

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

Fedorszki Ádám
Témavezető: Pfeil Tamás

1. Bevezetés

Az önálló projekt keretén belül a feladatom antigén-antitest reakciók modellezése és a megoldások szimbolikus és numerikus vizsgálata oldott antigén esetén.

A szervezet reagálása az idegen anyagok ellen az immunválasz, mely sejtes és kémiai részből áll, az utóbbiban vesznek részt az antitestek, melyek reverzibilis reakcióba lépnek az antigénekkal, létrehozva az immunkomplexekeket. Az immunkomplex koncentrációja asszociáció révén növekszik, disszociáció útján csökken, az előbbi másodrendű, az utóbbi elsőrendű kémiai reakció.

Az ELISA egy általánosan használt analitikai biokémiai vizsgálat. Különböző ELISA eljárásokat különböztetünk meg. A szilárd fázisúban egy antigént rögzítünk a reakciótartály aljára, utána az antigénre ráengednek egy oldatot, amely olyan antitesteket tartalmaz, amik megkötik a rögzített antigént. Az oldott fázisúnál a vizsgált oldathoz oldott antigént kevernek, majd megvárják az egyensúlyhoz közeli állapotot. A kompetitív ELISA két lépésből áll, az első az oldott fázis, a második a szilárd fázis az első fázis egyensúlyi oldatával.

2. Az immunkomplex képződés dinamikája monoklonális oldat és oldott antigén esetén

Az immunkomplex-képződés dinamikájának vizsgálata során feltételezzük, hogy egy antigén és egy antitest molekula alkot immunkomplexe (monovalens reagensek), az oldatban szereplő szabad antigének és immunkomplexekek eloszlása minden időpillanatban homogén az oldatban.

Ezen felvételek mellett a monoklonális (azonos kémiai szerkezetű antitesteket tartalmazó) oldat reakciója oldott antigénnel leírható közös differenciálegyenlettel:

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

ahol $[Ab]$ a szabad antitestek koncentrációja, $[Ag]$ a szabad antigének koncentrációja, $[AbAg]$ az immunkomplexe koncentrációja az idő függvényében, k_a , k_d az $Ab+Ag \rightleftharpoons AbAg$ reakció asszociációs, illetve disszociációs reakciósebességi állandója, és érvényesek az anyagmegmaradási egyenletek: $[Ab]_T = [Ab] + [AbAg]$, $[Ag]_T = [Ag] + [AbAg]$. Ennek a differenciálegyenletnek egyetlen immunológiailag értelmes egyensúlyi pontja van:

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

ahol $K_D = \frac{k_d}{k_a}$ a disszociációs egyensúlyi állandó.

A monoklonális oldat és oldott antigén esetén az immunológiailag értelmes egyensúlyi értéket vizsgáltuk az $\ln([Ag]_T)$ teljes antigén koncentráció logaritmus függvényében, a függvény a szimulációkban szigmoidnak bizonyult. Az inflexiós ponthoz tartozó $y = [Ag]_T$ értékre eredményül az

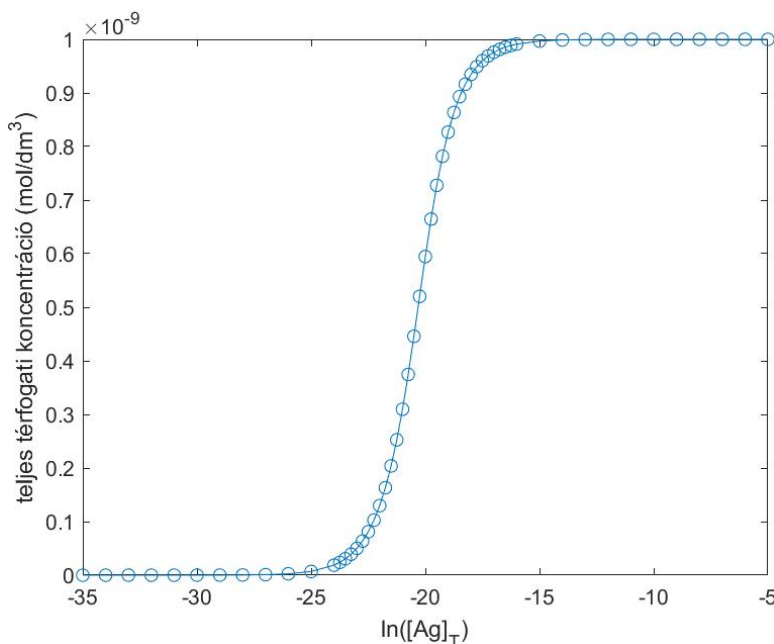
$$(K_D - [Ab]_T) \cdot y + ([Ab]_T + K_D)^2 = y \cdot \sqrt{([Ab]_T + y + K_D)^2 - 4[Ab]_T y} \quad (2.1)$$

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

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 térfeltelt 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}

1. táblázat. Az 1. Szimuláció paraméterei



1. ábra. Komplex koncentrációk a teljes antigén koncentráció természetes alapú logaritmusának függvényében.

Az 1. ábrán látott függvény szigmoid alakú, a 2.1 egyenlet egyetlen valós megoldása $y = [Ag]_T = 1,572303 \cdot 10^{-9}$, 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 2.1 egyenlet megoldása y , akkor $c \cdot [Ab]_T$ és $c \cdot K_D$ mellett $c \cdot y$. Az 1. Szimulációban K_D értéket változtatva számos szimulációt futattunk, hogy a monoklonális oldatot megismerjük.

3. Az immunkomplex képződés dinamikája poliklonális oldat és oldott antigén esetén

Poliklonális oldat esetén a komplexek képződésének dinamikáját írjuk le közönséges differenciálegyenlet-rendszerrel. Ebben az esetben n fajta antitest molekulát vizsgálunk az oldatban, akkor a reakció során n fajta antigén-antitest komplex alakul ki. Így n egyenletből álló differenciálegyenlet-rendszerrel írjuk le a reakciót:

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

ahol $[Ab_i]$ az i . típusú szabad antitest klónok koncentrációja, $[Ag]$ a szabad antigének koncentrációja, $[Ab_iAg]$ az i . típusú komplex koncentrációja az idő függvényében, k_{a_i} , k_{d_i} az $Ab_i + Ag \rightleftharpoons Ab_iAg$ reakció asszociációs, illetve disszociációs reakciósebességi állandói, az anyagmegmaradási egyenletek pedig: $[Ab_i]_T = [Ab_i] + [Ab_iAg]$,

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

Ezek alapján a differenciálegyenlet-rendszer:

$$\left. \begin{aligned} \frac{d[Ab_1Ag]}{dt} &= k_{a_1}([Ab_1]_T - [Ab_1Ag]) \left([Ag]_T - \sum_{i=1}^n [Ab_iAg] \right) - k_{d_1}[Ab_1Ag] \\ &\vdots \\ \frac{d[Ab_nAg]}{dt} &= k_{a_n}([Ab_n]_T - [Ab_nAg]) \left([Ag]_T - \sum_{i=1}^n [Ab_iAg] \right) - k_{d_n}[Ab_nAg] \end{aligned} \right\}.$$

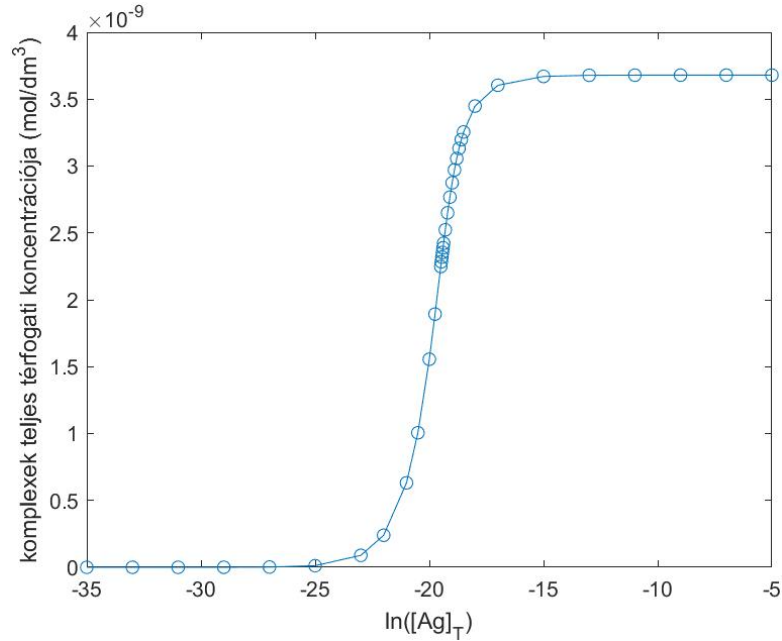
A leírtakat Matlab szoftvert használva numerikus szimulációk segítségével illusztráltuk. A múlt félévben a differenciálegyenlet-rendszer egyensúlyi pontját és annak stabilitását vizsgáltuk. A témavezetőmmel közösen igazoltuk, hogy egyetlen immunológilag értelmes egyensúlyi pont van és ez aszimptotikusan stabil. Ezen modellhez egy 10 klónból álló reális szimulációt készítettünk. A modellben szereplő reakció asszociációs, illetve disszociációs reakciósebességi állandóit egy kísérletes cikk alapján választottuk. Az adatokat lognormális eloszlásúnak találtuk, ami összhangban van azzal, hogy a reakciósebességi állandókat és a disszociációs egyensúlyi állandót egy korábbi kísérletes cikkben lognormálisnak igazolták.

2. Szimuláció. A 2. Szimulációban a nyugodt immunrendszer egyensúlyi összes komplex koncentrációját szimulálom $\ln([Ag]_T)$ 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 egyensúlyi állandók lognormális eloszlásúak. Az $[Ab_i]_T$ 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 $\ln([Ag]_T)$ értéke pedig befutja a $[-35; -5]$ intervallumot, ahol $[Ag]_T$ mol/dm²-ben van megadva. Az 2. táblázat tartalmazza az egyes klónok paramétereit.

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	$1,5881 \cdot 10^{-10}$	$4,20 \cdot 10^5$	$6,67 \cdot 10^{-5}$	$1,1855 \cdot 10^{-10}$
$Ab_{10}Ag$	$1,0417 \cdot 10^{-9}$	$1,20 \cdot 10^5$	$1,25 \cdot 10^{-4}$	$7,7820 \cdot 10^{-10}$

2. táblázat. Az 2. Szimuláció paramétereit

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.



2. ábra. Komplex koncentrációk a teljes antigén koncentráció természetes alapú logaritmusának függvényében.

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.

4. Összes komplex koncentrációja a teljes antigén koncentráció logaritmusának függvényében

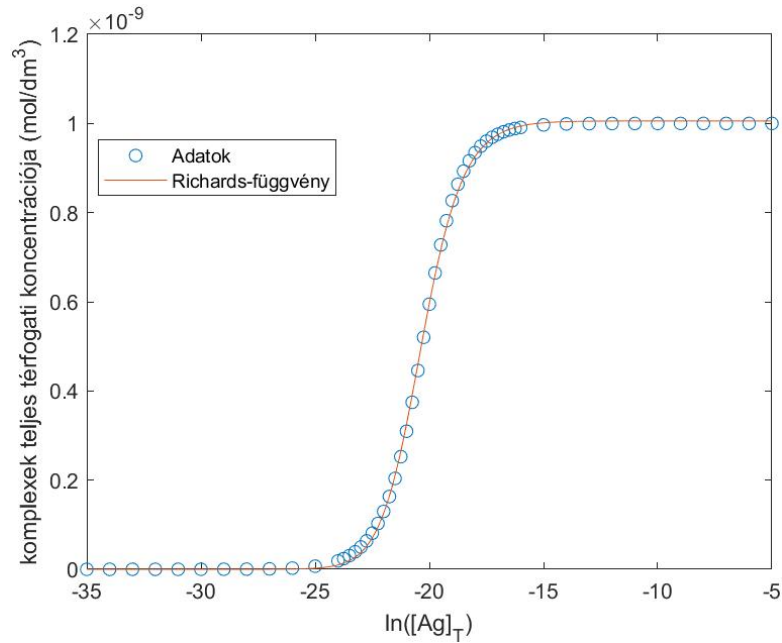
Az összes komplex egyensúlyi koncentrációja $\ln([Ag]_T)$ függvényében a laborkísérletekben és a szimulációkban is szigmoidnak bizonyult. Ezt csak monoklonális esetben sikerült bizonyítanunk. Az [1] cikkbeli modell szerint felszínre kinyomtatott antigén esetén a fix $k = 1$ -gyel illesztett Richards-függvény paramétereinek immunológiai jelentése van, ezért illesztettük az oldott antigén esetében is az összes komplex egyensúlyi koncentrációjára $\ln([Ag]_T)$ függvényében Richards-függvényt. Az általunk vizsgált modell felszínre kinyomtatott antigén esetén bizonyos tekintetben jobb, más szempontból kevésbé jó modellje az immunkomplex-képződésnek, mint az [1]-beli poliklonális lineáris modell.

A Richards-függvény következő paraméterezését használtuk:

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

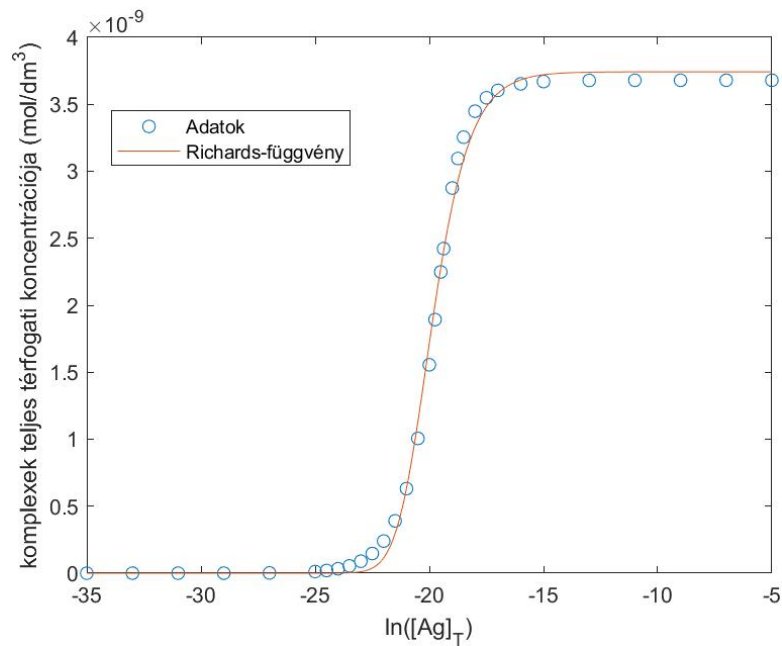
ahol A a felső aszimptota értéke, d az aszimmetria paraméter, k a kezdeti közel exponenciális növekedés rátáját befolyásolja d -vel együtt, x_i az inflexiós pont.

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



3. ábra. Az 1. Szimuláció szigmoid grafikonjára illesztett Richards-függvény.

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



4. ábra. Az 2. Szimuláció szigmoid grafikonjára illesztett Richards-függvény.

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 artritiszes betegektől származnak.

Hivatkozások

- [1] 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
- [2] 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.
- [3] 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.
- [4] 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
- [5] 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