

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biochemie



Bc. Iva Mácová

Příprava a charakterizace anti-peptidových protilátek
pro imunodetekci cytochromů P450

Preparation and characterization of anti-peptide antibodies
for immunodetection of cytochromes P450

Diplomová práce

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

Praha 2013

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracovala samostatně 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 20. srpna 2013

Poděkování

Touto cestou bych ráda poděkovala prof. RNDr. Petru Hodkovi, CSc. za odborné rady a cenné připomínky během zpracování této diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat celému kolektivu na Katedře biochemie PřF UK za vytvoření výborného pracovního prostředí a za pomoc během experimentální části.

V neposlední řadě patří mé velké díky mé rodině za podporu během celého mého studia.

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 indukované, 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.

Klíčová slova: Western blot, IgY, nádorové markery, chemoprevence, cytochrom P450 2S1 a 2W1

Abstract

The cytochromes P450 are enzymes participating in metabolism of endogenous and exogenous compounds. Their substrates include also carcinogens which may initiate carcinogenesis after activation by CYP450. Inductors of these enzymes are also chemopreventive compounds which are very popular and recommended in current time. Thus, studying of the effect of the chemopreventive compounds on cytochromes P450 induction and cancer development is of a high clinical importance.

The CYPs are most commonly found in the liver. However, there are forms that have not been detected in any human healthy tissue but their overexpression was observed in tumors. For this reason, they could serve for diagnosis and prognosis of cancer. Among these cytochromes are CYP2S1 and 2W1 which can be prognostic markers of colorectal cancer. Therefore, it would be opportune to have some tools for these enzyme detection.

One option is immunodetection of cytochromes P450 by Western blot using the specific antibodies. Today mammalian antibodies (IgG) are the most widely used but antibodies isolated from egg yolk (IgY) become popular mainly due to the large number of undisputed advantages.

For the preparation of the peptide immunogen, suitable peptide sequences were selected from CYP2S1 and 2W1 primary structure. The synthesized peptides were then conjugated with the carrier protein KLH and the hens were immunized by these conjugates. Then IgY from egg yolk were isolated by the extraction and precipitation methods with sodium chloride. The ability of antibodies to recognize the peptide was demonstrated by ELISA. The next procedure was purification by affinity chromatography when the specific antibodies were obtained. Finally the purified antibodies were used for the immunodetection of CYP2S1 and 2W1 in the biological material. CYP2S1 and 2W1 were showed in the lysates from cell lines MT-3, A549, MRC-5 and MCF-7 by Western blot technique. The cytochromes P450 in these samples were not detected probably due to their small amount. Another sample for immunodetection was the suspension of *E. coli* with the plasmid for expression of CYP2S1. The expressed CYP2S1 was detected well by the prepared antibodies. (In Czech)

Keywords: Western blot, IgY, tumor markers, chemoprevention, cytochrome P450 2S1 and 2W1

Obsah

Seznam použitých zkratek.....	7
1 Teoretický úvod.....	9
1.1 Cytochrom P450.....	9
1.1.1 Struktura.....	10
1.1.2 Nomenklatura.....	10
1.1.3 Katalytický cyklus	11
1.1.4 Inhibice	12
1.1.5 Indukce.....	13
1.1.6 Chemoprevence	14
1.1.7 Sirotci.....	17
1.2 Protilátky	19
1.2.1 Struktura protilátek	20
1.2.2 Savčí protilátky	21
1.2.3 Slepíčí protilátky.....	24
2 Cíl práce.....	28
3 Materiál a metody	29
3.1 Použitý materiál.....	29
3.2 Použité přístroje.....	30
3.3 Metody.....	32
3.3.1 Výběr peptidu	32
3.3.2 Příprava imunogenu.....	32
3.3.3 Imunizace slepic	34
3.3.4 Izolace protilátek.....	35
3.3.5 ELISA	36
3.3.6 Afinitní purifikace IgY	37

3.3.7	Buněčné kultury	40
3.3.8	Stanovení koncentrace proteinů	41
3.3.9	SDS elektroforéza v polyakrylamidovém gelu	41
3.3.10	Western blot	43
4	Výsledky	44
4.1	Výběr peptidu	44
4.2	Příprava imunogenu	49
4.3	Izolace protilátek	50
4.4	Specifita izolovaných protilátek	50
4.5	Afinitní purifikace IgY	51
4.6	Buněčné kultury	55
4.7	SDS elektroforéza v polyakrylamidovém gelu	56
4.8	Western blot	57
5	Diskuze	61
6	Souhrn	66
	Seznam použité literatury	67

Seznam použitých zkratek

A549	lidská epitelová buněčná linie adenokarcinomu
AHR	receptor aromatických uhlovodíků (z ang. aryl hydrocarbon receptor)
APS	persíran amonný (z ang. ammonium persulfate)
ARNT	jaderný přenašeč receptoru aromatických uhlovodíků (z ang. aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator)
BIS	N,N'-methylenbisakrylamid
BSA	hovězí sérový albumin (z ang. bovine serum albumin)
CAR	konstitutivní receptor androstanu (z ang. constitutive androstane receptor)
CCAR	cytoplazmatický CAR retenční protein (z ang. cytoplasmic CAR retention protein)
cDNA	komplementární DNA (z ang. complementary DNA)
CDR	oblast protilátky tvořící místo vázající antigen (z ang. complementarity determining region)
CYP	cytochrom P450
DEA	diethylamin
DNA	deoxyribonukleová kyselina (z ang. deoxyribonucleic acid)
EC	číselný kód enzymu (z ang. Enzyme Commission number)
EDC	1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimid
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina (z angl. ethylenediaminetetraacetic acid)
ELISA	stanovení pomocí enzymu navázaným na imunosorbent (z ang. enzyme-linked immunosorbent assay)
Fab	fragment vázající antigen (z ang. fragment antigen-binding)
Fc	konstantní fragment
Fv	variabilní fragment
HSP	protein teplotního šoku (z ang. heat shock protein)
Ig	imunoglobulin, protilátka
IPTG	isopropyl- β -D-1-thiogalaktopyranosid
kDa	kilodalton (1 Da $\sim 1.66 \times 10^{-27}$ kg)
KLH	hemocyanin z děrnatky obrovské (z ang. keyhole limpet hemocyanin)
MCF-7	lidská buněčná linie prsního karcinomu (z ang. Michigan Cancer Foundation - 7)
MES	2-(N-morfolino)ethansulfonová kyselina

MRC5	lidská fetální buněčná linie plicních fibroblastů
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina
MT-3	lidská buněčná linie kolorektální rakoviny
NADH	redukovaná formy nikotinamidadeninukleotidu
NADP ⁺	oxidovaná forma nikotinamidadeninukleotidfosfátu
NADPH	redukovaná forma nikotinamidadeninukleotidfosfátu
NK	přirozený zabíječ (z ang. natural killers)
p23	protein 23
PBS	fosfátový pufr (z ang. phosphate buffered saline)
pNPP	para-nitrofenylfosfát
PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovém poli
PPAR	receptor aktivovaný peroxisomovým proliferátorem(z ang. peroxisome proliferator-activated receptor)
PPRE	DNA oblast pro peroxisomový proliferátor(z ang. peroxisome proliferator response element)
PVDF	polyvinylidifluorid
PXR	receptor pregnanu X (z ang. pregnan X receptor)
RXR	receptor retinoidu X (z ang. retinoid X receptor)
SD	směrodatná odchylka
SDS	dodecylsulfát sodný (z ang. sodium dodecyl sulfáte)
sulfo-SMCC	sulfosukcinimidyl-4-(N-maleimidomethyl)cyklohexan-1-karboxylát
TCDD	2,3,7,8-tetrachlorodibenzeno-p-dioxin
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan
XAP	protein asociovaný s X (z ang. X associated protein)
XRE	DNA oblast pro xenobiotika (z ang. xenobiotic response element)

1 Teoretický úvod

1.1 Cytochrom P450

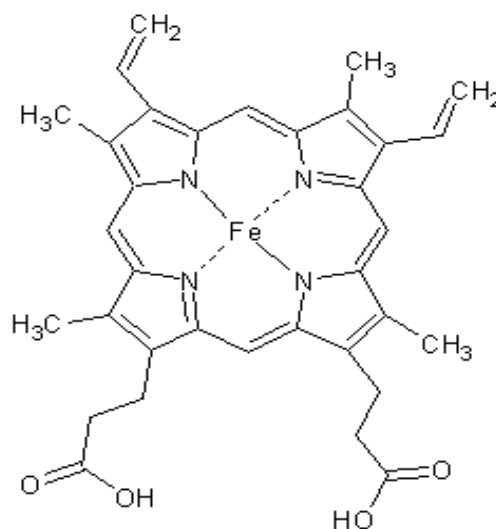
Cytochrom P450 (EC 1.14.14.1) je termín označující důležité monooxygenasy podílející se jednak na syntéze a metabolismu endogenních látek jako např. steroidů,¹ žlučových kyselin,² cholesterolu,³ arachidonové kyseliny⁴ a eikosanoidů,⁵ jednak na metabolismu xenobiotik.⁶ Zde hraje důležitou roli zejména v první fázi metabolismu, kde činí z exogenní látky více polární sloučeninu vnášením nejčastěji hydroxylové skupiny.

První zmínka o cytochromu P450 pochází z roku 1958, kdy si Klingenberg povšiml, že v mikrosomech získaných z potkaních jater se kromě cytochromu b₁ a b₅ nalézá pigment, který v redukované formě a s navázaným oxidem uhelnatým silně absorbuje při 450 nm.⁷ Později se zjistilo, že obsahuje i hemovou skupinu, a proto se začalo používat označení cytochrom P450.⁸ V nadcházejících letech se již potvrdilo, že hraje důležitou roli v hydroxylaci mastných kyselin⁹ i při metabolismu xenobiotik.¹⁰ S využitím cDNA v 80. letech byla objasněna i primární struktura těchto enzymů.¹¹ Přestože pozdější experimenty odhalily, že cytochrom P450 není schopen přenášet elektrony a jeho název je tudíž nepřesný, ke změně jména nedošlo.

Padesát let po objevu cytochromu P450 je dnes známo přes 18 500 forem cytochromů P450 ze stovek druhů, kde se účastní syntézy látek nezbytných pro život. Můžeme jej nalézt od kvasinek, bakterií, archeí, protist a hub přes rostliny až u vyšších živočichů. Např. u kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* katalyzuje reakci, při níž vzniká ochranná složka buněčné stěny spór, dityrosin. U rostlin cytochrom P450 syntetizuje celé spektrum důležitých látek, jež např. zabraňují dehydrataci, určují barvu květů, umožňují úspěšné opylování, podílejí se na obraně před predátory pomocí jedů (amygdalin z mandlí), ale také mají antiseptické, protinádorové a další léčivé účinky (citrál, menthol, kafr). Taktéž tento enzym hrál důležitou roli při vývoji eukaryotické buňky. Před dvěma miliardami let pravděpodobně došlo ke změně ve složení buněčné stěny prokaryot, a tudíž mohlo dojít k fagocytóze bakterie, ze které se později vyvinuly mitochondrie. Tato přeměna spočívala v přítomnosti cholesterolu v buněčné membráně, který vzniká spolupůsobením více enzymů. CYP51 se na této biosyntéze také podílí, jelikož demethyluje jeden z intermediátů cholesterolu – lanosterol. Proto tento enzym mohl stát u vzniku eukaryot a mnohobuněčných organismů.¹²

1.1.1 Struktura

Cytochrom P450 je transmembránový metaloenzym s podobnou strukturou jako chlorperoxidasa a NO synthasa. Vyskytuje se především v membránách hladkého endoplazmatického retikula a mitochondriích. Obsahuje hem b (Obrázek 1), což je totožný druh hemu nacházející se např. v hemoglobinu nebo myoglobinu. Hem b se skládá z protoporfyrinu IX a z centrálního atomu železa, na který je přes cystein vázán apoprotein. Jako šestý ligand trojmocného železa vystupuje v základním stavu voda.¹³



Obrázek 1: Struktura hemu b

1.1.2 Nomenklatura

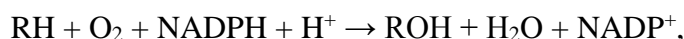
S postupem času byly popisovány nové cytochromy P450 lišící se v primární struktuře apoproteinu. A jelikož každý vědecký tým používal jiné označení pro objevené CYP, začalo být pojmenování nepřehledné a matoucí. Proto se roku 1985 v Airlie (Virginia, USA) na první mezinárodním semináři „P450 Gene and Their Regulation“ ustavila komise pro standardizaci nomenklatury genů cytochromů P450 (Committee on Standardized Nomenclature of the P450 Genes). Tento výbor se rozhodl členit CYP podle evoluční podobnosti na rodiny a podrodiny. Původně jedna rodina zahrnovala proteiny mající shodnou primární strukturu z více než 36 % a označovala se římskou číslicí. V rámci jednotlivých rodin se vyčlenily ještě podrodiny, které se vyznačovaly aminokyselinou sekvencí podobnou minimálně v 70 %. Tyto podrodiny se označovaly velkým písmenem. Na konec označení se psala arabská číslice, která označovala individuální gen.¹⁴ Později se ustavilo, že u savců geny *CYP* patří do stejné rodiny, pokud jsou shodné ≥ 40 % a do jedné podrodiny při shodnosti ≥ 55 %. Také se jako označení rodin zvolila arabská číslice.¹⁵ U lidí je v současnosti známo 14 rodin, přičemž rodiny CYP1-3 se účastní zejména metabolismu exogenních látek.

Více informací o různých formách cytochromů P450 lze vyhledat v internetové databázi Cytochrome P450 Homepage (<http://drnelson.uthsc.edu/CytochromeP450.html>).¹⁶

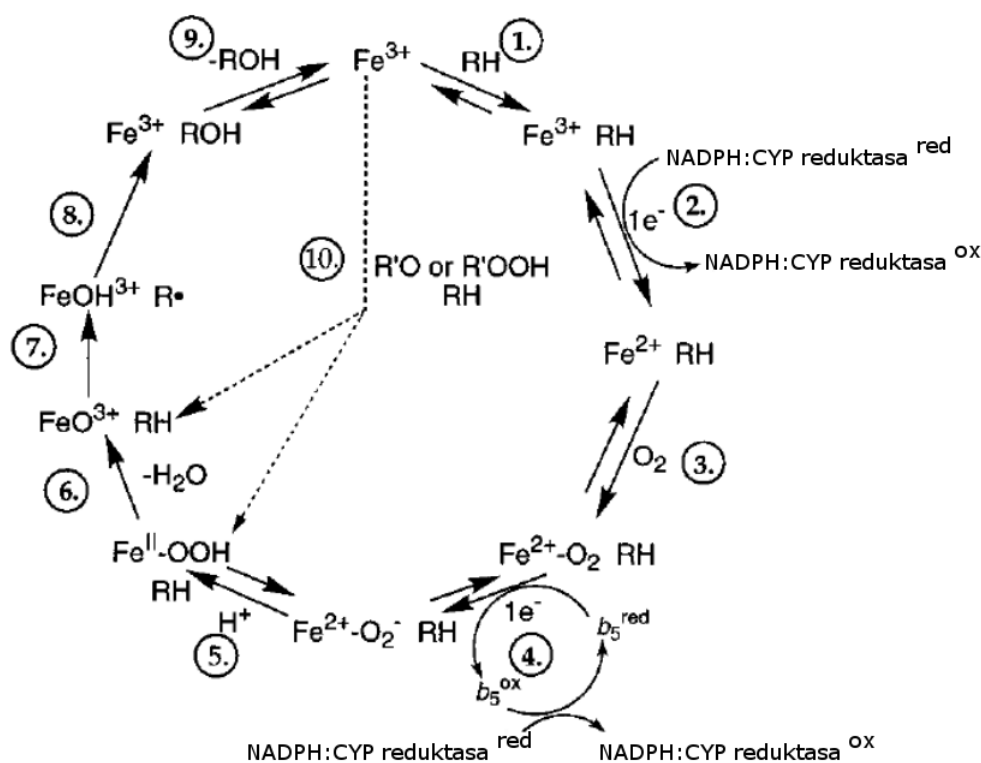
1.1.3 Katalytický cyklus

Cytochrom P450 patří do systému oxidas se smíšenou funkcí, což znamená, že je to enzym schopný přenášet elektrony na molekulární kyslík a jeden z jeho atomů zabudovávat do molekuly substrátu. V tomto systému působí CYP jako terminální oxidasa a spolupracuje s NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasou (EC 1.6.2.4) a fakultativně s cytochromem b₅ a NADH:cytochrom b₅ oxidoreduktasou (EC 1.6.99.3).

Katalyzovanou reakci lze sumárně vyjádřit rovnicí:



kde RH označuje molekulu substrátu a ROH je molekula hydroxylovaného substrátu.



Obrázek 2: Katalytický cyklus cytochromu P450 (převzato a upraveno z¹⁷⁾)

Obrázek 2 názorně popisuje katalytický cyklus cytochromů P450.^{17,18} V klidovém stavu je kationt železa v hemu hexakoordinovaný a je na něm navázána voda. Po navázání substrátu RH dochází k uvolnění vody a ke konformační změně, kdy se iont železa stává pentakoordinovaným (1). Poté dochází k redukci atomu železa elektronem pocházející z NADPH přinášeném pomocí flavinového enzymu, NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasy (2). Následuje vazba kyslíku na binární komplex cytochrom P450-substrát (3) a druhá redukce (4). Elektron může přinášet jednak NADPH:cytochrom P450

oxidoreduktasa jako v kroku (2) jednak cytochrom b₅. V následujícím kroku je přijat proton H⁺ (5) a rozštěpena vazba O-O v molekule kyslíku za vzniku vody (6). Po tomto kroku se stává komplex velmi nestabilní (7), a proto se druhý atom kyslíku zabudovává do substrátu (8). Na závěr se uvolní oxidovaný substrát ROH (9). Katalytický cyklus může také probíhat bez pomoci NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasy a kyslíku, pokud aktivovanou formu kyslíku poskytne organický peroxid (10).

1.1.4 Inhibice

Aktivita cytochromu P450 může být ovlivněna v jakémkoli kroku katalytického cyklu, avšak nejkritičtější jsou tyto tři reakce: navázání substrátu, navázání molekulárního kyslíku a substrátová oxygenace. Podle mechanismu lze inhibice rozdělit do tří kategorií:¹⁹

- reverzibilní: Tento druh zasahuje pouze do prvního kroku katalytického cyklu, kdy se inhibitor váže na prostetickou skupinu enzymu místo substrátu. Po odstranění inhibitoru se funkce enzymu zcela obnoví. Reverzibilní inhibice je nejčastěji zodpovědná za lékové interakce.
- kvazi-ireverzibilní: Inhibitor je metabolizován pomocí cytochromu P450 a vzniká reaktivní metabolit, který se váže na hem, čímž zabrání opakování katalytického cyklu. *In vitro* lze metabolit odstranit z aktivního místa působením lipofilních látek, radioaktivním zářením nebo přidáním hexakynoželazitanu draselného. Poté dochází k reaktivaci cytochromu P450. Nicméně *in vivo* je komplex hem-metabolit příliš silný a syntéza nového enzymu je jedinou možností jak obnovit jeho aktivitu.
- ireverzibilní: Látky obsahující funkční skupinu, která může být oxidována cytochromem P450 a která se následně kovalentně váže do aktivního místa enzymu, se nazývají ireverzibilní inhibitory nebo také "sebevražedné" substráty. Tyto metabolity pozmění hemovou skupinu nebo modifikují aminokyselinu apoproteinu, která je nezbytná pro navázání substrátu, přenos elektronů nebo aktivaci kyslíku. Příkladem jsou uhlovodíky s terminální dvojnou nebo trojnou vazbou, které jsou metabolizovány na reaktivní látky alkylující hem, nebo chloramfenikol (bakteriostatické antibiotikum), jehož vzniklý metabolit je schopný acylovat lysin v aktivním centru.

Inhibice cytochromu P450 jsou sledovány zejména ve farmakologii, jelikož oxiduje až 90 % všech léčiv, které mohou inhibovat aktivitu enzymu, čímž může docházet k hromadění

nepozměněných léčiv, metabolitů nebo produktů. V takových případech může docházet dokonce k život ohrožujícím situacím.

1.1.5 Indukce

Formy cytochromů P450 se mohou v těle vyskytovat ve stabilních koncentracích (konstitutivní CYP) nebo se jejich koncentrace v průběhu času může měnit v závislosti na přítomnosti induktorů (inducibilní CYP). Inducibilní formy patří zejména do rodin CYP1-4.

Regulace exprese cytochromů P450 na úrovni transkripce umožňuje buňce reagovat na proměnné prostředí a zvyšovat koncentraci enzymu v případě setkání s xenobiotiky, které by měly být rychle metabolizovány a vylučovány z těla. Podle mechanismu a zúčastněných transkripčních faktorů lze indukci CYP dělit na čtyři kategorie:

- AHR ("aryl hydrocarbon receptor"): V klidovém stavu se receptor aromatických uhlovodíků nachází v cytoplazmě v komplexu s proteiny HSP90, XAP2 a p23. Ligandy tohoto receptoru patří zejména do skupiny halogenovaných a polycyklických aromatických uhlovodíků. Po navázání ligandu dochází k rozvolnění komplexu a AHR s ligandem putuje do jádra, kde vytvoří heterodimer s proteinem ARNT ("aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator"). Poté se váží na úsek XRE ("xenobiotic response element") na DNA, čímž spouští transkripci enzymů účastnících se metabolismu xenobiotik. Tento mechanismus je typický pro CYP1, jehož silným induktorem je např. 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD).²⁰
- CAR ("constitutive androstane receptor"): Po vystavení buňky fenobarbitalu dochází k jeho navázání na cytoplazmatický receptor CAR, který se tak odpoutá od HSP90 a ko-chaperonu CCRP. Následuje translokace do jádra, kde se asociuje s RXR ("retinoid X receptor") a započiná transkripci genů, na jejichž promotory se komplex CAR-RXR navázal. Takto dochází k indukci CYP2.²¹
- PXR ("pregnan X receptor"): Ligandů receptoru pregnanu X je velké množství. Aktivovat ho dokáží přirozené steroidy (5 β -pregnan-3,20-dion, lithocholová kyselina) i exogenní látky, zejména široké spektrum léčiv (např. antimykotikum Clotrimazol, antibiotikum Rifampicin, lék na rakovinu Tamoxifen). Po aktivaci ligandem se heterodimer PXR-RXR váže na XRE a zahajuje transkripci příslušných genů. Tímto způsobem probíhá i indukce rodiny CYP3.²²

- PPAR ("peroxisome proliferator-activated receptor"): Tento jaderný receptor se vyskytuje ve třech izoformách (α , β , γ). Po navázání ligandu tvoří heterodimer s proteinem RXR a váže se na specifické úseky PPREs ("peroxisome proliferator response elements") na DNA, čímž spouští transkripci genů. PPAR hraje důležitou roli v regulaci metabolismu lipidů, protože lipidy a eikosanoidy jsou jeho přirozené ligandy. Nicméně také ovlivňuje hladinu CYP4, jehož induktorem jsou např. fibráty používané ve farmakologii k léčbě hyperlipidémie.²³

1.1.6 Chemoprevence

Chemoprevence neboli chemoprotylaxe je definována jako užívání chemických látek, léčiv či potravních doplňků k předcházení nemocí.²⁴ Ideální chemopreventivní látka by měla mít tyto vlastnosti: minimální vedlejší nebo toxické účinky, vysoká účinnost, možnost orálního podávání, známý mechanismus působení a nízká cena. Dodržet všechny zmíněné pravidla však není jednoduché zejména proto, že u velké části těchto látek není přesně znám mechanismus ani interakce s léčivými či vnějšími vlivy.²⁵

Různé chemopreventivní látky mohou působit na mnoha úrovních a pomáhat před vznikem širokého spektra nemocí. Příkladem je podávání antibiotik lidem náchylným k bakteriálním infekcím (lidé s poruchami imunitního systému, ochrana před šířením epidemie, pacienti trpící opakovanými bakteriálními nemocemi), používání fluoridových zubních past proti vzniku zubního kazu, užívání probiotik k udržení správné střevní mikroflóry, nahrazování železa potravními doplňky menstrujícími nebo těhotným ženám k prevenci před anémií či požívání multivitaminů k snížení rizika rozvoji rakoviny a srdečním onemocněním.²⁶

Vzhledem k příčinám úmrtí v České republice, kde po nemocích oběhové soustavy je na druhém místě vznik novotvarů,²⁷ se vynakládá velké úsilí na prevenci i léčbu rakoviny. Cílovými skupinami pro profylaktickou léčbu jsou zejména jedinci se špatným životním stylem a lidé vystaveni karcinogenům, lidé s genetickými predispozicemi nebo pacienti, jež rakovinu v minulosti prodělali. Chemopreventivní látky bránící vzniku rakoviny se běžně vyskytují i v potravinách (zejména v rostlinné stravě) a podle jejich struktury rozeznáváme několik druhů (Tabulka 1).²⁸

Tabulka 1: Rozdělení chemopreventivních sloučenin podle struktury (podle ²⁸)

Strukturní rys	Zástupci	Výskyt
karotenoidy	zeaxanthin, astaxanthin, α -, β -karoten, lutein	mrkev, citrusy, paprika, rajče, losos
vitamíny	kys. askorbová (vit. C), α -tokoferol (vit E), retinol (vit. A)	citrusy, brokolice, zelí, ananas, mořské plody, jahoda, meloun
polynenasycené mastné kyseliny	dokosahexaenová kyselina	rostlinné a rybí oleje
deriváty kyseliny linolové	cis-9, trans-11 a trans-10, cis-12 deriváty	hovězí maso, sýry, mléko
organosulfáty	diallylsulfid, N-acetylcystein, S-allylcystein	česnek, cibule
fenolické sloučeniny	flavonoidy, polyfenoly	zelený čaj, červené víno, rybíz, kakao, malina, citrusy
kurkumin	kurkumin	kurkuma (přísada do kari koření)
d-limonen	d-limonen	citrusové oleje
chlorofyl a deriváty	chlorofyl, chlorofylin	špenát, mořské řasy
chitin a chitosan	chitin a chitosan	houby, exoskelet členovců a mořských bezobratlých
isothiokyanáty	allylisothiokyanát, sulforafan	květák, hlávkové zelí, řeřicha, brokolice, kapusta
dehydroepidandrosteron	dehydroepidandrosteron	hormon nadledvin
laktoferin a jeho štěpné fragmenty	laktoferin	mléko

Chemopreventivní látky bránící vzniku a rozvoji rakoviny lze rozdělovat podle mechanismu působení a podle fáze karcinogeneze, ve které působí:²⁵

- **blokátoři:** Většina karcinogenů musí být nejprve metabolicky aktivována, aby se z nich staly elektrofilní formy schopné vázat se na DNA. Této iniciační fázi karcinogeneze brání tzv. blokátoři. Tyto látky se dělí podle mechanismu účinku

do pěti kategorií – inhibitory CYP (diallylsulfid, kyselina ellagová), induktory CYP (indol-3-karbinol, β -naftoflavon), induktory enzymů druhé fáze metabolismu (isothiokyanáty, polyfenoly), nukleofilní látky schopné vychytávat elektrofilní sloučeniny (N-acetylcystein, thiosulfát sodný) nebo induktory opravných mechanismů DNA (vanilin).

- supresory: Po iniciační fázi dochází k promoci a progresi. Tato dvě stádia karcinogeneze inhibují supresory. Ty mohou působit mnoha různými mechanismy, jako příklady supresorů lze jmenovat inhibitory metabolismu polyaminů či kyseliny arachidonové (piroxicam, ibuprofen), inhibitory proteas (leupeptin), induktory diferenciace (retinoidy, vápník, vitamín D), inhibitory exprese onkogenů (D-limonen) nebo inhibitory protein kinasy C (tamoxifen, staurosporin).

I přes uvedené prospěšné efekty existují důkazy, které vyvrací účinnost chemopreventivních látek a které dokonce ukazují na jejich škodlivost. V letech 2007-2008 proběhly rozsáhlé klinické testy, které zkoumaly vliv antioxidantních potravních doplňků (β -karoten, vitamín A, vitamín C, vitamín E a selen). Překvapivým výsledkem bylo, že nedošlo k potvrzení žádných preventivních účinků a v některých případech došlo dokonce ke zvýšení mortality při užívání těchto chemopreventivních látek.²⁹ Tento fakt lze vysvětlit tím, že chemopreventivní látky obsahují vyšší dávku účinné látky, než se běžně vyskytuje v potravinách, a tím že neznámým způsobem interagují s drahami syntézy a přeměny dalších sloučenin.

Z výše popsanych mechanismů je patrné, že chemopreventivní látky mohou ovlivňovat hladinu cytochromů P450 v těle, což může mít vliv na metabolismus dalších xenobiotik. Jelikož klinické testy jsou většinou prováděny zjednodušeným způsobem, kdy je izolovaně podávána pouze testovaná chemopreventivní látka, nemohou být sledovány interakce s látkami, se kterými se člověk v běžném životě setkává. Při podání chemopreventivní látky dochází k indukci cytochromů P450, které pak následně mohou metabolizovat prokarcinogeny na karcinogeny, čímž se může zvyšovat riziko vzniku rakoviny.³⁰ Naopak při podávání látek, jenž inhibují cytochrom P450, může docházet k hromadění nemetabolizovaných látek, což může vést ke zdravotním komplikacím končícím až smrtí.³¹

1.1.7 Sirotci

Izoformy cytochromu P450 se dají dělit nejen podle podobnosti v aminokyselinové sekvenci, ale také podle substrátu. Toto rozdělení lidských izoform je přehledně uvedeno v Tabulce 2.

Tabulka 2: Rozdělení lidských izoform cytochromu P450 podle substrátu (převzato z ³²)

Steroly	Mastné kyseliny	Eikosanoidy	Vitamíny	Xenobiotika	Neznámý
1B1	2J2	4F2	2R1	1A1	2A7
7A1	4A11	4F3	24	1A2	2S1
7B1	4B1	4F8	26A1	2A6	2U1
8B1	4F12	5A1	26B1	2A13	2W1
11A1		8A1	26C1	2B6	3A43
11B1			27B1	2C8	4A22
11B2				2C9	4F11
17				2C18	4F22
19				2C19	4V2
21A2				2D6	4X1
27A1				2E1	4Z1
39				2F1	20A1
46				3A4	27C1
51				3A5	
				3A7	

Jak je patrné, 13 z 57 izoform katalyzují reakce se zatím neznámým substrátem a obecně je o nich minimálně informací. Dostaly přívlastek „sirotci“ (ang. orphans), což se převzalo z terminologie molekulární biologie, kde se takto označují receptory s neznámým ligandem.³³

CYP2S1

Gen *CYP2S1* se nachází na dlouhém raménku chromosomu 19 (19q13.2) v tzv. CYP2 clusteru, kde se nacházejí i další geny pro izotypy rodiny CYP2. Protein se skládá z 504 aminokyselin a jeho hmotnost je 55,8 kDa.

Na základě analýz Dot blot a Northern blot byla zjištěna nejvyšší exprese v průdušnici, plicích, žaludku, tenkém střevu a slezině. V menší míře se vyskytuje také v játrech,

ledvinách, leukocytech, thymu a placentě.³⁴ Vyjmenované tkáně jsou často vystaveny velkému množství exogenních látek, a proto se dá předpokládat, že by CYP2S1 mohl hrát důležitou roli v metabolismu xenobiotik. Tuto domněnku potvrzuje také studie, která odhalila, že se tato forma nachází i v kůži, kde může být indukován UV zářením, kamenouhelným dehtem a retinovou kyselinou.³⁵ Dalším významným induktorem je 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD), díky kterému se také podařilo CYP2S1 v roce 2002 objevit.³⁶ TCDD indukuje expresi CYP2S1 zejména v plicních buňkách a to přes AhR receptor, což bylo do té doby charakteristické pouze pro CYP1 rodinu.

Jeho zvýšená exprese je spojená s výskytem nádorů, přestože u žádného typu rakoviny nebyl CYP2S1 určen jako nezávislý marker. Zvýšený výskyt byl potvrzen u pacientů s kolorektální rakovinou a značí horší prognózu.³⁷ Také bylo pozorováno signifikantní zvýšení exprese u metastázi primární rakoviny vaječníku.³⁸

CYP2W1

Gen *CYP2W1* se nachází na krátkém raménku chromosomu 7 (7p22.3) a kóduje protein složený ze 490 aminokyselin a molekulovou hmotností 53,8 kDa.

Dosud nebyla pozorována exprese v žádné zdravé dospělé lidské tkáni, nicméně exprese mRNA byla nalezena ve fetální a transformované tkáni, zejména v tumorech tlustého střeva a nadledvin.³⁹ Následující klinické studie ukázaly, že by CYP2W1 mohl být dobrý prognostický faktor. Pacienti s pokročilejším stadiem rakoviny tlustého střeva a tudíž s horšími vyhlídkami mají i vyšší expresi CYP2W1.⁴⁰

Pomocí rekombinantně získaného proteinu CYP2W1 byla zkoumána jeho aktivita a případné substráty. Ukázalo se, že dokáže katalyzovat N-demetylací benzfetaminu a oxidaci kyseliny arachidonové i když pouze velmi pomalu a s malým výtěžkem. A dále bylo pozorováno, že aktivuje některé prokarcinogeny zejména polycyklické aromatické uhlovodíky.⁴¹ S využitím homologního modelování byla predikována struktura a dva potencionální substráty – benzfetamin a indol.⁴²

Vzhledem k malému množství informací o těchto nově objevených enzymech by bylo dobré mít nástroj pro jejich detekci a zkoumání. K tomuto účelu mohou dobře posloužit imunochemické přístupy.

1.2 Protilátky

Protilátky jsou humorální složkou antigeně specifické imunity u většiny obratlovců. Jsou to glykoproteiny produkované specializovanými B lymfocyty - plazmatickými buňkami. Protilátky se dokáží vysoce specificky a s velkou afinitou vázat na antigen. Jejich hlavní úlohy v organismu jsou stručně shrnuty v následujících bodech:⁴³

- neutralizace: Protilátky se mohou vázat na povrchové molekuly, které jsou důležité pro patogenesi mikroorganismů, nebo na mikrobiální toxiny, čímž dochází k jejich neutralizaci.
- opsonizace: Částice s navázanou protilátkou se stává atraktivnější pro profesionální fagocyty (monocyty, makrofágy, neutrofilní a eosinofilní granulocyty), čímž se také aktivují destrukční mechanismy fagocytů.
- aktivace komplementu: Po rozeznání antigenu protilátkou může docházet k aktivaci klasické cesty komplementu, což napomáhá k opsonizaci, chemotaxi fagocytů a může vyústit až v lýzi mikroorganismů.
- indukce apoptózy: Navázání protilátky na specifický receptor může v dané buňce spustit kaskádu, která má za následek apoptózu.

Jejich unikátní vlastností specificky rozeznávat antigen se využívá i při některých biologických a biochemických metodách – průtoková cytometrie, imunohistochemie, imunoprecipitace, "Western blot", ELISA, afinitní chromatografie a další.

Podle způsobu, jakým byly protilátky získány, se dají dělit:

- polyklonální: Takto se označuje soubor protilátek získaný nejčastěji ze séra zvířete. Tyto imunoglobuliny rozeznávají různé epitopy na daném antigenu, kterým bylo zvíře imunizováno. Specifické imunoglobuliny se získávají nejčastěji afinitní purifikací. Jejich výhoda spočívá v nenáročné a levné produkci, nicméně mohou antigen rozeznávat s různou afinitou a aviditou. K imunizaci se může použít celý protein nebo pouze jeho část – peptid, který je navázán na proteinový nosič. Získané protilátky poté rozpoznávají na antigenu místo se sekvencí podaného peptidu. Takto získané protilátky se nazývají anti-peptidové.⁴⁴
- monoklonální: Tyto protilátky jsou produktem jednoho klonu plazmatické buňky, jsou stejného izotypu a rozeznávají stejný epitop. Normálně se v séru nevyskytují a poprvé byly zaznamenány u pacientů s mnohočetným myelomem.⁴⁵ Laboratorně se získávají z buněk tzv. hybridomů, které vzniknou po fúzi slezinného B lymfocytu a

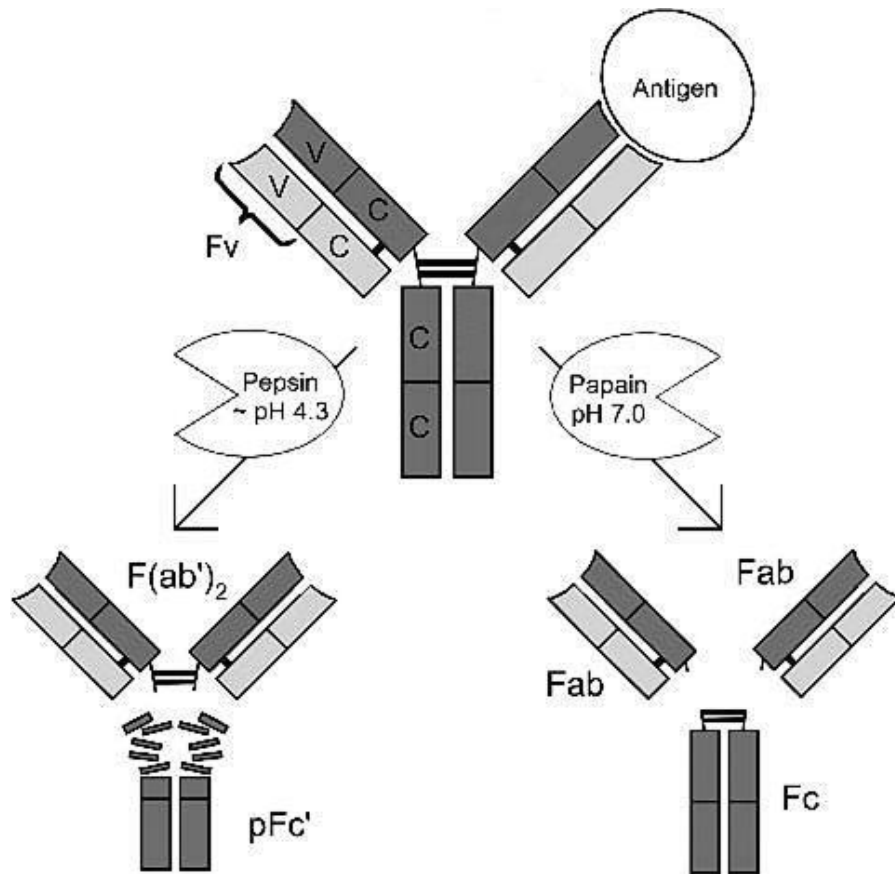
myelomovou buněčnou linií zajišťující imortilizaci. Tuto techniku poprvé popsali Köhler a Milstein, za což byli oceněni Nobelovou cenou v roce 1984.⁴⁶ Časově i finančně náročná produkce těchto protilátek je vyvážena sníženým rizikem zkřížených reakcí.

Dále se protilátky dají dělit podle druhu produkčního organismu, z něhož byly získány. K laboratorním účelům se nejčastěji používají savčí protilátky (zejména králičí, ovčí, kozí, myší, koňské), ale jako alternativa se začínají stále více využívat i slepičí protilátky, protože se jejich struktura a použití od savčí příliš neliší a purifikace je velmi jednoduchá a levná. U savců se imunoglobuliny získávají ze séra a méně často z kolostra. U ptáků se protilátky izolují ze žloutků snesených vajec, což je z etického pohledu přijatelnější možnost.

1.2.1 Struktura protilátek

Protilátky se dají schematicky znázornit jako tvar písmene Y a skládají se ze dvou identických těžkých řetězců (~50-75 kDa) a ze dvou identických lehkých řetězců (~25 kDa) spojených pomocí disulfidických můstků. Celková hmotnost protilátky se pohybuje v rozmezí 150-180 kDa. Řetězce se dále skládají z domén o 110-120 aminokyselinách poskládaných do tvaru β soudku. Těžké řetězce obsahují 4-5 těchto domén (podle izotypu protilátky) a lehké řetězce pouze 2 domény. Na N koncích všech řetězců se nachází variabilní doména (Fv), která je odpovědná za specifitu dané protilátky. Hypervariabilní smyčky na konci těžkého a lehkého řetězce dohromady tvoří tzv. "complementarity determining regions" (CDRs), kam se váže antigen. Pro každou protilátku pocházející z jedné plazmatické buňky je toto místo unikátní. Zbývající domény se nazývají konstantní a jejich struktura je shodná pro daný typ protilátky.⁴³

Pomocí enzymů lze protilátky kontrolovaně proteolyticky štěpit na různé fragmenty (viz Obrázek 3). Papain dokáže protilátku rozštěpit na dva identické fragmenty Fab, které každý váže po jedné molekule antigenu, a na fragment Fc, skládající se pouze z konstantních domén. Tento fragment má zejména efektorovou funkci, jelikož dokáže aktivovat komplement a váže se na povrchové receptory fagocytů a NK buněk (natural killers). Po štěpení pepsinem vzniká několik menších fragmentů z Fc, při čemž největší z nich se nazývá pFc'. Fragmenty Fab zůstávají spojené v jeden, který dokáže vázat dva antigeny.⁴⁵



Obrázek 3: Proteolytické štěpení protilátek (převzato z ⁴⁵)

1.2.2 Savčí protilátky

Savčí protilátky vyskytující se v séru se dají rozdělit podle typu těžkého řetězce, který se označuje malým řeckým písmenem - γ (IgG), α (IgA), μ (IgM), δ (IgD) a ϵ (IgE) (viz Obrázek 4).

Po prvním setkání s antigenem produkují plazmatické buňky nejprve pouze izotyp IgM, ze kterého následně alternativním sestřihem vznikají protilátky typu IgD. Podle mikroprostředí a druhu antigenu dochází k izotypovému přesmyku, kdy vznikají zbývající izotypy. Různé izotypy se neliší pouze typem těžkého řetězce, ale také vykazují odlišné vlastnosti – velikost, schopnost aktivovat komplement a vázat se na Fc receptory atd.⁴⁷ Jejich charakteristické rysy jsou stručně uvedeny v Tabulce 3.

Tabulka 3: Vlastnosti izotypů savčích protilátek (podle ^{43, 47})

Izotyp	Koncentrace v séru [%]	Lokalizace	Biologický poločas [dny]	Aktivace komplementu	Opsonizace	Přestup přes placentu	Další funkce
IgG1	75	sérum, intersticiální tekutina	21	++	+++	+	neutralizace toxinů a virů, sekundární odpověď
IgG2				+	+++		
IgG3				+++	+++		
IgG4				-	-		
IgA	15	sérum, slzy, sliny, povrch sliznic, mléko	6	-	-	-	ochrana sliznic
IgM	10	sérum, povrch B buněk	6	+++	+	-	primární odpověď, antigenně specifický receptor na B buňkách
IgD	<0,5	sérum, povrch B buněk	3	-	-	-	antigenně specifický receptor na B buňkách
IgE	<0,01	sérum, intersticiální tekutina	2	-	-	-	ochrana proti parazitům, alergie

IgG

Třída IgG je převládajícím izotypem v séru a má také nejdelší biologický poločas. Tato třída je dále dělena podle 4 různých těžkých řetězců, které byly číslovány podle zastoupení v séru zdravého jedince (IgG1 > IgG2 > IgG3 > IgG4). Tyto podtypy se také liší ve vlastnostech. Komplement nejlépe aktivuje IgG3 a IgG1, hůře IgG2 a IgG4 ho neaktivuje vůbec, který také jako jediný nepřispívá k opsonizaci. Různé podtypy IgG také reagují na různé druhy antigenů – IgG1 a IgG3 jsou indukovány po setkání s proteinovým antigenem, zatímco IgG2 a IgG4 reagují na polysacharidy.

IgA

Druhým nejzastoupenějším izotypem v séru je IgA, ale na mukózních površích je jeho koncentrace nejvyšší ze všech. Zde přímo neutralizuje toxiny nebo brání bakteriím a virům v navázání na sliznice. V séru se vyskytuje jako monomer, kdežto na sliznicích převládá jako dimer spojený polypeptidovým J-řetězcem pomocí disulfidických můstků. Dále se vyskytuje v mateřském mléku, kde tvoří až 50 % všech proteinů. Při kojení IgA z mateřského mléka osidluje trávicí trakt novorozence. IgA se může vyskytovat ve dvou podtypech IgA1 a IgA2 lišící se strukturou v pantové oblasti.

IgM

IgM je exprimován jako první při vývoji B lymfocytů a naivní B buňky mají na povrchu monomerní podobu IgM fungující jako antigeně specifický receptor. V séru se však vyskytuje jako pentamer, kdy jsou C_H4 domény spojeny disulfidickými můstky a dvě domény jsou spojeny J-řetězcem. Jako přirozené protilátky mají nízkou afinitu, ale díky své pentamerní podobě mají vysokou aviditu.

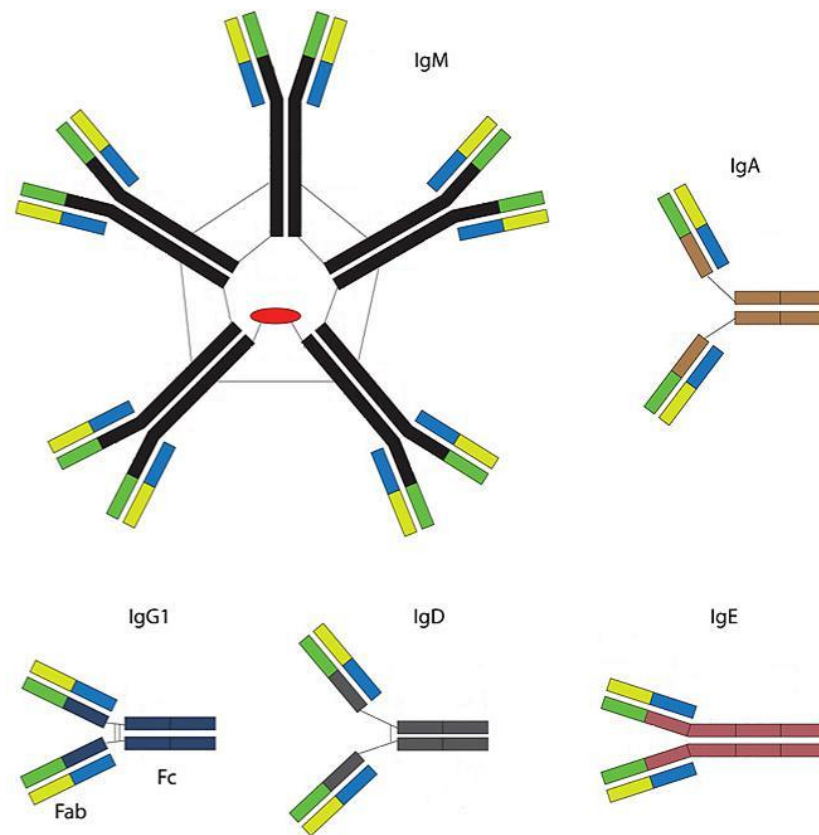
IgD

IgD se v séru vyskytuje minoritně a má krátký biologický poločas, jelikož v pantové oblasti je citlivý k proteolýze. Jeho funkce je zatím nejasná, protože se neúčastní žádného důležitého efektorového imunitního mechanismu.

IgE

Ačkoli IgE je v séru zastoupen nejméně, hraje důležitou roli v obraně proti mnohobuněčným parazitům. Také je hlavní příčinou alergií. Po rozpoznání alergenu,

se komplex antigen-IgE váže na Fc receptor žírných buněk, čímž spustí jejich degranulaci a vylití biologicky aktivních mediátorů (histamin, serotonin).



Obrázek 4: Izotypy savčích protilátek (převzato z ⁴⁵). Pentamer IgM je spojen pomocí J-řetězce.

1.2.3 Slepičí protilátky

Ve slepičím séru byly prokázány tři izotypy protilátek – IgA, IgM a IgY. Molekulové hmotnosti, morfologie i elektroforetické mobility jsou podobné jak pro slepičí tak pro savčí IgA a IgM.⁴⁸ Tyto dvě třídy se vyskytují ve vaječném bílku, zatímco IgY se nachází ve žloutku.

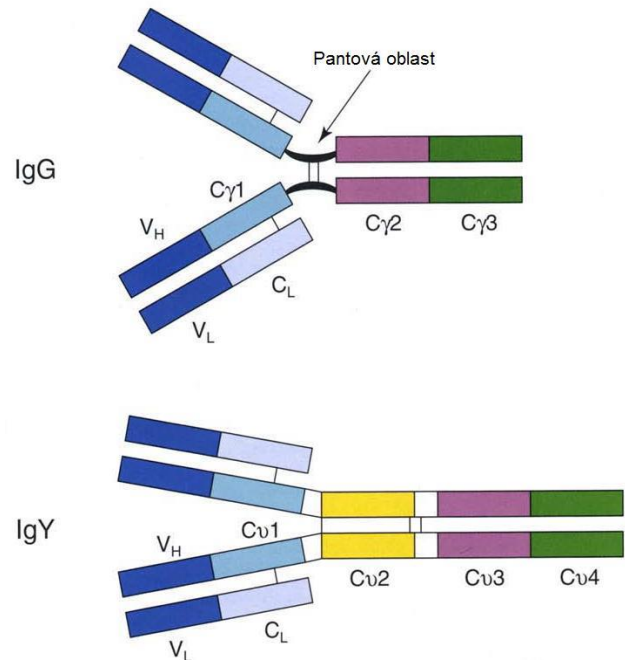
U ptáků obecně je IgY majoritní třída, která je funkcí podobná savčí IgG. Dříve se dokonce i stejně označovala, dokud mezi nimi nebyly objeveny značné rozdíly. Bylo proto zavedeno nové označení IgY podle ang. yolk = žloutek.⁴⁹

U savců procházejí protilátky přes placentu do plodu, zatímco u ptáků dochází k transportu imunoglobulinů do vejce, aby následně chránily vylíhnuté kuře. Zraní vajec u dospělé slepice (150 dní stará) začíná ve vaječníku, který obsahuje velké množství oocytů. Z nich se postupně stávají folikuly, jež jsou bohatě cévně zásobeny. Skrz tyto žíly jsou do folikulu přiváděny z jater složky budoucího žloutku vzniklé během metabolismu potravy.

Z krevního oběhu jsou také vychytávány protilátky IgY pomocí specifických receptorů na zrajícím oocytu. Poté pokračuje folikul do vejcovodu, kde dochází k tvorbě vaječného bílku, kam jsou také transportovány IgM a IgA, a nakonec se z vápníku utvoří skořápka.⁵⁰

Struktura IgY

Jediná protilátka vaječného žloutku IgY má na rozdíl od IgG (~150 kDa) molekulovou hmotnost přibližně 180 kDa a její těžký řetězec obsahuje 4 konstantní domény v porovnání se 3 doménami u IgG (Obrázek 5). Při srovnání s IgG byla zjištěna podobnost mezi savčími doménami C γ 2 a C γ 3 a slepičími C ν 3 a C ν 4, což vedlo k teorii, že se u savců z chybějící domény vyvinula tzv. pantová oblast, která poskytuje Fab fragmentu značnou pohyblivost.⁵¹



Obrázek 5: Struktura IgG a IgY (převzato z⁵¹). V-variabilní doména; C-konstantní doména; L-lehký řetězec; H-těžký řetězec; γ -řetězec gama; ν -řetězec ypsilon

Výhody slepičích protilátek

Obecně platí, že imunitní odpověď organismu je vyšší na antigen, který je fylogeneticky vzdálenější. Proto slepice produkuje více protilátek na savčí antigen než savci⁴⁸ a dokonce i na vysoce konzervované savčí proteiny.⁵² Vzhledem k evolučním rozdílům slepičí protilátky rozpoznávají jiné a dokonce více epitopů, což vede k amplifikaci signálu. K úspěšné imunizaci slepic většinou postačí menší množství antigenu (0,1-1,0 μ g proteinu)⁵³ a odpadá nutnost opakované imunizace.⁵⁴

Další nesporná výhoda slepičích protilátek spočívá v jejich izolaci. Ačkoli by se daly protilátky získávat i ze séra slepic, koncentrace IgY ve žloutku je 1,3-1,9 \times vyšší. Sběr vajec je neinvazivní metoda, zatímco časté odběry krve u savců pro přípravu protilátek jsou pro zvířata velmi stresující. Také metody purifikace IgY z vejce jsou nenáročné a jednoduché, protože žloutek obsahuje pouze jeden druh protilátek. Bylo popsáno mnoho postupů izolace IgY, které většinou sestávají z precipitačních a centrifugačních kroků.⁵⁵

Ačkoli 1 ml králíčího séra obsahuje 35 mg IgG a v 1 g žloutku je pouze 10 mg IgY, je tento nedostatek vyvážen délkou produkce. Slepice ročně snese přibližně 250 vajec, což činí 4 000 g žloutku, zatímco objem séra jednoho králíka činí 40 ml. To znamená, že za rok jedna slepice vyprodukuje 40 g IgY ale králík pouze 1,4 g IgG. Jinými slovy za rok je produkce slepičích protilátek až 30× výnosnější než produkce králíčích protilátek.⁵⁶

Další výhody použití IgY souvisí s imunologickými stanoveními. Při klinických testech se nejčastěji jako vzorek používá lidské sérum, které může obsahovat interferující endogenní komponenty vedoucí k chybným výsledkům. Je velmi obtížné tyto složky eliminovat, neboť složení séra se liší pacient od pacienta a i u stejné osoby je složení séra proměnné. Čerstvě získané sérum obsahuje aktivní komplementový systém. Během imunologických stanovení dochází k tvorbě komplexů antigen-IgG, které mohou spouštět komplementovou kaskádu. Výsledkem je navázání komplementu na imunokomplex, což brání v další interakci antigenu s protilátkou. Další problém nastává, pokud je savčí protilátka navázána na pevnou fázi (např. dno mikrotitrační destičky). V tomto případě se může komplement vázat na protilátku místo antigenu a vyvolat falešně pozitivní odpověď. Vzhledem k odlišné struktuře slepičí protilátka neaktivuje komplement, a tudíž nemůže dojít k interferenci.⁵⁷ Falešně pozitivní výsledky se objevují i u pacientů s revmatickou artritidou. Při tomto autoimunitním onemocnění se tvoří protilátky, které reagují s Fc částmi savčích IgG. Tyto autoprottilátky se obecně nazývají revmatoidní faktor a mohou se vyskytovat i u jiných onemocnění nebo dokonce u zdravých jedinců. Pokud se tedy provádí imunologické vyšetření "sandwichového" typu s primární i sekundární savčí protilátkou, dochází k jejich propojení pomocí revmatoidního faktoru a nikoli přes antigen. Slepíčí protilátka má ovšem odlišné složení Fc fragmentu, a proto nemůže dojít k takovým falešně pozitivním výsledkům.⁵⁸ V dalších vyšetřeních se využívají i jiné vzorky než sérum např. krev nebo tkáň, které mohou obsahovat lidské protilátky. V tomto případě může docházet ke křížové reaktivitě s použitými savčími protilátkami. Sekundární IgG pak může rozpoznávat protilátku ze vzorku místo primární nebo reagovat s hovězí IgG z roztoku hovězího sérového albuminu, který se často používá jako blokovací roztok. Jelikož je slepičí protilátka značně odlišná od savčí, není pozorována žádná křížová reaktivita tohoto typu.⁴⁸

Další rozdíl mezi slepičí IgY a savčí IgG spočívá v interakci s bakteriálním proteinem A a G. Protein A se nachází na povrchu *Staphylococcus aureus* a protein G na *Streptococcus sp.*, kde nejspíše mají protektivní roli pro bakterie. Tyto proteiny totiž váží Fc oblast IgG, čímž zabraňují opsonizaci i následné fagocytóze. Této vlastnosti se využívá i v laboratořích

při purifikaci IgG. Na druhou stranu IgY s proteinem A ani G nereaguje, ale lze jich tedy využít při různých detekcích bakteriálních proteinů, kdy za použití IgG může docházet k falešně pozitivním výsledkům.^{59, 60}

Jako možná nevýhoda žloutkových protilátek se jeví fakt, že ptáci jsou schopni vytvářet protilátky i na potravní antigeny. Jelikož jsou slepice v chovech nejčastěji krmeny hovězí masokostní moučkou, jež obsahuje keratin, vznikají proti tomuto proteinu i dalším obsaženým složkám moučky protilátky, které mohou interferovat při imunologických stanoveních. Nicméně jsou k odstranění tohoto nedostatku již vypracovány vhodné metody.^{61, 62, 63}

2 Cíl práce

Cílem diplomové práce bylo připravit a charakterizovat slepičí protilátky rozeznávající CYP2S1 a CYP2W1. Za tímto účelem bylo nutné vybrat vhodný antigen k imunizaci slepic, izolovat vaječné protilátky, separovat specifické protilátky a dokázat jejich specifitu pomocí imunologických metod.

Dalším cílem bylo zjistit přítomnost daných forem cytochromu P450 v různých buněčných liniích a dalších biologických vzorcích.

3 Materiál a metody

3.1 Použitý materiál

Fluka, Švýcarsko

2-merkптоethanol; akrylamid; BIS (N,N'-methylenbisakrylamid); EDC (1-ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl]karbodiimid-hydrochlorid); dioxan; maleinanhydrid; pNPP (hexahydrát 4-nitrofenylfosfátu disodného); SDS (dodecylsírán sodný); Tris (tris(hydroxymethyl)aminomethan)

Lach-Ner, Česká republika

APS (persírán amonný); bromfenolová modř; EDTA (kyselina ethylendiamintetraoctová) glycerol; HCl; KH₂PO₄; kyselina octová; L-cystein·HCl; MgCl₂; NaCl; Na₂CO₃; NaHCO₃; NaH₂PO₄·2H₂O; Na₂HPO₄·12H₂O

Merck Millipore, USA

PVDF Immobilon-P Membrane

Penta, Česká republika

azid sodný (NaN₃); ethanol, glycin; methanol; NaOH

PML Protein.Mléko.Laktóza, Česká republika

Laktino sušené mléko odtučněné

Roche, Švýcarsko

cOmplete ULTRA Tablets; PhosSTOP Phosphatase Inhibitor Cocktail Tablets

SERVA, Německo

Coomassie Brilliant Blue R 250; dialyzační střeva; TEMED (N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin); Triton X-100; Tween 20

Sigma-Aldrich, USA

anti-slepičí IgG konjugovaná s alkalickou fosfatase; BCIP/NBT (5-bromo-4-chloro-3-indolyl fosfát/nitro-blue tetrazolium tablety); DEA (diethylamin); deoxycholát sodný;

guanidin-HCl; MES (2-(N-morfolino)ethansulfonová kyselina); Sepharosa 4B aktivovaná CNBr; Tris·HCl

Thermo Fisher Scientific, USA

Inject Maleimide-Activated Mariculture KLH (keyhol limpet hemocyanin); KLH; Microplate BCA Protein Assay Kit – Reducing Agent Compatible; mikrotitrační destička F16 MaxiSorp NUNC-IMMUNO MODULE; SulfoLink Coupling Resin; standardy molekulových hmotností PageRuler Unstained Broad Range Protein Ladder a Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder

3.2 Použité přístroje

Analytické váhy

Discovery, Ohaus, USA

Automatické pipety

Nichipet EX, Nichiryo, Japonsko

Proline, Biohit, Finsko

Centrifugy

Centrifuge 5415R, Eppendorf, Německo

Centrifuge 5418, Eppendorf, Německo

Centrifuga K70D, MLW, Německo

Úpravna vody

Simplicity 158, Merck Millipore, USA

Fotometr mikrotitračních destiček

Sunrise, Tecan, Švýcarsko

Elektrický zdroj

EPS 301 Power Supply, Amersham Biosciences, USA

Elektroforetická aparatura

MiniVE Vertical Electrophoresis System, Amersham Biosciences, USA

Injekční mikrostříkačka

MICROLITER Syringe 702RN, Hamilton, Švýcarsko

Inkubátor

IR 1500 Automatic CO₂ Incubator, Flow Laboratories, Velká Británie

Magnetická míchačka

KMO 2 basic IKAMAG, IKA, Německo

"End-over-end" míchačka

Reax 2, Heidolph, Německo

Opakovací dávkovač

Multipette, Eppendorf, Německo

pHmetr

HI 2211, HANNA instruments, USA

Předvážky

Kern EW 600-2M, Kern&Sohn, Německo

Sonikátor

Elmasonic E30H, Elma, Německo

Spektrofotometr

Agilent 8453 Diode Array Spectrophotometer, Hewlett-Packard, USA

Vícekanálová pipeta

Proline, Biohit, Finsko

Vortex

MSI minishaker, IKA, Německo

"Western blot" aparatura

Fastblot B43, Biometra, Německo

3.3 Metody

3.3.1 Výběr peptidu

Jelikož jsou cytochromy P450 2S1 a 2W1 velmi těžko dostupné a obtížně izolovatelné ve formě vhodné k imunizaci, bylo nutné připravit k produkci specifických protilátek peptidové antigeny. Při jejich přípravě postačuje znát primární strukturu proteinu, ze které se následně vybere krátká sekvence aminokyselin, která po vazbě na vysokomolekulární proteinový nosič slouží k imunizaci. Podle literatury byly zvoleny tyto sekvence:

- CYP2S1a: KQVRPTDLHSTTQTR³⁴
- CYP2W1a: TMRPRAQALC³⁹

Dále byla pomocí dostupných modelovacích programů (<http://www.uniprot.org/>, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>, <http://web.expasy.org/protscale/>) vybrána sekvence cca 13 aminokyselin z C konce proteinů cytochromu P450 2S1 a 2W1. Vybraná sekvence by se měla nacházet na povrchu enzymů, neobsahovat uspořádanou sekundární strukturu, být unikátní pro daný protein a mít vhodné antigenní vlastnosti. Podle predikčních programů byly vybrány tyto sekvence:

- CYP2S1b: CPPDTLSLKPTVS
- CYP2W1b: CPGVSPASLDTTP

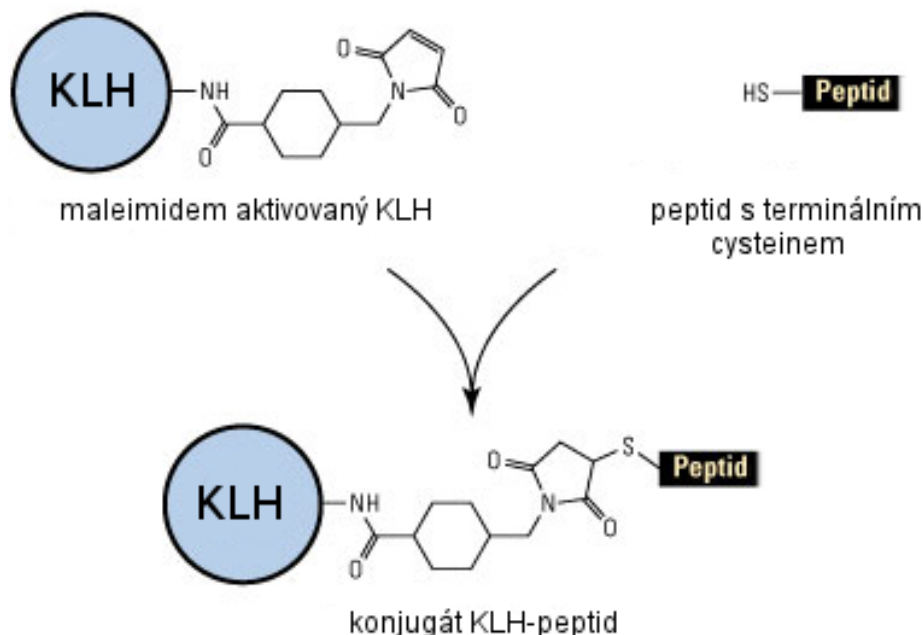
Podle vybraných sekvencí byly připraveny syntetické peptidy (biotechnologickou firmou VIDIA, ČR).

3.3.2 Příprava imunogenu

Protože uvedené peptidy jsou nedostatečně velké (nízká relativní hmotnost), aby vyvolaly imunitní odpověď, je potřeba je navázat na proteinový nosič - KLH (keyhol limpet hemocyanin). Pokud peptid obsahoval na jednom konci aminokyselinu cystein (CYP2S1a, CYP2S1b, CYP2W1b), probíhala konjugace adicí za vzniku thioetherové vazby. Nicméně jeden peptid cystein neobsahoval (CYP2S1a), proto byl KLH nejprve modifikován pomocí maleinanhidridu a poté na něj byl vázán peptid přes amino skupinu kondenzační reakcí za vzniku amidové vazby.

Konjugace KLH a peptidu přes thiolovou skupinu cysteinu

Nejvíce reaktivní aminokyselinou vyskytující se v proteinech je cystein, který obsahuje thiolovou skupinu –SH. Kromě jiných reakcí je tato skupina schopná tvořit thioesterovou vazbu s maleimidem, kdy dochází k adici na dvojnou vazbu (Obrázek 6).⁶⁴



Obrázek 6: Konjugace KLH a peptidu přes thiolovou skupinu (upraveno z ⁶⁵)

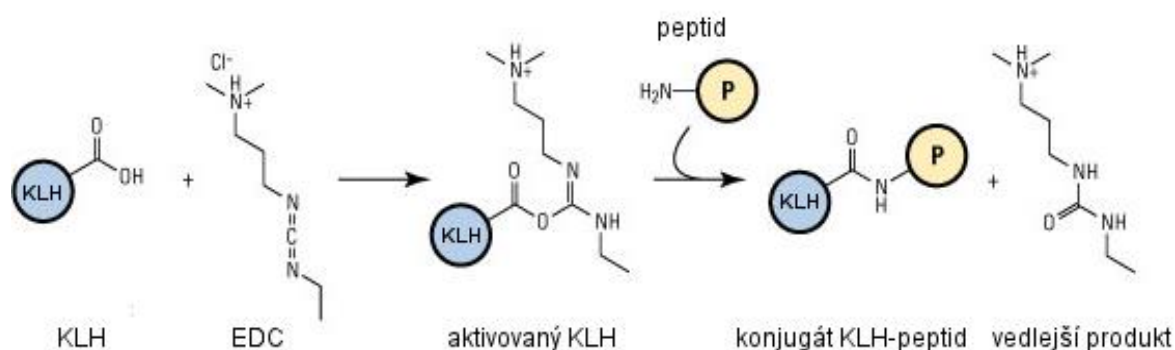
Jako proteinový nosič byl zvolen maleimidem aktivovaný KLH (mKLH), který vznikl modifikací KLH pomocí sulfo-SMCC (sulfosukcinimidyl-4-(N-maleimidomethyl)cyklohexan-1-karboxylát). Vzniklé maleimidové skupiny jsou následně schopné vázat thiolové skupiny peptidu.

Byl připraven roztok Imject Maleimide Activated Mariculture KLH v destilované vodě o koncentraci 10 mg/ml a roztok daného peptidu v konjugačním pufru (0,1M NaH₂PO₄; 0,15M NaCl; pH 7,2) o téže koncentraci. Oba roztoky byly smíseny v ekvivalentním množství (250 µl roztoku peptidu + 250 µl roztoku mKLH) a vzniklý roztok byl poté míchán dvě hodiny při laboratorní teplotě, během nichž vznikal konjugát KLH a daného peptidu.

Vazba peptidu na modifikovaný KLH karbodiimidovou kondenzací

Jelikož jeden peptid neobsahoval thiolovou skupinu, musela konjugace proběhnout přes jeho terminální aminovou skupinu a přes karboxylovou skupinu proteinového nosiče

KLH. Jak je patrné z Obrázku 7, dají se tyto dvě reaktivní skupiny propojit pomocí činidla EDC (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimid·hydrochlorid).⁶⁶



Obrázek 7: Konjugace KLH a peptidu pomocí EDC (upraveno z ⁶⁵)

Aby při aktivaci KLH činidlem EDC nedošlo k jeho agregaci v důsledku reakce aminových a karboxylových skupin, byly nejprve aminové skupiny reverzibilně modifikovány pomocí maleinanhydridu.^{67,68}

Nejprve byl připraven roztok KLH v uhličitánovém pufru (0,05M NaHCO₃; pH 9,5) o koncentraci 1 mg/ml. Na ledu bylo k 10 ml tohoto roztoku po kapkách přidáno 1,5 ml 1M maleinanhydridu v dioxanu a pH bylo upraveno na hodnotu 9. Po pětiminutové inkubaci na ledu následovala dialýza přes noc oproti 10 litrům 0,15M NaCl při 4°C.

Následovalo navázání peptidu na modifikovaný KLH. 10 mg EDC bylo rozpuštěno v 1 ml deionizované vody a následně bylo přidáno 125 µl tohoto roztoku EDC ke 2 ml modifikovaného KLH. Po pětiminutové inkubaci při laboratorní teplotě bylo přidáno 500 µl roztoku peptidu CYP2S1a v konjugačním pufru (0,1 M MES (2-(N-morfolino)ethansulfonová kyselina); pH 4,5-5,0) o koncentraci 4 mg/ml. Posledním krokem bylo dvouhodinové míchání při laboratorní teplotě, při níž vznikl konjugát KLH-peptid.

3.3.3 Imunizace slepic

Slepice nosného plemene Leghorn byly chovány v oddělených klecích za řízeného světelného režimu se stálým přístupem k vodě. Před první imunizační dávkou bylo nasbíráno několik vajec od každé slepice. Následně získané protilátky z těchto vajec sloužily jako negativní kontroly při dalších experimentech. Poté proběhla imunizace ve třech dávkách, kdy v týdenních odstupech bylo podáno intramuskulárně 100 µg konjugátu KLH s daným peptidem pro prvou dávku v kompletním Freundovu adjuvans a pro další dávky

v adjuvants nekompletním. Po imunizace následoval sběr vajec, které byly uchovávány při 4°C, dokud nebyly použity k izolaci protilátek.

3.3.4 Izolace protilátek

Protilátky vaječného žloutku se dají izolovat několika způsoby. Nejčastěji tyto postupy zahrnují precipitaci pomocí síranu amonného,⁶⁹ dextranu⁷⁰ nebo polyethylenglykolu.⁷¹ Také se využívá separace za využití ionexové chromatografie.⁷² Z velkého spektra postupů byla vybrána dvou kroková procedura zahrnující extrakci vodovodní vodou a precipitaci pomocí NaCl. Touto metodou se získá vysoce purifikovaná frakce imunoglobulinu Y (až 97 %).⁷³

Pro purifikaci kontrolních frakcí IgY bylo použito několik vajec, které byly ihned po sběru rozbity a žloutky byly naředěny do PBS s azidem sodným (13,4mM NaCl; 1,8mM Na₂HPO₄; 1mM NaH₂PO₄; 0,1% (w/v) NaN₃; pH 7,2) v poměru 1:1 a následně byly tyto suspenze 4× ředěny vodovodní vodou. Pro izolaci specifických protilátek bylo použito 8 vajec sbíraných minimálně týden po poslední dávce imunizace. Po oddělení bílků byly žloutky důkladně omyty pod proudem vody a 8× naředěny vodovodní vodou. Po řádném promíchání bylo u kontrolních i specifických frakcí upraveno pH na hodnotu 5 a suspenze naředěných žloutků byly zmrazeny při teplotě -20°C. V průběhu rozmrazování při laboratorní teplotě na filtračním papíře docházelo současně k oddělení vodorozpustné frakce od lipidního podílu žloutků. K filtrátu bylo podle objemu přidáno takové množství NaCl, aby jeho výsledná koncentrace byla 8,76 % (w/v), a pH bylo upraveno na hodnotu 4. Precipitace probíhala po dobu 30 minut za stálého míchání a poté 1,5 hodiny při laboratorní teplotě. Posledním krokem byla centrifugace (Janetzki K70) při 2 700×g 20 minut při teplotě 4°C. Vzniklá peleta (protilátková frakce IgY) byla resuspendována v PBS s azidem sodným. Roztoky protilátek byly skladovány při 4°C. Případný zákal byl oddělen pětiminutovou centrifugací při 14 500×g (The Centrifuge 5418, Eppendorf).

Koncentrace proteinů byla stanovena pomocí měření absorbance při 280 nm.⁷⁴ Jako srovnávací vzorek byl použit pufr PBS s 0,1% azidem sodným. Pro výpočet koncentrace proteinů v protilátkové frakci IgY byl použit empirický faktor podle následujícího vzorce:

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

c	koncentrace [mg/ml]
A ₂₈₀	absorbance při 280 nm
f	empirický faktor = 1,094
n	ředění protilátky

3.3.5 ELISA

K ověření specifity získaných protilátek byla použita metoda ELISA (z ang. Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay). Nejprve se na dno jamky mikrotitrační destičky adsorbuje antigen. Poté následuje inkubace se stanovovanou primární protilátkou, na kterou se váže sekundární protilátka značená enzymem (nejčastěji křenovou peroxidasou nebo alkalickou fosfatasou). Po přidání chromogenního substrátu vzniká barevný produkt, jehož koncentrace se dá měřit spektrofotometricky a je úměrná množství navázané primární protilátky.⁷⁵

Imobilizační pufr: 15mM Na₂CO₃; 35mM NaHCO₃; pH 9,6

Promývací roztok (PBS s 0,1% TWEEN 20): 13,4mM NaCl; 1,8mM Na₂HPO₄; 1mM NaH₂PO₄; 0,1%(v/v) TWEEN 20; pH 7,2

Blokovací roztok: 2% (w/v) roztok bílku v PBS s 0,1% TWEEN 20

PBS: 13,4mM NaCl; 1,8mM Na₂HPO₄; 1mM NaH₂PO₄; pH 7,2

Vyvolávací roztok: 1 mg/ml pNPP (4-nitrofenylfosfátu disodného); 0,02M Na₂CO₃; 0,03M NaHCO₃; 1mM MgCl₂

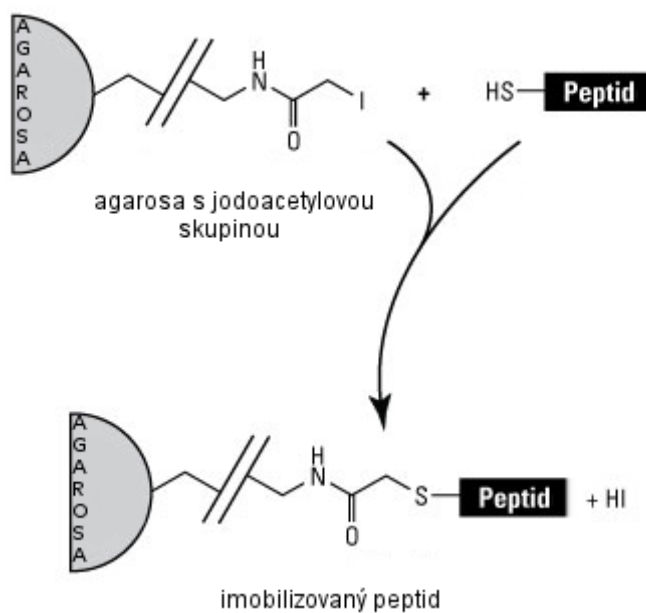
Všechny vzorky byly měřeny v paralelním uspořádání. První krok spočíval v navázání antigenu na dno jamek mikrotitrační destičky F16 MaxiSorp NUNC-IMMUNO MODULE. Byl připraven roztok peptidu v imobilizačním pufru o koncentraci 4 µg/ml a na jamku bylo aplikováno po 100 µl tohoto roztoku. Destička byla ponechána při 4°C přes noc. Následující den byl nenavázaný antigen odsát a každá jamka byla třikrát promyta 200 µl promývacího roztoku. Blokování probíhalo za použití 100 µl 2% roztoku bílku v PBS s 0,1% TWEEN 20 na jednu jamku při 37°C po dobu 1 hodiny. Jamky byly opět promyty a poté bylo nanášeno 100 µl slepičí protilátky v různých koncentracích. Inkubace s primární protilátkou probíhala při 37°C 2 hodiny. Po trojnásobném promytí následovalo nanášení sekundární protilátky - králičí protilátka rozpoznávající IgY značená alkalickou fosfatasou. Na jamku bylo aplikováno 100 µl sekundární protilátky v PBS ředěné 1:1 400 a provedena inkubace při 37°C 1 hodinu. Po důkladném promytí bylo aplikováno 100 µl vyvolávacího roztoku obsahující para-nitrofenylfosfát, který alkalická fosfatasa katalyzuje na žlutý paranitrofenol. Reakce byla zastavena po 10 minutách 100 µl 3M NaOH. Absorbance vzniklého produktu reakce byla měřena na fotometru Sunrise (Tecan).

3.3.6 Afinitní purifikace IgY

Izolované protilátky IgY z vaječného žloutku vykazovaly křížovou reaktivitu i s celou řadou dalších epitopů kromě peptidu. Pro izolaci specifických protilátek byla použita afinitní chromatografie. Podle toho, zda peptid obsahoval terminální cystein či nikoli, bylo nutné využít odlišné přístupy pro jeho zakotvení na nosič. Ke sledování průběhu purifikace IgY byla použita metoda ELISA.

Afinitní chromatografie na sorbentu s peptidem vázaným přes thiolovou skupinu cysteinu

Pro přípravu afinitního sorbentu s peptidem s merkaptoskupinou byl využit gel SulfoLink Coupling Resin, což je zesíťovaná agarosa nesoucí na raménku navázanou jodoacetylovou skupinou. Ta umožňuje vazbu peptidu na kolonu za vzniku thioetherové vazby (Obrázek 8).⁷⁶



Obrázek 8: Imobilizace peptidu obsahující cystein na agarosu s jodoacetylovanými skupinami (upraveno z⁶⁵)

Příprava afinitního sorbentu

Imobilizační pufr: 0,05M Tris; 0,005M EDTA; pH 8,5

Promývací pufr: 1M NaCl

Blokovací pufr: 0,05M L-cystein·HCl v imobilizačním pufru

Uchovávací pufr: PBS s 0,1% (w/v) NaN₃; pH 7,2

Do polypropylenové kolonky byly vneseny 4 ml roztoku SulfoLink Coupling Resin, což odpovídá přibližně 2 ml sedimentovaného gelu. Kolona byla promyta 8 ml imobilizačního pufru a poté byly nanесeny 2 ml roztoku peptidu v imobilizačním pufru o koncentraci 0,5 mg/ml. Gel s roztokem peptidu byl 15 minut míchán na "end-over-end" míchačce a poté byl inkubován při laboratorní teplotě po dobu 30 minut. Nenavázaný peptid byl odstraněn z kolony, která poté byla promyta 8 ml imobilizačního pufru. Následovalo blokování nezreagovaných jodoacetylových skupin roztokem L-cysteinu·HCl v imobilizačním pufru, kdy prvních 15 minut byl obsah kolony míchán za stejných předešlých podmínek a dalších 30 minut byl ponechán při laboratorní teplotě. Po uplynutí dané doby byl roztok oddělen a kolona byla promyta postupně 16 ml promývacího pufru a 6 ml uchovávacího pufru. Takto připravený gel s 2 ml uchovávacího pufru byl skladován při 4°C.

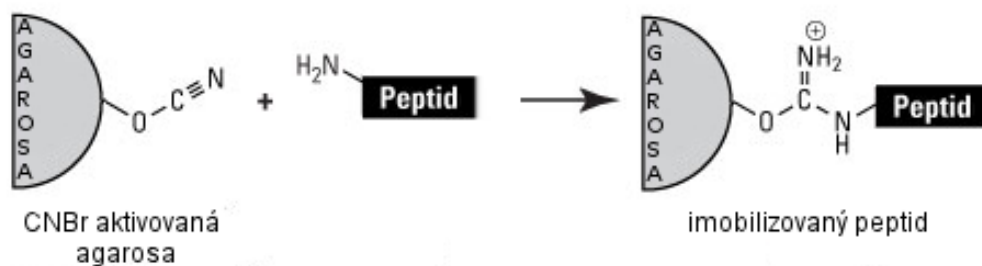
Izolace antipeptidové protilátky

Afinitní sorbent v kolonce ekvilibrován na laboratorní teplotu byl promyt postupně 6 ml 50mM diethylaminem (DEA) o pH 11,5; 6 ml 100mM KH₂PO₄ o pH 7,2 a 6 ml PBS. Poté bylo aplikováno po 15 ml roztoku příslušné IgY a provedena inkubace přes noc při 4°C za stálého míchání. Následující den byl nenavázaný IgY oddělen a kolona důkladně promývána PBS, dokud absorbance při 280 nm neklesla pod hodnotu 0,01. Následně bylo nanесeno 10 ml 1M roztoku NaCl v PBS a byly jímány frakce po 1 ml a sledována absorbance při 280 nm. Tento roztok o vysoké iontové síle eluoval slabě navázané protilátky.

Kolona byla poté promyta 25 ml PBS a specifická protilátka byla uvolněna pomocí 50mM DEA o pH 11,5. Byly jímány frakce po 1 ml a okamžitě neutralizovány 200 µl 1M KH₂PO₄ o pH 6,7. Frakce s největším podílem IgY byly přes noc dialyzovány proti 10 litrům PBS s 0,1% NaN₃ při 4°C. Kolona byla promyta PBS do neutrálního pH a postupně po 6 ml 4M guanidinem/HCl o pH 7,0; 6 ml 100mM KH₂PO₄ o pH 7,2 a 10 ml PBS. Gel s 2 ml uchovávacího pufru byl skladován při 4°C.

Afinitní chromatografie na sorbentu s peptidem vázaným přes amino skupinu

Pro konjugaci peptidu, který neobsahoval thiolovou skupinu, na kolonu, byl použit nosič (agarosa) aktivovaný bromkyanem, umožňující vázat peptidy i proteiny přes amino skupinu (Obrázek 9).⁷⁷



Obrázek 9: : Imobilizace peptidu na agarosu aktivovanou CNBr (upraveno z⁶⁵)

Příprava kolony

Imobilizační pufr: 0,1M NaHCO₃; 0,5M NaCl; pH 8,4

Blokovací pufr: 0,2M glycin; pH 8,0

Uchovávací pufr: PBS s 0,1% (w/v) NaN₃; pH 7,2

K naváženému množství (1 g) Sepharosy 4B aktivované bromkyanem bylo přidáváno během 2 hodin postupně po 5 ml 200 ml 1mM HCl. Sepharosa byla pak promyta 30 ml destilované vody a 5 ml imobilizačního pufru. Poté byl ihned gel v kolonce smísen s roztokem peptidu, který vznikl rozpuštěním 2,25 mg peptidu ve 3 ml imobilizačního pufru, a za stálého míchání inkubován při 4°C přes noc. Následující den byl roztok peptidu odstraněn a kolona byla promyta 8 ml imobilizačního pufru. Potom byly aplikovány 4 ml blokovacího pufru a kolona byla ponechána při laboratorní teplotě 2 hodiny za stálého míchání. Po uplynutí dané doby byl připravený sorbent promyt postupně 4 ml destilované vody, 10 ml 50mM DEA o pH 11,5, 10 ml 100mM KH₂PO₄ o pH 7,2 a 10 ml PBS.

Izolace antipeptidové protilátky

Na připravenou kolonu bylo naneseno 15 ml příslušné protilátky. Navázání protilátky na kolonu probíhalo za stálého míchání při 4°C přes noc. Další den byla nenavázaná protilátka oddělena a kolona promývána PBS a měřena absorbance eluátu při 280 nm. Promývání bylo ukončeno, když absorbance klesla pod hodnotu 0,01. Poté bylo na kolonu aplikováno 10 ml PBS s 1M NaCl a byly jímány frakce po 1 ml, u kterých byla změřena absorbance při 280 nm. Po promytí Sepharosy 25 ml PBS bylo na kolonu naneseno 50mM DEA o pH 11,5 pro uvolnění IgY z kolony. Frakce byly jímány po 1 ml do mikrozkušavek, které již obsahovaly 200 µl 1M KH₂PO₄ o pH 6,7 za účelem neutralizace. Následně byly spojeny frakce s největším obsahem proteinů a dialyzovány při 4°C přes noc proti 10 litrům PBS s 0,1% azidem sodným. Regenerace kolony byla provedena promytím 9 ml 4M

guanidinem/HCl o pH 7,0; 9 ml 100mM KH₂PO₄ o pH 7,2 a 15 ml PBS. Kolona byla uchovávána pro další použití s 3 ml PBS s 0,1% NaN₃ při 4°C.

3.3.7 Buněčné kultury

Po přípravě specifických protilátek bylo nutné potvrdit jejich schopnost imunodetekce cytochromů P450. Za tímto účelem byly vybrány buněčné linie, který potencionálně exprimují CYP2S1 a 2W1.

- MCF-7: lidské buňky rakoviny prsu; exprese CYP2W1⁷⁸ (poskytnuto Mgr. Kamilou Burdovou, Ústav molekulární genetiky AV ČR)
- A549: lidské epitelální buňky adenokarcinomu; exprese CYP2S1³⁶ (poskytnuto Bc. Libuší Noskovou, Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze)
- MT-3: lidské buňky kolorektální rakoviny, exprese CYP2S1 s vysokou hladinou mRNA cytochromu P450 2S1 (poskytnuto RNDr. Pavlem Součkem, CSc., Státní zdravotní ústav)
- MRC-5: lidské plicní fibroblasty; bez exprese CYP2W1 a CYP2S1; negativní kontrola (poskytnuto Mgr. Kamilou Burdovou, Ústav molekulární genetiky AV ČR)

Buněčné kultury byly získány ve formě pelet po centrifugaci. Pro další práci z nich byly připraveny lyzáty.

RIPA pufr: 150mM NaCl; 5mM Tris; 1% (v/v) Triton X-100; 0,5% (w/v) deoxycholát sodný; 0,1% (w/v) SDS; pH 8,0; do 10 ml pufru bylo přidáno po jedné tabletě cOmplete ULTRA Tablets a PhosSTOP Phosphatase Inhibitor Cocktail Tablets

K peletě buněčných kultur bylo přidáno takové množství lyzačního média (*RIPA pufr*), které odpovídalo 60 μ l na 10⁶ buněk. Po řádném rozsuspendování byla směs ponechána 30 minut při teplotě 4°C za mírného třepání. Následovala centrifugace při 13 400×g při 4°C po dobu 20 minut. Získaný supernatant byl jako lyzát buněk uchováván při -80°C.

Dalším biologickým vzorkem pro imunodetekci CYP2S1 za využití připravených protilátek byl kmen *Escherichia coli* (XL-1 blue), který byl transformován plasmidem pCMV-SPORT6 pro rekombinantní expresi lidského CYP2S1 s pozměněnou sekvencí na N konci a histidinovou kotvou připojenou na C konec proteinu. Pelety *E. coli* s naměřenými hodnotami optické density při 600 nm byly poskytnuty Mgr. Ivetou Mrízovou z Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy.

3.3.8 Stanovení koncentrace proteinů

Ke stanovení koncentrace proteinů ve vzorcích buněčných lyzátů byla použita metoda využívající barevné změny komplexu kyseliny bicinchoninové (BCA) s ionty mědi. Proteiny jsou schopné v alkalickém prostředí redukovat Cu^{2+} na Cu^+ . Tato redukce je následně vizualizována BCA, která s Cu^+ ionty tvoří fialový komplex absorbující při 562 nm. Výsledná absorbance je přímo úměrná koncentraci proteinů.⁷⁹

Reagent A: Na_2CO_3 ; NaHCO_3 ; kyselina bicinchoninová; vínan sodný v 0,1M hydroxidu sodném

Reagent B: 4% síran měďnatý

Ke stanovení byl využit "Microplate BCA Protein Assay Kit – Reducing Agent Compatible", obsahující předpřipravené reagenty a standard-BSA (hovězí sérový albumin) o různých koncentracích. Na mikrotitrační destičku bylo v triplicátech nanášeno po 9 μl lyzačního média (srovnávací vzorek), vody, standardu o různých koncentracích a vhodně naředěného vzorku. Následně bylo do všech jamek přidáno po 260 μl reakčního činidla, které bylo připraveno smícháním reagentů A a B v poměru 50:1. Destička byla inkubována 30 minut při 37°C. Po vychladnutí byla měřena absorbance při 562 nm a pomocí programu KIM32 sestrojena kalibrační křivka, pomocí níž byla vypočtena koncentrace proteinů ve vzorcích.

3.3.9 SDS elektroforéza v polyakrylamidovém gelu

Elektroforéza se obecně používá k rozdělení makromolekul v závislosti na jejich velikosti a náboji. Probíhá v homogenním elektrickém poli v gelu, který může být tvořen agarosou (nejčastěji pro DNA/RNA analýzy) nebo polyakrylamidem (separace proteinů). Pokud je nutné proteiny rozdělit pouze na základě jejich velikosti, využívá se vlastnosti dodecylsíranu sodného (SDS), který udělí každé bílkovině stejně velký záporný náboj.⁸⁰

gel A: Pufir A: 0,375M Tris·HCl; 0,1% (w/v) SDS; pH 8,8

 Polymerační roztok A v pufiru A: 30% (w/v) akrylamid; 0,8% (w/v) BIS; pH 8,8

 TEMED

 100 mg/ml APS

gel B: Pufir B: 0,125M Tris·HCl; 0,1% (w/v) SDS; pH 6,8

 Polymerační roztok B v pufiru B: 30% (w/v) akrylamid; 0,8% (w/v) BIS; pH 6,8

 TEMED

100 mg/ml APS

Příprava gelů na 1 elektroforézu:

8% gel A: 5,5 ml pufru A; 2 ml polymeračního roztoku A; 7,5 μ l TEMED; 75 μ l APS

3% gel B: 2,7 ml pufru A; 300 μ l polymeračního roztoku A; 3 μ l TEMED; 60 μ l APS

Elektrodový pufr: 0,025M Tris·HCl; 0,195M glycin; 0,1% (w/v) SDS, pH 8,3

Vzorkový pufr redukující 4×koncentrovaný: 0,25M Tris /HCl; 8% (w/v) SDS; 40% (v/v) glycerol; 20% (v/v) 2-merkptoethanol; 0,003% (w/v) bromfenolová modř; pH 6,8

Barvicí lázeň: 0,25% (w/v) Coomassie brilliant blue R-250; 46% (v/v) ethanol; 9,2% (v/v) kyselina octová

Odbarvovací lázeň: 25% (v/v) ethanol; 10% (v/v) kyselina octová

Nejprve byla sestavena elektroforetická aparatura ze dvou skel (10×10,5 cm), mezi která byly na okraje vloženy "spacery". Po umístění skel do aparatury byl mezi ně aplikován roztok pro polymeraci 8% separačního gelu A do výšky cca 3 cm od horní okraje skla a poté byl roztok převrstven destilovanou vodou. Polymerace separačního gelu probíhala 45 minut při laboratorní teplotě, následně byla voda odstraněna a prostor mezi skly vysušen filtračním papírem. Na zpolymerovaný gel A byl nanesen roztok pro 3% zaostřovací gel B, do kterého byl vnořen hřeben s 10 zuby. Po 20 minutách byl zaostřovací gel zpolymerovaný, tudíž mohl být do komory přidán elektrodový pufr a hřeben vyjmut.

Do vzniklých jamek byly nanášeny vzorky (lyzáty buněk, buněčná suspenze) a standardy molekulových hmotností (Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder; PageRuler Unstained Broad Range Protein Ladder). Lyzáty buněčných linií nebyly ředěny a buněčná suspenze expresního systému *E. coli* byla naředěna tak, aby výsledná hodnota optické denzity byla 0,5 při 600 nm. Ke všem vzorkům byl přidán vzorkovací pufr v poměru 3:1 a ty byly následně umístěny na 5 minut do vroucí vodní lázně. Do jamek bylo nanášeno pod hladinu elektrodového pufru 25 μ l vzorků a 7 μ l standardu pomocí injekční mikrostříkačky. Elektroforéza probíhala při 90 V po dobu 30 minut, poté bylo napětí zvýšeno na hodnotu 160 V. Metoda byla ukončena, když čelo bromfenolové modři bylo cca 0,5 cm od spodního okraje skel.

Po rozebrání aparatury, byl gel jemně odstraněn od skel a umístěn na 45 minut do barvicí lázně, po níž následovala odbarvovací lázeň po dobu 3 hodin při laboratorní teplotě. Gel, jenž nebyl obarven, byl použit na "Western blot".

3.3.10 Western blot

Metoda "Western blot" slouží k elektropřenosu proteinů rozdělených pomocí předcházející gelové elektroforézy na nitrocelulosovou nebo polyvinylidifluoridovou (PVDF) membránu.⁸¹ Poté je membrána postupně inkubována s primární protilátkou specifickou pro studovaný protein a sekundární protilátkou značenou enzymem (nejčastěji křenuvou peroxidasou nebo alkalickou fosfatasou). Po inkubaci se substrátem vzniká na membráně zóna odpovídající proteinu, který byl rozpoznán primární protilátkou.

Přenosový pufr: 0,025M Tris; 0,192M glycin; pH 8,3

PBS Triton+X-100: 0,134M NaCl; 1,8mM Na₂HPO₄; 1mM NaH₂PO₄; 0,3% (v/v) Triton X-100; pH 7.2;

Blokovací roztok: 5% roztok odtučněného mléka v PBS+Triton X-100

Gel po SDS PAGE byl ponořen do přenosového pufru s 10% methanolem na dobu cca 15 minut. Mezitím byla aktivována PVDF membrána ponořením do methanolu na několik vteřin, do vody na 5 minut a do přenosového pufru na 1 minutu. Na anodu byly postupně vrstveny tři papíry Whatman 3 navlhčených přenosovým pufrům, PVDF membrána, gel a tři papíry Whatman 3 smočené v přenosovém pufru. "Sendvič" byl řádně stlačen a přiklopen katodou. Elektropřenos probíhal 40 minut za vloženého proudu, které odpovídalo 3,5násobku povrchu gelu.

Přes noc byla membrána uložena při 4°C v blokovacím roztoku, aby se předešlo nespecifickým reakcím protilátky s místy na membráně neobsazenými proteiny. Následující den byla membrána za stálého míchání inkubována 2 hodiny při laboratorní teplotě s roztokem IgY v blokovacím roztoku. Výsledná koncentrace kontrolní a nepurifikované IgY byla 30 µg/ml a purifikované protilátky 1 µg/ml. Po odstranění primární protilátky byla membrána 3× promyta blokovacím roztokem po 5 minutách. Poté byla nanesena sekundární protilátka - králičí IgG proti slepičí IgY konjugovaná s alkalickou fosfatasou, která byla ředěna blokovacím roztokem v poměru 1:1 430. Následovalo další důkladné promývání - 3×5 minut blokovacím roztokem, 2×5 minut PBS+Triton X-100 a 2×5 minut destilovanou vodou. Vyvolávací roztok vznikl rozpuštěním tablety BCIP/NBT v 10 ml destilované vody. Po dostatečném zvýraznění byla membrána přesunuta z vyvolávacího roztoku do destilované vody a nakonec usušena mezi filtračními papíry.

4 Výsledky

4.1 Výběr peptidu

Nejprve bylo nutné z primární struktury cytochromů P450 2S1 a 2W1 vybrat sekvenci aminokyselin, která bude použita k přípravě imunogenu. Z každého enzymu byly vybrány dva úseky z C konce proteinu. Jedna sekvence byla převzata z literatury^{34,39} (na Obrázku 10 a 11 vyznačena červeně) a druhá byla určena podle vlastností predikovaných pomocí modelovacích programů (na Obrázku 10 a 11 vyznačena modře).

10	20	30	40	50	60
MEATGTWALL	LALALLLLLT	LALSGTRARG	HLPPGP'TPLP	LLGNLLQLRP	GALYSGIMRL
70	80	90	100	110	120
SKKYGPFVFTI	YLG'PWRP'VVV	LVGQEAVREA	LGGQAE'EFSG	RGTVAMLEGT	FDGHGVFFSN
130	140	150	160	170	180
GERWRQLRKF	TMLALRDLGM	GKREGEELIQ	AEARCLVETF	QGTEGRPFDP	SLLLAQATSN
190	200	210	220	230	240
VVCSLLFGLR	FSYEDKEFQA	VVRAAGTLL	GVSSQGGQTY	EMFSWFLRPL	PGPHKQLLHH
250	260	270	280	290	300
VSTLAAFTVR	QVQHQGNLD	ASGPARDLVD	AFLIKMAQEE	QNP'GTEFTNK	NMLMTVIYLL
310	320	330	340	350	360
FAGTMTVSTT	VGYTLLLLMK	YPHVQKWVRE	ELNRELGAGQ	APSLGDRTRL	PYTDAVLHEA
370	380	390	400	410	420
QRL'LLALVPMG	IPRTLMR'TTR	FRGYTLPQGT	EVFPLLGSIL	HDPNIFKHPE	EFNPDRFLDA
430	440	450	460	470	480
DGRFRKHEAF	LPFSLGKRVC	LGEGLAKAEL	FLFFTTILQA	FSLESPCPPD	TL'SLKPTVSG
490	500				
LFNIPPAFQL	QVRPTDLHST	TQTR			

Obrázek 10: Primární struktura CYP2S1. Vybrané peptidy pro přípravu imunogenu podle literatury³⁴ jsou označeny červeně a podle predikčních programů modře.

10	20	30	40	50	60
MALLLLFLG	LLGLWGLLCA	CAQDPSPAAR	WPPGPRPLPL	VGNLHLLRLS	QQDRSIMELS
70	80	90	100	110	120
ERYGPVFTVH	LGRQKTVVLT	GFEAVKEALA	GPGQELADRP	PIAIFQLIQR	GGGIFSSGA
130	140	150	160	170	180
RWRAARQFTV	RALHSLGVGR	EPVADKILQE	LKCLSGQLDG	YRGRPFPLAL	LGWAPSNITF
190	200	210	220	230	240
ALLFGRRFDY	RDPVFSVLLG	LIDEVMVLLG	SPGLQLFNVY	PWLGALLQLH	RPVLRKIEEV
250	260	270	280	290	300
RAILRTLLEA	RRPHVCPGDP	VCSYVDALIQ	QGQGDDEGL	FAEANAVACT	LDMVMAGTET
310	320	330	340	350	360
TSATLQWAAL	LMGRHPDVQG	RVQEELDRVL	GPGRTPRLED	QQALPYTSAV	LHEVQRFITL
370	380	390	400	410	420
LPHVPRCTAA	DTQLGGFLLP	KGTPVIPLLT	SVLLDETTQWQ	TPGQFNPGHF	LDANGHFVKR
430	440	450	460	470	480
EAFLPFSAGR	RVCVGERLAR	TELFLLFAGL	LQRYRLLPPP	GVSPASLDTT	PARAF TMRPR
490					
AQALCAVPRP					

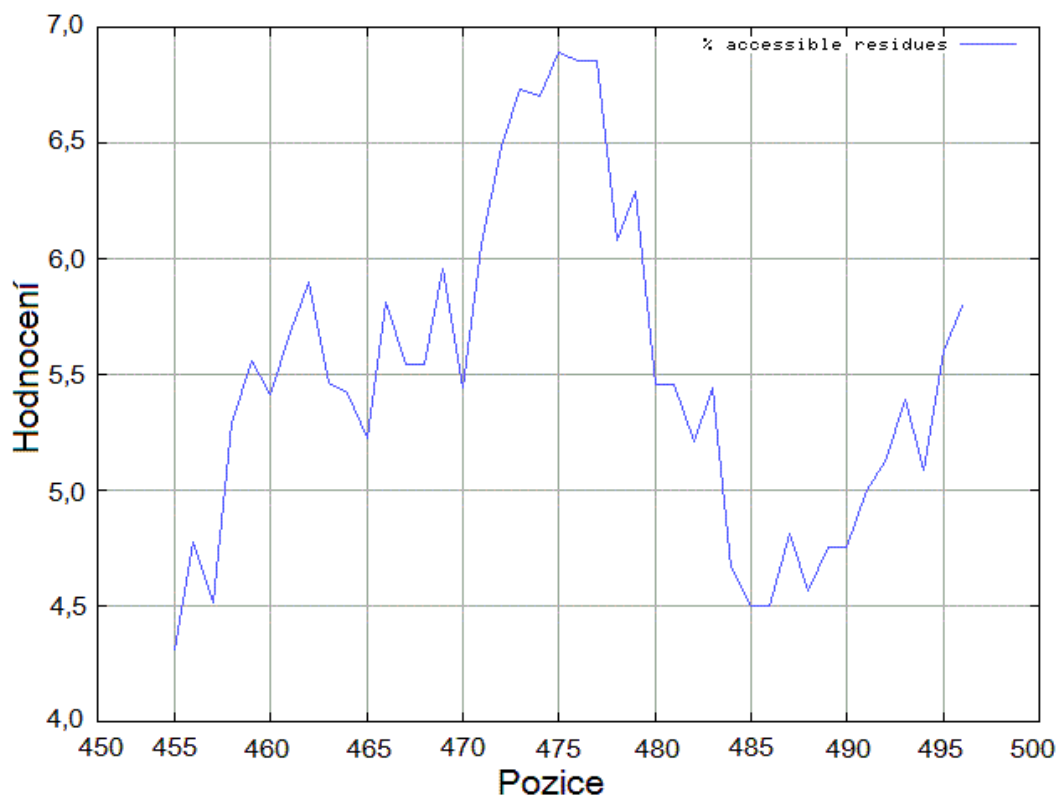
Obrázek 11: Primární struktura CYP2W1. Vybrané peptidy pro přípravu imunogenu podle literatury³⁹ jsou označeny červeně a podle predikčních programů modře.

Z literatury byly vybrány tyto sekvence:^{34, 39}

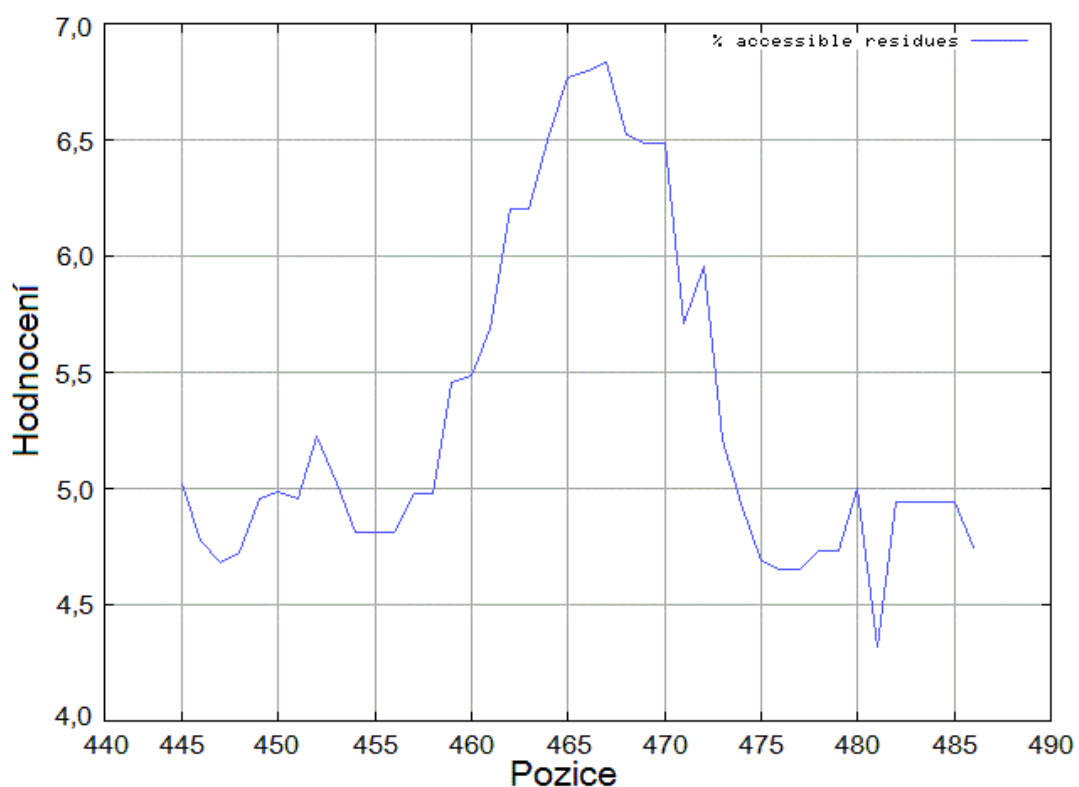
- CYP2S1a: KQVRPTDLHSTTQTR (na N konec peptidu byl přidán lysin, jehož amino skupina byla využita ke konjugaci na nosič)
- CYP2W1a: TMRPRAQALC

Pomocí predikčních programů byla zkoumána povrchová expozice sekvence (Obrázek 12 a 13), přítomnost uspořádané sekundární struktury (Obrázek 14 a 15) a antigenní vlastnosti (Obrázek 16 a 17). Po zvážení všech parametrů byly vybrány tyto sekvence:

- CYP2S1b: CPPDTLSLKPTVS
- CYP2W1b: CPGVSPASLDTTP (na N konec byl přidán cystein, který byl využit ke konjugaci na KLH)



Obrázek 12: Predikce přístupnosti C konce proteinu CYP2S1.⁸² Vybraná sekvence peptidu pro přípravu imunogenu se nalézá na pozici 466–479.



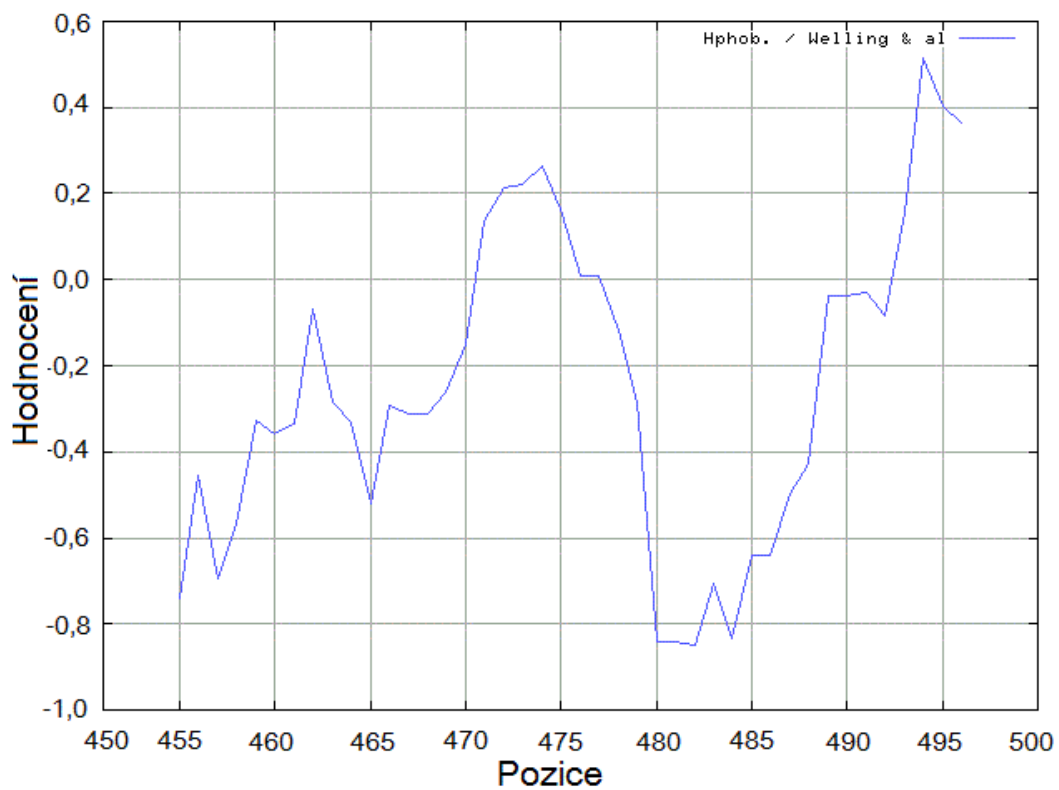
Obrázek 13: Predikce přístupnosti C konce proteinu CYP2W1.⁸² Vybraná sekvence peptidu pro přípravu imunogenu se nalézá na pozici 460–471.

10	20	30	40	50	60
cccchhhhhh	hhhhhhhhhh	hhcccccccc	ccccccccch	hhhhhhhhccc	chhhhhhhhhh
70	80	90	100	110	120
hhccccceeee	eeccccceeee	eechhhhhhhh	hhhhhhhhhhcc	ccccceeeec	ccccceeeec
130	140	150	160	170	180
chhhhhhhhhh	hhhhhhhhhhcc	cchhhhhhhh	hhhhhhhhhhh	hhcccccccc	chhhhhcchh
190	200	210	220	230	240
h?eee?cccc	ccccchhhhh	hhhhhhhhhhh	?ccccchhh	hhhhhhhhhhcc	ccchhhhhhhh
250	260	270	280	290	300
hhhhhhhhhhh	hhhhhhhhccc	ccccchhhhh	hhhhhhhhhhc	ccccccccchh	hhhhhhhhhhh
310	320	330	340	350	360
hccccchhh	hhhhhhhhhhh	cchhhhhhhh	hhhhhhccc	cccccccccc	ccchhhhhhhh
370	380	390	400	410	420
hhhhhcccc	ccccccccce	cccccccccc	eeehhhhhhhc	cccccccccc	cccccccccc
430	440	450	460	470	480
cccccccccc	cccccccc??	chhhhhhhhhh	hhhhhhhhhhh	hcccccccc	cccccccccc
490	500				
ccccccccce	cccccccccccc				

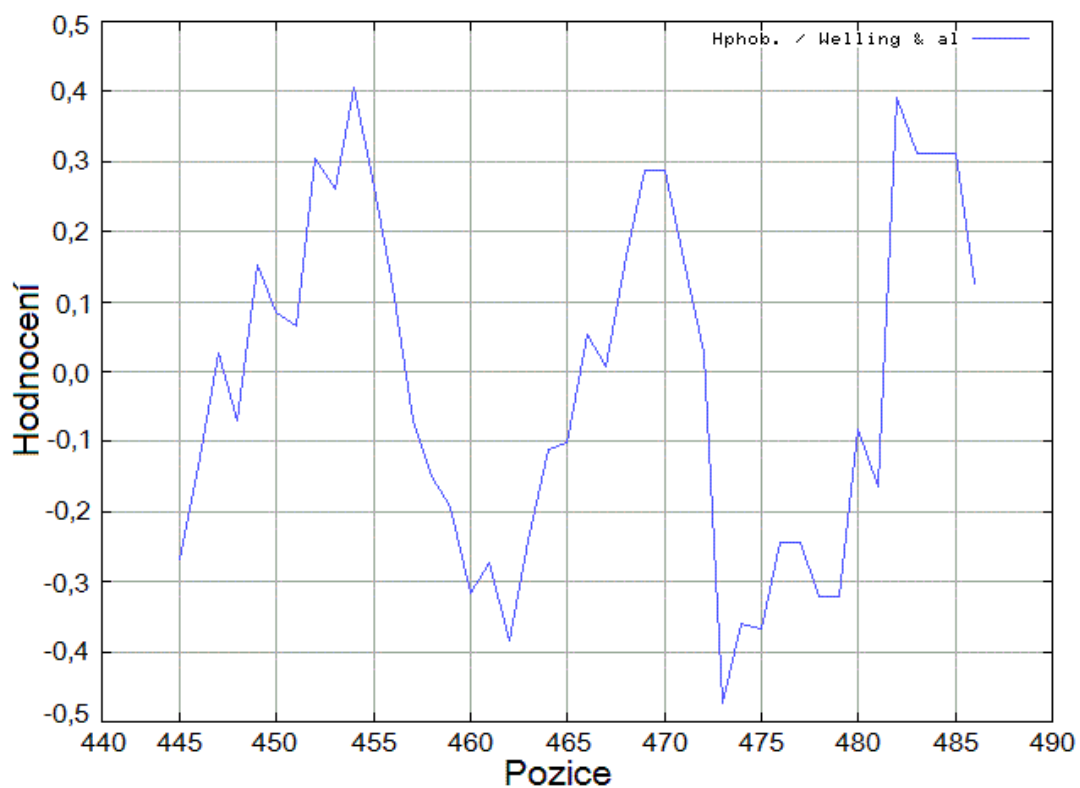
Obrázek 14: Predikce sekundární struktury CYP2S1.⁸³ h = α -helix; e = β -skládaný list; c = bez pravidelné sekundární struktury; ? = nejednoznačná struktura. Vybraná sekvence peptidu pro přípravu imunogenu je označena modře.

10	20	30	40	50	60
chhhhhhhhhh	hhhhhhhhhhc	cccccccccc	cccccccccc	ccchhhhhccc	ccchhhhhhhh
70	80	90	100	110	120
hhccccceeee	eeccccceeeec	chhhhhhhhhh	hccchhcccc	ccc?hhhhhhc	ccceeecccc
130	140	150	160	170	180
hhhhhhhhhhh	hhhhhhccc	hhhhhhhhhhh	hhhhhhhhhhh	cccccccccc	ce?????ee
190	200	210	220	230	240
eecccccccc	cchhhhhhhh	hhhhhhhhhhc	ccc?????c	cccchhhhhh	hhhhhhhhhhh
250	260	270	280	290	300
hhhhhhhhhhh	hhcccccccc	chhhhhhhhhh	hccccccccch	hhhhhhhhhhh	hhhhhhccc
310	320	330	340	350	360
chhhhhhhhhh	hhccccchhhh	hhhhhhhhhhh	cccccccccc	ccccchhhh	hhhhhhhhhhc
370	380	390	400	410	420
cccccccccc	cceccccceec	ccccceehhh	hhcccccccc	cccccccccc	cccccccccc
430	440	450	460	470	480
cccccccccc	cee?hhhhhh	hhhhhhhhhhh	hhhhcccccc	cccccccccc	cccccccccc
490					
ccceeecccc					

Obrázek 15: Predikce sekundární struktury CYP2W1.⁸³ h = α -helix; e = β -skládaný list; c = bez pravidelné sekundární struktury; ? = nejednoznačná struktura. Vybraná sekvence peptidu pro přípravu imunogenu je označena modře.



Obrázek 16: Predikce antigenicity C konce proteinu CYP2S1.⁸² Vybraná sekvence peptidu pro přípravu imunogenu se nalézá na pozici 466–479.



Obrázek 17: Predikce antigenicity C konce proteinu CYP2W1.⁸² Vybraná sekvence peptidu pro přípravu imunogenu se nalézá na pozici 460–471.

Vybrané sekvence aminokyselin cytochromů P450 pro přípravu imunogenu jsou spolu s označení příslušné protilátky přehledně uvedeny v Tabulce 4.

Tabulka 4: Vybrané sekvence aminokyselin pro přípravu imunogenu z cytochromů P450 2S1 a 2W1 a označení příslušného peptidu a IgY.

Cytochrom P450	Vybrané peptidy	Označení peptidu	Označení IgY
CYP2S1	KQVRPTDLHSTTQTR	CYP2S1a	S _A
	CPPDTLSLKPTVS	CYP2S1b	S _B
CYP2W1	TMRPRAQALC	CYP2W1a	W _A
	CPGVSPASLDTTP	CYP2W1b	W _B

4.2 Příprava imunogenu

Konjugace KLH a peptidu přes thiolovou skupinu cysteinu

Všechny syntetizované peptidy s terminálním cysteinem (CYP2S1b, CYP2W1a, CYP2W1b) byly dobře rozpustné v konjugačním pufru (0,1M NaH₂PO₄; 0,15M NaCl; pH 7,2). Po smíchání roztoku peptidu v konjugačním pufru s roztokem Imject Maleimide Activated Mariculture KLH v destilované vodě se netvořily žádné sraženiny a během dvouhodinového míchání za laboratorní teploty vznikl konjugát KLH-peptid, který byl použit pro imunizaci.

Vazba peptidu na modifikovaný KLH karbodiimidovou kondenzací

Nejprve bylo nutné blokovat amino skupiny proteinového nosiče KLH. Tento krok byl proveden, aby konjugace probíhala pouze přes lysin na N konci peptidu CYP2S1a a aby se zabránilo zesíťování KLH, což by vedlo ke srážení nosiče.

Rozpouštění KLH v uhličitanovém pufru bylo úspěšné a následné přidání roztoku maleinanhydridu v dioxanu neprovázely žádné komplikace. Po provedení dialýzy oproti 0,15M NaCl byl připraven KLH s modifikovanými amino skupinami. Po smíchání síťovacího činidla EDC a modifikovaného KLH nedocházelo k tvorbě sraženin, z čehož se dá vyvodit, že blokace amino skupin KLH proběhla úspěšně.

Peptid CYP2S1a byl lehce rozpustný v uhličitanovém pufru a po smíchání roztoku modifikovaného KLH s EDC a roztoku peptidu v uhličitanovém pufru vznikl konjugát KLH-peptid, který byl použit pro imunizaci slepic.

4.3 Izolace protilátek

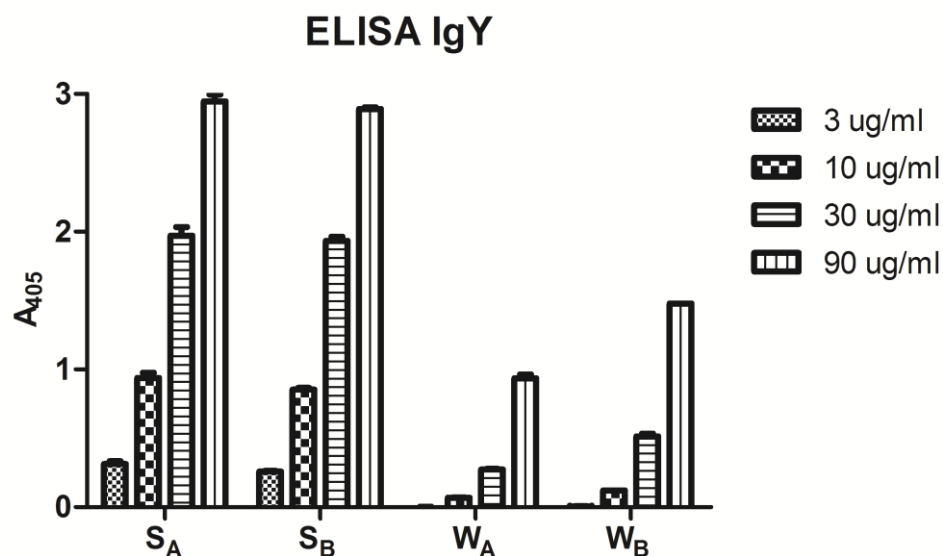
Ze žloutků vajec sbíraných před a po imunizaci byly připraveny kontrolní a specifické protilátky. Po izolaci protilátek skládající se z vymražení suspenzí žloutků a následné precipitace pomocí NaCl, byl změřen objem protilátkové frakce, u které byla fotometricky při 280 nm stanovena koncentrace proteinů. Změřené absorbance, koncentrace a obsah IgY jsou uvedeny v Tabulce 5.

Tabulka 5: Charakteristiky izolovaných protilátek

IgY	Objem [ml]	Koncentrace IgY [mg/ml]	Obsah IgY [mg]
K S_A	11,0	30,2	332,2
S_A	36,0	53,1	1 911,6
K S_B	18,5	26,8	495,8
S_B	21,0	42,8	898,8
K W_A	22,5	24,7	555,8
W_A	32,5	38,9	1 264,3
K W_B	13,5	20,2	272,7
W_B	27,0	39,6	1 069,2

4.4 Specifita izolovaných protilátek

Následně byla u izolovaných protilátek zjišťována schopnost specificky rozpoznávat daný antigen. Za tímto účelem byla provedena ELISA s rostoucí koncentrací IgY – 3; 10; 30 a 90 µg/ml. Jako antigen sloužil příslušný peptid navázaný na dno jamky mikrotitrační destičky. K detekci IgY byla použita králičí anti-slepičí protilátka konjugovaná alkalickou fosfatasou. Enzym tvořil barevný produkt, jehož koncentrace měřená jako absorbance při 405 nm je přímo úměrná množství specifické anti-peptidové protilátky. Výsledky jsou znázorněny na Obrázku 18.



Obrázek 18: Ověření schopnosti protilátek S_A, S_B, W_A a W_B specificky rozpoznávat antigen pomocí metody ELISA. Jako antigen byl použit příslušný peptid. Sloupce vyjadřují rozdíl absorbancí mezi specifickou a kontrolní protilátkou. Výsledky jsou uvedeny se směrodatnou odchylkou.

U všech izolovaných protilátek s rostoucí koncentrací IgY stoupá i absorbance při 405 nm (Obrázek 18), což naznačuje, že protilátky specificky rozpoznávají peptidový antigen.

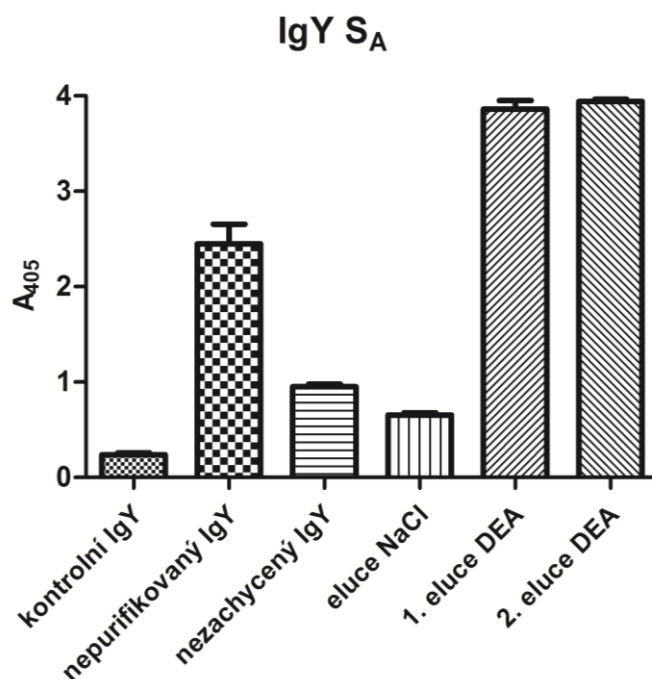
4.5 Afinitní purifikace IgY

Za účelem získání specifických protilátek z frakce IgY byla provedena afinitní purifikace. Po navázání peptidu na kolonu probíhala inkubace IgY s připraveným imunosorbentem přes noc při 4°C. Poté byl oddělen podíl IgY, který se nenavázal na peptid.

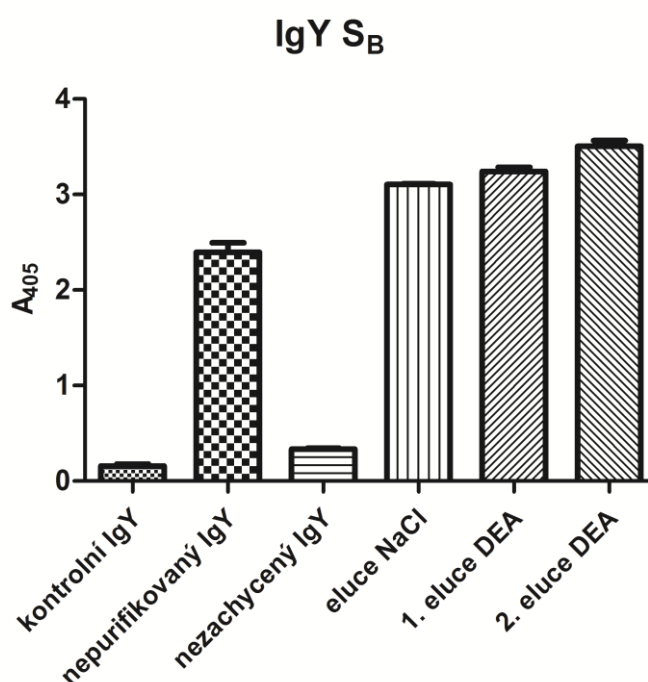
Následovalo uvolnění slabě navázaných protilátek za použití roztoku NaCl v PBS. Byly jímány frakce (1 ml), u kterých byla měřena absorbance při 280 nm. Frakce s největší absorbancí a tedy s největší koncentrací proteinů byla uschována při 4°C pro vyhodnocení průběhu afinitní purifikace pomocí ELISA.

Specifická frakce protilátek byla uvolněna vysokým pH roztoku DEA (pH = 11,5) do mikrozkuvek s 1M KH₂PO₄ pro neutralizaci. Protože po aplikaci 10 ml elučního média byl stále detekovatelný IgY, bylo v eluci pokračováno dalšími 5 ml DEA za stejných podmínek. Byly tedy připraveny dvě frakce specifických protilátek – 1. eluce DEA (7 ml) a 2. eluce DEA (5 ml).

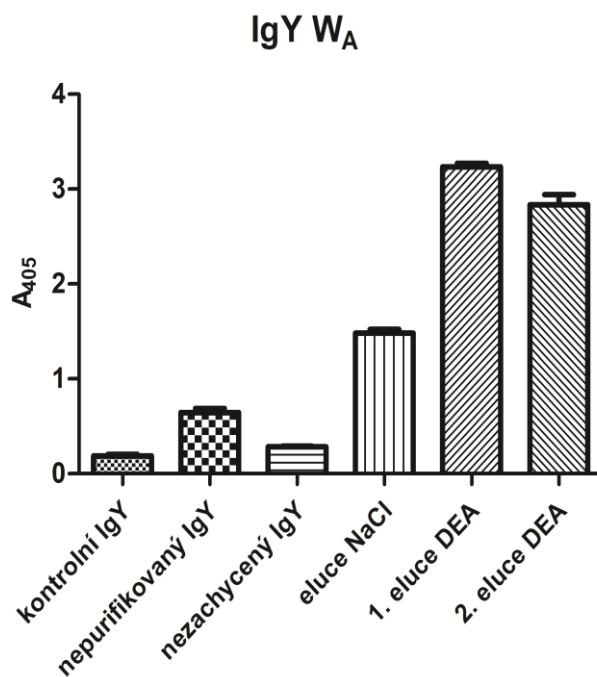
Průběh afinitní purifikace IgY byl sledován metodou ELISA. Pro porovnání jednotlivých frakcí protilátek byla zvolena koncentrace 30 µg/ml. Výsledky jsou graficky vyjádřeny a uvedeny se směrodatnou odchylkou. Z grafů na Obrázcích 19-22 je patrné, že všechny afinitní purifikace anti-peptidových protilátek byly úspěšné.



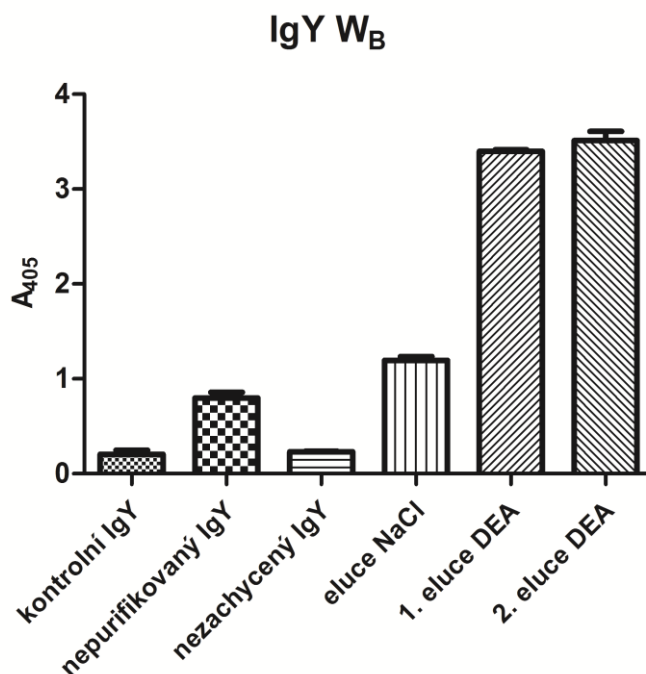
Obrázek 19: Průběh afinitní purifikace protilátky S_A sledovaný metodou ELISA. Jednotlivé frakce byly ředěny na koncentraci 30 µg/ml. Kontrolní IgY = protilátky získané před imunizací; nepurifikovaný IgY = protilátky po imunizaci nepurifikované afinitní chromatografií; nezachycený IgY = frakce nezachycena na kolonu s peptidem; eluce NaCl = protilátky uvolněné z kolony pomocí NaCl; 1. eluce DEA = specifické protilátky získané elucí pomocí DEA; 2. eluce DEA = specifické protilátky získané následující elucí pomocí DEA.



Obrázek 20: Průběh afinitní purifikace protilátky S_B sledovaný metodou ELISA. Jednotlivé frakce byly ředěny na koncentraci 30 µg/ml. Kontrolní IgY = protilátky získané před imunizací; nepurifikovaný IgY = protilátky po imunizaci nepurifikované afinitní chromatografií; nezachycený IgY = frakce nezachycena na kolonu s peptidem; eluce NaCl = protilátky uvolněné z kolony pomocí NaCl; 1. eluce DEA = specifické protilátky získané elucí pomocí DEA; 2. eluce DEA = specifické protilátky získané následující elucí pomocí DEA.



Obrázek 21: Průběh afinitní purifikace protilátky W_A sledovaný metodou ELISA. Jednotlivé frakce byly ředěny na koncentraci 30 µg/ml. Kontrolní IgY = protilátky získané před imunizací; nepurifikovaný IgY = protilátky po imunizaci nepurifikované afinitní chromatografií; nezachycený IgY = frakce nezachycena na kolonu s peptidem; eluce NaCl = protilátky uvolněné z kolony pomocí NaCl; 1. eluce DEA = specifické protilátky získané elucí pomocí DEA; 2. eluce DEA = specifické protilátky získané následující elucí pomocí DEA.



Obrázek 22: Průběh afinitní purifikace protilátky W_B sledovaný metodou ELISA. Jednotlivé frakce byly ředěny na koncentraci 30 µg/ml. Kontrolní IgY = protilátky získané před imunizací; nepurifikovaný IgY = protilátky po imunizaci nepurifikované afinitní chromatografií; nezachycený IgY = frakce nezachycena na kolonu s peptidem; eluce NaCl = protilátky uvolněné z kolony pomocí NaCl; 1. eluce DEA = specifické protilátky získané elucí pomocí DEA; 2. eluce DEA = specifické protilátky získané následující elucí pomocí DEA.

U jednotlivých frakcí afinitní purifikace byla stanovena koncentrace podle změřené absorbance při 280 nm. Dále byl určen obsah IgY ve frakcích. Výsledky jsou uvedeny v Tabulce 6.

Tabulka 6: Koncentrace a obsah IgY jednotlivých frakcí afinitní purifikace protilátek S_A, S_B, W_A a W_B.

Frakce IgY	Koncentrace IgY	Obsah IgY
Protilátka S_A		
Naneseno na kolonu	53,1 mg/ml	796,5 mg
Nezachyceno na koloně	40,9 mg/ml	613,5 mg
Eluce NaCl	300,0 µg/ml	300,0 µg
1. eluce DEA	285,6 µg/ml	1810,2 µg
2. eluce DEA	73,6 µg/ml	368,0 µg
Protilátka S_B		
Naneseno na kolonu	42,8 mg/ml	642,0 mg
Nezachyceno na koloně	31,6 mg/ml	474,0 mg
Eluce NaCl	103,0 µg/ml	103,0 µg
1. eluce DEA	113,2 µg/ml	793,1 µg
2. eluce DEA	55,2 µg/ml	275,7 µg
Protilátka W_A		
Naneseno na kolonu	38,9 mg/ml	583,5 mg
Nezachyceno na koloně	36,8 mg/ml	552,0 mg
Eluce NaCl	35,8 µg/ml	35,8 µg
1. eluce DEA	43,2 µg/ml	302,7 µg
2. eluce DEA	34,3 µg/ml	171,7 µg
Protilátka W_B		
Naneseno na kolonu	39,6 mg/ml	594,0 mg
Nezachyceno na koloně	30,6 mg/ml	459,0 mg
Eluce NaCl	77,7 µg/ml	77,7 µg
1. eluce DEA	119,8 µg/ml	838,6 µg
2. eluce DEA	34,2 µg/ml	170,7 µg

Naneseno na kolonu = protilátka po imunizaci před afinitní chromatografií; Nezachyceno na koloně = protilátková frakce nezachycena na kolonu s peptidem; Eluce NaCl = protilátka uvolněná z kolony pomocí NaCl; 1. eluce DEA = specifická protilátka získaná elucí pomocí DEA; 2. eluce DEA = specifická protilátka získaná následující elucí pomocí DEA.

I přes poměrně nízké zastoupení specifických anti-peptidových protilátek v připravených frakcích se je afinitní purifikací podařilo zkoncentrovat a získat tak nástroj pro imunodetekci CYP2S1 a 2W1.

4.6 Buněčné kultury

Pro ověření schopnosti anti-peptidových protilátek detekovat CYP2S1 a CYP2W1 byly vybrány buněčné linie, které cytochromy P450 potenciálně exprimují – MCF-7 exprimující CYP2W1; A549 a MT-3 exprimující CYP2S1. Jako negativní kontrola sloužily lidské plicní fibroblasty MRC-5.

Všechny buněčné linie byly lyzovány RIPA pufrům a poté byla stanovena koncentrace proteinů v lyzátech pomocí "Microplate BCA Protein Assay Kit – Reducing Agent Compatible". Výsledné koncentrace proteinů v lyzátech buněčných linií jsou přehledně uvedeny v Tabulce 7.

Tabulka 7: Koncentrace proteinů u lyzátů buněčných linií MCF-7, A549, MT-3 a MRC-5.

Buněčný lyzát	Koncentrace [mg/ml]
MCF-7	1,4
A549	1,5
MT-3	1,7
MRC-5	0,5

Jako další biologický materiál byl použit *E. coli*, do níž byl zaveden plasmid pro expresi CYP2S1. K dispozici byly dva vzorky – před (kontrola) a po indukci exprese pomocí isopropyl- β -D-1-thiogalaktopyranosidu (IPTG). Ke sledování růstu bakterií byla měřena optická densita (absorbance) při 600 nm (Tabulka 8).

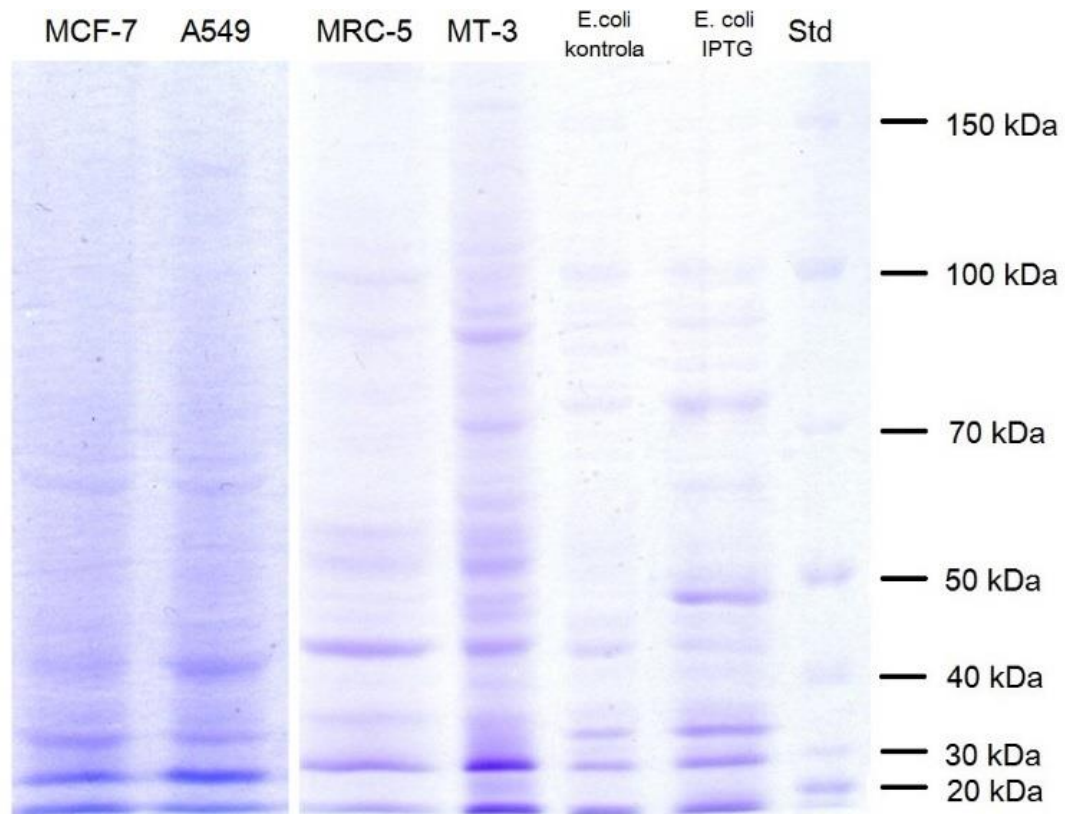
Tabulka 8: Optická densita *E. coli*.

<i>Escherichia coli</i>	OD ₆₀₀
kontrola	0,608
IPTG	3,220

Měření bylo provedeno Mgr. Ivetou Mrízovou. *E. coli* kontrola = neprodukující CYP2S1, *E. coli* IPTG = po indukci IPTG tzn. produkující CYP2S1.

4.7 SDS elektroforéza v polyakrylamidovém gelu

K rozdělení proteinů byla použita SDS elektroforéza za použití 3% zaostřovacího a 8% rozdělovacího polyakrylamidového gelu. Do jamek bylo nanášeno 25 μ l lyzátů buněčných kultur MCF-7, A 549, MRC-5 a MT-3 a dále suspenze kmenu *E. coli* (XL-1 blue) (Obrázek 23).

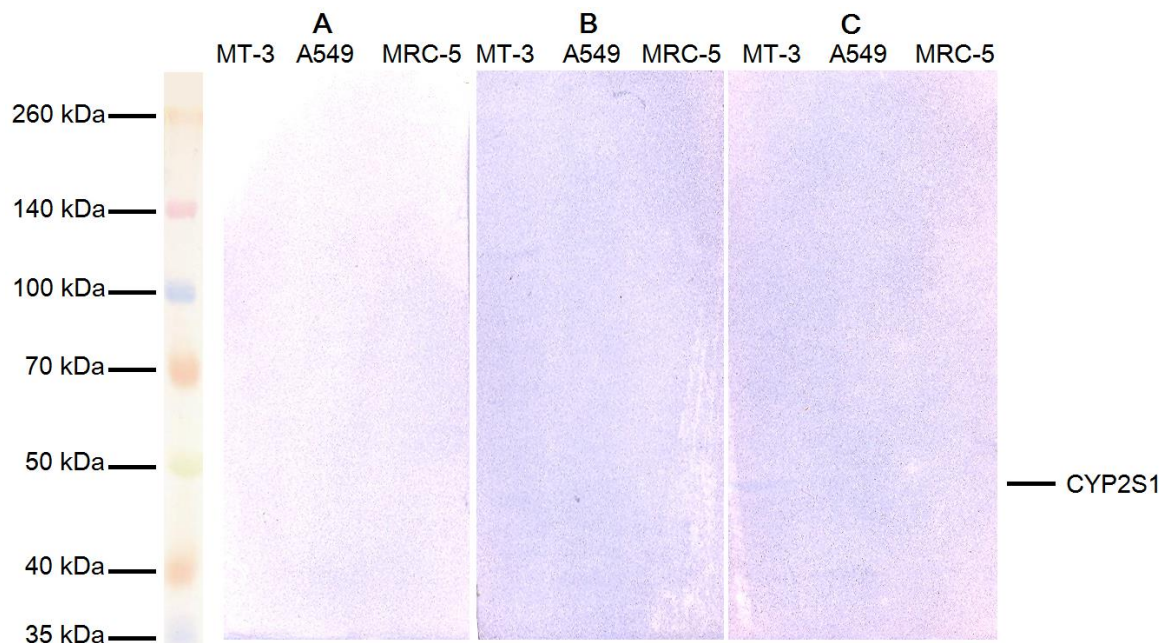


Obrázek 23: Elektroforéza buněčných kultur MCF-7, A549, MRC-5, MT-3 a *E. coli*. K dělení proteinů byl použit 3% zaostřovací gel a 8% rozdělovací gel za redukujících podmínek. Lyzáty buněčných kultur MCF-7, A549, MRC-5 a MT-3 byly aplikovány nenaředené. Vzorky *E. coli* byly ředěny takovým množstvím destilované vody, aby optická densita klesla na hodnotu 0,5. Jako standard molekulových hmotností (Std) byl použit PageRuler Unstained Broad Range Protein Ladder. *E. coli* kontrola = neprodukující CYP2S1, *E. coli* IPTG = po indukci IPTG tzn. produkující CYP2S1.

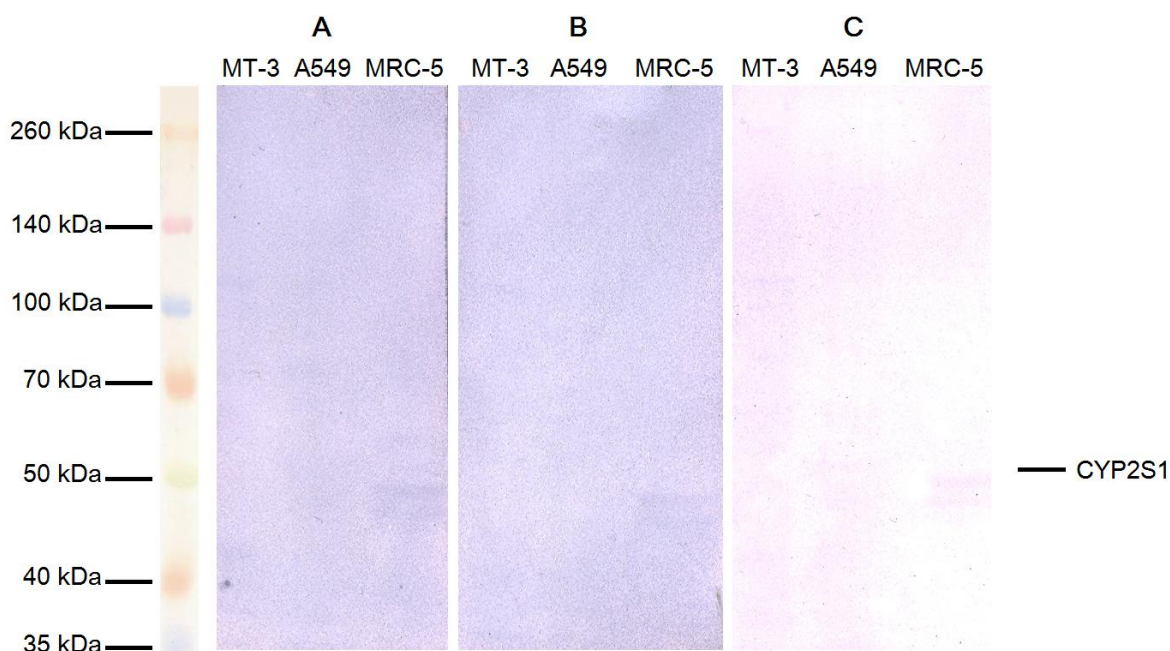
4.8 Western blot

Po provedení elektroforézy následoval elektropřenos proteinů z gelu na PVDF membránu metodou "Western blot". Na membráně byly cytochromy P450 2S1 a 2W1 detekovány pomocí afinitně purifikovaných slepičích protilátek o koncentraci 1 $\mu\text{g/ml}$ a po přidání substrátu vizualizovány jejich zóny pomocí alkalické fosfatasy, která byla konjugována na anti-slepičí IgG.

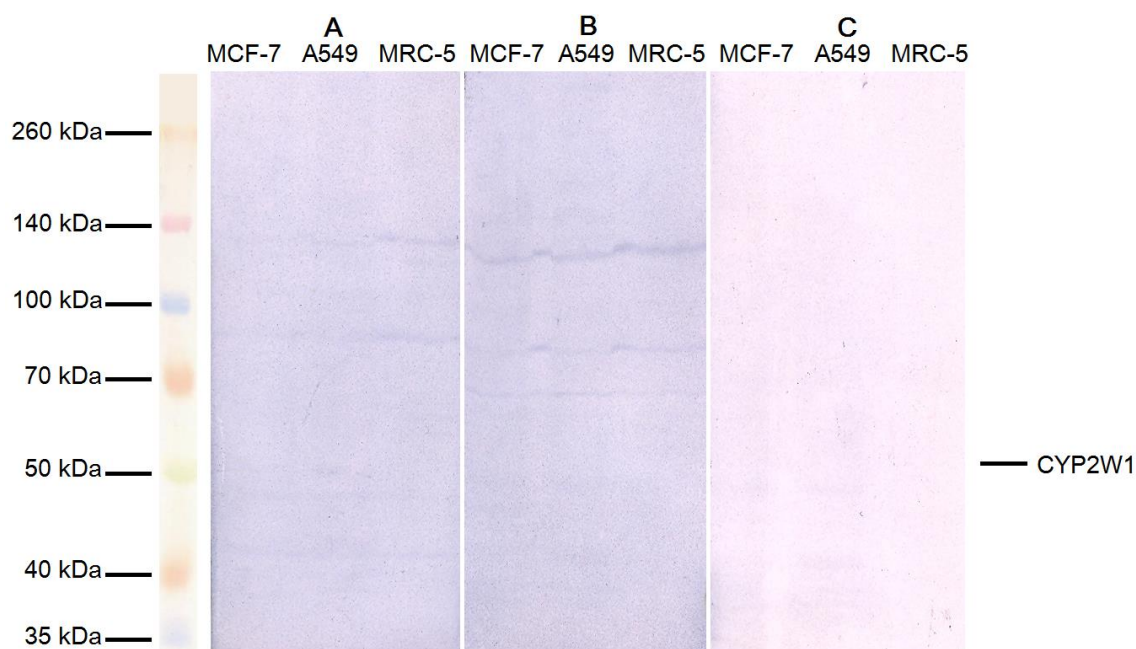
V buněčných lyzátech nebyla imunodetekce CYP2S1 a 2W1 příliš úspěšná (Obrázky 24-27), ale podařilo se detekovat CYP2S1 v suspenzi *E. coli*, který sloužil jako expresní systém pro rekombinantní expresi lidského CYP2S1 (Obrázky 28 a 29).



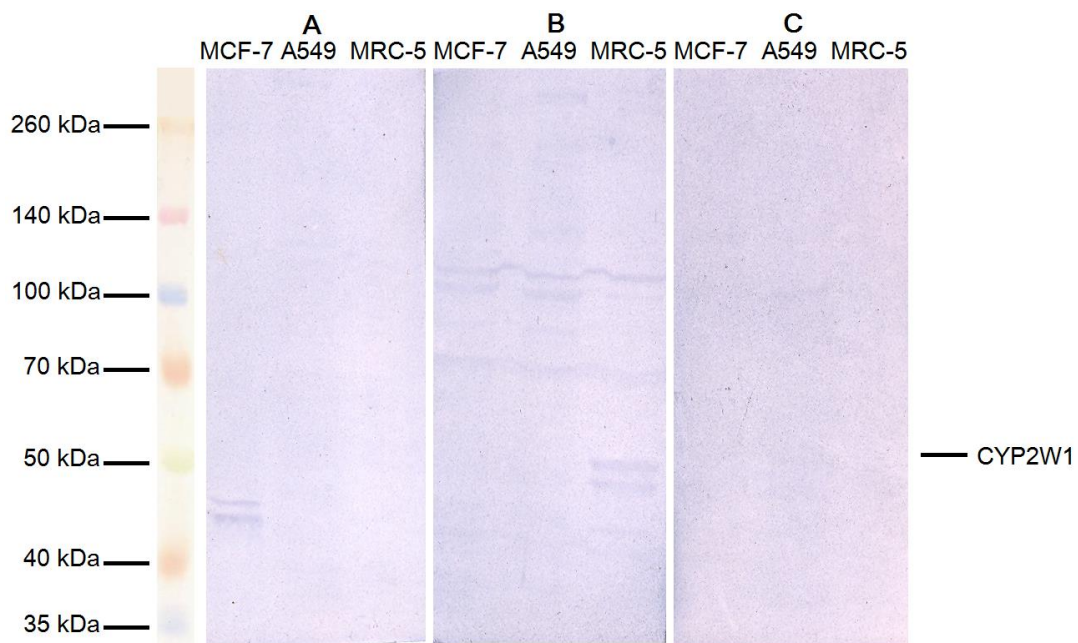
Obrázek 24: Imunodetekce CYP2S1 v buněčných lyzátech MT-3, A549 a MRC-5 pomocí různě připravených primárních IgY S_A a sekundární anti-slepičí IgG konjugovanou s alkalickou fosfatasou. A = kontrolní protilátka S_A izolovaná před imunizací o koncentraci 30 $\mu\text{g/ml}$; B = protilátka S_A nepurifikovaná afinitní chromatografií o koncentraci 30 $\mu\text{g/ml}$; C = afinitně purifikovaná protilátka S_A o koncentraci 1 $\mu\text{g/ml}$. Jako standard molekulových hmotností byl použit Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder.



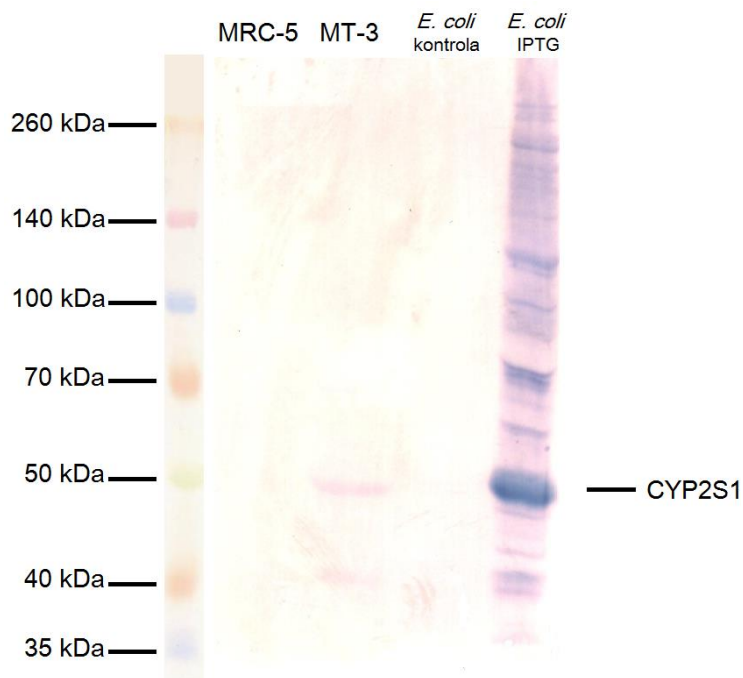
Obrázek 25: Imunodetekce CYP2S1 v buněčných lyzátech MT-3, A549 a MRC-5 pomocí různě připravených primárních IgY S_B a sekundární anti-slepičí IgG konjugovanou s alkalickou fosfataseou. A = kontrolní protilátka S_B izolovaná před imunizací o koncentraci 30 $\mu\text{g/ml}$; B = protilátka S_B nepurifikovaná afinitní chromatografií o koncentraci 30 $\mu\text{g/ml}$; C = afinitně purifikovaná protilátka S_B o koncentraci 1 $\mu\text{g/ml}$. Jako standard molekulových hmotností byl použit Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder.



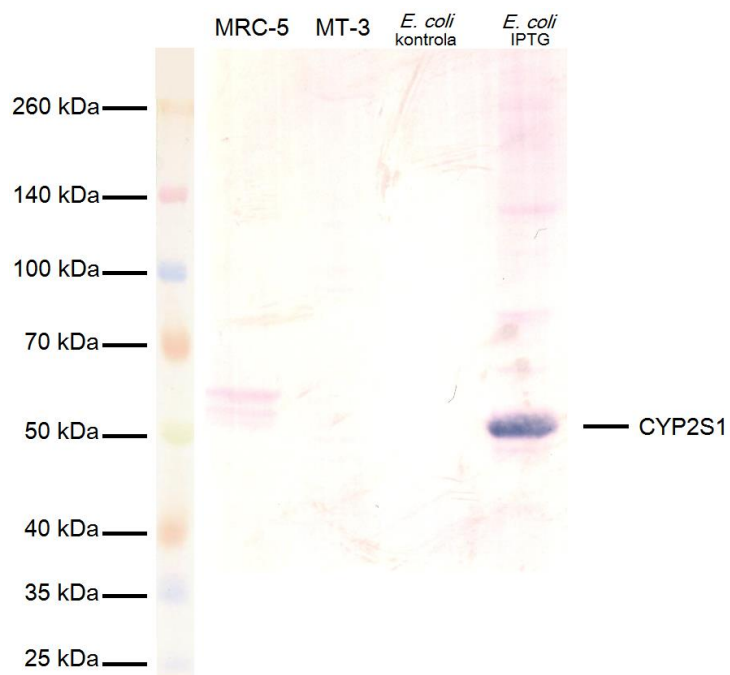
Obrázek 26: Imunodetekce CYP2W1 v lyzátech buněčných kultur MT-3, A549 a MRC-5 pomocí různě připravených primárních IgY W_A a sekundární anti-slepičí IgG konjugovanou s alkalickou fosfataseou. A = kontrolní protilátka W_A izolovaná před imunizací o koncentraci 30 $\mu\text{g/ml}$; B = protilátka W_A nepurifikovaná afinitní chromatografií o koncentraci 30 $\mu\text{g/ml}$; C = afinitně purifikovaná protilátka W_A o koncentraci 1 $\mu\text{g/ml}$. Jako standard molekulových hmotností byl použit Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder.



Obrázek 27: Imunodetekce CYP2W1 v lyzátech buněčných kultur MT-3, A549 a MRC-5 pomocí různě připravených primárních IgY W_B a sekundární anti-slepičí IgG konjugovanou s alkalickou fosfatasou. A = kontrolní protilátka W_B izolovaná před imunizací o koncentraci 30 $\mu\text{g/ml}$; B = protilátka W_B nepurifikovaná afinitní chromatografií o koncentraci 30 $\mu\text{g/ml}$; C = afinitně purifikovaná protilátka W_B o koncentraci 1 $\mu\text{g/ml}$. Jako standard molekulových hmotností byl použit Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder.



Obrázek 28: Imunodetekce CYP2S1 v lyzátech buněčných kultur MRC-5, MT-3 a suspenzích *E. coli* pomocí afinitně purifikované primární IgY S_A a sekundární anti-slepičí IgG konjugovanou s alkalickou fosfatasou. Koncentrace primární IgY S_A byla 1 $\mu\text{g/ml}$. *E. coli* kontrola = neprodukující CYP2S1, *E. coli* IPTG = po indukci IPTG tzn. produkující CYP2S1. Jako standard molekulových hmotností byl použit Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder.



Obrázek 29: Imunodetekce CYP2S1 v lyzátech buněčných kultur MRC-5, MT-3 a suspenzích *E.coli* pomocí afinitně purifikované primární IgY S_B a sekundární anti-slepičí IgG konjugované s alkalickou fosfatase. Koncentrace primární IgY S_A byla 1 $\mu\text{g/ml}$. *E. coli* kontrola = neprodukující CYP2S1, *E. coli* IPTG = po indukci IPTG tzn. produkující CYP2S1. Jako standard molekulových hmotností byl použit Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder.

5 Diskuze

V dnešní době roste popularita chemopreventivních přípravků, u nichž se předpokládá schopnost prevence vzniku a rozvoje celé škály nemocí.²⁴ Jelikož je v České republice druhá nejčastější příčina úmrtí rakovina²⁷, vynakládá se značné úsilí na výrobu profylaktik bránící vzniku novotvarů. Klinické testy většinou zkoumají podávání pouze jedné účinné látky a její vliv na zdravotní stav sledované skupiny.⁸⁴ Nicméně se nesledují interakce chemopreventivních látek s dalšími xenobiotiky, čímž může docházet k ovlivňování metabolismu exogenních i endogenních látek.

Karcinogeneze je komplexní proces, který je ovlivněn mnoha vlivy, a ani v současnosti není stále zcela objasněn. Člověk je vystaven velkému množství sloučenin, jenž mohou způsobit mutace.⁸⁵ V těle existují enzymy metabolizující tyto karcinogeny a mezi ně se řadí i cytochromy P450, které tak mohou ovlivňovat proces karcinogenezi.⁸⁶ Proto je významné mít nástroj k detekci cytochromů P450 a sledovat jejich roli v procesu karcinogeneze a vliv chemopreventivních látek.

Z dosud známých lidských forem cytochromů P450 byly vybrány dva zástupci z rodiny 2, které se vyskytují zejména v nádorových tkáních. Jedná se o CYP2S1 a 2W1, jejichž zvýšená exprese v tlustém střevě značí horší prognózu pro pacienty s kolorektální rakovinou.^{37, 39} Tyto cytochromy by tak mohly sloužit jako diagnostické a prognostické markery.⁴⁰ Jelikož byly tyto cytochromy P450 objeveny v relativně nedávné době, není o nich dostatek informací. Jejich exprese by mohla být sledována imunochemickými metodami např. připraveny slepičími protilátkami.

Pro získání specifických protilátek bylo nejprve nutné připravit imunogeny pro imunizaci slepic. Protože není jednoduché připravit proteiny CYP2S1 a 2W1 nebo je izolovat ve formě vhodné k imunizaci, byly k přípravě imunogenů použity pouze peptidy. Získané anti-peptidové protilátky jsou velmi specifické.⁸⁷ Za tímto účelem byly z primární struktury obou cytochromů P450 vybrány dvě sekvence peptidů 8-15 aminokyselin, které byly poté navázány na nosič KLH.

Z cytochromu P450 2S1 byla vybrána sekvence KQVRPTDLHSTTQTR, která byla dříve použita k přípravě imunogenu, jímž byl imunizován králík.³⁴ Získané protilátky ze séra byla následně použity k imunodetekci CYP2S1 v myší buněčné linii H2.35, do níž byl zaveden plasmid pro heterologní expresi lidského CYP2S1 a dále k identifikaci CYP2S1 v lidských tkáních. Dále byla vybrána sekvence CPPDTLSLKPTVS. Při výběru byla zohledněna

pozice sekvence v rámci proteinu. Hodnoty přístupnosti v rámci celého proteinu se pohybují v rozmezí cca 4,2-7,0. Vybraná sekvence aminokyselin se tedy podle predikčního programu nalézá na povrchu proteinu (Obrázek 12), tudíž by měla být dobře přístupná pro interakce s protilátkami. Při výběru sekvence pro přípravu imunogenu bylo také důležité zvážit, zda je vybraná sekvence součástí uspořádaných typů sekundárních struktur. Pokud by se vybraná sekvence nacházela v α -helixu nebo β -skládaném listu, mohla by být špatně dostupná pro rozpoznání protilátkou. Vybraná sekvence by měla obsahovat pouze nepravidelnou sekundární strukturu (Obrázek 14), takže by měla být vhodná pro interakci s protilátkou. Predikční programy také dokáží předpovědět, jestli daná sekvence bude mít vhodné antigenní vlastnosti (Obrázek 16). Ačkoli vybraná sekvence nedosahuje maxima antigenicity v rámci celého proteinu, byla zvolena jako dostatečná vzhledem k ostatním parametrům.

Sekvence TMRPRAQALC z cytochromu P450 2W1 byla zvolena, protože její použití bylo ověřeno imunodetekcí CYP2W1 v lidských tumorech.³⁹ Jako pozitivní kontrola byly také použity mikrosomy z buněčné kultury HEK293 transfekované plasmidem pro expresi CYP2W1. Jako druhá sekvence byla vybrána sekvence PGVSPASLDTTP, na jejímž N konci byl připojen cystein pro směrovanou konjugaci na proteinový nosič KLH. Vybrané aminokyseliny se s největší pravděpodobností nalézají na povrchu proteinu (Obrázek 13) a jsou tak dobře dostupné. Také sekundární struktury α -helixu a β -skládaného listu se nacházejí mimo vybranou oblast, která opět obsahuje pouze neuspořádanou sekundární strukturu (Obrázek 15). Podle predikčního programu nemá sice vybraná sekvence ideální antigenní vlastnosti, ale parametr imunogenicity je dostatečný (Obrázek 17).

Podle vybraných sekvencí byly syntetizovány peptidy, které byly následně konjugovány s proteinovým nosičem KLH. Imunizace se skládala ze třech dávek v týdenních odstupech.

Po imunizaci slepic byly ze žloutků vajec izolovány IgY. Bylo popsáno mnoho metod popisujících purifikaci imunoglobulinů z vajec.⁸⁸ Většina těchto postupů se skládá z několika precipitací pomocí různých látek a centrifugací, případně následuje gelová filtrace nebo ionexová chromatografie. Jelikož jsou tyto způsoby často zdoluhavé, byla použita dvou kroková izolace, která využívá extrakci vodovodní vodou (ředění 1:7, úprava pH, zamražení a filtrace) a precipitaci pomocí NaCl.⁷³ Tato metoda je rychlá, levná a připravená frakce obsahuje IgY o vysoké čistotě. Výtěžek protilátkové frakce činil 112 - 239 mg na jeden žloutek, přičemž průměrný žloutek obsahuje podle velikosti 100±150 mg protilátek.⁸⁹

Následně bylo ověřováno, zda izolované frakce IgY obsahují protilátky specificky rozpoznávající vybrané sekvence z cytochromů P450. Za tímto účelem byla provedena

ELISA, kdy jako antigen byl použit příslušný peptid a slepičí protilátka byla aplikována v různých koncentracích (Obrázek 18). IgY byla ředěna na koncentrace 3; 10; 30 a 90 $\mu\text{g/ml}$, tak aby odezva měla postupně trojnásobně růst. Taková tendence je patrná u protilátek W_A a W_B , u nichž je pravděpodobně menší koncentrace specifických protilátek nebo se izolované protilátky na peptid váží s nižší aviditou. U protilátek S_A a S_B se stoupající koncentrací roste i absorbance, ale není patrné trojnásobné navýšení. To je způsobeno tím, že absorbance není přímo úměrná koncentraci v celém rozsahu, ale pouze do hodnoty cca 1,0. Takový trend napovídá, že v izolovaných frakcích IgY S_A a S_B je větší množství protilátek specificky rozpoznávající peptid cytochromu P450 2W1 nebo že tyto protilátky mají vyšší aviditu.

Jelikož izolované IgY frakce obsahují kromě protilátek rozpoznávající peptidy cytochromů P450 také imunoglobuliny proti mnoha dalším antigenům, bylo nutné specifické protilátky purifikovat, aby nedocházelo ke křížovým reakcím. Proto byla provedena afinitní chromatografie, kdy byl na kolonu navázán příslušný peptid. Průběh afinitní purifikace byl sledován metodou ELISA (Obrázek 19-22).

Viditelný rozdíl mezi absorbancemi na ELISA afinitně nepurifikované a purifikované (eluována pomocí vysokého pH roztoku DEA) protilátky S_A na Obrázku 19 naznačuje, že afinitní chromatografie proběhla úspěšně. Srovnání absorbancí kontroly a podílu nezachyceného na kolonu nicméně ukazuje, že v této frakci zbývá část specifických protilátek. K jejich získání by bylo možno celý proces purifikace opakovat.

Přestože rozdíl mezi absorbancemi afinitně nepurifikované a purifikované protilátky S_B na Obrázku 20 není velký, dá se přesto usuzovat, že specifické protilátky byly z větší části purifikovány. To potvrzuje minimální rozdíl mezi absorbancemi kontrolní IgY a frakcí po afinitní chromatografii s nezachyceným IgY. Za použití zvýšené iontové síly (1M NaCl v PBS) bylo z kolony eluováno velké množství specifické protilátky, což může ukazovat na slabou vazbu mezi antigenem a protilátkou nebo na poškození protilátky během práce.

Také purifikace protilátky W_A proběhla úspěšně (viz Obrázek 21). Po afinitní chromatografii výrazně stoupla absorbance u purifikované frakce po eluci DEA a ve frakci, která se nenavázala na peptid na koloně, zůstal pouze malý podíl specifických protilátek.

Průběh purifikace specifické protilátky W_B dokumentuje Obrázek 22, který je velmi podobný Obrázku 13. Ze srovnání hodnot absorbancí při 405 nm z ELISA nepurifikovaného IgY a IgY eluovaného DEA je zřejmé, že afinitní purifikace proběhla úspěšně. V IgY frakci, která nebyla zachycena na koloně, zůstalo jen malé množství specifických protilátek.

Ze všech čtyřech protilátek se tedy podařilo purifikovat specifické protilátky. Dá se také konstatovat, že i delší expozice protilátek vysokému pH v průběhu 2. eluce specifické frakce nepoškodila IgY, protože i protilátky získané v této frakci jsou schopné rozpoznat antigen. Specifické protilátky představují přibližně 2 - 10 % z celé frakce IgY.⁸⁹

K imunodetekci celých cytochromů P450 byly vybrány buněčné linie exprimující CYP2S1 a 2W1. CYP2S1 by měl být exprimován v buněčných liniích A549³⁶ a MT-3, CYP2W1 by se měl nacházet v buněčné linii MCF-7.⁷⁸ Jako negativní kontrola byla použita linie MRC-5.

Po provedení elektroforézy (Obrázek 23) bylo patrné, že v lyzátech buněčných kultur se cytochromy P450 nenacházejí ve velkém množství. Pouze u *E. coli*, u níž byla exprese CYP2S1 indukována pomocí IPTG, je viditelný silný proužek v oblasti 50 kDa, který by mohl odpovídat cytochromu P450.

Pro ověření schopnosti protilátek rozpoznat cytochromy P450 byl proveden "Western blot". Nejprve bylo zjišťováno, zda se během afinitní chromatografie podařilo purifikovat specifické protilátky. Za tímto účelem byly porovnány výsledky za použití různých připravených primárních protilátek – kontrolní protilátka izolovaná před imunizací, protilátka nepurifikovaná afinitní chromatografií a specifická protilátka purifikovaná afinitní chromatografií. Na Obrázcích 24 a 25 nejsou viditelné žádné specificky detekované zóny v oblasti mobility cytochromů P450. Nicméně u protilátek W_A a W_B (Obrázky 26 a 27) je patrné, že se afinitní chromatografií odstranily protilátky, které rozeznávaly i jiné proteiny než cytochromy P450.

U vybraných buněčných linií se téměř nepodařilo detekovat cytochromy P450 2S1 ani 2W1. U buněčných linií A549³⁶ a MT-3 (stanoveno RNDr. Pavlem Součkem, CSc.) byly stanoveny pouze vysoké hladiny mRNA CYP2S1, ale nebyla prokázána exprese proteinu. Je tedy možné, že k translaci proteinu v těchto buňkách nedochází nebo naopak je CYP2S1 rychle degradován. U buněčné linie MCF-7 byl CYP2W1 detekován i pomocí "Western blotu".⁷⁸ Nicméně byly použity jiné postupy při získání lyzátů a během "Western blotu". K získání proteinů byl použit jiný detergent (NP-40). Dále bylo během "Western blotu" aplikováno na jamku 50 µg proteinu, zatímco v této diplomové práci se nanášelo pouze cca 27 µg na jamku. Je tedy možné, že CYP2W1 nebyl dostatečně koncentrován, aby mohl být detekován na membráně. Tan et al.⁷⁸ také používal sekundární protilátku značenou křenovou peroxidasou a detekce pomocí chemiluminiscence je citlivější než kolorimetrie.

Schopnost detekovat CYP2S1 protilátkami S_A a S_B byla prokázána pomocí "Western blotu" suspenze *E. coli* (Obrázky 28 a 29), který sloužil jako expresní systém CYP2S1. Po indukci exprese pomocí IPTG je na membráně zřetelný silný proužek v oblasti kolem 50 kDa příslušící CYP2S1. Protilátka S_A rozpoznává v suspenzi *E. coli* i další proteiny v celém rozmezí molekulových hmotností. Jelikož se stejná interference neobjevuje i u *E. coli* před indukcí IPTG je možné, že příčina souvisí s expresí dalších proteinů z expresního vektoru. Protilátka S_A dokázala detekovat CYP2S1 i u lyzátu buněčné linie MT-3, kde se tento protein vyskytuje pravděpodobně ve značně malém množství. To svědčí o vysoké aviditě této protilátky k CYP2S1. Protilátka S_B pravděpodobně váže CYP2S1 slaběji, neboť nedokázala rozpoznat daný protein u buněčné linie MT-3. Také vykazuje křížovou reakci s neznámým proteinem z lyzátu buněčné linie MRC-5. To může být dáno tím, že by se mohla vybraná sekvence pro přípravu imunogenu částečně shodovat i s primární strukturou daného proteinu.

Připravené protilátky S_A a S_B jsou tedy schopné rozpoznat CYP2S1 a je možné je použít k imunodetekci cytochromu P450. U protilátek W_A a W_B nebyla schopnost imunodetekce CYP2W1 jednoznačně prokázána a je ještě nutné provést další experimenty.

6 Souhrn

Cílem této diplomové práce bylo připravit slepičí anti-peptidové protilátky k imunodetekci CYP2S1 a 2W1.

Z aminokyselinových sekvencí cytochromů P450 2S1 a 2W1 byly proto vybrány následující peptidy, které splňovaly výběrová kritéria sekvenční jedinečnosti, povrchové expozice, absence uspořádané sekundární struktury a imunogenicity: KQVRPTDLHSTTQTR a CPPDTLSLKPTVS pro CYP2S1, TMRPRAQALC a CPGVSPASLDTTP pro CYP2W1.

Vybrané syntetické peptidy byly poté navázány na proteinový nosič KLH. Konjugace probíhala jednak přes thiolovou skupinu terminálního cysteinu peptidu, jednak přes aminoskupiny lysinu peptidu pomocí síťovacího činidla EDC. Připravenými konjugáty byly imunizovány slepice.

Po imunizaci byly z vaječných žloutků izolovány protilátky dvou krokovou metodou zahrnující extrakční a precipitační metody pomocí NaCl. Touto jednoduchou, levnou a rychlou metodou bylo získáno cca 112 - 239 mg IgY z jednoho žloutku. Schopnost protilátek rozpoznat daný peptid byla prokázána metodou ELISA.

Pro získání pouze specifických imunoglobulinů byla provedena afinitní chromatografie. Na kolonu byl nejprve navázán peptid a po inkubaci s protilátkou byly specifické imunoglobuliny uvolněny vysokým pH. Průběh purifikace byl sledován metodou ELISA, která potvrdila získání specifických protilátek.

Schopnost imunodetekce protilátek byla zkoumána metodou "Western blot". Jako biologické vzorky byly použity lyzáty z buněčných linií A549, MT-3 a MCF-7. Pouze jedna protilátka dokázala detekovat CYP2S1 v lyzátu MT-3 a ani jedna nedetekovala CYP2W1. Dalším vzorkem byla suspenze *E. coli* se zavedeným plasmidem pro expresi CYP2S1. Exprimovaný CYP2S1 byl rozpoznán oběma připravenými protilátkami.

Závěrem lze konstatovat, že byly připraveny dvě anti-peptidové slepičí protilátky schopné imunodetekce CYP2S1 a dvě protilátky, u nichž bude ještě nutné schopnost detekovat CYP2W1 potvrdit.

Seznam použité literatury

1. Meigs, R. A. and Ryan, K. J.: Enzymatic aromatization of steroids. I. Effects of oxygen and carbon monoxide on the intermediate steps of estrogen biosynthesis. *J Biol Chem* **1971**, *246* (1), 83-7.
2. Andersson, S.; Davis, D. L.; Dahlback, H.; Jornvall, H. and Russell, D. W.: Cloning, structure, and expression of the mitochondrial cytochrome P-450 sterol 26-hydroxylase, a bile acid biosynthetic enzyme. *J Biol Chem* **1989**, *264* (14), 8222-9.
3. Atkin, S. D.; Palmer, E. D.; English, P. D.; Morgan, B.; Cawthorne, M. A. and Green, J.: The role of cytochrome P-450 in cholesterol biogenesis and catabolism. *Biochem J* **1972**, *128* (2), 237-42.
4. Capdevila, J.; Marnett, L. J.; Chacos, N.; Prough, R. A. and Estabrook, R. W.: Cytochrome P-450-dependent oxygenation of arachidonic acid to hydroxyicosatetraenoic acids. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1982**, *79* (3), 767-70.
5. Vatsis, K. P.; Theoharides, A. D.; Kupfer, D. and Coon, M. J.: Hydroxylation of prostaglandins by inducible isozymes of rabbit liver microsomal cytochrome P-450. Participation of cytochrome b5. *J Biol Chem* **1982**, *257* (19), 11221-9.
6. Hodgson, E.: *Textbook of Modern Toxicology*. 3. ed.; John Wiley & Sons, New Jersey, USA, 2004; p. 119-128.
7. Klingenberg, M.: Pigments of rat liver microsomes. *Arch Biochem Biophys* **1958**, *75* (2), 376-86.
8. Omura, T. and Sato, R.: A new cytochrome in liver microsomes. *J Biol Chem* **1962**, *237*, 1375-6.
9. Lu, A. Y. and Coon, M. J.: Role of hemoprotein P-450 in fatty acid omega-hydroxylation in a soluble enzyme system from liver microsomes. *J Biol Chem* **1968**, *243* (6), 1331-2.
10. Kaschnitz, R. M. and Coon, M. J.: Drug and fatty acid hydroxylation by solubilized human liver microsomal cytochrome P-450-phospholipid requirement. *Biochem Pharmacol* **1975**, *24* (2), 295-7.
11. Fujii-Kuriyama, Y.; Mizukami, Y.; Kawajiri, K.; Sogawa, K. and Muramatsu, M.: Primary structure of a cytochrome P-450: coding nucleotide sequence of phenobarbital-inducible cytochrome P-450 cDNA from rat liver. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1982**, *79* (9), 2793-7.
12. Nelson, D. R.: A world of cytochrome P450s. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **2013**, *368* (1612).

13. de Montellano, P. R. O.: Models and mechanisms of cytochrome P450 action. In *Cytochrome P450: Structure, Mechanism, and Biochemistry*. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, USA, 2005; p. 1-2.
14. Nebert, D. W.; Adesnik, M.; Coon, M. J.; Estabrook, R. W.; Gonzalez, F. J.; Guengerich, F. P.; Gunsalus, I. C.; Johnson, E. F.; Kemper, B. and Levin, W.: The P450 gene superfamily: recommended nomenclature. *DNA* **1987**, *6* (1), 1-11.
15. Nelson, D. R.; Kamataki, T.; Waxman, D. J.; Guengerich, F. P.; Estabrook, R. W.; Feyereisen, R.; Gonzalez, F. J.; Coon, M. J.; Gunsalus, I. C. and Gotoh, O.: The P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers, early trivial names of enzymes, and nomenclature. *DNA Cell Biol* **1993**, *12* (1), 1-51.
16. Nelson, D. R. The cytochrome P450 homepage.
<http://drnelson.uthsc.edu/CytochromeP450.html> (navštíveno 30. 4. 2013).
17. Guengerich, F. P.: Common and uncommon cytochrome P450 reactions related to metabolism and chemical toxicity. *Chem Res Toxicol* **2001**, *14* (6), 611-50.
18. Guengerich, F. P.: Mechanisms of cytochrome P450 substrate oxidation: MiniReview. *J Biochem Mol Toxicol* **2007**, *21* (4), 163-8.
19. Lin, J. H. and Lu, A. Y.: Inhibition and induction of cytochrome P450 and the clinical implications. *Clin Pharmacokinet* **1998**, *35* (5), 361-90.
20. Fujii-Kuriyama, Y. and Mimura, J.: Molecular mechanisms of AhR functions in the regulation of cytochrome P450 genes. *Biochem Biophys Res Commun* **2005**, *338* (1), 311-7.
21. Timsit, Y. E. and Negishi, M.: CAR and PXR: the xenobiotic-sensing receptors. *Steroids* **2007**, *72* (3), 231-46.
22. Kliewer, S. A.; Goodwin, B. and Willson, T. M.: The nuclear pregnane X receptor: a key regulator of xenobiotic metabolism. *Endocr Rev* **2002**, *23* (5), 687-702.
23. Berger, J. and Moller, D. E.: The mechanisms of action of PPARs. *Annu Rev Med* **2002**, *53*, 409-35.
24. Stedman, T. L.: *The American Heritage Stedman's medical dictionary*. 2. ed.; Houghton Mifflin Co., Boston, USA, 2004.
25. Morse, M. A. and Stoner, G. D.: Cancer chemoprevention: principles and prospects. *Carcinogenesis* **1993**, *14* (9), 1737-46.
26. Steven H. Woolf, M. D.; Jonas, S. and Evonne Kaplan-Liss, M. D.: *Health promotion and disease prevention in clinical practice*. Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, USA, 2008; p. 346.
27. Český statistický úřad: Zemřelí podle seznamu příčin smrti, pohlaví a věku v ČR, krajích a okresech (2000 až 2009).

http://www.czso.cz/csu/2010edicniplan.nsf/kapitola/4017-10-%282000_az_2009%29-01 (navštíveno 25. 3. 2013).

28. Tsuda, H.; Ohshima, Y.; Nomoto, H.; Fujita, K.; Matsuda, E.; Iigo, M.; Takasuka, N. and Moore, M. A.: Cancer prevention by natural compounds. *Drug Metab Pharmacokinet* **2004**, *19* (4), 245-63.
29. Bjelakovic, G.; Nikolova, D.; Gluud, L. L.; Simonetti, R. G. and Gluud, C.: Antioxidant supplements for prevention of mortality in healthy participants and patients with various diseases. *Cochrane Database Syst Rev* **2008**, (2), CD007176.
30. Hodek, P.; Krizkova, J.; Burdova, K.; Sulc, M.; Kizek, R.; Hudecek, J. and Stiborova, M.: Chemopreventive compounds--view from the other side. *Chem Biol Interact* **2009**, *180* (1), 1-9.
31. Guengerich, F. P.: Cytochrome P450 and chemical toxicology. *Chem Res Toxicol* **2008**, *21* (1), 70-83.
32. Guengerich, F. P.; Wu, Z. L. and Bartleson, C. J.: Function of human cytochrome P450s: characterization of the orphans. *Biochem Biophys Res Commun* **2005**, *338* (1), 465-9.
33. Mangelsdorf, D. J. and Evans, R. M.: The RXR heterodimers and orphan receptors. *Cell* **1995**, *83* (6), 841-50.
34. Rylander, T.; Neve, E. P.; Ingelman-Sundberg, M. and Oscarson, M.: Identification and tissue distribution of the novel human cytochrome P450 2S1 (CYP2S1). *Biochem Biophys Res Commun* **2001**, *281* (2), 529-35.
35. Smith, G.; Wolf, C. R.; Deeni, Y. Y.; Dawe, R. S.; Evans, A. T.; Comrie, M. M.; Ferguson, J. and Ibbotson, S. H.: Cutaneous expression of cytochrome P450 CYP2S1: individuality in regulation by therapeutic agents for psoriasis and other skin diseases. *Lancet* **2003**, *361* (9366), 1336-43.
36. Rivera, S. P.; Saarikoski, S. T. and Hankinson, O.: Identification of a novel dioxin-inducible cytochrome P450. *Mol Pharmacol* **2002**, *61* (2), 255-9.
37. Kumarakulasingham, M.; Rooney, P. H.; Dundas, S. R.; Telfer, C.; Melvin, W. T.; Curran, S. and Murray, G. I.: Cytochrome P450 profile of colorectal cancer: identification of markers of prognosis. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **2005**, *11* (10), 3758-65.
38. Downie, D.; McFadyen, M. C.; Rooney, P. H.; Cruickshank, M. E.; Parkin, D. E.; Miller, I. D.; Telfer, C.; Melvin, W. T. and Murray, G. I.: Profiling cytochrome P450 expression in ovarian cancer: identification of prognostic markers. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **2005**, *11* (20), 7369-75.
39. Karlgren, M.; Gomez, A.; Stark, K.; Svard, J.; Rodriguez-Antona, C.; Oliw, E.; Bernal, M. L.; Ramon y Cajal, S.; Johansson, I. and Ingelman-Sundberg, M.: Tumor-specific

- expression of the novel cytochrome P450 enzyme, CYP2W1. *Biochem Biophys Res Commun* **2006**, *341* (2), 451-8.
40. Edler, D.; Stenstedt, K.; Ohrling, K.; Hallstrom, M.; Karlgren, M.; Ingelman-Sundberg, M. and Ragnhammar, P.: The expression of the novel CYP2W1 enzyme is an independent prognostic factor in colorectal cancer - a pilot study. *Eur J Cancer* **2009**, *45* (4), 705-12.
 41. Wu, Z. L.; Sohl, C. D.; Shimada, T. and Guengerich, F. P.: Recombinant enzymes overexpressed in bacteria show broad catalytic specificity of human cytochrome P450 2W1 and limited activity of human cytochrome P450 2S1. *Mol Pharmacol* **2006**, *69* (6), 2007-14.
 42. Li, W.; Tang, Y.; Hoshino, T. and Neya, S.: Molecular modeling of human cytochrome P450 2W1 and its interactions with substrates. *J Mol Graph Model* **2009**, *28* (2), 170-6.
 43. Hořejší, V. and Bartůňková, J.: *Základy imunologie*. 4. ed.; Triton, Praha, ČR, 2009; p. 64-69, 161.
 44. Zhai, R. and Zhu, X. Z.: Production of anti-peptide antibody of rat brain nitric-oxide synthase. *Zhongguo Yao Li Xue Bao* **1997**, *18* (3), 204-8.
 45. Lipman, N. S.; Jackson, L. R.; Trudel, L. J. and Weis-Garcia, F.: Monoclonal versus polyclonal antibodies: distinguishing characteristics, applications, and information resources. *ILAR J* **2005**, *46* (3), 258-68.
 46. Kohler, G. and Milstein, C.: Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* **1975**, *256* (5517), 495-7.
 47. Schroeder, H. W., Jr. and Cavacini, L.: Structure and function of immunoglobulins. *J Allergy Clin Immunol* **2010**, *125* (2 Suppl 2), S41-52.
 48. Carlander, D.; Stalberg, J. and Larsson, A.: Chicken antibodies: a clinical chemistry perspective. *Ups J Med Sci* **1999**, *104* (3), 179-89.
 49. Leslie, G. A. and Clem, L. W.: Phylogen of immunoglobulin structure and function. 3. Immunoglobulins of the chicken. *J Exp Med* **1969**, *130* (6), 1337-52.
 50. Kovacs-Nolan, J. and Mine, Y.: Avian egg antibodies: basic and potential applications. *Avian Poultry Biol Rev* **2004**, *15* (1), 25-46.
 51. Warr, G. W.; Magor, K. E. and Higgins, D. A.: IgY: clues to the origins of modern antibodies. *Immunol Today* **1995**, *16* (8), 392-8.
 52. Gassmann, M.; Thommes, P.; Weiser, T. and Hubscher, U.: Efficient production of chicken egg yolk antibodies against a conserved mammalian protein. *FASEB J* **1990**, *4* (8), 2528-32.
 53. Larsson, A.; Carlander, D. and Wilhelmsson, M.: Antibody response in Laying Hens with Small Amounts of antigen. *Food Agr Immunol* **1998**, *10* (1), 29-36.

54. Woolley, J. A. and Landon, J.: Comparison of antibody production to human interleukin-6 (IL-6) by sheep and chickens. *J Immunol Methods* **1995**, 178 (2), 253-65.
55. Hatta, H.; Kim, M. and Yamamoto, T.: A novel isolation method for hen egg yolk antibody, "IgY". *Agric Biol Chem* **1990**, 54 (10), 2531-5.
56. Hatta, H.; Tsuda, K.; Akachi, S.; Kim, M. and Yamamoto, T.: Productivity and some properties of egg yolk antibody (IgY) against human rotavirus compared with rabbit IgG. *Biosci Biotechnol Biochem* **1993**, 57 (3), 450-4.
57. Carlander, D. and Larsson, A.: Avian antibodies can eliminate interference due to complement activation in ELISA. *Ups J Med Sci* **2001**, 106 (3), 189-95.
58. Larsson, A.; Karlsson-Parra, A. and Sjoquist, J.: Use of chicken antibodies in enzyme immunoassays to avoid interference by rheumatoid factors. *Clin Chem* **1991**, 37 (3), 411-4.
59. Jin, W.; Yamada, K.; Ikami, M.; Kaji, N.; Tokeshi, M.; Atsumi, Y.; Mizutani, M.; Murai, A.; Okamoto, A.; Namikawa, T.; Baba, Y. and Ohta, M.: 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**.
60. Hoffman, W. L.; Ruggles, A. O. and Tabarya, D.: Chicken anti-protein A prevents Staphylococcus aureus protein A from binding to human and rabbit IgG in immunoassays and eliminates most false positive results. *J Immunol Methods* **1996**, 198 (1), 67-77.
61. Berube, B.; Coutu, L.; Lefievre, L.; Begin, S.; Dupont, H. and Sullivan, R.: The elimination of keratin artifacts in immunoblots probed with polyclonal antibodies. *Anal Biochem* **1994**, 217 (2), 331-3.
62. Paul-Pletzer, K. and Parness, J.: Elimination of keratin contaminant from 2-mercaptoethanol. *Anal Biochem* **2001**, 289 (1), 98-9.
63. Lee, T. F. and McNellis, T. W.: Elimination of keratin artifact bands from western blots by using low concentrations of reducing agents. *Anal Biochem* **2008**, 382 (2), 141-3.
64. Smyth, D. G.; Blumenfeld, O. O. and Konigsberg, W.: Reactions of N-ethylmaleimide with peptides and amino acids. *Biochem J* **1964**, 91 (3), 589-95.
65. ThermoFisher Scientific. <http://www.thermofisher.com> (navštíveno 4. 4. 2013).
66. Nakajima, N. and Ikada, Y.: Mechanism of amide formation by carbodiimide for bioconjugation in aqueous media. *Bioconjug Chem* **1995**, 6 (1), 123-30.
67. Butler, P. J.; Harris, J. I.; Hartley, B. S. and Leberman, R.: The use of maleic anhydride for the reversible blocking of amino groups in polypeptide chains. *Biochem J* **1969**, 112 (5), 679-89.

68. Butler, P. J.; Harris, J. I.; Hartley, B. S. and Leberman, R.: Reversible blocking of peptide amino groups by maleic anhydride. *Biochem J* **1967**, *103* (3), 78P-79P.
69. Akita, E. M. and Nakai, S.: Immunoglobulins from Egg-Yolk - Isolation and Purification. *J Food Sci* **1992**, *57* (3), 629-634.
70. Jensenius, J. C.; Andersen, I.; Hau, J.; Crone, M. and Koch, C.: Eggs - Conveniently Packaged Antibodies - Methods for Purification of Yolk Igg. *Journal of Immunological Methods* **1981**, *46* (1), 63-68.
71. Polson, A.; von Wechmar, M. B. and van Regenmortel, M. H.: Isolation of viral IgY antibodies from yolks of immunized hens. *Immunol Commun* **1980**, *9* (5), 475-93.
72. Fichtali, J.; Charter, E. A.; Lo, K. V. and Nakai, S.: Purification of Antibodies from Industrially Separated Egg-Yolk. *J Food Sci* **1993**, *58* (6), 1282-1285.
73. Hodek, P.; Trefil, P.; Simunek, J.; Hudecek, J. and Stiborova, M.: Optimized Protocol of Chicken Antibody (IgY) Purification Providing Electrophoretically Homogenous Preparations. *Int J Electrochem Sc* **2013**, *8* (1), 113-124.
74. Holiday, E. R.: Spectrophotometry of proteins: Absorption spectra of tyrosine, tryptophan and their mixtures. *Biochem J* **1936**, *30* (10), 1795-803.
75. Engvall, E. and Perlmann, P.: Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry* **1971**, *8* (9), 871-4.
76. Smythe, C. V.: The reactions of iodoacetate and of iodoacetamide with various sulfhydryl groups, with urease, and with yeast preparations. *J Biol Chem* **1936**, *114* (3), 601-612.
77. Porath, J.; Axen, R. and Ernback, S.: Chemical coupling of proteins to agarose. *Nature* **1967**, *215* (5109), 1491-2.
78. Tan, B. S.; Tiong, K. H.; Muruhadas, A.; Randhawa, N.; Choo, H. L.; Bradshaw, T. D.; Stevens, M. F. and Leong, C. O.: CYP2S1 and CYP2W1 mediate 2-(3,4-dimethoxyphenyl)-5-fluorobenzothiazole (GW-610, NSC 721648) sensitivity in breast and colorectal cancer cells. *Molecular cancer therapeutics* **2011**, *10* (10), 1982-92.
79. Smith, P. K.; Krohn, R. I.; Hermanson, G. T.; Mallia, A. K.; Gartner, F. H.; Provenzano, M. D.; Fujimoto, E. K.; Goeke, N. M.; Olson, B. J. and Klenk, D. C.: Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* **1985**, *150* (1), 76-85.
80. Laemmli, U. K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **1970**, *227* (5259), 680-5.
81. Towbin, H.; Staehelin, T. and Gordon, J.: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1979**, *76* (9), 4350-4.
82. ProtScale. <http://web.expasy.org/protscale/> (navštiveno 1. 8. 2013).

83. Consensus Secondary Structure Prediction. http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_secons.html (navštíveno 1. 8. 2013).
84. Kakizoe, T.: Chemoprevention of cancer--focusing on clinical trials. *Japanese journal of clinical oncology* **2003**, 33 (9), 421-42.
85. Agents classified by the IARC
<http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/ClassificationsGroupOrder.pdf>
(navštíveno 19. 8. 2013).
86. Guengerich, F. P. and Shimada, T.: Oxidation of toxic and carcinogenic chemicals by human cytochrome P-450 enzymes. *Chem Res Toxicol* **1991**, 4 (4), 391-407.
87. Trier, N. H.; Hansen, P. R. and Houen, G.: Production and characterization of peptide antibodies. *Methods* **2012**, 56 (2), 136-44.
88. Akita, E. M. and Nakai, S.: Comparison of four purification methods for the production of immunoglobulins from eggs laid by hens immunized with an enterotoxigenic E. coli strain. *J Immunol Methods* **1993**, 160 (2), 207-14.
89. Michael, A.; Meenatchisundaram, S.; Parameswari, G.; Subbraj, T.; Selvakumaran, R. and Ramalingam, S.: Chicken egg yolk antibodies (IgY) as an alternative to mammalian antibodies *Indian J Sci Technol* **2010**, 3 (4), 468-474.

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

Jméno a příjmení	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka