

Abstrakt

Cytochromy P450 jsou významné enzymy účastníci se metabolismu endogenních i exogenních látek. Jejich substrátem jsou také karcinogeny, které mohou aktivovat, čímž může docházet ke vzniku rakoviny. Pokud jsou tedy cytochromy P450, zodpovědné za aktivaci karcinogenů indukovány, riziko rakoviny se zvyšuje. Jedním z induktorů těchto enzymů jsou i chemopreventivní látky, které jsou v současnosti velmi oblíbené a doporučované. Proto by měl být sledován vliv chemopreventivních látek na cytochromy P450 a vznik rakoviny.

Cytochromy P450 se nejčastěji vyskytují v játrech. Nicméně existují také formy, které nebyly dosud prokázány v žádné zdravé lidské tkáni, ale jejich zvýšená exprese byla zjištěna v nádorech. Z tohoto důvodu by mohly sloužit k diagnostice a prognóze rakoviny. Mezi tyto cytochromy patří CYP2S1 a 2W1, které mohou být prognostickými markery kolorektální rakoviny. Proto by bylo vhodné mít nástroje k detekci těchto enzymů.

Jednou z možností je imunodetekce cytochromů P450 technikou "Western blot" pomocí specifických protilátek. Nyní jsou nejčastěji využívány savčí protilátky (IgG), avšak protilátky izolované z vaječného žloutku (IgY) získávají na popularitě zejména kvůli velkému množství nesporných výhod.

Pro přípravu peptidických imunogenů byly nejprve z primární struktury CYP2S1 a 2W1 vybrány vhodné sekvence peptidů. Syntetické peptidy byly pak navázány na proteinový nosič KLH a tímto konjugátem byly imunizovány slepice. Poté byly z vaječného žloutku izolovány IgY extrakčními a precipitačními metodami pomocí chloridu sodného. Schopnost protilátek rozpoznat daný peptid byla prokázána metodou ELISA. Následovala purifikace afinitní chromatografií, čímž byly získány pouze specifické protilátky. Nakonec byly purifikované protilátky použity k imunodetekci CYP2S1 a 2W1 v biologickém materiálu. Technikou "Western blot" byly v lyzátech z buněčných linií MT-3, A549, MRC-5 a MCF-7 prokazovány CYP2S1 a 2W1. Pravděpodobně vzhledem k jejich malému množství nebyly cytochromy P450 v těchto vzorcích jednoznačně detekovány. Dalším vzorkem pro imunodetekci byla suspenze *E. coli* se zavedeným plasmidem pro expresi CYP2S1. Exprimovaný CYP2S1 byl pomocí získaných protilátek dobře detekovatelný.