

STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Obor č. 6: Zdravotnictví

Studium afinitních interakcí diagnostických molekul antigen-protilátka a antigen-aptamer vybranými imunoanalytickými metodami

Marek Kalvoda

Pardubický kraj

Pardubice 2023

STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Obor č. 6: Zdravotnictví

**Studium afinitních interakcí diagnostických molekul
antigen-protilátka a antigen-aptamer vybranými
imunoanalytickými metodami**

**Study of affinity interactions of diagnostic antigen-
antibody and antigen-aptamer molecules by selected
immunoanalytical methods**

Autor: Marek Kalvoda

Škola: Střední průmyslová škola chemická Pardubice, Poděbradská
94, 530 09 Pardubice II

Kraj: Pardubický kraj

Konzultanti: doc. RNDr. Lucie Korecká, Ph. D.

Mgr. Zuzana Svobodová, Ph. D.

Pardubice 2023

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem svou práci SOČ vypracoval samostatně a použil jsem pouze prameny a literaturu uvedené v seznamu bibliografických záznamů.

Prohlašuji, že tištěná verze a elektronická verze soutěžní práce SOČ jsou shodné.

Nemám závažný důvod proti zpřístupnění této práce v souladu se zákonem č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších předpisů.

V Pardubicích dne 22. 1. 2023.....

Poděkování

Na prvním místě bych velmi rád poděkoval paní doc. RNDr. Lucii Korecké, Ph. D. za odbornou konzultaci a vstřícnost ve všech ohledech mé Středoškolské odborné činnosti, kterou jsem pod jejím vedením vypracovával ve skupině imunochemie Katedry biologických a biochemických věd Fakulty chemicko-technologické Univerzity Pardubice. Na výše zmíněném pracovišti mi během mé laboratorní práce pomáhali mnozí další pracovníci, těm také patří velký dík. Rovněž bych chtěl poděkovat paní Mgr. Zuzaně Svobodové, Ph. D., která mi pomohla s částí experimentální práce v laboratoři, a to zejména s instrumentací Affiblot. Jsem ji také vděčný za mnohé rady a připomínky k mé práci.

Dále bych chtěl poděkovat pedagožkám z mé školy Ing. Markétě Tefrové a Ing. Andree Čížkové, Ph. D., za seznámení se Středoškolskou odbornou činností a zprostředkování možnosti spolupráce na výše zmíněném pracovišti.

V neposlední řadě bych chtěl poděkovat své rodině a mnohým přátelům za trpělivost, vstřícnost a podporu během práce na mé Středoškolské odborné činnosti.

Anotace

Cílem práce bylo ověřit možnosti využití molekul aptamerů v imunochemické detekci vybraných biologicky aktivních proteinů (biomarkerů), a jejich porovnání s obvykle využívanými protilátkami (imunoglobuliny). Pomocí vybraných imunoanalytických metod byly studovány interakce aptamer – biomarker a protilátka – biomarker. Cílem bylo verifikovat a zhodnotit specifitu interakcí těchto molekul a ověřit využitelnost aptamerů pro případnou klinickou detekci proteinových biomarkerů jako vhodné alternativy protilátek. Jako modelový biomarker byl použit lidský epididymální protein 4 (HE4), který je mimo jiné ve vysoké míře exprimován v tkáni vaječníků v důsledku maligního zvratu. Pro studium interakcí byly využity specifické anti-HE4 protilátky třídy IgG a odpovídající molekuly aptameru (anti-HE4) konjugované s biotinem. Vybrané metody studia interakcí zahrnovaly imunoblot/dot-blot a Affiblot s kolorimetrickou a chemiluminiscenční detekcí a polyakrylamidovou gelovou elektroforézu (SDS-PAGE).

Klíčová slova

Imunochemické metody; ovariální karcinom; aptamery; blotting; SDS-PAGE elektroforéza

Annotation

This work aimed to confirm the potential use of aptamer molecules in immunochemical detection of selected biologically active proteins (biological markers). Further, it compares this method with a commonly used antibody (immunoglobulins). The interactions of aptamer–biomarker and antibody–biomarker were examined using a selection of immunoanalytical methods. The aim was not only to assess and confirm the specificity of the interaction of these molecules but also to ponder the potential applicability of aptamers as suitable alternatives to antibodies in the area of detection of protein biomarkers. Human epididymis protein 4 (HE4), which is frequently expressed in the ovary tissue in consequence of a malign turn was selected as a model biomarker. For testing the interactions, specific anti-HE4 IgG antibodies and aptamer molecules (anti-HE4) conjugated with biotin were used. The methods used for the study of interactions included immunoblotting/dot-blotting with colorimetric and/or chemiluminiscent detection and polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE).

Keywords

Imunochemical methods; ovarian cancer; aptamers; blotting; SDS-PAGE electrophoresis

Obsah

1	Úvod.....	7
2	Teoretická část	8
2.1	Imunochemie.....	8
2.2	Maligní nádory ovarií.....	8
2.2.1	Nádorový antigen CA 125 a lidský epididymální protein 4	9
2.3	Mechanismy imunitní odpovědi.....	10
2.3.1	Neadaptivní (vrozená) imunitní odpověď.....	10
2.3.2	Adaptivní imunitní odpověď.....	11
2.3.3	Imunochemická reakce	12
2.3.4	Imunoglobuliny.....	13
2.3.5	Tvorba imunokomplexu.....	17
2.4	Aptamery.....	17
2.4.1	Struktura a charakteristika aptamerů	18
2.4.2	Technologie SELEX	19
2.5	Biokonjugační reakce.....	20
2.6	SDS-PAGE elektroforéza.....	22
2.7	Blotové techniky	23
2.7.1	Dot-blot.....	24
2.7.2	Affiblot.....	25
3	Metodologie	26
3.1	Využití SDS-PAGE elektroforézy pro studium Mr protilátek a antigenu	26
3.2	Využití metody dot-blot pro ověření vazebné schopnosti protilátek a kalibraci množství antigenu	27
3.3	Využití metody Affiblot pro testování afinity protilátek k antigenu.....	29
3.4	Biokonjugace protilátek s biotinem	29
3.4.1	Biotinylace s využitím NHS-biotinu.....	30
3.4.2	Biotinylace s využitím biotin-hydrazidu.....	30
3.5	Testování koncentračního rozmezí streptavidin-HRP	31
3.6	Kalibrace biotinylovaných anti-HE4 protilátek	32
3.7	Testování vazebné schopnosti aptamerů.....	32
3.8	Porovnání vazebné schopnosti anti-HE4 aptamerů a biotinylovaných anti-HE4 protilátek.....	33
4	Výsledky.....	35

4.1	Ověření kvality a molekulové hmotnosti protilátek a antigenu elektroforeticky.....	35
4.2	Ověření vazebné schopnosti protilátek a antigenu a kalibrace antigenu	36
4.3	Studium afinity protilátek k antigenu.....	36
4.4	Zhodnocení účinnosti konjugace protilátek s biotinem	37
4.5	Zhodnocení koncentrační řady streptavidin-HRP	38
4.6	Zhodnocení kalibrace biotinylovaných anti-HE4 protilátek.....	39
4.7	Zhodnocení testů vazebné schopnosti aptamerů	40
4.8	Zhodnocení porovnání biotinylovaných aptamerů a biotinylovaných anti-HE4 protilátek.....	41
5	Závěr	44
6	Diskuze	46
7	Použitá literatura.....	47
8	Seznam a zdroje obrázků, tabulek, grafů a vzorců	50
8.1	Zdroje obrázků	51
9	Seznam použitých zkratk	52

1 ÚVOD

Ve své středoškolské odborné činnosti jsem se zabýval využitím oligonukleotidových molekul tzv. aptamerů jako alternativy k molekulám protilátek, které jsou využívány v imunochemických metodách. Aptamery mají při správném molekulárním designu specifické vazebné schopnosti podobně jako protilátky (imunoglobuliny). Toho lze využít pro imunochemickou detekci biomarkerů, v tomto případě proteinů. Cílem bylo otestovat a porovnat interakce aptamer – biomarker a protilátka – biomarker pomocí vybraných imunoanalytických metod, jako je blotting a SDS-PAGE elektroforéza.

Modelovým systémem byl lidský epididymální protein (HE4), který je jedním z biomarkerů ve zvýšené míře exprimovaných při karcinomu ovarií, tzn. sérový onkomarker (viz kapitola 2.2.1). Onkologická onemocnění a laboratorní diagnostika biomarkerů, které jsou s onemocněním asociované, jsou stále velmi aktuálním tématem, a právě možné využití aptamerů v klinické diagnostice je studováno vzhledem k některým omezením, která jsou u protilátek popisována. Toto téma jsem si vybral, protože mě obor biochemie a problematika využití aptamerů v laboratorní diagnostice a léčbě zajímá a chtěl bych se jejímu studiu dále věnovat.

Výsledkem mé práce jsou data popisující schopnost interakce obou biospecifických párů aptamer – biomarker a protilátka – biomarker, data potvrzující a porovnávající afinitu používaných specifických molekul vůči studovanému biomarkeru (HE4). Rovněž byla ověřena kvalita a molekulová hmotnost používaných komerčně dodávaných protilátek a antigenu HE4. Dále byla analyzována koncentrační řada streptavidin-HRP, který byl využit pro finální kolorimetrickou a chemiluminiscenční detekci biotinylovaných protilátek i aptamerů metodou dot-blot.

Experimentální část práce jsem realizoval na Katedře biologických a biochemických věd Fakulty chemicko-technologické UPCE ve vědecké skupině imunochemie pod vedením doc. RNDr. Lucie Korecké, Ph.D. a Mgr. Zuzany Svobodové, Ph.D., která se skupinou imunochemie úzce spolupracuje, ale působí na Katedře biologických a lékařských věd Farmaceutické fakulty UK v Hradci Králové.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Imunochemie

Imunochemie je definována jako interdisciplinární přírodovědný obor na rozhraní imunologie a chemie, resp. biochemie. Tento obor se zabývá molekulární podstatou imunitních procesů, jmenovitě studiem biolátek, jako jsou enzymy účastníci se imunitní odpovědi nebo enzymy využitelné pro laboratorní diagnostiku. Dále také cytokiny, složkami komplementu, receptory a specifickými povrchovými znaky imunitních buněk, ale i různými inhibitory, imunohormony a dalšími látkami, které jsou důležité v imunitních procesech [1].

Imunochemie se zabývá také studiem imunochemických reakcí, tj. interakcí mezi dvěma základními molekulami, antigenem a protilátkou. Zabývá se chemizmem těchto molekul a jejich strukturou. Právě princip imunochemických reakcí je základem pro veškerou kvalitativní i kvantitativní imunochemickou analýzu, a tedy i pro lékařskou laboratorní diagnostiku a analýzu biologicky aktivních látek v různých odvětvích. Metody využívající tohoto principu, tedy reakce antigenu s protilátkou, byly prvně popsány již před více jak 100 lety a cestu k aplikaci zejména v lékařské diagnostice si našly rychle. Mluvíme o metodách sérologických, elektroforetických, imunochromatografických a tzv. imunoanalytických. Řadíme sem také metody imunoblotu [2, 3].

2.2 Maligní nádory ovarií

Maligní rakovinné bujení ve vaječnicích se dělí do několika skupin, a to podle jejich tzv. histogeneze (tj. proces vzniku a vývoje tkáně). Mezi základní typy maligních zvrátů vaječníků řadíme nádory epitelu (karcinomy), dále neepitelové nádory zárodečných pruhů a stromatu a nakonec nádory germinálních buněk [4]. Přitom epitelové nádory tvoří převážnou většinu ovariálních malignit, a to kolem 90 %. Nejběžněji dochází k rozvoji onemocnění mezi 55. až 74. rokem života, u neepiteliálních malignit je častější výskyt u mladších žen [5, 6]. Incidence epiteliálního karcinomu ovarií se v posledních letech v České republice pohybuje kolem 18 diagnostikovaných žen na 100 000. Jak incidence, tak i mortalita vykazují mírný pokles. Udává se ovšem, že bohužel až 75 % diagnostikovaných případů jsou pozdní stádia často již s metastázemi. V období let 2014 až 2018 bylo jen 23 % případů diagnostikováno ve včasném stádiu nemoci. V současné době sice již existuje screeningový program pro širokou populaci, ale záchyt této diagnózy je stále obtížný. Jako terapeutické cesty jsou užívány běžné

onkologické postupy v podobě chirurgického zásahu (první krok), chemoterapie (velmi běžná) nebo radioterapie (méně, než chemoterapie) [4, 5].

Velký vliv na onemocnění mají i genetické predispozice v podobě autozomálně dominantních mutací na 13. a 17. chromozomu BRCA1 a BRCA2 spojené se syndromem karcinomu prsu. Nositelky těchto mutací mají 10-20× zvýšené riziko onemocnění než běžná populace. Mutace je spojena s patologií účinného mechanismu chránícího proti vzniku karcinomu jako je genomová integrita, transkripční a buněčná regulace [6].

Jak už bylo zmíněno výše, jednoduchá screeningová metoda neexistuje, záchyt prekanceróz je tedy dost problematický. Základem jsou klinické symptomy (onemocnění je velmi často asymptomatické či nespecifické), dále sonografické vyšetření, vyšetření magnetickou rezonancí či počítačovou tomografií, někdy doplněno o RTG (skiografie hrudníku) atd. Dále se jedná o biopsie a následná imunohistochemická vyšetření. Velice důležitým parametrem při stanovení diagnózy je laboratorní stanovení tzv. onkomarkerů, což jsou solubilní molekuly cirkulující v krvi, jejichž hladina je v důsledku nádorového bujení zvýšena. Stanovení onkomarkerů je využíváno také k monitorování účinnosti terapie. Podrobné informace o dominantním onkomarkeru, proteinu CA 125, rozšířené o další vyšetření jsou popsány níže [4, 6].

2.2.1 Nádorový antigen CA 125 a lidský epididymální protein 4

CA 125 je běžně se vyskytující složka epitelů mnoha tkání odvozených od coelomu (fetální coelomový epitel) včetně ženského genitálního traktu [6]. Není však standardně exprimován v epitelu ovarií. Pro diagnostiku je využíváno jeho stanovení v krevním séru [7]. Jedná se o běžně vyšetřovaný tumorový marker pro laboratorní průkaz karcinomu ovarií, kdy je jeho hodnota zvýšena nad 95 U/ml (fyziologická hodnota je nižší než 35 U/ml). Užívá se ale i pro diagnostiku dalších gynekologických malignit, jako je karcinom endometria, adenokarcinom hrdla dělohy, karcinom prsu a další negynekologické nádory [6]. Je exprimován u téměř 80 % serózních karcinomů ovarií a jeho vyšetření se provádí zejména při rodinné predispozici k onemocnění. Společně s antigenem HE4 (lidský epididymální protein 4) slouží k výpočtu tzv. ROMA (Risk of Ovarian Malignancy Algorithm) indexu, tedy odhadu rizika epiteliálního karcinomu ovarií [8].

HE4 je onkomarker, který je ve velmi vysokých koncentracích produkován již v raném stádiu onemocnění a vykazuje vysokou senzitivitu. Ve statistikách je uváděno, že v případech

rakoviny ovarií a gynekologických benigních nálezech má onkomarker HE 4 při senzitivitě 67 % až 96% specifitu [8]. Jiné zdroje uvádí, že HE4 je zvýšen u 93 % případů serózních malignit a dokonce až u 100 % endometrioidních karcinomů [9]. Podle dosavadních studií vykazuje antigen HE4 nejvyšší možnou senzitivitu pro diagnostiku karcinomů ovarií ze všech možných onkomarkerů. V kombinaci s vyšetřením CA 125 se senzitivita výrazně zvyšuje. Zajímavé je, že významnou roli ve zvýšené hladině HE4 hraje dysfunkce ledvin, proto se při vyšetření HE4 musí brát dostatečný zřetel na glomerulární filtraci. Vyšetření HE4 ale není dosud zcela standardním laboratorním krokem a v diagnostice ovariálních malignit se jedná stále o novější onkomarker [8].

2.3 Mechanismy imunitní odpovědi

Imunitní systém je důležitou složkou organismu přispívající k udržení homeostázy, tj. stálosti vnitřního prostředí organismu. Jeho schopností je rozpoznat vlastní struktury od cizích nebo nepřírodných struktur, bránit organismus proti nim a také je dlouhodobě udržet v tzv. imunologické paměti [10]. Imunitní systém chrání organismus nejen proti různým vnějším patogenům (viry, bakterie, paraziti či plísňe), ale i proti vlastním nebezpečným strukturám, jako je např. nádorové bujení. Důležitým aspektem imunitního systému je tolerance. Tolerance je myšlena vůči tělu vlastním molekulám a buňkám, ale i antigenům, které imunitnímu systému předložíme v prenatálním období [10, 11].

Rozeznáváme dva základní druhy imunitní odpovědi, vrozenou neadaptivní (také nespecifickou) odpověď, která je evolučně starší a imunitní odpověď adaptivní (specifickou), která je evolučně mladší a získává se během života jedince. Oba typy mechanismů mají dvě složky, a to složku buněčnou, tedy na obranném mechanismu se aktivně podílejí celé buňky, či humorální, která využívá tzv. solubilních molekul figurujících jako obranné látky [11].

2.3.1 Neadaptivní (vrozená) imunitní odpověď

Zcela první mechanickou bariérou proti cizorodým látkám a patogenům je kůže. Mezi jednoduché vrozené chemické bariéry pak řadíme pot, sliny, slzy a kyselinu chlorovodíkovou obsaženou v žaludečních šťávách [12].

Buňky zajišťující nespecifickou imunitní odpověď jsou především buňky schopné fagocytózy. Sem řadíme granulocyty: bazofily, eozinofily a neutrofilny a agranulární fagocytující buňky:

monocyty (diapedézou přecházejí do tkáně a mění se na makrofágy), dendritické buňky a mastocyty [10, 11].

Zařadit sem musíme i látky humorální obrany jako jsou pyrogeny (zvyšují tělní teplotu), složky komplementu (skupina sérových proteinů s opsonizačními, chemotaktickými a lyzačními vlastnostmi) nebo interferony (zajišťují antivirovou ochranu) [11].

2.3.2 Adaptivní imunitní odpověď

Adaptivní imunita se od imunity neadaptivní liší v jednom důležitém faktoru, a to je schopnost užití cílených obraných mechanismů proti specifickým chemickým strukturám – antigenům. Prezentace patogenních antigenů je zajišťována buňkami fagocytyujícími, tzv. antigen prezentujícími buňkami (APC). Ty jsou schopné přes specifické glykoproteinové struktury (tzv. MHC molekuly II. třídy) na svém povrchu vystavit části rozštěpených patogenních struktur. Tyto MHC molekuly mají na svém povrchu pouze APC buňky (nejčastěji makrofágy a dendritické buňky) a právě díky nim jsou schopné předložit buňkám adaptivní imunity části patogenních struktur [11].

Existují ale i molekuly MHC I. třídy. Tyto povrchové determinanty mají na sobě veškeré somatické buňky. Na těchto povrchových glykoproteinech prezentují buňkám adaptivní imunity části vlastních molekul. V případě vzniku chyby v buňce buňky adaptivní imunity takovou chybu zaregistrují a řadou různých mechanismů jsou schopny zasáhnout. Jedním z nejčastějších způsobů je iniciace apoptózy, tedy řízené buněčné smrti. Tak se lidský organismus brání například nádorovému bujení. MHC I. třídy se také uplatňují při transplantacích, kdy tyto molekuly od dárce musí být ve shodě s příjemcem. U MHC molekul se můžeme setkat i s označením HLA (Human Leukocyte Antigens) [11].

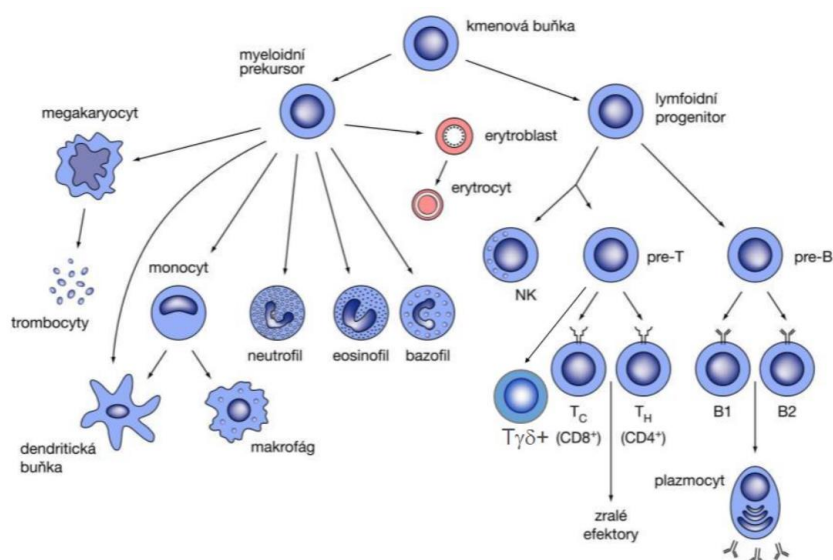
Lymfocyty

Z hlediska imunokompetentních buněk adaptivní imunity mluvíme o T-lymfocytech (zajišťují buněčnou imunitu) a B-lymfocytech (zajišťují humorální imunitu). Existuje mnoho různých mechanismů kooperace mezi těmito buňkami a ostatními somatickými buňkami. Jejich tvorba a diferenciací je vyobrazena na Obrázku 1 [10].

T-lymfocyty dělíme na cytotoxické, které rozeznávají MHC I. třídy a pomocné, které rozeznávají MHC II. třídy. Existují ale i další zvláštní skupiny T-lymfocytů. T-lymfocyty

cytotoxické likvidují buňky se vzniklými intracelulárními chybami, kdežto T-lymfocyty pomocné zprostředkovávají informaci o patogenních antigenech dalším buňkám. Mimo jiné i B-buňkám, které zajišťují humorální imunitu, tedy vznik specifických protilátek proti patogenním antigenům. B-lymfocytům produkujícím protilátky říkáme plazmatické buňky. Některé B-lymfocyty si schopnost tvořit specifické protilátky proti antigenům ponechají, těm poté říkáme paměťové buňky [10, 11].

Opomenout nesmíme zvláštní NK buňky (Natural Killers), které se podílejí na antivirové a protinádorové obraně. Rozpoznávají buňky s nízkou expresí MHC I. třídy na svém povrchu, což indikuje patologický stav takové buňky. NK buňka takové podezřelé buňky účinně likviduje [10, 11].



Obrázek 1 Schéma diference krevních buněk včetně lymfocytů [1]

2.3.3 Imunochemická reakce

Imunochemická reakce je reakce mezi antigenem a specifickou protilátkou (imunoglobulinem) za vzniku imunokomplexu. Taková reakce má původ ve specifických obraných mechanismech, které zajišťuje imunitní systém.

Antigeny

Antigeny jsou zpravidla makromolekuly, které je imunitní systém skrze své mechanismy schopen zaznamenat, identifikovat a reagovat na ně. Exoantigeny jsou takové molekuly, které pocházejí z vnějšího prostředí, nikoliv z organismu. Řadíme sem především patogenní mikroorganismy, jejich části a produkty. Autoantigeny jsou molekuly, které pocházejí ze samotného organismu, nejsou to tedy antigeny cizorodé. Řadíme sem různé produkty

biochemických reakcí a mechanismů, které jsou tvořeny ve změněné míře, nebo nejsou pro organismus běžné vůbec. Zvláštní skupinou exoantigenů jsou alergenů, tedy látky schopné vyvolat u citlivých jedinců patologickou imunitní reakci, alergii [11].

Antigenů lze využít jako biomarkerů v klinické diagnostice. Jedná se o molekuly zpravidla specificky spojené s infekcemi a jinými patologickými procesy různého druhu. Chemicky se jedná o proteiny, polysacharidy, lipidy a lipoproteiny [11].

Epitop

Imunitní mechanismy nejsou směřovány na celé molekuly antigenů. Specifita protilátek a imunitních receptorů je zaměřena na menší a konkrétní místa, tzv. epitopy, nebo také antigenní determinanty. Jedná se o specifické místo, kde dochází při interakci s vazebným místem imunoglobulinů nebo jinými receptory ke vzniku slabých nevazebných interakcí. Jeden antigen může mít epitop jen jeden, ale i velké množství [11, 13].

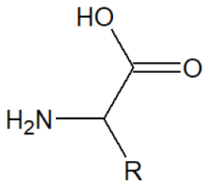
2.3.4 Imunoglobuliny

Imunoglobuliny, známé též jako protilátky, jsou proteiny. Jsou základem specifické imunitní odpovědi, a to díky jejich fascinujícím vlastnostem, co se jejich tvorby, struktury a vazebnosti týče [10, 13].

Chemická struktura imunoglobulinů

Jak již bylo zmíněno, imunoglobuliny jsou strukturně proteiny. Proteiny jsou biomakromolekulární látky tvořené menšími úseky, které se nazývají peptidy. Peptidy vznikají kondenzací L- α -aminokyselin za tvorby peptidové vazby. Aminokyseliny jsou tedy základní stavební jednotky proteinů. Jedná se o substituční deriváty karboxylových kyselin, které ve své molekule kromě karboxylové skupiny -COOH (maximálně dvě) nesou i aminoskupinu -NH₂, a to jednu nebo více (viz Obrázek 2) [14].

Aminokyseliny jsou různých druhů, dělí se dle vlastností. Existují i aminokyseliny, jež obsahují aromatické jádro nebo heterocyklus, substituenty jako hydroxyskupiny nebo aminokyseliny obsahující síru. Právě druh a počet funkčních skupin určuje chemickou reaktivitu. Běžně rozeznáváme 20 základních proteinogenních aminokyselin, ty dělíme na neesenciální (organismus je schopen jejich syntézy *de novo*) a esenciální (je nutné je přijímat s potravou) [14, 15].



Obrázek 2 Obecný vzorec α -aminokyseliny [zdroj autor, není-li uvedeno jinak]

Aminokyseliny se při fyziologickém $\text{pH} = 7,3$ vyskytují v roztoku v podobě tzv. zwitteriontů. Při tomto pH dochází k deprotonaci karboxylové skupiny a protonaci aminoskupiny. Aminokyseliny jsou tedy vnitřní soli, a právě proto mají vlastnosti solím velmi podobné. Zároveň se jedná o látky amfoterní. Velké množství aminokyselin je neutrálních, převažuje-li ale jedna z funkčních skupin, chovají se buď jako zásadité (převažuje $-\text{NH}_2$) nebo kyselé (převažuje $-\text{COOH}$) [15].

Spojením aminokyselin dochází ke vzniku tzv. peptidových řetězců. Ke vzniku peptidové (amidové) vazby dochází kondenzací karboxylové skupiny jedné aminokyseliny a aminoskupiny další aminokyseliny za odštěpení molekuly vody. V živých organismech dochází k tvorbě peptidových řetězců v procesu zvaném proteosyntéza v ribozomech. Ta se skládá z fází genové exprese, transkripce, translace a posttranslačních úprav. Právě díky složení do terciární a kvartérní struktury a posttranslačním úpravám získává protein svoji finální strukturu a vlastnosti [14, 15, 16].

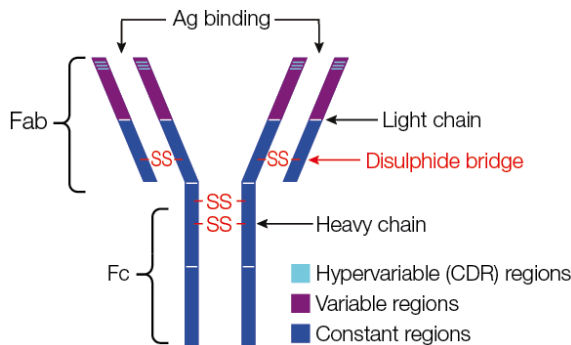
Struktura imunoglobulinů a jejich vazebné schopnosti

Struktura imunoglobulinů je komplexní a účelná. Imunoglobuliny mají v podstatě tvar písmene Y (Obrázek 3) nebo T. Jsou tvořeny dvěma těžkými (přibližně 446 aminokyselin) a dvěma lehkými peptidovými řetězci (214 aminokyselin). Těžké řetězce (angl. heavy – H) se rozdělují na pět různých typů (α , δ , ϵ , γ , μ), lehké řetězce (angl. light – L) na dva typy (χ , κ). Toto dělení je dle konstantních řetězců. Imunoglobuliny mají ale u obou druhů řetězců, tedy těžkých i lehkých, variabilní část o rozsahu 109 aminokyselin. Již primární struktura imunoglobulinu rozhoduje o povaze a účelu dané protilátky [13].

Peptidové řetězce jsou spojeny disulfidickými můstky. Na molekule imunoglobulinu můžeme rozlišit tři konce. Dvě horní ramena písmene Y jsou tzv. N-konce, jelikož zde peptidový řetězec končí volnou aminoskupinou, dolní C-konec končí volnou karboxylovou skupinou. Molekulu imunoglobulinu dělíme na tři fragmenty. Dolní fragment zahrnující C-konec je označován jako Fc. Fc fragment je tvořen dvěma těžkými řetězci spojenými disulfidickými můstky. Právě tuto

část molekuly imunoglobulinu je schopen vázat Fc receptor, který je exprimován na površích fagocytujících buněk. Ty tak dokáží fagocytovat neutralizované antigenní struktury, nebo tyto struktury cytotoxicky ničit [11, 13].

Z Fc fragmentu vychází dva fragmenty Fab končící N-koncem. Tyto fragmenty jsou tvořeny vždy jedním těžkým řetězcem a jedním lehkým řetězcem. Právě část N-konce je variabilní a zodpovídá za specifickou vazbu imunoglobulinu, tedy tzv. paratopu, na epitop antigenu [13].



Obrázek 3 Struktura imunoglobulinu [2]

Vazebná schopnost a tím i specifita k daným antigenům je dána právě variabilní částí Fab fragmentů. U imunoglobulinů sledujeme tzv. afinitu k danému antigenu, tedy sílu vazebné interakce jednoho vazebného místa protilátky s jedním vazebným místem na antigenu (epitop). U polyvalentních protilátek sledujeme i tzv. aviditu, tedy interakci imunoglobulinu s polyvalentním antigenem. V případě avidity se jedná o sumu afinit, s rostoucí afinitou pak vzrůstá i avidita [17].

Imunoglobuliny jsou tvořeny plazmatickými buňkami (aktivované B-lymfocyty). Právě jedna plazmatická buňka tvoří jeden druh protilátek s vazebnou specifitou k jednomu antigenu. Tvorba variabilních částí Fab fragmentů je v B-buňkách dána geneticky. V průběhu diferenciací B-buněk dochází v jejich DNA k různým rekombinacím v genu pro tvorbu imunoglobulinů. Po expresi takového genu a následné proteosyntéze tak vznikají protilátky s rozmanitými variabilními oblastmi [11, 13].

Dělení imunoglobulinů

Podle typu těžkého řetězce dělíme imunoglobuliny do pěti skupin. Rozeznáváme protilátky třídy IgG, IgA, IgM, IgE a IgD. Jednotlivé třídy protilátek se od sebe odlišují jak mírou

vazebných schopností, tak i jejich lokalizací a načasováním působení. Protilátky tříd IgG, IgE a IgD mají monomerní strukturu, IgA monomerní i dimerní a IgM pentamerní [13].

Hlavní třídou protilátek jsou IgG a účastní se sekundární odpovědi na průnik antigenu. Mají mnohé efektorové funkce. Kromě opsonizace či totální neutralizace antigenu jsou také například schopny aktivovat komplement. Jako jediné pronikají placentou a zaručují dlouhodobou ochranu. Protilátky třídy IgM se z časového hlediska účastní primární odpovědi na průnik antigenu. V séru nepřetrvávají dlouho. Jsou exprimovány jako specifické receptory na povrchu B-lymfocytů [11, 13]. IgA jsou třídou imunoglobulinů, které jsou ve vysoké míře na sliznicích a zajišťují tak první specifickou obranu před exoantigeny [10, 13]. Třídy IgE a IgD jsou v séru zastoupeny velmi málo. Jsou zodpovědné za uvolňování histaminu z mastocytů a bazofilů, tedy za rozvoj alergických reakcí a reakcí časně přecitlivělosti. IgE se účastní antihelmintózní obrany, IgD se vyskytují na povrchu B-lymfocytů jako B-celulární receptory [13, 18].

Polyklonální a monoklonální protilátky

Rozdíl mezi polyklonálními a monoklonálními protilátkami je hlavně ve schopnosti specificky vázat jeden daný epitop antigenu. Protilátky polyklonální jsou heterogenní směsí protilátek, které vznikají při imunizaci organismu. Směs čítá až tisíce různých druhů protilátek lišících se afinitou, specifitou vůči antigenním epitopům a biologickou funkcí. V diagnostických laboratorních metodách se běžně využívají, ačkoliv jejich charakter někdy zvyšuje nároky na validaci metody či následnou reprodukovatelnost výsledků [2, 11].

Naopak protilátky monoklonální vykazují shodné vlastnosti a jsou produkovány pouze jedním klonem B-lymfocytů. Mají schopnost vazby na jeden konkrétní typ epitopu, což zvyšuje přesnost jejich vazebných schopností [2]. Díky tzv. hybridomové technologii, která je založena na fúzi buněčné kultury nádorových (myelomových) buněk s lymfocyty izolovanými z antigenem imunizovaných myší. Dostáváme tak v podstatě nesmrtelnou hybridní buňku (hybridom) schopnou produkovat požadované monoklonální protilátky [21]. Monoklonální protilátky nachází uplatnění jak v cílené terapii, tak zejména v laboratorní diagnostice [11, 13].

2.3.5 Tvorba imunokomplexu

K tvorbě imunokomplexu při imunochemické reakci *in vitro* dochází v buď kapalném prostředí nebo v gelu (agary, hydrogely). Dále i na povrchu membrán nasycených kapalinou či na speciálním chromatografickém papíře.

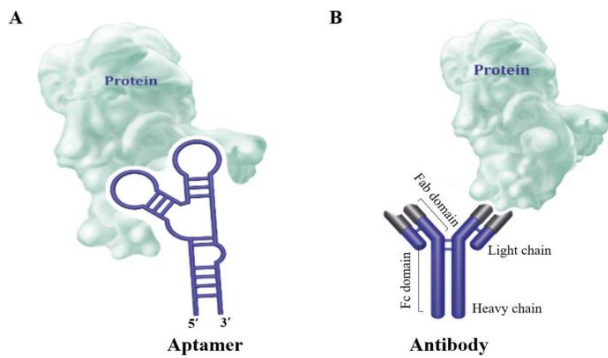
Složky vznikajícího imunokomplexu, tedy antigen a protilátka, jsou k sobě vázány prostřednictvím slabých nekovalentních vazebných interakcí. Tvorba imunokomplexu (biospecifického páru) je ovlivněna pH prostředí, teplotou (optimálně teplota 37 °C), přítomností iontů solí nebo detergentů.

Vazba antigenu a protilátky je reverzibilní. Je dána termodynamickými zákony, vznik imunokomplexu lze popsat rovnovážnou asociační konstantou K_A . Rychlost tvorby imunokomplexu vychází, stejně jako ostatní chemické reakce, z Guldberg-Waagova zákona. Sílu vazby (afinitu) je možné vyjádřit termodynamicky jako standardní chemickou afinitu rovnou záporné změně standardní Gibbsovy energie, kde R je univerzální plynová konstanta, T je termodynamická teplota a K je rovnovážná konstanta [2]:

$$\Delta G^0 = -\Delta G^0 = R \cdot T \cdot \ln K \quad (1)$$

2.4 Aptamery

Aptamery jsou strukturně oligonukleotidy, a to buď deoxyribonukleotidy (DNA) či ribonukleotidy (RNA). Jedná se o jednořetězcové molekuly se schopností selektivní vazby na vybrané cíle. Principiálně tak lze vazbu aptameru na cílovou molekulu přirovnat k vazbě protilátky na antigen. Tato vazba může mít, dle typu aptameru, velmi variabilní specifitu a rovněž afinitu. V porovnání s protilátkami jsou u aptamerů popisovány některé lepší vlastnosti. Velkou výhodou aptamerů je jejich přesná molekulární syntéza založená na technologii zvané SELEX (viz níže). Aptamery by mohly být, díky jejich vlastnostem, využity v moderních diagnostických metodách založených na specifické afinitní interakci, v analýze proteinů či jiných cílových markerů (viz schéma na Obrázku 4). [22, 23].



Obrázek 4 Schématické znázornění způsobu vazby ligandu molekulou aptameru a protilátky [3]

2.4.1 Struktura a charakteristika aptamerů

Nukleové kyseliny obecně jsou nositeli genetické informace v buňce. Buňka obsahuje řadu různých druhů nukleových kyselin a jejich derivátů [15]. Jaderná DNA obsahuje genetickou informaci pro proteosyntetické děje s přímou návazností na růst, diferenciaci, metabolismus a další děje v probíhající v buňce. Jaderná DNA, systematicky složená do chromatinu, potažmo do chromozomů, není jediná v buňce obsažená DNA. V závislosti na jejich typu (živočišné vs. rostlinné) obsahují buňky rovněž i mitochondriální či plastidovou DNA umožňující a regulující další buněčné děje [12, 16]. U všech živých organismů je genetická informace v podobě DNA předávána složitým a komplexním dějem z generace na generaci na základě své vlastní replikace. Strukturně je DNA a RNA složená z řetězce nukleotidů obsahující fosfátové estery příslušných nukleosidů (nukleová báze a pentóza). U DNA dochází ke zdvojení řetězce do podoby dvoušroubovice na základě komplementarity příslušných bází [13]. Molekuly RNA se fyziologicky uplatňují zejména, ale ne jenom, u genové exprese a následné proteosyntéze. U eukaryot rozeznáváme pět typů molekul RNA, a to například včetně mRNA (mediátorová RNA tvořící se při transkripci) či tRNA (transferová RNA přinášející při translaci jednotlivé aminokyseliny) [16].

U primární struktury DNA rozlišujeme čtyři dusíkaté báze, dvě pyrimidinové, cytosin (C) a thymin (T) a dvě purinové, adenin (A) a guanin (G) odvozené od příslušných heterocyklických molekul. Komplementarita bází v řetězci zajišťující komplexitu molekuly je dána vazbou vodíkovými můstky tvořenými mezi A a T a G a C. Sacharid (pentóza) je v tomto případě deoxyribóza [15]. RNA je strukturně velmi podobná, pouze nukleová báze thymin je vyměněna za uracil (U) a sacharid je ribóza. Běžně se RNA vyskytuje jako jednořetězcová molekula, výjimečně tvoří dvoušroubovici (duplex), je také schopná intramolekulární komplementarity a tvorby rozličných vnitřních struktur [13, 15].

Aptamery jsou oligonukleotidy, tedy kratší řetězce, o desítkách stavebních nukleotidů. Jejich vyšší struktura a s tím i úzce spjatá specifita vůči markeru (ligandu) je dána jejich 3D prostorovou strukturou v závislosti na slabých vazebných interakcích v molekule. Mezi tyto slabé vazebné interakce řadíme především strukturní komplementaritu nukleotidů, vrstvení aromatických cyklů (tzv. planární π - π stacking), van der Waalsovy interakce či elektrostatické síly a vodíkové můstky. Nejčastěji se při vazbě uplatňuje kombinace těchto sil [23].

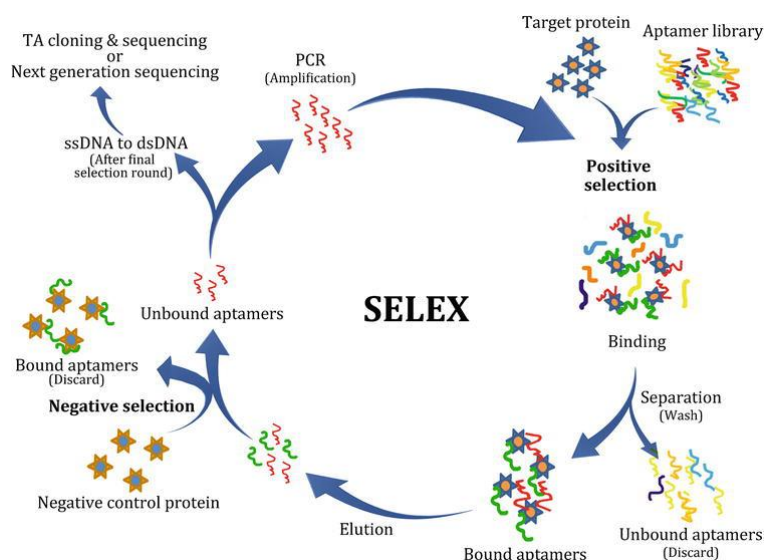
Jsou známy i přirozeně se vyskytující aptamery uplatňující se jako buněčné regulátory při expresi genů. U synteticky vytvořených aptamerů je velká výhoda flexibilní a snadné syntézy pro cílový ligand. Pro konkrétní diagnostické uplatnění lze aptamery velmi snadno modifikovat a připravit tak deriváty [22, 24].

2.4.2 Technologie SELEX

Díky technologii SELEX jsme schopni připravit *in vitro* velké množství aptamerů (jak DNA, tak RNA) s různorodou variabilní specifitou vůči ligandu. Aptamery jsou schopné velmi specifické a afinitní vazby jak malých monoatomárních ligandů v podobě iontů kovů, přes větší organické molekuly, až po strukturně komplexní makromolekuly [23].

Proces SELEXU je složen z cyklu pěti kroků (viz Obrázek 5). Postupně kroky zahrnují: navázání aptameru na ligand, oddělení nenavázaných aptamerů, uvolnění navázaných aptamerů z ligandu, amplifikace uvolněných sekvencí a poté jejich úpravy na jednořetězcové molekuly metodou PCR (polymerázová řetězová reakce) pro další cyklus SELEXU. Jako cílový ligand, který je pro následné diagnostické využití zcela identický s markerem, musí být použita vysoce purifikovaná a stabilní molekula [22, 23, 24].

Opakováním jednotlivých kroků se knihovna aptamerů stále zužuje na nejlépe vázající strukturu s dostatečnou specifitou a afinitou k ligandu [22]. Vstupující oligonukleotidy jsou připraveny synteticky rovněž v pěti krocích [14]. Vstupující molekula RNA aptameru musí být před prvním krokem SELEXu *in vitro* transkripce přepsána z DNA. Knihovny aptamerů lze pak různě modifikovat a připravovat deriváty konjugací s dalšími molekulami. Proto lze velmi efektivně využít aptamerů nejen v diagnostice, ale i terapii [23].



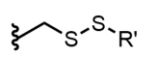

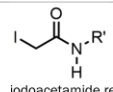
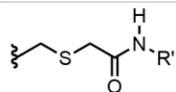


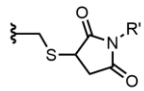

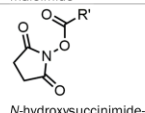
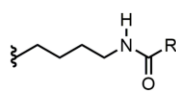

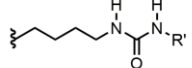

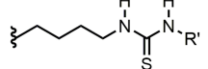


Obrázek 5 Mechanismus technologie SELEX [4]

Využití aptamerů připravených technologií SELEX *in vitro* v diagnostice a terapii je vhodné rovněž z etického hlediska. Při syntéze se nevyužívají živá zvířata, jako při přípravě *in vivo* polyklonálních nebo monoklonálních protilátek. Laboratorní zvířata musí být mnohdy kvůli izolaci protilátek usmrcena, zejména v případě využití malých laboratorních zvířat (myš, potkan, králík) [11]. Aptamery jsou rovněž výhodnější vzhledem k jejich velikosti, snadné manipulaci, stabilitě a při terapeutických aplikacích jsou rovněž velmi rychle a snadno odbouratelné, proto jsou vhodné i pro využití u zobrazovacích metod [23].

2.5 Biokonjugační reakce

Mezi tzv. biokonjugace se řadí velké množství reakcí, jejichž cílem je spojit dvě biomolekuly chemickou vazbou. Konjugovat lze řadu organických látek pocházejících z živých organismů, např. proteiny, nukleové kyseliny, ale i sacharidy. Biomolekuly se konjugují s jinými biomolekulami, dalšími organickými látkami s různými vlastnostmi, nebo i se syntetickými polymery. Možnosti konjugace jsou buď přímé spojení dvou molekul či přes spojovací můstek. Možných mechanismů biokonjugací je celá řada. Zvolený mechanismus se odvíjí od přítomné aminokyseliny (př. lysin, cystein, tyrosin), či jiné stavební struktury a její specifické funkční skupiny (př. N-konce, C-konce, thiol, cykly, heterocykly atd.). Z těch jednodušších se sem řadí reakce na primárních aminoskupinách s estery, fluoridy kyselin (substituce), isokyanáty a isothiokyanáty (adice). Dále reakce na zmíněných thiolových skupinách či dokonce diazotace a další složitější specifické reakce odvíjející se od přítomných funkčních skupin (viz Obrázek 6) [25].

Residue	Reagent	Product
 cysteine	 disulfide	
 cysteine	 iodoacetamide reagent	
 cysteine	 maleimide	
 lysine	 N-hydroxysuccinimide-activated ester	
 lysine	$O=C=N-R'$ isocyanate	
 lysine	$S=C=N-R'$ isothiocyanate	

Obrázek 6 Příklady některých biokonjugačních reakcí prostřednictvím uvedených funkčních skupin [5]

U výše zmíněných reakcí je problém se selektivitou a účinností, a proto se někdy využívá tzv. bioorthogonálních reakcí a velmi moderní a efektivní tzv. „click“ chemie. Strategií je nejprve na biomolekulu zavést nepůvodní funkční skupinu a následně provést biokonjugační reakci. Mezi tyto reakce se řadí modifikace ketonů a aldehydů, Huisgenova cykloadice azidů nebo Staudingerova ligace s organickými azidy [26].

Využití biokonjugací je opravdu široké, a to od sledování intracelulárních dějů a funkcí proteinů jejich značením, přes cílené distribuce léčiv, po specifickou detekci biomarkerů v diagnostice po biokonjugaci s protilátkami. Pro poslední zmíněnou aplikaci jsem využíval biokonjugační reakce imunoglobulinů s aktivovaným esterem N-hydroxysukcinimidu a biotinu (NHS-biotin ester) a biotin-hydrazid. Jako organické rozpouštědlo pro biotinylace se užívá dimethylsulfoxid [14, 15].

NHS-biotin ester se amidovou vazbou váže na primární aminoskupinu N-konce proteinů imunoglobulinů. Vedlejším produktem je volný N-hydroxysukcinimid. Druhým využitým způsobem konjugace biotinu na molekuly protilátek je vazba biotin-hydrazidu. Zde se využívá glykosylace (tedy přítomnost sacharidu) Fc části molekuly protilátek. Hydroxylové skupiny molekuly sacharidu lze selektivně oxidovat například jodistanem sodným za tvorby vysoce reaktivní aldehydové skupiny. Dalším následujícím reakčním krokem je adice dusíkatého

nukleofilu (biotin-hydrazid) na aldehyd za vzniku tzv. Schiffovy báze, a tedy připojení biotinu k protilátce [15].

Biotin má velmi silnou vazbu na streptavidin (bakteriální protein) a avidin (vaječný protein) [14]. Toho lze využít v detekčním systému za využití konjugátu streptavidinu s křenovou peroxidázou (enzym), která se používá jako enzymatická značka protilátek pro kolorimetrickou či chemiluminiscenční detekci antigenu (viz 2.7 Blotové techniky) [2].

2.6 SDS-PAGE elektroforéza

Metoda SDS-PAGE (elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsírany sodného) je jedna z nejvíce používaných typů elektroforetických metod sloužících k separaci proteinů (či peptidických řetězců) na základě jejich molekulové hmotnosti. Molekulová hmotnost (udávaná v jednotkách Dalton – Da) není ovšem jediným faktorem, na kterém separace závisí. Do rychlosti migrace (relativní mobilita) molekuly v gelu se částečně započítává i její stupeň denaturace. V případě proteinu izolovaného z organismu se projevují i posttranslační modifikace, v případě modifikovaných rekombinantních proteinů či syntetizovaných peptidů nebo konjugovaných proteinů se projevují i další substituenty na molekule. Na Obrázku 7 lze vidět kompletní elektroforetickou aparaturu.



Obrázek 7 Zapojená elektroforetická vana s vloženým gelem (Bio-Rad, USA) [zdroj autor, není-li uvedeno jinak]

Jak už bylo zmíněno, SDS-PAGE je založena na separaci proteinů v gelu. Jedná se konkrétně o polymer vzniklý z monomerů akrylamidu a N, N'-metylenbisakrylamidu. Polymerní síť gelu se tvoří radikálovou polymerací za iniciace persíranu amonného. Jako stabilizační látka

radikálů se přidává TEMED (Tetramethylethylendiamin). Metoda SDS-PAGE je diskontinuální, v porovnání s ostatními elektroforetickými metodami jsou zde využívány dva různé gely, dělicí (tvoří více jak dvě třetiny migrační zóny, porozitu ovlivňujeme koncentrací gelu v závislosti na predikované M_r dělených proteinů) a zaostřovací gel (vrchní část migrační zóny, zde se pipetují vzorky, má větší póry). Důležitou součástí SDS-PAGE je prostředí, ve kterém separace probíhá. Pro použití rozlišujeme tři druhy pufrů, a to pro přípravu dělicího gelu (pH=8,8), pro přípravu zaostřovacího gelu (pH=6,8) a tzv. elektrodový Tris - glycinový pufr (pH=8,3-8,6). U SDS-PAGE zajišťuje kombinace více faktorů, jako je například rozdílnost pH pufrů, že zvýšená hustota zón dělených vzorků proteinů vstupuje do dělicího gelu v podobě úzkých proužků, které se snáze separují a mají tak vyšší stupeň rozlišení.

Důležitou látkou v SDS-PAGE elektroforéze je dodecylsírán sodný. Právě tento aniontový detergent se váže na povrch dělených proteinů, denaturuje je, dodává jim podobný tvar a sjednocuje náboj. Díky úměrné délce komplexu SDS – bílkovina k molekulové hmotnosti vzorku, shodnému poměru nábojů na jednotku hmoty, a tvaru, se proteiny dělí na principu molekulového síta, kdy menší molekuly migrují v gelu dál než větší molekuly. Rozdělené proteiny na základě jejich molekulové hmotnosti pak v gelu detegujeme. Gel je pro detekci barven nejčastěji pomocí roztoku Coomassie Brilliant Blue nebo roztokem amoniakálního stříbra. Existují ale i další způsoby barvení gelu. Pro odečet molekulových hmotností vzorku se používá standard molekulových hmotností, který je směsí proteinů o známé molekulové hmotnosti, dělí se společně se vzorky, a slouží pro kalibraci každého gelu [2, 19].

2.7 Blotové techniky

Jedná se o skupinu bioanalytických technik, kdy jejich společným jmenovatelem je přenos biomolekul z kapalně fáze na fázi pevnou (membrány). Blotové metody jako Southern blotting (DNA), Northern blotting (RNA) či Western blotting (proteiny) se využívají k přenosu biomolekul po jejich separaci 1D elektroforézou, nebo 2D elektroforézou, která je kombinací izoelektrické fokusace a SDS-PAGE.

Typů přenosu biomolekul na membránu je více, lze tak docílit například pouhou difúzí látek díky savosti materiálu, elektricky pomocí procházejícího proudu nebo pouhou filtrací (vakuovou). Posledního zmíněného způsobu přenosu využívá metoda zvaná dot-blot.

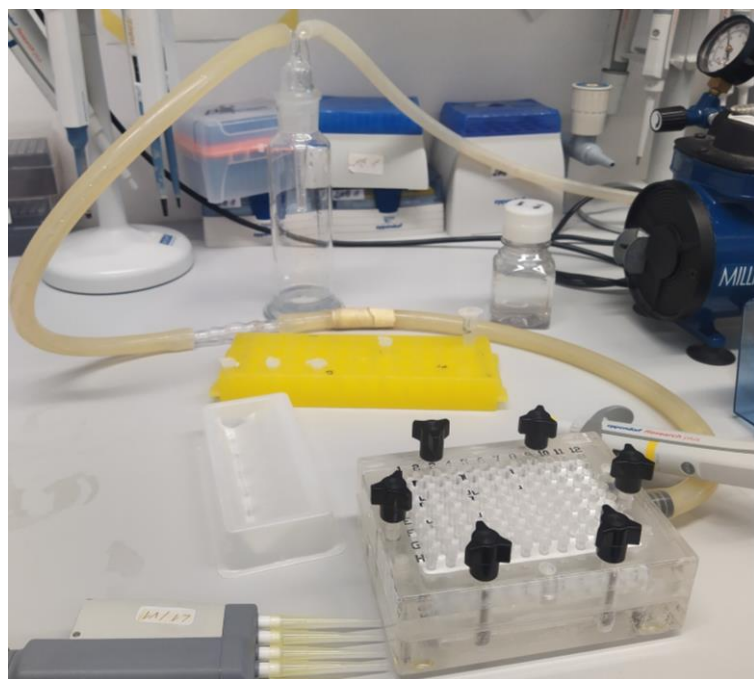
Biomolekuly lze po přenosu z kapalného prostředí na membránu vizualizovat. Zde se využívá reakce se specifickou protilátkou (nukleovou kyselinu, protein) značenou buď enzymem,

fluorochromem či radioizotopem. Dále lze využít vizualizaci tzv. metodou nepřímé detekce. Ta probíhá tak, že se primární specifická protilátka naváže na fixovaný antigen na membráně a sekundární značená protilátka se naváže na protilátku primární. Vzniká tak tzv. sandwich: antigen, primární protilátka, značená sekundární protilátka.

Intenzita získaného signálu (kolorimetricky, chemiluminiscenčně, fluorescenčně, radioizotopově) se poté odvíjí od množství navázaných protilátek. Tak lze získat jak kvalitativní informaci o antigenu, tak i kvantitativní informaci díky míře intenzity signálu (např. intenzita zabarvení) [2].

2.7.1 Dot-blot

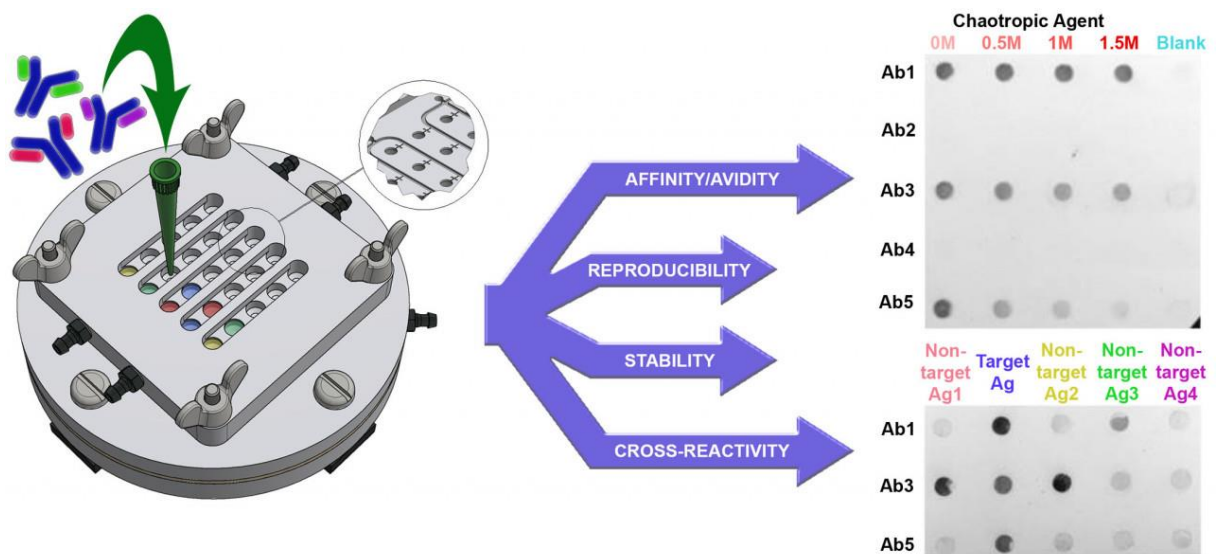
Je to metoda, kdy antigen je sorbován na povrch membrány v podobě teček (dot) o definovaném průměru. Zde se využívá vakuové filtrace ve speciální aparatuře, kdy kapalná fáze projde, ale antigen se uchytil na membráně. Průchod látek ovlivňuje porozita membrány. Složená aparatura s vývěvou viz Obrázek 8. Metoda je hojně uplatněna v klinické praxi (alergologie, sérologii, diagnostice autoimunitních onemocnění), ale i ve výzkumu. Uspořádání lze i obrátit tak, že na membráně je předem navázána specifická protilátka k průkazu antigenu ve vzorcích. Vizualizace a odečet signálu probíhá stejně, jako u ostatních blotových technik [2].



Obrázek 8 Zapojená dot-blot aparatura [zdroj autor, není-li uvedeno jinak]

2.7.2 Affiblot

Jedná se v podstatě o dot-blotu velmi podobnou techniku, s tím, že aparatura má v sobě kanálky umožňující boční odvádění kapaliny z membrány. Díky tomu s ní lze provést test na afinitu Ab vůči Ag, tedy v podstatě vazebnou sílu Fab fragmentů protilátky vůči epitopu antigenu (zároveň i aviditu). Všechny kroky analýzy lze provést v důmyslně konstruované aparatuře bez toho, aby se musela rozdělovat a membrána vyjímat. To je uzpůsobeno díky systému bočních odvodních kanálků, kam lze připojit vakuum. Důležité je zmínit, že Affiblot je nově patentovaná metoda vědců ze skupiny imunochemie na Katedře biologických a biochemických věd FChT UPCE a Ústavu analytické chemie AVČR v Brně [20].



Obrázek 9 Schéma aparatury Affiblot [6]

3 METODOLOGIE

Nejprve bylo nutné se naučit pracovat s veškerými používanými technikami, seznámit se s laboratorní (sklad chemikálií, automatické pipety a pH metry, příprava pufrů), správnou laboratorní praxí v biochemické laboratoři a rovněž se vybavit nezbytnými teoretickými poznatky. Poté jsem zahájil samotnou laboratorní práci na mé SOČ.

3.1 Využití SDS-PAGE elektroforézy pro studium Mr protilátek a antigenu

Zcela na začátku mé práce bylo nutné ověřit čistotu používaných protilátek a antigenu a rovněž ověřit jejich molekulové hmotnosti. K tomu byla využita SDS-PAGE elektroforéza. Nejprve bylo nutné připravit 10% dělicí gel a 5% zaostřovací gel. Gely byly připraveny mezi dvě elektroforetická skla 0,75 mm dle Tabulky 1 níže.

Tabulka 1 Roztoky pro přípravu SDS-PAGE

	5% zaostřovací gel [ml]	10% dělicí gel [ml]
Destilovaná voda	1,4	2,0
Roztok A 30% směs akrylamidu bisakrylamidu	0,33	1,65
Roztok B 1,5 M Tris-HCl pufr pH 8,8	-	1,25
Roztok C 1,0 M Tris-HCl pufr pH 6,8	0,25	-
Roztok D 10% roztok SDS	0,02	0,05
Roztok E 10% roztok persíranu amonného	0,02	0,05
TEMED	0,002	0,002

Příprava gelů byla prováděna ve zkumavce. Je nutné pracovat v digestoři a s patřičnou ochranou, protože některé látky pro přípravu gelu jsou toxické. Po připravení směsi byl objem rychle pipetován mezi dvě lihem očištěná a fixovaná skla a obě vrstvy gelů byly nechány polymerizovat.

Následovala příprava vzorků pro elektroforetické dělení. Bylo připraveno šest vzorků primárních protilátek o koncentraci 2 $\mu\text{g}/10 \mu\text{l}$ zředěných v PBS pufru a byly pipetovány do jamek v již připraveném gelu. Jedná se o monoklonální myší protilátky anti-HE4 IgG od firmy HyTest (Finsko) označené podle klonů 2B13 a 3C24. Byly připraveny dva vzorky těchto dvou

protilátek (dle dostupných balení). Rovněž byly připraveny dva vzorky dvou protilátek označovaných jako WFDC2 od firmy Sino Biological (Čína), jeden monoklonální myší, druhý polyklonální králičí. O stejné koncentraci byl připraven i vzorek antigenu rekombinantního proteinu HE4 od firmy Sino Biological (Čína). Pro separaci byly vzorky míchány s komerčním roztokem pro separaci, obsahujícím bromfenolovou modř pro indikace separace. Vzorky byly společně s molekulovým markerem (standardem o objemu 7 μ l) pipetovány do jamek již připraveného gelu promytého v elektroforetické vaně elektrodovým pufrem. Aparatura byla doplněna elektrodovým pufrem, uzavřena a zapojena. Elektroforéza probíhala přibližně hodinu, dokud bromfenolová modř nedoputovala cca 1 cm od spodního okraje skel. Separace probíhala při konstantním napětí 180 V a proudu 30 mA/gel.

Po ukončení elektroforézy byl gel z aparatury vyjmut, propláchnut, umístěn na noc do fixačního roztoku a následně obarven roztokem amoniakálního stříbra. Po fixaci byl gel 30 minut rehydratován v destilované vodě, následně 30 minut inkubace v 10% roztoku glutaraldehydu. Poté byl gel opakovaně promyt destilovanou vodou a následovalo 15 minut inkubace s roztokem amoniakálního stříbra. Ten je připraven bezprostředně před použitím titrací směsí 21 ml destilované vody, 1,4 ml vodného roztoku amoniaku a 239 μ l 9 M hydroxidu sodného 20% roztokem dusičnanu stříbrného do světle hnědého zbarvení roztoku a zákalu. Po oplachu gelu po inkubaci následovala aplikace vyvolávacího roztoku (směs 0,05% kyseliny citrónové a 0,04% formaldehydu). Nakonec bylo barvení ukončeno slitím vyvolávacího roztoku a přidáním ustalovacího roztoku (5% kyselina octová). Po obarvení byl gel vyfocen na denzitometrické stanici GeneSys firmy Syngene (Velká Británie).

3.2 Využití metody dot-blot pro ověření vazebné schopnosti protilátek a kalibraci množství antigenu

Metodou dot-blot byla provedena kalibrace množství HE4 detekované na Affiblotu 2.1 a 3.2 s chemiluminiscenční detekcí s využitím ClarityTM WesternECL Substrate (Bio-Rad, USA). Používaná aparatura byla ve všech případech DHM 96 unit (Scie-Plas, Cambridge, UK). Kalibrace posloužila k optimalizaci množství antigenu HE4 pro experimentální měření afinity protilátek vůči antigenu. Byly provedeny tři experimenty s primárními protilátkami anti-HE4 2B13 a 3C24 s rostoucí koncentrací antigenu naneseného na membránu, konkrétně 1 ng, 10 ng, 50 ng a konečně 100 ng na jamku. Poté byl proveden ještě jeden srovnávací experiment jak s protilátkami anti-HE4 2B13 a 3C24 tak monoklonálními a polyklonálními anti-HE4 protilátkami WFDC2.

Postup při dot-blotu byl u všech experimentů analogický, u čtvrtého a posledního se jen lišily aplikované primární protilátky, jak je zmíněno výše. Dot-blot byl proveden v tzv. sandwichovém uspořádání, kdy je nejprve na membránu nanesen sorpcí antigen, poté je přidána specifická primární protilátka a následně je na primární protilátku navázána sekundární protilátka se specifitou proti primární protilátce (anti-IgG) značená enzymem křenovou peroxidázou (HRP). Ten v posledním kroku katalyzuje přeměnu přidaného substrátu buď na barevný produkt nebo produkt chemiluminiscenční, v závislosti na typu použitého substrátového roztoku. Já používal sekundární protilátky anti-IgG od firmy Sigma-Aldrich (USA) buď tzv. se specifitou proti králičím (produkované v koze) nebo proti myším (produkované v králíkovi), dle použité primární protilátky.

Vlastní postup začíná smočením polyvinyliden difluoridové (PVDF) membrány v methanolu (v případě nitrocelulóзовé membrány (NC) v PBS pufru), následně se sestřižená membrána vkládá do blotovací aparatury, která je uzavřena. Poté následovala ekvilibrace membrány pomocí PBS-T pufru, který se pipetuje do jednotlivých jamek po 100 μ l. Dávkování probíhá pod tlakem, čímž dochází k rychlému průtoku kapaliny přes vloženou membránu. Dalším krokem je nanesení vzorků v požadované koncentraci a uspořádání znovu o objemu 100 μ l na jamku a o koncentraci kolem 3 μ g antigenu. Jako negativní kontroly (blank) byl použit pro protilátky nespecifický protein, hovězí sérový albumin (BSA). Vedle toho byl dávkován i roztok fosfátového pufru. Poté bylo provedeno jedno promytí 100 μ l PBS-T pufrům v místech, kde byly aplikovány vzorky. Následně byla membrána vyjmuta z aparatury, rozstříhána na čtverce s odpovídajícími jamkami (viz výsledky), umístěna do dělené Petriho misky a membrána byla 1 hodinu blokována roztokem 5% BSA v PBS-T pufru. Po inkubaci byla membrána promyta 3x 1 ml PBS-T pufru. Aplikace primárních protilátek je dalším krokem, kdy protilátky anti-HE4 3C24 a 2B13 byly v prvních třech kalibracích ředěny v poměrech 1:1000 a 1:3000 25% roztokem BSA v PBS-T. Ve čtvrtém experimentu byly ředěny již pouze v poměru 1:1000 a protilátky anti-HE4 WFDC2 byly aplikovány ve stejném ředění. Po hodinové inkubaci s primárními protilátkami následovalo znovu promytí membrány PBS-T pufrům a aplikace sekundárních protilátek značených HRP (anti-IgG^{HRP}). Membrány byly znovu inkubovány hodinu na třepačce. Poté nakonec následovalo poslední promytí PBS-T pufrům a aplikace substrátového roztoku Clarity WB ECL substrate pro chemiluminiscenční detekci a vyfocení na denzitometrické stanici ChemiDoc XRS Bio-rad (USA).

3.3 Využití metody Affiblot pro testování afinity protilátek k antigenu

Po zjištění optimální koncentrace antigenu HE4 na jamku tj. 25 ng jsem zahájil experimenty s testováním vazebné schopnosti / afinity vybraných protilátek anti-HE4 2B13 a 3C24 od firmy HyTest vůči výše zmíněnému antigenu.

Experimenty byly prováděny třikrát, z toho dvakrát na aparatuře Affiblot 2.1 a jednou na aparatuře Affiblot 3.2. Postup je v podstatě analogický s kroky při metodě dot-blot. Používané roztoky se neliší. Hlavním rozdílem je, že v případě experimentů prováděných v aparatuře Affiblot nedochází k vyjmutí membrány z aparatury po aplikaci vzorků, nýbrž všechny kroky se provádí v zapojené aparatuře. Oproti tomu u dot-blotu dochází v aparatuře pouze k imobilizaci antigenu a promytí, všechny ostatní kroky se provádí na membráně po jejím vyjmutí z aparatury. Speciálním krokem, který je hlavním parametrem pro ověření afinity je přidání tzv. chaotropního činidla, a to thiokyanatanu amonného (NH_4SCN). Úloha chaotropního činidla spočívá v narušení vazby mezi protilátkou a antigenem. Čím větší je koncentrace činidla, tím snáz narušuje vazbu. Naopak čím silnější je vazba protilátky k antigenu, a tedy afinita, tím je změna intenzity signálu při stoupající koncentraci činidla menší.

Thiokyanatan amonný byl přidán po inkubaci s primárními protilátkami a promytí. Pro tento krok je uzpůsobena aparatura. Důležité je otočit víko aparatury kvůli pipetování činidla. Činidlo se nechalo působit cca 5 minut a poté se tzv. bočním vakuem (nikoliv spodním, jako u dot-blotu) odsálo z membrány a následovalo promytí PBS-T. Poté se přidal konjugát sekundárních protilátek s HRP a postupovalo se jako při dot-blotu.

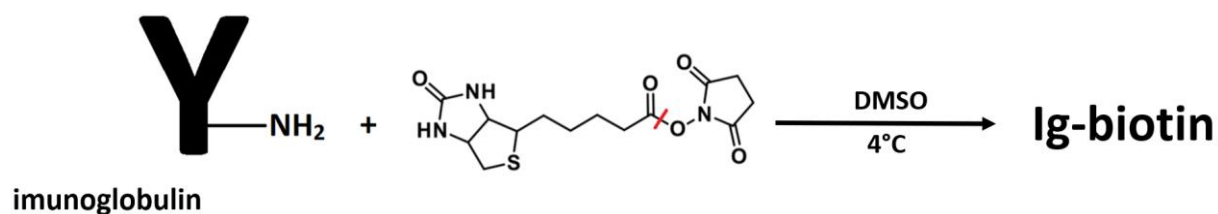
3.4 Biokonjugace protilátek s biotinem

Jelikož používané komerční anti-HE4 protilátky nejsou konjugované s biotinem, bylo nutné je s biotinem konjugovat v laboratoři před jejich použitím. Tyto biotinylované protilátky poté posloužily pro určení optimální koncentrační řady detekčního systému streptavidin-HRP. To bylo nutné pro pozdější stanovení vázaných komerčních aptamerů, které jsou komerčně konjugované s biotinem. Jak je uvedeno výše, biotin má enormně silnou vazbu na protein streptavidin, a proto se detekční systém streptavidin konjugovaný s křenovou peroxidázou efektivně využívá jako náhrada za tzv. nepřímé sandwichové uspořádání, kdy je na antigen vázána primární protilátka a poté sekundární značená protilátka.

Celkově jsem prováděl tři biotinylace a to dvakrát mechanismem vzniku amidové vazby pomocí činidla NHS-biotinu (aktivovaný ester, viz Obrázek 9) a jednou pomocí adice dusíkatého nukleofilu na aldehyd za vzniku Schiffovy báze pomocí činidla biotin-hydrazid (viz Obrázek 10), kde nejprve byly hydroxy skupiny glykosylovaných protilátek oxidací převedeny na aldehydové skupiny. Biotinyloval jsem oboje užívané protilátky anti-HE4 2B13 a 3C24.

3.4.1 Biotinylace s využitím NHS-biotinu

Cílem bylo připravit přibližně 50 µg biotinylovaných protilátek. Bylo tedy odebráno 50 µg původních anti-HE4 protilátek (2B13 i 3C24). Objem byl doplněn do 250 µl 0,1 M fosfátovým pufrům o pH 7. K připravenému roztoku bylo přidáno 50 µl roztoku NHS-biotinu v dimethylsulfoxidu (o koncentraci 1 mg/ml) a směs byla inkubována přes noc při 4 °C na rotátoru. Poté bylo přidáno 15 µl ethanolaminu, 10 min inkubováno, kvůli blokaci reaktivních skupin. Vzniklý produkt byl připraven pro použití. Úspěšnost biotinylace byla ověřena pomocí SDS-PAGE elektroforézy a metodou dot-blot při následných kalibracích koncentrační řady streptavidinu-HRP. Byla tedy ověřena reaktivita se streptavidinem, která potvrzuje biotinylací.

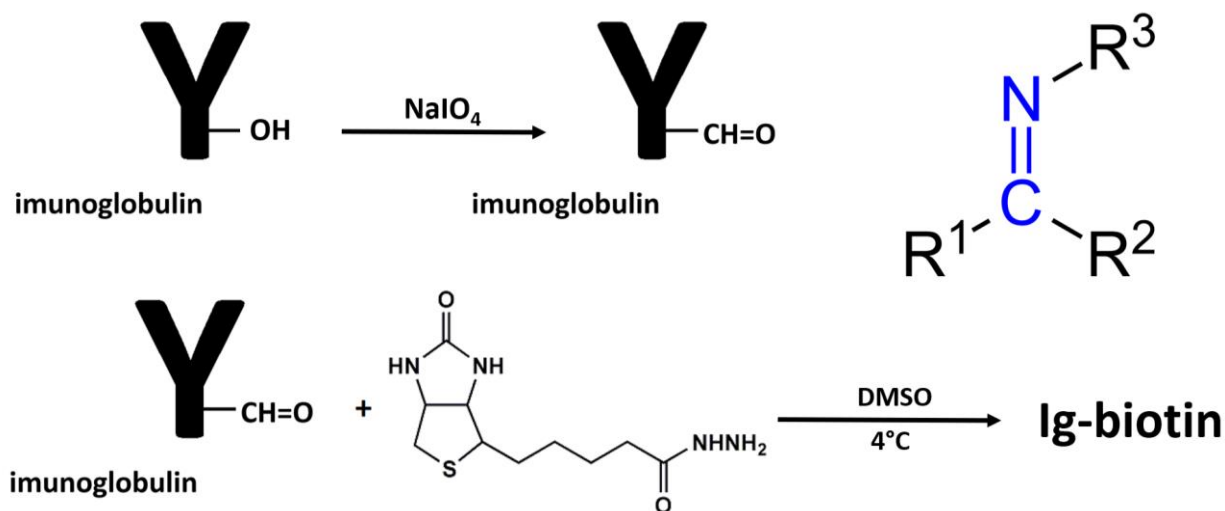


Obrázek 10 Reakční schéma biotinylace NHS-biotinem [7] upraveno

3.4.2 Biotinylace s využitím biotin-hydrazidu

Bylo znovu odebráno 50 µg anti-HE4 protilátek (2B13 i 3C24) a objem doplněn na 250 µl 0,02 M jodistanem sodným jakožto oxidačním činidlem. Inkubovalo se 30 minut ve tmě na rotátoru. Poté byla oxidace zastavena přidávkem 2,5 µl ethylenglykolu. Následně došlo k odsolení (zbavení se jodistanu sodného) na komerčních tzv. amicon centrifugačních kolonkách dle postupu výrobce. Po odsolení byl objem doplněn na 250 µl 0,1 M fosfátovým pufrům o pH 7. Nakonec byl přidán roztok biotin-hydrazidu v dimethylsulfoxidu (koncentrace 1 mg/ml) a směs byla inkubována přes noc při 4 °C na rotátoru. Úspěšnost byla znovu ověřena SDS-PAGE

elektroforézou a metodou dot-blot při následných kalibracích koncentrační řady streptavidinu-HRP.



Obrázek 11 Reakční schéma biotinylace biotin-hydrazidem [8] upraveno, doplněno o vzorec obecné Schiffovy báze (imin) [9]

3.5 Testování koncentračního rozmezí streptavidin-HRP

Po biotinylaci protilátek bylo důležitým krokem provést kalibraci koncentrací detekčního systému streptavidin-HRP. Zjištění optimální koncentrace poskytující dostatečný signál, bylo základním krokem pro následné testy s aptamery, které jsou rovněž biotinylované.

Celkově bylo provedeno šest kalibračních dot-blotů pro zjištění optimální koncentrace streptavidin-HRP. První dva dot-bloty byly provedeny pro oboje anti-HE4 protilátky (3C24 a 2B13) biotinylované NHS-biotinem. Dot-blot analýza byla provedena standardním způsobem dle používaného postupu (viz kapitola 3.2) s detekčním systémem vazba primární Ab-biotin – streptavidin-HRP (viz kapitola 3.4). Vysoce afinitní vazba značeného streptavidinu na biotin v této detekci nahrazuje značenou sekundární protilátku. Důležité je zdůraznit, že primární biotinylované protilátky byly na membráně sorbovány mechanicky přímo na povrch PVDF membrány, tedy nebylo použito antigenu HE4. Testovaná koncentrační řada streptavidin-HRP byla 1:1000, 1:5000, 1:10000 a 1:15000. Kromě jamky obsahující testovanou primární protilátku, dvou jamek obsahujících negativní kontroly (3 μg BSA/ml PBS-T a 10 mM fosfátový pufr o pH=7,3) byly do čtvrté jamky dákovány komerční biotinylované protilátky anti-ApoE jako pozitivní kontrola. Jejich biotinylace je garantována výrobcem a jsou kontrolou, že systém streptavidin-HRP je funkční.

Další použitou koncentrační řadou v druhém experimentu byla ředění 1:250, 1:500, 1:1000 a 1:5000. Provedení bylo shodné, jako u předchozích a byly tedy znovu paralelně testovány oboje používané protilátky. Ve všech čtyřech analýzách byla užita kolorimetrická detekce pomocí substrátu chlornaftolu (Opti-4CN™ kit, Bio-Rad).

V dalších dvou experimentech byly testovány nejdříve protilátky 3C24 biotinylované v tomto případě již oběma mechanismy (NHS-biotin a biotin-hydrazid). Poté byly analogicky testovány protilátky 2B13. Uspořádání experimentu bylo v tomto případě včetně dávkování antigenu HE4 antigenu na membránu. Pozitivní kontrola anti-ApoE protilátek již nebyla použita. Testovaná koncentrační řada streptavidin-HRP byla ředěna 1:500, 1:1000 a 1:3000. Použita byla chemiluminiscenční detekce pomocí kitu Clarity™ WesternECL Substrate (Bio-Rad, USA).

3.6 Kalibrace biotinylovaných anti-HE4 protilátek

Na nové aparatuře Affiblotu 3.1 byla provedena kalibrace množství antigenu HE4, a to 10, 50, 100, 200 a 500 ng. Použity byly NHS-biotinem biotinylované anti-HE4 protilátky 2B13 a 3C24 v ředění 1:1000. Jako detekční systém byl aplikován streptavidin-HRP ve dvou ředěních, 1:250 a 1:500, nakonec byla využita chemiluminiscenční detekce pomocí kitu Clarity™ WesternECL Substrate (Bio-Rad, USA).

Postup byl analogický jako u klasického dot-blotu. Kroky byly prováděny ve výše zmíněné aparatuře Affiblot 3.1 vytvořené 3D tiskem. Nutné tedy nebylo po sorpci antigenu HE4 membránu vyndat, vysušit a nechat blokovat rozstříhanou, nýbrž veškeré další kroky (blokace, aplikace primární protilátky a aplikace sekundární protilátky) proběhly v zapojené aparatuře díky její konstrukci tak jak je zmíněno výše. Jako negativní kontroly byly použity oba typy protilátek se streptavidin-HRP ve zředění 1:500 bez sorbovaného antigenu HE4.

3.7 Testování vazebné schopnosti aptamerů

Metodou dot-blot v uspořádání antigen – biotinylovaný anti-HE4 DNA aptamer (CTApt-M-582, Creative Biolabs) – streptavidin-HRP, byla ověřena vazebná schopnost používaných anti-HE4 aptamerů vůči cílovému antigenu HE4. V prvním kroku dot-blot analýzy byly na membránu sorbovány 3 µg proteinu HE4, pro negativní kontroly byly použity 3 µg BSA a 10 mM fosfátový pufr. Dále byla provedena blokace pomocí roztoku 5% BSA v PBS-T pufru. Následovala aplikace anti-HE4 aptamerů. Ze zásobního roztoku aptamerů o koncentraci 49 nmol/ml bylo provedeno trojí ředění a to 1:1000, 1:3000 a 1:5000 pufrem doporučeným

výrobcem (25 mM Tris pufru, 192 mM glycinu a 5 mM KH_2PO_4). Po hodinové inkubaci s aptamery bylo provedeno krátké trojnásobné promytí PBS-T a dlouhé trojnásobné promytí s inkubací 5 minut na třepačce, rovněž roztokem PBS-T. Nakonec byl aplikován streptavidin-HRP v určeném ředění dle výsledků předešlých experimentů 1:500. Po hodinové inkubaci se streptavidin-HRP bylo opět provedeno promytí stejně jako po inkubaci s aptamery. Nakonec byl na membránu aplikován používaný chemiluminiscenční substrát Clarity™ WesternECL Substrate s inkubací 5 minut. Po slití substrátu bylo provedeno vyhodnocení membrán na stanici Chemidoc XRS (Bio-rad, USA).

Po prvním experimentu, kde nám vzorky neposkytly žádný signál, jsem se rozhodl analýzu zopakovat. Zvolil jsem stejné uspořádání experimentu včetně všech kroků (viz Kapitola 3.7). Bylo ale upraveno ředění anti-HE4 aptamerů. Ze zásobního roztoku o koncentraci 49 nmol/ml byla připravena ředění aptamerů 1:500, 1:1000 a 1:3000. Nižší ředění aptamerů by mělo ukázat, jestli nejsme s jejich koncentrací pod limitem detekce. Koncentrace streptavidinu-HRP 1:500 byla zachována, rovněž chemiluminiscenční detekce.

3.8 Porovnání vazebné schopnosti anti-HE4 aptamerů a biotinylovaných anti-HE4 protilátek

Pro porovnání anti-HE4 aptamerů a připravených biotinylovaných anti-HE4 protilátek byla provedena dot-blot analýza. Nejprve byly tedy na membráně přímo sorbovány biotinylované protilátky 3C24 a 2B13 a rovněž i užívané anti-HE4 aptamery. Koncentrace protilátek na membráně byla 1 μg na jamku. Aptamery byly aplikovány v ředění 1 μl /100 μl pufru ze zásobního roztoku o koncentraci 49 nmol/ml. Po dávkování a krátkém trojnásobném promytí PBS-T a trojnásobném promytí s 5minutovou inkubací na třepačce byl aplikován streptavidin-HRP. Na tři membrány bylo použito ředění streptavidin-HRP 1:100, 1:250 a 1:500. Po hodinové inkubaci a promytí jako u předchozího kroku byl na pět minut přidán substrát pro chemiluminiscenční detekci Clarity™ WesternECL Substrate a provedeno vyhodnocení membrán na stanici Chemidoc XRS.

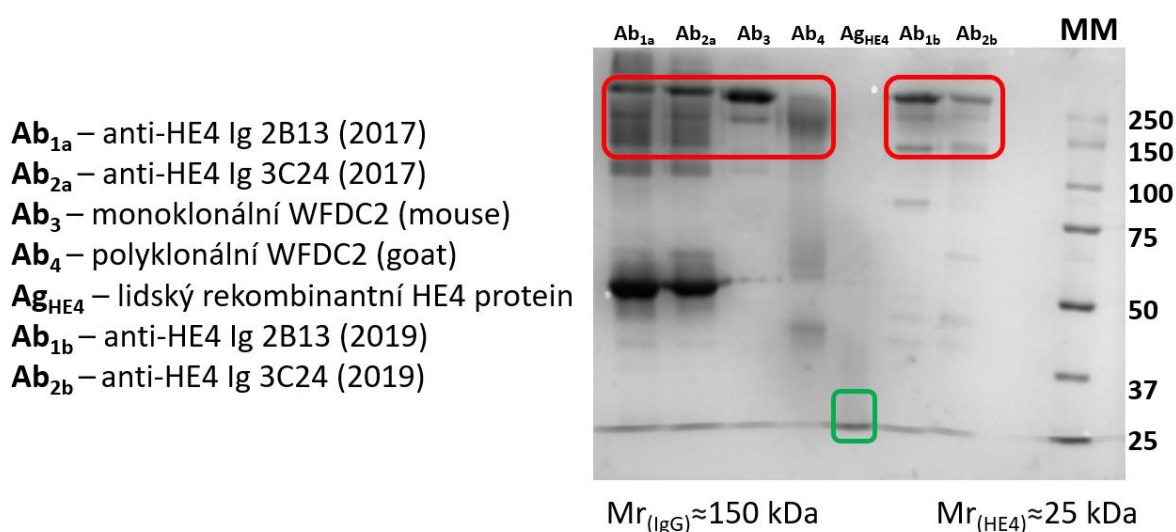
Následně byl proveden experiment s vazbou aptamerů na antigen HE4 a s použitím koncentrací streptavidin-HRP 1:100 a 1:50. Pro porovnání byly testovány i připravené biotinylované anti-HE4 protilátky (3C24 a 2B13) NHS-biotinem a biotin-hydrazidem. V případě protilátek bylo použito ředění streptavidin-HRP 1:50. Dot-blot byl proveden dle standardního postupu (viz Kapitoly 3.2 a 3.7). Množství sorbovaného antigenu na jamku bylo 3 μg . Protilátky a aptamery

byly ředěny dle předchozích provedení (viz Kapitoly 3.2 a 3.7). Po všech krocích byla provedena chemiluminiscenční detekce Clarity™ WesternECL Substrate (5 minut inkubace se substrátem) a provedeno vyhodnocení membrán na stanici Chemidoc XRS.

4 VÝSLEDKY

4.1 Ověření kvality a molekulové hmotnosti protilátek a antigenu elektroforeticky

Elektroforetická separace byla provedena dvakrát pro ověření výsledků, níže uvádím druhou analýzu frakcí vzorků antigenu a protilátek používaných pro experimenty. Gel byl po separaci barven roztokem amoniakálního stříbra. Metodou byla ověřena čistota komerčně dodávaných protilátek (Obrázek 9).

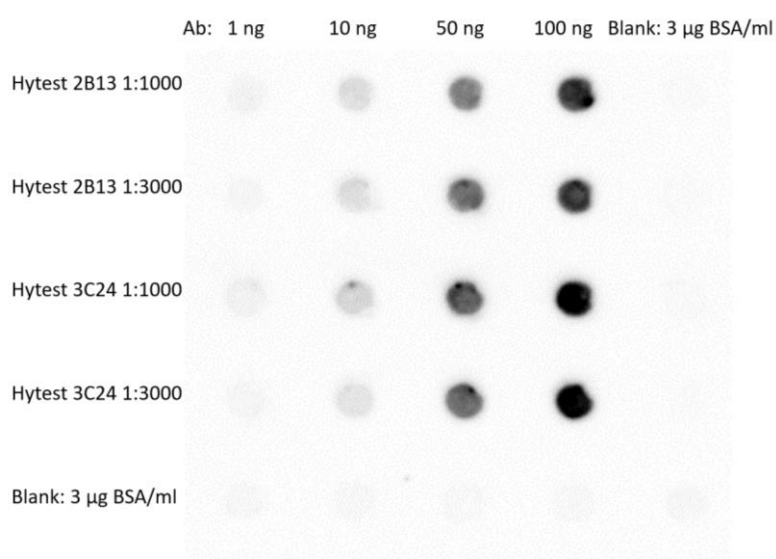


Obrázek 12 Elektroforetické dělení Ab a Ag [zdroj autor, není-li uvedeno jinak]

Molekulová hmotnost protilátek třídy IgG je 150 kDa. Při elektroforetické separaci je někdy možné pozorovat i proužek při vyšších molekulových hmotnostech (zejména 250 kDa), což je způsobeno možnou agregací molekul protilátek. Jedná se o jev, který se běžně vyskytuje. Protilátky anti-HE4 2B13 a 3C24 měly také velmi výraznou frakci okolo 50 kDa, ta byla pravděpodobně způsobena částečnou fragmentací protilátek, vzhledem k tomu, že se jednalo o protilátky po expiraci (z roku 2017), kdy je jejich stabilita garantována výrobcem. Pro další experimenty byly proto dále využívány pouze protilátky z roku 2019 (Ab_{1b} a Ab_{2b}). Molekulová hmotnost antigenu odpovídá hodnotě uváděné výrobcem a jedná se o cca 25 kDa. Pro přesnější určení by bylo vhodné provést separaci na gelu s menší porozitou. V případě antigenu se jedná o čistý protein.

4.2 Ověření vazebné schopnosti protilátek a antigenu a kalibrace antigenu

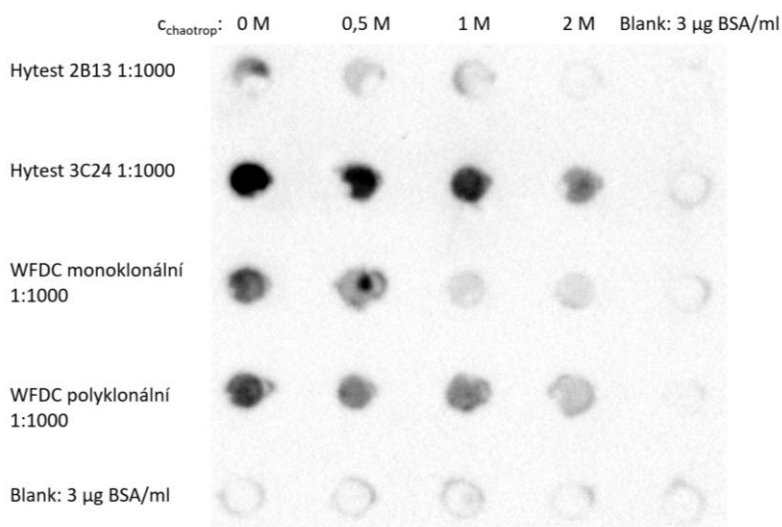
Všechny čtyři experimenty byly úspěšně provedeny a zhodnoceny. U všech studovaných primárních protilátek anti-HE4 byla prokázána reaktivita s antigenem HE4. Z prvních třech opakovaných experimentů bylo zjištěno, že optimální koncentrace antigenu HE4 na jamku je přibližně 25 ng, která je dostatečná pro hodnocení reaktivity s protilátkami. Poslední experiment se všemi primárními protilátkami potvrdil předchozí závěry. Níže uvádím pouze jeden z experimentů prováděný na aparatuře Affiblot (viz Obrázek 10).



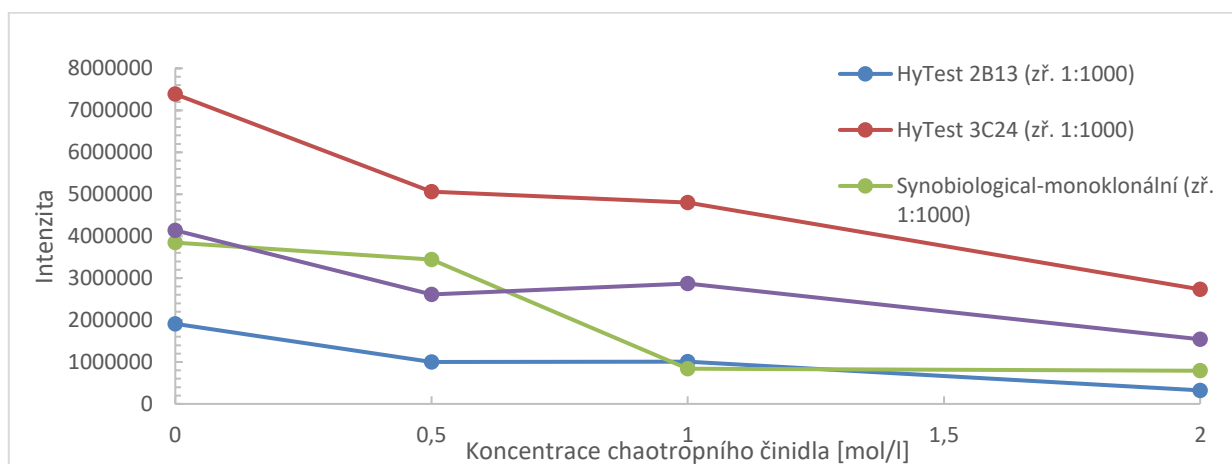
Obrázek 13 Kalibrace Ag HE4 s primární Ab od firmy HyTest [zdroj autor, není-li uvedeno jinak]

4.3 Studium afinity protilátek k antigenu

Z výsledků plyne, že monoklonální protilátka anti-HE4 3C24 od firmy HyTest má k antigenu HE4 největší afinitu, zbylé protilátky poskytly slabší signál. Níže je vidět intenzita signálu na vyfocené membráně (viz Obrázek 11) a rovněž grafické znázornění denzitometrického vyhodnocení intenzity signálu na vzrůstající koncentraci chaotropního činidla (viz Graf 1). Experiment byl opakován třikrát, a ačkoliv došlo k mírnému rozpití jednotlivých dot, data se shodovala.



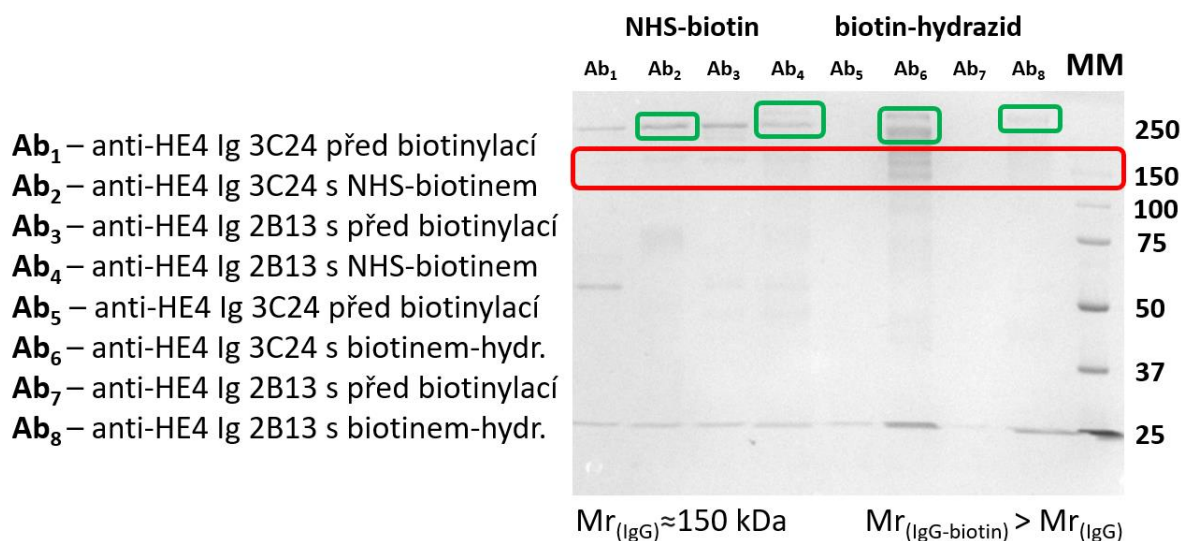
Obrázek 14 Test afinity Ab k Ag [zdroj autor, není-li uvedeno jinak]



Graf 1 Grafické znázornění síly vazby Ab při vzrůstající c chaotropního činidla [zdroj autor, není-li uvedeno jinak]

4.4 Zhodnocení účinnosti konjugace protilátek s biotinem

Všechny provedené experimenty biotinylace protilátek byly zhodnoceny elektroforeticky metodou SDS-PAGE, kde by měl být teoreticky zaznamenán posun proužku protilátek v gelu vzhledem ke změně jejich molekulové hmotnosti vlivem biotinylace. Takový posun byl zaznamenán, a tudíž lze vyvozovat, že biokonjugace proběhla úspěšně. Níže na Obrázku 14 je uveden výsledný gel barvený roztokem amoniakálního stříbra, na němž je posun vidět. U vzorků Ab₅ a Ab₇, tedy u oxidovaných protilátek před nukleofilní adicí, je vidět mírně snížená intenzita signálu.



Obrázek 15 Elektroforetické dělení frakcí Ab a biotinylovaných Ab [zdroj autor, není-li uvedeno jinak]

4.5 Zhodnocení koncentrační řady streptavidin-HRP

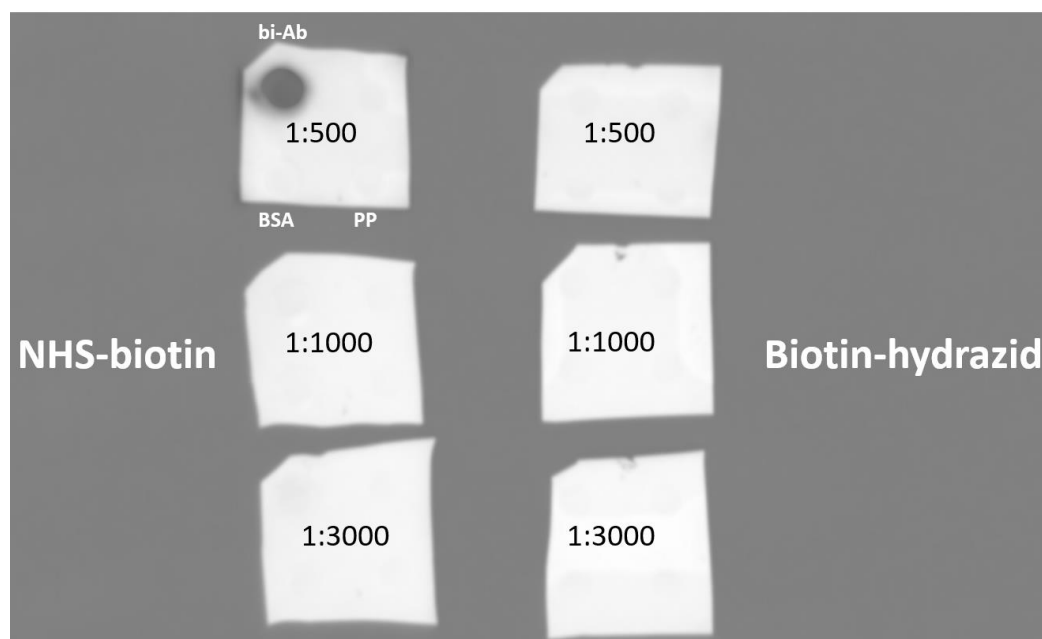
U prvních čtyř dot-blot experimentů, kde nebylo použito reakce primární biotinylované protilátky s antigenem HE4, došlo bohužel k výraznému rozpítí dot. I přes tento negativní fakt šly výsledky zhodnotit a data interpretovat. Z prvních dvou paralelních analýz s koncentrační řadou streptavidin-HRP 1:1000, 1:5000, 1:10000, 1:15000 bylo patrné, že ředění vyšší než 1:5000 je pro detekci nedostačující, a proto ji lze považovat jako limitní hranici citlivosti detekce připravených biotinylovaných anti-HE4 protilátek 2B13 a 3C24.

U dalších dvou analýz s koncentrační řadou Streptavidin-HRP 1:250, 1:500, 1:1000 a 1:5000 se výsledky potvrdily. Z výsledků kolorimetrické detekce lze usuzovat, že naopak nejmenší ředění (1:250) je pro detekci zbytečné. Naopak koncentrace 1:1000 a 1:5000 jsou výrazně slabší, a proto byla jako optimální koncentrace streptavidin-HRP v tomto systému vyhodnoceno zředění 1:500.

V posledních dvou analýzách bylo využito nově připravených biotinylovaných anti-HE4 protilátek 2B13 a 3C24, a to obou typů značení, NHS-biotinem i biotin-hydrazidem. Na membránu byl v prvním kroku sorbován antigen HE4, na membráně nedošlo k rozpítí dot. Byla využita detekce chemiluminiscenční, která je v porovnání s kolorimetrickou detekcí citlivější. Použita byla koncentrační řada streptavidin-HRP 1:500, 1:1000 a 1:3000.

V případě biotinylovaných anti-HE4 protilátek 3C24 značených NHS-biotinem (Viz Obrázek 15) se jako dostačující koncentrace ukázalo ředění 1:500 (vyšší zředění neposkytovalo žádný signál). U NHS-biotinylovaných anti-HE4 protilátek 2B13 nebyla optimální detekce v těchto ředěních prokazatelně dokázána, protože ředění 1:500 a 1:1000 poskytovalo naprosto minimální signál, 1:3000 žádný. To naznačuje, že biotinylace tohoto klonu protilátek s využitím NHS-biotinu nebyla účinná.

V případě protilátek biotinylovaných pomocí biotin-hydrazidu nebyl ani u jednoho ředění detegován odpovídající signál (Viz Obrázek 15). Ačkoliv výsledky z SDS-PAGE dělení nasvědčují úspěšné biotinylaci, je možné, že k ní došlo v mnohem menší míře, než NHS-biotinem. Je rovněž možné, že detekční limity takto derivatizovaných protilátek jsou mnohem níže, než biotinylovaných protilátek připravených pomocí NHS-biotinu.

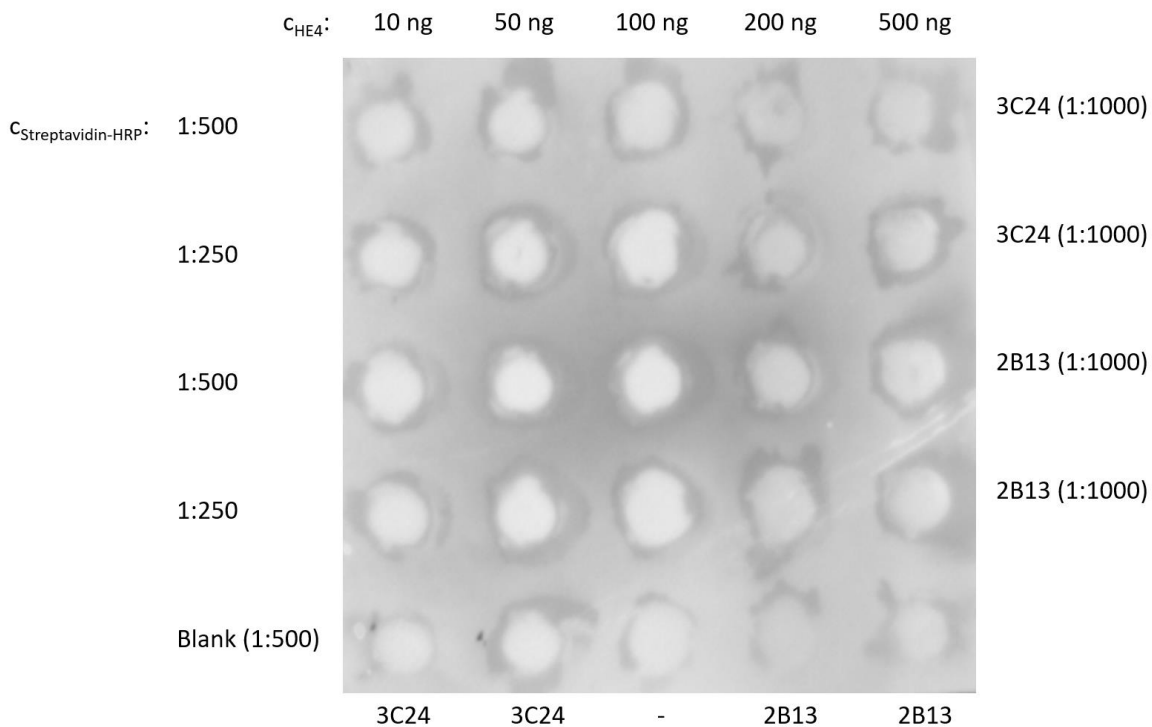


Obrázek 16 Dot-blot analýza koncentrační řady streptavidin-HRP u biotinylované protilátky 3C24 [zdroj autor, není-li uvedeno jinak]

4.6 Zhodnocení kalibrace biotinylovaných anti-HE4 protilátek

Po chemiluminiscenční detekci experimentu na aparatuře Affiblot bylo patrné, že k přímé dostatečné vazbě protilátky na antigen tak, aby byl patrný signál, nedošlo. To lze interpretovat tím, že nebyl dosažen potřebný stupeň biotinylace protilátek pro záchyt signálu v tomto uspořádání. Zachycení primárních anti-HE4 protilátek na membráně bylo poté neúspěšně ověřeno přidáním konjugátu anti-IgG sekundárních protilátek s HRP, kdy ale jejich vazba po chemiluminiscenční detekci rovněž nebyla patrná. Vidět byla nespecifická sorbce na okrajích

jednotlivých dot. Je možné, že použitý detekční kit byl nefunkční, proto bylo nutné experiment zopakovat. V dalším experimentu jsem ale použil vyšší koncentraci streptavidin-HRP.



Obrázek 17 Výsledek testování koncentrační řady biotinylovaných anti-HE4 protilátek [zdroj autor, není-li uvedeno jinak]

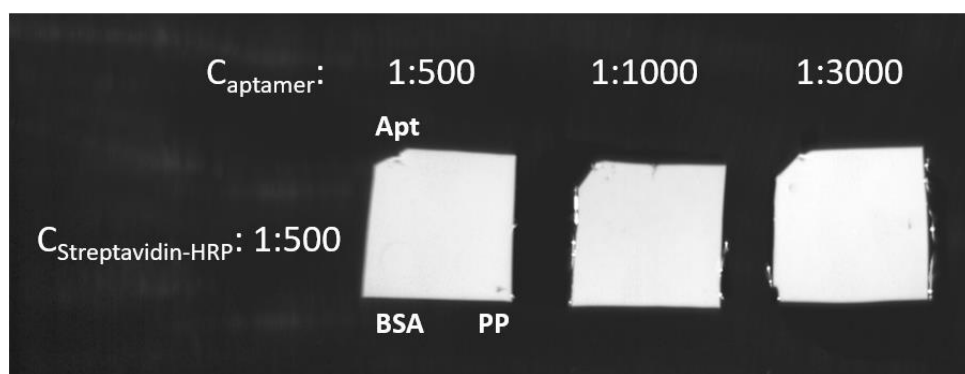
4.7 Zhodnocení testů vazebné schopnosti aptamerů

Po vyfocení membrán z experimentu, ověřujícího vazebnou schopnost používaných anti-HE4 aptamerů vůči cílovému antigenu HE4, a následné analýze výsledků bylo zjištěno, že vzorky nám neposkytují vůbec žádný signál (viz Obrázek 17). To mohlo být způsobeno více faktory. V úvahu lze vzít, že koncentrace streptavidinu-HRP pro chemiluminiscenční detekci 1:500 je pro analýzu s využitím biotinylovaných aptamerů nízká, rovněž ředění aptamerů může být pro úspěšný záchyt signálu moc vysoké, tedy koncentrace pod limitem detekce metody. Nakonec je rovněž možné, že anti-HE4 aptamery se specificky nevázaly na námi testovaný antigen HE4. Proto byly provedeny další ověřující experimenty, jež nám hypotézy měly objasnit.



Obrázek 18 První test vaznosti aptamerů na antigen HE4 [zdroj autor, není-li uvedeno jinak]

Při použití vyšších koncentrací testovaných anti-HE4 aptamerů s biotinovou kotvou nedošlo k detekci žádného signálu (Viz Obrázek 18), a tudíž bylo velmi pravděpodobné, že je problém v jejich vazbě na antigen nebo nízké koncentraci streptavidin-HRP pro úspěšnou detekci. Proto byl navrhnout další experiment, v němž byly využity i biotinylované anti-HE4 protilátky 3C24 a 2B13 jako vzorek pro porovnání.

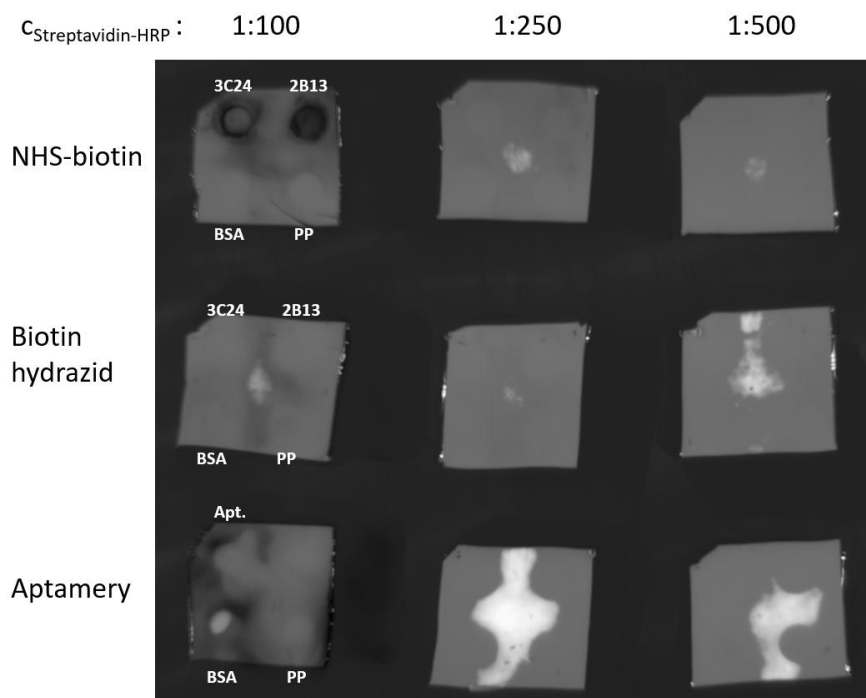


Obrázek 19 Druhý test vaznosti aptamerů na antigen HE4 [zdroj autor, není-li uvedeno jinak]

4.8 Zhodnocení porovnání biotinylovaných aptamerů a biotinylovaných anti-HE4 protilátek

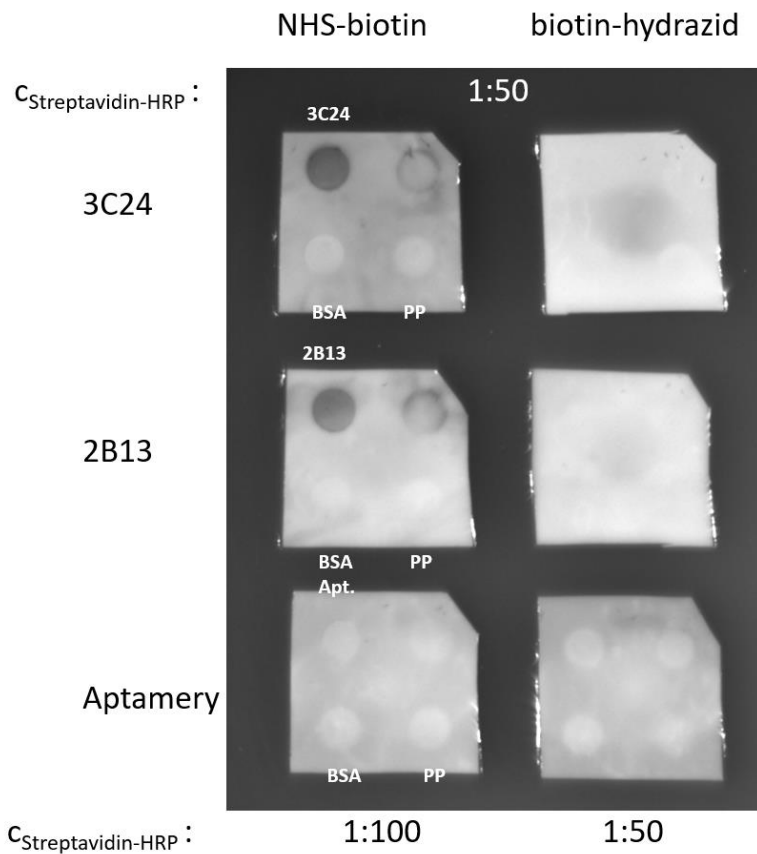
Z výsledků je patrné, že dříve laboratorně NHS-biotinylované protilátky již nedávají silný signál při ředění streptavidinu-HRP 1:250 a 1:500, ačkoliv byl při těchto koncentracích konjugátu po jejich přípravě patrný signál (Viz Kapitola 4.5). U obou protilátek biotinylovaných pomocí biotin-hydrazidu byla patrná jen mírná nespecifická sorpce streptavidin-HRP při nejvyšší koncentraci 1:100 a tudíž lze předpokládat, že biotinylované

protilátky nejsou dlouhodobě stabilní. U anti-HE4 aptamerů také nebyla prokázána reaktivita a je vidět pouze nespecifická sorpce streptavidin-HRP na membránu. Je také možné, že v případě aptamerů nedošlo kvůli jejich menší molekulové hmotnosti k sorpci na membránu, kam byly nanášeny přímo, bez antigenu. Je tedy možné, že v tomto experimentu nedošlo k záchytu aptamerů v místech aplikace (tedy tzv. doty neboli spotu, tj. tečka), ale došlo k jejich volné difúzi po membráně, jež se pak projevila takto rozptýleným signálem, resp. nespecifickým signálem celé membrány. Z toho lze také usuzovat, že v případě aptamerů byly předchozí experimenty pod limitem detekce, kvůli nízkým koncentracím streptavidin-HRP. Lze tedy usuzovat, že vazba používaných anti-HE4 aptamerů na antigen HE4 není optimální, resp. nedochází k reakci s konkrétním antigenem, který byl používán pro naše experimenty. Tyto komplikace se netýkají pouze aptamerů, ale lze se s tím setkat i v případě protilátek, kdy je nezbytné při zavádění jakékoliv imunoanalytické metody otestovat konkrétní protilátky s konkrétním antigenem. Obvykle se provádí testování větší škály obou proteinů a z výsledků se určí nejvhodnější pár. Tuto hypotézu jsem ověřil dalším experimentem za využití instrumentace Affiblot při testech jejich afinity k antigenu HE4. Z tohoto experimentu je tedy vidět, že v síle signálu jsou nejlepší protilátky biotinylované pomocí NHS-biotinu, kdy lepší výsledky ukazují protilátky 2B13.



Obrázek 20 Testy signálu volně imobilizovaných protilátek a aptamerů [zdroj autor, není-li uvedeno jinak]

Po vyhodnocení membrán provedeného experimentu s imobilizovaným antigenem HE4 je patrné, že oba typy anti-HE4 protilátek biotinylovaných NHS-biotinem signál poskytují, tudíž se vážou s antigenem HE4. U anti-HE4 protilátek biotinylovaných biotin-hydrazidem signál nebyl získán, a proto bylo potvrzeno, že nedošlo k účinné konjugaci protilátek s biotinem. Používané anti-HE4 aptamery ani při jedné z koncentrací (1:50 a 1:100) streptavidin-HRP neposkytovaly signál, a tudíž lze usuzovat, že nedochází k specifické vazbě na anitgen.



Obrázek 21 Testy vaznosti aptamerů v porovnání s protilátkami [zdroj autor, není-li uvedeno jinak]

5 ZÁVĚR

Metodou SDS–PAGE elektroforézy jsem ověřil molekulové hmotnosti a kvalitu používaných anti-HE4 protilátek a antigenu HE4, rovněž byla zjištěna fragmentace jednoho typu protilátek (2B13 a 3C24 z roku 2017), které byly z dalších experimentů vyřazeny. Z výsledků elektroforézy je vidět, že molekulová hmotnost IgG protilátek se pohybuje kolem 150 kDa, případně jsou přítomné agregáty, molekulová hmotnost proteinového antigenu HE4 kolem 25 kDa, což koresponduje s údaji od výrobce.

Provedl jsem experimenty ověřující vazebnou schopnost studovaných anti-HE4 protilátek s proteinovým onkomarkerem HE4 metodou dot-blot analýzy v tzv. sandwichovém uspořádání za využití sekundárních značených protilátek. Z výsledků je patrné, že všechny studované protilátky vykazují specifickou vazbu s cílovým proteinem. Metodou Affiblot byla rovněž studována afinita těchto protilátek vůči antigenu HE4, kdy nejvyšší afinitu vykazují protilátky 3C24 od firmy HyTest (Finsko).

Dále byla provedena biotinylace vybraných protilátek (3C24 a 2B13) pomocí dvou odlišných mechanismů biokonjugace. K úspěšné biokonjugaci došlo jen u mechanismu za užití NHS-biotinu a vzniku amidové vazby na volných N-koncích, a to u obou protilátek. Při ověření biokonjugací elektroforeticky byl ovšem posun patrný u všech biotinylovaných protilátek, nicméně pro úspěšnou afinitní interakci byla biotinylace nedostatečná.

Dalším krokem bylo určení optimální koncentrace streptavidin-HRP pro detekci biospecifického páru (a to jak antigen – protilátka, tak antigen – aptamer) značeného biotinovou kotvou. Jako optimální koncentrace streptavidin-HRP pro připravené biotinylované protilátky byla určeno ředění v rozmezí 1:250 až 1:500.

Optimální koncentrace streptavidin-HRP pro aptamery konjugované s biotinovou kotvou nebyla reálně určena, protože dle provedených dot-blot analýz komerční anti-HE4 aptamery specificky neváží antigen HE4, a tudíž neposkytují signál. Proto také nemohly být provedeny testy afinity aptamerů vůči antigenu, jelikož aptamer neposkytuje vazbu na antigen.

Z tohoto důvodu nelze využít tento konkrétní pár studovaných anti-HE4 aptamerů a rekombinantního lidského HE4 (Sino Biological, Čína) pro diagnostickou aplikaci. Bylo by nutné otestovat reaktivitu s antigenem od jiného výrobce, případně optimalizovat podmínky vazby aptamer-antigen. Možné problémy spojené s vazbou aptamerů na antigen a pokračování

experimentů je diskutováno v šesté kapitole. Naopak studované protilátky mají velmi dobré výsledky, a to zejména 3C24 a poté polyklonální anti-HE4 protilátky od firmy Sino Biological.

6 DISKUZE

Systém využívající protilátek vůči onkomarkeru HE4, který byl v rámci práce testován, je funkční. Ovšem pro reálnou aplikaci do klinických laboratoří je potřeba provést další řadu experimentů validujících výsledky tak, aby byly jasně interpretovatelné pro potřeby diagnostických závěrů. Protilátky vykazují velmi dobrou citlivost vůči onkomarkeru, a tedy po případné izolaci ze séra, by ho měly zachytit a poskytnout informaci o jeho přítomnosti a rovněž kvantitě, odečitatelné z intenzity signálu.

Nadějná chemie aptamerů přináší inovace jak do diagnostiky, tak do cílené léčby nejen onkologických onemocnění. Ovšem z výsledků mé práce je patrné, že používané konkrétní aptamery s biotinovou kotvou, které jsou na trhu dostupné, nejsou pro detekci konkrétního testovaného HE4 onkomarkeru vhodné. Možných důvodů, proč nedochází k vazbě aptameru na antigen HE4 je více. Mimo jiné může jít o nesprávný molekulární design metodou SELEX, a tedy úplné neschopnosti vazby aptameru na protein. Dále nemusí být vazba optimální (stabilní apod.) a při promývání mohlo docházet k odplavování aptamerů z epitopů antigenu, to by rovněž ukazovalo na nesprávný molekulární design, případně nízkou afinitu vůči konkrétnímu antigenu, který byl používán. Vyjmenovat mohu i další hypotézy, jako neoptimální biokonjugaci aptamerů s biotinovou kotvou, která může narušit afinitu k antigenu a tím nízkou vazebnou schopnost. Nakonec se otevírá i kapitola reakčních podmínek pro vazbu aptamerů na protein, které nemusely být pro aptamery vhodné, ačkoliv pro protilátky ano.

Všechny tyto hypotézy vytyčují cestu k dalším studiím interakcí aptamerů s cílovým antigenem, optimalizacím vazebných podmínek, a nakonec i testům afinity. To již ale není předmětem této studie.

V dalším plánu práce je analýza interakcí probíhajících v reálném čase pomocí metodiky Povrchové plasmonové resonance (MP-SPR), což je velmi moderní fyzikální metoda schopná poskytovat data o vazebných dějích na molekulární úrovni. Dále je třeba otestovat širší spektrum párů aptamer – antigen a nelézt vhodný pár s nejvyšší reaktivitou. S problémy reaktivity antigenu s protilátkami se běžně setkáváme, zejména v případě komerčně dodávaných proteinů a protilátek, které vykazují značnou variabilitu na obou stranách. Uvidíme, co další experimenty časem ukáží.

7 POUŽITÁ LITERATURA

1. Imunochemie. *WikiSkripta* [online]. neznámé: MEFANET, 14. 8. 2017. [cit. 2022-02-18]. Dostupné z: <https://www.wikiskripta.eu/w/Imunochemie>
2. SLOVÁKOVÁ, Marcela, Zuzana BÍLKOVÁ a Lucie KORECKÁ. *Vybraná laboratorní cvičení z imunoanalytických metod*. Vydání druhé opravené. Pardubice: Univerzita Pardubice, 2020. ISBN 978-80-7560-310-4.
3. LITZMAN, Jiří. *Základy vyšetření v klinické imunologii*. Vydání první. Brno: Masarykova univerzita, 2007. ISBN 978-80-210-4227-8
4. CITTERBART, Karel. *Gynekologie*. Praha: Galén, c2001. ISBN 80-726-2094-0.
5. Novotvary 2018 ČR Cancer Incidence in the Czech Republic 2018. In: Ústav zdravotnických informací a statistik ČR [online]. Praha: Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR, 2018 [cit. 2023-01-14]. Dostupné z: <https://www.uzis.cz/res/f/008352/novotvary2018.pdf>
6. MAČÁK, Jirka a Jana MAČÁKOVÁ. *Patologie*. Praha: Grada Publishing, 2004. ISBN 978-80-247-0785-3.
7. KOPÁČ, Josef. *Lékařská laboratorní diagnostika*. Turnov: Lékařská laboratoř Turnov, 2004. ISBN neznámé.
8. Doporučení České společnosti klinické biochemie ČLS JEP k využití nádorových markerů v klinické praxi. *Klinická biochemie a metabolismus* [online]. Česká lékařská společnost Jana Evangelisty Purkyně, 2021, 29.(1.), 42-49 [cit. 2022-10-18]. ISSN 1210-7921. Dostupné z: neznámé
9. NEKULOVÁ, M., L. MOUKOVÁ a J. TRBUŠEK. Nový sérový marker HE4 u karcinomu vaječníku. In: *Linkos: Česká onkologická společnost České lékařské společnosti J. E. Purkyně* [online]. neznámé: neznámé, 2010 [cit. 2022-10-03]. Dostupné z: <https://www.linkos.cz/lekar-a-multidisciplinari-tym/kongresy/po-kongresu/databaze-tuzemskych-onkologicky-konferencnich-abstrakt/novy-serovy-marker-he4-u-karcinomu-vajecniku/>
10. KOČÁREK, Eduard. *Biologie člověka 1*. Vydání první. Praha: Scientia, 2010. ISBN 978-80-86960-47-0.
11. HOŘEJŠÍ, Václav, Jiřina BARTUŇKOVÁ, Tomáš BRDIČKA a Radek ŠPÍŠEK. *Základy imunologie*. Vydání šesté aktualizované. Praha: Stanislav Juhaňák - Triton, 2017. ISBN 978-80-7553-250-3.

12. JELÍNEK, Jan a Vladimír ZICHÁČEK. *Biologie pro gymnázia: (teoretická a praktická část)*. Vydání jedenácté. Olomouc: Nakladatelství Olomouc, 2014. ISBN 978-80-7182-338-4.
13. MATOUŠ, Bohuslav. *Základy lékařské chemie a biochemie*. Vydání první. Praha: Galén, c2010. ISBN 978-80-7262-702-8.
14. MURRAY, Robert K. *Harperova Biochemie*. Vydání dvacáté třetí. Jinočany: H+H, Vyšehradská, 2002. Lange medical book. ISBN 80-731-9013-3.
15. MCMURRY, John. *Organická chemie*. Vydání první. Brno: Vysoké učení technické v Brně, nakladatelství VUTIUM, 2015. Překlady vysokoškolských učebnic. ISBN 978-80-214-4769-1.
16. PRITCHARD, D. J. a Bruce R. KORF. *Základy lékařské genetiky*. První české vydání. Praha: Galén, c2007. ISBN 978-80-7262-449-2.
17. Avidita. *WikiSkripta* [online]. neznámé: MEFANET, 26. 7. 2020. [cit. 2022-04-12]. Dostupné z: <https://www.wikiskripta.eu/w/Avidita>
18. IgE a IgD. *WikiSkripta* [online]. neznámé: MEFANET, 13. 1. 2022. [cit. 2022-04-12]. Dostupné z: https://www.wikiskripta.eu/w/IgE_a_IgD
19. návod na provedení SDS-PS-PAGE: SEPARACE PROTEINŮ POMOCÍ DISKONTINUÁLNÍ ELEKTROFORÉZY V POLYAKRYLAMIDOVÉM GELU ZA PŘÍTOMNOSTI SODIUM DODECYLSUFLÁTU SDONÉHO (SDS-PS-PAGE), Katedra biologických a biochemických věd, FChT UPCE
20. Affiblot: a dot blot-based screening device for selection of reliable antibodies†. *Analytical methods* [online]. 2021, -(35.), 3874-3884 [cit. 2022-05-24]. Dostupné z: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2021/ay/d1ay00955a>
21. VORÁČKOVÁ, Kateřina. *Diagnostické využití monoklonálních protilátek v medicíně a kriminalistice* [online]. Brno, 2010 [cit. 2022-07-06]. Dostupné z: https://is.muni.cz/th/1vg4z/Bakalarska_prace.pdf. Bakalářská práce. Přírodovědecká fakulta Masarykovy univerzity. Vedoucí práce Mgr. Jana Benešová.
22. HUANG, Jie, Xinxin CHEN, Xuekun FU, Zheng LI, Yuhong HUANG a Chao LIANG. Advances in Aptamer-Based Biomarker Discovery. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* [online]. 2021, 9(9.), 1-7 [cit. 2022-08-19]. ISSN 2296-634X. Dostupné z: doi:10.3389/fcell.2021.659760
23. OPLOVÁ, Michaela. *Aptamery - vazebné a regulační vlastnosti molekul RNA*. 2013. Bakalářská práce. Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta, Katedra buněčné biologie. Vedoucí práce Půta, František.

- 24.** CITARTAN, Marimuthu. Aptamers as the powerhouse of dot blot assays. *Talanta* [online]. 2021, 232(232), 1-7 [cit. 2022-08-19]. ISSN 00399140. Dostupné z: doi:10.1016/j.talanta.2021.122436
- 25.** Biokonjugační reakce. In: Masarykova univerzita v Brně [online]. neznámé: neznámé, neznámé [cit. 2022-05-24]. Dostupné z: https://is.muni.cz/el/sci/jaro2019/C4840/um/MIB4_Konjugacni_reakce.pdf
- 26.** Introduction to Bioconjugation. In: Chemistry libre text – Organic chemistry [online]. neznámé: neznámé, 2020 [cit. 2022-05-24]. Dostupné z: [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Organic_Chemistry/Supplemental_Modules_\(Organic_Chemistry\)/Reactions/Introduction_to_Bioconjugation](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Organic_Chemistry/Supplemental_Modules_(Organic_Chemistry)/Reactions/Introduction_to_Bioconjugation)

8 SEZNAM A ZDROJE OBRÁZKŮ, TABULEK, GRAFŮ A VZORCŮ

Obrázek 1 Schéma diferenciacce krevních buněk včetně lymfocytů	12
Obrázek 2 Obecný vzorec α -aminokyseliny.....	14
Obrázek 3 Struktura imunoglobulinu.....	15
Obrázek 4 Schématické znázornění způsobu vazby ligandu molekulou aptameru a protilátky.18	
Obrázek 5 Mechanismus technologie SELEX.....	20
Obrázek 6 Příklady některých biokonjugačních reakcí prostřednictvím uvedených funkčních skupin.....	20
Obrázek 7 Zapojená elektroforetická vana s vloženým gelem (Bio-Rad, USA).....	22
Obrázek 8 Zapojená dot-blot aparatura.....	24
Obrázek 9 Schéma aparatury Affiblot.....	25
Obrázek 10 Reakční schéma biotinylace NHS-biotinem.....	30
Obrázek 11 Reakční schéma biotinylace biotin-hydrazidem, doplněno o vzorec obecné Schiffovy báze (imin).....	31
Obrázek 12 Elektroforetické dělení Ab a Ag.....	35
Obrázek 13 Kalibrace Ag HE4 s primární Ab od firmy HyTest.....	36
Obrázek 14 Test afinity Ab k Ag.....	37
Obrázek 15 Elektroforetické dělení frakcí Ab a biotinylovaných Ab.....	38
Obrázek 16 Dot-blot analýza koncentrační řady streptavidin-HRP u biotinylované protilátky 3C24.....	39
Obrázek 17 Výsledky testování koncentrační řady biotinylovaných anti-HE4 protilátek.....	40
Obrázek 18 První test vaznosti aptamerů na antigen HE4.....	41
Obrázek 19 Druhý test vaznosti aptamerů na antigen HE4.....	41
Obrázek 20 Testy signálu volně imobilizovaných protilátek a aptamerů.....	42
Obrázek 21 Testy vaznosti aptamerů v porovnání s protilátkami.....	43

Tabulka 2 Roztoky pro přípravu SDS-PAGE.....	25
Graf 2 Grafické znázornění síly vazby Ab při vzrůstající c chaotropního činidla.....	37
Vzorec 1 Termodynamické vyjádření afinity protilátek.....	17

8.1 Zdroje obrázků

1. PALICH FUČÍKOVÁ, Jitka. Components of immune system (innate and adaptive immunity). In: *Nanopdf.com* [online]. neznámé: neznámé, neznámé [cit. 2022-10-16]. Dostupné z: https://nanopdf.com/download/functions-of-b-cells_pdf
2. IMMUNOGLOBULINS AND B-CELL DEVELOPMENT: Chapter 1: The Immune System. In: *OncologyPRO* [online]. neznámé: European Society for Medical Oncology, neznámé [cit. 2022-10-16]. Dostupné z: <https://oncologypro.esmo.org/education-library/essentials-for-clinicians/lymphomas/immunoglobulins-and-b-cell-development>
3. Illustration of how (A) aptamer and (B) antibody attaches to proteins and structure of (A) aptamer and (B) antibody. In: *Biomaterials Research* [online]. neznámé: neznámé, 2021 [cit. 2022-10-16]. Dostupné z: <https://biomaterialsres.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40824-021-00244-4/figures/1>
4. Aptamers from Louisville. In: *Ndghansah medium* [online]. neznámé: neznámé, 2020 [cit. 2022-05-30]. Dostupné z: <https://ndghansah.medium.com/aptamers-from-louisville-505d3d037ce6>
5. Bioconjugation. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001- [cit. 2022-05-24]. Dostupné z: <https://en.wikipedia.org/wiki/Bioconjugation>
6. Affiblot screening device for antibody selection. In: *Transfera.cz* [online]. Pardubice: FChT UPCE, 2021 [cit. 2023-01-16]. Dostupné z: <https://portfolio.transfera.cz/technology-overview/detail/190/>
7. NHS-biotin. In: *Quanta biodesign: limited* [online]. neznámé: neznámé, neznámé [cit. 2022-05-31]. Dostupné z: <https://www.quantabiodesign.com/product/10205/>
8. Biotin-hydrazide. In: *PurePEG* [online]. neznámé: neznámé, neznámé [cit. 2022-11-27]. Dostupné z: <https://www.purepeg.com/product/biotin-hydrazide/>
9. Obecná struktura iminu. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001- [cit. 2022-11-09]. Dostupné z: https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/7/72/Imino_Group_V.1.png

U zbylých obrázků je zdroj autor, není-li uvedeno jinak.

9 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

Ab	Protilátka
Ag	Antigen
APC	Antigen-presenting cells (antigen prezentující buňky)
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
elfo	Elektroforéza
HE4	Human epididymal protein 4 (lidský epididymální protein 4)
HLA	Human leukocyte antigen (nepřekládá se)
HRP	Horseradish peroxidase (křenová peroxidáza)
Ig	Imunoglobulin
IgG	Imunoglobulin třídy G
MHC	Major histocompatibility complex (Hlavní histokompatibilní komplex)
NHS	N-hydroxysukcinimid
NK	Natural killer
PBS-T	Phosphate buffered saline with tween (fosfátový pufr s přidavkem soli a tweenem)
PVDF	Polyvinyliden fluoride (polyvinyliden fluorid)
RNA	Ribonukleová kyselina
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate-polyakrylamide gel electrophoresis (polyakrilamidová gelová elektroforéza v přítomnosti dodecyl síranu sodného)