

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biochemie



Kateřina Vlasáková

Příprava a charakterizace protilátek proti cytochromu P450

1A1

Preparation and characterisation of antibodies against cytochrome

P450 1A1

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: prof. RNDr. Petr Hodek, CSc.

Praha 2015

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracovala samostatně pod vedením školitele prof. RNDr. Petra Hodka, CSc. a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 21. května 2015

Podpis:

Poděkování

Touto cestou bych chtěla poděkovat prof. RNDr. Petru Hodkovi, CSc. za trpělivost, cenné připomínky a odborné rady při zpracování této bakalářské práce. Dále bych poděkovat celému kolektivu Katedry biochemie PřF UK za pomoc během experimentální části.

V neposlední řadě bych chtěla poděkovat rodině a přátelům za podporu během studia.

Abstrakt

Rakovina je druhou nejčastější příčinou úmrtí v ČR. Maligní transformace buněk jsou způsobeny vznikem aduktů DNA nebo tvorbou reaktivních forem kyslíku. Jednou ze skupin enzymů, které katalyzují vznik těchto karcinogenních látek, jsou cytochromy P450, např. CYP1A1 a 1A2. V poslední době jsou velmi populární chemopreventivní doplňky stravy, které by měly snižovat riziko rakoviny. Jejich nadměrné užívání ale může vést k indukci CYP a naopak zvýšení rizika. Poznání cytochromů P450 může vést k účelnější farmakoterapii nebo dokonce prevenci rakoviny. Vhodným nástrojem pro studium proteinů je metoda „imunoblottingu“, která využívá specifické vazby antigen- protilátka. K tomuto účelu mohou posloužit slepičí anti-peptidové protilátky. Výsledkem této práce bylo získání slepičích protilátek proti peptidu, který byl vybrán na základě sekvence potkaního CYP1A1 a literatury.

Klíčová slova: Žloutkové protilátky, peptidové antigeny, ELISA, Western blot

Abstract

Cancer is the second most frequent cause of death in the Czech Republic. The malignant transformations of the tumour cells are thought to be caused by formation of DNA adducts or by reactive forms of oxygen. One of groups of enzymes, that catalyse the formation of these carcinogenic compounds, are cytochromes P450, for example the isofom CYP1A1 or CYP1A2. Recently, chemopreventive food supplements that should decrease the risk of cancer have become very popular. However, overusing of these supplements can induce CYP and increase the risk of cancer. Due to CYP proteins cognition could be the pharmacotherapy more efficient. Suitable tool for the study of CYP proteins is „immunoblotting“, which utilizes specific bound between an antigen and an antibody. The chicken anti-peptide antibodies were used for this purpose. The goal of this experiment was to obtain chicken anti-peptide antibodies, using a peptide based on the sequence of rat CYP1A1. The chicken antibodies can be used in further research. (In Czech)

Keywords: Yolk antibodies, peptide antigen, ELISA, Western blot

Obsah

| | |
|---|----|
| Seznam použitých zkratek | 5 |
| 1 Teoretický úvod | 6 |
| 1.1 Cytochromy P450..... | 6 |
| 1.1.1 Struktura | 7 |
| 1.1.2 Mechanismus účinku..... | 8 |
| 1.1.3 Klasifikace..... | 12 |
| 1.1.4 Význam..... | 12 |
| 1.2 Protilátky | 14 |
| 1.2.1 Možnosti přípravy..... | 16 |
| 1.2.2 Slepíčí protilátky..... | 17 |
| 2 Cíle | 18 |
| 3 Materiál a metody | 19 |
| 3.1 Použité přístroje | 19 |
| 3.2 Použité chemikálie a materiál | 20 |
| 3.3 Metody..... | 20 |
| 3.3.1 Výběr peptidu | 20 |
| 3.3.2 Příprava imunogenu | 21 |
| 3.3.3 Izolace IgY | 21 |
| 3.3.4 ELISA..... | 22 |
| 4 Výsledky..... | 24 |
| 4.1 Výběr peptidu..... | 24 |
| 4.2 Izolace IgY..... | 26 |
| 4.3 ELISA..... | 27 |
| 5 Diskuze | 28 |
| 6 Závěr..... | 30 |
| 7 Literatura | 31 |

Seznam použitých zkratk

| | |
|---------|--|
| AhR | aryl hydrocarbon receptor |
| AFB | aflatoxin |
| Atb. | antibiotikum |
| CCRP | „co- chaperon retention protein“ |
| CAR | konstitutivní androstanový receptor (constitutive androstane receptor) |
| CYP | cytochrom P450 |
| DMSO | dimethylsulfoxid |
| ELISA | „Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay“ |
| FAD | flavinadenindinukleotid |
| FMN | flavinmononukleotid |
| HAH | hydrogenované aromatické uhlovodíky (halogenated aromatic hydrocarbon) |
| HSP90 | „heat shock protein 90“ |
| IgG | imunoglobulin isotypu G |
| IgY | imunoglobulin ve vaječném žloutku (yolk) |
| KLH | keyhole limpet hemocyanin |
| MFO | oxygenasy se smíšenou funkcí (mixed function oxidase) |
| NAD(P)H | nikotinamiddinukleotid(fosfát) |
| p23 | co- chaperon |
| PAH | polycyklické aromatické uhlovodíky (polycyclic aromatic hydrocarbon) |
| PBS | fosfátem pufovaný roztok chloridu sodného |
| PPAR | „peroxisome proliferator- activated receptor“ |
| PXR | „pregnane X receptor“ |
| RARE | „retinoic acid response element“ |
| RXR | „retinoid X receptorem“ |
| SDS | dodecylsírán sodný |
| TCDD | 2',3',7',8'- tetrachlorodibenzo- <i>p</i> -dioxin |
| XAP2 | co- chaperon |
| RPM | počet otáček za minutu (revolutions per minute) |

1 Teoretický úvod

1.1 Cytochromy P450

Cytochromy P450 jsou hojně se vyskytující enzymy [1]. Můžeme je nalézt u všech živých organismů, od archebakterií, přes rostliny až k živočichům [2]. Sekvence jejich mRNA vykazují značnou podobnost [3]. Jedná se o rodinu enzymů, které se účastní biotransformace xenobiotik nebo léčiv a biosyntézy fyziologicky důležitých látek, jsou to například steroidy, mastné kyseliny, eicosanoidy, v tučných rozpustné vitamíny a mnoho dalších [1].

Cytochromy jsou terminálními oxidasami mikrosomálního oxygenasového systému enzymů zvané oxidasy se smíšenou funkcí (MFO- mixed function oxidase), které katalyzují inkorporaci atomu kyslíku do hydrofobní molekuly za současného vzniku vody [4, 5]. Cytochromy P450 (CYP) jsou systematicky označeny E. C. 1.14.14.1 [4].

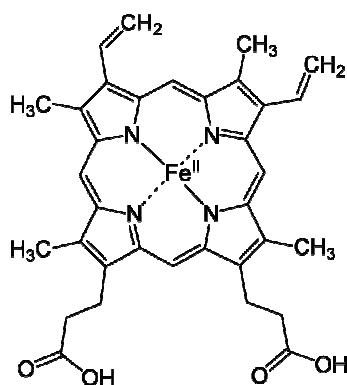
Cytochromy byly prvně pozorovány Martinem Klingenbergerem před více jak 50 lety, kdy studoval spektrofotometrické vlastnosti mikrosomální frakce z potkaních jater. Po přidání redukčního činidla k mikrosomům syčeným CO vykazovala směs specifickou absorpční křivkou s maximem při 450 nm, která je v rámci hemoproteinů jedinečná a slouží k charakterizaci cytochromů P450. Díky této vlastnosti také získaly cytochromy své označení P450, P jako pigment a 450 jako pozice pásu absorpčního maxima [6].

Jde o evolučně velmi starou skupinu enzymů. Šíře jejich výskytu vedla k nutnosti vysoce uspořádané nomenklatury [7]. Cytochromy P450 se nachází ve vyšší koncentraci v tkáních jako játra, střeva nebo kůra nadledvin [6].

Cytochromy hrají zásadní roli v I. fázi metabolismu [8], během které dochází ke zvyšování polarity látky pro snazší vyloučení z organismu [9]. Účastní se reakcí jako např. hydroxylace, N-, O-, S- dealkylace, sulfoxidace, epoxidace [1]. Jejich substrátová specifita je široká, hydroxylují celou škálu organických látek. Některé cytochromy katalyzují jen malý počet reakcí, např. cytochromy metabolizující endogenní látky [4]. Exogenními substráty mohou být například léčiva, anestetika, pesticidy nebo karcinogeny [1]. Krystalové struktury cytochromů jsou cílem zájmu farmaceutických firem z důvodu designu léčiv [10].

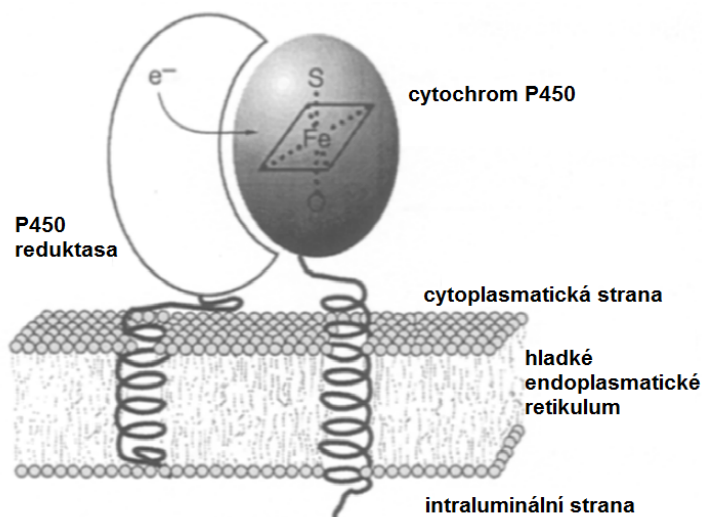
1.1.1 Struktura

Cytochromy jako proteiny jsou složeny přibližně z 500 aminokyselin. Jejich molekulové hmotnosti se pohybují okolo 50 000 [4]. U savců se jedná především o membránově vázané enzymy, které se vyskytují v peroxisomech a endoplasmatickém retikulu [11]. Na rozdíl od bakteriálních cytochromů P450 obsahují membránovou N-terminální kotvu [10]. Na N konci se proto vyskytují hydrofobní aminokyseliny pro vazbu v membráně, blízko C konce se vyskytuje molekula cysteinu, která zprostředkovává vazbu na hemové železo [6]. Katalytické místo je velmi silně konzervováno [12]. Části obsahující hem směřují do cytosolu [13]. Protoporfyryl IX (struktura zobrazena na obrázku č. 1) je kromě hydrofobních sil vázán v molekule CYP pomocí thiolátové síry cysteinu, která je pátým ligandem hemového železa. Šestým ligandem hemového železa je atom kyslíku v molekule vody [4].



Obrázek 1: Struktura hemu *b*

Monooxygenasové systémy jsou vícesložkové a kromě cytochromů P450 obsahují i jiné enzymy. Struktura MFO je znázorněna na obrázku č. 2. CYP (cytochrom P450) jako enzym můžeme zařadit mezi NAD(P)H-O₂ dependentní monooxygenasy, které katalyzují hydroxylaci. Další enzymy slouží k transportu elektronů. Jako transportéry elektronů jsou přítomny reduktasy cytochromů, např. NADPH: CYP oxidoreduktasa, NADH: cytochrom b₅ reduktasa nebo ferredoxin reduktasa. Tyto systémy dělí elektronový pár a dodávají postupně elektrony cytochromům P450 [4]



Obrázek 2: Struktura systému MFO (přejato a upraveno z [12])

1.1.2 Mechanismus účinku

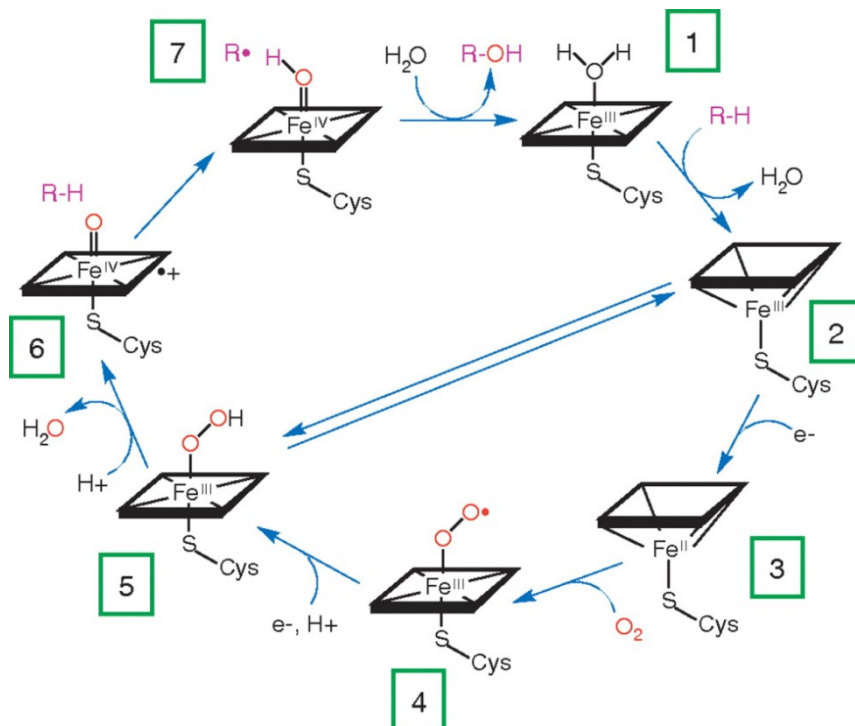
Substráty jsou předem vybrány mnoha fyziologickými procesy závislými na vlastnostech látek, např. absorpce v trávicím traktu.

Oxidace katalyzovaná CYP může probíhat 3 mechanismy- přenos hydroxylové skupiny na substrát, přenos elektronu ze substrátu s nízkým redoxním potenciálem nebo vložení atomu kyslíku na π - vazbu či volný elektronový pár [13].

Obecně můžeme přenos hydroxylové skupiny na substrát, tj. reakci katalyzovanou monooxygenasami, vyjádřit sumární rovnicí, kde RH je substrátem a ROH produktem hydroxylace: $RH + O_2 + 2H^+ + 2e^- \rightarrow ROH + H_2O$

V klidovém stavu má hemové železo oxidační číslo III (tzv. ferri forma) a je hexakoordinováno, šestá valence je s kyslíkem v molekule vody. Příchozí substrát vytlačí z aktivního místa šestý ligand, zároveň dochází ke změně konformace enzymu. Tato změna způsobí posun absorpčního pásu hemu v CYP. Vazba substrátu také umožňuje jednoelektronovou redukci hemu, čímž železo mění své oxidační číslo na II (tzv. ferro forma). Tato forma umožní vazbu molekulárního kyslíku. Komplex s O_2 je dále redukován ke vzniku peroxidového aniontu. V případě, že není druhý elektron doručen dostatečně rychle, se komplex rozpadá a pomocí superoxiddimutasy vzniká peroxid vodíku. V komplexu, který obsahuje biatomickou molekulu O_2 , dojde k rozštěpení vazby O-O. Po přijetí dvou elektronů dojde k odštěpení jednoho atomu kyslíku v podobě vody, zatímco druhý zůstane vázán v komplexu. Takto vzniklý radikál může odtrhnout z vhodného substrátu atom vodíku a vznikne radikál substrátu, na hemu tak vznikne hydroxylový

radikál. Jejich rekombinací vzniká hydroxylovaný produkt [4]. Schéma mechanismu CYP znázorňuje obrázek č. 3.



Obrázek 3: Katalytický cyklus cytochromu P450 (přejato a upraveno dle [14])

1.1.2.1 Inhibice

Narušení jediného kroku mechanismu může vést k inhibici enzymové aktivity. Reakcemi, které jsou k inhibici nejnáchylnější, jsou vazba substrátu na enzym, vazba molekulárního kyslíku a oxygenace substrátu.

Mechanismy inhibice můžeme dělit do 3 skupin- reverzibilní, quasi-ireverzibilní a ireverzibilní [15].

Reverzibilní inhibice

Pravděpodobně zahrnuje jen první krok katalytického cyklu. Inhibitory se mohou vázat jak na hemové železo, tak na lipofilní oblasti proteinu. Látky, které současně váží obě místa, inhibují silněji. Síla inhibitoru je tedy dána lipofilitou proteinu a silou vazby mezi volným elektronovým párem a hemovým železem.

Mnoho silných reverzibilních inhibitorů obsahuje dusík, např. imidazoly, pyridiny nebo chinoliny. Mezi látky obsahující chinolin patří například ellipticin, který selektivně inhibuje CYP1A1/2 [15].

Quasi-ireverzibilní inhibice

Je způsobena vznikem reaktivních metabolitů. Tyto metabolity tvoří stabilní komplex s hemovým železem, čímž je CYP převeden do inaktivního stavu. V *in vitro* podmínkách může při quasi-ireverzibilní inhibici dojít k opětovné reaktivaci. *In vivo* je ale stabilita těchto komplexů vysoká, takže jedinou možností, jak obnovit funkci enzymu, je syntéza nového.

Mezi quasi-ireverzibilní inhibitory můžeme zařadit např. metabolity alkylaminů, makrolidových antibiotik nebo hydrazinů [15].

Ireverzibilní inhibice

Ireverzibilní inhibice je způsobena tzv. sebevražděnými substráty, enzym je tedy inhibován metabolitem reakce, kterou sám katalyzuje.

Látky obsahující terminální dvojnou nebo trojnou vazbu jsou přeměněny na radikálové meziproducty, které alkylují hem nebo inaktivují protein. Inhibitor tedy modifikuje hem, protein nebo obojí současně. Mezi tyto látky patří např. olefiny nebo acetyleny.

Modifikace proteinu může být způsobena také tvorbou reaktivních siřných metabolitů [15].

1.1.2.2 Indukce

Jedna ze zvláštností některých CYP je jejich inducibilita. Na rozdíl od inhibice, která je v podstatě okamžitou odpovědí na vzniklou situaci, je indukce pomalý regulační proces. Z biologického pohledu je indukce adaptivní odpověď ochraňující buňky od toxicity některých xenobiotik [15].

Indukce CYP je z velké části zprostředkována pomocí transkripčních faktorů, resp. receptorů, aktivovaných ligandem. K těmto intracelulárním receptorům patří „aryl hydrocarbon receptor“ (AhR), nukleární receptory „pregnane X receptor“ (PXR), konstitutivní androstanový receptor (constitutive androstane receptor, CAR) a „peroxisome proliferator- activated receptor“ (PPAR) [16]. Inducibilní exprese rodiny CYP1 je řízena především receptorem AhR, rodiny CYP2, 3 a 4 jsou řízeny ostatními receptory (PXR, PPAR, CAR) [17].

AhR

Je konzervován od bezobratlých po obratlovce. Pravděpodobně hraje důležitou roli pro udržování homeostázy. V klidovém stavu je AhR asociován s HSP90, XAP2 a p23.

Ligandy vážící se na AhR jsou především halogenované a polycyklické aromatické uhlovodíky. Aktivace je způsobena změnou konformace. Komplex, který byl aktivován ligandem, je translokován do jádra.

Mezi ligandy vážící se na AhR patří např. 2',3',7',8'- tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) [17].

CAR

Tento receptor se nachází v játrech, ledvinách a trávicím traktu. Mezi ligandy vážící se na tento receptor patří např. fenobarbital, retinová kyselina nebo chlorpromazin. V klidovém stavu je asociován s HSP90 a ko- chaperonem CCRP. S „retinoid X receptorem“ (RXR) tvoří komplex, který váže „retinoic acid response element“ (RARE) a aktivují cílový gen [18, 19].

PXR

Primárně je exprimován v játrech a trávicím traktu. Aktivují ho přirozené steroidy nebo různé exogenní látky, např. léčiva Clotrimazol, Rifampicin a Tamoxifen. Aktivovaný PXR váže RXR a XRE [20]. PXR a CAR rozeznávají podobné sekvence cílových genů [19].

PPAR- α

Expresce CYP4 je v játrech a ledvinách ovlivněna řadou kyselých léčiv a xenobiotik, např. léky na snížení hyperlipidemie nebo ftaláty využívané jak v medicíně tak v chemickém průmyslu. Za indukci CYP4 je zodpovědný receptor PPAR- α . S RXR a PPARE tvoří tento receptor funkční „enhancer“. Na rozdíl od dalších savčích PPAR (PPAR- γ , PPAR- δ) hraje PPAR- α zásadní roli u indukované hepatokarcinogeneze. PPAR- γ je hojně transkribován v mnoha lidských tkáních, kde reguluje adipogenezi [21].

Příklady inhibitorů a induktorů CYP jsou uvedeny v tabulce č. 1.

Tabulka 1: Příklady induktorů a inhibitorů CYP (přejato a upraveno z [16], doplněno dle [22, 23, 24])

| Enzym | Inhibitor | Induktor |
|--------------|---------------------------------|---------------------------------------|
| 1A2 | Theofylin, kofein | Fluvoxamin (antidepresivum) |
| 2C9 | Warfarin (antikoagulans) | Fluconazol (triazolové antimykotikum) |
| 2E1 | Chlorzoxazon (svalový relaxant) | Disulfiram (antialkoholikum) |
| 3A4/5 | Midazolam (hypnotikum) | Clarithromycin (makrolidové atb.) |

Enzym- daná isoforma CYP, inhibitor, induktor- příklady

1.1.3 Klasifikace

Třídění cytochromů je založeno na sekvenční homologii. Jedna rodina je tvořena všemi cytochromy, které mají alespoň ze 40% shodnou sekvenci, a označujeme je číslem- např. CYP1. Dále cytochromy dělíme na podrodiny, do podrodiny patří všechny cytochromy, jejichž sekvence se shodují alespoň v 55%. Podrodiny označujeme velkým tiskacím písmenem, např. CYP1A. Poslední číslo v označení (např. CYP1A1) označuje konkrétní unikátní enzym [12].

1.1.4 Význam

Rakovina je po onemocněních kardiovaskulární soustavy druhou nejčastější příčinou úmrtí v ČR [25]. K maligním transformacím buňky dochází v důsledku poškození DNA. Toto poškození mohou způsobit např. karcinogeny tvořící adukty s DNA. Většina těchto aduktů potřebuje pro svůj vznik metabolickou aktivaci. Z tzv. pro- karcinogenní formy vznikají formy reaktivní, které tvoří vlastní adukty. Tato aktivace je často katalyzována oxidasami se smíšenou funkcí, jejichž součástí jsou právě cytochromy P450. Místo detoxifikace látky dochází k aktivaci, tu sice část léčiv vyžaduje, ale je tak aktivována i většina karcinogenů. Tohoto metabolismu se účastní pouze 3 rodiny lidských cytochromů, jsou jimi rodiny CYP1, CYP2, CYP3[9]. Druhým způsobem, jak mohou CYP způsobit změny struktury makromolekul, které následně zapříčiní poškození buněk, je tvorba vysoce reaktivních forem kyslíku, jako jsou superoxydy nebo hydroxylové radikály. CYP mohou také ovlivnit účinnost protirakovinových léčiv v závislosti na tom, zda je léčivo aktivováno nebo detoxifikováno. Rozdílná exprese CYP ve zdravé a rakovinné tkáni rozhoduje o selektivitě těchto léčiv proti nádorovým buňkám [6]. Proto poznání CYP může vést k účelnější farmakoterapii nebo dokonce prevenci rakoviny [9].

Na hladinu CYP mají vliv osobní návyky jako je strava, kouření, alkohol nebo expozice látkám, které mohou indukci způsobovat [26].

První možností, jak snížit riziko rakoviny, je snaha redukovat expozici karcinogenním environmentálním faktorům. Druhou možností je užívání exogenních faktorů (např. doplňky stravy) [26], které mohou inhibovat katalytickou funkci CYP [27]. Správný životní styl a strava by mohly předejít vzniku až 40% všech nádorů. Tyto preventivní vlastnosti nabízí např. rostlinná strava. Chemopreventivní schopnost látek rostlinného původu je kombinována s antioxidantními, protizánětlivými vlastnostmi a vlastnostmi podporující imunitu [26]. Těmito vlastnostmi disponují např. flavonoidní látky, které se

vyskytují v zelenině, ovoci, luštěninách, ale také v čaji, kávě, červeném víně nebo pivu [27]. Vzhledem k přírodnímu původu doplňků stravy je tato cesta prevence velmi populární, ale vyšší příjem těchto látek může mít i opačný účinek. Chemopreventivní látky působí jako induktory CYP, což znamená, že CYP mohou metabolizovat prokarcinogenní látky na karcinogenní. Dále mohou být tyto chemopreventivní látky přeměněny na cytotoxické nebo mutagenní látky. Tím se riziko výskytu rakoviny naopak zvyšuje [26, 28].

1.1.4.1 Podrodina 1A

Podrodina 1A je tvořena dvěma členy, CYP1A1 a 1A2, které jsou ze 71 % identické [29]. U lidí a hlodavců se vyskytují v plicích, játrech, střevě, placentě nebo ledvinách [30].

Indukce těchto dvou enzymů může vést ke snížení karcinogenity některých látek. Např. indukce β -naftoflavonem inhibuje vývoj nádoru v plicích a mléčné žláze hlodavců, kterým byl podáván 7,12-dimethylbenz[a]antracen, který je vysoce karcinogenní. Naopak tyto dva enzymy také mohou některé látky aktivovat, jako například benzo[a]pyren, a tím jejich indukce riziko karcinogenity zvyšuje [15].

Tato rodina má afinitu k polycyklickým, často halogenovaným, aromatickým uhlovodíkům HAH/ PAH (halogenated/ polycyclic aromatic hydrocarbons). Tyto látky jsou běžnými kontaminanty životního prostředí a způsobují různé toxické odezvy [31]. Jejich oxidací jsou produkovány arenoxidy, dielepoxydy a další reaktivní produkty, které tvoří adukty s DNA nebo proteiny [32].

CYP 1A1

Lidský CYP1A1 je složený z 512 aminokyselin [33]. Je exprimován především v tkáních jako plíce, trávicí trakt, placenta nebo kůže [34]. Je vysoce inducibilní [32]. U experimentálních zvířat je CYP1A1 indukován polutanty životního prostředí, kromě PAH také např. polychlorovanými dibenzo-*p*-dioxiny, polychlorovanými dibenzofurany a polychlorovanými bifenoly [35]. Konkrétní příklady induktorů mohou být 2',3',7',8'-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) nebo β -naftoflavon [36].

Nejčastější formou rakoviny je rakovina plic. Jejím největším rizikovým faktorem je cigaretový kouř, který obsahuje mnoho PAH a heterocyklických aminů nebo amidů, které jsou současně substrátem i induktorem CYP1A1 [36]. Indukce CYP1A1 souvisí s výskytem DNA aduktů v plicích a tím i rizikem vzniku rakoviny [37].

CYP 1A2

Jedná se o protein tvořený v případě lidské isoformy 515 aminokyselinami. Je exprimován v játrech a je inducibilní [32]. Většina jeho substrátů jsou hydrofobní a obsahují planární kruh [36]. Metabolizuje arylaminy nebo heterocyklické arylaminy. Jeho inhibice má vliv na prevenci rakoviny [34]. Účastní se metabolismu některých přírodních látek, např. theofyllin a kofein, nebo léčiv, např. tacrin, lidocain, paracetamol a warfarin. Mezi přírodní nefrotoxiny metabolizované CYP1A2 patří kyselina aristolochová, která souvisí s nádory močového měchýře [36].

Rizikovým faktorem pro vznik rakoviny je kromě jiného i strava. Potenciálními karcinogeny mohou být mykotoxiny nebo aflatoxiny, které jsou sekundárními metabolity plísně *Aspergillus*. Mohou se vyskytovat v arašidech nebo pistáciích. Aflatoxin (AFB) je aktivován CYP1A2 na exo- AFB-8,9-epoxid a další oxidované formy [27]. Tento elektrofilní metabolit je reaktivní a je schopen indukovat alkylaci guaninu v DNA [38].

1.2 Protilátky

V roce 1890 objevili von Behring a Kitasato v krvi agens, která byla schopná neutralizovat difterický toxin. Tuto částici nazvali jako „Antikörper“ (protilátky). V roce 1939 elektroforeticky rozdělili Tiselius s Kabatem sérum z imunizovaného zvířete na albuminovou, α -, β - a γ - globulinovou frakci. Reakce s antigenem zmenšila γ - frakci, proto globuliny obsažené v této frakci byly nazvány jako imunoglobuliny nebo IgG (imunoglobulin isotypu G) [39].

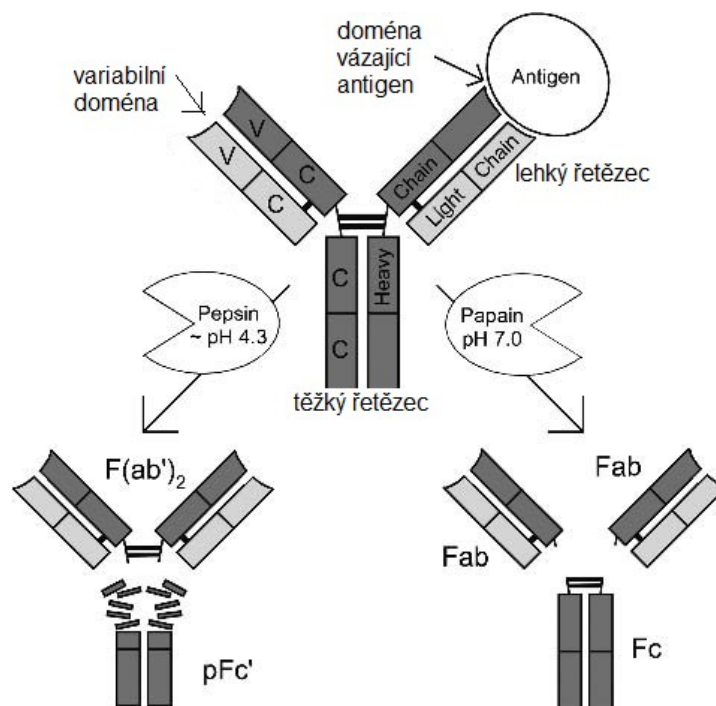
Imunoglobuliny slouží jako receptory na povrchu B buněk nebo jsou v rozpustné (sekretované) formě přítomné v krevním séru [40]. Rozpustné mohou sloužit k vazbě na antigen, tím mohou antigen „neutralizovat“, opsonizovat¹ nebo spustit komplementovou reakci² [39].

Protilátky jsou glykoproteiny sekretované specializovanými B buňkami, jinak nazývané také plazmatické buňky [41]. Imunoglobuliny jsou tvořeny 2 těžkými (H) řetězci, které jsou spojeny cystinovými můstky a jsou tvořeny 4-5 podobnými doménami, z nichž každá obsahuje přibližně 110- 120 aminokyselin. K těžkým řetězcům jsou připojeny 2 lehké (L) řetězce skládající se ze dvou domén. Domény na N konci L i H řetězce jsou označovány

¹ Opsonizace je děj, kdy je pomocí protilátek antigen rozpoznán jako cizorodý [39]

² Komplementová reakce je reakce vedoucí k chemotaxi, opsonizaci nebo zničení buňky [39]

jako variabilní (V_L , V_H) a vytvářejí vazebné místo pro antigen. Ostatní domény jsou konstantní (C). Oblast cystinových můstků se nazývá pantová. Působením vhodných proteolytických enzymů získáme fragmenty Fab, z nichž každý obsahuje jedno vazebné místo pro antigen, a fragment Fc. Struktura protilátek je schematicky zobrazena na obrázku č. 4. Touto konzervovanou částí molekuly se imunoglobuliny váží na Fc receptory. Rozlišujeme několik isotypů- IgA, IgE, IgG, IgM a IgD. Isotyp IgM tvoří pentamer, IgA dimer. Jednotlivé monomery IgM nebo IgA jsou spojené pomocným řetězcem J, u dimeru IgA se vyskytuje navíc sekreční komponenta. [40].



Obrázek 4: Struktura imunoglobulinu (přejato a upraveno dle [41])

Protilátky můžeme rozdělovat na monoklonální a polyklonální. Polyklonální protilátky jsou směs odlišných molekul, které jsou produktem mnoha klonů B buněk. Monoklonální jsou naopak produktem jediného klonu [40]. Protilátková křížová reaktivita polyklonálních protilátek může sloužit jako užitečný výzkumný nástroj pro identifikaci podobných antigenů. Monoklonální protilátky jsou mířené proti jedinému epitopu, může tedy nastat případ, že protilátka nerozezná svůj antigen v denaturované formě, což je nevýhodou oproti polyklonálním, které rozpoznají mnoho epitopů. Monoklonální protilátky můžeme využít při hodnocení změn konformace, protein- proteinových interakcí nebo fosforylačních stavů [41].

1.2.1 Možnosti přípravy

1.2.1.1 Polyklonální protilátky

Při imunizaci savčími proteiny je nejdůležitější výběr správného druhu tak, aby fylogenetický odstup produkčního organismu od savců byl co největší, což vede k větší odlišnosti epitopů. Při produkci polyklonálních protilátek je též důležitý výběr druhu, protože množství protilátek závisí na velikosti zvířete [41].

Polyklonální antisérum reaguje s řadou epitopů na určitém antigenu. Toto antisérum je výsledkem záměrné imunizace zvířete [40]. Imunizační proces zahrnuje 3- 4 imunizační dávky a průběžný sběr séra [42]. Sérum obsahující protilátky je pak získáno vykrvením imunizovaných zvířat [43]. Nejčastěji jsou používáni králíci, kozy nebo ovce pro jejich velikost, snadný přístup k cévám a robustnosti jejich imunitní odpovědi. Z nich nejvíce používaný je králík, protože je nejméně náročný a levný na chov. Kromě savců můžeme využít třeba slepice [41].

1.2.1.2 Monoklonální protilátky

Monoklonální protilátky jsou získávány hybridomovou technologií. Každý B lymfocyt produkuje jeden unikátní, specifický typ protilátky, čehož tato metody využívá.

Nejprve jsou myši imunizovány čistým antigenem. Následně izolujeme klon myších slezinných B buněk, který produkuje protilátky s požadovanou specifitou, dále je vytvořen hybridom fúzí s myelomatickými buňkami, hybridom pak roste v buněčné kultuře a do media jsou sekretovány vytvořené protilátky [40, 44].

1.2.1.3 Anti-peptidové protilátky

Protilátky nejen proti CYP mohou být připraveny imunizací syntetickým peptidem, tj. malým úsekem sekvence apoproteinu. Takto připravené protilátky jsou směřovány proti jedinečnému cílovému antigenu. Rozpoznávají tedy unikátní specifický region dané isoformy CYP.

Tyto protilátky se hodí pro „imunoblotting“, imuno-inhibici enzymové aktivity nebo imunocytochemii³ [44].

³ Imunocytochemie využívá značených protilátek pro zkoumání proteinů v tkáních [65]

1.2.2 Slepíčí protilátky

Slepíčí protilátky jsou levnější variantou savčích protilátek, navíc rozeznají více epitopů než odpovídající savčí [45]. Specifita⁴ a avidita⁵ slepičích protilátek jsou podobné jako u protilátek produkovaných králíky, myšmi nebo morčaty [46].

Slepíčí IgY (yolk) jsou homologem k savčím IgG a jsou produkovány do vaječného žloutku [46]. Každý žloutek obsahuje asi 100 mg IgY [43, 47]. Roční produkce IgY se pohybuje okolo 28-42 g na jednu slepici [43].

IgY kombinují dvě funkce, které jsou u savčích protilátek rozděleny mezi IgE a IgG, a to obrana proti systémovým infekcím, což zprostředkovává IgG, a schopnost zprostředkovávat anafylaktické reakce, což je funkcí IgE [48]. Pantová oblast IgY je kratší a méně flexibilní. Jsou více hydrofobní než IgG, kvůli prostředí ve žloutku bohatému na lipidy [43]. Molekulová hmotnost IgY (180 kDa) je větší než IgG (150 kDa) [49]. Jsou stabilní v rozmezí pH 4-9, do teploty 65°C ve vodném prostředí, v jiném jsou stabilnější. Rezistence vůči vyššímu pH a stabilita je zvyšována vyšší iontovou silou nebo stabilizačními činidly jako sorbitol. Protilátky jsou uchovávány při 4°C [43], v roztoku s přídavkem NaCl (0,9% w/v) a NaN₃ (0,02% w/v) [50].

Jednou z jejich výhod je velký fylogenetický rozestup od savců [41]. Protilátky jsou produkovány do vaječného žloutku, odkud jsou pak izolovány [51]. Není nutný sběr krve a vyprodukované množství protilátek za týden obsažených ve vajíčku je větší než v krvi králíka [41]. Sandwichové metody, jakou je třeba metoda ELISA (Enzyme- Linked ImmunoSorbent Assay), jsou náchylné na nescifickou interferenci způsobenou různými faktory přítomnými v séru. Slepíčí protilátky nabízí výhodu také v tom, že nerozeznají protein A, G, savčí Fc receptor a nespouští komplement, což jsou právě faktory způsobující interferenci [46].

IgY jsou úspěšně využívány pro vědecké, diagnostické, profylaktické i terapeutické účely [50]. Jsou využívány pro běžné imunometody jako jsou ELISA, Western blot [43].

⁴ schopnost rozeznat specifický epitop (část molekuly antigenu, která se váže do vazebního místa) [41]

⁵ síla, kterou polyvalentní protilátka interaguje s polyvalentním antigenem [40]

2 Cíle

Cílem této práce je vytvořit specifické protilátky proti potkanímu cytochromu P450 1A1.

Pro dosažení cíle bylo zapotřebí splnit dílčí úkoly:

- 1) Výběr a syntéza vhodného peptidu
- 2) Příprava imunogenu pro imunizaci slepic
- 3) Izolace IgY z vaječného žloutku
- 4) Zjištění specifity vytvořených protilátek pomocí metod ELISA a „Western blot“

3 Materiál a metody

3.1 Použité přístroje

Analytické váhy

40SM-200A, PESA, Švýcarsko

Discovery, Ohaus, USA

Automatické pipety

Nichipet EX, Nichiryo, Japonsko

Eppendorf, Německo

Centrifuga

Centrifuge 5418, Eppendorf, Německo

Centrifuga K70D, MLW, Německo

Fotometr mikrotitračních destiček

Sunrise, Tecan, Švýcarsko

Inkubátor

IR 1500 Automatic CO2 Incubator, Flow Laboratories, Velká Británie

Magnetická míchačka

KMO 2 basic IKAMAG, IKA, Německo

VARIOMAG MONO, USA

Opakovací dávkovač

Multipette, Eppendorf, Německo

pH metr

HI 2211, HANNA Instruments, USA

Předvážky

Kern EW 600-2M, Kern&Sohn, Německo

Sonikátor

Elmasonic E30H, Elma, Německo

Spektrofotometr

Spektromom 195 D, MOM Budapešť, Maďarsko

Vícekanálová pipeta

Proline, Biohit, Finsko

3.2 Použité chemikálie a materiál

Fluka, Švýcarsko

pNPP (hexahydrát 4-nitrofenylfosfátu disodného)

Chemapol, Československo

NaHCO₃, Na₂CO₃

Lach-ner, Česká republika

NaCl, NaH₂PO₄ · 2 H₂O, HCl; MgCl₂, NaH₂PO₄ · 2H₂O; Na₂HPO₄ · 12H₂O

Penta, Česká republika

NaN₃, NaOH

SERVA, Německo

Tween 20

Sigma- Aldrich, USA

Dimethylsulfoxid, anti-slepičí IgG konjugovaná s alkalickou fosfatasou;

Thermo Fisher Scientific, USA

Imject Maleimide-Activated Mariculture KLH (keyhol limpet hemocyanin); KLH;
mikrotitrační destička F16 MaxiSorp NUNC-IMMUNO MODULE

3.3 Metody

3.3.1 Výběr peptidu

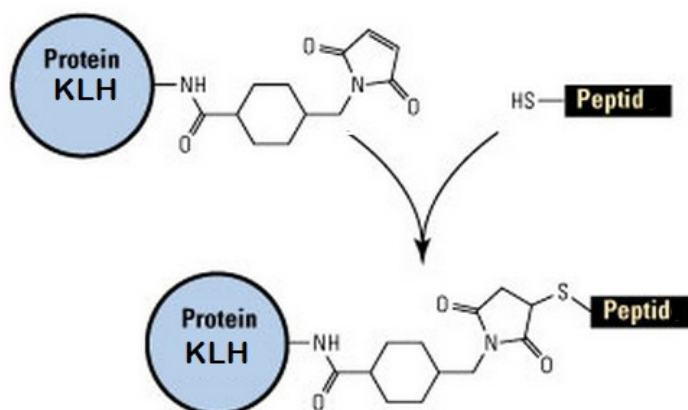
Nejprve byly v literatuře vyhledány komerčně využívané nebo vědecky použité sekvence peptidu. Na základě této rešerše bylo vyhledáno místo s nejčastějším výskytem použitých sekvencí. Dále byla pro získané peptidy zjišťována unikátnost, druhová specifita a křížová reaktivita s jinými enzymy potkaního metabolismu. Pro zjištění případné křížové reaktivity byl využit program BLAST (Basic Local Alignment Search Tool- nástroj pro vyhledávání podobností mezi sekvencemi), který hledá podobnosti a identity s ostatními proteiny. Pro nalezené peptidy s délkou upravenou na délku mezi 8-14 aminokyselin bylo provedeno srovnání mezi potkaním CYP1A1 a 1A2, lidským CYP1A1 a 1A2, lidským a potkaním CYP1A1a lidským a potkaním CYP1A2.

Pro vybrané peptidy byla pomocí komerčního webu predikována sekundární struktura (Consensus Secondary Structure Prediction, Network Protein Sequence Analysis, Pôle BioInformatique Lyonnais) a testováno skoré antigenicity (Antigen Profiler Peptide Tool, Thermo Scientific).

Podle vybraných sekvencí byly syntetizovány peptidy (biotechnologická firma VIDIA, ČR).

3.3.2 Příprava imunogenu

Vzhledem k tomu, že peptidy jsou příliš malé pro vytvoření dostatečné imunitní odpovědi, bylo nutné navázat na vhodný protein. V našem případě byl použit KLH (keyhole limpet hemocyanin). Jedná se o maleimidem aktivovanou formu, reagující s $-SH$ skupinou peptidu za vzniku thioesterové vazby. Schéma konjugace je znázorněno na obrázku č. 5.



Obrázek 5: Schéma konjugace peptidu na KLH (přejato a upraveno z [52])

Nejprve byl připraven konjugační pufr (0,1 M NaH_2PO_4 , 0,15 M NaCl, pH= 7,2). Dále bylo připraveno 200 μl roztoku Imject Maleimide Activated mcKLH v destilované vodě o koncentraci 10 mg/ml. Z obou peptidů bylo naváženo po 1 mg. Navážka peptidů byla rozpuštěna ve 100 μl konjugačního pufru, pro rozpuštění peptidu 1A1a bylo potřeba přidat 10 μl DMSO. Oba roztoky byly smíseny v ekvivalentním množství, tj. 100 μl roztoku peptidu v konjugačním pufru a 100 μl roztoku mcKLH. Vzniklá směs se míchala 2 hodiny při pokojové teplotě.

3.3.3 Izolace IgY

Žloutky, které byly použity pro získání kontrolní frakce IgY, byly dodány již oddělené od bílků a ředěné 1:1 PBS s azidem. Pro další práci byly tyto roztoky ředěny 4krát vodou z vodovodu. Pro izolaci specifických protilátek proti peptidu 1A1a bylo použito 5 vajec,

proti peptidu 1A1b také 5 vajec. Žloutky byly pomocí separátoru odděleny a 8krát ředěny vodou z vodovodu. Takto připravený roztok (4 nebo 8krát ředěný) byl promíchán na magnetické míchačce. Hodnota pH roztoku byla upravena pomocí 1 M HCl na hodnotu 5. Takto připravený roztok byl přes noc zamražen a druhý den během postupného rozmrazování přefiltrován. Do přefiltrovaného roztoku bylo přidáno NaCl do 8,76 % (w/v) koncentrace. Hodnota pH tohoto roztoku byla upravena 1 M HCl na pH= 4. Vzniklá směs se míchala 0,5 hod na magnetické míchačce, další 1,5 hod tato směs stála za laboratorní teploty. Během této doby došlo k precipitaci. Směs byla centrifugována na centrifuze Janetzki K70 při 2700 RPM (otáček za minutu) po dobu 20 min. Po centrifugaci byl slit supernatant, peleta byla resuspendována v 6 ml PBS s azidem (13,4 mM NaCl; 1,8 mM Na₂HPO₄; 1 mM NaH₂PO₄; 0,1% (w/v) azid sodný) a roztok byl ředěn, dokud nebyl roztok čirý. Vzniklý roztok byl 5 dní skladován v lednici, aby mohly sedimentovat nečistoty.

Výsledná koncentrace proteinů byla zjištěná pomocí měření absorbance při 280 nm. Před měřením absorbance byly vzorky stočeny při 13 000 RPM po dobu 5 minut. Jako slepý vzorek byl použit PBS pufr s 0,1% azidem sodným. Koncentrace proteinů v získané protilátkové frakci byla vypočítána pomocí empirického faktoru.

$$c = A_{280} \cdot f \cdot n$$

| | |
|-----------|------------------------------|
| c | koncentrace proteinů (mg/ml) |
| A_{280} | absorbance při 280 nm |
| f | empirický faktor $f = 1,094$ |
| n | ředění |

3.3.4 ELISA

Pro zjištění specifity protilátek proti daným peptidům byla použita metoda ELISA.

V prvním kroku bylo nutné navázat antigen na dno jamek destičky F16 MaxiSorp NUNC-IMMUNO MODULE. Pro navázání byl vytvořen roztok peptidů (1A1a a 1A1b) v imobilizačním pufru (15 mM Na₂CO₃; 35 mM NaHCO₃; pH 9,6) o koncentraci 4 µl/ml. Do každé jamky bylo nanášeno 100 µl. Destička byla inkubována přes noc při 4°C. Druhý den byl roztok slit a jamky byly 3krát promyty 200 µl promývacího roztoku (PBS s 0,1% TWEEN 20: 13,4 mM NaCl; 1,8 mM Na₂HPO₄; 1 mM NaH₂PO₄; 0,1% (v/v) TWEEN 20; pH 7,2). Po promytí bylo na destičku nanášeno po 150 µl 0,2% roztoku řídkého bílku v PBS s 0,1% TWEEN 20 a destička byla inkubována 1 hod při 37°C. Roztok bílku byl slit,

destička promyta a bylo nanášeno po 100 μ l roztoku slepičích protilátek o koncentracích 30 a 3,3 mg/ml, vždy v dubletu. Pro přípravu roztoku protilátek byl použit PBS (13,4 mM NaCl; 1,8 mM Na₂HPO₄; 1 mM NaH₂PO₄; pH 7,2). Inkubace probíhala 2 hod při 37°C. Po slití a promytí destičky bylo na destičku nanášeno po 100 μ l roztoku sekundárních králíčích anti- slepičích protilátek nesoucích alkalickou fosfatázu ředěných 1:1 400 v PBS. Destička byla inkubována při 37°C po dobu 1 hod. Po slití a promytí byl přidán vyvolávací roztok (0,1 mg/ml pNPP (4-nitrofenylfosfátu disodného); 0,02 M Na₂CO₃; 0,03 M NaHCO₃; 1 mM MgCl₂) a inkuboval se 10 min. Po 10 min byla reakce zastavena 100 μ l 3 M NaOH. Výsledek byl vyhodnocen na spektrofotometru Sunrise (Tecan).

Požadavku, aby se délka pohybovala mezi 8 a 14 aminokyselinami a na N nebo C konci byl cystein, se přibližovaly 3 sekvence, sekv. 3.1, 3.5 a 3.7 (3.5 a 3.7 jsou velmi podobné), ze kterých také vycházel další postup. Sekvence 3.1 a 3.7 byly postupně zkracovány a byla vyhodnocována jejich hydrofilita, aby byl peptid rozeznán imunitním systémem. V požadovaném rozmezí byly nejhydrofilnější peptidy **C- QDRRLDENANVQ (1A1a)** a **RDITDSLIEH- C (1A1b)**. Pomocí predikčního programu byla nalezena v peptidu 1A1a část α -helixu, která by ale neměla ovlivnit funkčnost peptidu, protože nebyla po celé délce a vyskytovala se na straně u cysteinu, který bude následně navázán na KLH. Přestože bylo pro druhý peptid (1A1b) zjištěno, že se po celé délce vybrané sekvence nachází α -helix, rozhodli jsme se tento peptid pro imunizaci využít, abychom získali porovnání mezi informacemi získanými z literatury a informacemi získanými pomocí predikčních programů.

Předposledním krokem bylo zjistit skóre antigenicity daného peptidu. Peptid **C- QDRRLDENANVQ** získal skóre 3,7, peptid **RDITDSLIEH- C** získal 2,6.

Na základě informací z literatury by měly být protilátky proti peptidu 1A1a použitelné jen pro lidský a potkaní CYP 1A1. U protilátek proti peptidu 1A1b lze předpokládat křížovou reaktivitu s potkaním CYP1A2, není však zcela jasné, zda ji lze využít i pro lidské isoformy CYP1A1 nebo 1A2. Shoda ve třech aminokyselinách by mohla způsobit křížovou reaktivitu. Pro zjištění a ověření křížové reaktivity protilátek s potkaním CYP1A2 a lidskými CYP 1A1 a 1A2 byl sestaven "alignment". Pro peptid 1A1a nebyla nalezena žádná shoda mezi potkaním CYP1A1 a 1A2. Pro peptid 1A1b bylo zjištěno, že v oblasti, ve které se sekvence peptidu vyskytuje, se nachází shoda ve třech aminokyselinách mezi potkaním CYP1A1 a 1A2. Pro sekvence obou peptidů byla nalezena homologie mezi lidským a potkaním CYP1A1. Pro peptid 1A1b byla nalezena částečná homologie mezi lidským a potkaním CYP1A2. "Alignment" je zobrazen na obrázku č. 7. Na základě "alignmentu" bylo tedy zjištěno, že protilátky proti peptidu **1A1a** by mohly křížově reagovat s lidským CYP1A1 a že protilátky proti peptidu **1A1b** by mohly křížově reagovat s potkaním i lidským 1A2 i lidským 1A1.

Tabulka 4: Charakteristiky izolovaných protilátek

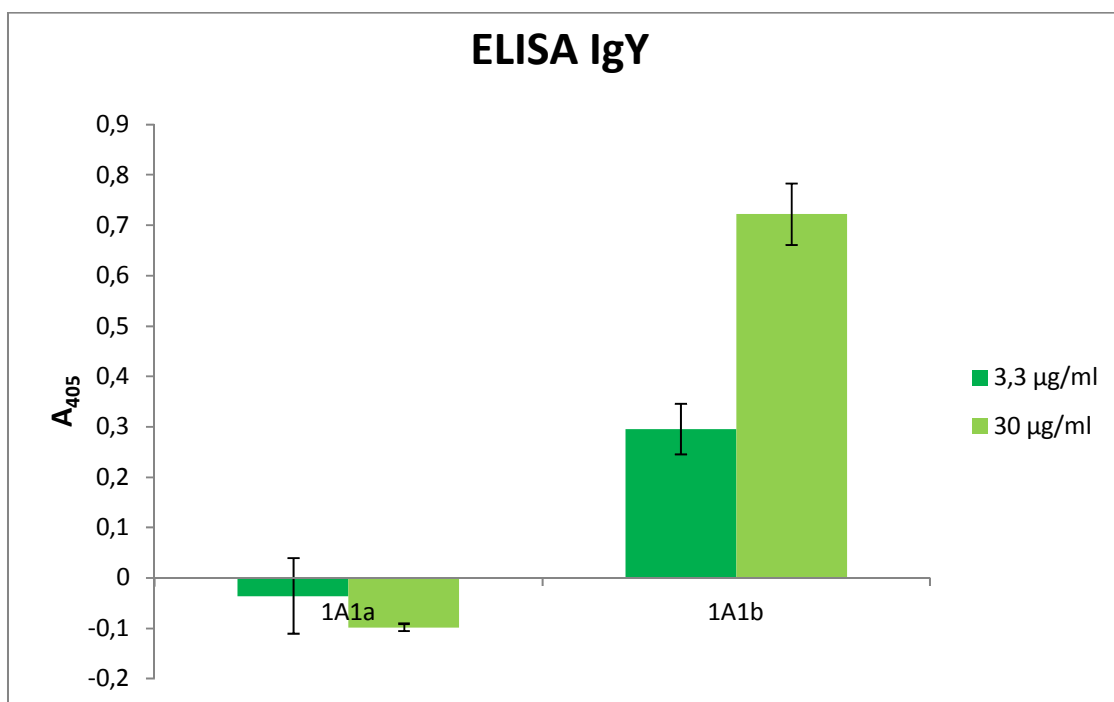
| IgY | Objem (ml) | Koncentrace IgY (mg/ml) |
|---------------------------|------------|-------------------------|
| K_(1A1a) | 18 | 23,8 |
| 1A1a | 11 | 27,8 |
| K_(1A1b) | 10 | 22,3 |
| 1A1b | 11 | 50,8 |

K_(1A1a)- označení kontrolní frakce protilátek proti peptidu 1A1a, *1A1a*- označení frakce specifických protilátek proti peptidu 1A1a, *K_(1A1b)* – označení kontrolní frakce protilátek proti peptidu 1A1b, *1A1b*- označení frakce specifických protilátek proti peptidu 1A1b

4.3 ELISA

Pro zjištění specifity protilátek proti daným peptidům byla provedena ELISA. Výsledky získané z jednotlivých absorbancí jsou znázorněny na obrázku č. 8.

Záporné hodnoty rozdílu absorbancí barevných komplexů specifických a kontrolních protilátek v případě protilátek proti peptidu 1A1a naznačují, že izolované protilátky peptid nerozeznávají. Naopak kladné hodnoty v případě peptidu 1A1b naznačují, že specifické protilátky peptid rozeznávají.



Obrázek 8: ELISA- Sloupce v grafu znázorňují rozdíl absorbancí mezi specifickými a kontrolními protilátkami. Výsledky jsou uvedeny se směrodatnou odchylkou.

5 Diskuze

Rakovina je po onemocněních kardiovaskulární soustavy druhou nejčastější příčinou úmrtí v ČR [25]. Maligní transformace buněk jsou zapříčiněny např. vznikem aduktů DNA nebo tvorbou reaktivních forem kyslíku [6, 9]. Jednou ze skupin enzymů, které katalyzují vznik těchto karcinogenních látek, jsou cytochromy P450 [9]. Konkrétními příklady CYP mohou být CYP1A1 a 1A2. CYP1A1 se podílí na vzniku např. rakoviny plic, kdy metabolizuje PAH přítomné v cigaretovém kouři [36, 37]. CYP1A2 metabolizuje např. kyselinu aristolochovou, která souvisí s nádory močového měchýře [36]. K populárním způsobům prevence rakoviny patří užívání chemopreventivních látek. Ty ale mohou mít při zvýšené míře užívání negativní následky, např. zvýšení pravděpodobnosti výskytu rakoviny díky indukci CYP [28]. Poznání CYP může vést k účelnější farmakoterapii [9]. Pro studium míry indukce CYP můžeme sledovat hladinu mRNA. Ale vztah mezi hladinou mRNA a množstvím aktivního proteinu není jednoznačný [60]. Lepší vypovídací hodnotu má tedy studium exprimovaných proteinů místo mRNA. Jako vhodný nástroj pro studium proteinů se nabízí metoda „imunoblottingu“ (např. Western blot), která využívá specifické vazby antigen- protilátka [61]. Proto, abychom mohli zkoumat námi vybraný protein, je nutné proti němu připravit specifické protilátky. Specifické protilátky můžeme připravit imunizací zvířete tak, že mu bude injikován konkrétní antigen [40]. Jako antigen lze použít celý protein nebo krátkou sekvenci z daného proteinu. Pro „imunoblotting“ můžeme použít anti-peptidové protilátky. Pro imunizaci zvířete je místo celého proteinu použita pouze vybraná krátká sekvence. Tím jsou protilátky také unikátní pro daný protein [44]. Kromě jiného je syntéza peptidu časově i finančně méně náročná než příprava celého proteinu. Jako produkční organismus protilátek byly vybrány slepice pro jejich fylogenetický odstup od savců. Jsou také levnější variantou k savcím protilátkám [45].

Pro syntézu peptidů byly vybrány dvě sekvence. Sekvence 1A1a (C- QDRRLDENANVQ) se vzhledem ke všem zjištěným parametrům i výběru na základě literatury nabízí jako vhodná (skóre antigenicity 3,7- dle predikčního programu se jedná o velmi dobrý antigen). V případě, že se sekvence vyskytuje v místě α - helixu nebo β - listu mohla by být hůře dostupná než v případě neuspořádané struktury. Tato situace nastala pro peptid 1A1b. Dle zjištěných parametrů je tato sekvence méně vhodná. Informace, dle kterých byl peptid 1A1b (RDITDSLIEH- C) vybrán, říkají, že peptidy v dané oblasti byly úspěšně použity. Je tedy otázkou, zda bude protilátka rozeznávat příslušnou sekvenci peptidu v rámci celého proteinu.

Z vaječných bílků byly izolovány kontrolní a specifické protilátky proti peptidům 1A1a nebo 1A1b. Pro zjištění specifity protilátek byla využita ELISA pro její citlivost. Touto metodou můžeme stanovovat nízké koncentrace protilátek [61]. Byly použity koncentrace 3,3 a 30 µg/ml, aby mohla být zachycena vyšší i nižší míra reaktivity izolované frakce. Na základě výsledků ELISA je patrné, že protilátky proti peptidu 1A1b daný peptid specificky rozeznávaly, protilátky proti peptidu 1A1a nikoliv. To, že protilátky proti peptidu 1A1a nerozeznávají peptid specificky, je s největší pravděpodobností způsobeno tím, že vajíčka, ze kterých byly protilátky izolovány, byla odebrána teprve po druhé imunizační dávce. První týdny po imunizaci klesá produkce vajec přibližně na 1 vejce za 5 dní a s dalšími imunizačními dávkami se postupně produkce stabilizuje přibližně na 1 vejce za 2-3 dny. Toto ustálení bylo pozorováno až od 3. imunizace. Počáteční pokles produkce je způsoben zatížením organismu imunitní reakcí [62, 63].

Pro zjištění, zda jsou protilátky proti peptidu 1A1b schopny rozeznat sekvenci peptidu v rámci celého proteinu, je třeba provést metodu „Western blot“ [64, 63]. Pro „Western blot“ by byly použity vzorky lidských CYP1A1 a 1A2 a potkaních CYP1A1 a 1A2 pro ověření předpokládaných vlastností. Podle informací, na jejichž základě byl peptid vybrán, bychom měli získat protilátky, které lze použít pro detekci potkaního CYP1A1 i 1A2, s možným využitím i pro detekci lidských CYP1A1 a 1A2.

Protilátky proti peptidu 1A1a nerozeznávají příslušný peptid specificky. Řešením by bylo izolovat protilátky znovu, z vajec sesbíraných po dokončené imunizaci. Poté by byla znovu provedena ELISA, při níž by bylo zjištěno, zda jsou protilátky specifické proti danému peptidu. V případě, že by výsledky metody ELISA nasvědčovaly specifitě protilátek proti peptidu 1A1a, byly by protilátky dále využity pro metodu „Western blot“. Opět by byly použity vzorky lidských CYP1A1 a 1A2 a potkaních CYP1A1 a 1A2. Protilátky proti peptidu 1A1a by měli být unikátní pro potkaní, resp. lidský, CYP1A1.

6 Závěr

Po imunizaci slepic peptidy 1A1a a 1A1b byly ze žloutků izolovány protilátky. Pomocí metody ELISA bylo zjištěno, že protilátky proti peptidu 1A1b jsou proti danému antigenu specifické a mohou být dále použity a že protilátky proti peptidu 1A1a nejsou proti svému antigenu dostatečně specifické a jsou dále nepoužitelné.

7 Literatura

- [1] R. Bernhardt, "Cytochromes P450 as versatile biocatalysts," *J. Biotechnol.*, 2006.
- [2] P. Anzenbacher and E. Anzenbacherová, "Cytochromes P450 and metabolism of xenobiotics," *Cell. Mol. Life Sci.*, 2001.
- [3] D. W. Nebert and D. W. Russell, "Clinical importance of the cytochromes P450," *Lancet*, 2002.
- [4] M. Stiborová, J. Hudeček, J. Páca, V. Martínek, and J. Páca, "Enzymy metabolizující kontaminanty životního prostředí," *Chem. List.*, 2004.
- [5] L. Chromá, M. Macková, T. Macek, V. Martínek, and M. Stiborová, "Rostlinné cytochromy P450 a peroxidasy a jejich úloha při degradaci kontaminantů životního prostředí," *Chem. List.*, 2001.
- [6] J. A. Hasler, R. Estabrook, M. Murray, I. Pikuleva, M. Waterman, J. Capdevila, V. Holla, C. Helvig, J. R. Falck, G. Farrell, L. S. Kaminsky, S. D. Spivack, E. Boitier, and P. Beaune, "Human cytochromes P450," *Mol. Aspects Med.*, 1999.
- [7] D. R. Nelson, "Cytochrome P450 and the individuality of species.," *Arch. Biochem. Biophys.*, 1999.
- [8] M. Ingelman-Sundberg, S. C. Sim, A. Gomez, and C. Rodriguez-Antona, "Influence of cytochrome P450 polymorphisms on drug therapies: Pharmacogenetic, pharmacoeepigenetic and clinical aspects," *Pharmacol. Ther.*, 2007.
- [9] M. Stiborová, "Studium enzymů biotransformujících xenobiotika jako nástroj k poznání mechanismu působení karcinogenů a konstrukce kancerostatik nové generace," 1996.
- [10] D. Nelson, "Molecular Basis of Disease Cytochrome P450s in humans Molecular Basis of Disease Cytochrome P450s in humans", 2009.
- [11] Z. Knejzlik, J. Kas, and T. Ruml, "Mechanismus vstupu xenobiotik do organismu a jejich detoxikace," *Chem. List.*, 2000.
- [12] N. R. Kitteringham, M. Pirmohamed, and B. K. Park, "The pharmacology of the cytochrome P450 enzyme system," *Baillieres. Clin. Anaesthesiol.*, 1998.
- [13] B. K. Park, M. Pirmohamed, and N. R. Kitteringham, "The role of cytochrome P450 enzymes in hepatic and extrahepatic human drug toxicity.," *Pharmacol. Ther.*, 1995.
- [14] <http://www.pnas.org/content/107/44/18783/F1.large.jpg>.
- [15] J. H. Lin and a Y. Lu, "Inhibition and induction of cytochrome P450 and the clinical implications.," *Clin. Pharmacokinet.*, 1998.
- [16] O. Pelkonen, M. Turpeinen, J. Hakkola, P. Honkakoski, J. Hukkanen, and H. Raunio, "Inhibition and induction of human cytochrome P450 enzymes: Current status," *Arch. Toxicol.*, 2008.

- [17] Y. Fujii-Kuriyama and J. Mimura, "Molecular mechanisms of AhR functions in the regulation of cytochrome P450 genes," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2005.
- [18] Y. E. Timsit and M. Negishi, "CAR and PXR: The xenobiotic-sensing receptors," *Steroids*, 2007.
- [19] A. H. Tolson and H. Wang, "Regulation of drug-metabolizing enzymes by xenobiotic receptors: PXR and CAR," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2010.
- [20] S. A. Kliewer, B. Goodwin, and T. M. Willson, "The Nuclear Pregnane X Receptor: A Key Regulator of Xenobiotic Metabolism," *Endocr. Rev.*, Oct. 2002.
- [21] D. J. Waxman, "P450 gene induction by structurally diverse xenochemicals: central role of nuclear receptors CAR, PXR, and PPAR," *Arch. Biochem. Biophys.*, 1999.
- [22] <http://lekarske.slovníky.cz/>.
- [23] "www.drugs.com."
- [24] "www.promedcs.cz."
- [25] "Český statistický úřad: Zemřelí podle seznamu příčin smrti, pohlaví a věku v ČR, krajích a okresech (2000 až 2009)."
- [26] P. Hodek, J. Křížková, K. Burdová, M. Šulc, R. Kizek, J. Hudeček, and M. Stiborová, "Chemopreventive compounds-View from the other side," *Chem. Biol. Interact.*, 2009.
- [27] K. Gross-Steinmeyer and D. L. Eaton, "Dietary modulation of the biotransformation and genotoxicity of aflatoxin B1," *Toxicology*, 2012.
- [28] J. Křížková, K. Burdová, J. Hudeček, M. Stiborová, and P. Hodek, "Induction of cytochromes P450 in small intestine by chemopreventive compounds," *Neuroendocrinol. Lett.*, 2008.
- [29] <http://www.uniprot.org/align/A20150506640235UKII>.
- [30] K. Lingappan, W. Jiang, L. Wang, X. I. Couroucli, and B. Moorthy, "Sex-specific differences in hyperoxic lung injury in mice: Role of cytochrome P450 (CYP)1A," *Toxicology*, 2015.
- [31] J. C. Otte, A. D. Schmidt, H. Hollert, and T. Braunbeck, "Spatio-temporal development of CYP1 activity in early life-stages of zebrafish (*Danio rerio*)," *Aquat. Toxicol.*, 2010.
- [32] Q. Ma and A. Y. H. Lu, "CYP1A Induction and Human Risk Assessment : An Evolving Tale of in Vitro and in Vivo Studies," *Metab. Dispos.*, 2007.
- [33] J. Fang, S. Wang, H. Wang, S. Zhang, S. Su, Z. Song, Y. Deng, J. Qian, J. Gu, B. Liu, J. Cao, and Z. Wang, "The Cytochrome P4501A1 gene polymorphisms and idiopathic male infertility risk: A meta-analysis," *Gene*, 2014.
- [34] J. Liu, J. Sridhar, and M. Foroozesh, "Cytochrome P450 Family 1 Inhibitors and Structure-Activity Relationships," *Changes*, 2012.

- [35] A. T. Drahashuk, B. P. McGarrigle, K. E. Larsen, J. J. Stegeman, and J. R. Olson, "Detection of CYP1A1 protein in human liver and induction by TCDD in precision-cut liver slices incubated in dynamic organ culture," *Carcinogenesis*, 1998.
- [36] S.-F. Zhou, L.-P. Yang, Z.-W. Zhou, Y.-H. Liu, and E. Chan, "Insights into the substrate specificity, inhibitors, regulation, and polymorphisms and the clinical impact of human cytochrome P450 1A2.," *AAPS J.*, 2009.
- [37] M. S. Islam, M. U. Ahmed, M. S. Bin Sayeed, A. Al Maruf, a. G. M. Mostofa, S. M. Akram Hussain, Y. Kabir, A. K. Daly, and A. Hasnat, "Lung cancer risk in relation to nicotinic acetylcholine receptor, CYP2A6 and CYP1A1 genotypes in the Bangladeshi population," *Clin. Chim. Acta*, 2013.
- [38] S. Rawal, J. E. Kim, and R. Coulombe, "Aflatoxin B1 in poultry: Toxicology, metabolism and prevention," *Res. Vet. Sci.*, 2010.
- [39] E. C. Franklin, "Structure and function of immunoglobulins. Relation to allergy.," *N. Y. State J. Med.*, 1968.
- [40] J. Bartůňková and V. Hořejší, *Základy imunologie*, 4. ed. Praha: Triton, 2009.
- [41] N. S. Lipman, L. R. Jackson, L. J. Trudel, and F. Weis-Garcia, "Monoclonal versus polyclonal antibodies: distinguishing characteristics, applications, and information resources.," *ILAR J.*, 2005.
- [42] <http://www.synteza-peptidu.cz/cs/imunizacni-protokol.htm>.
- [43] W. W. Zhang, "The use of gene-specific IgY antibodies for drug target discovery," *Drug Discov. Today*, 2003.
- [44] M. Shou and A. Y. H. Lu, "Minireview Antibodies as a Probe in Cytochrome P450 Research," *Drug Metab. Dispos.*, 2009.
- [45] W. Dias da Silva and D. V. Tambourgi, "IgY: A promising antibody for use in immunodiagnostic and in immunotherapy," *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 2010.
- [46] J. A. Woolley and J. Landon, "Comparison of antibody production to human interleukin-6 (IL-6) by sheep and chickens," *J. Immunol. Methods*, 1995.
- [47] F. G. de Andrade, S. F. Eto, A. C. Navarro dos Santos Ferraro, D. T. Gonzales Marioto, N. J. Vieira, A. P. Cheirubim, S. de Paula Ramos, and E. J. Venâncio, "The production and characterization of anti-biotoxic and anti-crotalic IgY antibodies in laying hens: A long term experiment," *Toxicon*, 2013.
- [48] G. W. Warr, K. E. Magor, and D. a Higgins, "IgY: clues to the origins of modern antibodies.," *Immunol. Today*, 1995.
- [49] W. Jin, K. Yamada, M. Ikami, N. Kaji, M. Tokeshi, Y. Atsumi, M. Mizutani, A. Murai, A. Okamoto, T. Namikawa, Y. Baba, and M. Ohta, "Application of IgY to sandwich enzyme-linked immunosorbent assays, lateral flow devices, and immunopillar chips for detecting staphylococcal enterotoxins in milk and dairy products," *J. Microbiol. Methods*, 2013.

- [50] A. Michael, S. Meenatchisundaram, G. Parameswari, T. Subbraj, R. Selvakumaran, and S. Ramalingam, "Chicken egg yolk antibodies (IgY) as an alternative to mammalian antibodies," *Indian J. Sci. Technol.*, 2010.
- [51] J. Kovacs-Nolan, M. Phillips, and Y. Mine, "Advances in the value of eggs and egg components for human health," *J. Agric. Food Chem.*, 2005.
- [52] <https://www.lifetechnologies.com/order/catalog/product/77605>.
- [53] <http://www.scbt.com/datasheet-20772-cyp1a1-h-70-antibody.html>.
- [54] <http://www.abcam.com/cytochrome-p450-1a1-antibody-ab126887.html>.
- [55] <http://www.avivasysbio.com/cyp1a1-antibody-middle-region-arp41404-p050.html>.
- [56] <http://www.sigmaldrich.com/catalog/product/sigma/av41404?lang=en®ion=CZ>.
- [57] <http://carcin.oxfordjournals.org/content/14/4/585>.
- [58] <http://www.antibodypedia.com/gene/4356/CYP1A1/antibody/234470/GTX81231>.
- [59] <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/etc.5620120910/abstract>.
- [60] P. Češková, K. Brožková, L. Hernychová, J. Štěrba, D. Valík, and B. Vojtěšek, "Hmotnostní spektrometrie v kvantitativní a diagnostické proteomice: Možnosti a limitace," *Chem. List.*, 2006.
- [61] B. J. P. Milan, *Vyšetřovací metody v imunologii*. Praha: Grada Publishing, a.s., 2005.
- [62] S. Lévesque, G. Martinez, and J. M. Fairbrother, "Improvement of Adjuvant Systems to Obtain a Cost-Effective Production of High Levels of Specific IgY." *Poultry Science*, 2007
- [63] M. Růžička, "Slepičí protilátky jako prostředek pasivní imunizace proti mikrobiálním onemocněním dýchacího traktu," Univerzita Karlova v Praze, 2010.
- [64] I. Mácová, "Příprava a charakterizace anti-peptidových protilátek pro imunodetekci cytochromů P450," Univerzita Karlova v Praze, 2013.
- [65] R. Závodská and P. Ju, "Imunocytochemická metoda – její princip a využití v laboratoři,"

Vypůjčení Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovateli.

| Jméno a příjmení | Číslo OP | Datum vypůjčení | Poznámka |
|------------------|----------|-----------------|----------|
| | | | |