

# Antigén-antitest reakciók modellezése és alkalmazás az ELISA immunkémiai vizsgálatban oldott antigén esetén

Készítette: Fedorszki Ádám

Témavezető: Pfeil Tamás

Alkalmazott Analízis és Számításmatematikai Tanszék

Budapest, 2023



- 1 Bevezetés
- 2 Az immunkomplex képződés dinamikája monoklonális oldat és oldott antigén esetén
- 3 Az immunkomplex képződés dinamikája poliklonális oldat és oldott antigén esetén
- 4 Összes komplex koncentrációja a teljes antigén koncentráció logaritmusának függvényében
- 5 Irodalomjegyzék

# Az immunkomplex képződés dinamikája monoklonális oldat és oldott antigén esetén

- $[AbAg]$ : az antigén-antitest komplex koncentrációja az idő függvényében.
- $[Ab]$ : a szabad antitestek koncentrációja, mint a  $t$  idő függvénye.
- $[Ag]$ : a szabad antigén koncentrációja, mint a  $t$  idő függvénye.
- $[Ab]_T$ : az antitestek kezdeti koncentrációja.
- $[Ag]_T$ : az antigén kezdeti koncentrációja.
- $k_a, k_d$ : a reakció asszociációs, illetve disszociációs reakciósebességi állandója.
- $K_D = \frac{k_d}{k_a}$  a disszociációs egyensúlyi állandó.

# Az immunkomplex képződés dinamikája monoklonális oldat és oldott antigén esetén

Az immunkomplex képződés dinamikáját monoklonális oldat és oldott antigén esetén az alábbi differenciálegyenlet írja le:

$$\frac{d[AbAg]}{dt} = k_a[Ab][Ag] - k_d[AbAg].$$

Érvényesek az anyagmegmaradási egyenletek:

- $[Ab]_T = [Ab] + [AbAg]$ ,
- $[Ag]_T = [Ag] + [AbAg]$ .

Ennek a differenciálegyenletnek egyetlen immunológiailag értelmes egyensúlyi pontja van:

$$[AbAg]_e = \frac{1}{2} \left( [Ab]_T + [Ag]_T + K_D - \sqrt{([Ab]_T + [Ag]_T + K_D)^2 - 4[Ab]_T[Ag]_T} \right).$$

# Az immunkomplex képződés dinamikája monoklonális oldat és oldott antigén esetén

A monoklonális oldat és oldott antigén esetén az immunológiai értelemszerű egyensúlyi értéket vizsgáltuk az  $\ln([Ag]_T)$  teljes antigén koncentráció logaritmus függvényében, a függvény a szimulációkban szigmoidnak bizonyult.

Az inflexióshoz tartozó  $y = [Ag]_T$  értékre eredményül az

$$(K_D - [Ab]_T) \cdot y + ([Ab]_T + K_D)^2 = y \cdot \sqrt{(y + [Ab]_T - K_D)^2 + 4 \cdot [Ab]_T \cdot K_D}. \quad (1)$$

implicit egyenletet kaptuk.

Az egyenletnek a Bolzano-tétel alapján létezik pozitív valós megoldása.

# Az immunkomplex képződés dinamikája monoklonális oldat és oldott antigén esetén

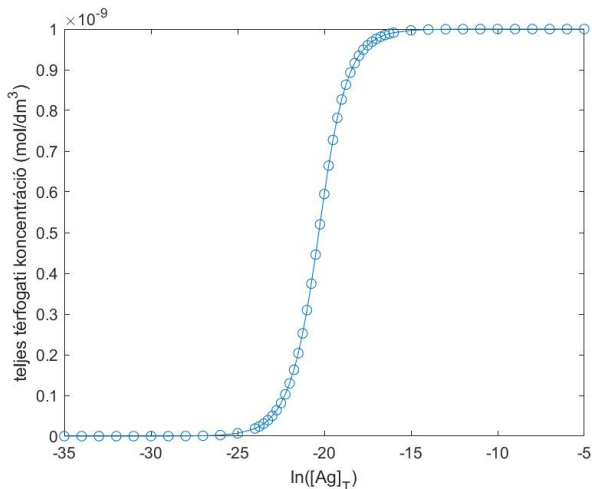
## 1. Szimuláció

Az 1. Szimuláció az immunkomplex képződés során az egyensúlyi immunkomplex koncentrációját írja le  $\ln([Ag]_T)$  függvényében monoklonális oldat és oldott antigén esetén. Az alábbi táblázat tartalmazza az 1. Szimulációbeli paramétereket, itt és később is  $M = \text{mol}/\text{dm}^3$  a térbeli koncentráció mértékegysége, neve molaritás.

Antitest klónok száma	$[Ab]_T$ (M)	$k_a$ ( $M^{-1}s^{-1}$ )	$k_d$ ( $s^{-1}$ )
1	$10^{-9}$	$10^5$	$10^{-4}$

Az 1. Szimuláció paraméterei

# Az immunkomplex képződés dinamikája monoklonális oldat és oldott antigén esetén



Komplex koncentrációk a teljes antigén koncentráció természetes alapú  
logaritmusának függvényében.

# Az immunkomplex képződés dinamikája monoklonális oldat és oldott antigén esetén

Az ábrán látott függvény szigmoid alakú, a (1) egyenlet egyetlen valós megoldása  $y = [Ag]_T = 1,572303 \cdot 10^{-9}$  M, amelyből az inflexiós pont értéke  $\ln([Ag]_T) = -20,2707$ .

Ha a monoklonális esetben  $[Ab]_T$ -t,  $[Ag]_T$ -t és  $K_D$ -t is a  $c$ -szeresére növeljük, akkor  $[AbAg]_e$  is a  $c$ -szeresére növekszik, ezért az  $[Ab]_T$  és  $K_D$  adatokkal jellemzett monoklonális oldat szigmoid görbéjéből a  $c \cdot [Ab]_T$  és  $c \cdot K_D$  adatokkal jellemzett vízszintes eltolással és függőleges nyújtással kapjuk, és ha  $[Ab]_T$  valamint  $K_D$  mellett a (1) egyenlet megoldása  $y$ , akkor  $c \cdot [Ab]_T$  és  $c \cdot K_D$  mellett  $c \cdot y$  megoldás. Az 1. Szimulációban  $K_D$  értékét változtatva számos szimulációt futattunk, hogy a monoklonális oldatot megismerjük.



# Az immunkomplex képződés dinamikája poliklonális oldat és oldott antigén esetén

Jelölések, ahol  $i = 1, \dots, n$ :

- $[Ab_i Ag]$ : az antigén-antitest komplex koncentrációja az idő függvényében.
- $[Ab_i]$ : a szabad antitestek koncentrációja, mint a  $t$  idő függvénye.
- $[Ag]$ : a szabad antigén koncentrációja, mint a  $t$  idő függvénye.
- $[Ab_i]_T$ : az antitestek kezdeti koncentrációja.
- $[Ag]_T$ : az antigén kezdeti koncentrációja.
- $k_{a_i}, k_{d_i}$ : a reakció  $n$  asszociációs, illetve disszociációs reakciósebességi állandója.
- $K_{D_i} = \frac{k_{d_i}}{k_{a_i}}$  a disszociációs egyensúlyi állandó.

# Az immunkomplex képződés dinamikája poliklonális oldat és oldott antigén esetén

Az immunkomplex képződés dinamikáját monoklonális oldat és oldott antigén esetén az alábbi differenciálegyenlet-rendszer írja le:

$$\left. \begin{aligned} \frac{d[Ab_1Ag]}{dt} &= k_{a_1}[Ab_1][Ag] - k_{d_1}[Ab_1Ag] \\ &\vdots \\ \frac{d[Ab_nAg]}{dt} &= k_{a_n}[Ab_n][Ag] - k_{d_n}[Ab_nAg] \end{aligned} \right\}.$$

Az anyagmegmaradási egyenletek pedig:

- $[Ab_i]_T = [Ab_i] + [Ab_iAg]$ , ahol  $i = 1, \dots, n$ .
- $[Ag]_T = [Ag] + \sum_{i=1}^n [Ab_iAg]$ .

# Az immunkomplex képződés dinamikája poliklonális oldat és oldott antigén esetén

## 2. Szimuláció

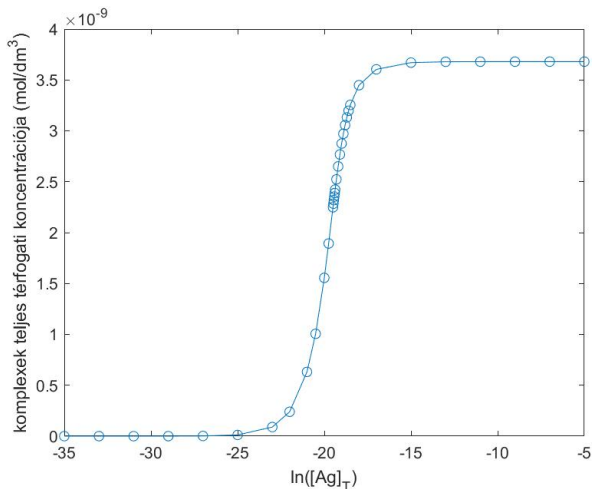
A 2. Szimulációban a nyugodt immunrendszer egyensúlyi összes komplex koncentrációját szimulálom  $\ln([Ag]_{\mathcal{T}})$  függvényében 10 klón esetén, amely akkor reális, amikor nem a teljes antigén-molekulát nyomtatják ki, csak egy részét, ami tartalmazza azt az epitópot, ahová az antitestek kötődnek. Az asszociációs és disszociációs reakciósebességi állandók lognormális eloszlásúak. Az  $[Ab_i]_{\mathcal{T}}$  értékeit véletlenszerűen egyenletes eloszlásúként választottuk a  $[\frac{2}{3} \cdot K_{D_i}; \frac{3}{4} \cdot K_{D_i}]$  intervallumból, ahol  $i = 1, \dots, 10$ . Az  $\ln([Ag]_{\mathcal{T}})$  értéke pedig befutja a  $[-35; -5]$  intervallumot, ahol  $[Ag]_{\mathcal{T}}$  mol/dm<sup>2</sup>-ben van megadva. A következő táblázat tartalmazza az egyes klónok paramétereit.

# Az immunkomplex képződés dinamikája poliklonális oldat és oldott antigén esetén

klónok	$K_D$ ( $M^{-1}$ )	$k_{a_i}$ ( $M^{-1}s^{-1}$ )	$k_{d_i}$ ( $s^{-1}$ )	$[Ab_i]_T$ (M)
$Ab_1Ag$	$4,1795 \cdot 10^{-11}$	$1,17 \cdot 10^6$	$4,89 \cdot 10^{-5}$	$3,0701 \cdot 10^{-11}$
$Ab_2Ag$	$8,4967 \cdot 10^{-11}$	$1,53 \cdot 10^5$	$1,30 \cdot 10^{-5}$	$6,3058 \cdot 10^{-11}$
$Ab_3Ag$	$2,4211 \cdot 10^{-10}$	$1,14 \cdot 10^6$	$2,76 \cdot 10^{-4}$	$1,6396 \cdot 10^{-10}$
$Ab_4Ag$	$5,5679 \cdot 10^{-10}$	$3,61 \cdot 10^5$	$2,01 \cdot 10^{-4}$	$4,1357 \cdot 10^{-10}$
$Ab_5Ag$	$5,8644 \cdot 10^{-10}$	$5,9 \cdot 10^4$	$3,46 \cdot 10^{-5}$	$4,2186 \cdot 10^{-10}$
$Ab_6Ag$	$6,0588 \cdot 10^{-10}$	$1,19 \cdot 10^5$	$7,21 \cdot 10^{-5}$	$4,0884 \cdot 10^{-10}$
$Ab_7Ag$	$1,2713 \cdot 10^{-9}$	$1,29 \cdot 10^5$	$1,64 \cdot 10^{-4}$	$8,7705 \cdot 10^{-10}$
$Ab_8Ag$	$5,6716 \cdot 10^{-10}$	$4,02 \cdot 10^5$	$2,28 \cdot 10^{-4}$	$4,0396 \cdot 10^{-10}$
$Ab_9Ag$	$1,5881 \cdot 10^{-10}$	$4,20 \cdot 10^5$	$6,67 \cdot 10^{-5}$	$1,1855 \cdot 10^{-10}$
$Ab_{10}Ag$	$1,0417 \cdot 10^{-9}$	$1,20 \cdot 10^5$	$1,25 \cdot 10^{-4}$	$7,7820 \cdot 10^{-10}$

A 2. Szimuláció paramétereit

# Az immunkomplex képződés dinamikája poliklonális oldat és oldott antigén esetén



Komplex koncentrációk a teljes antigén koncentráció természetes alapú  
logaritmusának függvényében.

# Az immunkomplex képződés dinamikája poliklonális oldat és oldott antigén esetén

Az egyensúlyi nemlineáris egyenletrendszer megoldását szimbolikusan végezzük a Matlab program segítségével. A megoldás során immunológiai szempontból csak azokat a valós megoldásokat keressük, amelyek mindegyik koordinátája pozitív.

Az ábra pontjait egy-egy szimulációval kaptuk. A számos szimuláció után különbségi hányados monotonitását vizsgálva becsültük az inflexiós pontot. Az alakváltást feltételezett pontja közelében újabb pontokban végeztük el a szimulációt, ezzel pontosítottuk a becslést. Ebből azt kaptuk, hogy az inflexiós ponthoz tartozó  $y = [Ag]_T$  a  $[-19, 475; -19, 425]$  intervallumba esik.

# Összes komplex koncentrációja a teljes antigén koncentráció logaritmusának függvényében

Az összes komplex egyensúlyi koncentrációja  $\ln([Ag]_T)$  függvényében a laborkísérletekben és a szimulációkban is szigmoidnak bizonyult. Ezt csak monoklonális esetben sikerült bizonyítanunk. Az [1] cikkbeli modell szerint felszínre kinyomtatott antigén esetén a fix  $k = 1$ -gyel illesztett Richards-függvény paramétereinek immunológiai jelentése van, ezért illesztettük az oldott antigén esetében is az összes komplex egyensúlyi koncentrációjára  $\ln([Ag]_T)$  függvényében Richards-függvényt. A Richards-függvény következő paraméterezését használtuk:

$$R(x) = A \cdot \left( 1 + (d - 1) \cdot e^{-k \cdot (x - x_i)} \right)^{\frac{1}{1-d}},$$

ahol  $A$  a felső aszimptota értéke,  $d$  az aszimmetria paraméter,  $k$  a kezdeti közel exponenciális növekedés rátáját befolyásolja  $d$ -vel együtt,  $x_i$  az inflexió pont.

# Összes komplex koncentrációja a teljes antigén koncentráció logaritmusának függvényében

## 3. Szimuláció

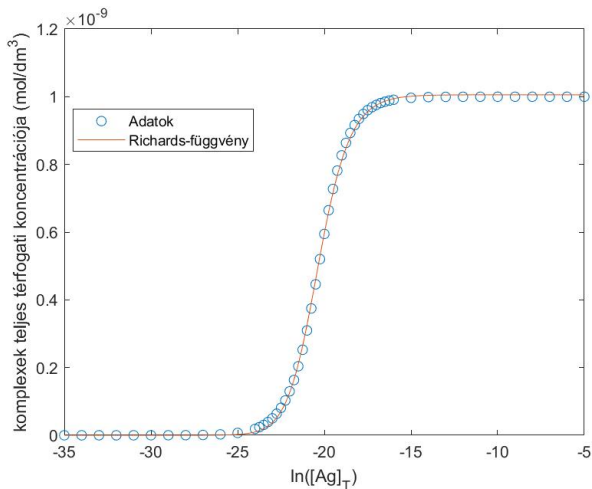
A 3. Szimulációban az 1. Szimuláció eredményéül kapott szigmoid görbére illesztettünk Richards-függvényt fix  $k = 1$ -gyel, melynek paraméterei  $A = 1,0056 \cdot 10^{-10}$ ,  $d = 1,6941$ ,  $x_i = -20,462$ .

## 4. Szimuláció

A 4. Szimulációban a 2. Szimuláció eredményéül kapott szigmoid görbére illesztettünk Richards-függvényt fix  $k = 1$ -gyel, melynek paraméterei  $A = 3,7426 \cdot 10^{-9}$ ,  $d = 1,3323$ ,  $x_i = -20,1163$ .

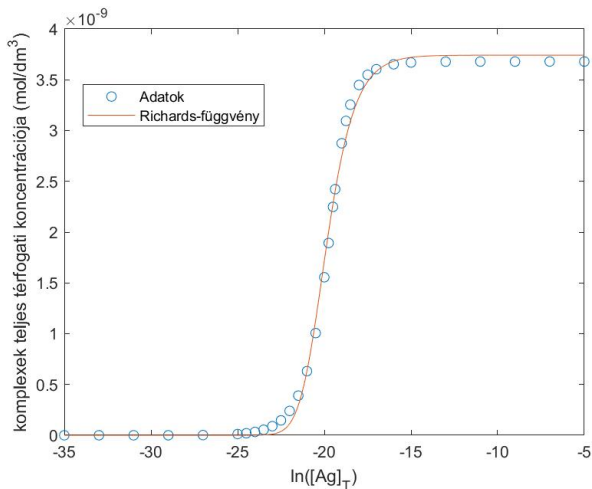


# Összes komplex koncentrációja a teljes antigén koncentráció logaritmusának függvényében



Az 1. Szimuláció szigmoid grafikonjára illesztett Richards-függvény.

# Összes komplex koncentrációja a teljes antigén koncentráció logaritmusának függvényében



Az 2. Szimuláció szigmoid grafikonjára illesztett Richards-függvény.

# Összes komplex koncentrációja a teljes antigén koncentráció logaritmusának függvényében

A monoklonális és 10 klónos poliklonális oldat eredményei után mono- és poliklonális oldat adatbázist építettünk, mely számos klónszámú oldatot tartalmaz, hogy lássuk mit jelentenek a Richards-paraméterek az oldott antigénes modellben. Célunk, hogy összefüggést találjunk a Richards-függvény paraméterei és a poliklonális oldat tulajdonságai között (az [1]-beli modell szerint  $x_i$  és a disszociációs állandó,  $d$  és az oldat heterogenitása között van kapcsolat). Az összefüggéseket majd össze tudjuk vetni olyan szérumokkal végzett mérések eredményeivel, melyek ismert kórtörténetű reumatoid arthritiszese betegektől származnak.

-  K. Papp, Á. Kovács, A. Orosz, Z. Hérincs, J. Randek, K. Liliom, T. Pfeil and J. Prechl Absolute Quantitation of Serum Antibody Reactivity Using the Richards Growth Model for Antigen Microspot Titration, *Sensors* 2022, 22, 3962
-  J. Prechl, K. Papp, Á. Kovács and T. Pfeil The Binding Landscape of Serum Antibodies: How Physical and Mathematical Concepts Can Advance Systems Immunology, *Antibodies* 2022, 11, 43.
-  Beatty, J.D.; Beatty, B.G.; Vlahos, W.G. Measurement of monoclonal antibody affinity by non-competitive enzyme immunoassay. *J. Immunol. Methods* 1987, 100, 173–179.
-  D. Yang, A. Singh, H. Wu, R Kroe-Barrett Comparison of biosensor platforms in the evaluation of high affinity antibody-antigen binding kinetics, *Analytical Biochemistry* 508 (2016) 78-96
-  T. R. Poulsen, A. Jensen, J. S. Haurum and P. S. Andersen Limits for Antibody Affinity Maturation and Repertoire Diversification in Hypervaccinated Humans, *The Journal of Immunology* 2011 187 (8): 4229–4235

# Köszönöm a figyelmet!