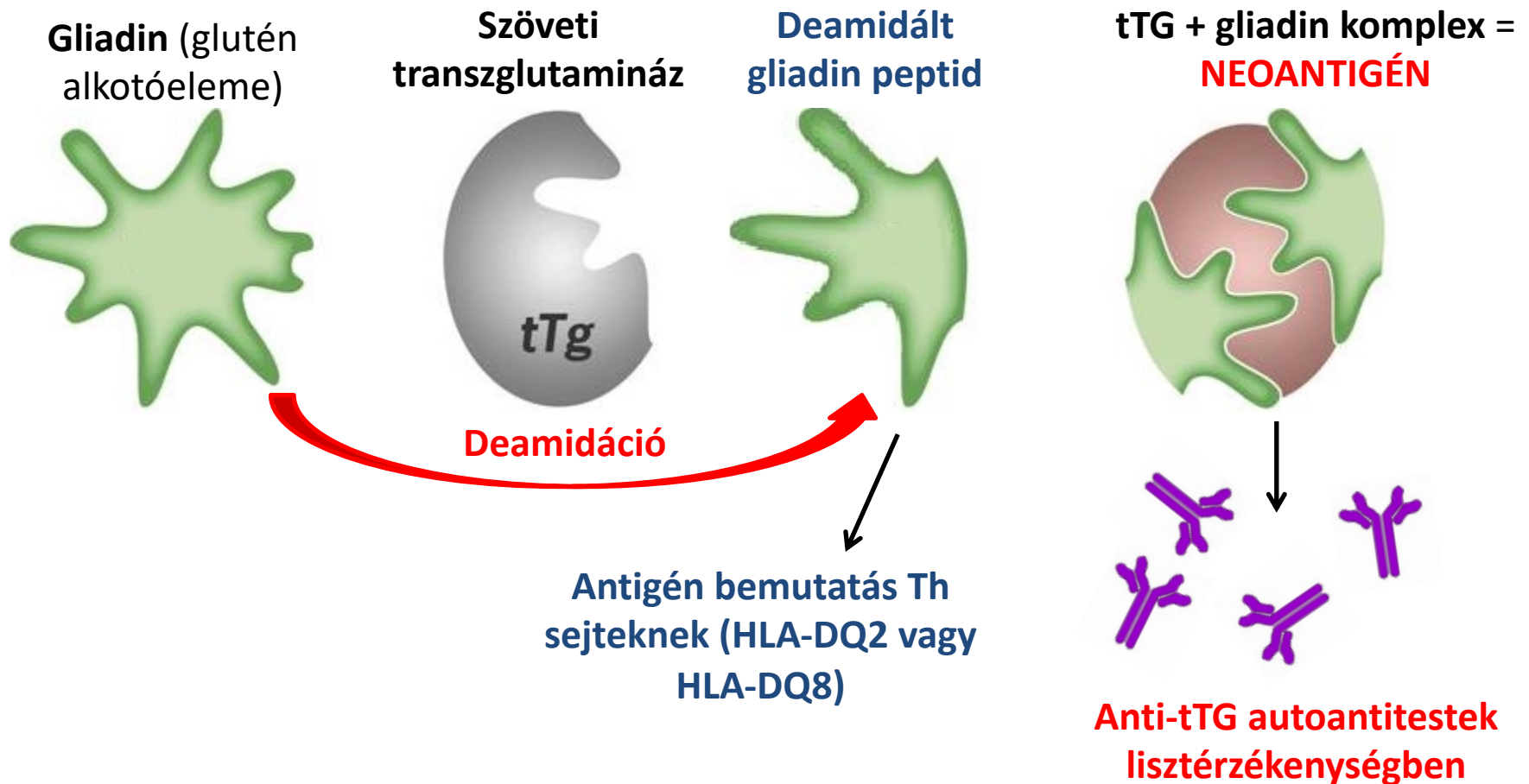


Molekuláris mimikri

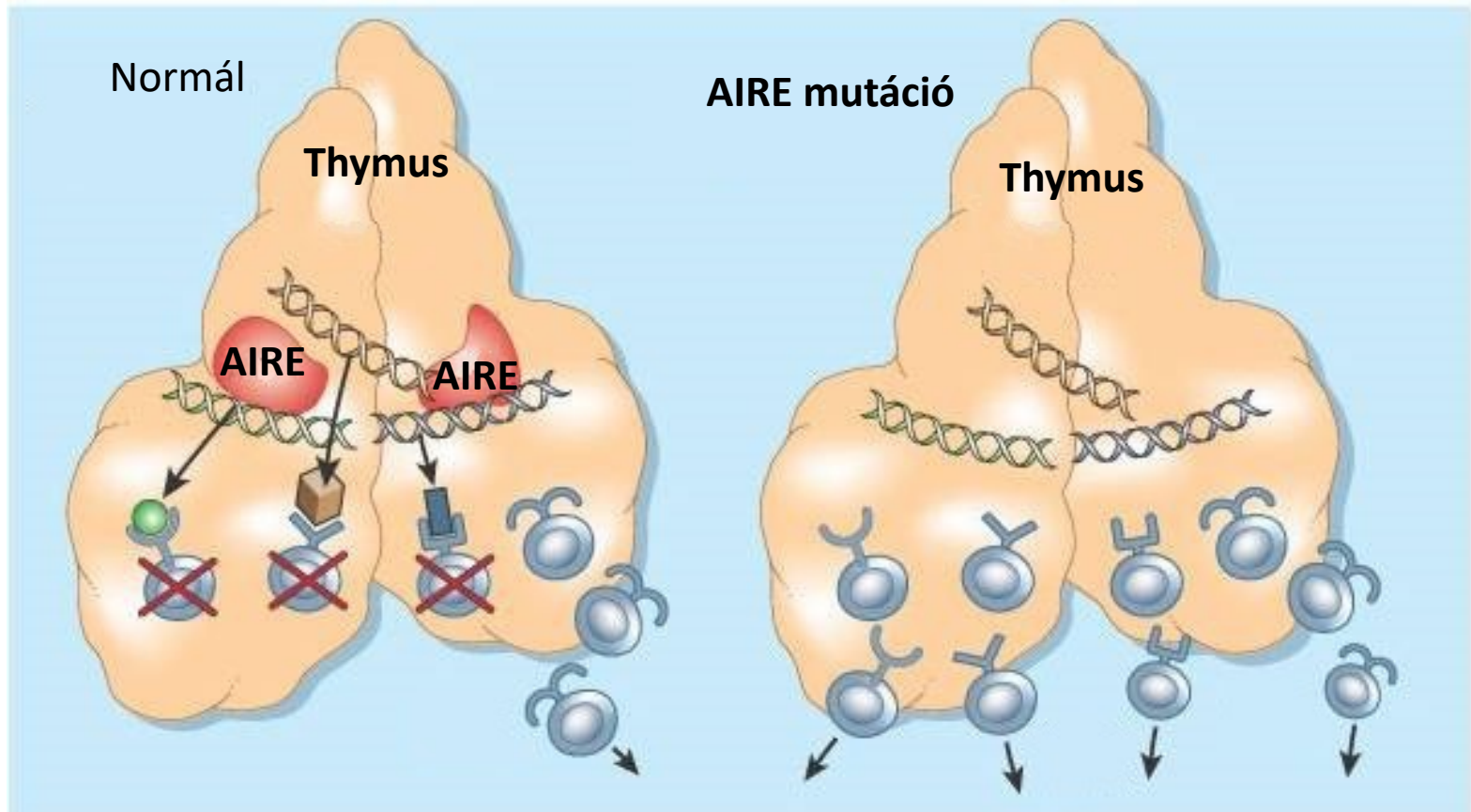
A kórokozó antigénje **szerkezeti hasonlóságot** mutat saját struktúrákkal. → Hajlamosító gének mellett **autoimmun keresztreakció** jön létre. (pl. Reumás láz *Streptococcus pyogenes* fertőzést követően)



Neoantigének keletkezése



Centrális tolerancia elvesztése



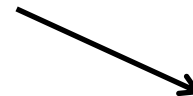
Negatív szelekció

Autoreaktív T-sejtek
kikerülnek a perifériára

APECED (Autoimmune polyendocrinopathy - candidiasis - ectodermal dystrophy)

Autoimmun kórképek csoportosítása

Autoimmun betegségek
(Részletesen lásd a klinikumban.)



Szisztémás kórképek
(Egész szervezetet érintik)

Szerv-specifikus kórképek
(Egy-egy konkrét szervet érintenek)



Rheumatoid arthritis



Addison-kór



Myasthenia gravis



Scleroderma
(Systemic sclerosis)



SLE (Systemic lupus erythematosus)



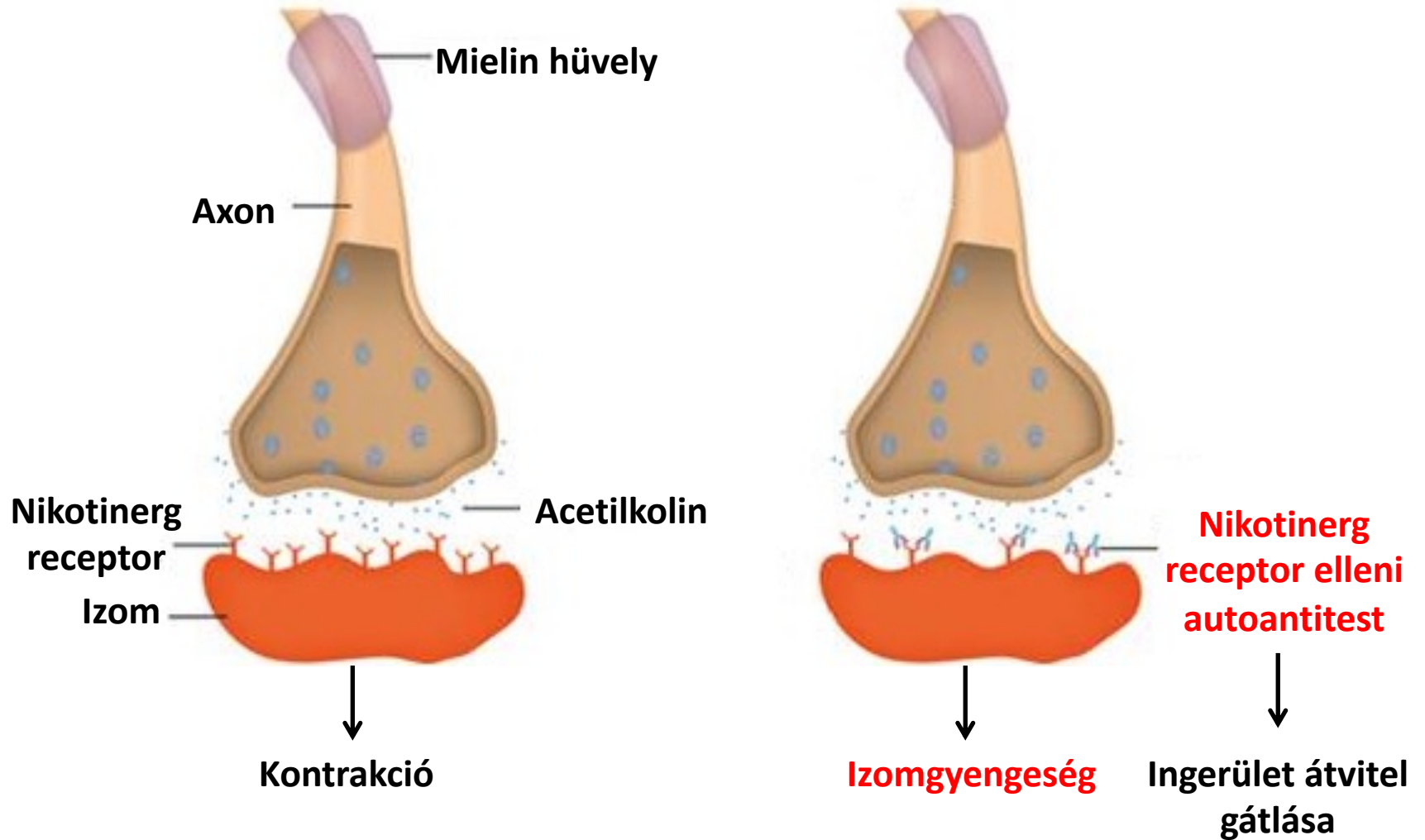
Graves-Basedow-kór



Szerv-specifikus autoantitestek

- Egy-egy adott szerv/szövetféleségre specifikus betegségben fordulnak elő.
- Példák az antitestek célpontjaira szerv-specifikus kórképek esetében:
 - I-es típusú cukorbetegség (IDDM): glutaminsav-dekarboxiláz (GAD), tirozin-foszfataáz-szerű fehérje (IA-2)
 - **Autoimmun pajzsmirigy-betegségek: tireoperoxidáz (TPO), tireoglobulin**
 - Goodpasture-szindróma: IV-es típusú kollagén (bazálmembrán a vesében és a tüdőben)
 - **Myasthenia gravis:** poszt-szinaptikus nikotinergerg **acetilkolin receptor** (neuromuszkuláris junkció)
 - **Lisztérzékenység (=cöliákia): szöveti transzglutamináz (tTG), endomízium, gliadin** (utóbbi az egyes gabonákban előforduló glutén alkotóeleme, tehát nem autoantigén!)
 - Primer biliáris cirrózis: különböző mitokondriális antigének
- Kimutatásuk **diagnosztikus** lehet és **prognosztikai jelentőséggel** bírhat, illetve alkalmas lehet a **betegség követésére**.

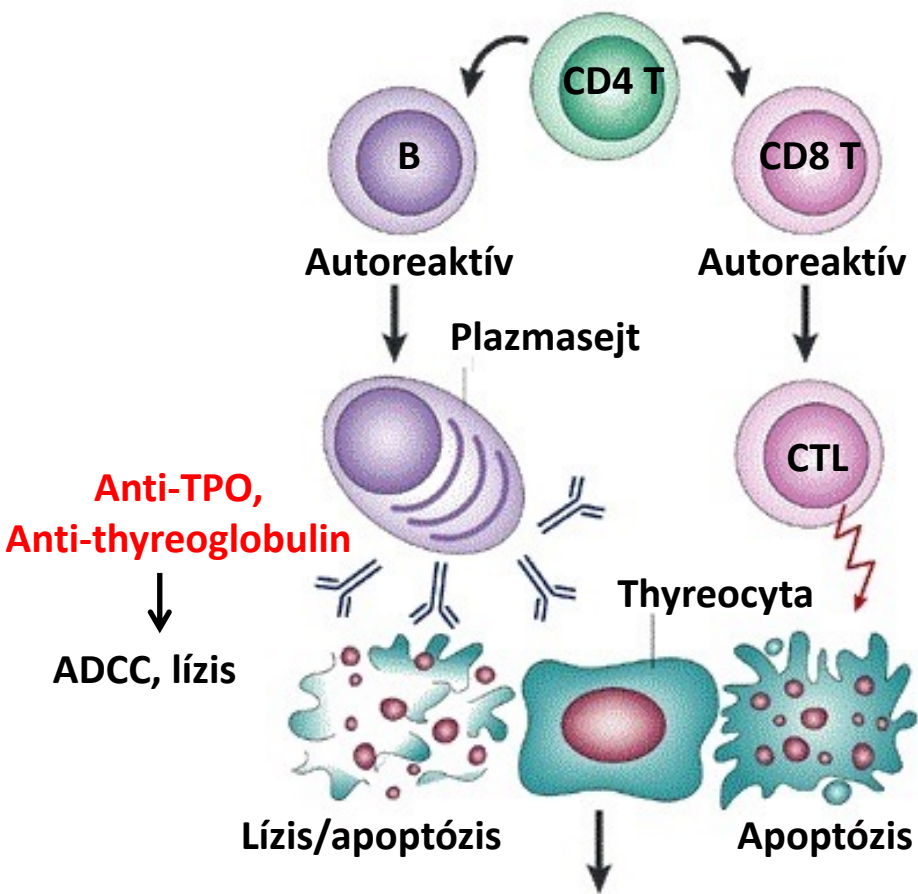
Myasthenia gravis



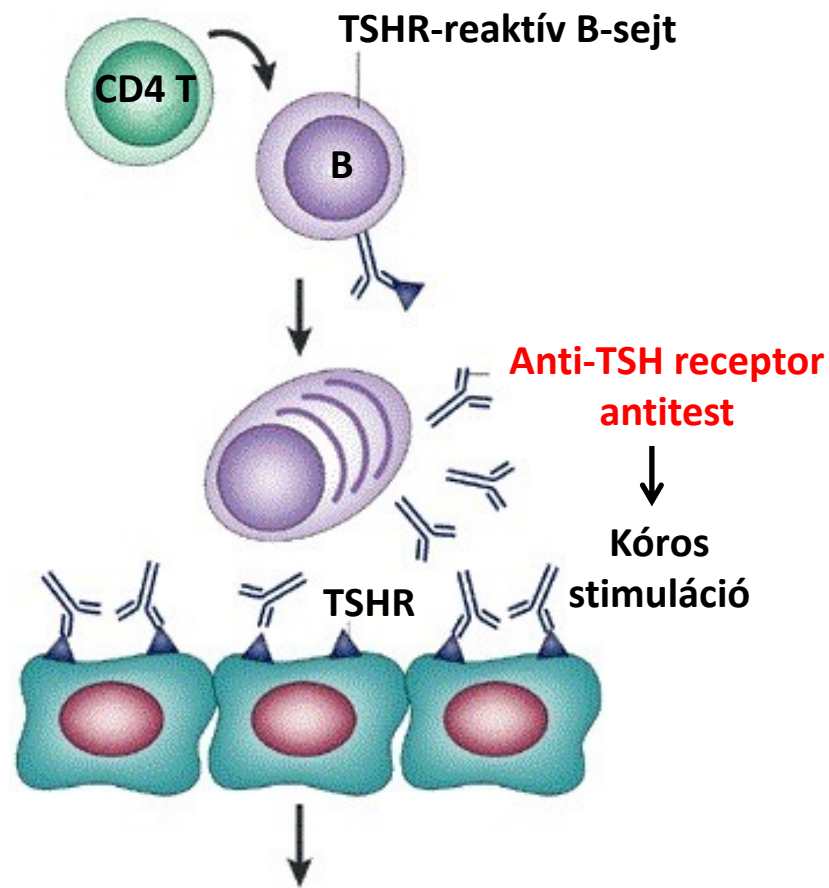
Autoimmun pajzsmirigy-betegségek

Hashimoto-thyreoiditis:

Graves-Basedow-kór:



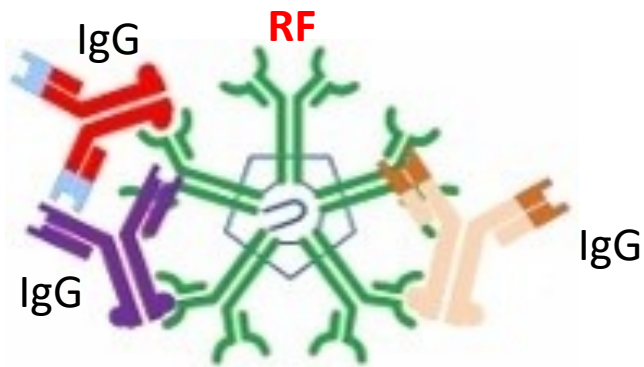
Hypothyreosis
(T3/T4↓, TSH↑)



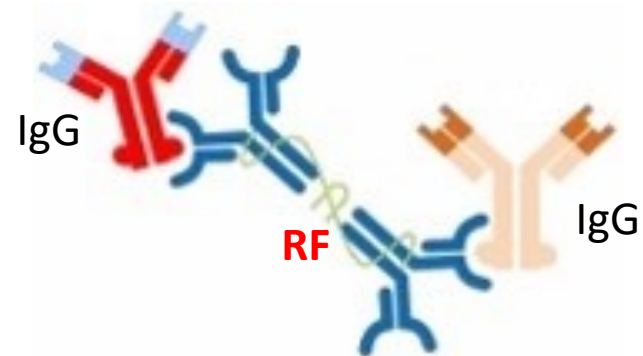
Hyperthyreosis
(T3/T4↑, TSH↓)

Szisztémás betegségeket jelző autoantitestek

- Példák:
 - **Anti-nukleáris antitestek** (ANA, anti-nuclear antibody)
 - Anti-citrullinált protein antitestek (ACPA, anti-citrullinated protein antibody)
 - **Anti-neutrophil citoplazmatikus antitestek** (ANCA, anti-neutrophil cytoplasmic antibody)
 - **Rheumatoid faktor** (RF, anti-IgG antitestek, általában IgM izotípusúak, de lehet IgG vagy IgA is)
 - Anti-foszfolipid autoantitestek (pl. anti-kardiolipin, anti- β 2 glikoprotein I)
- Kimutatásuk **diagnosztikus** lehet és **prognosztikai jelentőséggel** bírhat, illetve alkalmas lehet a **betegség követésére**.



IgM izotípusú rheumatoid faktor

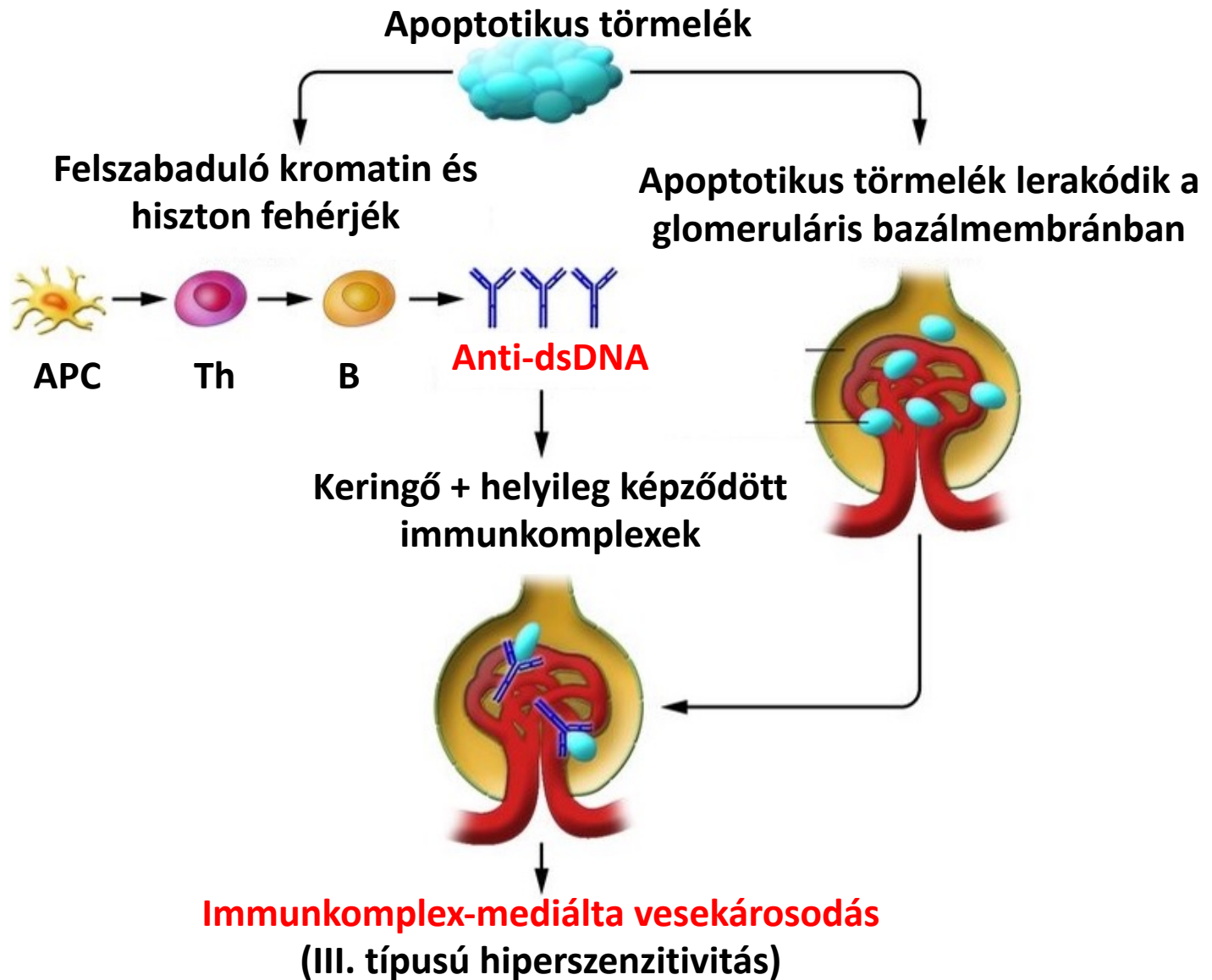


IgA izotípusú rheumatoid faktor

Anti-nukleáris antitestek (ANA)

- Valamilyen **sejtmagi struktúrát** ismernek fel, pl.:
 - **Kettőszálú DNS elleni antitest** (anti-dsDNA) → Elsősorban **SLE**
 - Anti-Smith (anti-SM), ribonukleoproteinek ellen → **SLE**
 - **Anti-Scl-70**, a topoizomeráz I ellen → **Scleroderma**
 - **Anti-centromer** antitestek → **Scleroderma**, primer biliaris cirrhosis
 - Anti-Ro (anti-SSA) és anti-La (anti-SSB) → Sjögren-szindróma, SLE
 - **Anti-Jo-1** a hisztidil-tRNS szintetáz ellen → **Polymyositis, dermatomyositis**
 - Anti-hisztin antitestek → Gyógyszer-indukálta SLE

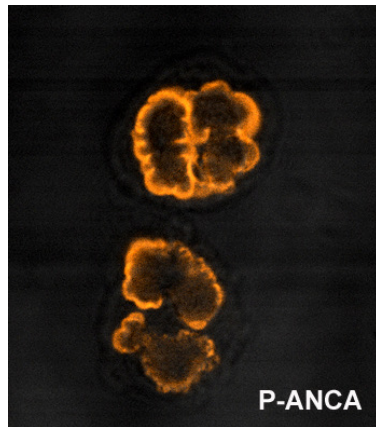
Lupus nephritis



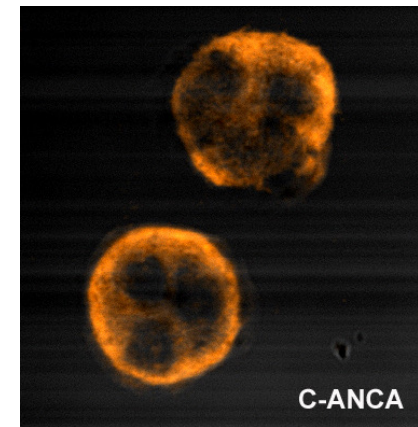
Anti-neutrofil citoplazmatikus antitestek (ANCA)

Két fő csoportjuk van:

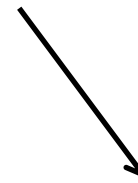
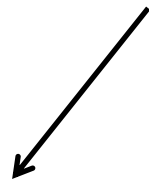
Perinukleáris mintázat (p-ANCA)



Citoplazmatikus mintázat (c-ANCA)



Indirekt immunfluoreszcens
mikroszkópia



- Antigén: főleg a **mieloperoxidáz** (MPO)
- Példák betegségekre (lásd klinikumban):
 - Colitis ulcerosa
 - Churg-Strauss szindróma
 - Mikroszkopikus polyangiitis
 - Primer sclerotizáló cholangitis

- Antigén: főleg a **proteináz 3** (PR3)
- Példák betegségekre:
 - Wegener granulomatosis (GPA: Granulomatosis with polyangitis)

Autoantitestek kimutatása

- **Szűrés (screening):**
 - **Direkt immunfluoreszcencia:** A beteg szövetmintáját vizsgálják. (pl. bőrgyógyászati és nefrológiai betegségek esetén, lásd klinikumban)
 - **Indirekt immunfluoreszcencia:** A beteg szérumát vizsgálják valamilyen sejtenyészetben vagy szöveten.
 - Az egyes autoantitestek eltérő **festődési mintázatokat** adnak a különböző sejt/szövetmintákon. (pl. homogén magfestődés, nukleoláris, centromer, mitokondriális, citoplazmatikus, stb.)
- **Antigén-specifikus** diagnosztikai vizsgálatok:
 - A szűrővizsgálat eredménye és/vagy a klinikai kép alapján, a **diagnózis megerősítésére.**
 - Módszerek:
 - **ELISA**
 - **Western blot**
 - **Radiális immundiffúzió**

} 6-8. gyakorlat

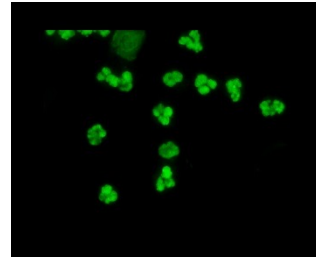


Vizsgálatok jellemzői

Immunfluoreszcencia: nem-specifikus, mintázatot ad, multiplex kép, manuális, sok autoantitest nem vizsgálható



Mi ez ?



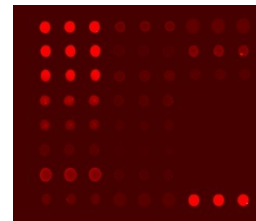
ELISA: antigén specifikus, egyedi autoantitestek mérése, automatizálható, új autoantigének felismerése



Idő ?

Multiplex microarray technológia: antigén specifikus, komplex autoantitest mintázat, automatizálható

Gyors, specifikus

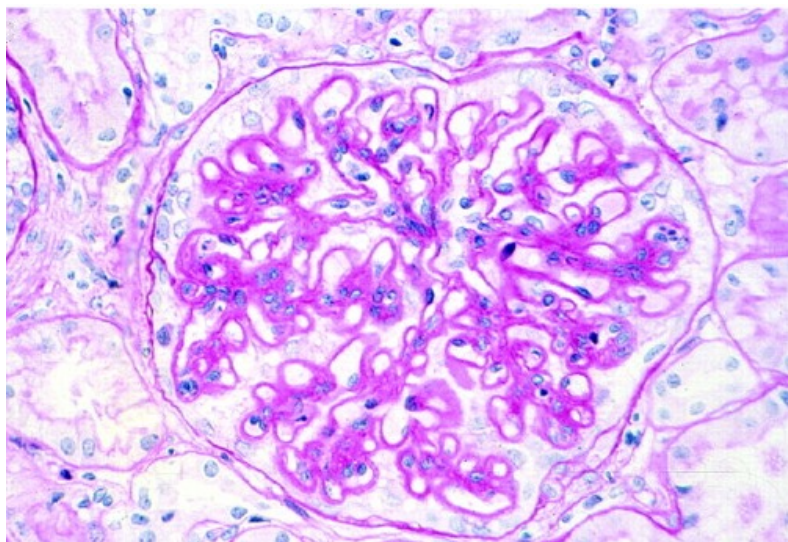


Immunfluoreszcencia I.

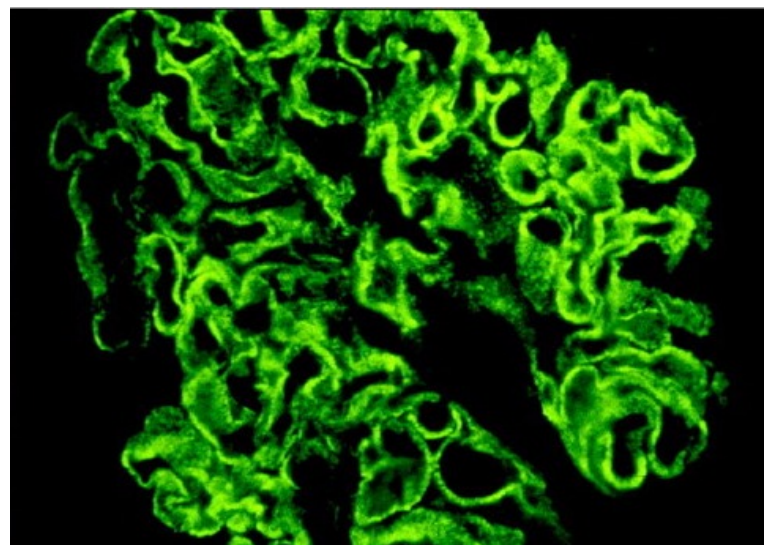
Direkt immunfluoreszcens vizsgálat SLE veseérintettségéről (lupus nephritis):

- Membranosus glomerulonephritis (lásd majd patológiából és nefrológiából)

1. Szövetteni mintavétel a betegből

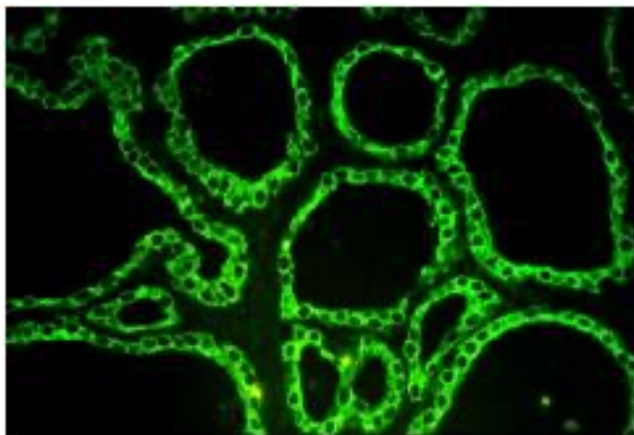


2. Glomerulus PAS-reakcióval:
megvastagodott bazálmembrán

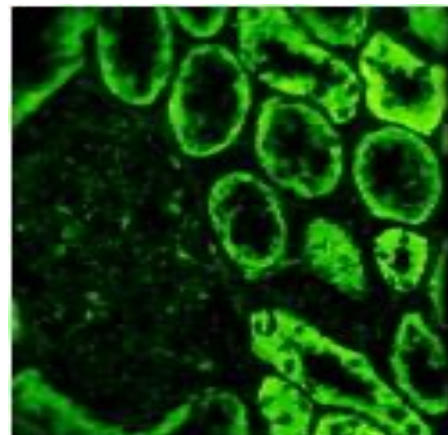


3. Glomerulus **direkt IF** vizsgálata:
IgG immunkomplexek lerakódása a
bazálmembránban (III. típusú hiperszenzitivitás)

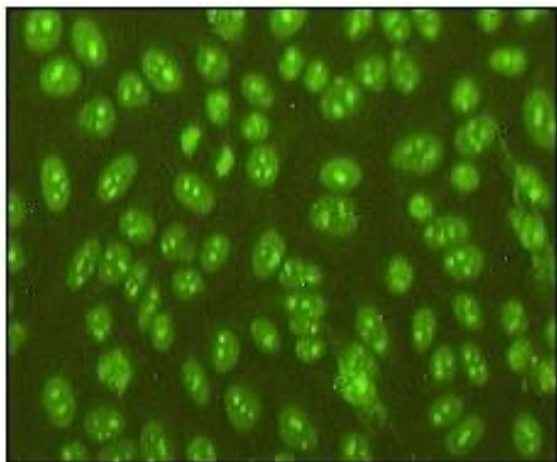
Immunfluoreszcencia II.



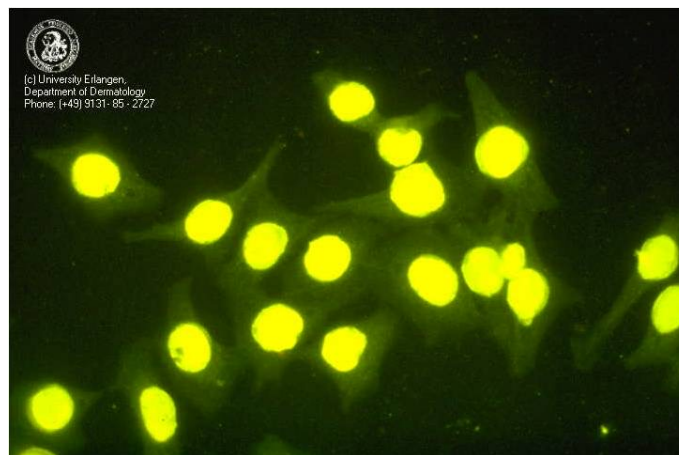
Anti-TPO autoantitestek kimutatása
pajzsmirigy szöveten



Mitokondriális festődési mintázat
vese szöveten



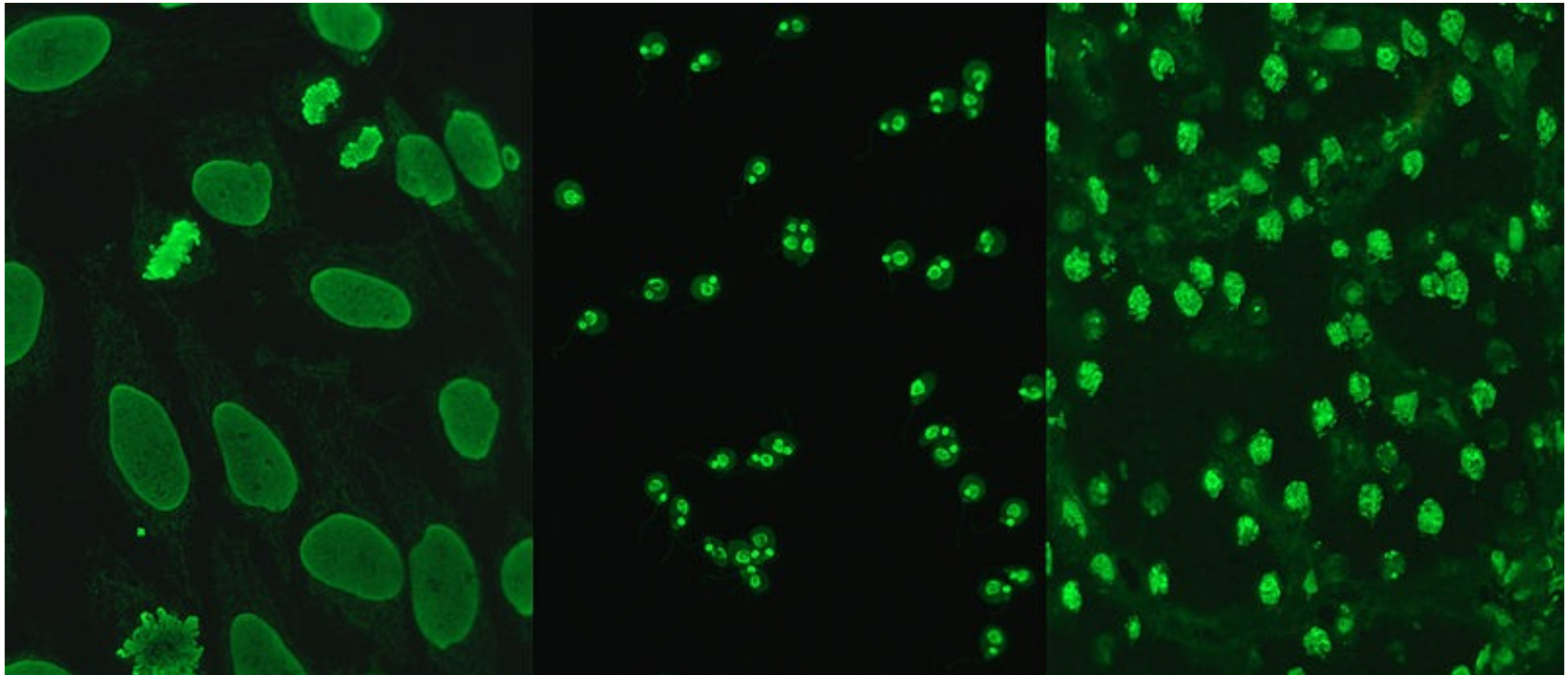
Nukleoláris magfestődés
Hep2 sejteken (anti-SSA)



Homogén magfestődés Hep2
sejteken (anti-dsDNA)

Immunfluoreszcencia III.

Anti-dsDNA kimutatása a beteg szérumból **indirekt immunfluoreszcens mikroszkópiával** különböző sejtípusok használatával:



HEp-20-10 sejttenyészet
(humán epiteliális tumor)

Crithidia luciliae sejtek
(protisza parazita)

Patkány májszövet

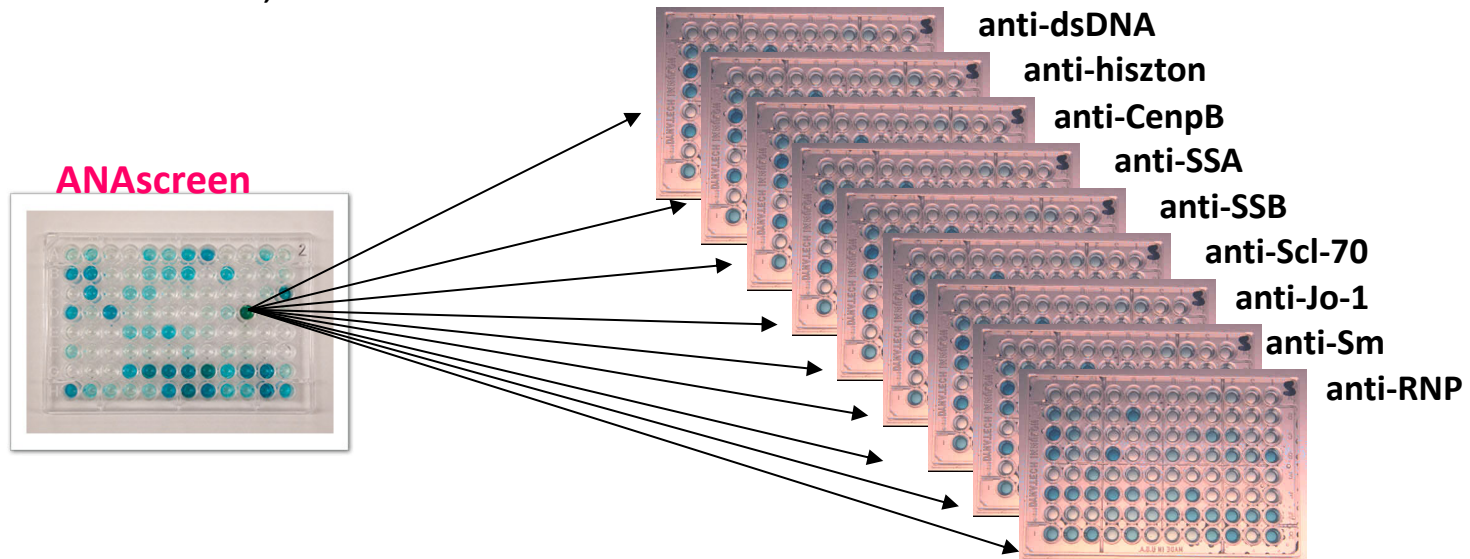
ANAscreen - microplate ELISA

Az ELISA lemezt Hep2 sejtek magjából kivont antigének keverékével érzékenyítik:

- dsDNA
- hiszton
- centromer
- SSA/Ro, SSB/La
- Sm, Sm/RNP
- Scl-70, Jo-1



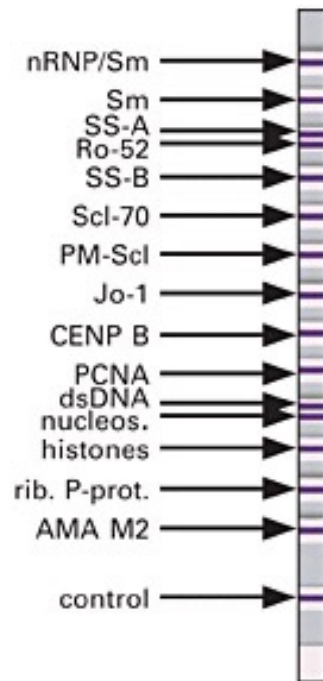
Pozitivitás esetén egy-egy antigénnel fedett külön ELISA lemezekon un. „kifejtő” vizsgálatok következnek



Multiplex immunszerológiai módszerek

1. **Immunoblot eljárás:** antigén denaturált konformációban, sok a fals pozitív/negatív reakció, nem elfogadott
2. **Protein chip módszerek: „microarray”:** - chip reader
 - üveg
 - műanyag
 - szilikon
 - nano-well
3. **Mikrogyöngy alapú módszerek:** - Flow citométer
 - Becton Dickinson
 - Bender MedSystem
 - Luminex platform

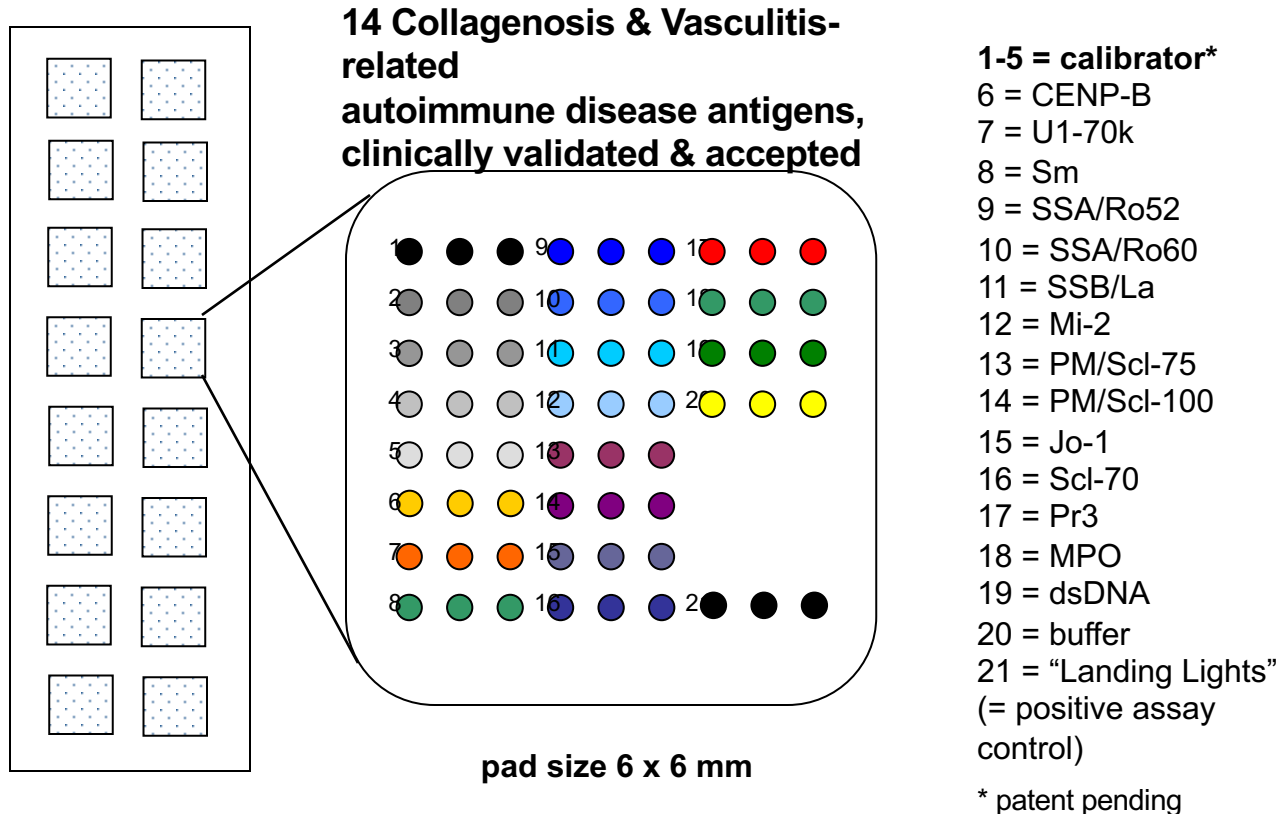
ANA-Profil Immunoblot



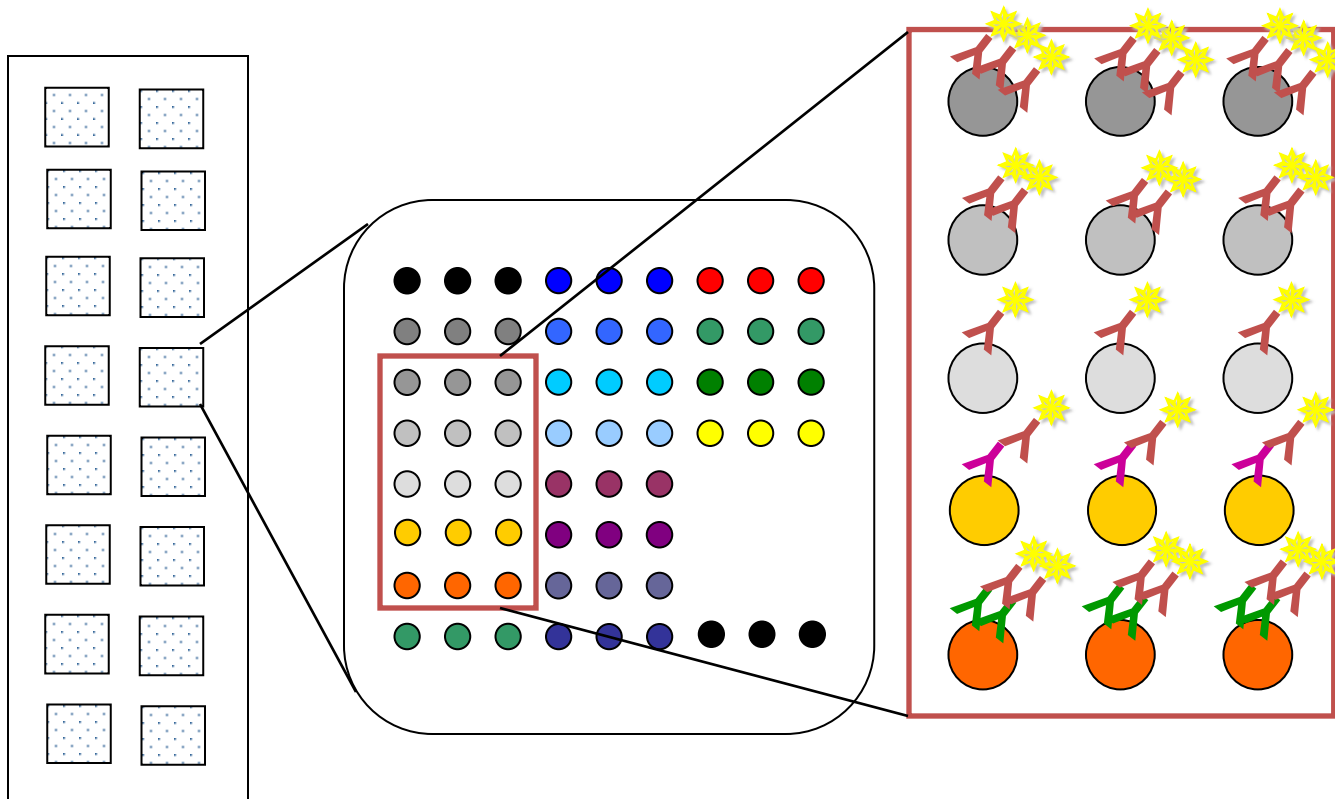
Előnye: - 1 beteg mintája is vizsgálható
- gyors

Hátrány: - antigén denaturált, nem megfelelő konformációban
- ál-negatív reakciók
- sok antigén nem vizsgálható

CombiChip Autoimmune 1.0 Layout



CombiChip Autoimmune 1.0 Layout



Hivatkozások (nincs sorban)

- Poletaev AB¹, et al.: **Immunophysiology versus immunopathology: Natural autoimmunity in human health and disease.** *Pathophysiology*. 2012 Jun;19(3):221-31. doi: 10.1016/j.pathophys.2012.07.003. Epub 2012 Aug 9.
- Nguyen TT¹, Elsner RA², Baumgarth N³: **Natural IgM prevents autoimmunity by enforcing B cell central tolerance induction.** *J Immunol*. 2015 Feb 15;194(4):1489-502. doi: 10.4049/jimmunol.1401880. Epub 2015 Jan 16.
- Binder CJ¹: **Naturally occurring IgM antibodies to oxidation-specific epitopes.** *Adv Exp Med Biol*. 2012;750:2-13. doi: 10.1007/978-1-4614-3461-0_1.
- Lutz HU¹: **Homeostatic roles of naturally occurring antibodies: an overview.** *J Autoimmun*. 2007 Dec;29(4):287-94. Epub 2007 Sep 12.
- Lutz HU¹, Binder CJ, Kaveri S: **Naturally occurring auto-antibodies in homeostasis and disease.** *Trends Immunol*. 2009 Jan;30(1):43-51. doi: 10.1016/j.it.2008.10.002. Epub 2008 Dec 4.
- Aziz M¹, et al.: **The role of B-1 cells in inflammation.** *Immunol Res*. 2015 Dec;63(1-3):153-66. doi: 10.1007/s12026-015-8708-3.
- Savage HP^{1,2}, Baumgarth N^{1,2,3}: **Characteristics of natural antibody-secreting cells.** *Ann N Y Acad Sci*. 2015 Jun 23. doi: 10.1111/nyas.12799.
- Grönwall C¹, Vas J, Silverman GJ: **Protective Roles of Natural IgM Antibodies.** *Front Immunol*. 2012 Apr 4;3:66. doi: 10.3389/fimmu.2012.00066. eCollection 2012.
- Elkon K¹, Casali P: **Nature and functions of autoantibodies.** *Nat Clin Pract Rheumatol*. 2008 Sep;4(9):491-8. doi: 10.1038/ncprheum0895.
- Grönwall C¹, Silverman GJ: **Natural IgM: beneficial autoantibodies for the control of inflammatory and autoimmune disease.** *J Clin Immunol*. 2014 Jul;34 Suppl 1:S12-21. doi: 10.1007/s10875-014-0025-4. Epub 2014 Apr 2.
- Cohen IR¹: **Biomarkers, self-antigens and the immunological homunculus.** *J Autoimmun*. 2007 Dec;29(4):246-9. Epub 2007 Sep 20.

Hivatkozások

- Vas J¹, Grönwall C, Silverman GJ: **Fundamental roles of the innate-like repertoire of natural antibodies in immune homeostasis.** *Front Immunol.* 2013 Feb 5;4:4. doi: 10.3389/fimmu.2013.00004. eCollection 2013.
- Xu X¹, et al.: **Human-derived natural antibodies: biomarkers and potential therapeutics.** *Future Neurol.* 2015;10(1):25-39.
- Casali P¹, Schettino EW: **Structure and function of natural antibodies.** *Curr Top Microbiol Immunol.* 1996;210:167-79.
- Panda S¹, Ding JL²: **Natural antibodies bridge innate and adaptive immunity.** *J Immunol.* 2015 Jan 1;194(1):13-20. doi: 10.4049/jimmunol.1400844.
- Mannoor K¹, Xu Y, Chen C: **Natural autoantibodies and associated B cells in immunity and autoimmunity.** *Autoimmunity.* 2013 Mar;46(2):138-47. doi: 10.3109/08916934.2012.748753. Epub 2013 Jan 10.
- Madi A¹, et al.: **The natural autoantibody repertoire in newborns and adults: a current overview.** *Adv Exp Med Biol.* 2012;750:198-212. doi: 10.1007/978-1-4614-3461-0_15.
- Kaveri SV¹: **Intravenous immunoglobulin: exploiting the potential of natural antibodies.** *Autoimmun Rev.* 2012 Sep;11(11):792-4. doi: 10.1016/j.autrev.2012.02.006. Epub 2012 Feb 12.
- Choi YS¹, et al.: **B-1 cells in the bone marrow are a significant source of natural IgM.** *Eur J Immunol.* 2012 Jan;42(1):120-9. doi: 10.1002/eji.201141890. Epub 2011 Nov 28.
- Rahyab AS¹, et al.: **Natural antibody - Biochemistry and functions.** *Glob J Biochem.* 2011;2(4):283-288.
- Baumgarth N¹: **The double life of a B-1 cell: self-reactivity selects for protective effector functions.** *Nat Rev Immunol.* 2011 Jan;11(1):34-46. doi: 10.1038/nri2901. Epub 2010 Dec 10.
- Chan AY^{1,2}, Anderson MS¹: **Central tolerance to self revealed by the autoimmune regulator.** *Ann N Y Acad Sci.* 2015 Nov;1356:80-9. doi: 10.1111/nyas.12960.

Hivatkozások

- Anaya JM¹: **The diagnosis and clinical significance of polyautoimmunity.** *Autoimmun Rev.* 2014 Apr-May;13(4-5):423-6. doi: 10.1016/j.autrev.2014.01.049. Epub 2014 Jan 11.
- Pisetsky DS¹: **Anti-DNA antibodies - quintessential biomarkers of SLE.** *Nat Rev Rheumatol.* 2015 Nov 19. doi: 10.1038/nrrheum.2015.151.
- Czömpöly T¹, et al.: **Anti-topoisomerase I autoantibodies in systemic sclerosis.** *Autoimmun Rev.* 2009 Jul;8(8):692-6. doi: 10.1016/j.autrev.2009.02.018. Epub 2009 Feb 13.
- Nihtyanova SI¹, Denton CP: **Autoantibodies as predictive tools in systemic sclerosis.** *Nat Rev Rheumatol.* 2010 Feb;6(2):112-6. doi: 10.1038/nrrheum.2009.238.
- Liberal R¹, et al.: **Diagnostic and clinical significance of anti-centromere antibodies in primary biliary cirrhosis.** *Clin Res Hepatol Gastroenterol.* 2013 Dec;37(6):572-85. doi: 10.1016/j.clinre.2013.04.005. Epub 2013 Jul 19.
- Zampieri S¹, et al.: **Anti-Jo-1 antibodies.** *Autoimmunity.* 2005 Feb;38(1):73-8.
- Aggarwal A¹: **Role of autoantibody testing.** *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 2014 Dec;28(6):907-20. doi: 10.1016/j.berh.2015.04.010. Epub 2015 May 23.
- Csernok E¹, Moosig F¹: **Current and emerging techniques for ANCA detection in vasculitis.** *Nat Rev Rheumatol.* 2014 Aug;10(8):494-501. doi: 10.1038/nrrheum.2014.78. Epub 2014 Jun 3.
- Poletaev AB¹, Stepanyuk VL, Gershwin ME: **Integrating immunity: the immunculus and self-reactivity.** *J Autoimmun.* 2008 Feb-Mar;30(1-2):68-73. doi: 10.1016/j.jaut.2007.11.012.
- Poletaev AB¹: **The immunological homunculus (immunculus) in normal state and pathology.** *Biochemistry (Mosc).* 2002 May;67(5):600-8.