Univerzita Karlova

Přírodovědecká fakulta

Studijní program:

Biochemie

Matúš Jurkovič

Nepřímé metody detekce HPV-specifických protilátek
Indirect methods for the detection of HPV-specific antibodies

Typ závěrečné práce:

Bakalářská práce

Vedoucí práce/Školitel:

Doc. RNDr. Ruth Tachezy, Ph.D.

Praha, 2025

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Při přípravě této bakalářské práce jsem využil ChatGPT a Grammarly za účelem systematické rešerše literatury a asistované editace textu. Klíčové prompty, které jsem použil, jsou následující: „Uveď literaturu o hladinách HPV-specifických protilátek u pacientů a zdravé populace," „Skontroluj gramatiku v tomto odstavci beze změn v slovosledu, či formulací." Po použití tohoto nástroje jsem důkladně revidoval a upravil obsah podle potřeby a plně přejímám odpovědnost za výslednou podobu práce.

V Praze dne 17.5.2025 .....

Abstrakt

Tato bakalářská práce se zabývala nepřímými metodami detekce protilátek specifických vůči časným proteinům lidských papilomavirů (HPV). HPV se přenáší nejčastěji pohlavně a způsobují řadu benigních i maligních onemocnění. Detekce protilátek vůči patogenu, namísto detekce samotného patogenu nebo jeho částí, je podstatou diagnostického přístupu zvaného sérologie. Detekce HPV-specifických protilátek má význam u onkologických pacientů s HPV-asociovanými nádory, které nevykazují prekancerózní stádia a první diagnostika odhalí již rozvinutý nádor. Nejčastěji využívanými metodami sérologických stanovení jsou GST-ELISA a Luminex. Obě tyto metody využívají rekombinantní antigeny pro zachycení protilátek a následnou imunochemickou detekci zachycených protilátek. Pro diagnostiku HPV-asociovaných nádorových onemocnění se navrhuje využití sérologické detekce protilátek vůči časným virovým proteinům HPV, které se do procesu karcinogeneze přímo zapojují. Dosud publikovaná data ukazují, že k dostatečné citlivosti záchytu rizikových pacientů bude třeba detekovat HPV-specifické protilátky proti více než jednomu antigenu. Cílem praktické části mé práce bylo připravit antigeny pro detekci HPV-specifických protilátek a ověřit jejich funkčnost na kontrolních sérech pacientů s nádory hlavy a krku.

Klíčová slova: časný virový protein, protilátka, GST-ELISA, antigen, sérum

Abstract

This bachelor's thesis dealt with indirect methods for detecting antibodies specific to early human papillomavirus (HPV) proteins. HPVs are most commonly transmitted sexually and cause a variety of benign and malignant diseases. Detection of antibodies to the pathogen, rather than detection of the pathogen itself or parts of the pathogen, is the essence of the diagnostic approach called serology. The detection of HPV-specific antibodies is important in cancer patients with HPV-associated tumours that do not show precancerous stages, and the first diagnosis reveals an already developed tumour. GST-ELISA and Luminex are the most commonly used serological methods. Both of these methods use recombinant antigens to capture antibodies and subsequent immunochemical detection of the captured antibodies. For the diagnosis of HPV-associated cancers, the use of serological detection of antibodies to early HPV viral proteins directly involved in the process of carcinogenesis is proposed. The data published so far show that detection of HPV-specific antibodies against more than one antigen will be necessary to detect at-risk patients with sufficient sensitivity. The aim of the practical part of my work was to prepare antigens for the detection of HPV-specific antibodies and to verify their functionality on control sera of patients with head and neck cancer.

Key words: early viral protein, antibody, GST-ELISA, antigen, serum

[IN CZECH]

Poděkování

Práce byla vypracována v rámci projektu Národní institut virologie a bakteriologie (Program EXCELES, ID: LX22NPO5103) – Financovaného Evropskou unií – NextGenerationEU.

Za podporu, odborné vedení a pomoc při vypracování této bakalářské práce děkuji své vedoucí práce a školitelce doc. RNDr. Ruth Tachezy, Ph.D. Za spolupráci a vedení při laboratorní práci děkuji RNDr. Martině Salákové, Ph.D., RNDr. Ingrid Polákové, Ph.D., M.Phil., Madihe Kanwal, Ph.D., a RNDr. Janě Šmahelové. RNDr. Vierke Ludvíkové a RNDr. Michalovi Šmahelovi, Ph.D., děkuji za darovaný materiál. Dále bych chtěl poděkovat celému kolektivu laboratoří Molekulární a nádorové virologie a Imunoterapie v BIOCEVu, a také své rodině a přátelům.

OBSAH

1 Úvod 10
2 Literání přehled 11
2.1 HPV 11
2.2 Časné virové proteiny E2, E4, E6 a E7 12
2.2.1 E2 12
2.2.2 E4 13
2.2.3 E6 & E7 13
2.3 Onemocnění spojené s HPV 14
2.4 Reakce imunitního systému 15
2.4.1 Aktivace imunitního systému 15
2.4.2 Protilátky proti časným virovým proteinům 16
2.5 Metody detekce HPV-specifických protilátek 17
2.5.1 Sérologie 17
2.5.2 GST-ELISA 18
2.5.3 Luminex 19
2.5.4 Radioimunochemické metody 20
2.5.5 Standardizace serologických testů 20
3 Cíle práce 22
4 Materiál a metody 23
4.1 Použité chemikálie 23
4.1.1 Různé chemické látky 23
4.1.2 Biologický materiál a enzymy 25
4.1.3 Pacientské vzorky a kontrolní séra 25
4.1.4 Protilátky 26
4.1.5 Pufry 26
4.1.6 Komerční kity 27
4.2 Použité přístroje 27
4.3 Použité metody 29
4.3.1 Mikrobiologické metody 29
4.3.2 Biochemické metody 31
4.3.3 Vyhodnocování výsledků 36
5 Výsledky 38
5.1 Mikrobiologické metody 38

5.2 Restrikční analýza 38
5.3 Sangerova sekvenace 39
5.4 Westernblot 41
5.5 ELISA 43
6 Diskuze 46
7 Závěr 51
Seznam literatury 52

Seznam zkratek

AMP	ampicilin
APS	persulfát amonný (z ang. *ammonium persulphate*)
BIC	bikarbonátový pufr (z ang. *bicarbonate buffer*)
bp	pár bazí (z ang. *base pair*)
CD	karbenicilin (z ang. *carbenicilin*)
CO	limitní hodnota (z ang. *cut off*)
DAG	z *ang. donkey anti-goat*
DTT	dithiothreitol
E. coli	*Escherichia coli*
E1–E8	časné virové proteiny (z ang. *early viral protein*)
ELISA	enzymový imunotest (z ang. *enzyme-linked immunosorbent assay*)
GC	glutathion-kasein (z ang. *glutathione-casein*)
GST	glutathion-S-transferasa
HPV	lidský papilomavirus (z ang. *human papillomavirus*)
IPTG	isopropyl β-d-1-thiogalaktopyranosid
L1, L2	pozdní virové proteiny (z ang. *late viral protein*)
LB	živné médium pro růst bakterií (z ang. *lysogenic broth*)
MCS	klonovací místo (z ang. *multiple cloning site*)
OD_{600}	optická denzita při vlnové délce 600 nm
ON	přes noc (z ang. *overnight*)
OPD	*o*-fenylendiamin (z ang. *o-phenylenediamine*)
PBS	fosfátový pufr (z ang. *phosphate buffered saline*)
PMSF	fenylmethylsulfonyl fluorid (z ang. *phenylmethylsulfonyl fluoride*)
PRB	retinoblastomový protein
REA	restrikční endonukleasová analýza
RIA	radioimunotest (z ang. *radioimmunoassay*)
RIPA	radioimunoprecipitační test (z ang. *radioimmunoprecipitation assay*)
RPM	otáčky za minutu (z ang. *revolutions per minute*)
SDS	sodný dodecylsulfát
SDS-PAGE	polyakrylamidová elektroforéza v prostředí SDS (z ang. *SDS-polyacrylamide gel electrophoresis*)
SOB	super optimální živné médium (z ang. *super optimal broth*)
SOC	super optimální živné médium s katabolickou represií (z ang. *super optimal broth with catabolic repression*)
TBE	Tris-borát-kys. ethylendiaminotetraoctová
TEMED	tetramethylethylendiamin
VLP	viru-podobná částice (z ang. *virus-like particle*)
WHO	Světová zdravotnická organizace (z ang. *World health organization*)

Seznam značek a symbolů

×	krát
× *g*	násobek gravitačního zrychlení
°C	stupeň Celsia
A	enzymová aktivita
c	koncentrace
g	gram
h	hodina
kDa	kilodalton
l	litr
mA	miliampér
min	minuta
ml	mililitr
mmol/l	milimol na litr
mol/l	mol na litr
ng/µl	nanogram na mikrolitr
nm	nanometr
pmol/µl	pikomol na mikrolitr
s	sekunda
U/ml	enzymová jednotka (Unit) na mililitr
V	volt
V	objem
µl	mikrolitr

1 Úvod

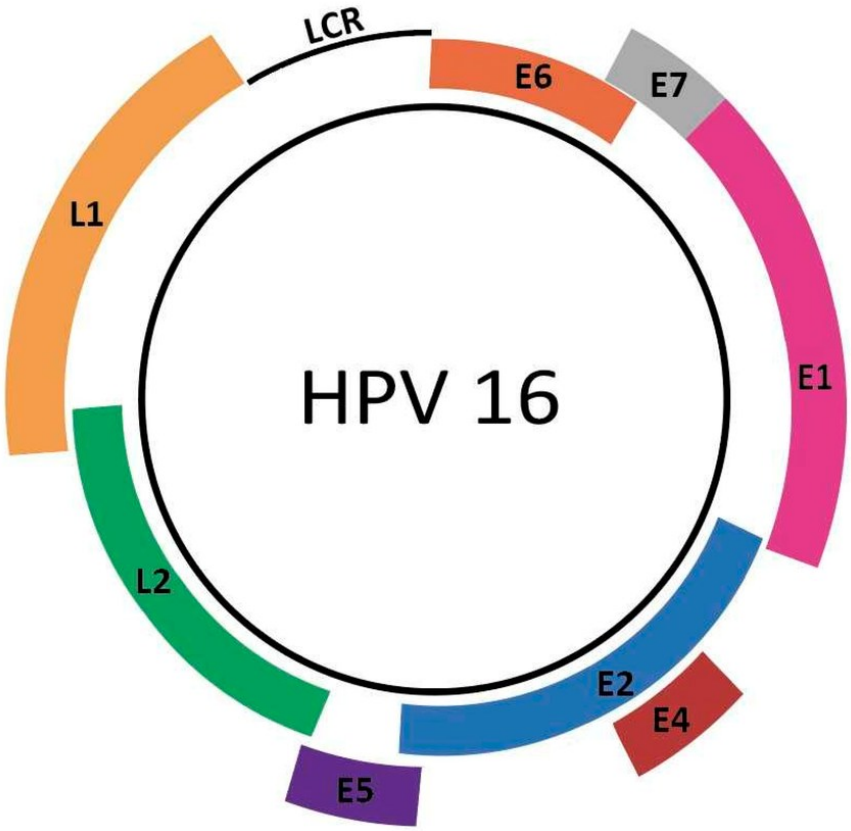
Lidské papilomaviry (HPV, z ang. *human papillomavirus*) jsou pohlavně přenosné viry, které napadají buňky epitelu kůže a sliznic. Většina infekcí proběhne bezpříznakově, ale HPV způsobují i řadu nezhoubných i zhoubných onemocnění. Z maligních onemocnění jsou tyto viry odpovědné především za téměř všechny případy karcinomu děložního čípku, za část nádorů anogenitálního traktu mužů a žen a za nádory hlavy a krku v oblasti orofaryngu. Virus syntetizuje řadu proteinů, které využívá ke svému množení či ochranu před obrannými mechanismy lidského těla. Tyto proteiny se dělí na časné a pozdní virové proteiny, podle toho, kdy dochází k jejich syntéze. Tělo rozeznává časné i pozdní virové proteiny jako cizí antigeny a začne se bránit tvorbou protilátek. Právě protilátky tvořené vůči proteinům HPV jsou cílem detekční metody sérologie. Serologická detekce protilátek specifických pro pozdní virové proteiny HPV se využívá pro epidemiologické studie, zatímco detekce protilátek proti časným virovým proteinům ukazuje potenciál pro využití při včasné diagnostice nádorových onemocnění asociovaných s HPV, především pro ty, pro něž neexistují klinicky identifikovatelná premaligní stádia. Detekční metody využívané v serologické diagnostice jsou založené na imunochemické detekci. Pro tuto detekci se nejčastěji sleduje vazba antigenu s protilátkou, kde antigen (časný virový protein) je syntetizován v rekombinantním systému a protilátky pocházejí přímo z pacientského séra.

Cílem této práce je shrnutí problematiky využití nepřímých metod v diagnostice HPV, se zaměřením na HPV-specifické protilátky proti časným proteinům a příprava těchto antigenů pro detekci HPV-specifických protilátek.

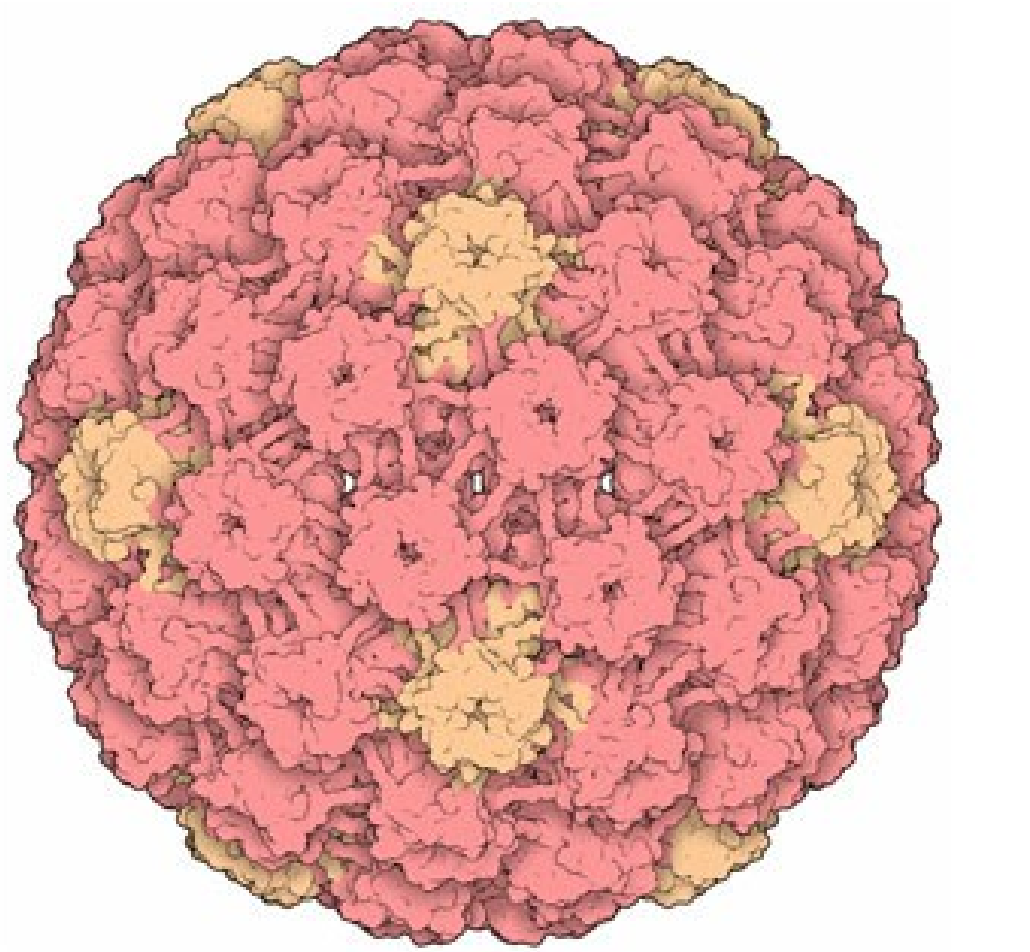
2 Literární přehled

2.1 HPV

HPV jsou neobalené viry (bez lipidového obalu), patřící do čeledi *Papillomaviridae*. Jedná se o DNA viry s kruhovou dvouvláknovou genetickou informací. Genom HPV (o délce ~ 8000 bp [1], viz Obr. 1) obsahuje, kromě regulačních prvků, i geny kódující časné proteiny (*E1* až *E8,* z ang. *early viral protein)* a pozdní proteiny (*L1* a *L2,* z ang. *late viral protein)* [2]. Proteiny *L1* a *L2* jsou označovány jako velký (*L1*) a malý (*L2*) kapsidový protein a jsou odpovědné za tvorbu proteinového obalu viru (kapsidy). Kapsida je tvořena ze 72 symetrických pentamerických podjednotek (kapsomer) hvězdicového tvaru o velikosti 11–12 nm [3] (viz Obr. 2, str. 12). Celková velikost viru je ~ 60 nm [1]. HPV jsou dnes klasifikovány dle sekvence *L1* proteinu a mezi nejrizikovější a nejčastější patří typy HPV16 a HPV18, které jsou odpovědné za 70 % karcinomů děložního čípku [4].



Obr. 1 Mapa genomu HPV16*. Na kruhovém genomu (černá kružnice) jsou vyznačeny geny pro syntézu časných (E1 až E7) a pozdních (L1 a L2) virových proteinů. Zkratkou LCR je označen dlouhý kontrolní úsek (ang. pro long control region), který obsahuje regulační elementy transkripce (promotory, enhancery). Na obrázku není znázorněn E8, který však vzniká alternativním sestřihem – více uvedeno v [5]. Většina sekvencí se překrývá, což naznačuje, že alternativní sestřih sekvencí je preferovanou strategií při transkripci. Převzato a upraveno z: [6]*

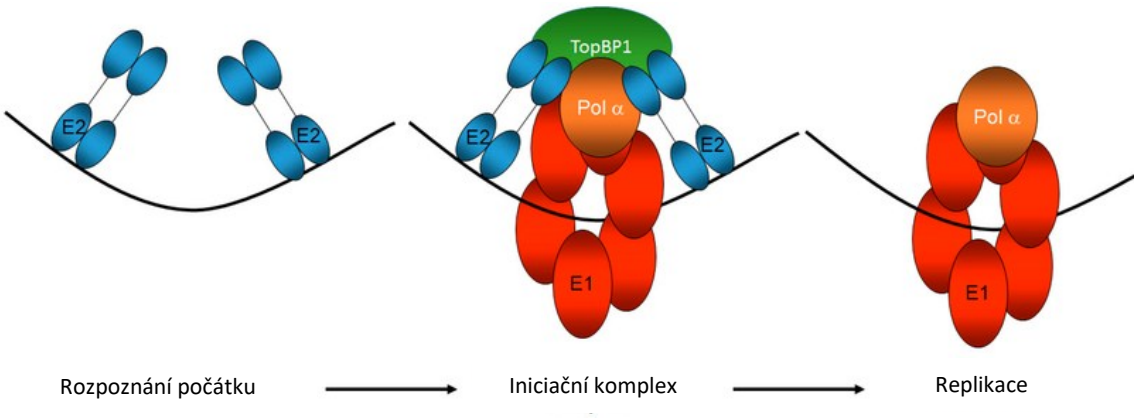


***Obr. 2 Kapsida HPV**. Na obrázku je vidět vnější struktura HPV, složená z pentamerů proteinů L1 organizovaných do hvězdicovitého tvaru. Každý červený pentamer sousedí se šesti a každý žlutý pentamer sousedí s pěti dalšími pentamery. Zdroj: [7]*

2.2 Časné virové proteiny E2, E4, E6 a E7

2.2.1 E2

Časné virové proteiny, na rozdíl od pozdních, nemají stavební funkci, ale jsou odpovědné za virovou replikaci, expresi genů či obranu vůči mechanismům imunitního systému hostitele. Protein E2 je pro životní cyklus HPV nepostradatelný, jelikož zabezpečuje transkripci genů pro syntézu dalších virových proteinů, ale i replikaci virového genomu [8]. Proto je E2 syntetizován všemi typy HPV. Protein E2 napomáhá iniciaci replikace vazbou na konsensuální sekvence v genomu HPV (E2-vazebná místa) a řídí vazbu E1 (virová helikasa) na místo počátku replikace (viz Obr. 3, str. 13) [9]. Primární úlohou E2 při transkripci je zprostředkování vazby proteinů hostitele na genom HPV [10]. Alternativním sestřihem E2 vzniká i fúzní protein E8ˆE2, který se pomocí E2 části váže do E2-vazebných míst a pomocí E8 domény zprostředkovává vazbu represorových proteinů, čímž dochází k inhibici transkripce [8, 11].



***Obr. 3 Role E2 při replikaci genomu HPV**. Dimer E2 rozeznává místo počátku replikace. Dimery E2 vázané na DNA zprostředkovávají vazbu proteinu E1 (helikasa) a TopBP1, který následně umožní vazbu hostitelské DNA-polymerasy (Pol α). Tyto proteiny spolu tvoří iniciační komplex pro replikaci. Virová helikasa E1 a hostitelská polymerasa jsou z komplexu uvolněny a spolu provádějí replikaci virového genomu. Převzato a upraveno z: [12].*

2.2.2 E4

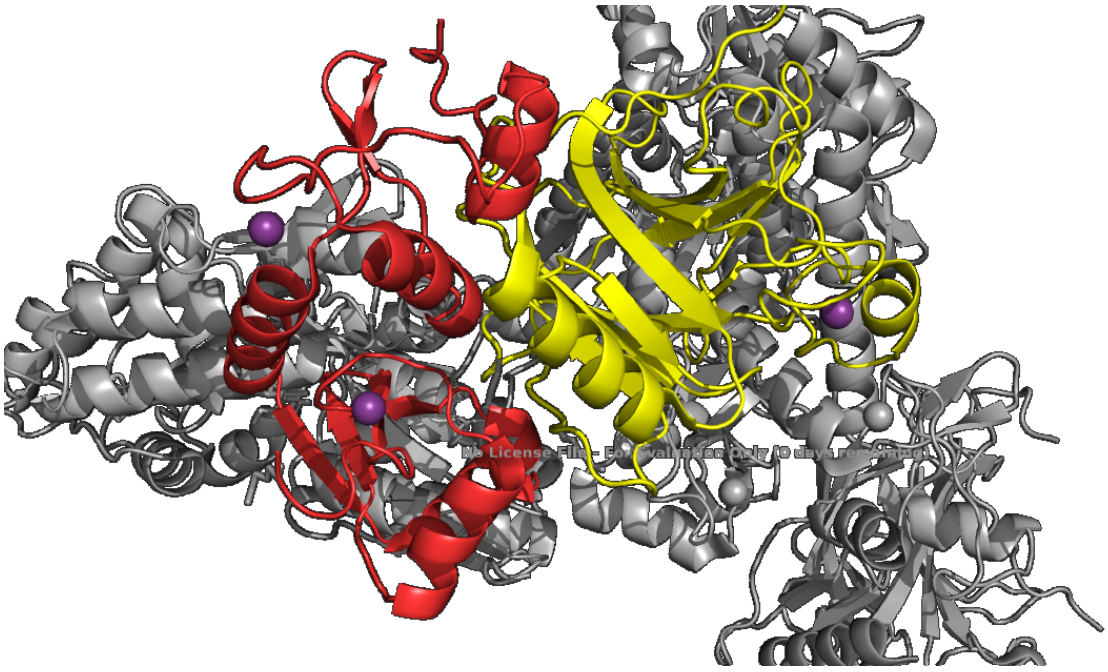
Role E4 v životním cyklu HPV je, podobně jako E2 a E1, spojená s replikací viru. Důležitý je také vliv E4 na skládání virových částic, jelikož pouze buňky exprimující E4 jsou schopny syntetizovat protein L1 tvořící virovou kapsidu [13]. Studie poukazují na možné využití typově specifických protilátek vůči E4 jako biomarkeru produktivní virové infekce, stádia onemocnění a také určení typu HPV, který je původcem nákazy [14, 15]. Jednou z funkcí E4 (přesněji E1^E4 proteinu HPV16) je indukce zastavení buněčného cyklu ve fázi G_2/M. Protein je schopný se vázat do fosforylační domény cyklin-dependentní kinasy, kterou inhibuje, a zastavuje tím přechod do M-fáze buněčného cyklu [16]. Jelikož HPV16 je vysoce rizikový typ, je tento poznatek významný jak z hlediska diagnostiky, tak terapie HPV-asociovaných nádorových onemocnění. Při srovnání životních cyklů HPV16 a HPV18 bylo zjištěno, že E4 více ovlivňuje amplifikaci genomu HPV16, což poukazuje na rozdílnost mezi životními cykly a funkcemi analogických proteinů u různých typů HPV. Tato studie také identifikovala schopnost E4 (HPV16) modulovat proteiny rodiny mitogenem aktivovaných proteinových kinas [17]. Další pravděpodobnou funkcí E4 je stabilizace proteinu E2 v průběhu virové infekce [17, 18]. Protein E4 je také asociován s modulací keratinového systému buňky [19, 20] a uvolňováním virových částic z infikované buňky [21].

2.2.3 E6 & E7

S nádorovými onemocněními asociovanými s HPV jsou z řady časných proteinů nejčastěji spojovány onkogenní proteiny E6 a E7. Jejich schopnost transformovat buňky byla dobře prostudována. K transformaci buněk je třeba přítomnost nemutovaných a nezkrácených proteinů E6 a E7 vysoce rizikových HPV [22, 23]. Jejich prominentní role

při iniciaci nádorového onemocnění je často asociována se schopností inhibovat buněčné nádorové supresorové proteiny.

Protilátky proti proteinu E6 se často vyskytují u pacientů se zhoubnými nádory, jak potvrzují četné studie [24–29]. Při vzniku nádoru hraje E6 důležitou roli, jelikož, mimo jiné, dokáže inaktivovat nádorový supresorový protein P53 [30]. Inaktivace je způsobena polyubiquitinací P53, která vede k jeho degradaci. Virový protein E6 a P53 spolu tvoří komplex. Tvorba E6/P53 komplexu je zprostředkována E6 asociovaným proteinem (E6AP, ubiquitinligasa), který je podstatně větší než E6 (m_{E6} = 18 kDa, m_{E6AP} = 100 kDa) [31]. Tvorba komplexu E6/E6AP/P53 je znázorněna na Obr. 4.



Obr. 4 Protein E6 *(označen červeně)* ***v komplexu s ubiquitinligasou E6AP*** *(označená šedě), degradující* ***tumor-supresor P53*** *(označen žlutě). Připraveno v programu PyMOL (PDB: 4XR8). Zdroj: [32]*

Podobně jako E6, i E7 je často asociován s transformací hostitelských buněk díky své interakci s nádorovým supresorovým retinoblastomovým proteinem (RB). Proliferující buňky vykazují vysokou míru exprese transkripčních faktorů E2F a jejich role při karcinogenezi byly důkladně studovány [33]. Protein RB se váže s transkripčními faktory proteinové rodiny E2F a transkripci inhibuje [34]. Protein E7 je odpovědný za proteazomální degradaci RB a RB-asociovaných proteinů, jako je protein P107 a P130 [35], čímž pravděpodobně napomáhá buněčné proliferaci a transformaci infikovaných buněk na buňky rakovinové.

2.3 Onemocnění spojené s HPV

Onemocnění způsobená infekcí HPV se nejčastěji projevují tvorbou nezhoubných novotvarů (papilomy), nebo lézí na sliznicích, které časem mohou přejít do stavu maligního nádoru. HPV infikují bazální vrstvy tělových epitelů (kmenové buňky), kde

virus zůstává po jistou dobu latentní. Navzdory tomu, že velké množství jedinců překoná infekci HPV bez příznaků, u dalších pacientů, po době latence, HPV způsobuje různá onemocnění [36]. Ty lze rozdělit do dvou klinických skupin: slizniční a kožní onemocnění. Mezi slizniční HPV-asociovaná onemocnění se řadí neoplázie čípku děložního a dalších anatomických lokalizací anogenitální oblasti mužů a žen. Benigním projevem na sliznicích jsou anogenitální bradavice. Kožní HPV-asociovaná onemocnění jsou častější a zahrnují například pravé bradavice (Verruca vulgaris), plantární bradavice (Verruca plantaris), nitkovité bradavice (Verruca filiformis) nebo ploché bradavice (Verruca plana). Progrese premaligní léze do malignity je často závislá na typu HPV, který buňky infikoval. Podle rizikovosti dělíme HPV na vysoce (například HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68, 73 a 82 [37]) a nízko rizikové (například HPV 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72 a 81).

Jedním ze základních rozdílů v životním cyklu vysoce a nízko rizikových HPV je schopnost integrovat svou genetickou informaci do genom hostitelské buňky (pro přehled [38]). Tato schopnost především vysoce rizikových HPV typů vede k neregulované produkci virových onkoproteinů E6 a E7 [39, 40], což může vést k rychlejší buněčné transformaci a proliferaci (viz 2.2.3). Mezi kožní maligní HPV-asociované nádory se řadí bazocelulární karcinom a spinocelulární karcinom, které jsou dvěma nejčastějšími typy nemelanomových kožních karcinomů. U těchto nádorů se HPV přisuzuje funkce kofaktoru. Mezi slizniční karcinomy patří karcinom děložního čípku, anogenitální nádory, či nádory hlavy a krku. Nádorové onemocnění spojené s infekcí HPV jsou asociována s vyšším počtem přeživších pacientů, než je tomu u pacientů s HPV-negativními nádory [41]. Pro diagnostiku karcinomu děložního čípku lze využít detekci klinicky patrných premaligních stádií, která je možné včas odhalit a léčit. U řady dalších HPV-asociovaných malignit také existují premaligní stádia klinicky odhalitelná. Pacienti s nádory hlavy a krku (kromě nádorů dutiny ústní) nevykazují žádná prekancerózní stádia [42], a proto je množství nádorů odhaleno až ve stádiu invazivního karcinomu. Včasný záchyt rizikových pacientů a vývoj intervenčních zákroků jsou klíčem ke snížení počtu HPV-asociovaných nádorů v populaci, zlepšení prognózy pacientů a kvality jejich života.

2.4 Reakce imunitního systému

2.4.1 Aktivace imunitního systému

Imunitní systém reaguje na různé podněty, které potenciálně ohrožují organismus. Po vniknutí infekčního agens do organismu se aktivuje primární (nespecifická) imunitní odpověď. Typickými nástroji nespecifické imunity jsou například horečka nebo fagocytující buňky. Součástí nespecifické imunity jsou také antigen-prezentující buňky, které pomocí receptorů prezentují cizí látky (antigeny) buňkám specifické imunity. Po

rozeznání antigenu je určena specificita lymfocytů, které následně dozrávají v paměťové či plazmatické buňky. Právě plazmatické buňky produkují protilátky, které jsou jedním z obraných nástrojů specifické imunitní odpovědi hostitelského organismu. Při infekci HPV se specifická protilátková imunitní odpověď nezaměřuje pouze na kapsidu viru (pozdní virové proteiny), ale tvoří se i protilátky specifické vůči časným virovým proteinům.

2.4.2 Protilátky proti časným virovým proteinům

Časné virové proteiny jsou odpovědné za množení viru v hostitelských buňkách a plní jiné nestrukturální funkce (viz 2.2). Tři z těchto proteinů jsou známé onkogeny (E5, E6, E7) a hladina těchto proteinů je významným faktorem při transformaci hostitelských buněk. Diagnostický význam dalších protilátek vůči časným virovým proteinům je menší, ale neopomenutelný.

Kvůli prominentní roli proteinu E2 při replikaci viru byli asymptomatičtí HPV-pozitivní pacienti zpočátku vyšetřováni na protilátky proti E2 [40]. Možnost diagnostického využití protilátek vůči E2 bylo v případě karcinomu děložního čípku naznačeno již v roce 1992 [43]. Po integraci viru do DNA hostitele je gen pro syntézu E2 inaktivován, což vede k masivní syntéze proteinů E6 a E7 [40]. Konzistentní s touto hypotézou jsou také výsledky Ewaisha a kol. (2017), kteří uvádí, že prevalence E2-specifických protilátek u pacientek s nádorem čípku dělohy byla pouze 14,5 % [44]. Na druhé straně Dahlstrom a kol. (2017) uvádí, že seropozitivita na E2-specifické protilátky byla u pacientů s orofaryngálním nádory 68 % ,oproti zdravým kontrolám, kde seropozitivita dosáhla 1 % [45]. Vysoká prevalence E2-specifických protilátek u pacientů s nádory orofaryngu naznačuje potenciál pro využití jako biomarker nádorového onemocnění.

Navzdory tomu, že E4-specifické protilátky jsou často asociovány s aktivní virovou infekcí, jsou detekovatelné i u pacientů s nádorovým onemocněním. Prevalence těchto protilátek je značně závislá na typu nádoru, kterým pacient trpí. Prevalence anti-E4 protilátek u pacientek s nádory děložního čípku byla podstatně vyšší (73 % séropozitivní) než v kontrolní populaci (17 % séropozitivní) [46]. Oproti tomu, byla séropozitivita na E4-specifické protilátky při diagnóze pacientů s nádory orofaryngu pouze 46 % [47]. Ve své studii Zhang a kol. z roku 2017 také uvádí, že pozitivita pacientů na E4-specifické protilátky je v době diagnózy nádoru významně nižší oproti jiným protilátkám vůči časným proteinům (E6: 85 %, E7: 72 %, E2: 82 %) [47]. Kreimer a kol. (2015) uvádí, že v kontrolní populaci (bez anogenitálního nádoru) byla prevalence protilátek vůči E2, E6 a E7 menší než 6 %, zatímco prevalence protilátek vůči E4 dosahovala až 17,2 % [48]. To naznačuje, že asociace E4-specifických protilátek s nádory je nižší než v případě jiných protilátek. Údaje o prevalenci anti-E4 protilátek ve zdravé populaci jsou však poměrně nekonzistentní, nakolik ve své práci z roku 1995, Müller a

kol. uvádí, že séropozitivita na E4-specifické protilátky v zdravé populaci dosáhla hodnoty pouze 1,1% u dospělých. Největší prevalence protilátek vůči E4 potvrdili v populaci bez nádorového onemocnění, či příznaků jiné HPV-asociované nemoci mezi dětmi a adolescenty, a to přes 20 % [49]. Mezi jednotlivci ze zdravé populace a pacienty sledované pro sexuálně přenosné onemocnění (pacienti nebyli testováni na infekci HPV) je velký rozdíl v hladinách protilátek vůči E4. Pacienti se sexuálně přenosnými onemocněními měli vyšší hladiny těchto protilátek i oproti pacientům trpícím na nádorové onemocnění; proto se spíše uvažuje o protilátkách vůči E4 jako o biomarkeru virové replikace [49].

Kvůli své velmi nízké prevalenci v populaci bez nádorového onemocnění a řádově vyšší prevalenci u pacientů s nádorovým onemocněním jsou E6-specifické protilátky nejslibnějším kandidátem na biomarker HPV-asociovaných nádorů. Séropozitivita na protilátky vůči E6 u lidí bez HPV-asociovaného nádoru je velmi neobvyklá [25, 26]. Kreimer a kol. ve své práci z roku 2013 uvádí, že v kontrolní populaci dosáhla prevalence séropozitivity pouhých 0,6 %, zatímco u pacientů s orofaryngeálním spinocelulárním karcinomem byla prevalence 34,8 % [26]. U řady pacientů výskyt těchto protilátek předcházel diagnóze nádoru i o více než 10 let [26, 28].

Podobně jako protilátky vůči E6, i protilátky proti E7, byly v mnoha studiích výrazně více zastoupené u pacientek s invazivním karcinomem děložního čípku [27, 50, 51]. Při již zmiňované studii cílené na orofaryngeální spinocelulá rní karcinomy bylo 40 % pacientů pozitivních na protilátky vůči E6, pozitivních také na protilátky proti E7 [26].

Prevalence protilátek specifických vůči onkoproteinům E6 a E7 je u pacientů s nádorovým onemocněním vysoká. Protilátky vůči E2 a E4 se spíše zapojují do procesu virové replikace, a proto jejich prevalence u onkologických pacientů není tak vysoká, jako protilátek proti E6 a E7. Nejlepším diskriminačním markerem pro nádorové onemocnění. Jsou díky své nízké prevalenci u zdravých jedinců. Protilátky vůči E6, avšak detekce dalších protilátek u pacientů zvyšuje citlivost záchytu rizikových jedinců.

2.5 Metody detekce HPV-specifických protilátek

2.5.1 Sérologie

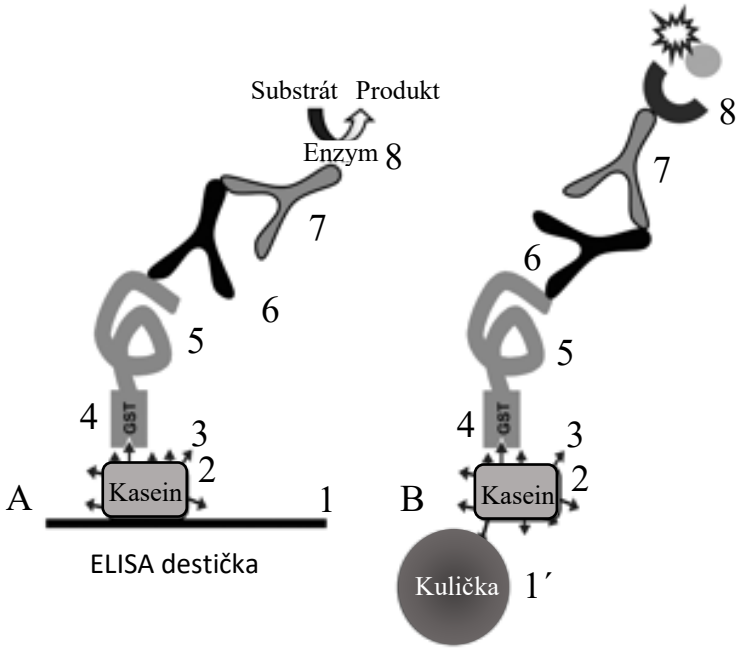
Sérologie je klinická analytická metoda založená na detekci protilátek v séru nebo krvi pacienta. Sérologie je nepřímou metodou průkazu patogena a využívá se k diagnostice v případech, kdy například není možné použít metody přímé detekce patogena [52]. Sérologie HPV-specifických protilátek je předmětem mnohých studií. Detekcí protilátek vůči pozdním virovým proteinům HPV lze prokázat expozici pacienta vůči viru HPV [53], ale tato metoda není vhodná pro diagnostiku, neboť neumožní určit anatomickou lokalizaci a dobu infekce. Překvapivé byly výsledky studie Kreimer a kol.,

z roku 2019, která zjistila, že protilátky specifické pro časné virové proteiny lze, v případě některých HPV-asociovaných karcinomů, detekovat i mnoho let před diagnózou. U pacientů s nádory orofaryngu to bylo u některých pacientů až 28 let před diagnózou [25]. Právě u těchto nádorů, kde nejsou známá premaligní stádia, by screening pomocí detekce těchto protilátek mohl mít důležitý význam. Detekce pouze jedné z protilátek však není dostatečně citlivá. Citlivost záchytu rizikových pacientů by mohla být zvýšena detekcí protilátek namířených proti několika časným antigenům viru.

2.5.2 GST-ELISA

Enzymový imunotest (ELISA, z ang. *enzyme-linked immunosorbent assay*) je detekční metoda využívaná v sérologii. Principem této metody je imobilizovat virový antigen na povrchu destičky a následně sledovat vazbu protilátek v pacientském séru pomocí imunochemické detekce. Detekce navázaných pacientských protilátek je provedena aplikací sekundární protilátky, která je specifická vůči lidskému imunoglobulinu specifické třídy (nejčastěji zvířecími monoklonálními protilátkami [54, 55]). Metoda může mít provedení semikvantitativní nebo kvantitativní.

Základní způsob imobilizace antigenu využívající vazby antigenu přímo na plast destičky byl kvůli vyšší specificitě nahrazen uspořádáním využívajícím vazby primární protilátky na povrch destičky pro imobilizaci antigenu [54]. To bylo postupně nahrazeno novým postupem využívajícím vazbu enzym-substrát pro imobilizaci antigenů. Při tomto systému je rekombinantně připravený antigen fúzován s glutathion-S-transferasou (GST) a povrch destičky je potažen glutathion-kaseinem (GC, z ang. *glutathione-cassein*). Vazba GST s glutathionem v GC zabezpečuje uchycení antigenu na povrch jamky destičky [55]. Uspořádání GST-ELISA je uvedeno na Obr. 5, str. 19.



***Obr. 5 Srovnání uspořádání GST-ELISA** (A) **a Luminex** (B). Při použití metody ELISA je na povrch jamky (1) navázán kasein (2) s glutathionem (3) vyčnívajícím dovnitř jamky. Vazba antigenu (5) je zprostředkována GST (4) fúzovanou se samotným antigenem. Na antigen se specificky váže lidský imunoglobulin (6), na který se specificky váže sekundární protilátka (7) fúzovaná s reportérovou molekulou (8), v tomto případě enzymem. Uspořádání při metodě Luminex je stejné jako u GST-ELISA až na povrch, kam se váže kasein. Při této metodě je kasein (2) vázán na povrch kuliček (1´). Schéma převzato a upraveno z: [55].*

Antigeny pro GST-ELISA jsou nejčastěji připravovány v rekombinantním systému (bakterie, kvasinky, bakuloviry) z důvodu, že HPV nerostou v tkáňových kulturách, jelikož životní cyklus HPV je závislý na diferenciaci keratinocytů a příprava takové tkáňové kultury je náročná [56]. Příprava v rekombinantním systému probíhá pomocí zavedení plazmidu do buněk rekombinantního systému a jeho následné indukce. Genetický kód rekombinantního antigenu je zaveden do plazmidu, který v sobě obsahuje i kód pro GST (například i námi využitý plazmid pGEX-4T-1, viz příloha 1), a antigen je tedy přímo produkován s navázaným GST, jako fúzní protein [55].

2.5.3 Luminex

Uspořádání ELISA bohužel neumožňuje komplexní, simultánní analýzu většího počtu vzorků, jelikož každý antigen musí být imobilizovaný v samostatné jamce destičky. Z toho důvodu je zejména pro klinické testy polyvalentních vakcín (obsahující kapsidové proteiny více druhů HPV) metoda ELISA časově náročná. Tento problém byl vyřešen příchodem multiplexových analýz. Původní multiplex analýza protilátek, antigenů či oligonukleotidů byla provedena v roce 1997 [58]. Pro výzkum HPV byla metoda zavedena v roce 2003 [59]. Metoda popsaná v [59] využívá kompetitivní provedení, ale původní publikace uvádí také úspěšné „capture“ provedení. Nejzásadnějším rozdílem mezi ELISA a Luminex je využití mikrosfér u Luminexu, jako základny pro imobilizaci antigenu (viz Obr. 5B, str. 19). Díky své malé velikosti je možné aplikovat vícero

mikrosfér s různými antigeny do jednoho séra a pomocí průtokové cytometrie lze vyhodnotit přítomnost protilátek proti několika antigenům v jednom vzorku zároveň. Jak je již z Obr. 5, str. 19 zřejmé, uspořádání zahrnující interakci GST a GC, je podobně jako u ELISA, využíváno i u metody Luminex [60].

2.5.4 Radioimunochemické metody

Radioimunotest (RIA, z ang. *radioimmunoassay*) je dnes málo využívaná metoda pro detekci HPV-specifických protilátek. V době svého objevu přinesla metoda RIA neočekávaný převrat v citlivosti. Metoda byla založená na kompetici volných hormonů značených radioaktivním izotopem a neznačených hormonů o vazbu na specifické protilátky. Pro vyhodnocení se využíval poměr hormonů značených v komplexu proti koncentraci volných značených hormonů. Tento poměr klesá, se zvyšující se koncentrací neznačených hormonů, díky jejich schopnosti inhibovat vazbu značených hormonů na protilátky. Díky tomu lze vypočítat koncentraci neznačených hormonů v roztoku [61]. RIA našla své využití i při detekci časných proteinů HPV, kdy místo hormonů byly použity virové antigeny [62].

Radioimunoprecipitační test (RIPA, z ang. *radioimmunoprecipitation assay*) je metoda založená na podobných principech jako RIA. Metoda RIPA byla poprvé využita pro výzkum hemaglutininu a základní princip metody spočívá v radioaktivním značení sledovaného proteinu (antigenu v serologických studiích), který je následně inkubován s protilátkami séra a následně precipitován přidáním sekundární protilátky. Pro vyhodnocení se využívá měření hodnoty radioaktivity [63]. Stanovení pomocí RIPA se využívalo také při stanovení HPV-specifických protilátek, zejména kvůli vyšší citlivosti [64], ale dnes je jeho využití limitované zejména kvůli bezpečnosti práce a přístrojové náročnosti (což platí i pro metodu RIA).

2.5.5 Standardizace serologických testů

Metody Luminex i GST-ELISA jsou zpravidla vyhodnocovány podle zavedených standardních operačních postupů. Tyto postupy se však mezi laboratořemi mohou lišit, a tedy i výsledky stejných metod v různých laboratořích se mohou lišit. Byla tedy rozpoznána potřeba standradizace používaných postupů, aby bylo možné výsledky různých pracovišť mezi sebou porovnávat. Tomuto se věnovala poprvé mezinárodní konference organizovaná Světovou zdravotnickou organizací (WHO, ang. *World health organization*) v roce 2006. V roce 2017 byla pro harmonizaci serologických pokusů založena specializovaná HPV-serologická laboratoř, která na konferenci v roce 2018 představila čtyři hlavní body harmonizace, které se postupně naplňují a vyvíjí [65, 66]. Jedním z bodů, je příprava mezinárodních standardů pro serologické experimenty. Ve studii organizované WHO bylo 29 laboratoří požádáno o provedení serologických stanovení na materiálech připravených jako standardy. Pokusy laboratoře provedly svými

zavedenými metodami. Na základě výsledků byly zhodnoceny vnitrolaboratorní a mezilaboratorní rozdíly a vybrány vzorky uznané za mezinárodní standardy pro harmonizaci serologických metod. Rozdíl do 20 % mezi duplikáty, v rámci jednoho testu (jedna laboratoř), je považován za přijatelný [67]. Pro vyhodnocení rozdílů mezi testy provedenými jednou laboratoří se používá poměr maximální a minimální naměřené hodnoty. Jestliže je poměr maximální a minimální hodnoty pro jeden vzorek větší než čtyři, je tento test vyhodnocen jako vysoce variabilní [67]. Výběr mezinárodních standardů byl založen na mezilaboratorní shodě pro jednotlivé testy. Shoda byla určena na základě vyhodnocení pozitivity/negativity sér a nikoliv na základě naměřených hodnot. Nicméně i naměřené koncentrace protilátek různými laboratořemi byly porovnány. Pro testy založené na vazbě antigen-protilátka byly při srovnání maximální a minimální hodnoty naměřené jednotlivými laboratořemi rozdíly od 115-násobné do 12 800-násobné. Tyto ohromné mezilaboratorní rozdíly jsou zapříčiněny také rozdílným vyjadřováním výsledných hodnot. Proto WHO navrhuje harmonizaci sérologických metod přechodem z vyjadřování výsledků v „in-house“ nastavených jednotkách a titrech na jednotný systém jednotek [67]. Sjednocení způsobu vyjádřování naměřených koncentrací by umožnilo spolehlivěji srovnávat data naměřená laboratořemi po celém světě.

3 Cíle práce

1. Popsat metody detekce HPV-specifických protilátek vůči časným virovým proteinům a jejich využití
2. Připravit antigeny a vyšetřit séra pacientů pomocí metody GST-ELISA
3. Popsat srovnání hladin protilátek vůči proteinům E2, E4, E6 a E7 u pacientů s nádory hlavy a krku

4 Materiál a metody

4.1 Použité chemikálie

4.1.1 Různé chemické látky

- **Agarosa** — Sigma Aldrich, bez přítomnosti DNAs a RNAs
- **Akrylamid/Bis** — SERVA, akrylamid (w = 40 %), N,N-methylenbisakrylamid (w = 2,6 %)
- **Ampicilin** (Amp) — Sigma Aldrich, sodná sůl ampicilinu, obsah vody < 2,0 %
- **Karbenicilin** (CD, z ang. *carbenicilin*) — Sigma Aldrich, disodná sůl carbenicilinu, obsah vody < 6,0 %
- **Proteinový standard Color Protein Standard, Broadrange** — New England Biolabs, rozsah detekce: 10 – 250 kDa
- **ddH_2O** — deionizovaná voda
- **dH_2O** — destilovaná voda
- **Kvasinkový extrakt** — Bacto™, Thermofischer Scientific, nízký obsah endotoxinů, Difco
- **NaCl** — Lach-Ner, čistota = 99,96 %
- **KCl** — Sigma Aldrich, čistota > 99,0 %
- **$MgCl_2$** — Sigma Aldrich, čistota > 98,0 % $c_{zásobní}$ = 1 mol/l
- **$MgSO_4 \cdot 7H_2O$** — Fluka, čistota > 99,5 % $c_{zásobní}$ = 1 mol/l
- **Bromfenolová modř** — SERVA
- **2-merkaptoethanol** — Sigma Aldrich, čistota > 99,0 %
- **Dithiotreitol** (DTT) — Sigma Aldrich, čistota > 97 % $c_{zásobní}$ = 1 mol/l
- **Barvící činidlo DNA-Loading Dye** — Thermoscientific, 6× koncentrovaný, obsahuje bromfenolovou modř
- **Fenylmethylsulfonyl fluorid** (PMSF, z ang. *phenylmethylsulphonyl fluride*) — Sigma Aldrich, čistota ≥ 99,0 % $c_{zásobní}$ = 100 mmol/l

- **DNA standard Generuler 1Kb** — Thermoscientific, rozsah detekce: 250 – 20 000 párů bazí (bp, z ang. *base pairs*), obsahuje barviva: „Xylene Cyanol FF“, bromofenolová modř, „Orange G“
- **Glutathion S-Transferasa** (GST) — $c_{\text{zásobní}}$ = 25 mg/ml, darem od RNDr. Ludvíkové
- **Glutathion-Casein** (GC) — $c_{\text{zásobní}}$ = 1 mg/ml, darem od RNDr. Ludvíkové
- **Glycerol** — Sigma Aldrich, čistota > 99,5 %, $w_{\text{zásobní}}$ = 30 %
- **Glycin** — SERVA, čistota > 98,5 %
- **H_2O_2** — OVERLACK, w = 30 %
- **H_2SO_4** — Sigma Aldrich, čistota = 95–97 % $c_{\text{zásobní}}$ = 2 mol/l
- **HCl** — Penta s.r.o., w = 35 % $c_{\text{zásobní}}$ = 1 mol/l
- **Lyzogenní živné médium** (LB, z ang. *lysogenny broth*) — Sigma Aldrich, složení: trypton (10 g/l), extrakt z kvasinek (5 g/l), NaCl (5 g/l)
- **Isopropyl β-d-1-thiogalaktopyranosid** (IPTG) — Sigma Aldrich, čistota ≥ 98,0 % $c_{\text{zásobní}}$ = 5 mol/l
- **Kasein** — Sigma Aldrich, obsah dusíka 13 – 15 %
- **DNA standard Massruler HR** — Thermoscientific, rozsah detekce: 1500 bp – 10 000 bp, obsahuje bromfenolovou modř
- **CH_3OH** — Lach-Ner, w > 99,8 %
- **Monohydrát kyseliny citronové** — Sigma Aldrich, čistota > 98,0 %
- **Na_2CO_3** — LACHEMA, čistota > 95,0 %
- **$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$** — Penta s.r.o., čistota > 99,0 %
- **$NaHCO_3$** — Penta s.r.o., čistota > 98,0 %
- **NaN_3** — Sigma Aldrich, čistota > 99,0 %
- **NaOH** — Sigma Aldrich, čistota > 98 %, přítomnost K < 0,02 %

- **N-lauroylsarkosin (sodná sůl)** — Sigma Aldrich, čistota > 94,0 %
- ***o*-fenylendiamin dichlorid** (OPD, z ang. *o-phenylenediamine dichloride*) — Sigma Aldrich, 10 mg/tableta
- **PCR-H_2O** — Sigma Aldrich, bez obsahu DNAs, RNAs, endonukleas, exonukleas a NICKas
- **Persulfát amonný** (APS, z ang. *ammonia persulphate*) — Kaufmann, *w* = 10 %,
- **RedGel** — Biotium, 10 000× koncentrovaný
- **Super optimální živné médium s katabolickou represií** (SOC, z ang. *super optimal broth with catabolic repression*) — trypton (*w* = 2%), extrakt z kvasinek (*w* = 0,5%), NaCl (10 mmol/l), KCl (2,5 mmol/l), $MgCl_2$ (10 mmol/l), $MgSO_4$ (10 mmol/l), glukosa (20 mmol/l)
- **Sodný dodecylsulfát** (SDS) — Sigma Aldrich, čistota > 98,5 %
- **Sušené mléko** — Tatra-Hlinsko, obsah tuků < 0,25 %
- **N,N,N´,N´-Tetramethylethylendiamin** (TEMED) — Sigma Aldrich, *w* ≃ 99 %
- **Tris** — SERVA, čistota > 99,0 %
- **Trypton** — OXOID
- **Tween 20** — Sigma Aldrich, *w* > 40 %

4.1.2 Biologický materiál a enzymy

- ***Escherichia coli*** (*E. coli*) — XL-1 Blue, Agilnet
- ***E. coli (E2)*** — *E. coli* transformované s inzertem *E2*, darem od RNDr. Ludvíkové
- ***E. coli (E4)*** — *E. coli* transformované s inzertem *E4*, darem od RNDr. Ludvíkové
- ***pBS*(+)** — plazmid bez inzertu, mapa viz **Error! Reference source not found.**, Stratagene, darem od RNDr. Šmahela, Ph.D.
- ***pGEX-4T-1–E6*** — plazmid s inzertem *E6*, speciální dar od [55]
- ***pGEX-4T-1–E7*** — plazmid s inzertem *E7*, speciální dar od [55]
- ***BamHI*** — Nerw England Biolabs, *A* = 20 000 U/ml, pro sekvenci viz příloha 3

4.1.3 Pacientské vzorky a kontrolní séra

Séra pacientů s nádory hlavy a krku z odběru při diagnostice nádoru. Šetřené na přítomnost protilátek vůči strukturní proteinům viru pomocí viru-podobných částic (VLP, z ang. *virus-like*

particles). Předešlé šetření také na E6 a E7. Vzorky domácí laboratoře (původ Ústav hematologie a krevní transfuze v Praze).

Označení	ID	Datum odběru	VLP16	VLP18	VLP31	VLP33	E6	E7
K+ (S3)	E6E7+	-	-	-	-	-	1	1
K- (S4)	E6E7-	-	-	-	-	-	0	0
S1	E6+E7-	-	-	-	-	-	1	0
S2	E6-E7+	-	-	-	-	-	0	1
P1	76	06/05/2004	1	0	1	1	1	1
P2	122	13/06/2005	0	0	0	0	1	0
P3	124	13/06/2005	0	0	0	0	1	1
P4	126	31/07/2005	1	1	1	1	1	1
P5	128	19/09/2005	1	0	0	0	1	1
P6	176	26/03/2007	1	0	1	0	1	1
P7	179	26/04/2007	1	0	0	0	1	1
P8	207	22/01/2008	1	0	0	0	1	1
P9	210	16/03/2008	1	0	0	0	1	1
P10	217	06/10/2008	1	1	1	1	1	1
P11	232	07/04/2009	1	0	1	0	1	1
P12	233	22/04/2009	0	0	0	0	1	1
P13	245	07/04/2010	1	1	1	1	1	1

4.1.4 Protilátky

- **Anti-GST** Kozí polyklonální primární protilátka specifická pro glutathion-S-transferasu (GST), ředení pro pužití: 1:1000, GE healthcare
- **DAG** Oslí sekundární protilátka specifická pro kozí primární protilátky (z ang. *donkey anti-goat*), ředění pro použití: 1:1000, Santa Cruz
- **DoAHU-PX** Oslí sekundární protilátka specifická pro lidskou primární protilátku. Fúzovaná s peroxidasou, ředění pro použití 1:7500, JacksonLAB

4.1.5 Pufry

- **CutSmart Buffer HF** Biolabs, 10× koncentrovaný, pH = 7,8
- **Bikarbonátový pufr** (BIC) 1× koncentrovaný, pH = 9,6
  Složení (100 ml): 0,16 g Na_2CO_3; 0,3 g $NaHCO_3$; 0,02 g NaN_3; doplněno do 100 ml dH_2O
- **Blokovací pufr** 1× koncentrovaný
  Složení (100 ml): 0,2 g kasein; doplněno do 100 ml PBS + 0,05% Tween 20
- **Fosfátový pufr** (PBS, z ang. *phosphate buffered saline*), 10× koncentrovaný, Sigma Aldrich, pH (1× koncentrovaný) = 7,3–7,5
- **Laemmliho pufr** 2× koncentrovaný, pH = 6,8

Složení (2 ml): 0,04 g Tris-HCl; 0,08 g SDS; 0,4 ml 30% glycerol; 0,2 ml 2-mekraptoethanol; 0,004 g bromfenolová modř, doplněno do 2 ml 1× koncentrovaným PBS

- **„Lower buffer“** — 1× koncentrovaný, pH = 8,8
  Složení (100 ml): 18,75 g Tris; 0,4 g SDS, doplnit do 100 ml ddH_2O
- **PBS + 0,05% Tween 20** — 1× koncentrovaný, pH = 7,4
  Složení (1 l): 50 µl Tween 20, doplněno do 1 l dH_2O
- **Přenosový pufr** — 10× koncentrovaný, pH = 8,3
  Složení (1 l): 144 g glycin; 30,2 g Tris; doplněno do 1 l dH_2O
- **„Running buffer“** — 10× koncentrovaný, pH = 8,3
  Složení (1 l): 30,4 g Tris; 144 g glycin; 10 g SDS; doplněno do 1 l dH_2O
- **Ředící pufr** — 1× koncentrovaný
  Složení (8 ml): 80 µl GST; doplněno do 8 ml blokovacím pufrem
- **Tris-borát-kys. ethylendiaminotetraoctová pufr (**TBE**)** — 10× koncentrovaný, pH = 8,2
  Sigma Aldrich
- **Substrátový pufr** — 1× koncentrovaný
  Složení (100 ml): 0,73 g monohydrát kyseliny citronové; 2,38 g $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$; upravit na pH = 5,0; doplnit do 100 ml dH_2O
- **„Upper buffer“** — 1× koncentrovaný, pH = 6,8
  Složení (100 ml): 6,05 g Tris; 0,4 g SDS, doplnit do 100 ml ddH_2O

4.1.6 Komerční kity

- **Nucleospin EasyPure®** — Macherey-Nagel, Německo
- **SuperSignal™ West Pico PLUS** — Thermo Fischer Scientific, USA
- ***Mix & Go! E. coli Transformation Kit and Buffer Set*** — ZYMO REASERCH, USA

4.2 Použité přístroje

- **Analytické váhy** — BEL, mark 254 AI, Itálie
- **Blotovací nádoba** — BioRad, Minitrans-Blot® Cell, Čína
- **Čtečka destiček** — BioRad, iMark™ platereader, USA
- **Destičky pro imunotest** — Dynatech, PolySorp, 96 jamek, USA

- **Digitální suchá lázeň** Labnet, AccuBlock Labnet, USA
- **Digitální suchá lázeň** BIOER, CHB-202, Čína
- **Inkubátor** InkuLine, VWR, USA
- **Lednice** Liebherr, CP4023, Německo
- **Lednice** Liebherr, Comfort, Německo
- **Lednice** Liebherr, Profiline, Německo
- **Ledovač** Brema Icemakers, Iceflaker, Itálie
- **Magnetická míchačka s výhřevem** SCILOGEX, MS-H-S, USA
- **Malá třepačka** N-BIOTEK, Shaking incubator NB-205, Jižní Korea
- **Míchací deska** Labnet, Rocker 25 Labnet, USA
- **Mikrovlnnná trouba** LG, Smart Inverter magnetron LG, Čína
- **Minicentrifuga** Labnet, Prism™ Mini Centrifuge, USA
- **Třepací termoblok** MB-102 BIOER, Čína
- **Mraznička** pHCBI, Twinguard, Nizozemsko
- **Multikanálová digitální autopipeta** ThermoScientific, Finnpipette, Finsko
- **Nádoba pro elektroforézu** Owl, B1A, USA
- **Nádoba pro SDS-elektroforézu** Amersham Biosciences, Mighty small II for 8×7cm gels, UK
- **pH metr** HANNA instruments, HI3221 pH/ORP/ISE/Temperature Bench Meter with Calibration Check, USA
  Skleněná elektroda: HANNA instruments, USA
- **Předvážky** Boeco, BPS 51 plus, Německo
- **Stolní centrifuga** Eppendorf, centrifuge 5424, Německo
- **Velká centrifuga** ThermoScientific, Heraens Megafuge 16R, Neměcko
  Výměnný rotor: Thermoscientific 75003181, 75003682, USA
- **Velká třepačka** Labcompanion, Incubated shaker SIF 6000R , Jižní Korea
- **Víko blotovací nádoby** BioRad, Mini-PROTEAN® Tetra system BioRad, USA
- **Vizualizační systém** Amersham, Imager 600, UK
- **Vizualizační systém** Syngene, INGENIUS 3, Indie
  Osvětlení: TransILLUMINATOR, Indie
  Kamera: CAM-FLXCM1, Indie
- **Vortex** Labnet, Vortexmixer, USA
- **Přístroj na měření koncentrace** Thermo scientific, Nanodrop 2000, USA
- **Zdroj napětí pro elektroforézu** BioRad, PowerPac 1000, USA
- **Ultrasonický homogenizátor** Qsonica, Q125 Sonicator, USA
- **Zdroj napětí pro elektroforézu** Consort, EV245 Consort, Belgie

4.3 Použité metody

4.3.1 Mikrobiologické metody

4.3.1.1 Příprava kultivačních médií

Zásobní LB agar (300 ml) byl rozpuštěn v mikrovlnné troubě. Po ochlazení bylo přidáno 300 µl karbenicilinu (CD, z ang. *carbenicilin*) a médium důkladně ručně promícháno. Následně bylo médium rozplněno do Petriho misek, které byly po zatuhnutí agaru uloženy do lednice pro další využití. Do nové uzavíratelné sterilní zásobní láhve bylo přeneseno 80 ml tekutého LB média, přidáno 80 µl ampicilinu (AMP) a opět uloženo do lednice (vždy před množením transformované či indukované bakteriální kultury).

Pro indukci kompetence u *E. coli* XL-1 Blue bylo připraveno super optimální živné médium (SOB, z ang. *super optimal broth*). V 70 ml dH2O byl rozpuštěn trypton (*m* = 2 g), extrakt z kvasinek (*m* = 0,5 g), NaCl (m = 0,058 g), KCl (*m* = 0,019 g). Do roztoku byly přidány 1 ml $MgCl_2$ a 1 ml $MgSO_4$. Nakonec bylo pH upraveno na pH = 6,5 a doplněno dH_2O do 100 ml a médium bylo odesláno na sterilizaci v horkovzdušném autoklávu.

4.3.1.2 Příprava kompetentních buněk *E. coli* XL-1 Blue

Kompetentní bakterie byly připraveny ze zásobních *E. coli* XL-1 Blue podle postupu kompatibilního s komerčním kitem pro bakteriální transformaci *Mix & Go!*. Den před přípravou kompetentních bakterií bylo připraveno 100 ml SOB média (pro složení viz. 4.3.1.1). Množení bakterií proběhlo ve 3 ml LB média (bez antibiotik). Byly připraveny 2 sterilní zkumavky, do jedné byly očkovány zásobní bakterie pomocí dřevěné špachtle, druhá zkumavka byla kontrolní. Bakterie byly namnoženy při teplotě 37 °C a rychlosti 200 RPM v třepačce přes noc (ON, z ang. *overnight*). Po 16 hodinách inkubace bylo z každé zkumavky odebráno 500 µl média a přeočkováno do 50 ml SOB média připravených v 500 ml baňkách a byla změřena optická denzita při vlnové délce 600 nm (OD_{600}). Poté byly baňky třepány při teplotě 26 °C a rychlosti 200 RPM po dobu 3 h. V 30-minutových intervalech byla měřena OD_{600} až do doby, kdy její hodnota dosáhla 0,4. Pro další kroky byly využity roztoky, pufry a postupy, které jsou součástí komerčního kitu *Mix & Go!*. Poté byla bakteriální suspenze alikvotována po 160 µl do mikrozkumavek a uložena do mrazničky na –80 ºC.

4.3.1.3 Transformace *E. coli* XL-1

Kompetentní bakterie *E. coli* XL-1 (pro postup viz 4.3.1.2) byly nejprve transformovány kontrolním plazmidem pBS. Při tomto experimentu jsme porovnávali dvě metody transformace: *Fast Transformation* (kompatibilní pouze s *Mix & Go!* kompetentními bakteriemi, pěstované v SOB médiu) a transformaci v super optimálním

živném médiu s katabolickou represií (SOC, z ang. *super optimal broth with catabolic repression*). Pro metodu *Fast Transformation* bylo z rozmražených zásobních bakterií XL-1 odebráno 50 µl a přeneseno do čisté mikrozkumavky. Následně bylo přidáno 5 µl plazmidu pBS (výsledná koncentrace $c_{plazmid}$ = 1 ng/µl) a jemně ručně promícháno. Po inkubaci 10 min na ledu byly bakterie vysety na Petriho misky s LB + CD médiem (viz. 4.3.1.1) temperované předem na 37 °C v inkubátoru. Inkubace bakterií byla provedena ON při teplotě 37 °C.

K provedení SOC transformace bylo z rozmražených zásobních bakterií odebráno 50 µl a přeneseno do čisté mikrozkumavky. K bakteriální suspenzi byl přidán 5 µl plazmidu pBS a jemně promícháno. Následovala inkubace na ledu po dobu 10 min. Po inkubaci na ledu byly k bakteriím přidány 4× objem SOC média (250 µl) a bakterie byly třepány po dobu 1 h při teplotě 37 °C a rychlosti 300 RPM. Na závěr byly bakterie vysety na Petriho misky s LB agarem + CD (viz 4.3.1.1) předem temperované na 37 °C v inkubátoru. Inkubace bakterií probíhala ON při 37 °C.

Množství bakteriálních kolonií na Petriho miskách připravených oběma metodami bylo srovnatelné. V další fázi byly bakterie transformovány příslušnými plazmidy s inzerty, metodou *Fast Transformation*, kvůli její časové i nákladové výhodnosti.

Pro transformaci plazmidů s inzertem bylo odebráno 80 µl zásobních netransformovaných bakterií *E. coli* XL-1 a přeneseno do čisté mikrozkumavky. Do mikrozkumavek byly přidány příslušné plazmidy tak, aby byla výsledná koncentrace plazmidu $c_{plazmid}$ = 500 ng/µl. Bakterie byly inkubovány na ledu po dobu 10 min a poté vysety na Petriho misky s LB + CD agarem (viz. 4.3.1.1). Bakterie byly vysety na plotny v různých objemech (20 µl, 10 µl, 5 µl a 2,5 µl) a inkubovány ON při teplotě 37 °C.

Vyrostlé kolonie transformovaných bakterií byly přeneseny do 3 ml nového LB + AMP média a třepány ON při teplotě 37 °C a rychlosti 200 RPM. Následně byly bakterie peletovány centrifugací při laboratorní teplotě a rychlosti 8000× *g* po dobu 2 min. Z bakterií byly plazmidy izolovány pomocí kitu Nucleospin EasyPure®. Koncentrace plazmidů byly měřeny pomocí přístroje NanoDrop 2000. Izolované plazmidy byly uloženy pro další použití při teplotě –20 °C.

4.3.1.4 Příprava zásob transformovaných bakterií

Do sterilních zkumavek bylo odměřeno po 3 ml LB + AMP média (viz 4.3.1.1). Z ploten s transformovanými bakteriemi byla pomocí dřevěného párátka vypíchnuta vždy izolovaná kolonie a přenesena přímo do média ve zkumavce. Poté následovalo ON třepání při teplotě 37 °C a rychlosti 200 RPM. Po 16 h bylo do čistých mikrozkumavek přidáno 100 µl 30% glycerolu a alikvot 100 µl bakteriální suspenze. Směsi byly důkladně vortexovány až do smíchání glycerolu s bakteriální suspenzí. Poté byly mikrozkumavky uloženy do mrazničky při teplotě –80 °C.

4.3.1.5 Indukce proteosyntézy pomocí IPTG

Do sterilních zkumavek bylo odměřeno 5 ml LB + AMP média (viz 4.3.1.1). Ze zamražených transformovaných bakterií byla párátkem vypíchnuta malá část bakteriální suspenze a přenesena do média ve zkumavce. U každého typu bakterie byl proces proveden dvakrát pro paralelní pěstování indukovaných a neindukovaných bakterií. Bakterie byly třepány ON při teplotě 37 °C a rychlosti 200 RPM. Ráno byla ON kultura 20× naředěna přidáním 2 ml bakteriální suspenze do 38 ml čistého LB + AMP média v 500 ml Erlenmeyerově baňce a změřena její OD_{600}. Bakterie byly třepány při teplotě 37 °C a rychlosti 200 RPM až do doby, kdy hodnota OD_{600} dosáhla 0,4. Poté bylo do jedné baňky přidáno 39 µl IPTG (výsledná $c_{IPTG} = 5$ mmol/l) a třepáno při stejných podmínkách další 2 h. Do druhé baňky IPTG přidáno nebylo, ale baňka s bakteriální suspenzí byla třepána spolu s indukovanými bakteriemi 2 h při teplotě 37 °C a rychlosti 200 RPM. Na závěr byly centrifugovány různé alikvoty (3 ml bakteriální suspenze pro metodu Western blot a 35 ml bakteriální suspenze pro metodu ELISA) jednotlivých bakterií po dobu 3 min, při laboratorní teplotě a 14 000× *g*. Supernatanty byly slity a pelety uchovány v mrazničce při teplotě –80 °C.

4.3.2 Biochemické metody

4.3.2.1 Restrikční analýza

Restrikční endonukleasová analýza (REA) je založená na využití restrikčních endonukleas k tvorbě sekvenčně specifických štěpů na nukleové kyselině. V našem případě byla REA využita k ověření inzertu plazmidu, kterým byly bakterie transformovány. Po provedení REA se ověřuje migrace fragmentů pomocí gelové elektroforézy, jelikož štěpené plazmidy se pohybují v gelu různě od neštěpených plazmidů.

Před začátkem REA byl připraven 1% agarózový gel o objemu 40 ml. Pro REA byly rozmraženy plazmidy izolované z transformovaných bakterií (viz 4.3.1.3). Pro každý plazmid byla do sterilních mikrozkumavek připravena reakční směs sestávající z plazmidu o koncentraci 100 ng/µl; 0,5 µl restrikční endonukleasy *BamHI* a pufru CutSmart HF (1× koncentrovaný, ředěný pomocí vody bez obsahu proteas a nukleas) do celkového objemu 10 µl. Reakce probíhaly při teplotě 37 °C po dobu 1 h v termobloku a následně byly zastavené inkubací po dobu 20 min při teplotě 65 °C. Po ukončení inkubace byly ke všem vzorkům přidány 2 µl nanášecí barvičky a vzorky naneseny na 1% agarózový gel. Poté byla spuštěna elektroforéza při 120 V, 80 mA v TBE pufru po dobu přibližně 1,5 h. Výsledky byly vizualizovány pomocí zobrazovacího systému INGENIUS 3.

4.3.2.2 Sangerova sekvenace plazmidů

Pro sekvenaci byly použity primery pGEX-5´ a pGEX-3´ (viz příloha 1). Oba primery leží na okrajích vnášených inzertů a pomocí sekvenace z obou stran vznikají dvě sekvence, které spolu lze porovnat, pro ověření správného zařazení nukleotidů inzertu a korigovat tím chyby, které vznikají zejména v prvních sekvenovaných nukleotidech. Pro každý z primerů byla připravena sekvenační reakce, kam byl primer přidáván o objemu 5 µl tak, aby výsledná c_{primer} = 5 pmol/ µl. Templáty nukleových kyselin (sekvenované plazmidy) byly přidány v různých koncentracích (kvůli různé velikosti plazmidů a inzertů) dle Tab. 1.

Tab. 1 Komponenty jednotlivých sekvenačních reakcí. *Příprava reakcí probíhala při laboratorní teplotě.*

Inzert	V_{primer}/µl	$V_{plazmid}$/µl	$m_{plazmid}$/ng	$c_{plazmid}$/ng·µl^{-1}	$V(H_2O)$/µl
E2	5,0	1,8	180	22,5	1,2
E4		3,0	100	12,5	0,0
E6		2,0	226	28,3	1,0
E7		1,8	200	25,0	1,2

Připravené reakce byly předány do sekvenačního servisního střediska (OMICS Genomika, Biocev).

4.3.2.3 Izolace proteinů

Prvním krokem izolace proteinů byla lýza indukovaných bakterií. Lýza byla pro srovnání výtěžku prováděna dvěma způsoby, a to za pomoci dvou různých lyzačních roztoků.

Lýza pomocí Laemmliho pufru (pro složení viz. 4.1.3) byla provedena pouze resuspendováním bakteriálních peletů v připraveném pufru. Pro pelet připravený z 3 ml bakteriální suspenze (viz 4.3.1.5) bylo použito 150 µl Laemmliho pufru. Po resuspendování byla směs povařena při teplotě 95 °C po dobu 6 min. Lyzáty byly následně uloženy při teplotě – 20 °C pro další využití.

Pro lýzu pro ELISA byly pelety indukovaných bakterií resuspendovány v 525 µl PBS (1× koncentrovaný), přidáno DTT (výsledná c = 2 mmol/l), přidán N-lauroylsarkosin (výsledná w = 0,5 %) a přidán PMSF (výsledná c = 1 mmol/l). Po promíchání byly vzorky sonikovány na ledu (3 × 30 s sonikace, 30 s inkubace) a centrifugovány po dobu 30 min při 15 800× g. Centrifugací byly odděleny proteiny vyskytující se v cytoplasmě a membránové proteiny. Supernatant a pelet byly odděleny a oba uchovány při teplotě – 20 °C pro analýzu metodou Western blot.

Po každé izolaci byla koncentrace připraveného proteinu měřena pomocí přístroje NanoDrop 2000.

4.3.2.4 SDS PAGE a Western blot

Lyzáty transformovaných buněk byly analyzovány pomocí metody Western blot. Vzorky připravené lýzou s Laemmliho pufrem (viz 4.1.5), izolované z indukovaných i neindukovaných transformovaných bakterií s bromfenolovou modří, byly přímo nanášeny na připravený 10% akrylamidový gel (separační gel: 2,1 ml ddH_2O; 1,7 ml akrylamid/Bis; 1,25 ml „lower buffer"; 35 µl APS, 8 µl TEMED, zaostřovací gel: 1,2 ml ddH_2O; 0,3 ml akrylamid/Bis; 0,5 ml „upper buffer"; 16 µl APS, 4 µl TEMED). Lyzáty připravené s využitím DTT, N-lauroylsarkosinem a PMSF byly před aplikací na gel ještě upraveny; z lyzátu získaného ze supernatantu (proteiny rozpustné ve vodě) bylo odebráno 25 µl a přidáno 1,25 µl Laemmliho pufru; lyzáty získané z peletu (membránové proteiny) byly resuspendovány v 600 µl PBS (1× koncentrovaný), odebráno 20 µl a přidáno 20 µl Laemmliho pufru (2× koncentrovaný). Oba vzorky byly posléze povařeny po dobu 6 min při teplotě 95 °C v suché lázni (Labnet AccuBlock).

Připravené vzorky byly analyzované na SDS gelové elektroforéze (SDS-PAGE, z ang. *SDS-polyacrylamide gel electrophoresis*). Elektroforéza probíhala při konstantním napětí 150 V, proudu 80 mA po dobu 1 h 5 min v „running buffer" (viz . 4.1.5)

Proteiny separované v SDS-PAGE byly přeneseny na nitrocelulosovou membránu aktivovanou v methanolu a přenosovém pufru (viz. 4.1.5). Přenos probíhal v blotovací aparatuře (Minitran-Blot® Cell + Mini-PROTEAN® Tetrasystem) pomocí 1× koncentrovaného přenosového pufru (viz. 4.1.5) při konstantním napětí 150 V, proudu 350 mA po dobu 1,5 h. Poté byly zbylá vazebná místa na membráně blokována v lázni s 5% mlékem (5 g sušeného mléka rozpuštěno v 95 ml PBS + 0,05% Tween 20) po dobu 30 min.

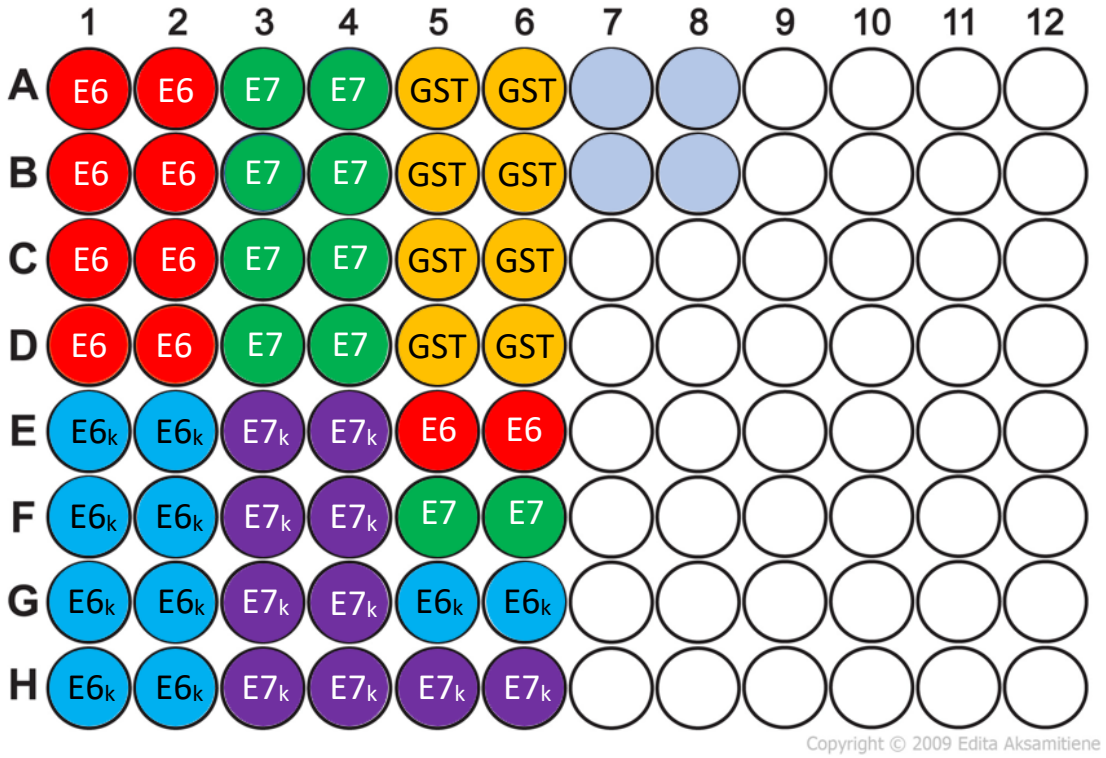
Pro detekci proteinů byla membrána inkubována ON při 5 °C s primární kozí polyklonální protilátkou specifickou pro GST-tag (anti-GST). Ráno byla membrána opláchnuta 3 × 10 min v PBS + 0,05% Tween 20. Po oplachu následovala inkubace se sekundární oslí protilátkou specifickou pro kozí primární protilátku (DAG) po dobu 2 h při teplotě 5 °C. Oplach probíhal za stejných podmínek jako po inkubaci s primární protilátkou. Imunodetekci jsme provedli vyvoláním membrány chemiluminiscenčním barvivem (součást kitu SuperSignal™ West Pico PLUS, viz. 4.1.6). Po vyvolání byly proteiny zobrazeny pomocí systému Amersham™ Imager 600, očištěny od barviva oplachem v PBS + 0,05% Tween 20, usušeny na vzduchu a uloženy pro archivní účely.

4.3.2.5 Optimalizace ELISA (detekce HPV E6 a E7 specifických protilátek)

Optimalizační ELISA byla provedena s cílem ověřit funkčnost metody, kvalitu připravených antigenů, reakčních činidel používaných v experimentech ELISA a porovnat různé přístupy přípravy slepého vzorku (množství odfiltrovaného pozadí).

Prvním krokem experimentu bylo potažení jamek destičky pomocí čerstvě připraveného roztoku připraveného naředěním zásobního GC 500× v BIC pufru. Do

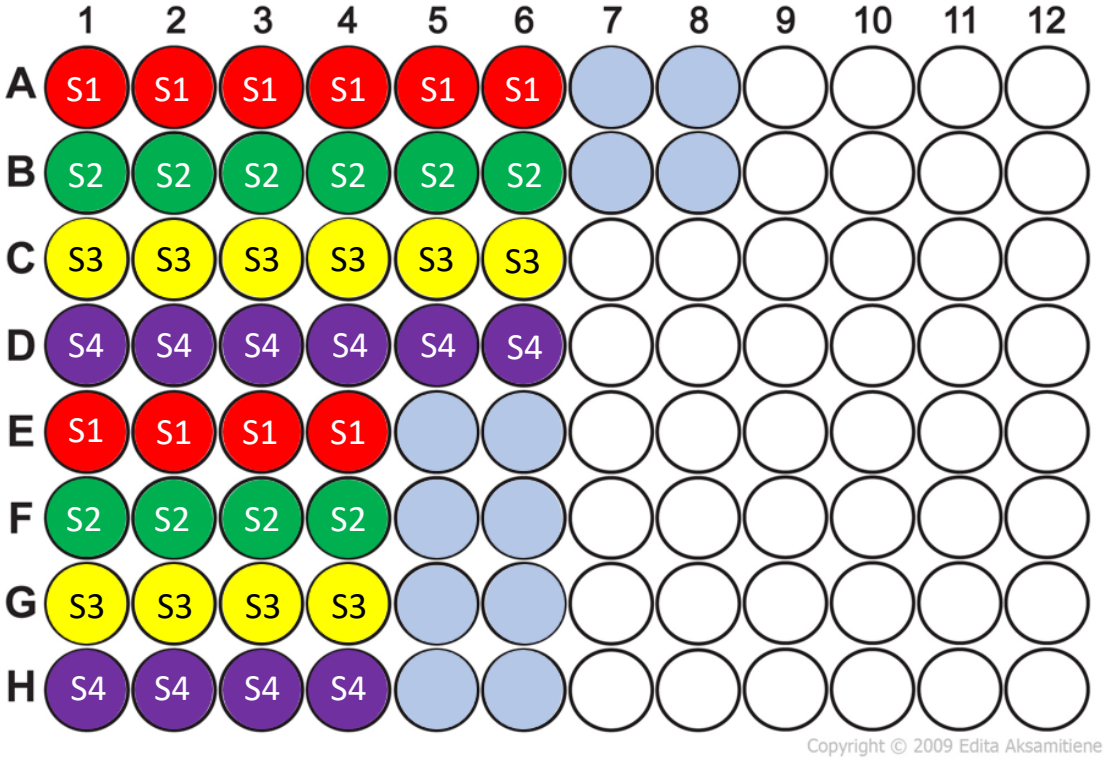
každé jamky destičky bylo přidáno 100 µl roztoku. Destička byla zakryta víkem a uložena přes noc do inkubátoru na 37 °C. Po inkubaci byl roztok vyklepnut z jamek destičky do buničiny a do všech jamek bylo pipetováno 200 µl blokovacího pufru a inkubováno při 37 °C po dobu 1 h. Poté byl blokovací pufr z jamek odstraněn a do jamek byly přidány antigeny ředěné na c = 0,25 µg/µl v 12 ml blokovacího pufru podle schématu na Obr. 6. Po nanesení antigenů byla destička inkubována opět při 37 °C po dobu 1 h.



***Obr. 6 Schéma nanesení antigenů**. Do jamek označených červeně s popiskem E6 byl jako antigen přidán mnou připravený protein E6. Do jamek označených tmavě zeleně s popiskem E7 byl jako antigen přidán mnou připravený protein E7. Do jamek označených modře s popiskem $E6_k$ byl jako antigen přidán kontrolní protein E6 připraven RNDr. Ludvíkovou. Do jamek označených fialově s popiskem E7k byl jako antigen přidán kontrolní protein E7 připraven RNDr. Ludvíkovou. Do žlutých jamek byla jako antigen přidána pouze GST. Do zbylých jamek nebyl přidán antigen, pouze 100 µl blokovacího pufru.*

Po ukončení inkubace byly nenavázané antigeny odstraněny a jamky 5× promyty pomocí PBS + 0,05% Tween 20. Do jamek byla následně nanesena kontrolní séra

ředěná poměru 1:100 s ředícím pufrem. Do každé jamky bylo pipetováno 100 µl séra podle schématu na Obr. 7 a inkubováno při 37 °C po dobu 1 h.



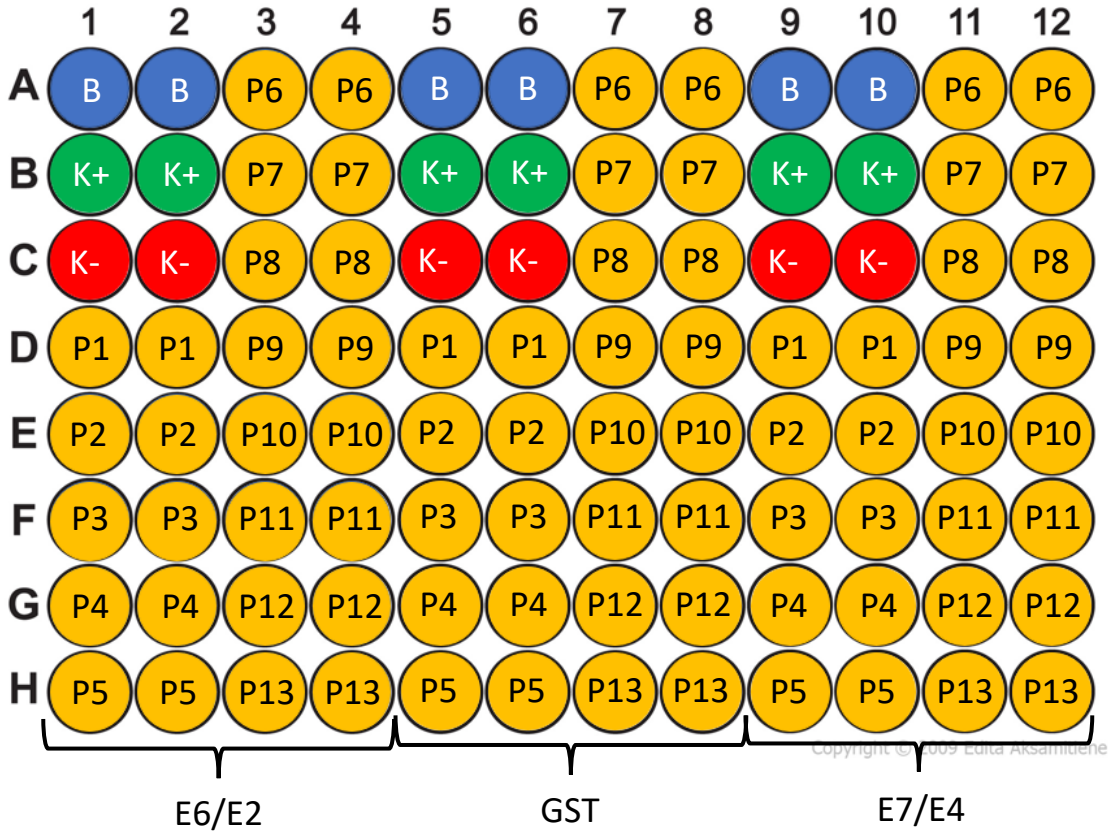
***Obr. 7 Schéma nanesení sér**. Do červených jamek bylo přidáno sérum S1 (GST E6-, E7+) obsahující protilátky proti proteinu E7. Do zelených jamek bylo přidáno sérum S2 (GST E6+, E7-) obsahující protilátky proti E6. Do žlutých jamek bylo přidáno sérum S3 (GST E6E7+), obsahující protilátky proti E6 i E7. Do fialových jamek bylo přidáno sérum S4 (GST E6E7-) neobsahující protilátky proti E6 ani E7. Do zbylých jamek bylo přidáno pouze 100 µl ředícího pufru.*

Po inkubaci opět následoval 5× oplach pomocí PBS + 0,05% Tween 20. Do jamek bylo přidáno 100 µl protilátky (konjugátu) „Donkey antiHuman fused with PX“ (DoAHU) ředěné v poměru 1:7500 v blokovacím pufru a inkubace probíhala při 37 °C po dobu 1 h. Během inkubace byla ve tmě rozpuštěna tableta obsahující 10 mg *o*-fenylendiamindichloridu (OPD, z ang. *o-phenylenediamine dichloride*) ve 25 ml substrátového pufru. Po ukončení inkubace byl proveden 5× oplach pomocí PBS + 0,05% Tween 20. Před posledním oplachem bylo k rozpuštěnému OPD přidáno ve tmě 10 µl 30% H_2O_2 a promícháno. Roztok OPD byl přidán po 100 µl do všech jamek a destička byla inkubovaná 5 min při laboratorní teplotě ve tmě. Po zbarvení slepých vzorků byly reakce zastaveny přidáním 100 µl H_2SO_4 o c = 2 mol/l. Pro vyhodnocení byla změřena absorbance při vlnových délkách 490 nm a 620 nm pomocí čtečky destiček iMark™ Plate Reader.

4.3.2.6 ELISA E2 a E4

Po optimalizaci metody byla provedena ELISA pro detekci E2 a E4 HPV-specifických protilátek. Postup přípravy destičky byl stejný jako při optimalizačním pokusu (viz 4.3.2.5). Pro tento pokus byly paralelně připravovány dvě destičky. První

byla potažena proteiny E2 a E4 a druhá byla potažena proteiny E6 a E7. Jelikož pacientská séra byla předem analyzována pouze na přítomnost E6 a E7 HPV-specifických protilátek, sloužila destička potažená E6 a E7 jako kontrolní. Po potažení jamek s příslušným antigenem a GST byla do jamek nanesena pacientská séra (viz 4.1.3). Rozložení destičky je znázorněno na Obr. 8. Další postup byl shodný s postupem uvedeným ve 4.3.2.5.

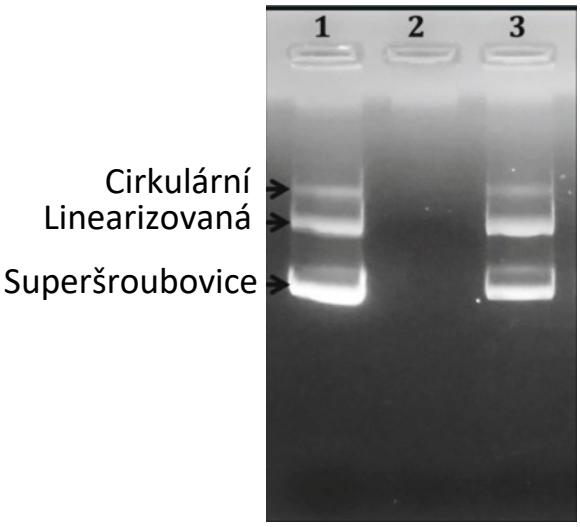


Obr. 8 Uspořádání destičky pro ELISA s E6 a E7, také pro E2 a E4*. Jamky označené modře obsahovaly slepý vzorek. Červené jamky obsahovaly pozitivní kontrolu (sérum obsahující protilátky specifické vůči E6 i E7). Zeleně označené jamky obsahovaly negativní kontrolu (sérum zaručeně neobsahující ani protilátky specifické vůči E6, ani E7). Zbylé jamky (označené žlutě) obsahovaly séra pacientů. Toto schéma bylo platné pro nanesení rekombinantně připravených antigenů E6 a E7, i E2 a E4. Jako kontrola pozadí bylo použito potažení destiček GST.*

4.3.3 Vyhodnocování výsledků

Interpretace výsledků REA je založená na srovnání migrace štěpených a neštěpených plazmidů. Pokud použijeme restrikční endonukleázu s jedním cílovým místem na plazmidu, měli bychom na gelu vidět jeden proužek o očekávané velikosti plazmidu, nebo plazmidu s inzertem. Plazmidy se v bakteriích nachází ve třech stavech:

cirkulární, linearizovaný a superšroubovice, čemuž odpovídají i tři migrující proužky při analýze nelinearizovaného plazmidu (viz Obr. 9).



***Obr. 9 Nativní formy plazmidů v bakteriálních kulturách**. Nejpomaleji v agarosovém gelu migruje cirkulární forma plazmidu, linearizovaná forma se pohybuje rychleji. Převzato a upraveno z: [68].*

Přítomnost virových proteinů i GST byla ověřena pomocí Sangerovi sekvenace s využitím programu BLAST [69]. Pomocí programu Clone manager byly získány kompletní sekvence inzertů pomocí překrytí sekvencí získaných pomocí primerů pGEX-5´a pGEX-3´. Následně byla provedena analýza kompletní sekvence v programu Jalview 2.11.4.1 porovnáním s referenčními sekvencemi uvedenými v databázi PaVE [70].

Výsledky ELISA byly vyhodnoceny v programu Excel. Nejprve byly od hodnot absorbance při vlnové délce 490 nm odečteny absorbance při 620 nm. Poté byly duplikáty zprůměrovány a odečteny hodnoty absorbance z jamek inkubovaných s příslušným sérem, ale bez antigenu (tedy pouze s GST). Tím byla získána hodnota OD vzorku. Kvůli nedostatečnému množství seronegativních kontrol nebyla vypočtena hraniční hodnota (CO, z ang. *cut off*), ale séra byla rozdělena podle arbitrárního systému do 3 kategorií: negativní ($OD \in \langle 0; 0{,}8 \rangle$), neurčená ($OD \in \langle 0{,}8; 1{,}1 \rangle$), pozitivní ($OD \in \langle 1{,}1; \infty$). Normálně zahrnuje výpočet CO směrodatné odchylky z duplikátů vzorků, a proto byly vypočteny průměry a ne medián jednotlivých duplikátů. Tento postup je součástí standardního operačního postupu domácí laboratoře [71].

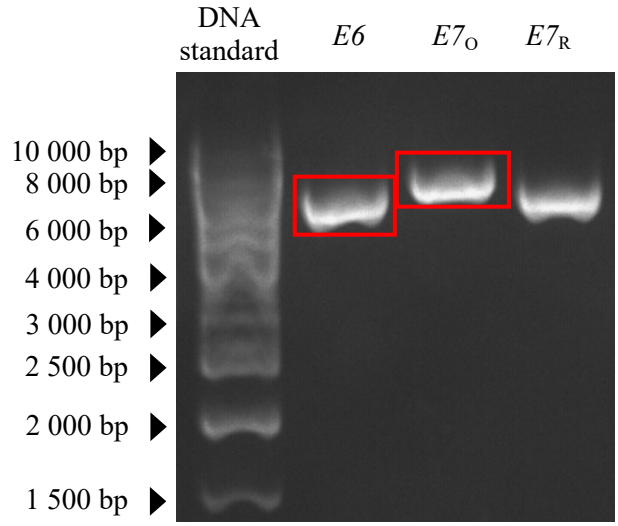
5 Výsledky

5.1 Mikrobiologické metody

V rámci mikrobiologické části byly dosaženy uspokojivé výsledky v každém kroku. Inkubací v SOB médiu a využitím komerčního kitu *Mix & Go!* byla indukována kompetence u bakterií *E. coli* XL-1 Blue. Kompetentní bakterie byly úspěšně transformovány metodou *Fast Transformation*, jelikož kolonie bakterií transformované plazmidy s inzertem vyrostly v prostředí antibiotik a při negativní kontrole žádné bakterie nevyrostly.

5.2 Restrikční analýza

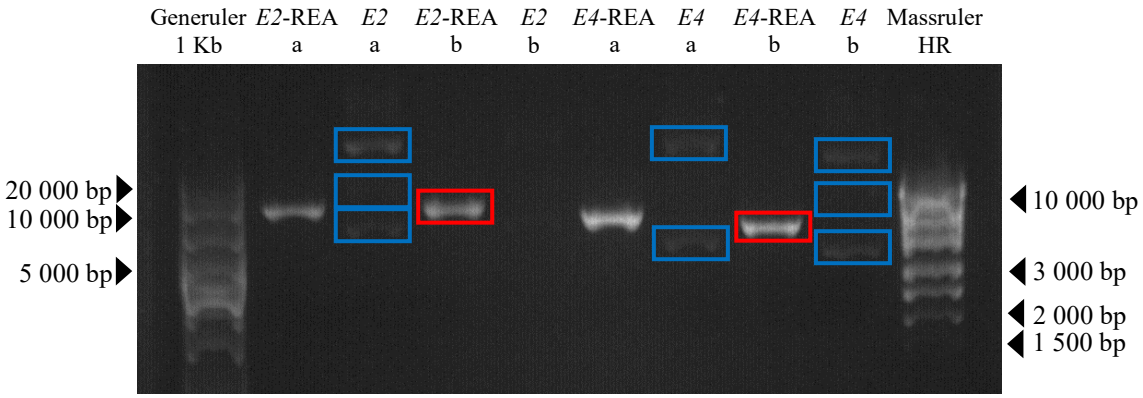
Pomocí restrikční analýzy je možné nejrychleji určit, zda je genetický materiál použitý k produkci rekombinantních proteinů neporušený. První byly analyzovány plazmidy s *E6* a *E7* genem. Při klonování plazmidu nesoucí informaci pro E7, byly objeveny dva různé typy kolonií, a to s ostrým a rozpitým rozhraním. Plazmidy z obou kolonií byly izolovány a na gel naneseny spolu s izolovaným plazmidem pro E6 (Obr. **10**). Úspěšné štěpení endonukleasou *BamHI* dokazuje migraci pouze jedné linie plazmidů s *E6* a *E7*. Plazmidy izolované z různých kolonií E7 měly různou hmotnost, a proto jsme se rozhodli pro kontrolu Sangerovou sekvenací. Výpočet hmotnosti nebo retence v tomto případě nebyl potřebný, jelikož se jednalo pouze o hrubou kontrolu počtu proužků reprezentujících migrující plazmidy.



***Obr. 10 Fotografie 1% agarozového gelu zachycující výsledky REA**. REA plazmidů s inzerty E6, $E7_O$ (izolovány z kolonií s ostrým ohraničením), $E7_R$ (izolovány z kolonií s rozpitým ohraničením). Pro štěpení byla zvolena endonukleasa BamHI. Označené proužky byly dále využity pro Sangerovou sekvenaci. Jako DNA standard byl použit Massruler HR.*

Poté byly analyzovány plazmidy nesoucí sekvence pro syntézu E2 a E4. Pokus byl proveden dvakrát a izoláty z obou pokusů byly naneseny na 1% agarozový gel. Izoláty

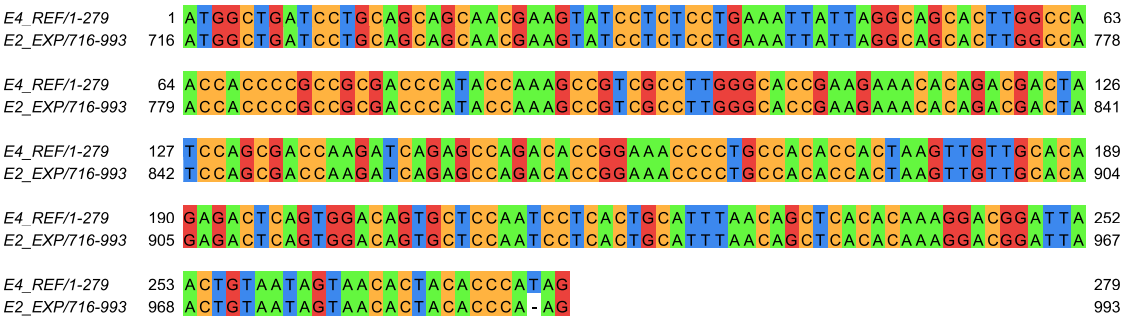
z prvního experimentu jsou označeny (a) a izoláty z druhého (b). Paralelně se štěpenými plazmidy byly na gel naneseny i neštěpené plazmidy. Plazmidy se v populaci bakterií vyskytují ve třech přirozených konformácích: cirkulární, linearizované a ve stavu superšroubovice (viz Obr. 11 E2a, E4a, E4b, při E2b pravděpodobně chyba při nánosu na gel).



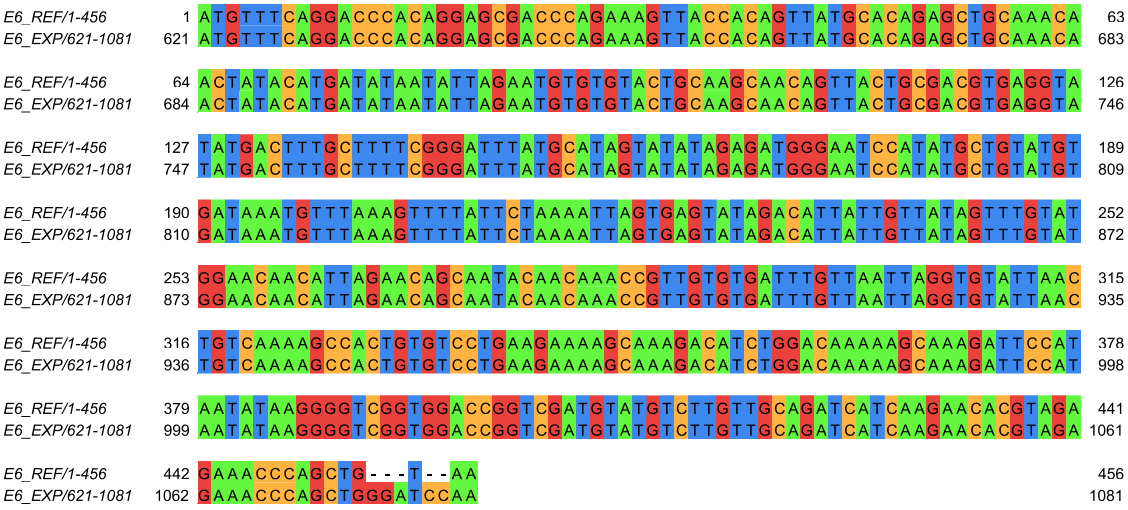
Obr. 11 Fotografie 1% agarozového gelu zobrazující výsledek REA plazmidů nesoucích sekvence pro E2 a E4*. Na gelu byly paralelně analyzovány vzorky ze dvou experimentů. První experiment (a) neposkytl uspokojivé výsledky REA, a proto byl experiment opakován (b) a výsledky paralelně srovnány. Vzorky plazmidů byly štěpeny (E2-REA, E4-REA) pomocí enzymu BamHI. Na gel byly vždy naneseny pro kontrolu i neštěpené plazmidy (E2, E4). Červeně označené proužky byly dále použity pro sekvenaci dle Sangera. Proužky označené modře reprezentují tři formy plazmidu: nejpomaleji migrující je cirkulární forma plazmidu, prostřední pruh reprezentuje linearizovanou formu, jejíž velikost by měla odpovídat rychlosti migrace štěpených plazmidů. Nejrychleji putují plazmidy ve formě superšroubovice. Všechny tři formy plazmidu se v populaci bakterií mohou vyskytovat.*

5.3 Sangerova sekvenace

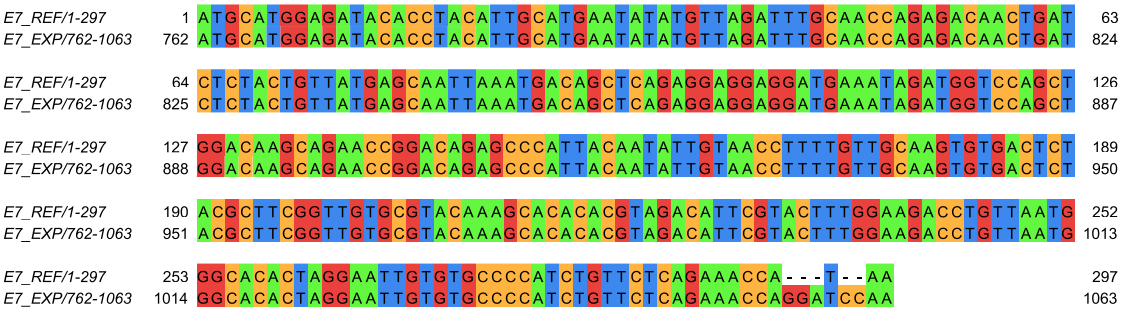
Pomocí sekvenace dle Sangera byl ověřen stav genetické informace vkládané do bakterií. Cílem bylo najít sekvence pro syntézu daného časného proteinu a GST. Sekvenovány byly pouze inzerty a části vektoru, ne celé plazmidy. Sekvence získané sekvenací pomocí primerů pGEX-5´ a pGEX-3´byly v programu Clone manager proloženy a získány konsensuální sekvence. Ty byly následně kontrolovány pomocí programu BLAST, pomocí kterého jsme ověřili přítomnost úseků odpovědných za syntézu časných proteinů a GST. Na závěr byl v programu Jalview 2.11.4.1 proveden srovnání dvou námi získaných sekvencí a referenčních sekvencí *E4* (Obr. 12, str. 40), *E6* (Obr. 13, str. 40) a *E7* (Obr. 14, str. 40) uvedených v databáze PaVE . V případě *E2* (Obr. **15**, str. 41), sekvenace pomocí primeru pGEX-3´ neproběhla úspěšně, a proto byla s referenční sekvencí srovnána pouze sekvence získaná pomocí primeru pGEX-5´. Všechny sekvence byly vyhodnoceny jako vhodné pro další experimenty. Sekvence E2 vykazovala ve srovnání s referenčním genem uvedeným v databáze PaVE, větší množství mutací způsobených nedostatečnou přesností Sangerova sekvenování delších úseků (viz Obr. 15, str. 41).V této fázi pokusů jsme ale připravený E2 protein přesto využili.



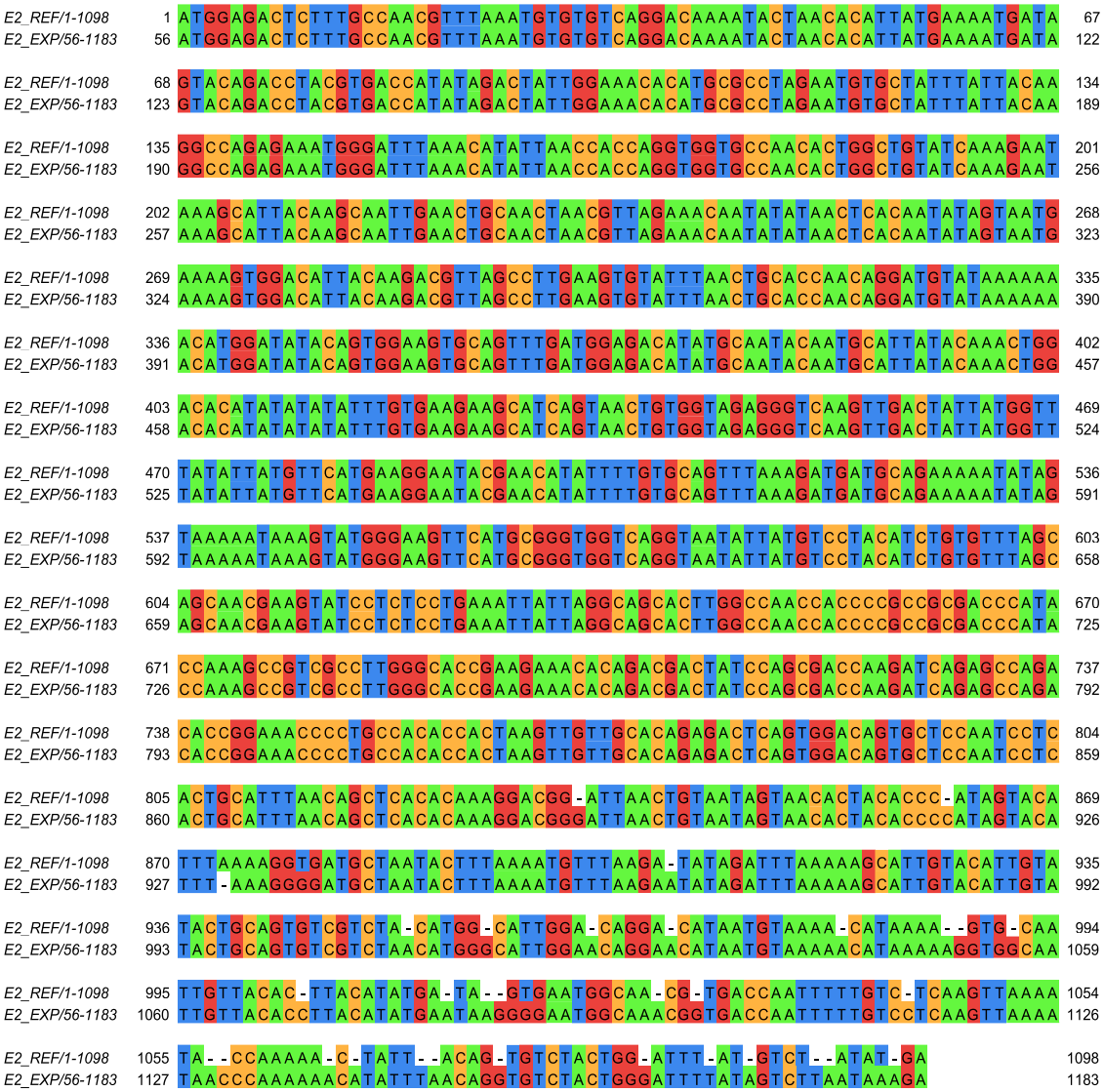
***Obr. 12 Výsledné porovnání sekvence získané Sangerovou sekvenací (E4_EXP) a referenční sekvence HPV16 E4 z databáze PaVE (E4_REF)**. Sekvence získaná experimentálně vykazuje vysokou míru stability. Rozdíl je ve stop kodonu na konci sekvence, který je v inzertu deletován. Porovnání bylo provedeno v programu Jalview 2.11.4.1.*



***Obr. 13 Výsledné porovnání sekvence získané Sangerovou sekvenací (E6_EXP) a referenční sekvence HPV16 E6 z databáze PaVE (E6_REF)**. Výsledky ukazují pouze 5 inzercí na konci sekvence získané sekvenací dle Sangera. Opět se na konci sekvence jedná o změnu ve stop kodonu. Sekvence E6 je zřejmě dostatečně konzervována a od referenční se příliš neliší. Porovnáni bylo provedeno v programu Jalview 2.11.4.1.*



***Obr. 14 Výsledné porovnání sekvence získané Sangerovou sekvenací (E7_EXP) a referenční sekvence HPV16 E7 z databáze PaVE (E7_REF)**. Míra konzervace nukleotidové sekvence je podobně jako v případě E6, vysoká a na konci sekvence byla objevena stejná změna jako u E6. Porovnání bylo provedeno v programu Jalview 2.11.4.1.*

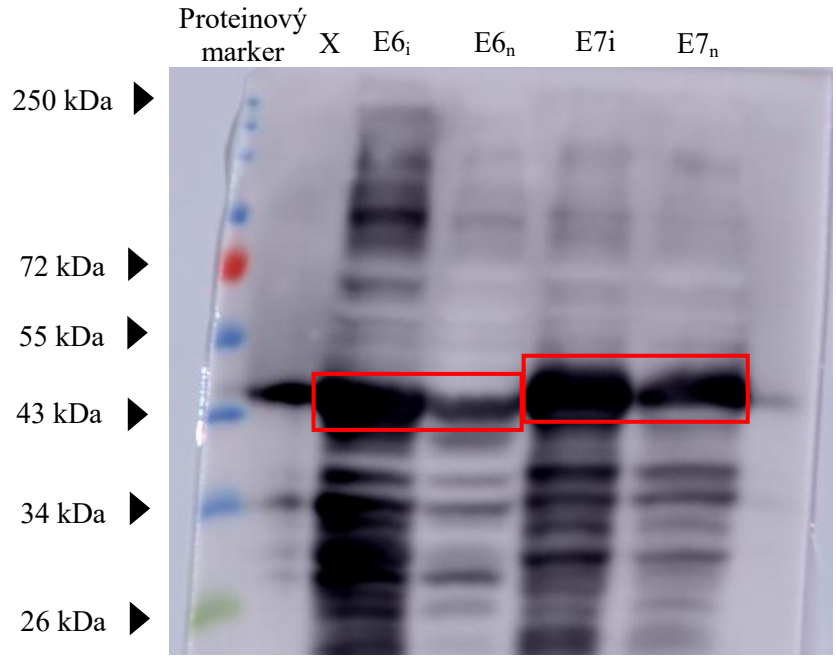


***Obr. 15 Výsledné porovnání sekvence získané Sangerovou sekvenací (E2_EXP) a referenční sekvence HPV16 E2 z databáze PaVE (E2_REF)**. V první polovině sekvence je míra podobnosti vysoká, ale v druhé polovině se vyskytuje velké množství bodových mutací (inzercí v E2_EXP), způsobených nedostatečnou přesností Sangerova sekvenováním delších fragmentů. Porovnání bylo provedeno v programu Jalview 2.11.4.1.*

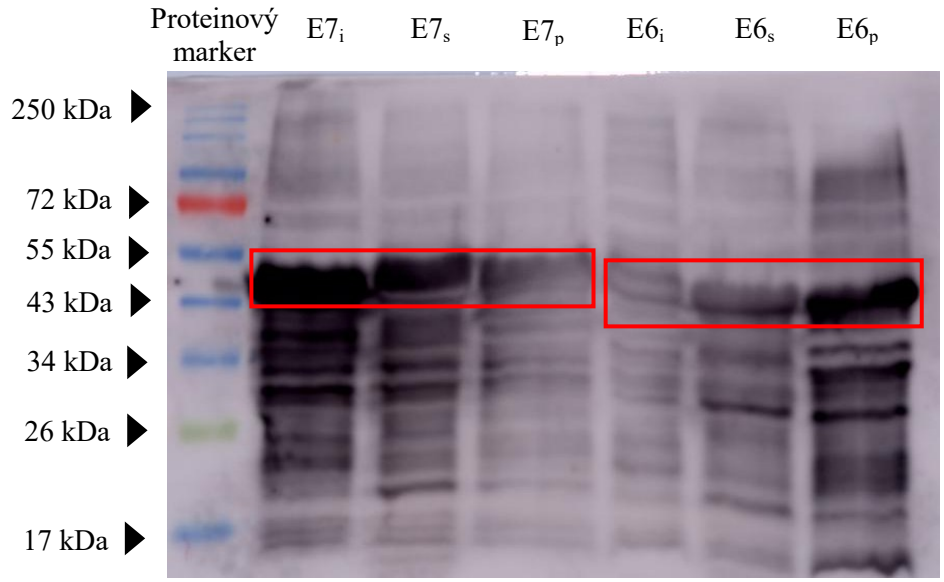
5.4 Westernblot

Cílem kontroly pomocí metody Western blot bylo ověřit přítomnost produkovaných antigenů a úspěšnost indukce proteosyntézy a proteinové izolace. Na Obr. 16, str. 42 lze pozorovat rozdílnou intenzitu proužků v dráhách lyzátů z indukovaných a neindukovaných *E. coli*. Srovnání výtěžku proteinů při lýze pomocí Laemmliho pufru a lyzačního roztoku obsahujícího DTT, PMSF a N-lauroylsarkosin je zobrazeno na Obr. 17, str. 42. Pomocí tohoto Western blotu jsme potvrdili, že E6 a E7 se

vyskytují při rekombinantní syntéze jak v membráně, tak cytosolu bakterií *E. coli* (Obr. **17**, str. 42).



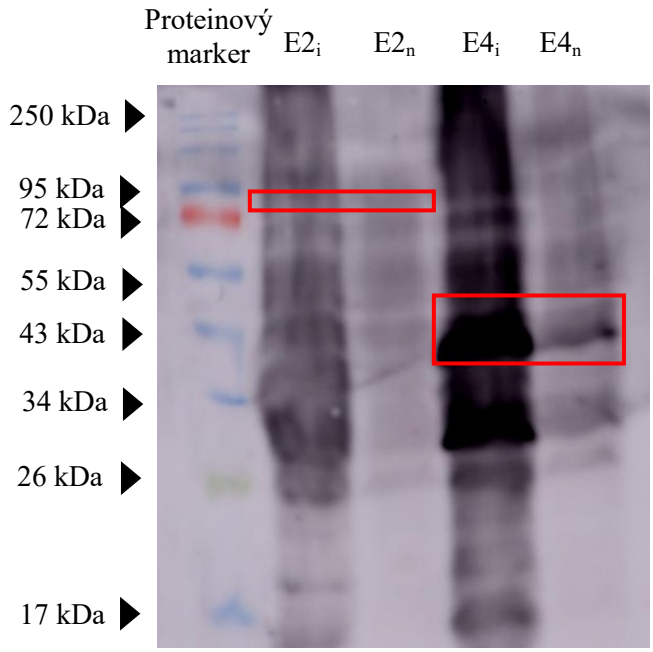
***Obr. 16 Western blot proteinů E6 a E7**. Jako standard byl použit Color Protein Standard, Broadrange (Biolabs) označen jako proteinový marker. Druhá jamka byla kvůli chybnému nanesení vzorku vynechána (označení X). Ve třetí a čtvrté jamce je viditelný proužky E6 při očekávané hmotnosti (46–49 kDa). V páté a šesté dráze lze pozorovat proužky E7, které by však měly mít nižší hmotnost než proužky E6. Na obrázku je také zřetelný rozdíl mezi indukovanými ($E6_i$, $E7_i$) a neindukovanými ($E6_n$, $E7_n$) vzorky. Proteiny byly izolovány z bakterií E. coli pomocí Laemmliho pufru a na gel byly nanášeny celé bakteriální lyzáty.*



***Obr. 17 Western blot srovnávající výtěžky různých izolací**. Jako standard byl opět použit Color Protein Standard, Broadrange (Biolabs) označen jako proteinový marker. Dráhy označené $E7_i$ a $E6_i$ odpovídají izolaci pomocí Laemmliho pufru. Na gel byly nanášeny celé bakteriální lyzáty. Dráhy $E7_s$, $E6_s$, $E7_p$ a $E6_p$ odpovídají izolaci za využití lyzačního roztoku. Proteiny separovány v dráhách $E7_s$ a $E6_s$ zůstaly po centrifugaci lyzátu v supernatantu, zatímco $E7_p$ a $E6_p$ zůstaly v peletu.*

Následně byl proveden Western blot i pro E2 a E4. Proteiny byly izolovány pouze za využití lyzačního roztoku s DTT, N-lauroylsarkosinem a PMSF a pro imunoblot byly

použity pouze supernatanty vzniklé po centrifugaci. Protein E4 se podařilo identifikovat, ale přítomnost E2 s jistotou potvrzena nebyla. Na Obr. 18 je v dráhách E4 jasně viditelný hrubý proužek odpovídající očekávané hmotnosti fúzního proteinu (43 kDa). V dráhách E2 přítomnost výraznějších proužků chybí, avšak při očekávané hmotnosti 82 kDa byl slabý signál zachycen, a proto nelze produkci E2 alespoň v malém množství vyloučit. Všechny lyzáty byly dále využity v ELISA experimentech.



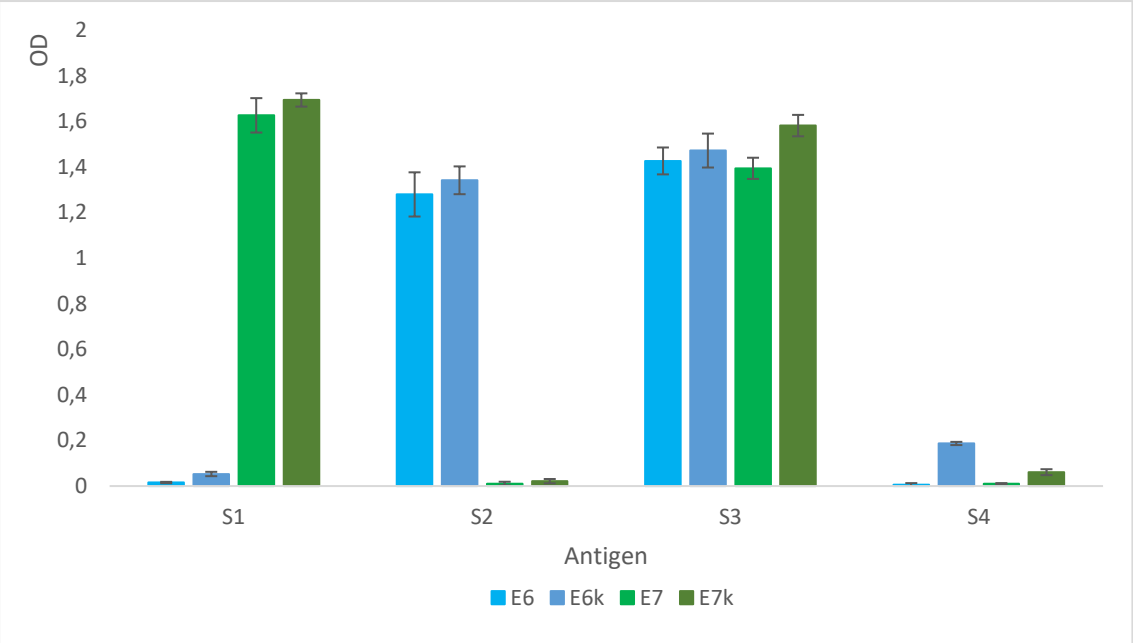
***Obr. 18 Western blot E2 a E4**. Jako standard byl opět použit Color Protein Standard, Broadrange (Biolabs) označen jako proteinový marker. Opět byly srovnávány izoláty z indukovaných ($E2_i$, $E4_i$) a neindukovaných ($E2_n$ a $E4_n$). V dráhách E4 je patrný hrubší proužek při hmotnosti 43 kDa (označen v červeném obdélníku), který pravděpodobně odpovídá fúznímu proteinu E4. V dráhách E2 nelze výrazný proužek identifikovat, ale mezi 72–95 kDa standardy se proužky nachází, co vyznačuje červený obdélník. Kvůli tomu nebyla syntéza E2 fúzního proteinu vyloučena.*

5.5 ELISA

Prvním krokem vedoucím k finálním výsledkům byla optimalizace metody GST-ELISA. Pro tento úkol byla vybrána 4 kontrolní séra (viz 4.1.3) a připravena destička s jamkami potaženými různými antigeny. Pomocí optimalizace byly také srovnány různé způsoby přípravy slepého vzorku a ověřena citlivost metody na kontrolních sérech. Na základě arbitrárního systému adaptovaného ze standardního operačního postupu domácí laboratoře byly vypočteny hodnoty uvedené v Tab. 2, str. 44 a následně určena pozitivita nebo negativita příslušného vzorku (přítomnost protilátek vůči danému antigenu). Výsledky odpovídaly kontrolám a také údajům z předešlých měření. Výsledky byly, pro přehledné srovnání absorbancí, následně vyneseny do grafu (viz Obr. 19, str. 44). Výsledky využité pro srovnání a výběr slepého vzorku zde neuvádíme, jelikož pro toto vyhodnocení byla srovnávána hrubá data, která jsou uvedená v sekci Přílohy (příloha 4).

***Tab. 2 Vyhodnocení optimalizace ELISA metody**. Zelenou barvou jsou označeny vzorky, které byly vyhodnoceny jako negativní a červenou barvou jsou označeny pozitivní vzorky. S1 až S4 jsou kontrolní séra (pro složení viz. 4.1.3). Modrou barvou jsou označeny slepé vzorky a vzorky, kde byla jako antigen použita pouze GST. Pro schéma přípravy ELISA viz 4.3.2.5. Antigeny označené E6 a E7 byly nově připraveny a antigeny $E6_k$ a $E7_k$ sloužily jako kontrola a byly připraveny a darovány RNDr. Ludvíkovou.*

Sérum	Antigen			
	E6	$E6_k$	E7	$E7_k$
S1	0,0155	0,053	1,627	1,6945
S2	1,28	1,342	0,011	0,0215
S3	1,427	1,4725	1,3945	1,582
S4	0,0065	0,187	0,011	0,061

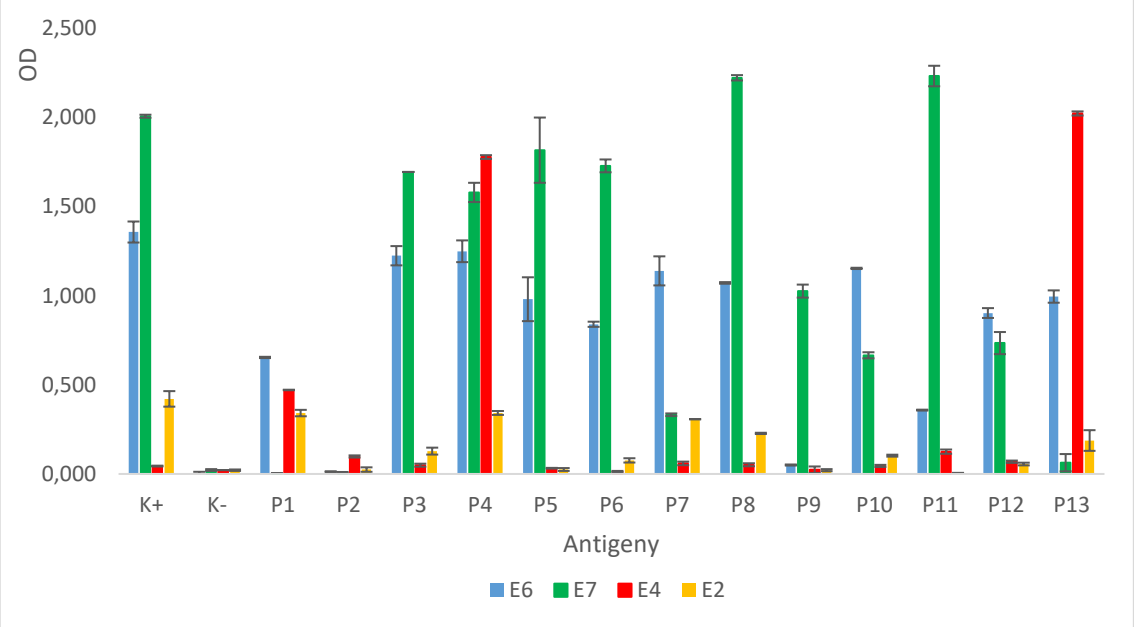


***Obr. 19 Grafické zobrazení výsledků optimalizační ELISA**. Na grafu jsou znázorněny rozdíly absorbancí při vlnových délkách 490 nm a 620 nm u jednotlivých vzorků. Hodnoty označené E6 a E7 reprezentují výsledky jamek potažených rekombinantními proteiny E6 a E7, které jsem připravil sám, zatímco E6k a E7k reprezentují výsledky jamek potažených proteiny E6 a E7 připravenými RNDr. Ludvíkovou.*

Následovala ELISA s antigeny E2 a E4. Pro srovnání byly paralelně připravovány destičky potažené rekombinantními proteiny E2, E4 a E6, E7. Destička potažená E6 a E7 sloužila jako referenční, neboť vzorky byly analyzované již dříve a hladiny protilátek použitých sér byly známé. Naopak hladiny protilátek specifických pro antigeny E2 a E4 nebyly u těchto vzorků známé. Výsledky ELISA E6, E7, E4 a E2 jsou uvedeny v Tab. 3, str. 45 a pro snadnější vizualizaci výsledků, byly vypočítané hodnoty vyneseny do grafu znázorněného na Obr. 20, str. 45. Vyhodnocení pozitivity a negativity na jednotlivé protilátky u jednotlivých pacientů jen velmi omezeně odpovídá výsledkům předešlého šetření (viz 4.1.3). Hrubá data předešlého šetření (příloha 5) byla srovnána s hrubými daty naměřených mnou (příloha 6) ale ani zde výsledky neodpovídaly. Hrubá data pro ELISA E2 a E4 jsou uvedena v příloze 7. Pro výsledné srovnání hrubých dat viz příloha 8.

***Tab. 3 Vyhodnocení detekce HPV E6, E7, E2 a E4 specifických protilátek metodou ELISA**. Červeně jsou znázorněny vzorky vyhodnocené jako negativní, zeleně vzorky pozitivní. Žlutě jsou znázorněné vzorky, které dosahují hodnoty v intervalu <0,8; 1,1>, tedy nelze jednoznačně potvrdit jejich pozitivitu nebo negativitu. K+ a K- označují kontrolní séra (použité i při optimalizační ELISA, K+ = S3, K- = S4), zatímco P1 až P13 označují pacientská séra. Pro schéma přípravy ELISA viz 4.3.2.6, str. 35 a pro informace o pacientských sérech viz 4.1.3.*

Sérum	Antigen			
	E6	E7	E4	E2
K+	1,357	2,007	0,044	0,421
K-	0,002	0,022	0,022	0,021
P1	0,654	0,003	0,471	0,342
P2	0,013	0,006	0,098	0,025
P3	1,224	1,694	0,049	0,128
P4	1,249	1,579	1,778	0,342
P5	0,980	1,816	0,032	0,025
P6	0,840	1,728	0,013	0,076
P7	1,139	0,332	0,059	0,307
P8	1,072	2,222	0,052	0,228
P9	0,050	1,026	0,024	0,021
P10	1,153	0,666	0,045	0,103
P11	0,358	2,232	0,125	0,006
P12	0,903	0,734	0,069	0,056
P13	0,995	0,063	2,022	0,188



***Obr. 20 Graf znázorňující srovnání hladin protilátek specifických vůči proteinům E2, E4, E6 a E7 u pacientů s nádory hlavy a krku a u kontrolních sér**. Na ose OD jsou uvedeny hodnoty OD, získané metodou popsanou v 4.3.3.*

6 Diskuze

Prvním úspěchem v rámci praktické části této bakalářské práce byla mikrobiologická část. Úspěšně jsem transformoval bakterie *E. coli* XL-1 Blue, které se povedlo namnožit a získal jsem dostatečné množství i pro budoucí experimenty. Připravené bakteriální zásoby byly uskladněny pro využití v budoucnosti.

Dále se povedlo optimalizovat GST-ELISA. Pomocí kontrolních sér jsme ověřili, že připravené antigeny fungují srovnatelně s těmi původními. Při optimalizačním experimentu jsme také zvolili způsob přípravy slepého vzorku. Naměřené hodnoty pro všechna čtyři kontrolní séra odpovídaly předešlému vyhodnocení vyšetření s antigeny od RNDr. Ludvíkové (Tab. 2, pro výsledky předešlých štření viz. 4.1.3), a proto byly vyhodnoceny jako vyhovující standardy pro ELISA s pacientskými vzorky. Pro výběr slepého vzorku byly testovány tři přístupy jeho přípravy. Jamka byla potažena připraveným antigenem, ale bez přídání séra; jamka nebyla potažená antigenem a nebylo přidané sérum a jamka byla potažená čistým GST namísto antigenu. Pro další postup byl zvolen postup zahrnující potažení jamky pouze GST a inkubací s pacientským sérem, jelikož je to postup uvedený v standardním operačním postupu domácí laboratoře (založen na publikovaných postupech [54]). Vliv na chemiluminiscenci má v tomto případě pouze samotný antigen, protilátky a produkt vzniklý enzymovou reakcí. Do pozadí se tedy řadí vliv kotvícího mechanismu (GC a GST viz 2.5.2) a vliv séra (neodmyté části). Postup zahrnující přidání séra do jamky bez antigenu nebo GST není vhodný, jelikož nefiltruje vliv kotvícího mechanismu na luminiscenci. Podle mého názoru může být postup založený na potažení jamek vlastním antigenem bez přídavku séra vhodný, což naznačují i hrubá data naměřených absorbancí (příloha 4). Filtruje se totiž vliv kotvícího mechanismu, ale také antigenu samotného, snižují se rozdíly mezi jednotlivými antigeny a tím signál více odpovídá samotné koncentraci protilátek. Na druhé straně nepřítomnost séra v jamce neposkytuje možnost filtrovat příspěvek složek séra na naměřenou hodnotu.

Po optimalizační ELISA byla provedena ELISA pro detekci E2 a E4. Tuto metodu jsem na půdě domácí laboratoře zaváděl jako první a jsem také první, kdo připravil antigeny pro tuto detekci. Tento krok experimentu však zatěžoval nedostatek kontrolních sér pro detekci E2- a E4-specifických protilátek. Pokusil jsem se ale srovnat naměřené hladiny protilátek specifických vůči E2 a E4 s naměřenými hladinami protilátek vůči E6 a E7. Destička pro detekci E6- a E7- specifických protilátek sloužila jako referenční pro detekci protilátek vůči E2 a E4. Na referenční destičku byly naneseny jak kontrolní séra pro detekci E6- a E7-specifických protilátek, tak pacientská séra dříve vyšetřená na přítomnost stejných protilátek. Výsledky ELISA pro E6 a E7 neodpovídali těm, které byly získané v předešlém testováním (viz 5.55.5 a 4.1.3 a příloha 6). Přičíny mohou být různé. První možností je stáří sér, jelikož některá séra byla i 20 let stará a nevíme přesně,

jak často bylo se séry manipulováno, a tedy jestli nedošlo k degradaci protilátek. Selhání při přípravě antigenů jsme vyloučili použitím kontrolních sér, jejichž naměřené hodnoty odpovídaly hodnotám naměřeným dříve a zároveň jsem neobjevil větší rozdíly mezi OD naměřené při použití mnou připravených antigenů a antigenů připravených RNDr. Ludvíkovou. To také podporuje teorii, že rozdíly ve vyhodnocení byly zapříčiněny stavem pacientských sér. Srovnání výsledků je obtížné i z důvodu toho, že pro současná měření nemůžeme spočítat hodnotu CO kvůli nedostatku využitých negativních sér a je tedy možné, že pouhé srovnání pozitivity a negativity na základě naměřených OD a co pro předchozí měření je nesrovnatelné. Pro budoucí pokusy je nutné doplnit vyšetření srovnatelného počtu pozitivních a negativních sér a stanovit standardizované CO.

Detekce E2- a E4-specifických protilátek v sérech pozitivních na E6- a E7-specifické protilátky poskytla zajímavé informace o hladinách těchto protilátek u pacientů s nádory hlavy a krku. Exprese proteinu E4 je spojována s produktivní virovou infekcí, jelikož exprese E4 je spojována s uvolněním viru z infikované buňky [21]. Také i protilátky vůči E4 jsou spojovány s přítomnou produktivní virovou infekcí [14, 15], a proto jsme předpokládali nízkou prevalenci těchto protilátek u pacientů s onklogickým onemocněním, ale využití E4 jako markeru onkologických nemocí není optimální, neboť v séru se může projevit jiná produktivní benigní léze, která produkuje E4 a tím i u onkologického pacienta může dojít k naměření vysokých hladin protilátek proti E4. To může také vysvětlit vysoké naměřené hladiny E4 u dvou z našich pacientů (viz Tab. 3, str. 45). V souladu s výše uvedeným jsme detekovali E4-specifické protilátky jen u 2/13 pacientů. Jak jsem již uvedl výše, tento výsledek má zatím limitovanou výpovědní hodnotu z důvody diskutabilní kvality pacientských sér a nemožnosti stanovit hodnotu CO. Na druhé straně lze pozorovat markantní rozdíly mezi hodnotami naměřených absorbancí (viz Obr. 20, str. 45). Je tedy nevysvětleným pozorováním rozdíl těchto hodnot, který může být zakotven v některé z biologicky významných funkcí proteinu E4 či v anamnéze vyšetřovaných pacientů. Protilátky specifické vůči E2 nebyly identifikovány u žádného z pacientů, což je v přímém rozporu s naším předpokladem a také zjištěními jiných výzkumných skupin [28, 48]. Jak ale napověděly výsledky kontrolního imunoblotu, antigen E2 nebyl s největší pravděpodobností úspěšně připravený (Obr. 18, str. 43). Antigen nemusel být vyprodukovaný vůbec, ale slabý proužek na imunoblotu spíše naznačuje, že byl tento antigen produkován ve velmi malém množství. Další možné vysvětlení negativního výsledku ELISA může být i samotná struktura proteinu E2 a jeho interakce s protilátkami. Protein E2 se pro svoji funkci přirozeně dimerizuje (viz 2.2.1). Naše výsledky naznačují, že E2-specifické protilátky rozeznávají pouze konformační epitopy. To potvrzují i jiné práce [72], ale zároveň uvádí, že určité E2-specifické protilátky jsou schopny vázat i denaturované formy E2. Naší teorií je, že vzhledem k tomu, že námi produkované proteiny neprošly procesem skládání v „refolding buffer“ (jako je popsáno v [55]), mohlo k dimerizaci dojít v omezené míře

nebo vůbec. V takovém případě by příčinou toho, že u žádného z pacientů nebyla pozitivní odpověď naměřena, mohlo být, že se protilátky na vyprodukované monomery imobilizované na povrchu destičky nemohly navázat, i když v séru pacientů přítomny byly. Třetí možnou příčinou je také prostá degradace protilátek v sérech (diskutováno výše).

Tato práce se zabývala nepřímými metodami detekce HPV-specifických protilátek, a to od produkce antigenů až po samotnou detekci protilátek. V rámci přípravy protilátek jsme využili publikovaných postupů domácí laboratoře pro přípravu antigenů fúzovaných s GST pro detekční metodu GST-ELISA [71, 73, 74] s cílem ověřit také úspěšnost přípravy doposud domácí laboratoří nepřipravovaných antigenů E2 a E4 a jejich využití při detekci HPV-specifických protilátek. Antigeny fúzované s GST se obyčejně přečišťují pomocí GST-afinitní chromatografie, pomocí které lze získat čistý antigen pro použití při ELISA, jak je popsáno v původní publikaci [55]. V našem případě byla purifikace vynechána z důvodu, že antigeny se díky GST specificky váží na GC, kterým je potažen povrch destičky a po promytí destičky zůstává navázaný pouze antigen, zatímco zbytek bakteriálního lyzátu je oplachem z destičky odnesen. Prokázali jsme, že v případě proteinů E4, E6 a E7 je možné tento postup využít, ale experiment by měl být opakován s nově odebranými séry a větším počtem vzorků. Koncentrace proteinů byly měřeny v celém bakteriálním lyzátu, nemohli jsme tedy ověřit množství antigenu použitého pro potah jamek destičky. Proto by bylo vhodné prozkoumat i rozdíly, jaké mají na naměřené hodnoty OD vzorků při použití různých množství bakteriálního lyzátu. Syntéza proteinu E2 nebyla úspěšná pravděpodobně proto, že se jedná o protein podstatně složitější struktury, než zbylé tři zkoumané proteiny. V tomto případě je podle našich zjištění nevyhnutelná purifikace a kontrola skládání proteinu. Pro další analýzy navrhujeme postupovat jak je uvedeno v [55].

Moje práce měla také za cíl přispět k stále častěji propagovanému přístupu detekce většího počtu HPV-specifických protilátek proti časným virovým proteinům u pacienta. Řada studií zabývajících se touto otázkou byla již publikována [28, 49] a vznikají i první populační studie, které pro identifikaci rizikových pacientů využívají právě násobné seropozitivity [28]. Ve své práci dokumentuji úspěšnou přípravu většiny analyzovaných antigenů a částečné ověření jejich funkčnosti na kontrolních sérech a pacientských materiálech. Jedná se o předběžné výsledky pro přípravu studie většího rozsahu. Tyto antigeny a metodický přístup by měl být využit ve studii většího rozsahu zaměřeného na pacienty s nádory hlavy a krku. Včasný záchyt rizikových pacientů je klíčem k lepší úspěšnosti léčby nádorových onemocnění asociovaných s HPV a výzkum detekčních metod je nepostradatelnou součásti. Při časném odhalení nemoci se pacientovy šance na přežití radikálně zvyšují. Pro pacienty s nádory hlavy a krku však momentálně neexistuje účinná metoda pro včasný záchyt rizikových pacientů. . Výsledky

Jiang a kol. z roku 2019 poukazují též na možné terapeutické využití monoklonálních protilátek specifických pro časné virové proteiny k inhibici nádorové progrese [75].

V rámci výsledků mikrobiologické části je zajímavý výskyt dvou vizuálně rozdílných bakteriálních kolonií *E. coli* XL-1 Blue transformovaných plazmidem pGEX-4T-1 s inzertem *E7*. Kromě kolonií s ostrým rozhraním jsme pozorovali taky růst kolonií s rozpitým rozhraním, které u jiných transformovaných bakteriích pozorováno nebylo. Plazmidy z obou kolonií jsme se pokusili ověřit pomocí REA (Obr. 10, str. 38). Tato analýza dokázala rozdílnou hmotnost plazmidů ozančených $E7_O$ a $E7_R$. Pro další experimenty jsme se rozhodli použít plazmid $E7_O$ kvůli podobnosti kolonií, ze kterých byl izolován, s koloniemi ostatních transformovaných linií. Hlubší analýzu $E7_R$ jsme se neprováděli, ale tento fenomén by bylo vhodné zkoumat dál a ověřit stav inzertu pro časný protein. Bakterie s plazmidy s inzerty pro syntézu E2 a E4 jsme dostali darem od RNDr. Vierky Ludvíkové, provedli jsme analýzu plazmidů pomocí REA a výsledky potvrdily kvalitu plazmidů (Obr. 11, str. 39). V dráhách se štěpenými plazmidy lze pozorovat migraci pouze jednoho linearizovaného fragmentu a u neštěpených plazmidů lze pozorovat více migrujících fragmentů, což odpovídá různým formám plazmidů vyskytujícím se v bakteriích. Proto byla pro ověření sekvencí použita Sangerova sekvenace. Analýza touto metodou dokázala, že sekvence inzertů jsou shodné s referenčními geny uvedenými v databázi PaVE. Mutace na koncích sekvencí zřejmě nejsou projevem artefaktů spojených s limity použité metody [55]. Sekvenace byla prováděna pomocí primerů s „opačným směrováním“ pGEX-5´ a pGEX-3´ aby se limitovalo nesprávné přiřazení bazí a také z důvodu, že efektivita sekvenace klesá s délkou sekvenovaného vzorku. Některé zdroje uvádí, že Sangerova sekvenace nedokáže vyhodnotit úsek delší než 1000 bp [76]. Tato limitace je evidentní v případě sekvenace izertu *E2*, který je podstatně delší než inzerty *E6*, *E7* a *E4* (Obr. 15, str. 41). Při sekvenaci pomocí pGEX-5´ jsem na konci sekvence detekoval množství inzercí, které mohou být následkem snížené efektivity sekvenace právě při analýze delších fragmentů. Sekvenovaný úsek na Obr. 15, str. 41 odpovídá pouze sekvenci získané pomocí primeru pGEX-5´, jelikož sekvenace s primerem pGEX-3´ neproběhla úspěšně. Sekvenací dle Sangera se nám tedy podařilo vyvrátit podezření o poškození inzertů a experiment mohl pokračovat indukcí proteosyntézy. Zbytek plazmidového vektoru však sekvenován nebyl a nelze tedy potvrdit, že k poruchám nedošlo v jiných částech plazmidu, co by mohlo v případě E2 vysvětlit nízkou produkci proteinu zaznamenanou na imunoblotu.

Protesyntéza na inducibilním plazmidu pGEX-4T-1 je vyvolána přidáním substrátu. Jelikož plazmid využívá mechanismus *lac*-operonu (příloha 1) je pro indukci proteosyntézy využíván IPTG. Vyprodukované proteiny je následně z bakterie potřeba izolovat. Nejprve byl zvolen jednokrokový izolační postup, kdy byl k bakteriálnímu peletu přidán Laemmliho pufr a resuspendovaný pelet byl vařen 6 min při 95 °C. Výsledky získané tímto postupem byly dobré (Obr. 16, str. 42), ale pro další pokusy jsme

použili lýzu za využití lyzačního roztoku (viz 4.3.2.3). Srovnání výtěžků lýze různými metodami dokumentuje Obr. 17, str. 42, kde nejsou rozdíly ve výtěžku izolace patrné. Izolace pomocí lyzačního roztoku poskytla méně intenzivní signály na Western blotu, což je pro identifikaci hledaných fragmentů výhodnější, neboť nedochází k tak velkému přesahu čela pohybující se frakce. Metodou Western blot jsme také identifikovali vyprodukované proteiny na základě předpokládané hmotnosti (Obr. 16, str. 42, Obr. 17, str. 42, Obr. 18, str. 44). Nebyli jsme schopni identifikovat E2 protein. V očekávané oblasti nebyl patrný výrazný, pouze slabý pruh. Jak jsem uvedl již dříve, tento antigen jsme v ELISA použili, ale bez úspěchu. Srovnáním lyzátů z indukovaných a neindukovaných bakterií jsme potvrdili úspěšnou indukci proteosyntézy pomocí IPTG. Identifikace proteinů byla obtížná zejména z toho důvodu, že specificita použitých protilátek se ukázala jako nedostatečná. Protilátky s pravděpodobně degradovanými vazebnými místy se navázaly na každý protein bakteriálního lyzátu, a proto imunobloty spíše připomínají SDS-PAGE. Příčina rozdílu v syntéze E2 a zbylých časných proteinů je neznámá, jelikož stav inzertu byl kontrolován (uvedeno výše). Možnou příčinou by byla mutace v receptoru pro IPTG, nebo promotorových oblastí vektoru, které sekvenací kontrolovány nebyly. Nelze také vyloučit, že starší bakterie již nebyly dost vitální pro úspěšnou syntézu proteinů.

6 Závěr

Tato práce měla za cíl popsat metody detekce HPV-specifických protilátek a jejich využití, připravit antigeny a vyšetřit pacientské vzorky metodou GST-ELISA na přítomnost protilátek specifických vůči časným virovým proteinům E2, E4, E6 a E7 a naměřené hladiny protilátek porovnat a vyhodnotit jejich význam. Cíle této bakalářské práce se podařilo naplnit:

- Metody detekce HPV-specifických protilátek a jejich využití byly popsány formou krátké literární rešerše uvedené v části 2.5 na str. 17.
- Antigeny pro detekci HPV-specifických protilátek se podařilo připravit i bez purifikace pomocí afinitní chromatografie. Jedinou výjimkou byl protein E2, který se nepovedlo nasyntetizovat.
- Pacientská séra byla vyšetřena pomcí medoty GST-ELISA s využitím připravených antigenů.
- U pacientů byly naměřeny různé hladiny protilátek vůči jednotlivým antigenům. Absence antigenu E2 však znemožnila detekci protilátek specifických vůči tomuto antigenu.
- Výsledky GST-ELISA byly vyhodnoceny, ale kvůli nedostatku kontrolního materiálu a negativních vzorků, nebylo možné použít metodu zahrnující výpočet CO. Výsledky byly vyhodnoceny arbitrárně nastaveným systémem, ten ten však nelze jednoduše porovnat s výsledky za použití CO. Srovnání OD hodnot za využití dříve připravených antigenů a nově připravených antigenů ukazují úspěšnost přípravy. Srovnání naměřených OD pacientských sér před mnoha lety a nyní tedy spíše ukazuje, že skladování sér a jejich opakované rozmražování vede k degradaci protilátek.
- Odhalili jsme nečekaně masivní sérologickou odpověď dvou pacientů s nádory hlavy a krku na časný protein E4, která by vyžadovala analýzu anamnézy těchto pacientů.

Seznam literatury

[1] Belnap DM, Olson NH, Cladel NM, Newcomb WW, Brown JC, Kreider JW, Christensen ND, Baker TS. Conserved Features in Papillomavirus and Polyomavirus Capsids. *Journal of Molecular Biology*. 1996;259(2):249–263. doi:10.1006/jmbi.1996.0317

[2] Williamson A-L. Recent Developments in Human Papillomavirus (HPV) Vaccinology. *Viruses*. 2023;15(7):1440. doi:10.3390/v15071440

[3] Baker TS, Newcomb WW, Olson NH, Cowsert LM, Olson C, Brown JC. Structures of bovine and human papillomaviruses. Analysis by cryoelectron microscopy and three-dimensional image reconstruction. *Biophysical Journal*. 1991;60(6):1445–1456. doi:10.1016/S0006-3495(91)82181-6

[4] Clifford GM, Smith JS, Plummer M, Muñoz N, Franceschi S. Human papillomavirus types in invasive cervical cancer worldwide: a meta-analysis. *British Journal of Cancer*. 2003;88(1):63–73. doi:10.1038/sj.bjc.6600688

[5] Kuehner F, Stubenrauch F. Functions of Papillomavirus E8^E2 Proteins in Tissue Culture and In Vivo. *Viruses*. 2022;14(5):953. doi:10.3390/v14050953

[6] Sausen DG, Shechter O, Gallo ES, Dahari H, Borenstein R. Herpes Simplex Virus, Human Papillomavirus, and Cervical Cancer: Overview, Relationship, and Treatment Implications. *Cancers*. 2023;15(14):3692. doi:10.3390/cancers15143692

[7] PDB101: Molecule of the Month: Human Papillomavirus and Vaccines. RCSB: PDB-101. Dostupné z URL: http://pdb101.rcsb.org/motm/221 [cit. 23.3.2025].

[8] Sankovski E, Männik A, Geimanen J, Ustav E, Ustav M. Mapping of betapapillomavirus human papillomavirus 5 transcription and characterization of viral-genome replication function. *Journal of Virology*. 2014;88(2):961–973. doi:10.1128/JVI.01841-13

[9] Frattini MG, Laimins LA. Binding of the human papillomavirus E1 origin-recognition protein is regulated through complex formation with the E2 enhancer-binding protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1994;91(26):12398–12402. doi:10.1073/pnas.91.26.12398

[10] McBride AA. The Papillomavirus E2 proteins. *Virology*. 2013 [accessed 2025 Apr 19];445(1):57–79. doi:10.1016/j.virol.2013.06.006

[11] Dreer M, van de Poel S, Stubenrauch F. Control of viral replication and transcription by the papillomavirus E8^E2 protein. *Virus Research*. 2017;231:96–102. (Human Papillomaviruses). doi:10.1016/j.virusres.2016.11.005

[12] Bristol M, Das D, Morgan I. Why Human Papillomaviruses Activate the DNA Damage Response (DDR) and How Cellular and Viral Replication Persists in the Presence of DDR Signaling. *Viruses*. 2017;9:268.

doi:10.3390/v9100268

[13] Brown DR, Bryan JT, Pratt L, Handy V, Fife KH, Stoler MH. Human Papillomavirus Type 11 E1 up angle E4 and L1 Proteins Colocalize in the Mouse Xenograft System at Multiple Time Points. *Virology*. 1995;214(1):259–263. doi:10.1006/viro.1995.9931

[14] Griffin H, Wu Z, Marnane R, Dewar V, Molijn A, Quint W, Van Hoof C, Struyf F, Colau B, Jenkins D, et al. E4 antibodies facilitate detection and type-assignment of active HPV infection in cervical disease. *PloS One*. 2012;7(12):e49974. doi:10.1371/journal.pone.0049974

[15] Ikegami T, Kise N, Kinjyo H, Kondo S, Suzuki M, Tsukahara N, Murakami A, Kiyuna A, Agena S, Tanaka K, et al. Development of Antibodies against HPV-6 and HPV-11 for the Study of Laryngeal Papilloma. *Viruses*. 2021;13(10):2024. doi:10.3390/v13102024

[16] Davy CE, Jackson DJ, Wang Q, Raj K, Masterson PJ, Fenner NF, Southern S, Cuthill S, Millar JBA, Doorbar J. Identification of a G(2) arrest domain in the E1 wedge E4 protein of human papillomavirus type 16. *Journal of Virology*. 2002;76(19):9806–9818. doi:10.1128/jvi.76.19.9806-9818.2002

[17] Egawa N, Wang Q, Griffin HM, Murakami I, Jackson D, Mahmood R, Doorbar J. HPV16 and 18 genome amplification show different E4-dependence, with 16E4 enhancing E1 nuclear accumulation and replicative efficiency via its cell cycle arrest and kinase activation functions. *PLoS pathogens*. 2017;13(3):e1006282. doi:10.1371/journal.ppat.1006282

[18] Davy C, McIntosh P, Jackson DJ, Sorathia R, Miell M, Wang Q, Khan J, Soneji Y, Doorbar J. A novel interaction between the human papillomavirus type 16 E2 and E1--E4 proteins leads to stabilization of E2. *Virology*. 2009;394(2):266–275. doi:10.1016/j.virol.2009.08.035

[19] McIntosh PB, Laskey P, Sullivan K, Davy C, Wang Q, Jackson DJ, Griffin HM, Doorbar J. E1--E4-mediated keratin phosphorylation and ubiquitylation: a mechanism for keratin depletion in HPV16-infected epithelium. *Journal of Cell Science*. 2010;123(Pt 16):2810–2822. doi:10.1242/jcs.061978

[20] Roberts S, Ashmole I, Rookes SM, Gallimore PH. Mutational analysis of the human papillomavirus type 16 E1--E4 protein shows that the C terminus is dispensable for keratin cytoskeleton association but is involved in inducing disruption of the keratin filaments. *Journal of Virology*. 1997;71(5):3554–3562. doi:10.1128/JVI.71.5.3554-3562.1997

[21] Doorbar J. Host control of human papillomavirus infection and disease. Best Practice & Research. *Clinical Obstetrics & Gynaecology*. 2018;47:27–41. doi:10.1016/j.bpobgyn.2017.08.001

[22] Hawley-Nelson P, Vousden KH, Hubbert NL, Lowy DR, Schiller JT. HPV16 E6 and E7 proteins cooperate to immortalize human foreskin keratinocytes. *The EMBO journal*. 1989;8(12):3905–3910. doi:10.1002/j.1460-2075.1989.tb08570.x

[23] Münger K, Phelps WC, Bubb V, Howley PM, Schlegel R. The E6 and E7 genes of the human papillomavirus type 16 together are necessary and sufficient for transformation of primary human keratinocytes. *Journal of Virology*. 1989;63(10):4417–4421. doi:10.1128/JVI.63.10.4417-4421.1989

[24] Lang Kuhs KA, Kreimer AR, Trivedi S, Holzinger D, Pawlita M, Pfeiffer RM, Gibson SP, Schmitt NC, Hildesheim A, Waterboer T, et al. Human papillomavirus 16 E6 antibodies are sensitive for human papillomavirus-driven oropharyngeal cancer and are associated with recurrence. *Cancer*. 2017;123(22):4382–4390. doi:10.1002/cncr.30966

[25] Kreimer AR, Ferreiro-Iglesias A, Nygard M, Bender N, Schroeder L, Hildesheim A, Robbins HA, Pawlita M, Langseth H, Schlecht NF, et al. Timing of HPV16-E6 antibody seroconversion before OPSCC: findings from the HPVC3 consortium. *Annals of Oncology*. 2019;30(8):1335–1343. doi:10.1093/annonc/mdz138

[26] Kreimer AR, Johansson M, Waterboer T, Kaaks R, Chang-Claude J, Drogen D, Tjønneland A, Overvad K, Quirós JR, González CA, et al. Evaluation of Human Papillomavirus Antibodies and Risk of Subsequent Head and Neck Cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 2013 . doi:10.1200/JCO.2012.47.2738

[27] Müller M, Viscidi RP, Sun Y, Guerrero E, Hill PM, Shah F, Bosch FX, Muñoz N, Gissmann L, Shah KV. Antibodies to HPV-16 E6 and E7 proteins as markers for HPV-16-associated invasive cervical cancer. *Virology*. 1992;187(2):508–514. doi:10.1016/0042-6822(92)90453-v

[28] Busch C-J, Hoffmann AS, Viarisio D, Becker BT, Rieckmann T, Betz C, Bender N, Schroeder L, Hussein Y, Petersen E, et al. Detection of stage I HPV-driven oropharyngeal cancer in asymptomatic individuals in the Hamburg City Health Study using HPV16 E6 serology – A proof-of-concept study. eClinicalMedicine. 2022;53:101659. doi:10.1016/j.eclinm.2022.101659

[29] Manzo-Merino J, Thomas ,Miranda, Fuentes-Gonzalez ,Alma M, Lizano ,Marcela, and Banks L. HPV E6 oncoprotein as a potential therapeutic target in HPV related cancers. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*. 2013;17(11):1357–1368. doi:10.1517/14728222.2013.832204

[30] Werness BA, Levine AJ, Howley PM. Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science*. 1990;248(4951):76–79. doi:10.1126/science.2157286

[31] Huibregtse JM, Scheffner M, Howley PM. A cellular protein mediates association of p53 with the E6 oncoprotein of human papillomavirus types 16 or 18. *The EMBO journal*. 1991;10(13):4129–4135. doi:10.1002/j.1460-2075.1991.tb04990.x

[32] Martinez-Zapien D, Ruiz FX, Poirson J, Mitschler A, Ramirez J, Forster A, Cousido-Siah A, Masson M, Vande Pol S, Podjarny A, et al. Structure of the E6/E6AP/p53 complex required for HPV-mediated degradation of p53. *Nature*. 2016;529(7587):541–545. doi:10.1038/nature16481

[33] Kassab A, Gupta I, Moustafa A-EA. Role of E2F transcription factor in oral cancer: Recent insight and advancements. *Seminars in Cancer Biology*. 2023;92:28–41. doi:10.1016/j.semcancer.2023.03.004

[34] Hiebert SW, Chellappan SP, Horowitz JM, Nevins JR. The interaction of RB with E2F coincides with an inhibition of the transcriptional activity of E2F. *Genes & Development*. 1992;6(2):177–185. doi:10.1101/gad.6.2.177

[35] Gonzalez SL, Stremlau M, He X, Basile JR, Münger K. Degradation of the retinoblastoma tumor suppressor by the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein is important for functional inactivation and is separable from proteasomal degradation of E7. *Journal of Virology*. 2001;75(16):7583–7591. doi:10.1128/JVI.75.16.7583-7591.2001

[36] Gravitt PE. Evidence and impact of human papillomavirus latency. *The Open Virology Journal*. 2012;6:198–203. doi:10.2174/1874357901206010198

[37] Muñoz N, Bosch FX, de Sanjosé S, Herrero R, Castellsagué X, Shah KV, Snijders PJF, Meijer CJLM, International Agency for Research on Cancer Multicenter Cervical Cancer Study Group. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *The New England Journal of Medicine*. 2003;348(6):518–527. doi:10.1056/NEJMoa021641

[38] Molina MA, Steenbergen RDM, Pumpe A, Kenyon AN, Melchers WJG. HPV integration and cervical cancer: a failed evolutionary viral trait. *Trends in Molecular Medicine*. 2024;30(9):890–902. doi:10.1016/j.molmed.2024.05.009

[39] Arians N, Nicolay NH, Brons S, Koerber SA, Jaschke C, Vercruysse M, Daffinger S, Rühle A, Debus J, Lindel K. Carbon-ion irradiation overcomes HPV-integration/E2 gene-disruption induced radioresistance of cervical keratinocytes. *Journal of Radiation Research*. 2019;60(5):564–572. doi:10.1093/jrr/rrz048

[40] Rosales R, López-Contreras M, Cortes RR. Antibodies against human papillomavirus (HPV) type 16 and 18 E2, E6 and E7 proteins in sera: Correlation with presence of papillomavirus DNA. *Journal of Medical Virology*. 2001;65(4):736–744. doi:10.1002/jmv.2098

[41] Gillison ML, Koch WM, Capone RB, Spafford M, Westra WH, Wu L, Zahurak ML, Daniel RW, Viglione M, Symer DE, et al. Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. *Journal of the National Cancer Institute*. 2000;92(9):709–720. doi:10.1093/jnci/92.9.709

[42] Lim YX, D'Silva NJ. HPV-associated oropharyngeal cancer: in search of surrogate biomarkers for early lesions. *Oncogene*. 2024;43(8):543–554. doi:10.1038/s41388-023-02927-9

[43] Lehtinen M, Leminen A, Kuoppala T, Tiikkainen M, Lehtinen T, Lehtovirta P, Punnonen R, Vesterinen E, Paavonen J. Pre- and posttreatment serum antibody responses to HPV 16 E2 and HSV 2 ICP8 proteins in women with cervical carcinoma. *Journal of Medical Virology*. 1992;37(3):180–186. doi:10.1002/jmv.1890370306

[44] Ewaisha R, Panicker G, Maranian P, Unger ER, Anderson KS. Serum Immune Profiling for Early Detection of Cervical Disease. *Theranostics*. 2017;7(16):3814–3823. doi:10.7150/thno.21098

[45] Dahlstrom KR, Anderson KS, Field MS, Chowell D, Li G, Sturgis EM. Abstract 2265: HPV16 serostatus and risk of oropharyngeal carcinoma. *Cancer Research*. 2017;77(13_Supplement):2265. doi:10.1158/1538-7445.AM2017-2265

[46] Salazar-Piña DA, Pedroza-Saavedra A, Cruz-Valdez A, Ortiz-Panozo E, Maldonado-Gama M, Chihu-Amparan L, Rodriguez-Ocampo AN, Orozco-Fararoni E, Esquivel-Guadarrama F, Gutierrez-Xicotencatl L. Validation of Serological Antibody Profiles Against Human Papillomavirus Type 16 Antigens as Markers for Early Detection of Cervical Cancer. *Medicine*. 2016;95(6):e2769. doi:10.1097/MD.0000000000002769

[47] Zhang Y, Waterboer T, Haddad RI, Miles BA, Wentz A, Gross ND, Fakhry C, Quon H, Lorch JH, Gourin CG, et al. Human papillomavirus (HPV) 16 antibodies at diagnosis of HPV-related oropharyngeal cancer and antibody trajectories after treatment. *Oral Oncology*. 2017;67:77–82. doi:10.1016/j.oraloncology.2017.02.004

[48] Kreimer AR, Brennan P, Lang Kuhs KA, Waterboer T, Clifford G, Franceschi S, Michel A, Willhauck-Fleckenstein M, Riboli E, Castellsagué X, et al. Human Papillomavirus Antibodies and Future Risk of Anogenital Cancer: A Nested Case-Control Study in the European Prospective Investigation Into Cancer and Nutrition Study. *Journal of Clinical Oncology*. 2015;33(8):877–884. doi:10.1200/JCO.2014.57.8435

[49] Müller M, Viscidi RP, Ulken V, Bavinck JNB, Hill PM, Fisher SG, Reid R, Munoz N, Schneider A, Shah KV, et al. Antibodies to the E4, E6, and E7 Proteins of Human Papillomavirus (HPV) Type 16 in Patients with HPV-Associated Diseases and in the Normal Population. *Journal of Investigative Dermatology*. 1995;104(1):138–141. doi:10.1111/1523-1747.ep12613659

[50] Jochmus-Kudielka I, Schneider A, Braun R, Kimmig R, Koldovsky U, Schneweis KE, Seedorf K, Gissmann L. Antibodies against the human papillomavirus type 16 early proteins in human sera: correlation of anti-E7 reactivity with cervical cancer. *Journal of the National Cancer Institute*. 1989;81(22):1698–1704. doi:10.1093/jnci/81.22.1698

[51] Mann VM, de Lao SL, Brenes M, Brinton LA, Rawls JA, Green M, Reeves WC, Rawls WE. Occurrence of IgA and IgG antibodies to select peptides representing human papillomavirus type 16 among cervical cancer cases and controls. *Cancer Research*. 1990;50(24):7815–7819. PMID: 2174733

[52] Serology - an overview | ScienceDirect Topics. Dostupné z URL: https://www.sciencedirect.com/topics/neuroscience/serology [cit. 29.3.2025].

[53] Kirnbauer R, Hubbert NL, Wheeler CM, Becker TM, Lowy DR, Schiller JT. A virus-like particle enzyme-linked immunosorbent assay detects serum antibodies in a majority of women infected with human papillomavirus type 16. *Journal of the National Cancer Institute*. 1994;86(7):494–499. doi:10.1093/jnci/86.7.494

[54] Meschede W, Zumbach K, Braspenning J, Scheffner M, Benitez-Bribiesca L, Luande J, Gissmann L, Pawlita M. Antibodies against early proteins of human papillomaviruses as diagnostic markers for invasive cervical cancer. *Journal of Clinical Microbiology*. 1998;36(2):475–480. doi:10.1128/JCM.36.2.475-480.1998

[55] Sehr P, Zumbach K, Pawlita M. A generic capture ELISA for recombinant proteins fused to glutathione *S*-transferase: validation for HPV serology. *Journal of Immunological Methods*. 2001;253(1):153–162. doi:10.1016/S0022-1759(01)00376-3

[56] De Gregorio V, Urciuolo F, Netti PA, Imparato G. In Vitro Organotypic Systems to Model Tumor Microenvironment in Human Papillomavirus (HPV)-Related Cancers. *Cancers*. 2020;12(5):1150. doi:10.3390/cancers12051150

[57] LLC GB. pGEX-4T-1 Sequence and Map. Dostupné z URL: https://www.snapgene.com/plasmids/pgex_vectors_(ge_healthcare)/pGEX-4T-1 [cit. 16.5.2025].

[58] Fulton RJ, McDade RL, Smith PL, Kienker LJ, Kettman JR. Advanced multiplexed analysis with the FlowMetrix system. *Clinical Chemistry*. 1997;43(9):1749–1756. PMID: 9299971

[59] Opalka D, Lachman CE, MacMullen SA, Jansen KU, Smith JF, Chirmule N, Esser MT. Simultaneous quantitation of antibodies to neutralizing epitopes on virus-like particles for human papillomavirus types 6, 11, 16, and 18 by a multiplexed luminex assay. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. 2003;10(1):108–115. doi:10.1128/cdli.10.1.108-115.2003

[60] Waterboer T, Sehr P, Michael KM, Franceschi S, Nieland JD, Joos TO, Templin MF, Pawlita M. Multiplex Human Papillomavirus Serology Based on In Situ–Purified Glutathione S-Transferase Fusion Proteins. *Clinical Chemistry*. 2005;51(10):1845–1853. doi:10.1373/clinchem.2005.052381

[61] Berson SA, Yalow RS. General principles of radioimmunoassay. *Clinica Chimica Acta*. 1968;22(1):51–69. doi:10.1016/0009-8981(68)90247-7

[62] Kato H, Torigoe T. Radioimmunoassay for tumor antigen of human cervical squamous cell carcinoma. *Cancer*. 1977;40(4):1621–1628. doi:10.1002/1097-0142(197710)40:4<1621::aid-cncr2820400435>3.0.co;2-i

[63] Six HR, Kasel JA. Radioimmunoprecipitation assay for quantitation of serum antibody to the hemagglutinin of type A influenza virus. *Journal of Clinical Microbiology*. 1978;7(2):165–171. doi:10.1128/jcm.7.2.165-171.1978

[64] Baay MFD, Duk JM, Groenier KH, Burger MPM, de Bruijn HWA, Hollema H, Stolz E, Herbrink P. Relation between HPV-16 serology and clinico-pathological data in cervical carcinoma patients: prognostic value of anti-E6 and/or anti-E7 antibodies. *Cancer Immunology, Immunotherapy*. 1997;44(4):211–215. doi:10.1007/s002620050375

[65] Park I, Kemp TJ, Pinto LA. The HPV Serology Laboratory leads an initiative to standardize and harmonize human papillomavirus serology assays. *PLOS Pathogens*. 2023;19(6):e1011403. doi:10.1371/journal.ppat.1011403

[66] Park I, Unger ER, Kemp TJ, Pinto LA. The second HPV serology meeting: Progress and challenges in standardization of human papillomavirus serology assays. *Vaccine*. 2023;41(6):1177–1181. doi:10.1016/j.vaccine.2023.01.008

[67] Kemp TJ, Panicker G, Eklund C, Nie J, Wang Y, Beddows S, Rigsby P, Huang W, Dillner J, Unger ER, et al. WHO International Standards for antibodies to HPV6 HPV11 HPV31 HPV33 HPV45 HPV52 and HPV58. npj *Vaccines*. 2024;9(1):1–13. doi:10.1038/s41541-024-00949-2

[68] Mosbah H, Chahdoura H, Kammoun J, Besbes M, Louati H, Hachicha S, Flamini G, Achour L, Selmi B. Rhaponticum acaule (L) DC essential oil: Chemical composition, in vitro antioxidant and enzyme inhibition properties. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 2018;18. doi:10.1186/s12906-018-2145-5

[69] BLAST: Basic Local Alignment Search Tool. Dostupné z URL: https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi [cit. 16.5.2025].

[70] PaVE. Dostupné z URL: https://pave.niaid.nih.gov/index [cit. 16.5.2025].

[71] Malerova S, Hejtmankova A, Hamsikova E, Salakova M, Smahelova J, Klozar J, Tachezy R. Prevalence and Risk Factors for Oral HPV in Healthy Population, in Central Europe. *Anticancer Research*. 2020;40(3):1597–1604. doi:10.21873/anticanres.14107

[72] Gauthier J-M, Dillner J, Yaniv M. Structural analysis of the human papillomavirus type 16-E2 transactivator with antipeptide antibodies reveals a high mobility region linking the transactivation and the DNA-binding domains. *Nucleic Acids Research*. 1991;19(25):7073–7079. doi:10.1093/nar/19.25.7073

[73] Simonidesova S, Hamsikova E, Ludvikova V, Klozar J, Vencalek O, Tachezy R. Prognostic value of posttreatment HPV-specific antibodies in patients with oropharyngeal tumors. *Journal of Surgical Oncology*. 2019;120(2):117–124. doi:10.1002/jso.25473

[74] Koslabova E, Hamsikova E, Salakova M, Klozar J, Foltynova E, Salkova E, Rotnaglova E, Ludvikova V, Tachezy R. Markers of HPV infection and survival in patients with head and neck tumors. *International Journal of Cancer*. 2013;133(8):1832–1839. doi:10.1002/ijc.28194

[75] Jiang Z, Albanese J, Kesterson J, Warrick J, Karabakhtsian R, Dadachova E, Phaëton R. Monoclonal Antibodies Against Human Papillomavirus E6 and E7 Oncoproteins Inhibit Tumor Growth in Experimental Cervical Cancer. *Translational Oncology*. 2019;12(10):1289–1295. doi:10.1016/j.tranon.2019.06.003

[76] Adewale BA. Will long-read sequencing technologies replace short-read sequencing technologies in the next 10 years? *African Journal of Laboratory Medicine*. 2020;9(1):1340. doi:10.4102/ajlm.v9i1.1340