

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta
Katedra Fyziologie živočichů a vývojové biologie

**Kalretikulin – autoantigén u autoimunitních a
nádorových onemocnění**

Aneta Pekáriková

Praha, 2007

Vedúci diplomovej práce: Doc. RNDr. Ludmila Tučková, DrSc.

Prehlasujem, že som túto prácu vypracovala samostatne s použitím citovanej literatúry a pod vedením vedúceho diplomovej práce.

Pod'akovanie

Ďakujem mojej školiteľke Doc. RNDr. Ludmile Tučkovej, DrSc. za odborné vedenie mojej diplomovej práce, za cenné rady a konzultácie pri jej vypracovaní.

Moja vďaka patrí i prof. MUDr. Helene Tlaskalovej, DrSc. za pomoc a odborné pripomienky k diplomovej práci.

Ďalej by som rada poďakovala Ing. Danielovi Sánchezovi, Ph.D. za neoceniteľnú pomoc, ochotu a trpezlivosť, s ktorou sa mi venoval počas celého môjho pôsobenia v laboratóriu.

Ďakujem i ostatným členom nášho laboratória, menovite Mgr. Jane Cínovej, Pavle Kašparovej, MUDr. Andrei Kitanovičovej, Ing. Barbare Pecharovej a Mgr. Petrovi Šotkovskému za vytváranie príjemného pracovného prostredia.

Ďakujem MUDr. Ive Hoffmanovej z Fakultnej nemocnice Královské Vinohrady, prednostovi MUDr. Zdeňkovi Benešovi z Thomayerovej nemocnice a MUDr. Pavlovi Drastichovi z IKEMu, ktorí nám poskytli vzorky sér a klinické dáta pacientov. Bez nich by táto práca nemohla vzniknúť.

V neposlednom rade chcem poďakovať i mojej rodine za podporu po celé obdobie štúdia.

Táto diplomová práca vznikala v rokoch 2004 – 2007 a bola finančne podporovaná z grantových projektov 310/03/H147, NPVII637, 310/07/0414 Grantovej agentúry ČR a grantom A500200709 AV ČR, v.v.i..

Kalretikulin – autoantigén u autoimunitných a nádorových ochorení

Úvod: Kalretikulin, vápnik viažuci proteín a chaperon, je častý autoantigén u autoimunitných ochorení. Nedávno boli protilátky proti kalretikulínu (CRT) preukázané v sérach niektorých pacientov s karcinómom pečene (CaH) a pankreasu (CaP) použitím kombinácie dvojrozmernej elektroforézy a Western blotu. **Ciele:** Cieľom tejto práce bolo **a)** kvantifikovať hladiny IgA a IgG protilátok proti CRT v sérach pacientov s CaH, CaP (metastazujúcimi, nemetastazujúcimi), nádorom hrubého čreva, pankreatitídou a vírusovou hepatitídou, **b)** analyzovať antigénne epitopy CRT, **c)** pripraviť prvú polovicu ľudského rekombinantného CRT. **Metódy:** Priamym ELISA testom s ľudským rekombinantným CRT sme testovali výšky hladín sérových protilátok. Metódou PEPSCAN so syntetickými dekapeptidmi CRT sme analyzovali antigénne epitopy CRT rozpoznávané IgA a IgG protilátkami v sérach pacientov s CaH a CaP. Rekombinantnou technológiou bola pripravená a následne afinitnou chromatografiou izolovaná prvá polovica ľudského rekombinantného CRT. **Výsledky:** **a)** V porovnaní s kontrolnými sérami zdravých krvných darcov (2/35) sme preukázali signifikantne zvýšené hladiny IgA anti-CRT protilátok u pacientov s CaH ($P < 0,01$, 8/13), CaP ($P < 0,05$, 17/38), CaP s metastázami v pečeni ($P < 0,01$, 2/8) a pankreatitídou ($P < 0,05$, 4/14). Signifikantne zvýšené hladiny IgG anti-CRT protilátok boli detegované u pacientov s CaH ($P < 0,01$, 8/13) a CaP ($P < 0,01$, 15/38) v porovnaní s kontrolnými sérami zdravých krvných darcov (2/35); **b)** IgA protilátky všetkých pacientov s CaH a CaP reagovali s aminokyselinovými sekvenciami EVKIDNSQVESG a RKEEEEAEDKED na molekule CRT. IgG protilátky pacientov s CaH i CaP rozpoznávali spoločnú aminokyselinovú sekvenciu EEDKKRKEEEEAEDKED, s nižšou frekvenciou i peptidy FAEAPFSNKGQT, ERAKIDDPTD a DKAPEHIPDP; **c)** Prvá polovica rekombinantného CRT bola po expresii v *E.coli* viazaná na bunkové inklúzie, preto sme ju museli solubilizovať roztokom močoviny a izolovať za denaturačných podmienok. **Záver:** Naše výsledky poukazujú na pravdepodobnú existenciu epitopov špecificky rozpoznávaných protilátkami pacientov s onkologickými ochoreniami. Testovanie protilátok proti týmto epitopom by mohlo slúžiť k diagnostickým či prognostickým účelom.

Kľúčové slová: kalretikulin, protilátky, nádory pečene, nádory pankreasu, antigénne epitopy, ELISA, PEPSCAN

Calreticulin – an autoantigen in autoimmune and tumor diseases

Introduction: Calreticulin, a calcium binding protein and chaperon, is a common autoantigen in autoimmune diseases. Antibodies (Ab) against calreticulin (CRT) were recently detected in sera of some patients with hepatocellular carcinoma (CaH) and pancreatic tumors (CaP) using a combination of two-dimensional electrophoresis and Western blotting. **Aims:** The aims of this study were a) to quantify the levels of IgA and IgG Ab against CRT in sera of patients with CaH, CaP (metastatic, non metastatic), colorectal carcinoma, pancreatitis and viral hepatitis. b) to analyse the antigenic epitopes of CRT, c) to prepare the first half of human recombinant CRT. **Methods:** Direct ELISA test with human recombinant CRT as antigen was used for testing the levels of serum Ab. Antigenic epitopes of CRT recognised by serum IgA and IgG Ab were analysed by PEPSCAN method in patients with CaH and CaP. The first half of human recombinant CRT was prepared by recombinant technology and subsequently purified by affinity chromatography. **Results:** We found significantly elevated levels of IgA anti-CRT Ab in sera of patients with CaH ($P < 0,01$, 8/13), CaP ($P < 0,05$, 17/38), CaP with liver metastasis ($P < 0,01$, 2/8) and pancreatitis ($P < 0,05$, 4/14) in contrast to healthy controls (2/35). Significantly elevated levels of IgG anti-CRT Ab were detected in sera of patients with CaH ($P < 0,01$, 8/13) and CaP ($P < 0,01$, 15/38) in contrast to healthy controls (2/35); b) IgA Ab of all patients with CaH and CaP reacted with amino acid sequences EVKIDNSQVESG and RKEEEEAEDKED on CRT molecule. IgG Ab of patients with CaH and CaP bound the same amino acid sequence EEDKKRKEEEEAEDKED and with lower frequency also the peptides FAEAPFSNKGQT, ERAKIDDPTD and DKAPEHIPDP, c) The first half of human recombinant CRT was associated with inclusion bodies after its cell expression; for this reason we solubilised this fragment by urea and subsequently purified it under denaturising conditions. **Conclusions:** Our results suggest the existence of epitopes specifically recognised by Ab of both patients with CaH and CaP. Testing of the Ab specifically binding the epitopes could be useful for diagnostic or prognostic purposes.

Key words: calreticulin, antibodies, hepatocellular carcinoma, pancreatic tumors, antigenic epitopes, ELISA, PEPSCAN

OBSAH

| | |
|---|----|
| 1. Zoznam skratiek..... | 8 |
| 2. Úvod..... | 10 |
| 3. Prehľad literatúry | 11 |
| 3.1. Nádory a nádorové antigény, protinádorová imunita..... | 11 |
| 3.2. Kalretikulin | 14 |
| 3.2.1. Štruktúra kalretikulinu | 14 |
| 3.2.2. Lokalizácia kalretikulinu | 16 |
| 3.2.3. Biologické vlastnosti kalretikulinu | 17 |
| 3.2.3.1. Kalretikulin ako chaperon | 17 |
| 3.2.3.2. Kalretikulin ako regulátor Ca^{2+} homeostázy | 18 |
| 3.2.3.3. Úloha kalretikulinu v embryogenéze | 18 |
| 3.2.3.4. Ovplyvnenie bunkovej adhézie kalretikulinom..... | 18 |
| 3.2.3.5. Vplyv kalretikulinu na génovú expresiu steroidných hormónov | 19 |
| 3.2.3.6. Úloha kalretikulinu pri fagocytóze apoptických buniek | 19 |
| 3.2.4. Interakcia kalretikulinu s extracelulárnymi a intracelulárnymi | 20 |
| molekulami | 20 |
| 3.3. Výskyt autoprotilátok proti kalretikulinu | 20 |
| 3.4. Analýza antigénnych epitopov kalretikulinu rozpoznávaných | 21 |
| antikalretikulinovými protilátkami | 21 |
| 3.5. Príčiny autoreaktivity proti kalretikulinu | 22 |
| 3.6. Nádorové markery..... | 24 |
| 3.7. Onkologické ochorenia a kalretikulin | 25 |
| 3.7.1. Nádory pečene..... | 26 |
| 3.7.1.1. Karcinóm pečene a rizikové faktory | 26 |
| 3.7.1.2. Karcinóm pečene a kalretikulin..... | 27 |
| 3.7.1.3. Metastatické nádory pečene | 29 |
| 3.7.2. Nádory pankreasu | 29 |
| 3.7.2.1. Nádory pankreasu a rizikové faktory | 29 |
| 3.7.2.2. Nádory pankreasu a kalretikulin..... | 31 |
| 3.7.3. Nádory hrubého čreva..... | 32 |
| 3.7.3.1. Kolorektálny karcinóm a rizikové faktory | 32 |
| 3.7.3.2. Kolorektálny karcinóm a kalretikulin | 33 |

| | |
|---|----|
| 4. Materiály a metódy | 34 |
| 4.1. Príprava a purifikácia ľudského rekombinantného kalretikulinu a jeho fragmentov..... | 34 |
| 4.1.1. Transformácia plazmidu s kalretikulinovým fragmentom do kompetentných buniek <i>E.coli</i> BL 21 (λ DE3) a indukcia jeho expzie | 34 |
| 4.1.2. Analýza solubility 1.polovice ľudského rekombinantného kalretikulinu..... | 36 |
| 4.1.3. Purifikácia ľudského rekombinantného kalretikulinu na TALON™ Superflow™ matrix..... | 36 |
| 4.2. SDS-PAGE | 38 |
| 4.3. Western blot..... | 39 |
| 4.4. Testovanie hladín patientských protilátok proti kalretikulinu a tkanivovej transglutamináze metódou ELISA..... | 40 |
| 4.5. Analýza antigénnych epitopov kalretikulinu metódou PEPSCAN..... | 42 |
| 4.6. Štatistické spracovanie dat..... | 43 |
| 4.6.1. ELISA..... | 43 |
| 4.6.2. PEPSCAN | 43 |
| 4.7. Zoznam použitých chemikálií a prístrojov | 44 |
| 4.7.1. Zoznam použitých chemikálií | 44 |
| 4.7.2. Zoznam použitých súprav a protilátok | 45 |
| 4.7.3. Zoznam použitých prístrojov a programov..... | 46 |
| 5. Výsledky..... | 47 |
| 5.1. Purifikácia ľudského rekombinantného kalretikulinu a jeho fragmentov | 47 |
| 5.1.1. Izolácia prvej polovice kalretikulinu na Talonovej kolone | 47 |
| 5.2. Stanovenie hladín protilátok proti kalretikulinu a tkanivovej transglutamináze . | 51 |
| 5.2.1. Stanovenie hladín IgA a IgG protilátok proti kalretikulinu | 51 |
| 5.2.2. Stanovenie hladín IgA protilátok proti tkanivovej transglutamináze | 52 |
| 5.3. Analýza antigénnych epitopov kalretikulinu | 57 |
| 5.3.1. Reaktivita sérových protilátok triedy IgA s dekaeptidmi kalretikulinu..... | 58 |
| 5.3.2. Reaktivity sérových protilátok triedy IgG s dekaeptidmi kalretikulinu | 58 |
| 5.4. Zmeny hladín antikalkretikulinových protilátok a ich špecificity v priebehu ochorenia u pacientov s onkologickými ochoreniami..... | 66 |
| 6. Diskusia | 69 |
| 7. Záver | 77 |
| 8. Použitá literatúra..... | 79 |

1. ZOZNAM SKRATIEK

| | |
|----------------------|--|
| 2DE | dvojrozmerná polyakrylamidová elektroforéza |
| AFP | α -fetoproteín |
| ALP | alkalická fosfatáza |
| ALT | alanin aminotransferáza |
| AMK | aminokyselina |
| APC | adenomatous polyposis coli |
| APC | antigén prezentujúca bunka |
| AST | aspartát aminotransferáza |
| ATP | adenozintrifosfát |
| AU | arbitrary units |
| BCA | bicinchoninová kyselina |
| CaCo | karcinóm hrubého čreva |
| CaCo+ | karcinóm hrubého čreva s metastázami v pečeni |
| CaH | primárny karcinóm pečene |
| CaP | karcinóm pankreasu |
| CaP+ | karcinóm panreasu s metastázami v pečeni |
| CEA | karcinoembryonálny antigén |
| CRT | kalretikulin |
| CRT 32 | skrátená forma kalretikulinu s molekulovou hmotnosťou 32 kDa |
| CRT 18 | skrátená forma kalretikulinu s molekulovou hmotnosťou 18 kDa |
| CT | počítačová tomografia (computed tomography) |
| DNA | deoxyribonukleová kyselina |
| <i>E.coli</i> | <i>Escherichia coli</i> |
| ECL | chemiluminiscencia (enzyme conjugated luminiscence) |
| EDTA | ethylendiaminotetraoctová kyselina |
| ELISA | enzyme-linked immunosorbent assay |
| ER | endoplazmatické retikulum |
| Gp | glykoproteín |
| Ig | imunoglobulín |
| IPTG | izopropyl β -D-thiogalaktopyranosid |
| LB | Luria-Bertani |

| | |
|-------------|---|
| LRP | LDL-receptor-related protein |
| MHC | hlavný histokompatibilný komplex (major histocompatibility complex) |
| Mr | molekulová hmotnosť |
| n | počet pacientov |
| NS | nesignifikantný |
| NTA | nitrilotrioctová kyselina (nitrilotriacetic acid) |
| OPD | orthofenylendiamin |
| PBS | fosfát-fyziologický roztok (Phosphate Buffered Saline) |
| PCR | polymerázová reťazová reakcia |
| PDI | disulfid izomeráza (protein disulphid isomerase) |
| PSA | prostatický špecifický antigén |
| RI | index reaktivity |
| RNA | ribonukleotidová kyselina |
| SDS | dodecylsulfát sodný |
| SLE | systemový lupus erythematoses |
| TBS | tris-fyziologický roztok (Tris Buffered Saline) |
| Tris | tris(hydroxymetyl)aminomethan |
| UV | ultrafialové |

2. ÚVOD

Kalretikulín je vápnik viažúci chaperon a stresový proteín s celou radou ďalších biologických funkcií a častý autoantigén u autoimunitných ochorení. Táto molekula je primárne lokalizovaná v endoplazmatickom retikule, no vplyvom stresu, nekrózy či apoptózy dochádza k jej translokácii na plazmatickú membránu, do jadra či k jej uvoľneniu z buniek.

Zvýšená expresia kalretikulínu bola preukázaná v nádorových tkanivách pečene, pankreasu a hrubého čreva. Protilátky proti kalretikulínu boli detegované v sérach niektorých pacientov s karcinómom pečene a pankreasu použitím dvojrozsmernej elektroforézy (2DE) a Western blotu. Poznatky o prítomnosti a biologických vlastnostiach autoprotílátok u nádorových ochorení sú značne limitované. Doposiaľ neboli u onkologických pacientov kvantifikované sérové hladiny antikalkretikulínových protílátok. Nebol stanovený vzťah výskytu týchto protílátok k patogenéze ochorenia ani definovaný ich prognostický a diagnostický význam.

Ciele práce:

1. ELISA testom kvantifikovať hladiny protílátok proti a) kalretikulínu a b) tkanivovej transglutamináze v sérach pacientov s onkologickými ochoreniami tráviaceho traktu, pacientov rizikových skupín a kontrolných skupín zdravých krvných darcov.
2. Štatisticky vyhodnotiť výsledky testovania a získané hodnoty porovnať s klinickými a biochemickými dátami pacientov.
3. Monitorovať výšky hladín sérových antikalkretikulínových protílátok u vyššie zmienených pacientov v priebehu ochorenia.
4. Analyzovať antigénne epitopy kalretikulínu rozpoznávané sérovými protílátkami pacientov s onkologickými ochoreniami a skupiny zdravých krvných darcov metódou PEPSCAN.
5. Pre naväzujúce experimenty pripraviť prvú polovicu ľudského rekombinantného kalretikulínu procesom zahrňujúcim transformáciu produkčného kmeňa *E.coli* BL 21 (λ DE3) plazmidom obsahujúcim gén pre požadovaný proteínový fragment, indukciu expzie tohto fragmentu a jeho purifikáciu metódou afinitnej chromatografie

3. PREHLAD LITERATÚRY

3.1. NÁDORY A NÁDOROVÉ ANTIGÉNY, PROTINÁDOROVÁ IMUNITA

Bunkové delenie je za fyziologických podmienok presne regulovaný proces. Narušenie tejto regulácie môže viesť ku vzniku nádoru.

Nádory sa vo vzťahu k závažnosti ochorenia, ktoré je nimi spôsobené, schématicky členia na benígne (nezhubné) a malígne (zhubné). Benígne nádory sú väčšinou diferencované, pomaly rastú a nemajú schopnosť prenikať do ďalších tkanív hostiteľa (metastázovať). Oproti tomu malígne nádory sú horšie diferencované, rýchlejšie rastú a môžu metastázovať. Preto sú veľmi nebezpečné.

Existuje veľké množstvo nádorových typov. Najčastejšie maligné nádory pochádzajú z epiteliálnych buniek a nazývajú sa karcinómy. Z mezenchymálneho tkaniva vznikajú sarkomy. Solidné maligné nádory lymfatických tkanív sa nazývajú lymfómy a nádory lymfocytov z ostatných hematopoetických buniek leukémie.

Rozvoj nádoru býva sprevádzaný reakciou imunitného systému. Na histologickej úrovni boli preukázané mononukleárne infiltráty T lymfocytov, NK (natural killer) buniek a makrofágov v okolí niektorých typov nádorov a taktiež proliferácia lymfocytov v spádových lymfatických uzlinách. Imunitný systém dokáže špecificky rozpoznať nádorové bunky. Rozhodujúcu úlohu v tomto rozpoznávaní zohráva existencia nádorových antigénov. Tieto antigény rozdelujeme do 2 základných skupín.

Prvú skupinu tvoria nádorovo špecifické antigény (TSA, tumor-specific antigens), ktoré sa za fyziologických podmienok na bunkách nevyskytujú. Vznik týchto antigénov môže byť výsledkom mutácií, chromozomálnych translokácií, atypických postranlačných modifikácií obvyklých bunkových proteínov, expresií genómov onkogénnych vírusov či výsledkom expresií fúznych génov vzniknutých inzerciou vírusového genómu do bunkových proto-onkogénov a tumor supresorových génov.

Druhú skupinu nádorových antigénov tvoria tzv. s nádorom asociované antigény (TAA, tumor-associated antigens). Tieto antigény sa môžu nachádzať na niektorých bunkách, obvykle však v nízkych hladinách. U nádorov môžu byť tieto antigény zvýšene exprimované alebo sa môžu atypicky vyskytovať na bunkách, na ktorých sa za fyziologických podmienok nevyskytujú. Patria sem onkofetálne antigény

(karcinoembryonálny antigén (CEA), α -fetoproteín (AFP)) normálne prítomné na embryonálnych bunkách, melanómové antigény (MAGE-1, Melan-A) silne exprimované na melanómových bunkách, antigén HER/2 neu zvýšene exprimovaný na bunkách niektorých karcinómov mliečnej žľazy, adhezívna molekula EPCAM, prostatický špecifický antigén (PSA) i tzv. diferenciacné antigény leukemických buniek (CALLA- common acute lymphoblastoid antigen). Stanovenie tkanivovej alebo bunkovej expresie TAA či detekcia ich solubilných foriem v periférnej krvi sú využívané ako pomocné diagnostické markery (HOŘEJŠÍ a BARTŮŇKOVÁ 2005, ŘÍHOVÁ 2005).

V protinádorovej imunite sa uplatňujú pravdepodobne všetky zložky imunitného systému. Za hlavnú efektorovú populáciu sa však považujú $CD8^+$ cytotoxické T lymfocyty (T_c), ktoré rozpoznávajú peptidy nádorových antigénov v komplexe s MHC gp I na povrchu malígnych buniek. K zahájeniu imunitnej odpovede založenej na T_c musí prekursor T_c rozpoznať komplexy MHC gp I s nádorovými peptidmi na povrchu APC (antigen presenting cell). Cez kostimulačné a adhezívne molekuly poskytne APC prekursorom T_c signál k proliferácii a diferenciacii na klon zrelých efektorových cytotoxických buniek. Dôležitú úlohu pritom zohrávajú aj pomocné $CD4^+$ lymfocyty. Sú významnými producentmi cytokínov nevyhnutných pre konečnú diferenciaciu $CD8^+$ T lymfocytov v cytotoxické T bunky. V boji proti nádorom sa účastnia $CD4^+$ bunky taktiež sekréciou cytotoxických a rastových cytokínov; $INF-\gamma$ aktivuje makrofágy a zároveň zvyšuje expresiu MHC gp I na povrchu nádorových buniek. Oproti $CD8^+$ bunkám, $CD4^+$ bunky sú schopné rozpoznávať antigénne peptidy nádorov v komplexe s MHC gp II, ktoré sú prítomné na povrchu APC. APC im zároveň poskytujú i potrebné kostimulačné signály pre konečnú diferenciaciu a aktiváciu.

Funkcia oboch populácií lymfocytov ($CD8^+$ aj $CD4^+$) je závislá na prítomnosti APC exprimujúcich na svojom povrchu kostimulačné molekuly a komplexy MHC gp I i MHC gp II s nádorovými peptidmi. Nádorové bunky (pokiaľ nevznikajú z APC) neexprimujú na svojom povrchu kostimulačné molekuly. Rozpoznanie antigénu na bunkách neposkytujúcich druhý signál vedie k útlmu lymfocytov. Aby došlo k účinnej aktivácii T bunkových klonov špecifických pre nádorový antigén, je nutné, aby bola nádorová bunka fagocytovaná APC. Pre navodenie špecifickej protinádorovej reakcie $CD8^+$ cytotoxických buniek je preto zrejme veľmi dôležitý proces nazývaný cross-prezentácia, pri ktorom APC pohlcujú rozpadnuté nádorové bunky či z nich uvoľňované

proteíny a prezentujú ich v komplexe s MHC gp I. Tie sú rozoznané aktivovanými cytotoxickými lymfocytmi stimulovanými pomocou kostimulačných molekúl na povrchu APC. Okrem toho APC prezentujú pohltené nádorové antigény i v komplexe s MHC gp II, čím aktivujú CD4⁺ lymfocyty. Aktivované a zrelé cytotoxické lymfocyty už môžu bez ďalšej stimulácie špecificky zabíjať nádorové bunky exprimujúce na svojom povrchu komplex nádorového peptidu s MHC I.

V boji proti nádorom sa zúčastňujú aj makrofágy a NK bunky. Makrofágy sú často kumulované na okrajoch nádorovej masy. V pokusoch *in vitro* lyzujú nádorové bunky s omnoho väčšou intenzitou ako bunky nenádorové. Makrofágy môžu zabíjať nádorové bunky rôznymi mechanizmami: lyzozomálnymi enzýmami, kyslíkovými radikálmi či produkciou cytokínov (TNF). NK bunky zabíjajú cytotoxickými mechanizmami nádorové bunky, ktoré majú obmedzenú expresiu MHC gp I.

Úloha protilátok pri deštrukcii nádorových buniek bola zatiaľ preukázaná len *in vitro*. Zahrňuje aktiváciu komplementu a ADCC (antibody-dependent cell cytotoxicity) (ŘÍHOVÁ 2005).

Ku vzniku nádoru dochádza pravdepodobne dôsledkom ochromenia účinných efektorových mechanizmov protinádorovej imunity.

U pacientov s nádorovými ochoreniami se pomerne často vyskytujú protilátky proti rôznym autoantigénom (IMAI *et al.* 1993, TAN 2001, HONG *et al.* 2000, LE NAOUR *et al.* 2002, MADRID 2005, HERMSEN *et al.* 2007). Nedávno bola popísaná v sérach niekoľkých pacientov s karcinómom pečene a pankreasu prítomnosť autoprottilátok proti multifunkčnému proteínu kalretikulínu (HONG *et al.* 2000, LE NAOUR *et al.* 2002).

3.2. KALRETIKULIN

Jedným z pomerne častých autoantigénov preukázaných u rôznych autoimunitných ochorení je všadeprítomný a multifunkčný proteín kalretikulin (CRT), ktorý je študovaný i v našom laboratóriu. Kalretikulin je rozpustný, kyslý (pI 4,65), kalcium viažúci proteín a chaperon (SPIRO *et al.* 1996, KRAUSE a MICHALAK 1997, MICHALAK *et al.* 1999). Jeho molekulová hmotnosť je 46 kDa, avšak na SDS-PAGE migruje vďaka množstvu záporne nabitých skupín v C-terminálnej oblasti ako molekula o hmotnosti 60-63 kDa (WAISMAN *et al.* 1985).

Kalretikulin bol popísaný v roku 1974 ako Ca^{2+} viažúci proteín v sarkoplazmatickom retikule kostrového svalu (OSWALD a MACLENNAN 1974). Neskôr bol objavený aj v endoplazmatickom retikule (ER) a gény kódujúce tento proteín boli izolované z viacerých stavovcov, bezstavovcov i vyšších rastlín. Proteín sa nachádza vo všetkých bunkách obsahujúcich ER s výnimkou kvasiniek a prokaryot (MICHALAK *et al.* 1999).

Gén pre kalretikulin je silne evolučne konzervovaný, čomu nasvedčuje viac ako 70% homológia nukleotidových sekvencií (s výnimkou intronu 3 a 6) u ľudského a myšieho génu. Ľudský gén je lokalizovaný na lokuse p13.3- p13.2 devätnásteho chromozómu. Homológny gén u myši je mapovaný na chromozóme 8 (MCCAULIFFE *et al.* 1992, WASER *et al.* 1997).

3.2.1. Štruktúra kalretikulinu

Kalretikulin pozostáva zo 400 aminokyselinovej sekvencie a je arbitrárne členený do troch štruktúrne a funkčne odlišných domén so špecializovanými funkciami – N, P, C (obr. 1).

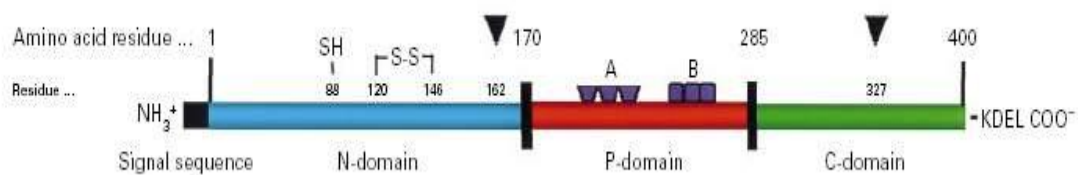
N-doména kalretikulinu (AMK 1-180) – má globulárnu štruktúru. Pozostáva z 8 anti-paralelných β reťazcov s jedným disulfidickým mostíkom a z 2 úsekov krátkych α helixov. Predpokladá sa, že disulfidický mostík medzi Cys 120 a Cys 146 môže hrať dôležitú úlohu pri správnom zložení N-terminálnej oblasti kalretikulinu (MATSUOKA *et al.* 1994). Táto doména viaže Zn^{2+} a interaguje *in vitro* s ďalšími chaperonmi endoplazmatického retikula, s DNA väzbovou doménou jadrových receptorov a s nukleovými kyselinami (RNA rubella viru) (BURNS *et al.* 1994b,

DEDHAR *et al.* 1994, ATREYA *et al.* 1995, BAKSH *et al.* 1995, MICHALAK *et al.* 1996, MICHALAK *et al.* 1999).

P-doména kalretikulinu (AMK 181-290) – ide o doménu kalretikulinu, bohatú na prolín, ktorá vykazuje aminokyselinové sekvenčné podobnosti s ostatnými Ca^{2+} viažúcimi chaperonmi, ako sú kalnexin (BERGERON *et al.* 1994) a kalmegin (WATANABE *et al.* 1994). Doména pozostáva z troch krátkych helixov, troch anti-paralelných β listov a z dvoch súborov aminokyselinových repetícií. Táto doména utvára dlhú ramennú štruktúru a interaguje s ostatnými chaperonmi v lumene ER. Nachádza sa tu vysoko afinitné, ale zároveň nízkokapacitné väzbové miesto pre vápnik (1 mol Ca^{2+} /mol proteínu) (MICHALAK *et al.* 1999).

P-doména má spolu s N-doménou najkonzervovanejšiu aminokyselinovú sekvenciu. Obe domény sú zodpovedné za chaperonovú funkciu proteínu (NAKAMURA *et al.* 2001b, MICHALAK *et al.* 2002). Nedávne štúdie ukázali, že mutácia v pozícii His¹⁵³ N-domény zruší chaperonovú funkciu proteínu (GUO *et al.* 2003).

C-doména kalretikulinu (AMK 291-400) – obsahuje vysoké množstvo negatívne nabitých aminokyselín a je v nej lokalizované vysokokapacitné väzbové miesto (20-30 mol Ca^{2+} /mol proteínu) viažúce Ca^{2+} s nízkou afinitou (OSTWALD a MACLENNAN 1974, BAKSH *et al.* 1991, NAKAMURA *et al.* 2001b). Táto doména má dôležitú úlohu pri regulácii interakcií kalretikulinu s proteínmi (PDI-protein disulfid izomeráza, ERp57 a možno ďalšie chaperony) (CORBETT *et al.* 1999). C-doména CRT je zakončená sekvenciou KDEL – retenčným signálom endoplazmatického retikula, ktorý umožňuje umiestnenie proteínu do jeho lumenu (MICHALAK *et al.* 1996).



Obr.1 Kalretikulin. Molekula sa arbitrárne člení na tri domény: N, P a C. V N-doméne proteínu je znázornený disulfidický mostík (120-146) a cysteínový zvyšok v pozícii 88. Fialové trojuholníky a štvorčeky v P-doméne CRT predstavujú aminokyselinové repetície. V pozíciách 162 a 327 sú šípkami označené potenciálne glykozylačné miesta (prevzaté z článku MICHALAK *et al.* 1999).

3.2.2. Lokalizácia kalretikulinu

Kalretikulin je primárne prítomný v endoplazmatickom retikule. Jeho výskyt bol preukázaný aj v iných kompartmentoch bunky, ako napr. v jadre nádorových buniek a lymfatických granuloch T lymfocytov (DUPUIS *et al.* 1993, YOON *et al.* 2000, BRUNAGEL *et al.* 2003). Za fyziologických podmienok sa kalretikulin objavuje v nízkych koncentráciách na povrchu buniek; preukázaná bola asociácia kalretikulinu s α reťazcom MHC gp I bez β_2 mikroglobulínu a s $\alpha_6\beta_1$ integrínmi (ZHU *et al.* 1997, ANDRIN *et al.* 1998, AROSA *et al.* 1999, GARDAI *et al.* 2005). Za patologických podmienok bola zistená prítomnosť kalretikulinu aj extracelulárne (v krvi, v moči) (KISHORE *et al.* 1997b, KAGEYAMA *et al.* 2004). Jeho uvoľnenie z bunky zvyčajne nastáva v dôsledku vírusovej infekcie, nekrózy či programovanej bunkovej smrti. Nezanedbateľnú úlohu pri bunkovej translokácii kalretikulinu má aj stres spôsobený tepelným šokom (heat shock), UV žiarením, prítomnosťou ťažkých kovov či porušením normálnej funkcie endoplazmatického retikula (EGGLETON a LLEWELLYN 1999). Mechanizmy, ktorými je kalretikulin transportovaný na povrch bunky, nie sú úplne jasné. Bola popísaná i prítomnosť kalretikulinu v apoptických telieskach uvoľňovaných z bunky počas programovanej bunkovej smrti (CASCIOLA-ROSEN a ROSEN 1997). Ďalším z možných vysvetlení výskytu kalretikulinu mimo ER je, že by mohol byť exprimovaný ako forma bez signálnej

sekvencie pre ER alebo by mohlo dôjsť k odštiepeniu tejto sekvencie posttranslačnými úpravami (CORBETT a MICHALAK 2000).

3.2.3. Biologické vlastnosti kalretikulinu

Funkcia kalretikulinu je pleiotropná. Je to vysoko univerzálny chaperon lektínovej povahy (SAITO *et al.* 1999, TROMBETTA 2003b), ktorý hrá dôležitú úlohu pri regulácii Ca^{2+} homeostázy a Ca^{2+} závislých metabolických dráh (NAKAMURA *et al.* 2001b, MICHALAK *et al.* 2002), v embryogenéze (MESAELI *et al.* 1999), pri modifikácii bunkovej adhézie (COPPOLINO *et al.* 1997), zmene génovej expresie (MICHALAK *et al.* 1999, BURNS *et al.* 1994a, DEDHAR *et al.* 1994), fagocytóze apoptických buniek (GARDAI *et al.* 2005) a potenciálne i indukcii protinádorovej imunity (OBEID *et al.* 2007, CLARKE a SMYTH 2007).

3.2.3.1. Kalretikulin ako chaperon

Kalretikulin sa podieľa na skladaní rozličných bielkovín, napr. povrchových receptorov, integrínov, transportérov či iónových kanálov (MICHALAK *et al.* 1999). Táto funkcia je významne spojená s tzv. kalretikulin-kalnexinovým cyklom, v ktorom sa kalretikulin spolu s ďalšími chaperonmi ER (kalnexin, Erp57, PDI) podieľa na skladaní novosyntetizovaných glykoproteínov. CRT a kalnexin viažu prostredníctvom svojich P-domén monoglukosylovaný, vysoko manózový oligosacharid ($\text{Glc}_1\text{Man}_9\text{GlcNAC}_2$) a rozpoznávajú terminálnu glukózu a štyri interné manózy glykoproteínu (TROMBETTA 2003b). Kalretikulin interaguje s týmito glykoproteínmi až do okamžiku, než nadobudnú prirodzenú terciálnu či kvartérnu štruktúru (SAITO *et al.* 1999).

Veľmi dôležitou funkciou kalretikulinu je jeho účasť na skladaní MHC gp I (SOLHEIM *et al.* 1997). Tento proces sa zahajuje väzbou kalnexinu na α reťazec MHC gp I hneď po jeho syntéze. Po asociácii β_2 -mikroglobulínu s α reťazcom MHC gp I dochádza k uvoľneniu kalnexinu z komplexu. Následne sa vzniknutý heterodimér viaže na kalretikulin a tapasin. Peptidové fragmenty, ktoré sú degradované v proteazómoch v cytosole, sú transportované prostredníctvom TAP

pumpy do lumenu ER. MHC gp I sa po kompletnom zložení uvoľňuje z komplexu proteínov a spolu s peptidmi je transportovaný na membránu.

Kalretikulin je považovaný i za stresový proteín; jeho expresia sa zvyšuje následkom bunkového stresu napr. tepelným šokom (CONWAY *et al.* 1995).

3.2.3.2. Kalretikulin ako regulátor Ca^{2+} homeostázy

Kalretikulin hrá zásadnú úlohu v regulácii Ca^{2+} homeostázy. Zvýšená hladina kalretikulinu zvyšuje množstvo Ca^{2+} v intracelulárnych zásobárňach (BASTIANUTTO *et al.* 1995). Naopak kalretikulin-deficientné bunky majú zníženú koncentráciu Ca^{2+} v ER v porovnaní s bunkami s fyziologickou hladinou kalretikulinu (NAKAMURA *et al.* 2001b). Kalretikulin pravdepodobne modifikuje transportnú aktivitu sarkoplazmatickej/endoplazmatickej ATPázy, ktorá transportuje Ca^{2+} do lumenu ER (CAMACHO *et al.* 1995, JOHN *et al.* 1998).

3.2.3.3. Úloha kalretikulinu v embryogenéze

Experimentálne bola preukázaná úloha kalretikulinu vo vývoji srdca u myši. Disrubcia génu pre kalretikulin bola pre myši letálna. Histologická analýza embryí kalretikulin-deficientných myši preukázala defekty vo vývoji srdca, predovšetkým stenšenie srdečnej steny. Popri anatomických zmenách srdca bola u týchto myši preukázaná aj omphalocela (umbilikálna hernia) (MESAELI *et al.* 1999).

Expresia kalretikulinu bola v embryonálnych bunkách vysoká a po narodení prudko klesala (MESAELI *et al.* 1999). Zvýšená postnatálna expresia kalretikulinu v srdci myši viedla k rozvoju ťažkých srdečných aritmií a bloku atrio-ventrikulárneho prevodného srdečného systému (NAKAMURA *et al.* 2001a).

3.2.3.4. Ovplyvnenie bunkovej adhézie kalretikulinom

Kalretikulin asociuje s cytoplazmatickou časťou α podjednotky membránových integrínov, ktoré sprostredkujú bunkovú adhéziu (ROJANI *et al.* 1991, KRAUSE a MICHALAK 1997). U myši s knock-outom génu pre kalretikulin bolo pozorované porušenie integrínmi sprostredkovanej adhézie na fibronektin a

laminin, pričom množstvo exprimovaných integrínov zostalo nezmenené (COPPOLINO *et al.* 1997).

3.2.3.5. Vplyv kalretikulinu na génovú expresiu steroidných hormónov

Väzba kalretikulinu s DNA väzbovou doménou jadrových steroidných receptorov potlačuje génovú expresiu. Kalretikulin špecificky interaguje s dvoma receptormi steroidných hormónov (glukokortikoidným, androgénom) (BURNS *et al.* 1994b, DEDHAR *et al.* 1994). Predpokladá sa, že by tiež mohol viazať progesterónový receptor. Steroidné hormóny sa viažu na intracelulárne receptory a vytvárajú tak komplexy hormón – receptor, ktoré priamo ovplyvňujú transkripciu génov. V prítomnosti kalretikulinu však DNA väzbová doména steroidných receptorov nemôže interagovať s príslušnou nukleotidovou sekvenciou promotora génu, čo vedie k inhibícii transkripcie. Je možné, že nápadná sekvenčná podobnosť medzi α podjednotkou integrínu a DNA väzbovou doménou steroidných receptorov súvisí s väzbou kalretikulinu k obom molekulám (BURNS *et al.* 1994a).

3.2.3.6. Úloha kalretikulinu pri fagocytóze apoptických buniek

Kalretikulin slúži spolu s fosfatidylserínom ako rozhodujúca molekula pre rozpoznanie a odstránenie apoptických buniek fagocytmi (GARDAI *et al.* 2005). Fagocytujúce bunky rozoznávajú kalretikulin na povrchu apoptických buniek prostredníctvom receptoru CD91/LRP (LDL-receptor-related protein) (BASU *et al.* 2001). GARDAI *et al.* (2005) preukázal neschopnosť či zníženú schopnosť fagocytov pohltnúť kalretikulin-deficientné bunky.

Mechanizmus fagocytózy apoptických buniek je prísne regulovaný. Aby sa zabránilo nekontrolovanej fagocytóze buniek, na ich povrchu sú prítomné proteíny (CD 47, CD 200) rozpoznávané povrchovými inhibičnými receptormi fagocytov (SIRP- α , CD 200R). Ich aktiváciou sa vysielajú inhibičné signály označované ako “don't eat me“ signály (HOŘEJŠÍ a BARTUŇKOVÁ 2005). Pri premene bunky na apoptotickú, dochádza (ešte pred stratou membránovej integrity) k zmenám na jej povrchu. Zvýši sa prítomnosť kalretikulinu na povrchu, jeho molekuly sa zhlukujú navzájom a aj s fosfatidylserínom a slúžia ako “eat me“ signály. Tieto zmeny pravdepodobne blokujú “don't eat me“ signálizáciu (väzbu CD 47 a SIRP- α) a

kalretikulin tak dokáže efektívnejšie stimulovať receptor CD91/LRP na fagocytoch (GARDAI *et al.* 2005). Mechanizmy tohto procesu nie sú doposiaľ dostatočne objasnené. Uvažuje sa i o tom, že kalretikulin môže na povrchu buniek stabilizovať povrchové molekuly, ktoré sú dôležité pre aktiváciu fagocytov (CLARKE a SMYTH 2007).

OBEID *et al.* (2007) označili úlohu kalretikulinu v rozvinutí protinádorovej imunitnej odpovede za kľúčovú a načrtli možnosť použitia kalretikulinu v protinádorovej terapii. Experimentálne navodili rýchlu translokáciu kalretikulinu na povrch nádorových buniek prostredníctvom cytostatika anthracyklínu (OBEID *et al.* 2007)

V súvislosti s protinádorovým efektom je zaujímavý inhibičný efekt N-domény kalretikulinu, označovanej niektorými autormi ako vasostatin, na novotvorbu ciev nádorov (PIKE *et al.* 1999, SUN *et al.* 2005).

3.2.4. Interakcia kalretikulinu s extracelulárnymi a intracelulárnymi molekulami

Okrem vyššie uvedených molekúl, kalretikulin interaguje i s receptorom pre vitamín D, RNA vírusu Rubeoly, perforínmi cytolytických granúl (ANDRIN 1998, FRASER *et al.* 2000), komponentmi ribonukleoproteínového komplexu Ro/SS-A (CHENG *et al.* 1996, SINGH *et al.* 1994, EGGLETON a LLEWELLYN 1999) a s C1q komponentom komplementu. Schopnosť väzby kalretikulinu s C1q je daná jeho štruktúrnou podobnosťou s C1q receptorom (MALTHORA *et al.* 1993, KISHORE *et al.* 1997a).

3.3. VÝSKYT AUTOPROTIĽÁTKOV PROTI KALRETIKULINU

Fenomén výskytu antikalretikulinových protilátok je známy u veľkej rady autoimunitných a parazitárnych ochorení. Ako historicky prvé izotypy protilátok proti kalretikulinu boli popísané triedy IgG a IgM v sérach pacientov so SLE, reumatickou artritídou, Sjögrenovým syndrómom, kongenitálnym srdečným blokom a zmiešanou chorobou spojiva (ORTH *et al.* 1996, KISHORE *et al.* 1997b, ROUTSIAS *et al.* 1993, EGGLETON a LLEWELLYN 1999). IgM a IgG protilátky

boli preukázané i v sérach pacientov infikovaných parazitmi *Schistosoma japonicum*, *Onchocerca volvulus* a *Trypanosoma cruzi* (LUX *et al.* 1992, HUGGINS *et al.* 1995, MARCELAIN *et al.* 2000).

Aj napriek širokému výskytu antikalretikulínových protilátok izotypu IgG, antikalretikulínové protilátky triedy IgA boli detegované iba u pacientov s niektorými gastrointestinálnymi chorobami. IgA autoprotiľátky proti kalretikulínu boli popísané i v sérach pacientov s glutén senzitivnou enteropatiou - celiakiou, ktorá sa dnes považuje za autoimunitné ochorenie, aj keď je u geneticky citlivých osôb vyvolávaná potravinovým lepkom (KARSKÁ *et al.* 1995, TUČKOVÁ *et al.* 1995). V sérach 92% celiakálnych pacientov boli preukázané zvýšené hladiny IgA a IgG antikalretikulínových protilátok. Popri izotype IgG a IgM protilátok, IgA antikalretikulínové protilátky boli detegované aj u niektorých pacientov s primárnou biliárnou cirhózou, autoimunitnou hepatitídou, alkoholickou cirhózou pečene a yersiniózou (KREISSEL *et al.* 1999, SÁNCHEZ *et al.* 2003). Zvýšené hladiny IgA protilátok proti kalretikulínu boli popísané i u niekoľkých pacientov s roztrúsenou sklerózou a nešpecifickými črevnými zápalmi (KREISEL *et al.* 1999, SÁNCHEZ *et al.* 2000).

3.4. ANALÝZA ANTIGÉNNYCH EPITOPOV KALRETIKULINU ROZPOZNÁVANÝCH ANTIKALRETIKULINOVÝMI PROTILÁTKAMI

Pre objasnenie tvorby antikalretikulínových protilátok či pre priblíženie ich úlohy u jednotlivých chorôb je dôležité charakterizovať špecificitu týchto protilátok pre jednotlivé časti kalretikulínu. Zároveň analýza epitopov tohto proteínu rozpoznávaných protilátkami pacientov môže byť významná aj z hľadiska ich diagnostickej alebo prognostickej hodnoty.

Informácie o protilátkami rozpoznávaných epitopoch kalretikulínu sú obmedzené. Antigénne epitopy kalretikulínu rozpoznávané IgG protilátkami boli popísané u pacientov s reumatickými ochoreniami (SLE, Sjögrenov syndróm, reumatoidná artritída). K tomuto účelu autori zvolili ELISA metódu, v ktorej použili ako antigén syntetické peptidy a rekombinantne pripravené fragmenty kalretikulínu (ROUTSIAS *et al.* 1993, EGGLETON *et al.* 2000). V týchto štúdiách autori

detekovali najviac antigénnych epitopov v N- a P- terminálnej časti kalretikulinu. Epitopy boli rozpoznávané protilátkami 69% pacientov s aktívnou formou SLE, zatiaľ čo C-doména nebola IgG protilátkami týchto pacientov rozpoznávaná (EGGLETON *et al.* 2000). Rozpoznávanie N-domény kalretikulinu IgG protilátkami pacientov so SLE preukázal taktiež KISHORE *et al.* (1997b), ktorý túto doménu považuje za imunodominantnú. Oproti tomu u pacientov s hepatocelulárnym karcinómom indukovali imunitnú odpoveď epitopy lokalizované v C terminálnej časti kalretikulinu (LE NAOUR *et al.* 2002). To naznačuje odlišnosti v epitopoch kalretikulinu vyvolávajúcich autoreaktivitu u jednotlivých chorôb.

Neskôr SÁNCHEZ *et al.* (2003) charakterizovali pomocou metódy PEPSCAN i epitopy rozpoznávané IgA protilátkami u pacientov s celiakiou, primárnou cirhózou pečene, autoimunitnou hepatitídou a alkoholickou cirhózou pečene. U tejto metódy boli použité syntetické dekaeptidy kovalentne naviazané na celulóзовú membránu. Tieto peptidy pokrývali celú sekvenciu molekuly kalretikulinu a vzájomne sa pritom prekrývali o osem aminokyselín. Pacientské sérové IgA protilátky reagovali s veľkým množstvom peptidov korešpondujúcich so sekvenciami všetkých troch častí kalretikulinovej molekuly. Najviac antigénnych epitopov rozpoznávaných protilátkami pacientov bolo lokalizovaných v N- a C-doméne molekuly. Základným zistením tohto štúdia bol nález spoločných a pre chorobu špecifických antigénnych epitopov kalretikulinu rozpoznávaných sérovými IgA protilátkami pacientov (SÁNCHEZ *et al.* 2003).

3.5. PRÍČINY AUTOREAKTIVITY PROTI KALRETIKULINU

Existuje niekoľko vzájomne sa dopĺňujúcich konceptov, ktoré objasňujú vznik autoreaktivity proti kalretikulinu.

Autoreaktivita proti kalretikulinu je spojovaná s jeho uvoľnením do extracelulárneho prostredia. Toto uvoľnenie spôsobené deštrukciou buniek má za následok konformačné zmeny proteínu a odhalenie množstva kryptických epitopov, ktoré boli doposiaľ pre imunitný systém nedostupné (EGGLETON a LLEWELLYN 1999).

Vznik autoimunitnej reakcie proti kalretikulinu môže tiež vyvolať asociácia proteínu s molekulami, ktoré indukujú imunitnú odpoveď. U pacientov trpiacich Sjögrenovým syndrómom a SLE sa kalretikulin vyskytuje v komplexe s Ro/SS-A. Tento rozpustný ribonukleoproteínový komplex, ktorý pozostáva zo štyroch proteínových komponentov (60-,52- 46 kDa proteíny a kalretikulin) a ďalších štyroch malých cytoplazmatických RNA (hYRNA 1, -3, -4 a -5), je uvoľňovaný z poškodených buniek. Uvoľnený Ro/SS-A môže vyvolať autoimunitnú reakciu, ktorá sa rozširuje na všetky molekuly komplexu vrátane kalretikulinu („epitope spreading“) (KINOSHITA *et al.* 1998, EGGLETON a LLEWELLYN 1999).

Príčinou spustenia autoimunitnej reakcie proti kalretikulinu môže byť aj mechanizmus molekulárnych mimikier – podobnosť mikrobiálnych antigénov s molekulami telu vlastnými. Parazity môžu uvoľňovať molekulárne homológy kalretikulinu, aby unikli imunitnej odpovedi hostiteľa. Takýmto homológom kalretikulinu je napr. Ral-1 sekretovaný parazitom *Onchocerca volvulus*. Ral-1, podobne ako kalretikulin, sa viaže na podjednotku C1q komplementovej molekuly C1, a tým môže blokovat' klasickú dráhu komplementu (EGGLETON a LLEWELLYN 1999). Súčasne na zvýšené množstvo Ral-1 molekuly v hostiteľských tkanivách reaguje imunitný systém hostiteľa tvorbou protilátok (MCCAULIFFE *et al.* 1990, LUX *et al.* 1992). Boli preukázané homológne sekvencie kalretikulinu s molekulami niektorých parazitov (*Onchocerca volvulus* (MC CAULIFFE *et al.* 1990), *Schistosoma japonicum* (HUGGINS *et al.* 1995), *Leishmania donovani* (JOSHI *et al.* 1996), *Amblyomma americanum* (SANDERS *et al.* 1998), *Necator americanus* (PRITCHARD *et al.* 1999)). V tejto súvislosti je zaujímavé, že niektoré z antigénnych epitopov kalretikulinu rozpoznávaných IgA protilátkami pacientov s gastrointestinálnymi chorobami vykazovali 90% homológie so sekvenciami kalretikulinového homógu parazita *O. volvulus* (peptid ASKPEDWDEW), ale aj s niektorými sekvenciami molekúl *Vibrio cholerae* (peptid SIYAYDNFGV) (SÁNCHEZ *et al.* 2003).

Tvorbu protilátok proti kalretikulinu môže indukovať taktiež expresia aberantne či atypicky posttranslačne modifikovaných foriem tohto proteínu. V sérach pacientov s halotanovou hepatítidou boli preukázané protilátky proti trifluoroacetylovanej forme kalretikulinu i protilátky proti intaktnej molekule kalretikulinu (GUT *et al.* 1995).

3.6. NÁDOROVÉ MARKERY

Za nádorové markery sa považujú molekuly, ktoré majú súvislosť s prítomnosťou nádoru a jeho progresiou. Predstava ideálneho nádorového markera zahŕňa:

- 1.) špecificitu pre malignitu (v ideálnom prípade pre konkrétny typ nádoru) a jej lokalizáciu
- 2.) pozitívnu koreláciu s množstvom nádorového tkaniva
- 3.) primeranú dynamiku hladín markera vo vzťahu k množstvu nádorového tkaniva
- 4.) jednoduchý prístup k príslušnej molekule (prítomnosť v telesných sekrétoch)

Aj napriek veľkej snahe, doposiaľ žiaden nádorový marker nespĺňa všetky vyššie uvedené kritéria (LAI 2003). Stanovenie prítomnosti či hladín týchto molekúl sa v klinickej praxi používa pre screening, stanovenie diagnózy a prognózy, monitorovanie odpovede na liečbu či pre včasnú detekciu opakovaného výskytu. Väčšina molekúl používaných ako nádorové markery pochádza z nádorových buniek, no môžu byť produkované organizmom aj ako odpoveď na nádorový rast.

Pre diagnostiku nádorov gastrointestinálneho traktu (kolorektálneho karcinómu, hepatocelulárneho karcinómu a nádorov pankreasu) sa v klinickej praxi najviac používajú nádorové markery prítomné v sérach pacientov: karcinoembryonálny antigén (CEA), alfa-fetoproteín (AFP) a mucínové markery (CA-19-9) (SEREGNI *et al.* 2001).

Karcinoembryonálny antigén (CEA) bol prvýkrát popísaný v roku 1965 Goldom a Freedmanom v extrakte adenokarcinómu hrubého čreva (GOLD a FREEDMAN 1965). CEA je glykoproteín patriaci do imunoglobulínovej superrodiny. Je to adhezívna molekula prítomná v plazmatickej membráne. Pravdepodobne umožňuje vzájomnú adhezivitu nádorových buniek. CEA je exprimovaný vo vysokej hladine v nádorových bunkách, ale nie v bunkách zdravých dospelých jedincov. Za fyziologických podmienok bola vysoká expresia CEA popísaná iba na bunkách čreva, pankreasu a pečene počas embryonálneho vývoja. CEA sa používa ako marker pre diagnostikovanie kolorektálneho karcinómu. Tento marker však nie je špecifický len pre toto ochorenie. Jeho hladina býva zvýšená aj u karcinómu prsníka, žalúdka, pankreasu, močového mechúra a pečene ale aj u nemalígnych zápalových ochorení pečene

a pankreasu (SEREGNI *et al.* 2001, ŘÍHOVÁ 2005). Stanovenie hladín CEA má však význam pri sledovaní remisie ochorenia po ukončení liečby (ŘÍHOVÁ 2005).

Alfa-fetoproteín (AFP) je glykoproteín fyziologicky produkovaný žltkovým vakom a pečeňou fétu. V dospelosti je v sére prítomný len v malom množstve. V klinickej praxi sa používa ako diagnostický marker hepatocelulárneho karcinómu, avšak jeho využiteľnosť je obmedzená kvôli zvýšeným sérovým hladinám AFP u závažných ochorení pečene (hepatitída, cirhóza) (BAYATI *et al.* 1998, MOTOLAKUBA *et al.* 2006). Zvýšené hladiny AFP boli preukázané i v sérach pacientov s nádormi žalúdka, pankreasu a zárodočných buniek (BRODANOVÁ a KORDAČ 1993, ŘÍHOVÁ 2005).

Mucín CA 19-9 je vysokomolekulárny glykoproteín, ktorý sa pravdepodobne tvorí v dôsledku poruchy syntézy karbohydrátových postranných reťazcov. Zvýšené sérové hladiny CA 19-9 boli popísané u viacerých malignít (gastrointestinálnych, respiračných, urogenitálnych). Testovanie hladín CA 19-9 sa využíva hlavne v diagnostike karcinómu pankreasu, ale zvýšené hladiny tohto mucínu boli preukázané aj u nemalígnych ochorení pankreasu a pečene (GUPTA 1985, SEREGNI *et al.* 2001, ŘÍHOVÁ 2005).

Do dnešnej doby nie je identifikovaný dostatočne účinný biomarker pre včasnú diagnostiku karcinómu pankreasu, kolorektálneho karcinómu a hepatocelulárneho karcinómu, či pre ich rozlíšenie od chronického zápalového ochorenia, ktoré predchádza týmto ochoreniam.

3.7. ONKOLOGICKÉ OCHORENIA A KALRETIKULIN

V niekoľkých štúdiách bola preukázaná zvýšená expresia kalretikulínu či výskyt jeho atypických foriem v nádorových tkanivách pečene, pankreasu, močového mechúra, hrubého čreva, prsníka a prostaty. Príčiny týchto zvýšených expresií zatiaľ nie sú presne známe. V štúdiách zaoberajúcich sa touto problematikou bolo poukázané i na možnosť použitia kalretikulínu či protilátok proti kalretikulínu ako markera pre diagnostiku niektorých nádorových ochorení (BINI *et al.* 1997, ALAIYA *et al.* 2000, YOON *et al.* 2000, LE NAOUR *et al.* 2002, BRUNAGEL 2003, HONG *et al.* 2004, KAGEYAMA *et al.* 2004).

3.7.1. Nádory pečene

3.7.1.1. Karcinóm pečene a rizikové faktory

Karcinóm pečene je šiestym najčastejšie sa vyskytujúcim typom rakoviny na svete. Vzhľadom k zlej prognóze pacientov s karcinómom pečene, je tento nádor jednou z najčastejších príčin úmrtí pacientov na onkologické ochorenia. Medzi krajiny s najvyššou incidenciou nádorov pečene patria východná a juhovýchodná Ázia, Melanézia a sub-saharská Afrika (PARKIN *et al.* 2005).

Karcinóm v pečeni rastie ako homogénna masa, ktorá utláča okolitý parenchým. Neskôr vytvára satelitné uzly, ktoré môžu splývať s pôvodným uzlom. Karcinóm v cirhóze má multilokulárnu formu s početnými malými uzlami, ktoré postupne prerastajú do okolitého parenchýmu. Časté sú nekrotické zmeny nádorovej masy najmä uprostred väčších uzlov (BRODANOVÁ a KORDAČ, 1993).

K diagnostike karcinómu pečene sa používa sonografia, počítačová tomografia, laparoscopia, scintigrafické vyšetrenie, angiografia, magnetická rezonancia a histologické vyšetrenie tkaniva pečene. Laboratórne sa testujú sérové hladiny alfa-fetoproteínu (AFP) (MOTOLA-KUBA *et al.* 2006, KLENER *et al.* 2001).

Hlavným rizikovým faktorom pre vznik karcinómu pečene je infekcia vírusom hepatitídy B a hepatitídy C. Prekonanie týchto chorôb zvyšuje riziko karcinómu pečene až 20 násobne (DONATO *et al.* 1998). 25 percent pacientov s hepatocelulárnym karcinómom je chronickým nositeľom vírusu hepatitídy B v USA (MARRERO 2003). V súčasnej dobe je zvyšujúca sa incidencia karcinómu pečene vo svete vysvetľovaná rozširovaním vírusu hepatitídy v populácii. V oblastiach s vysokým výskytom nádorov pečene sa ako prevencia úspešne uplatňuje očkovanie novorodencov proti vírusovej hepatitíde B (CHANG *et al.* 1997). Významnú úlohu pri vzniku hepatocelulárneho karcinómu zohráva i cirhóza pečene, hepatotoxíny (predovšetkým aflatoxín produkovaný plesňou *Aspergillus flavus*), porfíria, tyrosinémia I. typu a hereditárna hemochromatóza (FRACANZANI *et al.* 2001, KLENER *et al.* 2001, BRODANOVÁ a KORDAČ 1993, MOTOLA-KUBA *et al.* 2006).

Vírusové hepatitídy predstavujú rôznorodú skupinu ochorení pečene charakterizovanú poškodením jej tkaniva zápalovým či nekrotickým procesom. Sú vyvolané hepatotropnými vírmi. Priebeh ochorenia môže byť rôzny, od spontánne

miznúceho poškodenia až po nenávratné poškodenie pečene. Vo vzťahu ku vzniku primárneho karcinómu pečene je významná vírusová hepatitída typu B a C (KLENER *et al.* 2001).

Vírusová hepatitída B je spôsobená Hepadnavírusom. Z celosvetového hľadiska ide o stále častú formu vírusových hepatítid. Počet vírusonosičov sa odhaduje až na 300 miliónov. Vírusy sú obsiahnuté v telových tekutinách. Spôsob prenosu vírusovej hepatitídy B je horizontálny a vertikálny. Najčastejšie formy horizontálneho prenosu sú krvné transfúzie, injekčná aplikácia drog a pohlavný styk. Sérum pacientov infikovaných vírusom hepatitídy B obsahuje proti tomuto vírusu protilátky, ktorých detekcia je základom pre sérovú diagnostiku. V liečbe sa využíva interferon alfa, lamivudin, adefovir a entecavir (KLENER *et al.* 2001, MARCELLIN *et al.* 2007).

Vírusová hepatitída C je spôsobená Flavivírusmi. Cesty prenosu sú v podstate totožné s hepatitídou B. Vírus infikuje periférne mononukleáry, ktoré sú potom rezervoárom infekcie. V terapii sa využíva podávanie interferónu alfa a ribavidinu (KLENER *et al.* 2001).

3.7.1.2. Karcinóm pečene a kalretikulin

LE NAOUR *et al.* (2002) identifikovali pomocou 2DE v hepatómových bunkových líniiach (PLC-PRF5 a Huh7) osem proteínov, ktoré boli rozpoznávané sérovými protilátkami u niektorých pacientov s hepatocelulárnym karcinómom, ale nie protilátkami zdravých jedincov. Tieto molekuly sú zástupcami rozličných skupín proteínov ako chaperony (kalretikulin a hsp60), štruktúrne proteíny (cytokeratin 8, cytokeratin 18 a β tubulin), enzýmy (creatin kináza-B, F1-ATP synthase β -subunit a nukleosid phosphate kináza A). V tejto štúdií autori detekovali v nádorových líniiach pečene skrátenu formu kalretikulinu s molekulovou hmotnosťou 32 kDa, ktorú označili ako CRT 32 (obr. 2). Hmotnostná spektrometria a Western blotova analýza použitím špecifických protilátok proti C- a N- terminálnemu peptidu potvrdila, že CRT 32 má skrátenu N- doménu. V porovnaní s nemalígnym tkanivom pečene bolo množstvo CRT 32 v nádorovom tkanive pečene vyššie (LE NAOUR *et al.* 2002).

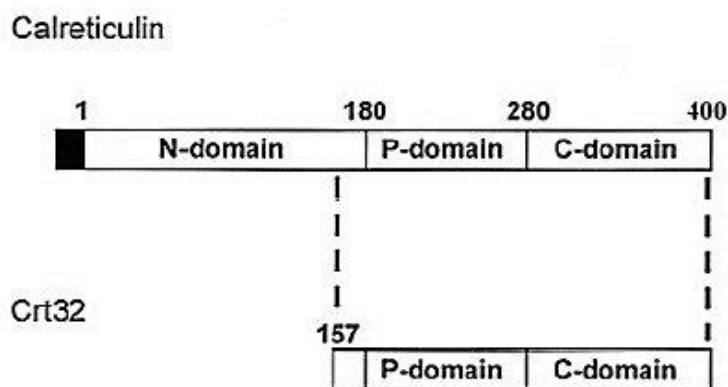
Obe formy kalretikulinu, kompletná molekula kalretikulinu a CRT 32, boli rozpoznávané IgG protilátkami v sérach pacientov s hepatocelulárnym karcinómom. Protilátky proti CRT 32 sa vyskytovali len v dvoch z 24 sér pacientov s nádorom prsníka a v dvoch z 52 sér pacientov s nádorom pľúc. Neboli zistené žiadne protilátky

proti kalretikulinom u pacientov s nádorom mozgu (n=16), melanómom (n=7) a nádorom pažeráku (n=17) (LE NAOUR *et al.* 2002).

YOON *et al.* (2000) preukázali hojné zastúpenie kalretikulinu v jadre buniek hepatocelulárneho karcinómu (ale nie v jadrách nemalígneho tkaniva pečene).

Nedávno CHIGNARD *et al.* (2006) identifikovali skrátenú formu kalretikulinu – CRT 18 v nádorovom tkanive hepatocelulárneho karcinómu. Jej aminokyselinová sekvencia korešponduje s N-koncovou časťou kalretikulinu. V porovnaní s CRT 32, zastúpenie CRT 18 bolo signifikantne znížené v nádorovom tkanive pečene. Prítomnosť CRT 18 autori preukázali i v médiu bunkovej línie PLC-PRF5. Celá molekula kalretikulinu je pravdepodobne v bunkách hepatocelulárneho karcinómu štiepená na CRT 32 a CRT 18, pričom proteínový fragment CRT 18 je uvoľňovaný do extracelulárneho prostredia. Izoformu kalretikulinu CRT 18 detegovali aj v sérach pacientov s hepatocelulárnym karcinómom. Metódou ELISA preukázali signifikantne zvýšené hladiny CRT 18 v sérach pacientov s hepatocelulárnym karcinómom v porovnaní so sérovými hladinami CRT 18 u pacientov rizikových skupín pre vznik ochorenia (chronická hepatitída a cirhóza) a zdravých kontrol (CHIGNARD *et al.* 2006).

LE NAOUR *et al.* (2002) predpokladá, že k vyvolaniu humorálnej odpovede proti kalretikulinu a CRT 32 môže prispieť zvýšená expresia CRT 32 v nádorových tkanivách. CHIGNARD *et al.* 2006 predpokladajú, že príčinou vzniku autoprotilátok proti kalretikulinu v sérach pacientov s hepatocelulárnym karcinómom by mohlo byť štiepenie kalretikulinu na fragmenty CRT 32 a CRT 18 (CHIGNARD *et al.* 2006).



Obr. 2 Kalretikulín a jeho skrátaná forma CRT 32 (prevzaté z článku LE NAOUR *et al.* 2002).

3.7.1.3. Metastatické nádory pečene

Pečeň je najpriaznivejším miestom pre vznik metastáz. Vďaka svojmu cievnemu zásobeniu a intenzívnemu prekrveniu, pečeň vychytáva maligné bunky prinášané obehom. Metastatické nádory pečene tvoria až 95% všetkých nádorov pečene. Hlavným zdrojom metastáz v pečeni sú nádory tráviaceho traktu (najmä kolorektálny karcinóm) ale i nádory prsníka, bronchiálny karcinóm či karcinóm obličiek a tyreoidey (BRODANOVÁ a KORDAČ 1993, KLENER *et al.* 2001).

Metastatické postihnutie pečene sa prejavuje v pokročilých štádiách tlakovou bolesťou v mezogastriu, ascitom, zvýšenými teplotami či rýchle progredujúcou kachektizáciou a anemizáciou. Pečeň je výrazne zväčšená a tvrdá. Zvyšuje sa aktivita ALP, GMT a aminotransferáz. Diagnostika je založená na využívaní ultrasonografie, počítačovej tomografie, laparoskopie a biopsii pečene (BRODANOVÁ a KORDAČ 1993, KLENER *et al.* 2001).

3.7.2. Nádory pankreasu

3.7.2.1. Nádory pankreasu a rizikové faktory

Pacienti s rakovinou pankreasu majú najhoršiu prognózu zo všetkých pacientov s onkologickými ochoreniami (PARKIN *et al.* 2005). Medián prežitia pacientov s nádorom pankreasu sa pohybuje v rozmedzí 3-6 rokov. Nádory pankreasu sú

najčastejšie malígne novotvary derivované z výstelky exokrinnej časti pankreasu – adenokarcinómy (95%) (KLENER *et al.* 2001).

Včasnú diagnostiku nádoru pankreasu je obtiažne, pretože symptómy ochorenia sú nešpecifické a premenlivé. To je príčinou odhalenia až pokročilejších štádií, kedy už nádor prerastá do okolitých tkanív a tvorí dcérske ložiská (LUTTGES a KLOPPEL 2000). Klinické príznaky sa vyznačujú epi- a mezogastrálnou bolesťou u asi 90% pacientov. Pri lokalizácii karcinómu v oblasti kaudy pankreasu sa intenzita bolesti mení so zmenou polohy. Postihnutím hlavy pankreasu môže dôjsť k obštrukcii žlčovodu nádorovými masami a vzniku žltacky (KLENER *et al.* 2001).

V súčasnosti pre diagnostiku využívané metódy (ultrasonografia, počítačová tomografia, endoskopická retrográdna cholangiopankreatografia a laparoscopia) sú schopné odhaliť obvykle až pokročilé štádium rozvoja nádoru. Najčastejšie používaným laboratórnym testom pre diagnostiku nádorov pankreasu je stanovenie hladiny CA 19-9 v séru (KLENER *et al.* 2001, KARACHRISTOS *et al.* 2005).

Príčiny vzniku nádorov pankreasu sú nejasné. Ako rizikové faktory pre vznik tohto ochorenia sa uvádzajú príslušnosť k mužskému pohlaviu, vek, fajčenie, diabetes mellitus či diéta s vysokým obsahom tuku. V poslednej dobe sa významná úloha pri vzniku nádoru pankreasu pripisuje pankreatitídam (KLENER *et al.* 2001, WAYNE *et al.* 2007).

Pankreatitídou je označovaný zápal pankreasu. Je vyvolaný porušením tkaniva tráviacimi enzýmami predčasne aktivovanými už v samotnom pankrease. V klinickej praxi je pankreatitída rozdeľovaná na akútnu a chronickú.

Akútna pankreatitída sa prejavuje prudkou epigastrálnou bolesťou sprevádzanou obvykle zvýšením koncentrácie pankreatických enzýmov v krvi a v moči, leukocytózou, popr. šokom. Môže sa vyskytnúť i opuch brucha, zvracanie či horúčka. Najčastejšou príčinou bývajú ochorenia žlčových ciest a konzumácia alkoholu. Diagnóza sa stanovuje na základe klinických príznakov, laboratórnych vyšetrení sérových hladín pankreatických amyláz a lipáz a sonografiou či počítačovou axiálnou tomografiou (KLENER *et al.* 2001).

Hlavným rysom chronickej pankreatitídy je dlhotrvajúce poškodenie tkaniva pankreasu. Väčšina pacientov trpí typickou, stálou bolesťou lokalizovanou predovšetkým v hypogastriu a pod oboma rebrovými oblúkmi. Bolesť sa spravidla zintenzívňuje príjmom potravy a tekutín. Sú však známe i ťažšie pokročilejšie formy pankreatitíd, kedy bolesť úplne vymizne navzdory ťažkého poškodenia pankreatického

tkaniva. Najčastejšou príčinou vzniku chronickej pankreatitídy je dlhodobá nadmerná konzumácia alkoholu. Medzi ďalšie rizikové faktory patrí poškodenie pankreatického vývodu po prekonaní akútnej pankreatitídy, dlhodobé podávanie analgetík či stavy doprevádzané zvýšenou hladinou vápnika (hyperkalcémia) a inými metabolickými poruchami. Na vznik chronickej pankreatitídy môže mať vplyv i heritabilita (hereditárna pankreatitída) a kongenitálna pankreatická abnormalita (pancreas divisum). Diagnostika je založená na sérologickom vyšetrení enzymatickej aktivity pankreasu a použitím morfológických metód ako sonografia, endoskopická retrográtna cholangiopankreatografia a počítačová axiálna tomografia (KLENER *et al.* 2001).

3.7.2.2. Nádory pankreasu a kalretikulín

V sérach 50% pacientov s nádormi pankreasu boli preukázané sérové protilátky proti niekoľkým proteínom (transmembránovému glykoproteínu MUC1, p53, Rad51) (RAEDLE *et al.* 1996, MAACKKE *et al.* 2002, HAMANAKA *et al.* 2003). HONG *et al.* (2004) identifikovali pomocou kombinácie 2DE a Western blotu dve izoformy kalretikulínu, ktoré boli rozpoznávané IgG sérovými protilátkami 58% pacientov s nádorom pankreasu. Prítomnosť týchto izoform kalretikulínu nebola obmedzená iba na bunky nádoru pankreasu ale boli tiež preukázané v rovnakej koncentrácii i u ďalších nádorov (pľúc, hrubého čreva, vaječníkov). Sérové protilátky pacientov s týmito nádormi na rozdiel od protilátok pacientov s nádormi pankreasu nereagovali s izoformami kalretikulínu. Vzhľadom k tomu autori považujú za nepravdepodobné, že by expresia izoform kalretikulínu v nádorových tkanivách prispievala k tvorbe antikalkretikulínových protilátok. Hoci v nádorovej bunkovej línii pankreasu bola zistená prítomnosť skrátenej formy kalretikulínu CRT 32, nebola voči nej vyvolaná imunoreaktivita (HONG *et al.* 2004).

3.7.3. Nádory hrubého čreva

3.7.3.1. Kolorektálny karcinóm a rizikové faktory

Karcinóm hrubého čreva (kolorektálny karcinóm) je v Českej populácii častou malignitou (KLENER *et al.* 2001). Kolorektálny karcinóm má v porovnaní s ostatnými frekventovanými malignitami relatívne dobrú prognózu; mortalita predstavuje asi polovicu z diagnostikovaných prípadov tohto ochorenia (PARKIN *et al.* 2005). Horšiu prognózu však majú vždy metastazujúce nádory.

Histologicky najčastejším typom kolorektálneho karcinómu je adenokarcinóm, ktorý sa vyskytuje v 90% prípadov. Z ostatných typov nádorov sa vyskytujú lymfómy a squamózne karcinómy. Najvýznamnejšími klinickými prejavmi ochorenia sú prítomnosť krvi či hlienu v stolici, zmeny v jej frekvencii, kvalite a konzistencii a krvácanie z konečníka. Ochorenie je sprevádzané i nešpecifickými príznakmi: únava, chudnutie, anémia, subfebrília. Kolorektálne karcinómy často metastazujú do pečene, menej do pľúc, nadobličiek, peritonea, mozgu a skeletu (KLENER 2001).

V diagnostike sa uplatňuje viacero vyšetrovacích metód: kolonoskopické vyšetrenie s bioptickou verifikáciou, dvojkontrastná irigoskopia, vyšetrenie okultného krvácania v stolici a testovanie hladín karcinoembryonálneho antigénu (CEA) v sére (SEREGNI *et al.* 2001).

Na vzniku kolorektálneho karcinómu sa podieľajú faktory genetické (mutácia K ras génu, inaktivácia génu p53, APC) i faktory vonkajšieho prostredia. Geneticky je podmienených 10-15% všetkých nádorov hrubého čreva. O vplyvoch vonkajšieho prostredia svedčia predovšetkým veľké rozdiely vo výskyte ochorenia v rôznych geografických oblastiach (PARKIN *et al.* 2005, KLENER *et al.* 2001). Významnú úlohu zohráva najmä zlá životospráva (vysoký obsah tukov v potrave, nízky obsah vlákniny a vitamínov, obezita, nedostatok fyzickej aktivity), vek, dlhotrvajúce nešpecifické črevné zápal, prítomnosť adematózných polypov na sliznici hrubého čreva, nadmerná konzumácia alkoholu a fajčenie (MCKEOWN-EYSSSEN 1994, KLENER *et al.* 2001).

3.7.3.2. Kolorektálny karcinóm a kalretikulin

BRUNAGEL *et al.* (2003) preukázali prítomnosť kalretikulinu v jadrovej matrix buniek kolorektálneho karcinómu použitím kombinácie 2 DE a Western blotu. Expresia kalretikulinu v jadre malígnych buniek bola signifikantne vyššia v porovnaní s jeho expresiou v jadrách buniek v zdravom tkanive hrubého čreva (BRUNAGEL *et al.* 2003).

4. MATERIÁLY A METÓDY

4.1. PRÍPRAVA A PURIFIKÁCIA ĽUDSKÉHO REKOMBINANTNÉHO KALRETIKULINU A JEHO FRAGMENTOV

Pre testovanie hladín antikalkretikulínových protilátok v sérach pacientov s onkologickými ochoreniami bolo potrebné pripraviť ľudský rekombinantný kalretikulín, ktorý sme použili ako antigén v ELISA testoch. V spolupráci s laboratóriom Dr. Šeba boli pripravené okrem kompletnej molekuly kalretikulínu aj jej polovice a štvrtiny vo forme fúzných proteínov s reťazcom šiestich histidínov (6xHis).

4.1.1. Transformácia plazmidu s kalretikulínovým fragmentom do kompetentných buniek *E.coli* BL 21 (λ DE3) a indukcia jeho expresie

Kultivačné médiá:

LB médium: 10 g Bacto-trytone, 5 g kvasničného extraktu, 10 g NaCl, 1 l deionizovanej H₂O

MDO médium: 1 g NaH₂PO₄, 3 g Na₂HPO₄, 2 g NH₄Cl, 0,5 g Na₂SO₄, 10 mg thiaminu, 20 mg kvasničného extraktu, 20 mg glycerolu, 1000 ml deionizovanej H₂O

(pomocou 5 mol/l NaOH upraviť na pH 7; sterilizácia autoklávaním (0,12 MPa, 20 minút)).

Plazmidový konštrukt (pET 28b) nesúci gén pre 1. polovicu kalretikulínu bol vopred pripravený v spolupráci s rakúskym pracoviskom Odd. patológie Viedenskej univerzity (Profesor Valenta, Dr. Swoboda, RNDr. Jelínková, Ph.D.). DNA kódujúca ľudský rekombinantný kalretikulín bola amplifikovaná pomocou PCR použitím špecifických primerov a cDNA ľudského kalretikulínu pochádzajúcej z Genbank, č. M32294.

Vytvorený plazmid sme transformovali do kompetentných buniek produkčného kmeňa *E.coli* BL 21 (λ DE3). 50 μ l buniek *E.coli* BL21 zmiešaných s 1 μ l plazmidovej

DNA (100 µg/ml) sme preniesli z ľadu na vodný kúpeľ (37 °C), pridali 0,5 ml LB (Luria-Bertani) média a nechali ďalšiu hodinu pri 37 °C vo vodnom kúpeli. Po uplynutí inkubačnej doby sme preniesli 200 µl transformovaných buniek na vopred pripravené Petriho misky s agarom a antibiotikom kanamycínom (100 µl agaru, 60 µl kanamycínu) a nechali inkubovať cez noc pri 37 °C. Na druhý deň sme sterilnou bakteriologickou kľučkou urobili ster niekoľkých kolónií a zaočkovali „prekultúru“ do banky s 50 ml LB média a 30 µl kanamycínu. Bunky sme nechali rásť cez noc za stáleho trepania pri 37 °C. Ráno sme odobrali 15 ml suspenzie z 50 ml „prekultúry“ do vytemperovaných 5 l Erlenmeyerových baniek s médiom MDO a kanamycínom (500 ml MDO, 300 µl kanamycínu). Zároveň sme pre SDS-PAGE analýzu odobrali i 1 ml suspenzie ako negatívnu kontrolu bez indukcie expresie proteínového fragmentu. Po 45 minútach intenzívneho trepania sme začali v pravidelných časových intervaloch merať optickú densitu (OD) kultúry na spektrofotometri pri vlnovej dĺžke 600 nm (tab. 1).

Tab. 1

| ČAS (min) | OD |
|-----------|-------|
| 0 | 0,175 |
| 25 | 0,245 |
| 50 | 0,319 |
| 75 | 0,419 |
| 100 | 0,721 |

Po dosiahnutí optimálnej optickej denzity (0,721), kedy je kultúra na počiatku exponenciálnej fázy rastu, sme pridali do 5 l banky 5 ml IPTG (izopropyl β-D-thiogalaktopyranosid), čím sme indukovali expresiu prvej polovice kalretikulinu. Inkubácia prebiehala za stáleho trepania 4 hodiny pri 30 °C. Nasledovalo prudké ochladenie kultúry, z ktorej sme odobrali 1 ml pre analýzu vzorky na SDS-PAGE v porovnaní so vzorkou odobranou pred indukciou IPTG. Vzorky sme centrifugovali (13000 ot/1 min) a vzniknutý pelet resuspendovali v 200 µl TUE (50 mM Tris, 8 M Urea, 2 mM EDTA, pH 8). Takto spracované vzorky sme narieslili v redukčnom pufrí (kapitola 4.2.) a nanášali na gél.

Po centrifugácii kultúry (3400 ot/30 min) bol pelet resuspendovaný v 20 ml sonikačného pufru (Tris 50 mM, NaCl 150 mM) a následne opäť scentrifugovaný (5 000 ot/ 10 min). Supernatant sme zliali a pelet tvorený bunkami *E.coli* sme zmrazili a uchovali pri -20 °C.

4.1.2. Analýza solubility 1. polovice ľudského rekombinantného kalretikulínu

E.coli BL 21 (λ DE3) s exprimovaným kalretikulínovým fragmentom boli resuspendované v sonikačnom pufru (20 ml Tris 50 mM, NaCl 150 mM) a lyzované na sonikátore (výkon 50 W). Kyvetu s resuspendovanými bunkami sme upevnili tak, aby sa nedotýkala sondy sonikátora a ponorili ju do ľadového kúpeľa. Sonikácia prebiehala 4x 30-60 sekúnd s 30 sekundovými prestávkami na chladenie. Vznikol opalescentný roztok, ktorý sme scentrifugovali pri 3 000 ot/10 min. Tým sme odstránili nezsonikované bunky. Supernatant sme opäť odstredili pri 20 000 ot/30 min, čím sa usadili bunkové inklúzie.

V ďalšom kroku bolo potrebné zistiť, či je 1. polovica kalretikulínu rozpustná v cytosole alebo sa nachádza v bunkových inklúziách. Solubilitu fragmentu kalretikulínu sme analyzovali pomocou SDS-PAGE. Na gél sme nanášali vzorku supernatantu, v ktorom by sa fragment kalretikulínu v prípade rozpustnosti nachádzal. Ak by bol nami požadovaný proteínový fragment nerozpustný, jeho prítomnosť by sme preukázali v bunkových inklúziách, teda v pelete po centrifugácii (20 000 ot/30 min).

Z peletu bunkových inklúzií sme roztokom 4M močoviny a 50 mM TRISu odmyli bunkové membrány. Následne sme pridali 10 ml roztoku 7M močoviny a 50 mM TRISu, intenzívne miešali 30 min a odstredili pri 20 000 ot/30 min. Supernatant (močovínový extrakt), ktorý by v prípade nerozpustnosti 1.polovice kalretikulínu obsahoval tento fragment, sme nanášali na gél.

4.1.3. Purifikácia ľudského rekombinantného kalretikulínu na TALONTM SuperflowTM matrix

Prvá polovica kalretikulínu bola purifikovaná metódou afinitnej chromatografie použitím TALONovej matrix s imobilizovaným kobaltnatým iónom. Prostredníctvom

tohto iónu sa môže štruktúra tvorená šiestimi histidínmi na konci fragmentu kalretikulínu špecificky viazať na matrix.

Roztoky:

Ekvilibračný roztok: 50 mM Tris, 8 mM Urea, 300 mM NaCl

Premývací roztok: 50 mM Tris, 8 mM Urea, 300 mM NaCl, 1 mM imidazol

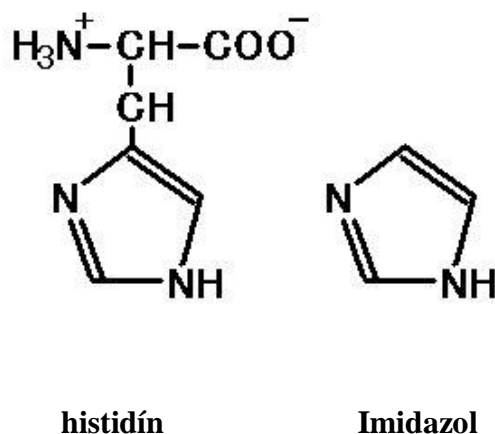
Elučný roztok: 50 mM Tris, 8 mM Urea, 300 mM NaCl, 150 mM imidazol

Kolónku sme naplnili 7 ml TALONovej matrix a prepláchli deionizovanou vodou a ekvilibračným roztokom. Potom sme k matrix pridali močovínový extrakt, v ktorom sme po analýze na SDS-PAGE preukázali kalretikulínový fragment. Túto zmes sme umiestnili na rotačný prístroj a za stáleho rotovania sme nechali proteínový fragment naväzovať na matrix 30 min pri izbovej teplote. Po uplynutí inkubácie sme močovínový extrakt nechali pretiecť kolónkou a následne kolónku postupne premývali ekvilibračným roztokom (asi 20 ml), premývacím roztokom (asi 10 ml) a nakoniec elučným roztokom. Počas premývania kolonky elučným roztokom došlo vďaka zvýšenej koncentrácii imidazolu k uvoľneniu fragmentu kalretikulínu z TALONovej matrix. Ako je vidieť na obr. 3, imidazol je molekulový analóg histidínu a kompetuje s histidínom o väzbové miesto na Co^{2+} TALONovej matrix. Preto pri 150 mM koncentrácii imidazolu v elučnom roztoku dochádza k uvoľneniu 1. polovice kalretikulínu.

Frakcie sme následne prečistili gélovou filtráciou na Sephadex G25. Sephadex G25 bolo potrebné premyť deionizovanou vodou a ekvilibračným roztokom, pretože sa uchováva v 2 mM kyseline octovej. Až potom bolo možné nanášať na kolónku izolované frakcie.

Jednotlivé frakcie obdržané v priebehu afinitne-chromatografickej izolácie fragmentu kalretikulínu z bakteriálneho lyzátu boli separované elektroforézou v polyakrylamidovom géle v prostredí s SDS (sodiumdodecylsulfát sodný) a následne ofarbené roztokom Coomassie[®] Brilliant Blue R-250 (kapitola 4.2.). Prítomnosť 1. polovice kalretikulínu bola verifikovaná po prenesení na nitrocelulóзовú membránu reaktivitou s antikalretikulínovými protilátkami (kapitola 4.3.).

Na stanovenie koncentrácie proteínov v izolovaných frakciách sme použili BCA kit.



Obr. 3 Histidín a imidazol – molekulárne analógy

4.2. SDS-PAGE

Roztoky :

10% SDS: 10g SDS /100 ml H₂O

Tris pufoer pH 8,8: 18,15 g Tris /60 ml H₂O, upraviť pH pomocou HCl a doplniť do 100 ml H₂O

Tris pufoer pH 6,8: 6 g Tris /60 ml H₂O, upraviť pH pomocou HCl a doplniť do 100 ml H₂O

Elektródový pufoer: 9g Tris, 43,2 g glycín, 3 g SDS, 600 ml H₂O

10% roztok aminopersíranu: 0,1g (NH₄)₂S₂O₈ (peroxidisíran amónny) /1 ml H₂O

Redukujúci K-pufoer: 2,4 ml Tris pufru (pH 6,8), 2 ml 10% SDS, 1 ml glycerolu, 4 ml H₂O, 0,5 ml 2-merkptoethanolu

Coomassie brilliant blue roztok: 250 ml methanol, 50 ml konc. kyselina octová, 200 ml H₂O, 1 g Coomassie[®] Brilliant Blue R-250

Odfarbovací roztok: 40 ml methanol, 10 ml kyselina octová, 50 ml H₂O

Sušiaci roztok: 10 ml glycerol, 50 ml methanol, 140 ml H₂O

Príprava gélov:

Elektroforéza v polyakrylamidovom géle v prostredí s SDS bola pripravená modifikáciou metódy LAEMMLI a FAVRE (1973). Desať percentný akrylamidový deliaci gél (4,05 ml H₂O, 2,5 ml Tris pH 8,8, 100 µl 10% SDS, 3,3 ml akrylamidu, 50 µl 10% persíranu, 5 µl TEMEDu) sme aplikovali pomocou injekčnej striekačky medzi

sklá v stojanoch elektroforetickej súpravy. Gél sme prevrstvili destilovanou vodou a nechali polymerizovať (30 minút, 37 °C). Potom sme vyrobili zaostrovací gél (6,1 ml H₂O, 2,5 ml Tris 6,8, 100 µl 10% SDS, 1,3 ml akrylamid, 50 µl 10% aminopersíranu, 10 µl TEMEDu), ktorý sme po zasunutí hrebeňov do priestoru medzi sklami naniesli na deliaci gél. Po spolymerizovaní (30 minút) sme skompletovali elektroforetickú sústavu a zaliali roztokom elektródového pufru (60 ml elektródového pufru, 240 ml H₂O). Na gél sme nanášali vzorky v redukčnom pufri povarené po dobu 5 minút (10 µl vzorky, 10 µl K-pufri, 2 µl bromfenolovej modrej) a zmes štandardov. Elektroforéza prebiehala pri 35 mA a 90-180 V po dobu asi 45 minút. Jednotlivé proteíny migrovali gélom rozlične rýchlo v závislosti na molekulovej hmotnosti. Separované proteíny so známou M_r (štandard) nám slúžili k zisteniu molekulových hmotností delených bielkovín vo vzorkách. Po uvoľnení zo súpravy sme gél ofarbili roztokom Coomassie® Brilliant Blue R-250 (30 min na miešačke alebo cez noc). Po zliatí roztoku sme pozadie gélu odfarbili odfarbovacím roztokom a nakoniec gél vysušili v sušiacom roztoku.

4.3. WESTERN BLOT

Roztoky:

Blotovacie roztok: 14,4 g glycín, 3 g Tris, 200 ml methanol, doplniť do 1 l H₂O

Chemiluminiscenčný roztok I: 18 ml H₂O, 2 ml 1M Tris pufru (pH 8,5), 90 µl kyseliny kumarové (90 mmol/l, rozpúšťadlo- DMSO), 200 µl luminolu (250 mmol/l, rozpúšťadlo- DMSO)

Chemiluminiscenčný roztok II: 18 ml H₂O, 2 ml 1M Tris pufru (pH 8,5), 12 µl H₂O₂ (30%)

Aby sme sa presvedčili o prítomnosti izolovaného rekombinantného kalretikulínu v jednotlivých frakciách, použili sme k jeho detekcii metódu Western blotu. Pri tejto metóde separované molekuly, ktoré interakciou s SDS získali záporný náboj, prechádzajú z polyakrylamidového gélu cez blotovaciu membránu na anodickú stranu blotovacej jednotky. Molekuly zachytené na membráne je následne možné detekovať napr. pomocou protilátok.

Pripravili sme si fotomisku do ktorej sme naliali pripravený blotovací roztok. Na držiak blotu sme postupne ukladali prenosovú podložku, filtračný papier rovnakej

veľkosti a nitrocelulóзовú membránu vystrihnutú podľa veľkosti gélu. Po skončení elektroforézy sme preniesli na membránu gél a priložili filtračný papier a prenosovú podložku. Držiak sme vložili do blotovacej nádoby a priliali zbytok blotovacieho roztoku tak, aby bol držiak s membránou plne ponorený. Blotovacie zariadenie sme napojili na zdroj elektrického prúdu (250 mA). Vlastné blotovanie prebiehalo 1 hodinu. Po skončení blotácie sme vybrali membránu z blotovacieho zariadenia a nechali ju usušiť.

Postup vlastnej imunodetekcie kalretikulinu bol nasledujúci. Voľné miesta na celulóзовom povrchu membrány s prenesenými proteínmi bolo nutné zablockovať 3% mliekom v 0,1% PBS-Tween® (PBS-T) po dobu 2 hodín. Po premytí (3x po 5 min 0,1% PBS-T) membrány 0,1% PBS-T sme pridali králičiu primárnu antikalkretikulínovú protilátku (ABR, UK) nariedenú v blokačnom roztoku (1% mlieko v 0,1% PBS-T) a nechali inkubovať 12 hodín na trepačke pri 4 °C. Potom sme membránu opäť premyli a aplikovali sekundárnu protilátku proti králičím imunoglobulínom konjugovanú s peroxidázou riedenú v blokačnom roztoku (1 % mlieko v 0,1% PBS-T). Po hodinovej inkubácii na trepačke pri izbovej teplote sme membránu opätovne premývali.

Prostredníctvom chemiluminiscenčnej reakcie sme väzbu protilátok k peptidu vizualizovali pomocou chemiluminiscenčných roztokov I a II zmiešaných v pomere 1:1. Svetelné kvantá emitované v miestach väzby protilátok boli zachytené na rentgenovom filme.

4.4. TESTOVANIE HLADÍN PACIENTSKÝCH PROTILÁTOK PROTI KALRETIKULINU A TKANIVOVEJ TRANSGLUTAMINÁZE METÓDOU ELISA

Roztoky:

PBS: 36 g NaCl, 0,8 g NaH₂PO₄, 4,8 g Na₂HPO₄·12 H₂O, doplniť do 4 l H₂O a upraviť pH na 7,2-7,4

Citrátový pufor: 2,94 g citrónanu sodného/100 ml H₂O, pomocou 0,1M kyseliny citrónovej upraviť pH na 4,2

Vyvolávací pufor: 10 ml citrátového pufru (pH 4,2), 10 mg OPD (orthofenylendiamin), 7,5 µl H₂O₂

K testovaniu hladín patientských protilátok proti kalretikulinu a tkanivovej transglutamináze sme použili priamy dvojstupňový ELISA test, u ktorého v prvom kroku je antigén naadherovaný na povrch mikrotitračnej doštičky. Voľné miesta na doštičke sú obsadené vhodným blokačným činidlom. Následne sú na doštičku aplikované séra vhodne nariadené v blokačnom roztoku. Prítomnosť naviazaných patientských protilátok je detekovaná pomocou sekundárnej protilátky proti danému izotypu ľudských protilátok. Sekundárne protilátky sú konjugované s enzýmami, ktoré menia pôvodne bezfarebný chromogénny substrát na farebný. Miera zafarbenia substrátu pozitívne koreluje s množstvom patientských protilátok naviazaných na antigén.

Metodický postup ELISA testu pre stanovenie IgA a IgG antikalkretikulínových protilátok bol prevzatý z prác KARSKÁ *et al.* (1995), SÁNCHEZ *et al.* (2000) a je momentálne súčasťou patentového riadenia. Ako antigén sme použili ľudský rekombinantný kalretikulin pripravený v našom laboratóriu.

ELISA test pre testovanie hladín protilátok proti tkanivovej transglutamináze bol prevzatý z práce DIETERICH *et al.* (1998). Ako antigén sme použili komerčne dostupnú tkanivovú transglutaminázu izolovanú z pečene morčiat. Zásobný roztok morčacej tkanivovej transglutaminázy (1,1 mg solid rozpustený v 1 ml PBS) sme nariadení v PBS v pomere 1:100 a naniesli na mikrotitračnú doštičku Nunc-Maxisorp v objeme 50 µl na jamku a nechali naväzovať k jej povrchu cez noc pri 4 °C. Na druhý deň sme roztok s nenaviazaným antigénom zliali a voľné miesta na doštičke sme obsadzovali 1% roztokom BSA v PBS (100 µl na jamku) 1 hodinu pri izbovej teplote. Následne sme doštičku premyli 3 x PBS, 3 x PBS-Tween (0,05%), 3 x PBS. Patientské séra a štandard tvorený zmesou reálnych patientských sér sme nariadení v pomere 1:20 a 1:100 v 1% BSA, nanášali v tripletoch na doštičku v objeme 50 µl na jamku a inkubovali 2 hodiny pri izbovej teplote. Potom sme doštičky premyli (3 x PBS, 3 x PBS-Tween (0,05%), 3 x PBS) a nanášali sekundárne protilátky proti ľudskému IgA konjugované s chrenovou peroxidázou riedené 1:750 v 10 % normálnom ovčom sére v PBS (50 µl na jamku). Po hodinovej inkubácii pri izbovej teplote sme doštičky opätovne premyli (3 x PBS, 3 x PBS-Tween (0,05%), 3 x PBS) a pridali citrátový pufoer s rozpusteným OPD (orthofenyldiamin) a H₂O₂ (5 ml citrátového pufru, 5 mg OPD, 7,5 µl H₂O₂). Chromogénnu reakciu sme zastavili pomocou 2 M H₂SO₄. Optickú denzitu vzoriek i štandardu sme merali na ELISA readeri pri vlnovej dĺžke 492 nm.

4.5. ANALÝZA ANTIGÉNNÝCH EPITOPOV KALRETIKULINU METÓDOU PEPSCAN

Metóda PEPSCAN bola použitá k analyzovaniu detailnej špecificity patientských sér či sér kontrolnej skupiny zdravých krvných darcov. Metóda PEPSCAN využíva syntetické deka-peptidy kalretikulínu kovalentne naviazané na celulóзовú membránu. Súbor deka-peptidov korešponduje s kompletnou sekvenciou molekuly kalretikulínu. Susediace deka-peptidy sa navzájom prekrývajú o osem aminokyselín.

Roztoky:

TBS pH 8 – zásobný: 80 g NaCl, 2 g KCl, 61 g Tris, 800 ml H₂O → upraviť pH 8

Doplniť do 1000 ml

TBS – riedený: 100 ml TBS pH8 (zásobný), 900 ml H₂O

TBS-Tween (0,1%): 1000 ml TBS riedený, 1 ml Tween

Blokovací roztok (4%): 4 g mlieka do 100 ml 0,1% TBS/ Tween

Reaktivačný roztok I: 6,05g Tris HCl , 1l H₂O → upraviť pH 6,7

pridať 7,1 ml 2-merkptoethanol, 10 g SDS

Reaktivačný roztok II: 1,88 g glycínu, 500 ml H₂O → upraviť pH 4

Vysušenú membránu sme najprv aktivovali metanolom po dobu 8 minút. Nasledovalo premývanie 3 x 5 min v TBS-Tween (TBS-T). Po premytí bola membrána blokovaná v blokovacom roztoku po dobu 1 hod. Séra sme riedili 1:100 v 2% mlieku v 0,1% TBS-T a inkubovali s membránou 2 hodiny pri izbovej teplote. Potom sme membránu premývali 3 x 5 min v TBS-T a následne inkubovali 1 hodinu so sekundárnou protilátkou (anti-ľudskou IgA/IgG) konjugovanou s peroxidázou, riedenou 1:750 v 2% mlieku v 0,1% TBS-T. Väzba protilátok ku deka-peptidom bola vizualizovaná chemiluminiscenčnou reakciou, analogicky ako v prípade metódy Western blotu (kapitola 4.3.). Aby sme čo najobjektívnejšie ohodnotili reaktivitu sérových protilátok s jednotlivými deka-peptidmi kalretikulínu, porovnávali sme časovo rozlične dlhé expozície.

Membrány sme používali opakovane. Po každom použití membrány bola nutná jej regenerácia, ktorou boli uvoľnené naviazané protilátky.

Postup regenerácie membrány:

Membránu sme premývali 3x 2min TBS/Tween
Reakt. roztok I – 1 hod, pokojová teplota
3x 2min TBS/ Tween
Reakt. roztok II – 30 min, pokojová teplota
3x 2 min TBS/Tween
1x 10 min TBS provozný
1x 2 min methanol

Po ukončení regenerácie sme membránu nechali voľne usušiť a skladovali v chladničke.

4.6. ŠTATISTICKÉ SPRACOVANIE DAT

4.6.1. ELISA

Výšky hladín protilátok proti kalretikulínu a tkanivovej transglutamináze namerané metódou ELISA uvádzame v jednotkách AU (arbitrary units). AU predstavuje percento optickej denzity vzorky z optickej denzity štandardu. Hodnotu cut-off sme stanovovali zo skupiny 35 zdravých krvných darcov ako priemer + 2x smerodajná odchýlka. Nad túto hodnotu sme považovali séra za pozitívne. Každé sérum bolo testované najmenej dvoma na sebe nezávislými experimentmi. Štatistické rozdiely hladín protilátok pacientov v porovnaní s hladinami protilátok zdravých kontrol sme vyhodnocovali neparametrickým Mann-Whitney testom na hladinách významnosti: $P < 0,01$ (**), $P < 0,05$ (*). NS značí nesignifikantné rozdiely medzi hladinami protilátok pacientov a kontrolnej skupiny krvných darcov.

4.6.2. PEPSCAN

Reaktivitu patientských protilátok proti jednotlivým peptidom sme vyhodnocovali kvalitatívne ako negatívnu/pozitívnu. V rámci jednej skupiny bola táto reaktivita vyjadrená ako index reaktivity (RI). RI udáva pomer počtu pacientov, ktorých protilátky reagovali s určitým peptidom ku všetkým pacientom v testovanej skupine. Výsledky PEPSCANu boli znázornené vo forme grafu, kde x-ová os predstavuje 201 decapeptidov kalretikulínu. Na y-ovej osi je vynesovaný index reaktivity RI.

Aby sme čo najobjektívnejšie odhalili reaktivitu sérových protilátok s jednotlivými deka-peptidmi kalretikulínu, porovnávali sme časovo rozlične dlhé expozície.

4.7. ZOZNAM POUŽITÝCH CHEMIKÁLIÍ A PRÍSTROJOV

4.7.1. Zoznam použitých chemikálií a materiálov

2-merkaptóethanol (Serva, SRN)

akrylamid (Bio-Rad, USA)

bakteriologický agar (Oxoid, Veľká Británia)

Bacto-tryptone (Oxoid, Veľká Británia)

bromfenolová modrá (Lachema, ČR)

citronan sodný (Lachema, ČR)

Coomassie[®] Brilliant Blue R-250 (Serva, SRN)

dimethylsulfoxid (Sigma-Aldrich, USA)

dodecylsulfát sodný (Serva, SRN)

dodekahydrát dihydrogenfosforečnanu sodného ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$) (Lachema, ČR)

ethanol (Merck, SRN)

ethylendiaminotetraoctová kyselina (EDTA) (Serva, SRN)

glycerol (Lachema, ČR)

glycín (Serva, SRN)

hovädzí sérový albumin (Sigma-Aldrich, USA)

hydrogenfosforečnan sodný (NaH_2PO_4) (Lachema, ČR)

hydroxid sodný (Lachema, ČR)

chlorid amónny (Lachema, ČR)

chlorid draselný (Lachema, ČR)

chlorid sodný (Lachema, ČR)

imidazol (Fluka, SRN)

izopropyl β -D-thiogalaktopyranosid (IPTG) (Alexis biochemicals, USA)

kanamycín (Sigma-Aldrich, USA)

kolónka (Bio-Rad, USA)

kyselina citrónová (Lachema, ČR)

kyselina chlorovodíková (Lachema, ČR)

kyselina kumarová (Sigma-Aldrich, USA)
kyselina octová (Lachema, ČR)
kyselina sírová (Lachema, ČR)
luminol (Sigma-Aldrich, USA)
methanol (Lachner, ČR)
mikrotitračné doštičky (Nunc, Dánsko)
mlieko (Laktino, ČR)
močovina (Merek, SRN)
nitrocelulóзовá membrána (Amersham Biosciences, SRN)
N,N,N',N'-tetrametylethylendiamin (TEMED) (Bio-Rad, USA)
Orthophenylendiamin (OPD) (Sigma-Aldrich, USA)
PEPSCANová membrána (Abimed, SRN)
peroxid vodíka (Chemapol, Československo)
peroxodisíran amónny (Lachema, ČR)
rentgenové filmy (Kodak, Francúzsko)
Sephadex G 25 (Pharmacia, Švédsko)
štandardy - Prestained SDS-PAGE Standards (Bio-Rad, USA)
TALON™ Superflow™ matrix (BD Bioscience Clontech, USA)
Thiamin (Sigma-Aldrich, USA)
tkanivová transglutamináza (Sigma-Aldrich, USA)
tris(hydroxymetyl)aminomethan (Tris) (Serva, SRN)
Tween® (Serva, SRN)

4.7.2. Zoznam použitých súprav a protilátok

BCA kit (Pierce, USA)
primárna králičia antikalretikulínová protilátka (ABR, USA)
sekundárna protilátka proti králičím imunoglobulínom konjugovaná s chrenovou peroxidázou (The Binding Site, Veľká Británia)
sekundárna protilátka proti α a γ reťazcu ľudských imunoglobulínov konjugovaná s chrenovou peroxidázou (The Binding Site, Veľká Británia)

4.7.3. Zoznam použitých prístrojov a programov

autokláv SYSTEC C 5075 EL (SYSTEC GmbH, SRN)
blotovacia jednotka Mini Trans-Blot[®] (Bio-Rad, USA)
centrifuga Universal 32R (Hettich, Veľká Británia)
centrifuga Rotanta 460R (Hettich, Veľká Británia)
centrifuga EBA 12 (Hettich Zentrifugen, Tullingen, SRN)
centrifuga Biofuge pico (Heraeus instruments, Veľká Británia)
elektroforetická jednotka Mini-PROTEAN[®] II (Bio-Rad, USA)
pH metr Jenway 3505 (Baroworld Scientific Ltd., Essex, Anglie)
prístroj na vyvolanie filmov – Optimax (Fomei, Bukurešť, Rumunsko)
spektrofotometer Titertek Multiscan[®] MCC/340 ELISA Reader (Eflab, Fínsko)
spektrofotometer SECOMAM S.250I+ (ALC-SECOMAM, Francúzsko)
štatistický program: Prism[™]
termostatický vodný kúpeľ typ U7C, VEB MLW, NDR
ultrasonikátor 4710, Cole-Parmer Instruments Co., USA
zdroj napätia CONSORT E844 (Scie-Plas, Veľká Británia)

5. VÝSLEDKY

5.1. PURIFIKÁCIA ĽUDSKÉHO REKOMBINANTNÉHO KALRETIKULINU A JEHO FRAGMENTOV

V spolupráci s laboratóriom dr. Šeba bol v našom laboratóriu pripravený ľudský rekombinantný kalretikulín a fragmenty korešpondujúce s jeho štvrtinami a polovicami. Druhá štvrtina, tretia štvrtina, štvrtá štvrtina, druhá polovica kalretikulínu a jeho celá molekula boli izolované za natívnych podmienok na Ni-NTA kolóne. Prvú štvrtinu a prvú polovicu kalretikulínu nebolo možné izolovať za týchto podmienok, pretože boli nerozpustné a po sonikácii buniek *E.coli* prítomné v bunkových inklúziách. Fragmenty boli extrahované do močoviny a purifikované na TALONovej kolóne.

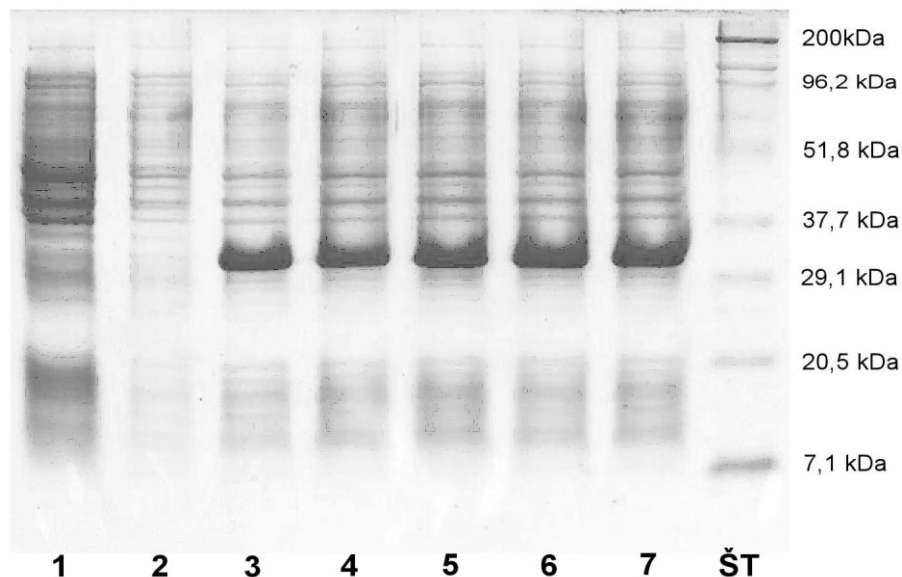
Plazmidový konštrukt (pET 28b) nesúci gén pre 1. polovicu kalretikulínu sme transfekovali do buniek produkčného klonu *E.coli* BL21 (λ DE3) a následne sme indukovali expresiu proteínového fragmentu pomocou IPTG. Vzorka suspenzie kultúry odobraná pred indukciou expresie fragmentu slúžila ako negatívna kontrola v analýze SDS-PAGE. Analýza expresie 1. polovice kalretikulínu u buniek stimulovaných a nestimulovaných IPTG je znázornená na obr. 4. Solubilitu exprimovaného fragmentu sme overovali na SDS-PAGE (obr. 5). Na gél sme nanášali vzorku supernatantu po centrifugácii zlyzovaných buniek a vzorku močovínového extraktu, ktorý sme získali podľa popisu v kapitole 4.1.2.. Prvú polovicu kalretikulínu sme preukázali v močovínovom extrakte.

5.1.1. Izolácia prvej polovice kalretikulínu na TALONovej kolóne

Prvú polovicu kalretikulínu sme vyizolovali za denaturačných podmienok na Co^{2+} TALONovej kolóne. Po naviazaní rekombinantného fragmentu na matrix sme kolónku premývali postupne ekvilibračným, premývacím a elučným roztokom, pri ktorom došlo k uvoľneniu kalretikulínového fragmentu z TALONovej matrix. Analýza SDS-PAGE na obr. 6 znázorňuje uvoľňovanie 1. polovice kalretikulínu z kolóny v priebehu premývania jednotlivými roztokmi.

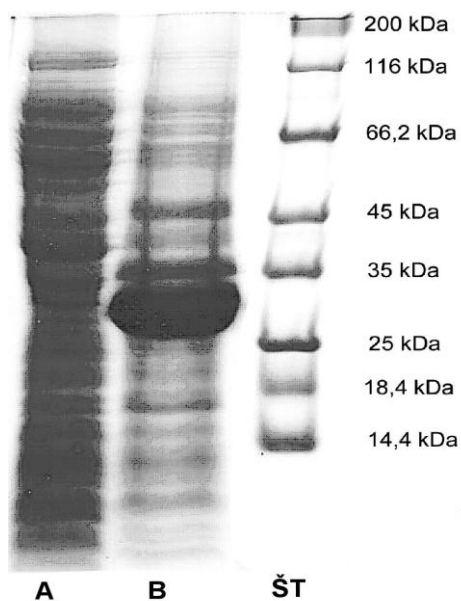
Obr. 4 SDS-PAGE analýza (10% gél, farbený Commassie Blue) expresie 1. polovice rekombinantného kalretikulinu u buniek stimulovaných a nestimulovaných IPTG.

1, 2 - resuspendované bunky bez stimulácie (1.: 15 μ l, 2.: 5 μ l); 3-7 – resuspendované bunky po stimulácii IPTG s následnou expresiou fragmentu kalretikulinu (15 μ l)



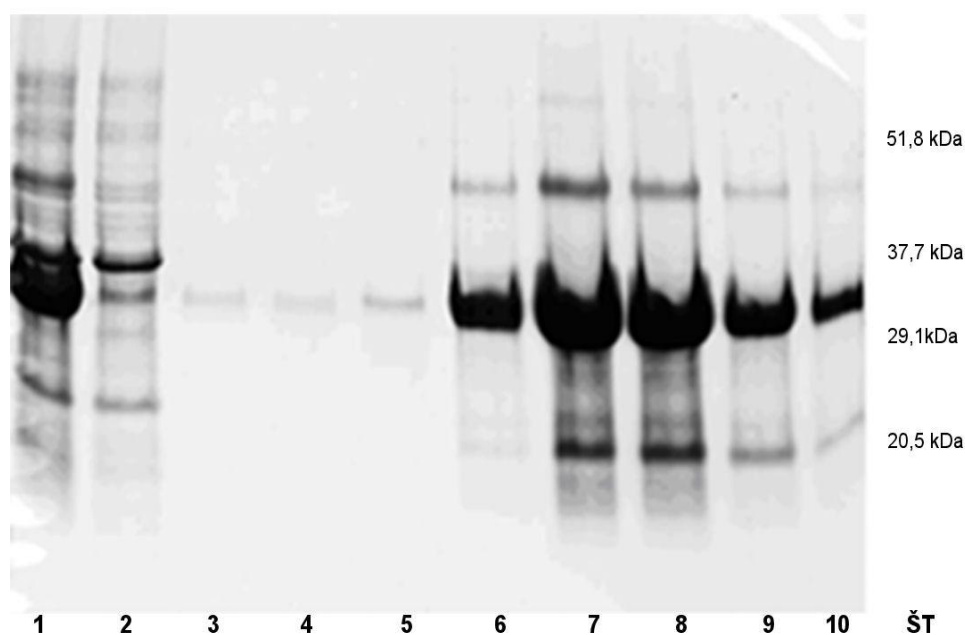
Obr. 5 Testovanie prítomnosti 1. polovice kalretikulinu SDS-PAGE analýzou (10% gél, farbený Coomassie Blue):

A – supernatant lyzátu buniek *E.coli* BL 21 (λ DE3) rozpustený v sonikačnom pufre (negatívny pre kalretikulin); **B** - močovínový extrakt bunkových inklúzií (pozitívny pre kalretikulin)



Obr. 6 SDS-PAGE analýza (10% gél, farbený Coomassie Blue) izolácie 1. polovice kalretikulinu na TALONovej kolóne

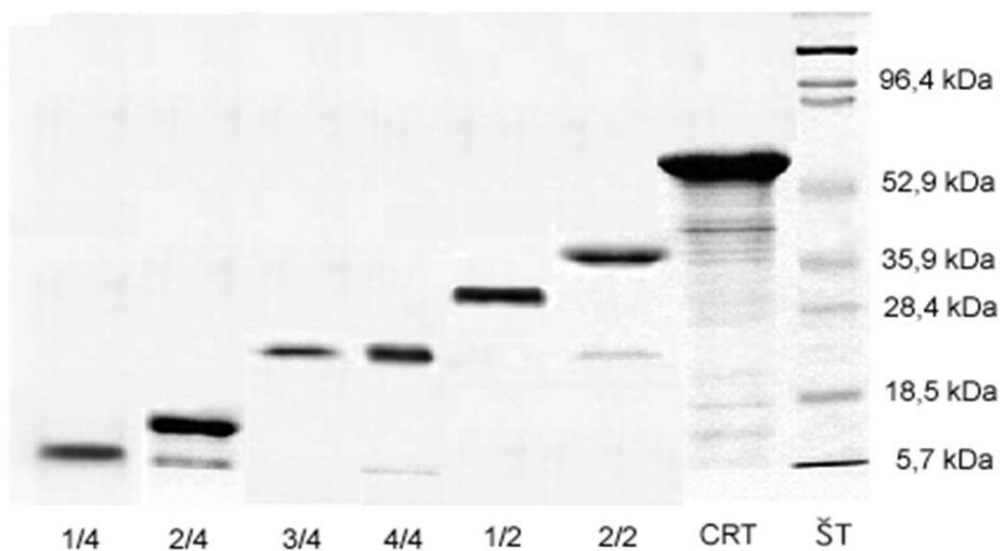
1 – močovínový extrakt z produkčného kmeňa E coli, 2 – pretečená frakcia, 3 – frakcia po premytí ekvilibračným roztokom, 4 – frakcia po premytí premývacím roztokom, 5 -10 – frakcie po premytí elučným roztokom



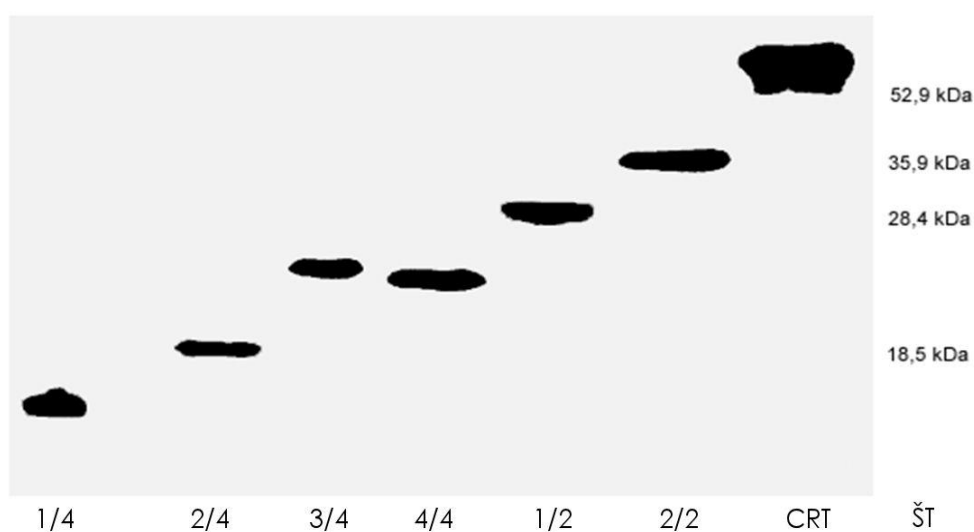
Čistota izolovaných frakcií bola overovaná na SDS-PAGE (10% gél, farbený Coomassie Blue). Prítomnosť izolovaného kalretikulinu i jeho fragmentov v jednotlivých frakciách bola preukazovaná Western blotom použitím králičích antikalkretikulínových protilátok. Pre dokumentáciu uvádzam výslednú SDS-PAGE analýzu kalretikulinu a jeho jednotlivých fragmentov izolovaných členmi nášho laboratória (obr. 7). Zároveň prikladám i Western blot analýzu s celou molekulou kalretikulinu a jeho fragmentmi (obr.8).

Koncentráciu proteínov v izolovaných frakciách sme stanovovali BCA kitom. Hodnoty sa pohybovali medzi 0,077 až 10,5 mg/ml.

Obr. 7 SDS-PAGE analýza (10% gel, farbený Coomassie Blue) izolovaného kalretikulinu a jeho častí: 1-prvá, 2-druhá, 3-tretia, 4-štvrtá štvrtina kalretikulinu, 5-prvá (N-terminálna), 6-druhá polovica kalretikulinu, 7-kompletná molekula kalretikulinu (ŠT – štandard molekulových hmotností).



Obr. 8 Reaktivita antikalretikulinových protilátok s celou molekulou rekombinantného kalretikulinu a jeho izolovanými fragmentmi korešpondujúcimi s prvou, druhou, treťou a štvrtou štvrtinou a prvou a druhou polovicou tejto molekuly



5.2. STANOVENIE HLADÍN PROTIĽÁTKOVI PROTI KALRETIKULINU A TKANIVOVEJ TRANSLUTAMINÁZE

5.2.1. Stanovenie hladín IgA a IgG protilátok proti kalretikulinu

Za účelom stanovenia hladín anti-kalretikulinových protilátok bola v našom laboratóriu pripravená celá molekula ľudského rekombinantného kalretikulinu, ktorý sme použili ako antigén v dvojstupňovom ELISA teste. Testovali sme séra 103 pacientov, z toho bolo 13 pacientov s primárnym karcinómom pečene, 38 pacientov s karcinómom pankreasu, 8 pacientov s karcinómom pankreasu s metastázami v pečeni, 7 pacientov s karcinómom hrubého čreva, 7 pacientov s karcinómom hrubého čreva s metastázami v pečeni, 14 pacientov s pankreatitídami, 16 pacientov s vírusovou hepatitídou B (n=3) a C (n=13). Kontrolnú skupinu tvorili séra 35 zdravých krvných darcov.

Výsledky testovania hladín protilátok proti kalretikulinu triedy IgA a IgG sú zhrnuté v grafe 1. Zvýšené hladiny (nad cut-off) IgA antikalretikulinových protilátok sme preukázali u 8 z 13 (61,5%) pacientov s primárnym karcinómom pečene, 17 z 38 (44,7%) pacientov s karcinómom pankreasu, 2 z 8 (25%) pacientov s karcinómom pankreasu s metastázami v pečeni, 2 zo 7 (28,6%) pacientov s karcinómom hrubého čreva, 4 zo 7 (57,1%) pacientov s karcinómom hrubého čreva s metastázami v pečeni, 4 zo 14 (28,6%) pacientov s pankreatitídou, 1 zo 16 (6,25%) pacientov s vírusovou hepatitídou. Zvýšené hladiny (nad cut-off) IgG antikalretikulinových protilátok boli detekované u 8 z 13 (61,5%) pacientov s primárnym karcinómom pečene, 15 z 38 (39,5%) pacientov s karcinómom pankreasu, 2 z 8 (25%) pacientov s karcinómom pankreasu s metastázami v pečeni, 2 zo 7 (28,6%) pacientov s karcinómom hrubého čreva, 2 zo 7 (28,6%) pacientov s karcinómom hrubého čreva s metastázami v pečeni a 4 zo 14 (28,6%) pacientov s pankreatitídou.

Signifikantne zvýšené hladiny IgA antikalretikulinových protilátok sme preukázali u pacientov s primárnym karcinómom pečene ($P < 0,01$, $98,9 \pm 69,83$ [priemer \pm smerodajná odchýlka]), karcinómom pankreasu ($P < 0,05$, $76,31 \pm 60,86$), karcinómom pankreasu s metastázami v pečeni ($P < 0,01$, $63,14 \pm 14,94$) a pankreatitídou ($P < 0,05$, $59,79 \pm 29,98$) v porovnaní s kontrolnou skupinou zdravých darcov ($40 \pm 14,94$). Hladiny antikalretikulinových protilátok triedy IgG boli

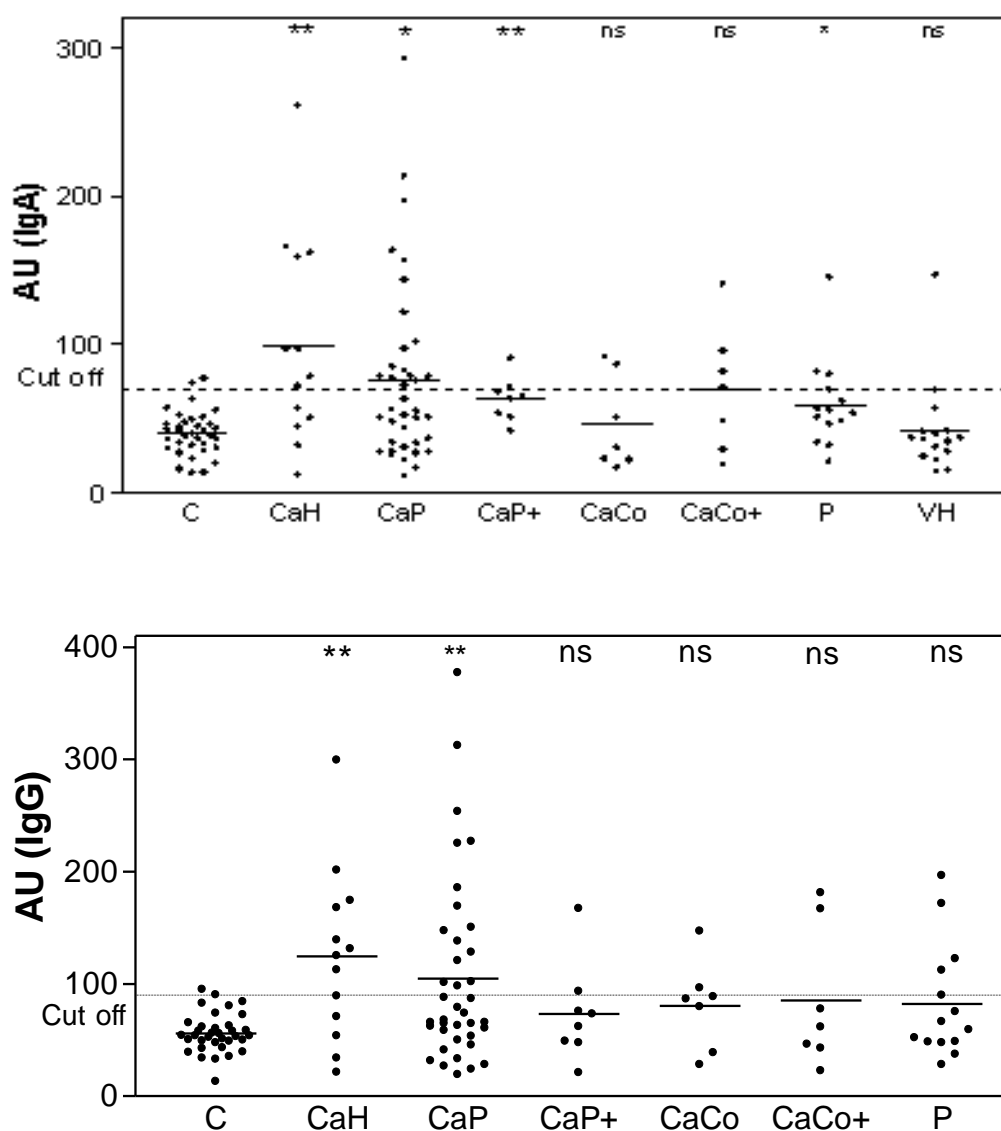
signifikantne zvýšené u pacientov s primárnym karcinómom pečene ($P < 0,01$, $124,4 \pm 75,99$) a karcinómom pankreasu ($P < 0,01$, $104,7 \pm 82,6$) v porovnaní s kontrolnou skupinou zdravých darcov ($55,69 \pm 17,23$).

5.2.2. Stanovenie hladín IgA protilátok proti tkanivovej transglutamináze

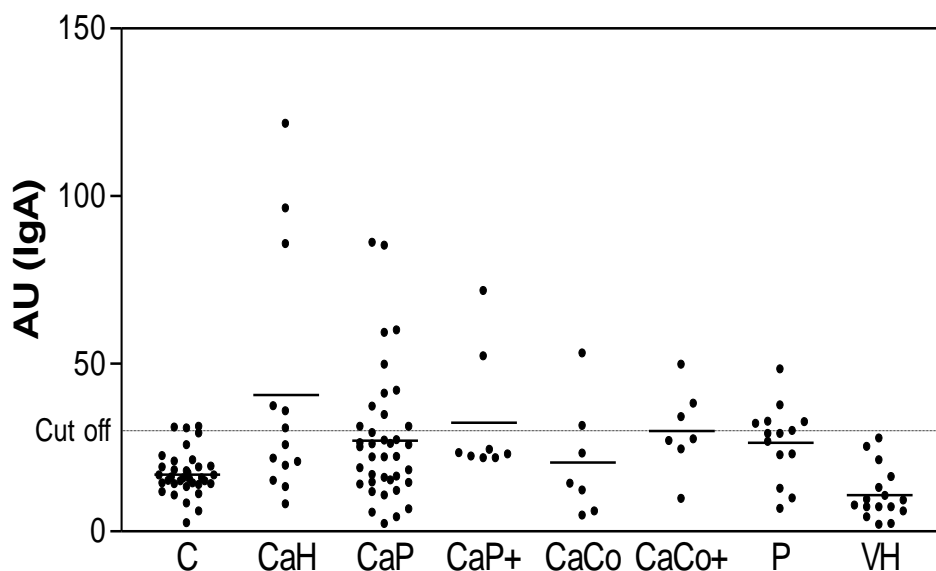
Pre stanovenie hladín protilátok proti tkanivovej transglutamináze v priamom dvojstupňovom ELISA teste sme použili komerčne dostupnú morčaciu tkanivovú transglutaminázu izolovanú z pečene. Testovaniu sme podrobili séra pacientov, u ktorých sme stanovovali hladinu sérových protilátok proti kalretikulínu (kapitola 5.2.1.).

Výsledky testovania hladín protilátok proti tkanivovej transglutamináze znázorňuje graf 2. Zvýšené hladiny (nad cut-off) IgA protilátok proti tkanivovej transglutamináze sme preukázali v sérach 6 z 13 (46,2%) pacientov s primárnym karcinómom pečene, 11 z 38 (28,9%) pacientov s karcinómom pankreasu, 2 z 8 (25%) pacientov s karcinómom pankreasu s metastázami v pečeni, 2 zo 7 (28,6%) pacientov s karcinómom hrubého čreva, 3 zo 7 (42,9%) pacientov s karcinómom hrubého čreva s metastázami v pečeni a 5 zo 14 (35,7%) pacientov s pankreatitídou.

Graf 1 Distribúcia IgA a IgG antikalretikulínových protilátok u pacientov s primárnym karcinómom pečene (CaH, n=13), karcinómom pankreasu (CaP, n=38), karcinómom pankreasu s metastázami v pečeni (CaP+, n=8), karcinómom hrubého čreva (CaCo, n=7), karcinómom hrubého čreva s metastázami v pečeni (CaCo+, n=7), pankreatitídou (P, n=14), vírusovou hepatitídou (VH, n=16) a zdravých kontrol (C, n=35). Hladiny protilátok sú vyjadrené v jednotkách AU. Plné krátke vodorovné čiary označujú priemerné hladiny protilátok. Hodnota cut-off (70 AU pre IgA, 90 AU pre IgG protilátky) je znázornená tenkou vodorovnou čiarou. Štatisticky významné rozdiely hladín protilátok medzi kontrolnou skupinou a patientskými skupinami sú vyjadrené: $P < 0,01$ (**), $P < 0,05$ (*), ns - nesignifikantné hladiny protilátok.



Graf 2 Distribúcia IgA protilátok proti tkanivovej transglutamináze u pacientov s karcinómom pečene (CaH, n=13), karcinómom pankreasu (CaP, n=38), karcinómom pankreasu s metastázami v pečeni (CaP+, n=8), karcinómom hrubého čreva (CaCo, n=7), karcinómom hrubého čreva s metastázami v pečeni (CaCo+, n=7), pankreatitídou (P, n=14), vírusovou hepatitídou (VH, n=16) a zdravých kontrol (C, n=35). Hladiny protilátok sú vyjadrené v jednotkách AU. Hodnota cut-off (30 AU) je znázornená tenkou vodorovnou čiarou. Plné krátke vodorovné čiary označujú priemerné hladiny protilátok.



Výsledky testovania hladín protilátok proti kalretikulínu a tkanivovej transglutamináze u onkologických pacientov, pacientov rizkových skupín a zdravých kontrol sú zhrnuté v tab. 2. Výsledky sú vyjadrené ako priemerné hodnoty hladín protilátok a smerodajné odchýlky.

Tab. 2

Priemerné hladiny \pm smerodajné odchýlky priemerov hladín sérových protilátok proti kalretikulínu (IgA, IgG) a tkanivovej transglutamináze (IgA) onkologických pacientov, pacientov rizikových skupín a zdravých darcov. Hodnoty sú uvedené v jednotkách AU.

| Diagnóza / počet pacientov | Protilátky proti | | |
|---|-------------------|-------------------|-------------------|
| | CRT / IgA | CRT / IgG | tTG / IgA |
| primárny Ca pečene / 13 | 98,9 \pm 69,83 | 124,4 \pm 75,99 | 40,72 \pm 36,19 |
| primárny Ca pankreasu / 38 | 76,31 \pm 60,86 | 104,7 \pm 82,6 | 27,05 \pm 19,48 |
| Ca pankreasu s meta v pečeni / 8 | 63,14 \pm 14,94 | 73,33 \pm 43,7 | 32,44 \pm 18,9 |
| primárny Ca hrubého čreva / 7 | 45,91 \pm 31,48 | 80,44 \pm 39,39 | 20,54 \pm 17,10 |
| Ca hrubého čreva s meta v pečeni / 7 | 69,2 \pm 41,89 | 85,29 \pm 62,93 | 29,89 \pm 12,44 |
| pankreatitída / 14 | 59,79 \pm 29,98 | 82,24 \pm 51,01 | 26,49 \pm 11,16 |
| vírusová hepatitída B a C / 16 (13 a 3) | 32,7 \pm 31,44 | netestované | 12,43 \pm 7,508 |
| zdravé kontroly / 35 | 40 \pm 14,94 | 55,69 \pm 17,23 | 16,96 \pm 6,575 |

Ca – karcinóm

V tejto štúdii sme sa taktiež zaoberali vzťahom medzi testovanými protilátkami a onkologickými markermi či indikátormi poškodenia pečene (AST/ALT) (aspartát aminotransferázy/alanin aminotransferázy). Vybrané laboratórne dáta pacientov získané z klinických pracovísk a výsledky nášho testovania sú uvedené v tab. 3. Vzhľadom k nízkemu počtu pacientov, u ktorých boli tieto dáta dostupné, je tabuľka uvádzaná iba orientačne. Vzťahy medzi protilátkami a týmito laboratórnymi dátami sú komentované v diskusii.

Tab. 3 Prehľad našich výsledkov porovnaných s obdržanými laboratórnymi dátami pacientov (AST/ALT, CA 19-9, AFP, CEA) s karcinómom pečene (CaC), karcinómom pankreasu (CaP), karcinómom pankreasu s metastázami v pečeni (CaP+), karcinómom hrubého čreva (CaCo), karcinómom hrubého čreva s metastázami v pečeni (CaCo+) a pankreatitídami (P). Hodnoty zvýšené nad prahovú hodnotu cut-off sú v šedých poliach tabuľky.

| Pacient č.. | Dg | CRT – IgA (AU) | CRT – IgG (AU) | tTG – IgA (AU) | AST/ALT (U/ml) | CA 19-9 (U/ml) | AFP (ng/ml) | CEA (ng/ml) |
|-------------|-------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|-------------|-------------|
| 1 | CaC | 44,5 | 138,8 | 30,5 | 1,7/0,96 | 37,7 | 7,3 | - |
| 2 | CaC | 96,9 | 201,1 | 13 | 1,54/1,4 | 248 | - | 2,6 |
| 3 | CaC | 112,1 | 71,1 | 88,4 | 1,8/2,5 | - | 54555 | - |
| 4 | CaP | 78,1 | 23,8 | 4,1 | 0,2/0,1 | 47 | - | 2,8 |
| 5 | CaP | 47,9 | 31,1 | 31 | 4/8 | 0,6 | 6,2 | 4,6 |
| 6 | CaP | 72 | 64,3 | 85 | 1,5/3,75 | 2140 | - | 2,7 |
| 7 | CaP | 30,4 | 26,4 | 10,5 | 0,93/0,89 | 1370 | - | - |
| 8 | CaP | 82,8 | 62,7 | 34,6 | 0,95/1,31 | >10000 | - | - |
| 9 | CaP | 62,8 | 185,3 | 14,4 | 5,1/4,17 | 460 | - | - |
| 10 | CaP | 78,8 | 45,2 | 13,8 | 0,3/0,64 | 8220 | - | - |
| 11 | CaP | 77,3 | 73,5 | 26,2 | 0,83/1,7 | 68,9 | - | - |
| 12 | CaP | 196,3 | 226,6 | 59,8 | 0,9/0,7 | 253,3 | 5,3 | 3,8 |
| 13 | CaP | 62,8 | 75,6 | 13,7 | 1,5/2,3 | -ve | -ve | -ve |
| 14 | CaP | 27,4 | 67,4 | 11,9 | 7/16 | 51,3 | 2,1 | 1,4 |
| 15 | CaP+ | 68,1 | 167 | 22,8 | 0,54/0,74 | 1850 | - | - |
| 16 | CaP+ | 71,7 | 75,5 | 22,2 | 0,34/0,22 | 171 | - | - |
| 17 | CaP+ | 90,7 | 93,2 | 24,2 | 0,32/0,32 | 1240 | - | - |
| 18 | CaP+ | 50,9 | 72,8 | 52,1 | 0,4/0,34 | >10000 | - | 150 |
| 19 | CaCo | 86,6 | 79,3 | 23,1 | 1,06/0,88 | 509 | - | 3,7 |
| 20 | CaCo+ | 140,6 | 166,7 | 37,9 | 0,62/0,3 | 47,5 | - | 11 |
| 21 | CaCo+ | 70,5 | 42,4 | 24,3 | 0,48/0,3 | - | - | 331 |
| 22 | CaCo+ | 95,4 | 180,9 | 49,5 | 0,15/0,34 | - | - | 6,3 |
| 23 | CaCo+ | 48,3 | 46 | 27,3 | 0,39/0,36 | 20,1 | 1,4 | 31 |
| 24 | CaCo+ | 81,7 | 22,3 | 33,9 | 1,72/0,79 | 191 | 87,8 | - |
| 25 | P | 56,4 | 196,4 | 22,6 | 0,27/0,17 | 44,9 | - | - |
| 26 | P | 81,6 | 58,8 | 26,6 | 0,43/0,72 | 10,7 | - | - |
| Cut-off | | 70 | 90 | 30 | 0,7/0,7 | 39 | 28 | 5,2 |

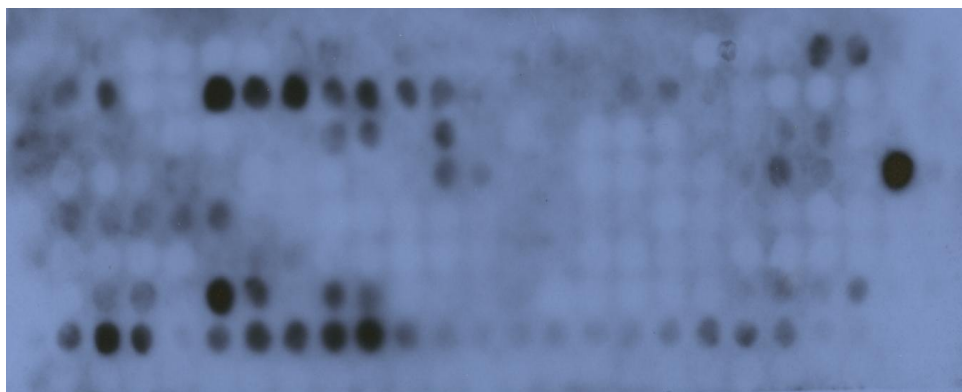
5.3. ANALÝZA ANTIGÉNNYCH EPITOPOV KALRETIKULINU

Antigénne epitopy kalretikulinu rozpoznávané sérovými protilátkami triedy IgA a IgG pacientov s karcinómom pečene a pankreasu sme charakterizovali metódou PEPSCAN. Pre toto štúdium sme vybrali séra pacientov, u ktorých sme metódou ELISA preukázali zvýšené hladiny antikalkretikulínových protilátok izotypu IgA a IgG. Príklad reaktivity sérových protilátok pacienta s deka-peptidmi kalretikulinu na membráne PEPSCANU znázorňuje obr. 9.

Antigénne epitopy kalretikulinu rozpoznávané IgA protilátkami boli charakterizované u 5 pacientov s karcinómom pečene a 6 pacientov s karcinómom pankreasu. Epitopy rozpoznávané protilátkami triedy IgG sme charakterizovali u 4 pacientov s karcinómom pečene a 5 pacientov s karcinómom pankreasu. Kontrolná skupina pozostávala zo sér 12 zdravých krvných darcov.

Obr. 9 Príklad reaktivity serových IgA protilátok pacienta s karcinómom pankreasu s jednotlivými deka-peptidmi kalretikulinu metódou PEPSCAN

N-koniec →



→ C-koniec

5.3.1. Reaktivita sérových protilátok triedy IgA s dekapeptidmi kalretikulinu

Obr. 10 dokumentuje analýzu imunodominantných epitopov kalretikulinu, do ktorej sme zahrnuli iba peptidy rozpoznávané IgA protilátkami viac ako 60 % pacientov (RI = 0,6). Takto často rozpoznávané aminokyselinové sekvencie sme preukázali vo všetkých 3 doménach molekuly kalretikulinu, najviac ich však bolo prítomných v jej C doméne.

Protilátky triedy IgA všetkých pacientov (5/5) s karcinómom pečene reagovali s aminokyselinovými úsekmi VQFTVKHEQNID (aminokyseliny [AMK] 83-94) v N-doméne, EVKIDNSQVESG (173-184), EWKPRQIDNP (164-173) v P-doméne a IFDNFLITND (317-326), EKQMKDKQDEEQRLKEEEEED (345-364) a EEEDKKRKEEEEAEDKED (361-378) v C-doméne kalretikulinu.

Peptidy EVKIDNSQVESG (173-184) a RKEEEEAEDKED (367-378) boli zároveň rozpoznávané IgA protilátkami každého z pacientov (6/6) s karcinómom pankreasu. Okrem týchto peptidov, IgA protilátky všetkých pacientov s karcinómom pankreasu reagovali aj s aminokyselinovými sekvenciami LSASFAEAPF (65-74) v N doméne a sekvenciou EEAEDKEDDAEDKDEDEE (371-388) v C-doméne kalretikulinu.

IgA protilátky kontrolnej skupiny zdravých krvných darcov reagovali len s malým počtom peptidov s indexom reaktivity maximálne 0,33. Rozpoznávanými peptidmi boli peptidy DEEKDKGLQTSQ (47-58), KGKNVLINKD (141-150) a EDKRRKEEEE (363-372).

5.3.2. Reaktivity sérových protilátok triedy IgG s dekapeptidmi kalretikulinu

Na obr. 11 je znázornená analýza imunodominantných epitopov kalretikulinu, ktoré boli rozpoznávané IgG protilátkami viac ako 60% pacientov (RI=0,6). U pacientov s karcinómom pečene sme preukázali imunodominantné epitopy kalretikulinu vo všetkých 3 doménach, u pacientov s karcinómom pankreasu prevažne v C-doméne kalretikulinu.

Protilátky izotypu IgG pacientov s karcinómom pečene (4/4) rozpoznávali sekvenciu FAEAPFSNKGQT (169-180) lokalizovanú v N-doméne, ERAKIDDPTD (211-220) v P-doméne a EEDKKRKEEEEAEDKED (363-378) v C-doméne. S peptidmi FAEAPFSNKGQT (169-180) a ERAKIDDPTD (211-220) reagovali i IgG protilátky pacientov s karcinómom pankreasu, najviac však rozpoznávali sekvencie kalretikulínu EEKKRKEEEEAEDKED (382-385) a EDKDEDEEDEEDKEED (391-394).

IgG protilátky kontrolnej skupiny zdravých darcov, podobne ako IgA protilátky, reagovali iba s niekoľkými peptidmi s indexom reaktivity maximálne 0,33. Oba izotypy protilátok rozpoznávali aminokyselinovú sekvenciu EDKKRKEEEAE (363-374). Okrem tejto sekvencie, sérové IgG protilátky niektorých zdravých darcov rozpoznávali aj aminokyselinovú sekvenciu GTIFDNFLITNDEA (315-328).

Obr. 10 – na nasledujúcej strane (č. 60). Vyhodnotenie špecificity sérových IgA protilátok pacientov s karcinómom pečene (H, znázornené čiernou farbou) a pankreasu (P, znázornené červenou farbou). Aminokyselinová sekvencia kalretikulínu (N-, P- a C-doména) je označená šedou farbou. Za jednotlivými dekapeptidmi rozpoznávanými protilátkami viac ako 60% pacientov (RI=0,6) je vyjadrené percento pacientov, ktorých IgA protilátky reagovali s konkrétnym peptidom. Podčiarknuté sú aminokyselinové sekvencie kalretikulínu, ktoré boli rozpoznávané kontrolnými sérami zdravých darcov.

Obr. 10 - popis na strane č. 59

N-doména

| | | | |
|------------|--|--|---|
| 1 | EPAVYFKEQFLDGDGWTSRWIE-S-KHKS--DF-GKFLVSSGKFGDEEKDKGLQTSQDARFYA | | |
| H | TSRWIE-S-K (80%) IE-S-KHKS--(60%) -S-KHKS--D (80%) -KHKS--DF- (80%) HKS--DF-GK (60%) S--DF-GFKV (60%) | DEEKDKGLQT (80%) EKDKGLQTSQ (80%) DKGLQTSQDA (80%) | |
| P | | EKDKGLQTSQ (67%) DKGLQTSQDA (83%) GLQTSQDARF (83%) | |
| 65 | LSASF-E-PFSNKGQTLV VQFTVKHEQNIDCGGGYVKLFPNSLDQTDMDHGDSEYNIMFGPDIGG | | |
| H | LSASF-E-PFSNKG(60%) ASF-E-PFSN (80%) F-E-PFSNKG (80%) E-PFSNKGQT (80%) | VQFTVKHEQN (100%) FTVKHEQNID (100%) | KLFPNSLDQT (60%) FPNSLDQTDMD (60%) |
| P | LSASF-E-PF (100%) ASF-E-PFSN (83%) F-E-PFSNKG (83%) E-PFSNKG (67%) | VQFTVKHEQN (67%) FTVKHEQNID (67%) | KLFPNSLDQT (83%) FPNSLDQTDMD (83%) |
| 129 | PGTKKVHVIFNYKGNVLINKDIRCKDDEFTHLYTLVIRPDNTYEVKIDNSQ | | |
| H | PGTKKVHVIF (60%) | INKDIRCKDD (60%) | EVKIDNSQ KIDNSQ DNSQ SQ |
| P | | | EVKIDNSQ KIDNSQ DNSQ |
| | P-doména | | |
| 181 | VESGSLEDDWDFLPPKKIKDPDASKPEDWDERAKIDDPTDSKPEDWDK-PEHIPDPD | | |
| H | VE (100%) VESG (100%) VESGSL (80%) VESGSLED (80%) | KIKDPDASKP (80%) KDPDASKPED (80%) | ERAKIDDPTD(80%) AKIDDPTDSK DWDK-PEHIP(60%) DK-PEHIPDP(60%) |
| P | VE (100%) VESG (100%) VESGSL (67%) | | WDERAKIDDP(67%) ERAKIDDPTD (83%) |
| 237 | AKKPEDWDEEMDGEWEPPIQNPYKGEWKPRQIDNPDYKGTWIHPEIDNPEY | | |
| H | | KGEWKPRQID (80%) EWKPRQIDNP (100%) | |
| P | | | |

Obr. 11 Vyhodnotenie špecificity sérových IgG protilátok pacientov s karcinómom pečene (H, znázornené čiernou farbou) a pankreasu (P, znázornené červenou farbou). Aminokyselinová sekvencia kalretikulinu (N-, P- a C-doména) je označená šedou farbou. Za jednotlivými deka-peptidmi rozpoznávanými protilátkami viac ako 60% pacientov (RI=0,6) je vyjadrené percento pacientov, ktorých IgG protilátky reagovali s konkrétnym peptidom. Podčiarknuté sú aminokyselinové sekvencie kalretikulinu, ktoré boli rozpoznávané kontrolnými sérami zdravých darcov.

N-doména

| | |
|-----|--|
| 1 | EPAVYFKEQFLDGDGWTSRWIE-S-KHKS--DF-GKFLVSSGKFGYDEEKDKGLQTSQDARFYA |
| H | IE-S-KHKS--(75%) |
| P | |
| 65 | LSASF-E-PFSNKGQTLV VQFTVKHEQNIDCGGGYVKLFPNSLDQTDMHGDSEYNIMFGPDIIGGPG |
| H | ASF-E-PFSN (75%) F-E-PFSNKG (75%) E-PFSNKGQT (75%) |
| P | |
| 129 | PGTKKVHVIFNYKGKKNVLINKDIRCKDDEFTHLYTLIVRPDNTYEVKIDNSQ |
| H | EVKIDNSQ KIDNSQ DNSQ SQ |
| P | |

P-doména

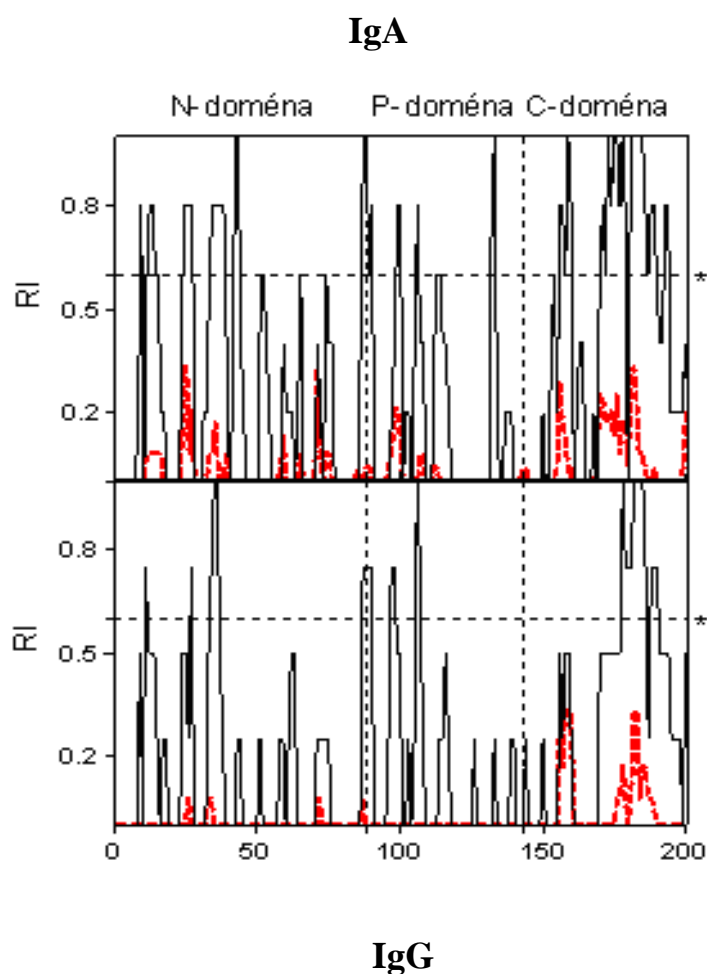
| | |
|-----|--|
| 181 | VESGSLEDDWDFLPPKKIKDPDASKPEDWDERAKIDDPTDSKPEDWDK-PEHIPDPDAKKPEDW |
| H | VE (75%) LPPKKIKDPD (75%) ERAKIDDPTD(100%)DWDK-PEHIP (60%) VESG (75%) PKKIKDPDAS (75%) AKIDDPTDSK(75%) DK-PEHIPDP (60%) VESGSL (75%) VESGSLED (75%) |
| P | DK-PEHIPDP (63%) |
| 237 | AKKPEDWDEEMDGEWEPPIQNPEYKGEWKPRQIDNPDYKGTWIHPEIDNPEY |
| H | |
| P | |

C-doména

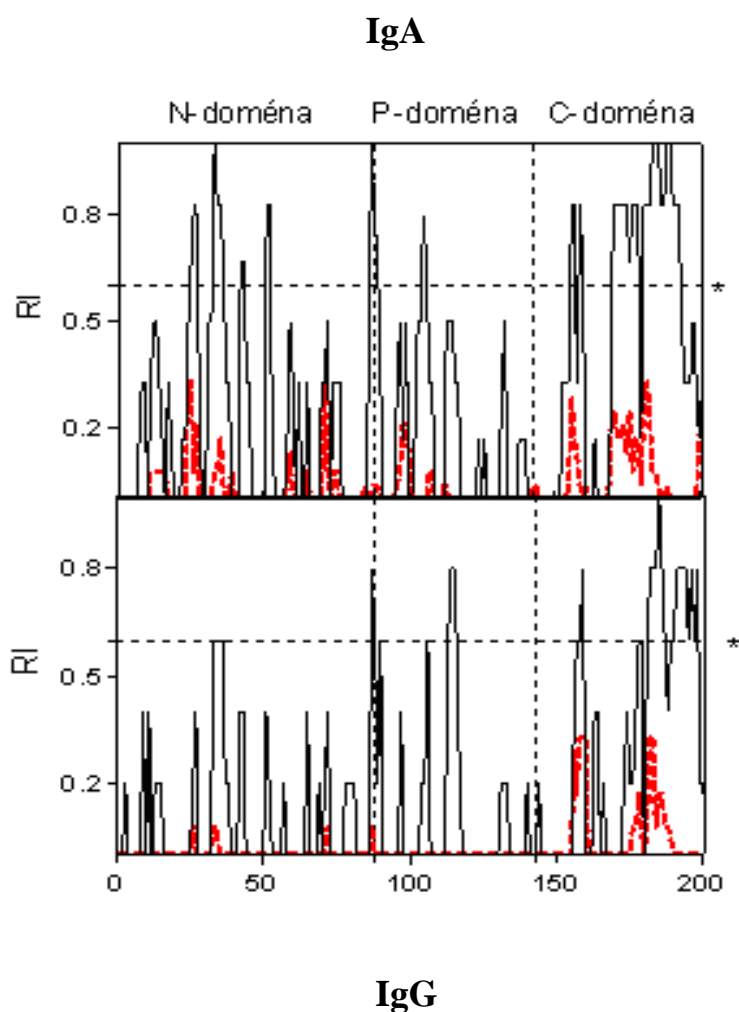
| | |
|-----|---|
| 291 | SPDPSIYAYDNFGVLGLDLWQVKSGTIFDNFLITNDEAYAEFFGNETWGVTKAAEKQMKDKQDE |
| H | |
| P | IFDNFLITND (88%) |
| 355 | EQRLKEEEEEDKKRKEEEEAEDKEDD-EDKDEDEEEDKEEDEEEDVP-GQAKDEL |
| H | RLKEEEEEDKK (75%) KEEEEEEDKKR (75%) EEEDKKRKEE (75%) EDKKRKEEEE (100%) KKRKEEEAE (100%) RKEEEEAEDK (100%) EEEEAEDKED (100%) EEAEDKEDD- (75%) DKEDD-EDKD (75%) D-EDKDEDEE (75%) |
| P | EQRLKEEEEED (63%) RLKEEEEEDKK (63%) EEEDKKRKEE (75%) EDKKRKEEEE (75%) KKRKEEEAE (88%) RKEEEEAEDK (88%) EEEEAEDKED (88%) EEAEDKEDD- (75%) AEDKEDD-ED (63%) EDD-EDKDED (63%) EDKDEDEEED (63%) KDEDEEED (63%) EDEEEDKE (63%) EEDEEDKEED (63%) EDKEEDEEED (63%) |

Profil reaktivity sérových protilátok pacientov s jednotlivými dekapeptidmi kalretikulínu znázorňujú grafy 3 a 4. Protilátkami pacientov bolo rozpoznávané veľké množstvo dekapeptidov kalretikulínu. Protilátky triedy IgA pacientov oboch skupín rozpoznávali v porovnaní s IgG protilátkami viac antigénnych epitopov molekuly kalretikulínu. Zároveň i frekvencia rozpoznávania jednotlivých dekapeptidov IgA protilátkami bola väčšia ako v prípade IgG protilátok. Najviac antigénnych epitopov kalretikulínu bolo rozpoznávaných IgA protilátkami pacientov s karcinómom pečene, najmenej IgG protilátkami pacientov s karcinómom pankreasu.

Graf 3 Reaktivita sérových IgA a IgG protilátok pacientov (n=5, IgA; n=4, IgG) s karcinómom pečene s jednotlivými kalretikulinovými dekaeptidmi. X-ová os grafu predstavuje 201 dekaeptidov kalretikulinu, hodnota RI (index reaktivity) udáva pomer počtu pacientov, ktorých protilátky reagovali s určitým peptidom ku všetkým pacientom v testovanej skupine. Reaktivita sérových protilátok pacientov je znázornená čiernou súvislou čiarou, reaktivita kontrolných sér červenou prerušovanou čiarou. Hviezdičkou (*) je označená hodnota RI, od ktorej vnímame peptid ako často rozpoznávaný.



Graf 4 Reaktivita sérových IgA a IgG protilátok pacientov (n=6, IgA; n=5, IgG) s karcinómom pankreasu s jednotlivými kalretikulinovými dekaeptidmi. X-ová os grafu predstavuje 201 dekaeptidov kalretikulínu, hodnota RI (index reaktivity) udáva pomer počtu pacientov, ktorých protilátky reagovali s určitým peptidom ku všetkým pacientom v testovanej skupine. Reaktivita sérových protilátok pacientov je znázornená čiernou súvislou čiarou, reaktivita kontrolných sér červenou prerušovanou čiarou. Hviezdičkou (*) je označená hodnota RI, od ktorej vnímame peptid ako často rozpoznávaný.

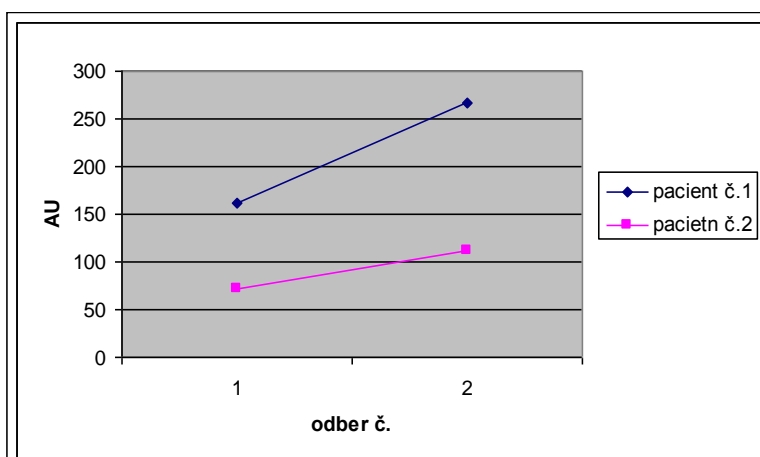


5.4. ZMENY HLADÍN ANTIKALRETIKULINOVÝCH PROTILÁTKO A ICH ŠPECIFICITY V PRIEBEHU OCHORENIA U PACIENTOV S ONKOLOGICKÝMI OCHORENAMI

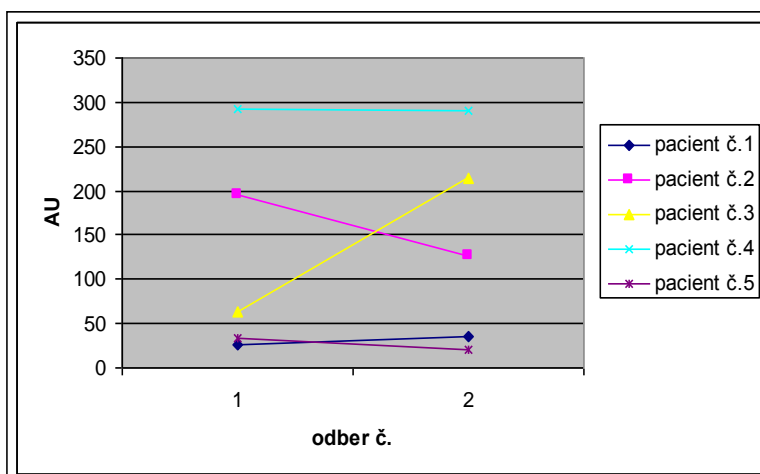
Vývoj hladín antikalretikulínových protilátok v priebehu ochorenia sme sledovali u 2 pacientov s karcinómom pečene a u 5 pacientov s karcinómom pankreasu. U týchto pacientov sme mali k dispozícii 2 odbery krvi s časovým odstupom v priemere troch mesiacov. Ako je zrejmé z grafov 5 a 6, hladiny IgA i IgG antikalretikulínových protilátok u niektorých pacientov v priebehu ochorenia kolísali (rástli či klesali), u iných pacientov sa nemenili.

Graf 5 – Zmeny hladín IgA anti-CRT protilátok v priebehu ochorenia u pacientov s A) karcinómom pečene B) karcinómom pankreasu

A

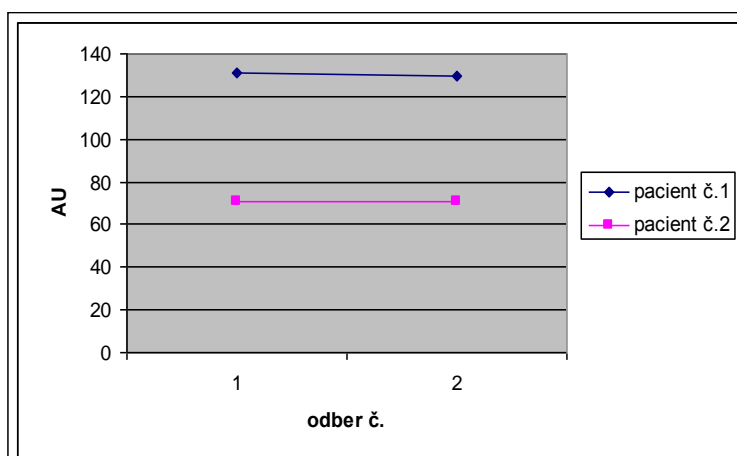


B

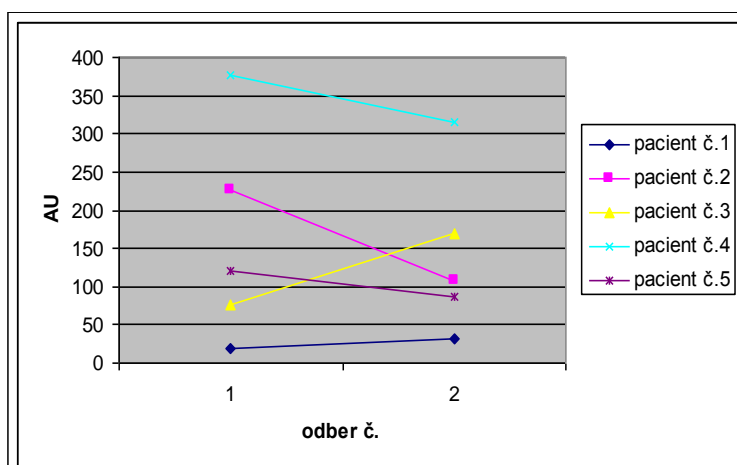


Graf 6 Zmeny hladín IgG anti-CRT protilátok v priebehu ochorenia u pacientov s A) karcinómom pečene B) karcinómom pankreasu

A



B



U jedného pacienta s karcinómom pečene sme sledovali zmeny spektra antigénnych epitopov na molekule kalretikulinu v priebehu ochorenia. Za obdobie 4 mesiacov došlo u tohto pacienta k zvýšeniu sérových hladín antikalretikulínových protilátok triedy IgA zo 161 AU na 266 AU (pacient č. 1, graf 5A). Oproti tomu, hladina protilátok triedy IgG zostala nezmenená (131 AU, 130 AU; pacient č. 1, graf 6A). Zaujímalo nás, či sa nezmenilo i množstvo rozpoznávaných dekaeptidov na molekule kalretikulinu. Výsledok testovania znázorňuje tabuľka (tab. 4), z ktorej je zrejmé, že spektrum epitopov kalretikulinu rozpoznávaných sérovými protilátkami sa v priebehu ochorenia rozšírilo.

Tab. 4 Príklad rozširovania spektra antigénnych epitopov kalretikulinu u jedného z pacientov v priebehu ochorenia. Farebne je znázornená reaktivita IgA antikaretikulínových protilátok s jednotlivými dekapeptidmi kalretikulinu u pacienta s hepatocelulárnym karcinómom s dvoma odbermi s časovým odstupom asi 4 mesiacov
a) odber z 20.9.2002 b) odber zo 7.1.2003

a)

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 |
| 21 | 22 | 23 | 24 | 25 | 26 | 27 | 28 | 29 | 30 | 31 | 32 | 33 | 34 | 35 | 36 | 37 | 38 | 39 | 40 |
| 41 | 42 | 43 | 44 | 45 | 46 | 47 | 48 | 49 | 50 | 51 | 52 | 53 | 54 | 55 | 56 | 57 | 58 | 59 | 60 |
| 61 | 62 | 63 | 64 | 65 | 66 | 67 | 68 | 69 | 70 | 71 | 72 | 73 | 74 | 75 | 76 | 77 | 78 | 79 | 80 |
| 81 | 82 | 83 | 84 | 85 | 86 | 87 | 88 | 89 | 90 | 91 | 92 | 93 | 94 | 95 | 96 | 97 | 98 | 99 | 100 |
| 101 | 102 | 103 | 104 | 105 | 106 | 107 | 108 | 109 | 110 | 111 | 112 | 113 | 114 | 115 | 116 | 117 | 118 | 119 | 120 |
| 121 | 122 | 123 | 124 | 125 | 126 | 127 | 128 | 129 | 130 | 131 | 132 | 133 | 134 | 135 | 136 | 137 | 138 | 139 | 140 |
| 141 | 142 | 143 | 144 | 145 | 146 | 147 | 148 | 149 | 150 | 151 | 152 | 153 | 154 | 155 | 156 | 157 | 158 | 159 | 160 |
| 161 | 162 | 163 | 164 | 165 | 166 | 167 | 168 | 169 | 170 | 171 | 172 | 173 | 174 | 175 | 176 | 177 | 178 | 179 | 180 |
| 181 | 182 | 183 | 184 | 185 | 186 | 187 | 188 | 189 | 190 | 191 | 192 | 193 | 194 | 195 | 196 | 197 | 198 | 199 | 200 |
| 201 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

b)

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 |
| 21 | 22 | 23 | 24 | 25 | 26 | 27 | 28 | 29 | 30 | 31 | 32 | 33 | 34 | 35 | 36 | 37 | 38 | 39 | 40 |
| 41 | 42 | 43 | 44 | 45 | 46 | 47 | 48 | 49 | 50 | 51 | 52 | 53 | 54 | 55 | 56 | 57 | 58 | 59 | 60 |
| 61 | 62 | 63 | 64 | 65 | 66 | 67 | 68 | 69 | 70 | 71 | 72 | 73 | 74 | 75 | 76 | 77 | 78 | 79 | 80 |
| 81 | 82 | 83 | 84 | 85 | 86 | 87 | 88 | 89 | 90 | 91 | 92 | 93 | 94 | 95 | 96 | 97 | 98 | 99 | 100 |
| 101 | 102 | 103 | 104 | 105 | 106 | 107 | 108 | 109 | 110 | 111 | 112 | 113 | 114 | 115 | 116 | 117 | 118 | 119 | 120 |
| 121 | 122 | 123 | 124 | 125 | 126 | 127 | 128 | 129 | 130 | 131 | 132 | 133 | 134 | 135 | 136 | 137 | 138 | 139 | 140 |
| 141 | 142 | 143 | 144 | 145 | 146 | 147 | 148 | 149 | 150 | 151 | 152 | 153 | 154 | 155 | 156 | 157 | 158 | 159 | 160 |
| 161 | 162 | 163 | 164 | 165 | 166 | 167 | 168 | 169 | 170 | 171 | 172 | 173 | 174 | 175 | 176 | 177 | 178 | 179 | 180 |
| 181 | 182 | 183 | 184 | 185 | 186 | 187 | 188 | 189 | 190 | 191 | 192 | 193 | 194 | 195 | 196 | 197 | 198 | 199 | 200 |
| 201 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

6. DISKUSIA

Kalretikulin je častý autoantigén u autoimunitných ochorení. Výskyt antikalretikulinových protilátok izotypu IgG a IgM bol popísaný u viacerých reumatoidných a parazitárnych ochorení (LUX *et al.* 1992, ROUTSIAS *et al.* 1993, HUGGINS *et al.* 1995, KISHORE *et al.* 1997b).

V našom laboratóriu bol vyvinutý ELISA test na kvantitatívne stanovenie sérových hladín antikalretikulinových protilátok. Týmto testom sme preukázali zvýšené hladiny IgA izotypu antikalretikulinových protilátok v sérach 92% pacientov s celiakiou (SÁNCHEZ *et al.* 2000). IgA antikalretikulinové protilátky boli detegované i v sérach pacientov s autoimunitnou hepatitídou, primárnou biliárnou cirhózou (autoimunitnými chorobami asociovanými s celiakiou) a alkoholickou cirhózou, avšak v nižšom percente prípadov (KREISEL *et al.* 1999, SÁNCHEZ *et al.* 2003).

Nedávno, LE NAOUR *et al.* (2002) a HONG *et al.* (2004) detegovali prítomnosť IgG antikalretikulinových protilátok v sérach pacientov s hepatocelulárnym karcinómom a karcinómom pankreasu. U onkologických pacientov bol výskyt sérových IgG antikalretikulinových protilátok stanovený iba kvalitatívne, použitím kombinácie 2DE a Western blotu so vzorkami nádorového tkaniva i nádorových bunkových línií (LE NAOUR *et al.* 2002, HONG *et al.* 2004).

U mnohých onkologických ochorení, predovšetkým u karcinómu pankreasu ale aj u hepatocelulárneho karcinómu, do dnešnej doby chýba vhodný marker ranných štádií ochorení (LAI 2003). Autori viacerých štúdií poukázali na potenciálnu možnosť použitia detekcie hladín sérových protilátok ako včasného diagnostického markera (TAN 2001, LE NAOUR *et al.* 2002, HONG *et al.* 2004, MADRID 2005). Problematika nádorových markerov je veľmi zložitá. Okrem toho, že väčšina markerov nie je schopná odhaliť ranné štádiá ochorení, sú súčasne aj nešpecifické; nedokážu odlíšiť zápalové ochorenie orgánu (často predchádzajúce malignému ochoreniu) od už prepuknutej malignity.

Pre zlepšenie diagnostiky ranných štádií týchto ochorení je preto potrebné preveriť každý potenciálny marker. Z tohto dôvodu sme zahájili štúdium zamerané na kvantifikáciu hladín protilátok proti kalretikulinu v sérach pacientov s nádormi gastrointestinálneho traktu: s primárnym karcinómom pečene, karcinómom pankreasu, karcinómom hrubého čreva a pacientov rizikových skupín pre vznik týchto malignít

(vírusových hepatítid a pankreatítid). Testovanie hladín antikalretikulínových protilátok u zmiených pacientov nebolo dodnes popísané. Vzhľadom k tomu, že s chorobami tráviaceho traktu sú všeobecne asociované protilátky izotypu IgA, rozhodli sme sa v sérach pacientov s nádormi gastrointestinálneho traktu a rizikových skupín pre vznik týchto malignít stanoviť okrem IgG izotypu antikalretikulínových protilátok aj hladiny antikalretikulínových protilátok izotypu IgA.

Najvyššie percento sér pozitívnych na IgA antikalretikulínové protilátky bolo v našej štúdií preukázané v skupine pacientov s hepatocelulárnym karcinómom (8/13, 61,5%); približne rovnaké percento sér pozitívnych na IgA antikalretikulínové protilátky popísal SÁNCHEZ *et al.* (2003) u pacientov s autoimunitnou hepatítidou. Najvyšší podiel sér pozitívnych na antikalretikulínové protilátky triedy IgG zo všetkých testovaných skupín pacientov bol v skupine pacientov s hepatocelulárnym karcinómom. Nie všetci pacienti pozitívni na jeden izotyp antikalretikulínových protilátok boli súčasne pozitívni i na druhý izotyp protilátok.

Doposiaľ neexistuje možnosť objektívneho porovnania našich výsledkov testovania sérových hladín antikalretikulínových protilátok u onkologických pacientov s inými publikovanými prácami. Orientačne je možné porovnať výskyt antikalretikulínových protilátok izotypu IgG u onkologických pacientov s prácami LE NAOUR *et al.* (2002) a HONG *et al.* (2004). V týchto štúdiách autori preukázali prítomnosť antikalretikulínových protilátok iba kvalitatívne, navyše i odlišným metodickým postupom. LE NAOUR *et al.* (2002) preukázali prítomnosť IgG antikalretikulínových protilátok v sérach 27% pacientov s hepatocelulárnym karcinómom. V našej štúdií bolo percento sér pacientov s hepatocelulárnym karcinómom pozitívnych na IgG antikalretikulínové protilátky vyššie (61,5%). HONG *et al.* (2004) detekovali prítomnosť IgG antikalretikulínových protilátok v sérach pacientov s karcinómom pankreasu. Výskyt týchto protilátok popísali u 58,3% pacientov s karcinómom pankreasu. V našej štúdií sme preukázali nižšie percento sér pacientov s karcinómom pankreasu pozitívnych na IgG antikalretikulínové protilátky (39,5%).

Testovanie hladín IgA a IgG antikalretikulínových protilátok u pacientov rizikových skupín pre vznik malignít preukázalo iba ojedinelý výskyt pozitívnych sér. Zvýšené hladiny IgA alebo IgG protilátok proti kalretikulínu boli však preukázané u 4 zo 14 pacientov s pankreatítidami. U týchto pacientov s pankreatítidami, ktorých séra mali zvýšené hladiny antikalretikulínových protilátok, by bolo vhodné naďalej sledovať

klinický stav a vývoj hladín sérových protilátok. Nádory pankreasu sa totiž často vyskytujú v teréne chronickej pankreatitídy (BEGER a RAU 2007).

Testovanie hladín nádorových markerov je štandardne používané v klinickej praxi. Preto sme sa v tejto štúdii zaoberali i vzťahom hladín antikalretikulínových protilátok s vybranými onkogénnymi markermi často používanými v diagnostike malignít gastrointestinálneho traktu (CA 19-9, CEA, AFP). Okrem toho sme porovnávali pozitivitu sér pacientov na antikalretikulínové protilátky s pozitivitou sér na indikátor poškodenia pečene AST/ALT (aspartát aminotransferázy/alanin aminotransferázy). Výsledky testovania hladín protilátok v našej štúdii a zmienené biochemické markery u jednotlivých pacientov sú zhrnuté v tab. 3 (kapitola 5.2.2.). Z tohto porovnania vyplýva, že poškodenie pečene, ktoré býva asociované s hypergamaglobulinémiou (BRODANOVÁ a KORDAČ 1993), nemá vplyv na sérové hladiny antikalretikulínových protilátok. Pozitivita sér pacientov s karcinómom pankreasu na nádorový marker CA 19-9 korešpondovala s pozitivitou sér pacientov na antikalretikulínové protilátky izotypu IgA, zatiaľčo s pozitivitou sér pacientov na IgG antikalretikulínové protilátky nekorešpondovala. Séra väčšiny pacientov (6 z 9) pozitívnych na CA 19-9 boli pozitívne aj na IgA antikalretikulínové protilátky. Pacienti č. 5 a 13 mali negatívny nález pre CA 19-9 a zároveň nemali zvýšené antikalretikulínové protilátky ani jedného izotypu. U jedného pacienta s hepatocelulárnym karcinómom (pacient č.1) bola preukázaná diskrepancia medzi pozitivitou séra na onkogénne markery a pozitivitou séra na IgG antikalretikulínové protilátky. Tento pacient mal zvýšené hladiny IgG antikalretikulínových protilátok, ale nemal zvýšené hladiny onkogénnych markerov CA 19-9 a AFP. Rozsiahlejšie hodnotenie výsledkov u jednotlivých skupín pacientov je však obmedzené nízkym počtom pacientov s klinickými dátami.

V rámci testovania výšok hladín antikalretikulínových protilátok sme u niektorých onkologických pacientov v priebehu ochorenia monitorovali i dynamiku IgA a IgG antikalretikulínových protilátok. Počas testovaného obdobia sa hladiny antikalretikulínových protilátok v sérach pacientov vyvíjali individuálne. Kolísanie hladín protilátok môže súvisieť so zmenou celkového zdravotného stavu pacienta alebo zmenami v imunitnom systéme v priebehu onkologického ochorenia. Pacientom, u ktorých bol preukázaný pokles hladín antikalretikulínových protilátok, neboli podávané lieky s imunosupresívnym účinkom. Títo pacienti však boli podľa vyjadrení ošetrovujúcich lekárov v terminálnom štádiu nádorového ochorenia, ktoré je často

sprevádzané kachexiou a imunodeficienciou potencionálne vedúcich k negativite sérologických testov (BRANDACHER *et al.* 2006, MORLEY *et al.* 2006).

Testovanie sérových IgA protilátok proti tkanivovej transglutamináze je považované za špecifický marker celiakie (DIETRICH *et al.* 1998). V sérach väčšiny pacientov s celiakiou boli preukázané taktiež IgA antikalretikulínové protilátky.

Aby sme prípadne odhalili latentnú celiakiu u testovaných pacientov s onkologickými ochoreniami, pristúpili sme popri testovaní hladín antikalretikulínových protilátok i k testovaniu týchto pacientov na IgA protilátky proti tkanivovej transglutamináze. Zvýšené hladiny IgA protilátok proti tkanivovej transglutamináze sme detekovali v sérach niektorých pacientov vo všetkých testovaných skupinách pacientov. Najvyššie percento sér pozitívnych na IgA protilátky proti tkanivovej transglutamináze sme preukázali v skupine pacientov s hepatocelulárnym karcinómom (46,2%). Príčinou relatívne vysokého percenta sér pacientov pozitívnych na tieto protilátky môže byť použitie komerčne dostupnej tkanivovej transglutaminázy izolovanej z pečene morčiat ako antigénu v ELISA testoch. Falošná pozitivita tohoto testu už bola popísaná u pacientov s chronickými ochoreniami pečene v štúdií CARROCCIO *et al.* (2001).

V našom laboratóriu boli v rámci štúdia SÁNCHEZ *et al.* (2003) testované hladiny IgA protilátok proti tkanivovej transglutamináze u pacientov s autoimunitnou hepatitídou, primárnou biliárnou cirhózou a alkoholickou cirhózou. Najprv bola ako antigén v ELISA teste použitá tkanivová transglutamináza izolovaná z pečene morčiat. Týmto testom boli preukázané vysoké hladiny protilátok u mnohých pacientov. Pretestovaním sér pacientov diagnostickou súpravou používajúcou ako antigén ľudskú rekombinantnú transglutaminázu sa počet pacientov pozitívnych na tieto protilátky znížil (SÁNCHEZ *et al.* 2003). Príčinou falošne pozitívnych výsledkov získaných ELISA testom s tkanivovou transglutaminázou izolovanej z pečene morčiat mohla byť reaktivita sérových protilátok s kontaminantmi preparátu tkanivovej transglutaminázy (CARROCCIO *et al.* 2001). Preto je nutné pretestovať séra onkologických pacientov so zvýšenou hladinou protilátok proti tkanivovej transglutamináze ELISA testom využívajúcom ako antigén ľudskú rekombinantnú transglutaminázu.

Oproti tomu je však zaujímavé, že protilátky proti tkanivovej transglutamináze boli vo zvýšenej miere preukázané u pacientov v terminálnej fáze onkologických ochorení (METZGER *et al.* 2006). Zároveň nediagnostikovaná a neliečená celiakia

môže viesť k rozvoju malignít tráviaceho traktu (TLASKALOVÁ *et al.* 2000, SILANO *et al.* 2007).

Pre experimenty v našom laboratóriu bolo nutné pripraviť okrem celej molekuly kalretikulinu aj jeho fragmenty korešpondujúce so štvrtinami a polovicami tohoto proteínu. Tieto molekuly boli v spolupráci s ďalšími pracoviskami (Odd. patológie Viedenskej univerzity, laboratóriom Dr. Šeba Mikrobiologického ústavu AVČR) pripravené rekombinantnou technológiou ako fúzne proteíny s reťazcom šiestich histidínov umožňujúcich ich efektívnu izoláciu. Vzhľadom k odlišnej solubilitate jednotlivých fragmentov kalretikulinu, nebolo možné izolovať ich za rovnakých podmienok. Celá molekula, druhá polovice a druhá, tretia a štvrtá štvrtina kalretikulinu boli solubilné, izolácia teda mohla prebiehať za natívnych podmienok. Prvú štvrtinu a prvú polovicu kalretikulinu, ktoré sú súčasťou N-domény kalretikulinu, nebolo možné izolovať za natívnych podmienok. Tieto fragmenty boli v nerozpustnej forme prítomné v bunkových inklúziách. Preto ich bolo nutné solubilizovať roztokom močoviny a izoláciu previesť za denaturačných podmienok. Odlišná solubilita a prítomnosť fragmentov v bunkových inklúziách pravdepodobne súvisí s fyzikálno-chemickými vlastnosťami N- koncovej časti kalretikulinu.

Popri testovaní hladín antikalkretikulínových protilátok triedy IgA a IgG sme sa zamerali aj na analýzu antigénnych epitopov kalretikulinu rozpoznávaných sérovými protilátkami pacientov s onkologickými ochoreniami.

Výsledky nášho pilotného štúdia naznačujú pravdepodobnú existenciu imunodominantných epitopov kalretikulinu rozpoznávaných IgA i IgG sérovými protilátkami onkologických pacientov. Špecifická protilátok u pacientov s karcinómom pečene i pankreasu bola podobná. IgA protilátky pacientov s karcinómom pečene i karcinómom pankreasu frekventovane rozpoznávali veľké množstvo rovnakých dekapeptidov na molekule kalretikulinu, no protilátky všetkých pacientov oboch skupín reagovali len s epitopmi EVKIDNSQVESG v P-doméne a EEEEAEDKED v C-doméne kalretikulinu. IgG protilátky pacientov s karcinómom pečene i pankreasu rozpoznávali spoločnú aminokyselinovú sekvenciu EEDKKRKEEEAEDKED v C-doméne, s nižšou frekvenciou i peptidy FAEAPFSNKGQT v N-doméne a ERAKIDDPTD a DKAPEHIPDP v P-doméne molekuly kalretikulinu. Sekvencia EDKKRKEEEAE bola rozpoznávaná aj IgA a IgG protilátkami niekoľkých sér kontrolnej skupiny darcov.

Dôkladnejšie štatistické analýzy epitopov kalretikulinu rozpoznávaných protilátkami pacientov s onkologickými ochoreniami sú v našej štúdií limitované

nízkym počtom sér. Je však možné, že testovaním väčšieho súboru patientských sér by sme mohli odhaliť epitopy špecificky rozpoznávané protilátkami len jednej skupiny pacientov t.j. epitopy špecifické pre konkrétny typ onkologického ochorenia. V štúdiu SÁNCHEZ *et al.* (2003) boli charakterizované antigénne epitopy kalretikulinu rozpoznávané sérovými IgA protilátkami pacientov s celiakiou a s ňou asociovanými hepatickými ochoreniami. Porovnaním tejto práce s výsledkami analýzy kalretikulínových epitopov u onkologických pacientov, sú viditeľné rozdiely v rozpoznávaných epitopoch kalretikulinu u jednotlivých ochorení, najmä v jeho N-doméne.

Je zaujímavé, že mnohé aminokyselinové sekvencie frekventovane rozpoznávané IgA protilátkami pacientov s celiakiou boli i u pacientov s onkologickými ochoreniami imunodominantné. Ide o sekvencie ASFAEAPFSNKG a GLQTSQDARF v N doméne, KIKDODASKP v P doméne a QVKSGTIFDNFL, IFDNFLITND a sekvencie bohaté na glutamovú kyselinu (pozície 355 – 372 AMK) zahrňujúce i dekaeptid EQRLKEEEED v C doméne kalretikulinu. Oproti tomu, peptidy reagujúce so sérami väčšiny pacientov s ochoreniami pečene asociovanými s celiakiou (autoimunitnou hepatitídou, primárnou biliárnou cirhózou) a pacientov s alkoholickou cirhózou neboli často rozpoznávané protilátkami pacientov s karcinómom pečene a pankreasu.

IgA protilátky pacientov s autoimunitnou hepatitídou a primárnou biliárnou cirhózou reagovali so sekvenciami AVYFKEQFLDGD a EYNIMFGPDI lokalizovanými v N-doméne kalretikulinu, pričom protilátky pacientov s karcinómom pečene a pankreasu tieto aminokyselinové sekvencie kalretikulinu významne nerozpoznávali; sekvenciu AVYFKEQFLDGD nerozpoznávali IgA protilátky žiadneho pacienta so skupiny testovaných sér onkologických pacientov, peptid EYNIMFGPDI rozpoznávali protilátky triedy IgA dvoch z 5 pacientov s karcinómom pečene a troch zo 6 pacientov s karcinómom pankreasu. Epitopy kalretikulinu (GGYVKLFPNS a YVKLFPNSLD) označené v tejto štúdií za špecifické pre autoimunitnú hepatitídu neboli rozpoznávané IgA protilátkami žiadneho pacienta z testovanej skupiny onkologických pacientov. Peptid ASKPEDWDER, s ktorým reagovali séra 67% pacientov s alkoholickou cirhózou, bol rozpoznávaný len jedným z 5 pacientov s karcinómom pečene a jedným zo 6 pacientov s karcinómom pankreasu.

V štúdií EGGLETON *et al.* (2000) boli analyzované antigénne epitopy kalretikulinu rozpoznávané IgG protilátkami pacientov so SLE metódou ELISA,

v ktorej boli použité ako antigén syntetické pentadecamérne peptidy a rekombinantne pripravené časti kalretikulinu. IgG protilátky pacientov so SLE reagovali s pentadecamérnymi peptidmi KDIRKCKDDEFTHLYT, GEWKPRQIDNPD, EYKGEWKPRQIDNPD, YKGTWIHPEIDNPEY. Dekapeptidy, ktoré korešpondujú s aminokyselinovými sekvenciami týchto imunodominantných pentadecamérnych peptidov, neboli v našej štúdií IgG protilátkami pacientov s karcinómom pečene a pankreasu frekventovane rozpoznávané. IgG protilátky pacientov so SLE rozpoznávali epitopy v N a P- doméne kalretikulinu, s C-doménou nereagovali. Oproti tomu, nami charakterizované imunodominantné epitopy rozpoznávané IgG protilátkami onkologických pacientov boli lokalizované prevažne v C-doméne kalretikulinu.

Výsledky týchto experimentov naznačujú možnú existenciu imunodominantných epitopov kalretikulinu špecifických pre určitý typ ochorenia. Prítomnosť epitopov na molekule kalretikulinu rozpoznávaných sérovými protilátkami pacientov prevažne s určitým ochorením zároveň vedie k úvahe o príčinách imunogenicity konkrétnych častí kalretikulinu u jednotlivých ochorení. Odlišnosti v spektre imunodominantných epitopov rozpoznávaných protilátkami pacientov s jednotlivými ochoreniami by mohlo súvisieť s odlišným mechanizmom zapojenia kalretikulinu do patogenetického mechanizmu príslušného ochorenia. Oproti tomu, protilátková reaktivita proti určitým častiam kalretikulinovej molekuly by mohla spätne ovplyvniť jeho funkcie a aktivitu. Tvorba IgA protilátok proti kalretikulinu u pacientov naznačuje lokálnu imunitnú odpoveď tvoriacu sa v sliznici gastrointestinálneho traktu. IgG izotyp protilátok je asociovaný skôr so systémovou imunitnou odpoveďou. V súčasnej dobe nie sú dostatočne objasnené biologické vlastnosti ani príčiny vzniku antikalretikulinových protilátok. TAN (2001) predpokladá, že výskyt autoprotiátok v sérach pacientov môže slúžiť ako faktor indukujúci aberantne prebiehajúce bunkové mechanizmy v priebehu rozvoja nádoru. U hepatocelulárneho karcinómu bolo poukázané na súvislosť tvorby antikalretikulinových protilátok s expresiou skrátených foriem kalretikulinu (CRT 32, CRT 18), ktoré môžu byť linearizované a tým môže dojsť i k odhaleniu kryptických epitopov (LE NAOUR *et al.* 2002, CHIGNARD *et al.* 2006). Oproti tomu v štúdiu HONG *et al.* (2004) nepredpokladajú, že by zvýšená expresia kalretikulinu či expresia jeho izoforiem prispela k imunogenicite tohto proteínu u pacientov s nádormi pankreasu. V nádorovej bunkovej línii pankreasu bola zistená prítomnosť skrátenej formy kalretikulinu CRT 32, ktorá bola preukázaná aj v nádorovom tkanive pečene. Na rozdiel od sérových protilátok pacientov s hepatocelulárnym karcinómom, protilátky

v sérach pacientov s karcinómom pankreasu nereagovali s CRT 32 (HONG *et al.* 2004). V našej štúdií analýzy antigénnych epitopov kalretikulínu metódou PEPSCAN však boli mnohé peptidy korešpondujúce so sekvenciou CRT 32 rozpoznávané sérovými protilátkami pacientov s karcinómom pankreasu. Rozdiely v rozpoznávaní príslušných častí kalretikulínu môžu byť dané odlišným metodickým prístupom, ktorý v našej štúdií umožnil analýzu iba lineárnych epitopov kalretikulínu. HONG *et al.* (2004) predpokladá, že úlohu v zmene imunogenicity by podľa autorov mohla zohrávať aj odlišná glykozylácia či genetické predispozície (HONG *et al.* 2004).

V budúcnosti by bolo vhodné pokračovať v analýze antigénnych epitopov kalretikulínu rozpoznávaných sérovými protilátkami onkologických pacientov metódou PEPSCAN a tým rozšíriť súbor testovaných patientských sér. Vzhľadom k tomu, že metóda PEPSCAN je obmedzená iba na charakterizáciu sekvenčných antigénnych epitopov, je potrebné previesť taktiež analýzu konformačných antigénnych epitopov, napríklad metódu fágovej knižnice. Užitočné by mohlo byť i kvantitatívne stanovenie hladín protilátok proti určitým epitopom kalretikulínu ELISA testom. Ak by sa ďalšími experimentmi preukázali epitopy špecificky rozpoznávané protilátkami pacientov s konkrétnym typom onkologického ochorenia, mohlo by byť testovanie týchto protilátok užitočné v diagnostike ochorenia.

7. ZÁVER

Cieľom diplomovej práce bolo kvantifikovať hladiny protilátok proti kalretikulinu a tkanivovej transglutamináze v sérach pacientov s onkologickými ochoreniami, pacientov rizikových skupín a zdravých krvných darcov, sledovať vývoj hladín protilátok v priebehu ochorenia a charakterizovať antigénne epitopy kalretikulinu rozpoznávané sérovými protilátkami pacientov i zdravých krvných darcov. Pre naväzujúce experimenty bolo potrebné pripraviť prvú polovicu ľudského rekombinantného kalretikulinu.

ELISA testom s ľudským rekombinantným kalretikulinom sme detekovali zvýšené hladiny (nad cut-off) IgA antikalretikulinových protilátok u 61,5% pacientov s primárnym karcinómom pečene, 44,7% pacientov s karcinómom pankreasu, 25% pacientov s karcinómom pankreasu s metastázami v pečeni, 28,6% pacientov s karcinómom hrubého čreva, 57,1% pacientov s karcinómom hrubého čreva s metastázami v pečeni, 28,6% pacientov s pankreatitídou a 6,25% pacientov s vírusovou hepatitídou. Zvýšené hladiny (nad cut-off) IgG antikalretikuloných protilátok sme preukázali u 61,5% pacientov s primárnym karcinómom pečene, 39,5% pacientov s karcinómom pankreasu, 25% pacientov s karcinómom pankreasu s metastázami v pečeni, 28,6% pacientov s karcinómom hrubého čreva, 28,6% pacientov s karcinómom hrubého čreva s metastázami v pečeni a 28,6% pacientov s pankreatitídami.

Signifikantne zvýšené hladiny IgA antikalretikulinových protilátok sme preukázali u pacientov s primárnym karcinómom pečene ($P < 0,01$, $98,9 \pm 69,83$ [priemer \pm smerodajná odchýlka]), karcinómom pankreasu ($P < 0,05$, $76,31 \pm 60,86$), karcinómom pankreasu s metastázami v pečeni ($P < 0,01$, $63,14 \pm 14,94$) a pankreatitídou ($P < 0,05$, $59,79 \pm 29,98$) v porovnaní s kontrolnou skupinou zdravých krvných darcov ($40 \pm 14,94$). Hladiny antikalretikulinových protilátok triedy IgG boli signifikantne zvýšené u pacientov s primárnym karcinómom pečene ($P < 0,01$, $124,4 \pm 75,99$) a karcinómom pankreasu ($P < 0,01$, $104,7 \pm 82,6$) v porovnaní s kontrolnou skupinou zdravých darcov ($55,69 \pm 17,23$).

ELISA testom využívajúcom ako antigén tkanivovú transglutaminázu izolovanú z pečene morčiat sme preukázali zvýšené hladiny protilátok proti tkanivovej transglutamináze v sérach 46,2% pacientov s primárnym karcinómom pečene, 28,9%

pacientov s karcinómom pankreasu, 25% pacientov s karcinómom pankreasu s metastázami v pečeni, 28,6% pacientov s karcinómom hrubého čreva, 42,9% pacientov s karcinómom hrubého čreva s metastázami v pečeni a 35,7% pacientov s pankreatitídou.

U niekoľkých pacientov s karcinómom pečene a pankreasu sme v priebehu ochorenia monitorovali vývoj hladín IgA a IgG antikalretikulínových protilátok. Počas testovaného obdobia sa hladiny antikalretikulínových protilátok v sérach jednotlivých pacientov vyvíjali individuálne; u niektorých pacientov kolísali (rástli či klesali) u iných pacientov sa nemenili.

Analýza antigénnych epitopov kalretikulinu rozpoznávaných IgA a IgG protilátkami onkologických pacientov preukázala pravdepodobnú existenciu imunodominantných epitopov spoločných pre pacientov s karcinómom pečene a pankreasu. Protilátky triedy IgA všetkých pacientov s karcinómom pečene a pankreasu reagovali s aminokyselinovými sekvenciami EVKIDNSQVESG v P-doméne a RKEEEEAEDKED v C-doméne kalretikulinu. IgG protilátky pacientov s karcinómom pečene i pankreasu rozpoznávali spoločnú aminokyselinovú sekvenciu EEDKKRKEEEEAEDKED v C-doméne, s nižšou frekvenciou i peptidy FAEAPFSNKGQT v N-doméne a ERAKIDDPTD a DKAPEHIPDP v P-doméne molekuly kalretikulinu. So sekvenciou EDKKRKEEEE reagovali i IgA a IgG protilátky niekoľkých sér zdravých krvných darcov.

Pripravili sme prvú polovicu ľudského rekombinantného kalretikulinu procesom zahrňujúcim transformáciu produkčného kmeňa *E.coli* BL 21 (λ DE3) plazmidom obsahujúcim gén pre požadovaný proteínový fragment, indukciu expície tohto fragmentu a jeho purifikáciu metódou afinitnej chromatografie použitím TALONovej matrix s imobilizovaným kobaltnatým iónom. SDS-PAGE analýzou sme preukázali prítomnosť prvej polovice kalretikulinu v bunkových inklúziách *E.coli*, preto bolo nutné extrahovať fragment do močoviny a následne izolovať za denaturačných podmienok.

8. POUŽITÁ LITERATÚRA

- Alaiya A., Roblick U., Egevad L., Carlsson A., Franzén B., Volz D., Huwendiek S., Linder S., Auer G. (2000): Polypeptide expression in prostate hyperplasia and prostate adenocarcinoma. *Anal Cell Pathol* 21: 1-9
- Andrin Ch., Pinkoski M.J., Burns K., Atkinson E.A., Krahenbuhl O., Hudig D., Frase S.A., Winkler U., Tschopp J., Opas M., Bleackley Ch., Michalak M. (1998): Interaction between a Ca²⁺-binding protein calreticulin and perforin, a component of the cytotoxic T-cell granules. *Biochemistry* 37: 10386-10394
- Arosa F.A., Jesus O., Porto G., Carmo A.M., Sousa M. (1999): Calreticulin is expressed on the cell surface of activated human peripheral blood T lymphocytes in association with major histocompatibility complex class I molecules. *J Biol Chem* 274: 16917-16922
- Atreya C.D., Singh N.K., Nakhasi H.L. (1995): The rubella virus RNA binding activity of human calreticulin is localized to the N-terminal domain. *J Virol* 69: 3848-3851
- Baksh S., Michalak M. (1991): Expression of calreticulin in *Escherichia coli* and identification of its Ca²⁺ binding domains. *J Biol Chem* 266: 21458–21465
- Baksh S., Spamer C., Heilmann C., Michalak M. (1995): Identification of the Zn²⁺ binding region in calreticulin. *FEBS Lett* 376: 53-7
- Bastianutto C.E., Clementi E., Codazzi F. Podini P., De Giorgi F., Rizzuto J., Meldolesi J., Pozzan T. (1995): Overexpression of calreticulin increases the Ca²⁺ capacity of rapidly exchanging Ca²⁺ stores and reveals aspects of their luminal microenvironment and function. *J Cell Biol* 130: 847-855
- Basu S., Binder R.J., Ramalingam T., Srivastava P.K. (2001): CD 91 is a common receptor for heat shock proteins gp96, hsp90, hsp70, and calreticulin. *Cell Press* 14: 303-313
- Bayati N., Silverman A.L., Gordon S.C.(1998):Serum alpha-fetoprotein levels and liver histology in patients with chronic hepatitis C. *Am J Gastroenterol* 93: 2452-2456
- Beger H.G., Rau B.M. (2007): New advances in pancreatic surgery. *Curr Opin Gastroenterol* 23: 522-534
- Bergeron J.J., Brenner M.B., Thomas D.Y., Williams D.B. (1994): Calnexin: a membrane-bound chaperone of the endoplasmic reticulum. *Trends Biochem Sci* 19: 124–128
- Bini L., Magi B., Marzocchi B., Arcuri F., Tripodi S., Cintorino M., Sanchez J.C., Frutiger S., Hughes G., Pallini V., Hochstrasser D.F., Tosi P. (1997): Protein expression profiles in human breast ductal carcinoma and histologically normal tissue. *Electrophoresis* 18: 2832-2841

- Boehm J., Orth T., van Nguyen P., Soling H.D. (1994): Systemic lupus erythematosus is associated with increased auto-antibody titers against calreticulin and grp94, but calreticulin is not the Ro/SS-A antigen. *Eur J Clin Invest* 24: 248-257
- Brandacher G., Winkler C., Schroecksadel K., Margreiter R., Fuchs D. (2006): Antitumoral activity of interferon-gamma involved in impaired immune function in cancer patients. *Curr Drug Metab* 7: 599-612
- Brodanová M., Kordač V. (1993): *Klinická hepatologie*. Grada Avicenum, Praha
- Brunagel G., Shah U., Schoen R.E., Getzenberg R.H. (2003): Identification of calreticulin as a nuclear matrix protein associated with human colon cancer. *J Cell Biochem* 89: 238-243
- Burns K., Atkinson E.A., Bleackley R.C., Michalak M. (1994a): Calreticulin: from Ca^{2+} binding to control of gene expression. *Trends Cell Biol* 4: 152-154
- Burns K., Duggan B., Atkinson E.A., Famulski K.S., Nemer M., Bleackley R.Ch., Michalak M. (1994b): Modulation of gene expression by calreticulin binding to the glucocorticoid receptor. *Nature* 367: 476-480
- Camacho P., Lechleiter J.D. (1995): Calreticulin inhibits repetitive intracellular Ca^{2+} waves. *Cell* 82: 765-771
- Casciola-Rosen L., Rosen A. (1997): Ultraviolet light-induced keratinocyte apoptosis: a potential mechanism for the induction of skin lesions and autoantibody production in SLE. *Lupus* 6: 175-180
- Clarke Ch., Smyth M.J. (2007): Calreticulin exposure increases cancer immunogenicity. *Nat Biotech* 25: 192-193
- Conway E.M., Liu L., Nowakowski B., Steiner-Mosonyi M., Ribeiro S.P., Michalak M. (1995): Heat shock-sensitive expression of calreticulin. *J Biol Chem* 270: 17011-17016
- Coppolino M., Woodside J.W., Demaurex N., Grinstein S., St-Arnaud R., Dedhar S. (1997): Calreticulin is essential for integrin-mediated calcium signalling and cell adhesion. *Nature* 386: 843-847
- Corbett E.F., Michalak M. (2000): Calcium, a signaling molecule in the endoplasmic reticulum? *Trends Biochem Sci* 25: 307-311
- Corbett E.F., Oikawa K., Francois P., Tessier D.C., Kay C., Bergeron J.J., Thomas D.Y., Krause K.H., Michalak M. (1999): Ca^{2+} regulation of interactions between endoplasmic reticulum chaperones. *J Biol Chem* 274: 6203-6211
- Dedhar S., Rennie P.S., Shago M., Hagesteijn C.Y., Yang H., Filmus J., Hawley R.G., Bruchofsky N., Cheng H., Matusik R.J. (1994): Inhibition of nuclear hormone receptor activity by calreticulin. *Nature* 367: 480-483

- Dieterich W., Laag E., Schöpfer H., Volta U., Ferguson A., Gillett H., Riecken E.O., Schuppan D. (1998): Autoantibodies to tissue transglutaminase as predictors of celiac disease. *Gastroenterol* 115: 1317-1321
- Donato F., Boffetta P., Puoti M.A. (1998): A meta-analysis of epidemiological studies on the combined effect of Hepatitis B and C virus infections in causing hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer* 75: 347-54
- Dupuis M., Schaerer E., Krause K.H., Tschopp J. (1993): The calcium-binding protein calreticulin is a major constituent of lytic granules in cytolytic T lymphocytes. *J Exp Med* 177: 1-7
- Eggleton P., Llewellyn D.H. (1999): Pathophysiological roles of calreticulin in autoimmune disease. *Scand J Immunol* 49: 466-73.
- Eggleton P., Ward F.J., Johnson S., Khamashta M.A., Hughes G.R.V., Hajela V.A., Michalak M., Corbett E.F., Staines N.A. (2000): Fine specificity of autoantibodies to calreticulin: epitope mapping and characterization. *Clin Exp Immunol* 120: 384-391
- Fernández Madrid F. (2005): Autoantibodies in breast cancer sera: candidate biomarkers and reporters of tumorigenesis. *Cancer Let* 230: 187-198
- Fracanzani A.L., Conte D., Fraquelli M., Taioli E., Mattioli M., Losco A., Fargion S. (2001): Increased cancer risk in a cohort of 230 patients with hereditary hemochromatosis in comparison to matched control patients with non-iron-related chronic liver disease. *Hepatology* 33: 647-51
- Fraser S.A., Karimi S., Michalak M., Hudig D. (2000): Perforin lytic activity is controlled by calreticulin. *J Immunol* 164: 4150-4155
- Gardai S.J., McPhillips K.A., Frasch S.C., Janssen W.J., Murphy-Ullrich J.E., Bratton D.L., Oldenborg P.A., Michalak M., Henson P.M. (2005): Cell-surface calreticulin initiates clearance of viable or apoptotic cells through trans-activation of LRP on the phagocyte. *Cell* 123: 321-334
- Guo L., Groenendyk J., Papp S., Dabrowska M., Knoblach B., Kay C., Parker J.M., Opas M., Michalak M. (2003): Identification of an N-domain histidine essential for chaperone function in calreticulin. *J Biol Chem* 278: 50645–50653
- Gupta M.K., Arciaga R., Bocci L., Tubbs R., Bukowski R., Deodhar S.D. (1985): Measurement of a monoclonal-antibody-defined antigen (CA 19-9) in the sera of patients with malignant and nonmalignant diseases. Comparison with carcinoembryonic antigen. *Cancer* 56: 277-283
- Gut J., Christen U., Fey N., Koch V., Stoffler D. (1995): Molecular mimicry in halothane hepatitis. Biochemical and structural characterization of lipoyled autoantigens. *Toxicol* 97: 199-224

- Hamanaka Y., Suehiro Z., Fukui M., Shikichi K., Imai K., Hinoda Z. (2003): Circulating anti-MUC1 IgG antibodies as a favourable prognostic factor for pancreatic cancer. *Int J Cancer* 103: 97-100
- Hermesen B.B., Verheijen R.H., Menko F.H., Gille J.J., van Uffelen K., Blankenstein M.A., Meijer S., van Diest P.J., Kenemans P., von Mensdorff-Pouilly S. (2007): Humoral immune responses to MUC1 in women with a BRCA1 or BRCA2 mutation. *Eur J Cancer* 43: 1556-1563
- Hong S.H., Misek D.E., Wang H., Puravs E., Giordano T.J., Greenson J.K., Brenner D.E., Simeone D.M., Logsdon C.D., Hanash S.M. (2004): An autoantibody-mediated immune response to calreticulin isoforms in pancreatic cancer. *Cancer res* 64: 5504-5510
- Hořejší V., Bartůňková J.(2005): *Základy Imunologie* (3.vydání). Triton, Praha
- Huggins M.C., Gibbs J., Moloney N.A. (1995): Cloning of a *Schistosoma japonicum* gene encoding an antigen with homology to calreticulin. *Mol Biochem Parasitol* 71: 81-87
- Chang M.H., Chen C.J., Lai M.S., Hsu H.M., Wu T.C., Kong M.S., Liang D.C., Shau W.Y., Chen D.S. (1997): Universal hepatitis B vaccination in Taiwan and the incidence of hepatocellular carcinoma in children. Taiwan Childhood Hepatoma Study Group. *N Engl J Med* 336: 1855-1859
- Cheng S.T., Nguyen T.Q., Yang Y.-S., Capra J.D., Sontheimer R.D. (1996): Calreticulin binds hYRNA and the 52-hDa polypeptide component of the Ro/SS-A ribonucleoprotein autoantigen. *J immunol* 156: 4484-4491
- Chignard N., Shang S., Wang H., Marrero J., Bréchet Ch., Hanash S., Beretta L. (2006): Cleavage of endoplasmic reticulum proteins in hepatocellular carcinoma: Detection of generated fragments in patient sera. *Gastroenterol* 130: 2010-2022
- Imai H, Nakano Y., Kiyosawa K., Tan E.M. (1993): Increasing titers and changing specificities of antinuclear antibodies in patients with chronic liver disease who develop hepatocellular carcinoma. *Cancer* 71: 26-35
- John L.M., Lechleiter J.D., Camacho P. (1998): Differential modulation of SERCA2 isoforms by calreticulin. *J. Cell Biol* 142: 963–973
- Joshi M., Pogue G.P., Duncan R.C., Lee N.S., Singh K.H., Atreya C.D., Dwyer D.M., Nakhasi H.L. (1996): Isolation and characterisation of *Leishmania donovani* calreticulin gene and its conservation of the RNA binding activity. *Mol Biochem Parasitol* 81: 53-64
- Kageyama S., Isono T., Iwaki H., Wakabayashi Y., Okada Y., Kontani K., Yoshimura K., Terasi A., Arai Y., Yoshiki T. (2004): Identification by proteomic analysis of calreticulin as a marker for bladder cancer and evaluation of the diagnostic accuracy of its detection in urine. *Clin Chem* 50: 857-866

- Karachristos A., Scarmeas N., Hoffman J.P.(2005): CA 19-9 levels predict results of staging laparoscopy in pancreatic cancer. *J Gastroenterol Surg* 9: 1286-1292
- Karská K., Tučková L., Steiner L., Tlaskalová-Hogenová H., Michalak M. (1995): Calreticulin – the potential autoantigen in coeliac disease. *Biochem Biophys Res Commun* 209: 597-605
- Kinoshita G., Keech C.L., Sontheimer R.D., Purcell A., McCluskey J., Gordon T.P. (1998): Spreading of the immune response from 52 kDa Ro and 60 kDa Ro to calreticulin in experimental autoimmunity. *Lupus* 7: 7-11
- Kishore U., Sontheimer R.D., Sastry K.N., Zaner K.S., Zappi E.G., Hughes G.R., Khamashta M.A., Strong P., Reid K.B., Eggleton P. (1997a): Release of calreticulin from neutrophils may alter C1q-mediated immune functions. *Biochem J* 322: 543-550
- Kishore U., Sontheimer R.D., Sastry K.N., Zappi E.G., Hughes G.R.V., Khamashta M.A., Reid K.B.M., Eggleton P. (1997b): The systemic lupus erythematosus (SLE) disease autoantigen-calreticulin can inhibit C1q association with immune complexes. *Clin Exp Immunol* 108: 181-190
- Klener P. *et al.* (2001): *Vnitřní lékařství* (druhé, doplnené vydání). Galén, Praha
- Krause K., Michalak M. (1997): Calreticulin. *Cell* 88: 439-443
- Kreissel W., Siegel A., Bahler A., Spamer C., Schiltz E., Kist M., Seilnacht G., Klein R., Berg P.A., Heilmann C. (1999): High prevalence of antibodies to calreticulin of the IgA class in primary biliary cirrhosis: a possible role of gut-derived bacterial antigens in its aetiology? *Scand J Gastroenterol* 34: 623-628
- Lai L.C., Cheong S.K., Goh K.L., Leong C.F., Loh C.S., Lopez J.B., Nawawi H., Sivanesaratnam V., Subramaniam R. (2003): Clinical usefulness of tumour markers. *Malaysian J Pathol* 25: 83-105
- Laemmli U.K., Favre M. (1973): Maturation of the head of bacteriophage T4. I. DNA packaging events. *J Mol Biol* 80: 575-599
- Le Naour F., Brichory F., Misek D.E., Bréchet Ch., Hanash S.M., Beretta L. (2002): A distinct repertoire of autoantibodies in hepatocellular carcinoma identified by proteomic analysis. *Mol Cell Proteomics* 1: 197-203
- Luttges J., Kloppel G. (2000): Precancerous conditions of pancreatic carcinoma. *J Hepat Pancreat Surg* 7: 568-574
- Lux F.A., McCauliffe D.P., Buttner D.W., Lucius R., Capra J.D., Sontheimer R.D., Lieu T.S. (1992): Serological cross-reactivity between a human Ro/SS-A autoantigen (calreticulin) and the lambda Ral-1 antigen of *Onchocerca volvulus*. *J Clin Invest* 89: 1945-1951

- Maacke H., Hundertmark C., Miska S., Voss M., Kalthoff H., Sturzbecher H.W. (2002): Autoantibodies in sera of pancreatic cancer patients identify recombination factor Rad51 as a tumor-associated antigen. *J Cancer Res Clin Oncol* 128: 219-222
- Malthora R., Willis A.C., Jensenius J.C., Jackson J., Sim R.B. (1993): Structure and homology of human C1q receptor (collectin receptor). *Immunol* 78: 341-348
- Marrero J.A. (2003): Hepatocellular carcinoma. *Curr Opin Gastroenterol* 19: 243-249
- Gupta M.K., Arciaga R., Bocci L., Tubbs R., Bukowski R., Deodhar S.D. (1985): Measurement of a monoclonal-antibody-defined antigen (CA 19-9) in the sera of patients with malignant and nonmalignant diseases. *Cancer* 56: 277-283
- Marcelain K., Colombo A., Molina M.C., Ferreira L., Lorca M., Aquillaón J.C., Ferreira A. (2000): Development of an immunoenzymatic assay for the detection of human antibodies against *Trypanosoma cruzi* calreticulin, an immunodominant antigen. *Acta Trop* 75: 291-300
- Marcellin P., Lada O., Asselah T. (2007): Treatment of chronic hepatitis B with the combination of pegylated interferon with lamivudin. *Hepatol Res* 37: 55-61
- Matsuoka K., Seta K., Yamakawa Y., Okuyama T., Shinoda T., Isobe T. (1994): Covalent structure of bovine brain calreticulin. *Biochem J* 298: 435-442
- McCauliffe D.P., Yang Y.S., Wilson J., Sontheimer R.D., Capra J.D. (1992): The 5'-flanking region of the human calreticulin gene shares homology with the human GRP78, GRP94, and protein disulfide isomerase promoters. *J Biol Chem* 267: 2557-2562
- McCauliffe D.P., Zappi E., Lieu Z.S., Michalak M., Sontheimer R.D., Capra J.D. (1990): A human Ro/SS-A is the homologue of calreticulin and is highly homologous with onchocercal Ral-1 antigen and alypsia "memory molecule". *J Clin Invest* 86: 332-335
- McKeown-Eyssen G. (1994): Epidemiology of colorectal cancer revisited: Are serum triglycerides and/or plasma glucose associated with risk? *Can Epidemiol* 3: 687-695
- Mesaeli N., Nakamura K., Zvaritch E., Dickie P., Dziak E., Krause K.H., Opas M., MacLennan D.H., Michalak M. (1999): Calreticulin is essential for cardiac development. *J Cell Biol* 144: 857-868
- Metzger M.-H., Heier M., Mäki Markku, Bravi E., Schneider A., Löwel H., Illing T., Schuppan D., Wichmann H.-E. (2006): Mortality excess in individuals with elevated IgA anti-transglutaminase antibodies: The KORA/MONICA Augsburg cohort study 1989-1998. *Eur J Epidemiol* 21: 359-365
- Michalak M., Burns K., Andrin C., Mesaeli N., Jass G.H., Busaan J.L., Opas M. (1996): Endoplasmic reticulum form of calreticulin modulates glucocorticoid-sensitive gene expression. *J Biol Chem* 271: 29436-29445

- Michalak M., Corbett E.F., Mesaeli N., Nakamura K., Opas M. (1999): Calreticulin: one protein, one gene, many functions. *Biochem J* 344: 281-292
- Michalak M., Robert Parker J.M. and Opas M. (2002): Ca²⁺ signaling and calcium binding chaperones of the endoplasmic reticulum. *Cell Calcium* 32: 269–278.
- Morley J. E., Thomas D.R., Wilson M.-M.G. (2006): Cachexia: pathophysiology and clinical relevance. *Am J Clin Nutr* 83: 735-743
- Motola-Kuba D., Zamora-Valdés D., Uribe M., Méndez-Sánchez N. (2006): Hepatocellular carcinoma. An overview. *An Hepatol* 5: 16-24
- Nakamura K., Robertson M., Liu G., Dickie P., Nakamura K., Guo J.Q., Duff H.J., Opas M., Kavanagh K., Michalak M. (2001a): Complete heart block and sudden death in mouse overexpressing calreticulin. *J Clin Invest* 107: 1245-1253
- Nakamura K., Zuppini A., Arnaudeau S., Lynch J., Ahsan I., Krause R., Papp S., De Smedt H., Parys J.B., Müller-Esterl W., Lew D.P., Krause K.-H., Demaurex N., Opas M., Michalak M. (2001b): Functional specialization of calreticulin domains. *J Cell Biol* 154: 961–972
- Obeid M., Tesniere A., Ghiringhelli F., Fimia G.M., Apetoh L., Perfettini J-L., Castedo M., Mignot G., Panaretakis T., Casares N., Métivier D., Larochette N., Endert P., Ciccocanti F., Piacentini M., Zitvogel L., Kroemer G. (2007): Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death. *Nat Med* 13: 54-61
- Orth T., Dorner T., Meyer zum Buschenfelde K.H., Mayet W.J. (1996): Complete congenital heart block is associated with increased autoantibody titers against calreticulin. *Eur J Clin Invest* 26: 205-215
- Ostwald T.J., MacLennan D.H. (1974): Isolation of a high affinity calcium-binding protein from sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 249: 974-979
- Obeid M., Tesniere A., Ghiringhelli F., Fimia G.M., Apetoh L., Perfettini J-L., Castedo M., Mignot G., Panaretakis T., Casares N., Métivier D., Larochette N., Endert P., Ciccocanti F., Piacentini M., Zitvogel L., Kroemer G. (2007): Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death. *Nat Med* 13: 54-61
- Parkin D.M., Bray F., Ferlay J., Pisani P.(2005): Global Cancer Statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 55: 74-108
- Pike S.E., Yao L., Setsuda J., Jones K.D., Cherney B., Appella E., Sakaguchi K., Nakhasi H., Atreya C.D., Teruya-Feldstein J., Wirth P., Gupta G., Tosaso G. (1999): Calreticulin and calreticulin fragments are endothelial cell inhibitors that suppress tumor growth. *Blood* 94: 2461–2468
- Pritchard D.I., Brown A., Kasper G., McElroy P., Loukas A., Hewitt C., Berry C., Fullkrug R., Beck E. (1999): A hookworm allergen which strongly resembles calreticulin. *Parasite Immunol* 21: 439-450

- Readle J., Oremek G., Welker M., Roth W.K., Caspary W. F., Zuezem S. (1996): p53 autoantibodies in patients with pancreatitis and pancreatic carcinoma. *Pancreas* 13: 241-246
- Rojiani M.V., Finlay B.B., Gray V., Dedhar S. (1991): In vitro interaction of a polypeptide homologous to human Ro/SS-A antigen (calreticulin) with a highly conserved amino acid sequence in the cytoplasmic domain of integrin alpha subunits. *Biochemistry* 30: 9859-9866
- Routsias H.J.G., Tzioufas A.G., Sakarellos-Daitsiotis M., Sakarellos C., Moutsopoulos H.M.(1993): Calreticulin synthetic peptide analogues: anti-peptide antibodies in autoimmune rheumatic diseases. *Clin Exp Immunol* 91: 437-441
- Říhová B. (2005): Protinádorová imunita. In: Šterzl a kolektiv autorů (eds.): *Základy imunologie pro zubní a všeobecné lékaře*, Karolinum, Praha
- Saito Y., Ihara Y., Leach M.R., Cohen-Doyle M.F., Williams D.B. (1999): Calreticulin function in vitro as a molecular chaperone for both glycosylated and non-glycosylated proteins. *The EMBO J* 18: 6718-6729
- Sanders M.L., Jaworski D.C., Sanchez J.L., De Fraites R.F., Glass G.E., Scott A.L., Raha S., Ritchie B.C., Needham G.R., Schwartz B.S. (1998): Antibody to a cDNA-derived calreticulin protein from *Amblyomma americanum* as a biomarker of tick exposure in humans. *Am J Trop Med Hyg* 59: 279-285
- Sánchez D., Tučková L., Mothes T., Kreisel W., Benš Z., Tlaskalová-Hogenová H.(2003): Epitopes of calreticulin recognised by IgA autoantibodies from patients with hepatic and coeliac disease. *J Autoimmun* 21: 383-392
- Sánchez D., Tučková L., Šebo P., Michalak M., Whelan A., Šterzl I. Jelínková L., Havrdová E., Imramovská M., Beneš Z., Krupičková S., Tlaskalová-Hogenová H. (2000): Occurrence of IgA and IgG autoantibodies to calreticulin in coeliac disease and various autoimmune diseases. *J Autoimmun* 15: 441-449
- Seregni E., Ferrari L., Martinetti A., Bombardieri E. (2001): Diagnostic and prognostic tumor markers in the gastrointestinal tract. *Sem Surg Oncol* 20: 147-166
- Silano M., Volta U., Mecchia A.M., Dessi M., Di Benedetto R., De Vincenzi M..Collaborating centers of the Italian registry of the complications of coeliac disease (2007): Delayed diagnosis of coeliac disease increase cancer risk. *BCM Gastroenterology* 7: 8
- Singh N.K., Atreya C.D., Nakhashi H.L. (1994): Identification of calreticulin as a rubella virus RNA binding protein. *Proc Nat Acad Sci USA* 91: 12770-12774
- Seregni E., Ferrari L., Martinetti A., Bombardieri E. (2001): Diagnostic and prognostic tumor markers in the gastrointestinal tract. *Sem Surg Oncol* 20: 147-166

- Solheim J.C., Beatriz M.C., Hansen T.H. (1997): Are transporter associated with antigen processing (TAP) and tapasin class I MHC chaperones? *J Immunol* 158: 541-543
- Spiro R.G., Zhu Q., Bhoyroo V., Solling H.D. (1996): Definition of the lectin-like properties of the molecular chaperon calreticulin, and demonstration of its copurification with endomannosidase from rat liver Golgi. *J Biol Chem* 271: 11588-11594
- Sun Q.M., Cao L., Fang L., Cheng C., Dai J., Chen L.L., Hua Z.C. (2005): Expression, purification of human vasostatin 120-180 in *Escherichia coli*, and its anti-angiogenic characterization. *Protein Expr Purif* 39: 288-295
- Tan E.M. (2001): Autoantibodies as a reporters identifying aberrant cellular mechanisms in tumorigenesis. *J Clin Invest* 108:1411-1415
- Tlaskalová H., Tučková L., Pospíšil M., Štěpánková R. (2000): Malignancy in coeliac disease and dermatitis herpetiformis. In: Shoenfeld Y., Gershwin M.E. (eds): *Cancer and Autoimmunity*, Elsevier Science B.V., USA
- Trombetta E.S. (2003a): The contribution of N-glycans and their processing in the endoplasmic reticulum to glycoprotein biosynthesis. *Glycobiology* 13: 77R–91R
- Trombetta E.S., Parodi A. J. (2003b): Quality control and protein folding in the secretory pathway. *Annu Rev Cell Dev Biol* 19: 649-676
- Tučková L., Tlaskalová-Hogenová H., Farré M.A., Karská K., Rossman P., Kolínská J., Kocna P (1995): Molecular mimicry as a possible cause of autoimmune reactions in coeliac disease? Antibodies to gliadin cross-react with epitopes on enterocytes. *Clin Immunol Immunopathol* 74: 170-176
- Waisman D.M., Salimath B.P., Anderson M.J. (1985): Isolation and characterization of CAB-63, a novel calcium binding protein. *J Biol Chem* 260: 1652-1660
- Waser M., Mesaeli N., Spencer C., Michalak M. (1997): Regulation of calreticulin gene expression by calcium. *J. Cell Biol* 138: 547–557
- Watanabe D., Yamada K., Nishina Y., Tajima Y., Koshimizu U., Nagata A., Nishimune Y. (1994): Molecular cloning of a novel Ca(2+)-binding protein (calmegin) specifically expressed during male meiotic germ cell development. *J Biol Chem* 269: 7744-7749
- Wayne M., Cooperman A., Kasmin F., Cohen S., Dryska H., Ottaviana L., Katcherian Ch., Cambroner N., Siegel J. (2007): Chronic pancreatitis with synchronous and metachronous malignancy: Three unusual cases and a literature review. *J Surg Educ* 64: 158-61

Yoon G.S., Lee H., Jung Y., Yu E., Moon H.B., Song K., Lee I. (200): Nuclear matrix of calreticulin in hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 60: 1117-1120

Zhu Q., Zelinka P., White T., Tanzer M.L.(1997): Calreticulin-integrin bidirectional signaling complex. *Biochem Biophys Res Commun* 232: 354-358