



Zdravotně
sociální fakulta
Faculty of Health
and Social Studies

Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
University of South Bohemia
in České Budějovice

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Zdravotně sociální fakulta
Katedra laboratorních metod a informačních systémů

Bakalářská práce

Příprava monoklonálních protilátek proti antigenům borelie

Vypracovala: Veronika Švejdová
Vedoucí práce: prof. RNDr. Jan Kopecký, CSc.

České Budějovice 2015

Abstrakt

Ve své bakalářské práci se zaměřuji na přípravu monoklonálních protilátek proti antigenům borelie. V teoretické části bakalářské práce popisují druhy rodu *Borrelia* a protilátky. V úvodu práce je pojednáno o historii objevu spirochěty způsobující onemocnění lymeská borelióza, dále o vektorech tohoto onemocnění a rozdělení borelií podle geografického výskytu. Následuje taxonomické zařazení a popis bakterie, který je zaměřený na bičíky, uspořádání genetického materiálu a na vnější povrchové antigeny důležité pro tyto bakterie. V další části popisují vztah borelie, vektora a hostitele a průběh imunitní odpovědi při onemocnění. Podrobněji jsou popsány kožní příznaky onemocnění lymeská borelióza a pár slov o relabující horečce. Tato kapitola je zakončena popsáním laboratorní diagnostiky původce lymeské boreliózy *Borrelia burgdorferi*.

Dále se zaměřuji na vznik protilátek přirozenou cestou a na přípravu monoklonálních protilátek hybridomovou technologií. Stručně popisují jejich rozdělení a využití.

Praktická část bakalářské práce byla uskutečněna v laboratořích Přírodovědecké fakulty Jihočeské univerzity. Zde jsem pomocí hybridomové technologie fúzí spojila myelomovou buňku se splenocytem imunizované myši za vzniku hybridomu. Tyto hybridomy jsem následně klonovala a kultivovala v mediu, které jsem testovala metodou ELISA na výskyt protilátek. Hybridomy s vysokou produktivitou byly zálohovány zmrazením v tekutém dusíku. Monoklonální protilátky jsem přečistila, zkoncentrovala a otestovala jejich titr.

Klíčová slova: *Borrelia burgdorferi* sensu lato, lymeská nemoc, monoklonální protilátky, hybridomová technologie

Abstract

In my bachelor thesis I deal with preparation of monoclonal antibodies against antigens of *Borrelia*. In theoretical section I describe genus *Borrelia* and antibodies. The introduction deals with the history of discovery of the spirochete that causes Lyme disease, vectors of this disease and classification of *Borreliae* according to geographical occurrence. Taxonomic categorization and description of the bacterium follows. It is focused on flagellum, arrangement of genetic material and on external surface antigens important for this bacterium. In the next section I describe *Borrelia* – vector - host interactions and the development of immune response during the disease. Dermal symptoms of the Lyme disease are described in detail. A few words about relapsing fever are added. This chapter ends with description of laboratory diagnostics of *Borrelia burgdorferi*.

Next, I focused on the characterization of antibodies and on preparation of monoclonal antibodies by hybridoma technology. I briefly describe ways of their utilization.

Practical part of Bachelor thesis was carried out in the laboratories of Faculty of Science. Here, with the help of hybridoma technology, I fused myeloma cells with splenocytes of immunized mice producing hybridomas. These hybridomas I cultivated in medium, which I subsequently tested for occurrence of antibodies by ELISA. Hybridomas having high productivity were cloned, frozen and stored in liquid nitrogen. Finally I purified monoclonal antibodies, concentrated them and tested their titre.

Keywords: *Borrelia burgdorferi* sensu lato, Lyme disease, monoclonal antibodies, hybridoma technology

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to – v nezkrácené podobě – v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných fakultou – elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejich internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 5. května 2015

.....

(Veronika Švejdová)

Poděkování

Těchto pár řádek bych chtěla věnovat všem, kteří mi pomohli a podpořili mě během studia i při tvorbě bakalářské práce. Především rodina a přátelé mi byli oporou. Velké díky patří prof. RNDr. Janu Kopeckému, CSc. za to, že se mě ujal a pomohl mi vypracovat mou práci až do konce. Také bych chtěla poděkovat kolektivu Katedry medicínské biologie Přírodovědecké fakulty Jihočeské univerzity za pomoc při realizaci metod.

Obsah

1	Úvod	9
2	Cíle práce	10
3	Literární přehled	11
3.1	Lymeská borelióza	11
3.1.1	Úvod	11
3.1.2	Rod <i>Borrelia</i>	12
3.1.3	Genom	15
3.1.4	Vnější povrchové proteiny	15
3.1.5	Patogeneze	16
3.1.6	Onemocnění	17
3.1.7	Laboratorní diagnostika <i>Borrelia burgdorferi</i>	19
3.2	Protilátky	20
3.2.1	Vývoj B lymfocytů	20
3.2.2	Thymus independentní protilátková odpověď	22
3.2.3	Thymus dependentní protilátková odpověď	22
3.2.4	Polyklonální protilátky	23
3.2.5	Monoklonální protilátky	23
3.2.6	Využití monoklonálních protilátek	25
4	Hypotézy	26
5	Materiál a metody	27
5.1	Adjuvantní imunizace myši	27
5.2	Testování odebrané krve na přítomnost specifických protilátek metodou ELISA	27
5.3	Fúze slezinných buněk s myelomovými buňkami	28
5.4	Kultivace hybridomů v selektivním (HAT) médiu	30
5.5	Testování produkčních hybridomů metodou ELISA	31
5.6	Mrazení produkčních hybridomů	31
5.7	Klonování produkčních hybridomů metodou limitního ředění	31
5.8	Produkce monoklonálních protilátek do kultivačního média	32

5.9	Purifikace a zkoncentrování monoklonálních protilátek.....	32
6	Výsledky.....	35
6.1	Testování odebrané myší krve na přítomnost specifických protilátek metodou ELISA	35
6.2	Testování produkčních hybridomů metodou ELISA	35
6.3	Testování klonovaných hybridomů na produkci protilátek metodou ELISA ..	41
6.4	Změření titru purifikovaných a zkoncentrovaných protilátek metodou ELISA 43	
7	Diskuze	44
8	Závěr.....	47
9	Použitá literatura:.....	48

Seznam použitých zkratk

BCR	B cell receptor
BOFES	bovinní fetální sérum
CD	cluster of differentiation
CNS	centrální nervová soustava
DMSO	dimethylsulfoxide
DNA	deoxyribonukleová kyselina
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
HLA	human leukocyte antigen
HGPRT	hypoxantin-guanin fosforibosyl transferáza
INF	interferon
IL	interleukin
Osp	outersurface protein, vnější povrchový protein
PBS	phosphate-buffered saline, fosfáty pufovaný fyziologický roztok
PCR	polymerázová řetězová reakce
PNC	penicilin
SCF	stem cell factor, faktor kmenových buněk
SMC	streptomycin
TCR	T cell receptor
Th	T helper cell, pomocný T lymfocyt
TNF	tumor necrosis factor

1 Úvod

Lymeská borelióza je onemocnění přenášené klíšťaty. Primárně se vyskytuje v přírodě – nezávisle na člověku. Rezervoárem u toho onemocnění mohou být kromě hlodavců také ptáci. Nejvyšší počet případů onemocnění lymeskou boreliózou byl roku 1995. Podle Státního zdravotního úřadu, bylo v České republice za období od roku 2008 do roku 2013 v průměru přes 4000 nakažených lymeskou boreliózou za rok.

Polyklonální protilátky jsou heterogenní protilátky různých tříd a podtříd, které jsou namířené proti různým antigenům a mají různou afinitu. Hybridomová technologie překonává nedostatky těchto polyklonálních imunoglobulinů. Díky hybridomové technologii je možno získat neomezené množství zcela identických imunoglobulinů, neboli monoklonálních protilátek. Tyto monoklonální protilátky reagují se stejnou antigenní determinantou a mají stejné biologické vlastnosti.

Hybridomovou technologii lze z pohledu vědeckého, z pohledu aplikací klinické medicíny a většiny vědeckých odvětví, které mají vztah k živé přírodě, považovat za jednu z nejperspektivnějších technologií. Je široce používána v experimentálních podmínkách i průmyslově jako zdroj komerčně využívaných monoklonálních protilátek.

Monoklonální protilátky se využívají ve všech imunochemických postupech. Používají se k detekci solubilních látek, k detekci membránových či nitrobuněčných molekul, ke stanovení humorálních faktorů, k detekci cytosinů, mediátorů, hormonů, specifických protilátek a mnoha dalších.

2 Cíle práce

Cílem mé bakalářské práce, je příprava monoklonálních protilátek proti antigenům borelie za použití následujících metod:

- Adjuvantní imunizace myší
- Testování odebrané krve na přítomnost specifických protilátek metodou ELISA
- Fúze slezinných buněk s myelomovými buňkami a kultivace hybridomů v selektivním (HAT) médiu
- Testování produkčních hybridomů metodou ELISA
- Klonování produkčních hybridomů metodou limitního ředění
- Produkce monoklonálních protilátek do kultivačního media
- Purifikace monoklonálních protilátek

3 Literární přehled

3.1 Lymeská borelióza

3.1.1 Úvod

Od první zmínky o lymeské borelióze /patrně roku 1883/ od dermatologa Buchwalda, který popsal acrodermatitis chronica atropicans, trvalo přibližně sto let do objevení původce této infekce, spirochéty zařazené mezi borelie Willie Burgdorferem, později pojmenovaná *Borrelia burgdorferi*. Během těchto sta let bylo popsáno mnoho klinických projevů, které byly později přiřazeny tomuto původci. Patří mezi ně boreliový lymfocytom, erythema migrans (typický pro toto onemocnění), chronická atrofická dermatitida, multifokální postižení nervového systému a další. Důležitým mezníkem byl epidemický výskyt zánětlivé artopatie spjaté s předešlým erythema migrans v oblasti poblíž městečka Old Lyme v Conektikatu roku 1976. Bylo postiženo 39 dětí a 12 dospělých. 23 z těchto dětí navíc postihla juvenilní revmatoidní artritida. Předešlá fakta spolu s okolností o rozšíření klíšťat *Ixodes dammini* v dané oblasti vedla k popsání nozologické jednotky označované jako lymeská nemoc (Steere 2006; Bartůněk et al. 2006).

Bakterie *Borrelia burgdorferi* sensu lato je původcem lymeské boreliózy. Je nejčastější infekcí přenášená klíšťaty v mírném pásmu severní polokoule. Onemocnění může proběhnout bezpříznakově nebo s vážnými zdravotními komplikacemi. Rod lze na základě genetických vlastností rozdělit do dvou hlavních skupin. Jedna skupina způsobuje lymeskou boreliózu přenášenou tvrdými klíšťaty rodu *Ixodes* a druhá skupina je původcem návratné horečky přenášenou měkkými klíšťaty rodu *Ornithodoros*.

Borelie způsobující lymeskou boreliózu jsou přenášeny čtyřmi druhy klíšťat rodu *Ixodes*. Klíště může být přenašečem ve všech stádiích svého vývoje larva, nymfa a dospělý jedinec. Vektorem v USA je *Ixodes scapularis* a *I. pacificus*, v Evropě a severní Africe je to *I. ricinus* a *I. persulcatus* v Asii (Halperin 2011).

Souhrnné označení pro druhy borelií je *Borrelia burgdorferi* sensu lato (Bbsl). Ve Spojených státech je toto onemocnění způsobeno *Borrelia burgdorferi* sensu stricto (Bbss). V Evropě je způsobeno patogenními *Borrelia afzelii*, *B.garinii*, *B. valasiana* a *B. burgdorferi* sensu stricto. V Asii jsou původci lymeské boreliózy *B. afzelii* a *B. garinii*. Příležitostně může být způsobeno jinými druhy, jako je *Borrelia spielmani*. Všechny jsou přenášeny tvrdými klíšťaty rodu *Ixodes* (Steere 2001; Bartůněk et al. 2006; Cook 2015, Derdáková et al. 2003).

3.1.2 Rod *Borrelia*

Borelie se taxonomicky řadí do kmenu Spirochaetes, třídy Spirochaetes, řádu Spirochaetales, čeledi Spirochaetaceae, rod *Borrelia*. Do čeledi Spirochaetaceae se také řadí původce onemocnění syfilis *Treponema*.

Spirochety *Borrelia burgdorferi* jsou mikroaerofilní, gramnegativní bakterie, spirálovitě vinutého tvaru o rozměrech 0,5 x 3–20 µm. Buňky jsou spirálovitě stočené se 4 až 15 pravidelnými závití vzdálenými 2,2 µm. Buňky se pohybují rotací kolem podélné osy nebo smršťováním a natahováním. Bičíky obtáčejí tělo buňky pod vnější vrstvou a nevyčnívají do okolního prostředí. Buněčná stěna se skládá ze tří vrstev, vnější lipoproteinové, střední glykolipidové a vnitřní peptidoglykanové. Bičíky tvoří axiální vlákno, které zřejmě umožňuje vývrtkovitý pohyb skrz prostředí. *B. burgdorferi* má neobvyklý metabolismus týkající se chybění enzymů obsahujících železo. Železo je zde nahrazeno manganem (Bauchman 2006, Bartůněk et al. 2006).

Rozlišení spirochét v pulzní gelové elektroforéze podle sekvenčního uspořádání chromozomové DNA umožnilo rozlišení na druhy *Borrelia burgdorferi* sensu stricto zahrnující všechny americké kmeny a *B. afzelii*, *B.garinii* a *B. japonica*. *B.turdi*, *B.tunukia* a *B. sinica* byly izolovány v jihovýchodní Asii. Dalšími druhy objevenými v Evropě jsou *B.valaisiana*, *B. lusitaniae* a *B.andersonii*. V USA objevené druhy *B. bisettii* a *B. miyamotoi* byly následně izolovány ve Slovinsku, Švédsku a ČR. Celkový termín pro genospecies komplexu je *Borrelia burgdorferi* sensu lato (Bartůněk et al. 2006, Gray et al. 2002)

Přehled druhů rodu *Borrelia*

	Druh	Poznámka	Citace
1	<i>Borrelia afzelii</i>	Patogenní Evropa	
2	<i>Borrelia americana</i>		
3	<i>Borrelia andersonii</i>	Nepatogenní Sev. Amerika	
4	<i>Borrelia anserina</i>		
5	<i>Borrelia baltazardii</i>		
6	<i>Borrelia bavariensis</i>	Nepatogenní Evropa	
7	<i>Borrelia bissetii</i>		
8	<i>Borrelia brasiliensis</i>		
9	<i>Borrelia burgdorferi sensu stricto</i>	Patogenní Sev. Amerika	
10	<i>Borrelia carolinensis</i>	Nepatogenní Sev. Amerika	
11	<i>Borrelia caucasica</i>		
12	<i>Borrelia coriaceae</i>		
13	<i>Borrelia crocidurae</i>		
14	<i>Borrelia dugesii</i>		
15	<i>Borrelia duttonii</i>		
16	<i>Borrelia garinii</i>	Patogenní Evropa, Asie	
17	<i>Borrelia graingeri</i>		
18	<i>Borrelia harveyi</i>		
19	<i>Borrelia hernii</i>		
20	<i>Borrelia hispanica</i>		

21	<i>Borrelia japonica</i>	Nepatogenní Asie	
22	<i>Borrelia kurtenbachii</i>		
23	<i>Borrelia latyschewii</i>		
24	<i>Borrelia lusitaniae</i>	Nepatogenní Evropa	
25	<i>Borrelia mazzottii</i>		
26	<i>Borrelia miyamotoi</i>		
27	<i>Borrelia parkeri</i>		
28	<i>Borrelia persica</i>		
29	<i>Borrelia recurrentis</i>		
30	<i>Borrelia sinica</i>	Nepatogenní Asie	
31	<i>Borrelia spielmanii</i>	Patogenní Evropa	
32	<i>Borrelia tanukii</i>	Nepatogenní Asie	
33	<i>Borrelia theileri</i>		
34	<i>Borrelia tillae</i>		
35	<i>Borrelia turcica</i>	Nepatogenní Asie	
36	<i>Borrelia turdi</i>	Nepatogenní Asie	
37	<i>Borrelia turicatae</i>		
38	<i>Borrelia valaisiana</i>	Nepatogenní Evropa	
39	<i>Borrelia venezuelensis</i>		
40	(<i>Borrelia texasensis</i>)		

(URL 1)

3.1.3 Genom.

Genom borelií je komplexní a skládá se z malého lineárního chromozomu o délce 910 725 kilobází. Borelie mají variabilní počet kruhových a lineárních plazmidů, typicky 12 lineárních a 9 kruhových. Plazmidy obsahují geny určující tvorbu všech povrchových proteinů Osp. Tyto proteiny jsou důležité pro přežití borelií v hostiteli. Jako první publikovala kompletní genomovou sekvenci *Borrelia burgdorferi* kmene B31 Feserová v roce 1997. Významným faktem je, že existuje sekvence pro více než 100 známých nebo očekávaných lipoproteinů, to je více než kterýkoli jiný organismus.

Pohyblivost je pro borelie zásadní, jsou proto důležité geny pro flagelární struktury, která umožňuje pohyb skrz viskózní povrch. Spirochéty mají málo genů pro syntézu proteinů s biosyntetickou aktivitou, jsou proto závislé na svém hostiteli. Jejich kultivace je proto velmi náročná. Borelie nemají sekvenci pro žádný známý toxin (Halperin 2011, Steere 2006, Fraser et al. 1997).

3.1.4 Vnější povrchové proteiny

Odlišnosti borelií jsou dány genotypem i fenotypem každého druhu a tím se liší i antigenní struktury a imunogenní i patogenní vlivy na hostitele. Antigenní determinanty určující citlivost i specifitu sérologických testů se odlišují i v rámci jednoho druhu. Tuto variabilitu určují regulační geny *Borrelia direct repeat* (Bdr), které umožňují rychlé přizpůsobení změnám prostředí. Vnější povrchové proteiny borelií se označují jako Osp. OspA je dominantním antigenem, který se projevuje ve středním střevě klíštěte během vegetačního klidu. Ve slinných žlázách je vlivem Bdr genu potlačen. Jeho přítomnost je podmínkou pro přežití uvnitř klíštěte, protože usnadňuje adhezi spirochét ve střevě. Pokud hostitel obsahuje sérové protilátky proti OspA antigenu mohou při pohlcení krve klíštětem neutralizovat borelie obsažené pouze v jeho střevě. Pokud jsou borelie ve slinných žlázách, funkce OspA genu je potlačena a protilátky již borelie nezničí. Když se klíště přisaje na hostitele, je tvorba OspA potlačena a borelie se připravuje na cestu ze střeva přes hemocoel do slin klíštěte

a odtud do hostitelovy krve. Ve stejný okamžik se zvyšuje produkce OspC. Expze OspC a infekčnost se postupně zvyšuje za několik dní poté, co spirochety napadly hostitelské tkáň. Důležitým regulačním faktorem expze OspA a OspC je teplota okolního prostředí. OspC není přítomen při nízkých teplotách a vyskytuje se při 34–37 °C. To znamená, že již při pohybu klíštěte po povrchu hostitele před přisátím se aktivuje expze OspC (Bartůněk et al. 2006, Steere 2006).

3.1.5 Patogeneze

Po přisátí aplikuje klíště komplexní směs bioaktivních chemikálií do hostitele, jako je protein vázající histamin, inhibitory cytokinů, komplementu a antikoagulanty. Klíště nepozorovaně saje a sliny infikované boreliemi se dostávají do hostitele. Spirochéty jsou schopny proniknout neporušenou kůží hostitele, jiné způsoby přenosu jsou raritní.

Borelie je velmi pohyblivá a invazivní bakterie, která se rychle šíří z místa kousnutí klíštěte. Její tvar a vnější povrchové proteiny umožňují prostupovat vrstvou endotelových buněk. Kromě toho borelie vážou hostitelův plazminogen, který pomáhá šířit se v organismu prostřednictvím tkáňové matrix (Kuthejlová et al. 2001, Steere 2006, Bartůněk et al. 2006).

Imunitní odpověď hostitele

U většiny osob infikovaných boreliemi dochází k indukci obranných imunitních mechanismů, které je eliminují. Osoby, které nejsou schopny eliminovat patogenní borelie, podléhají rozvoji multiorgánového zánětlivého onemocnění. Dochází ke spuštění deregulovaných obranných reakcí, které poškozují tkáň hostitele. Borelie mohou být uvnitř hostitele lokalizovány extracelulárně i intracelulárně, v buňkách monocyto-makrofágové linie, fibroblastech a endotelových buňkách, a tak unikat imunitnímu dozoru.

Po napadení těla hostitele dochází spirochetálními lipoproteiny k aktivaci makrofágů, endotelových buněk, neutrofilů a B-lymfocytů. Makrofágy následně uvolňují prozánětlivé cytokiny, včetně TNF- α a IL-1 β a některé IFN- γ . Dochází také k modulaci adhezivních molekul ze skupiny selektinů a členů velké imunoglobulinové

rodiny. Protilátková odpověď je spuštěna již v prvních dnech infekce, protilátky jsou však prokazatelné až po několika týdnech. Jako první začíná obvykle tvorba protilátek třídy IgM, na kterou po dvou až čtyřech týdnech naváže tvorba IgG. Spektrum protilátek se může v závislosti na hostiteli i formě onemocnění lišit.

Borelie jsou schopny spustit přirozenou i specifickou imunitní odpověď hostitele. Imunitní odpověď je však značně ovlivňována působením tlumivých faktorů uvolňovaných při sání klíštěte, a také změnami biologických vlastností patogenních borelií při přechodu do hostitele.

Za většinu poškozených buněk jsou zodpovědné Th1 lymfocyty. Na poškození hostitele se podílejí i protilátky reagující například s bílkovinami CNS nebo gangliosidy (Steere 2006, Krejsek a Kopecký 2004, Bartůněk et al. 2006).

3.1.6 Onemocnění

Lymeská borelióza

Průběh infekce může být chronický nebo relabující, borelie mohou navodit imunopatologické procesy.

Rozděluje se na 3 fáze infekce. V počátečním stádiu časné místní infekce převažují změny pokožky. Následuje afekce lymfatických uzlin, jako odezva na přítomnost spirochét, které vyvolávají místní i celkovou zánětlivou reakci. Při dalším rozvoji dochází ke vzniku zánětlivého diseminovaného, generalizovaného stádia. Základní projevy lymeské boreliózy jsou, až na regionální rozdíly, obdobné po celém světě. Jedná se o komplexní infekci s řadou projevů, jako jsou kožní léze zvané erythema migrans, kloubní, neurologické, srdeční projevy, postižení oka a další (Feder et al. 2008, Paola a Raoult 2001).

Postižení kůže ve formě **erythema migrans** nejvíce charakterizuje první stadium onemocnění a představuje 85 % všech kožních projevů. Vyskytuje se u většiny postižených lymeskou boreliózou během 1–3 týdnů bez ohledu na věk nebo pohlaví. Rozvíjí se na místě přisátí klíštěte v rozmezí 1 dne až více než měsíc. Jedná se o červenou plazící se vyrážku s terčovým vzorem nebo bez něj s hladkým povrchem

o velikosti minimálně 5 centimetrů v průměru (Bartůněk et al. 2006, Wetter a Ruff 2011).

Boreliový lymfocytom je kožním projevem u druhého stádia, společně s erythema migrans. Je nejmenším charakteristickým znakem lymeské boreliózy o velikosti od několika milimetrů do 3–5 centimetrů. Jedná se o lokalizovanou papuli nebo plak červené až fialové barvy. Do druhého stádia se řadí také postižení srdce ve formě myokarditidy nebo myoperikarditidy. Při postižení očí dochází ke konjunktivitidě (Bartůněk et al. 2006, Nadal et al. 1988).

Třetí fáze onemocnění, pozdní nebo přetrvávající, se vyskytuje v řádech měsíců až let od počátku onemocnění. Postižením kůže u třetího stádia lymeské boreliózy může být **acrodermatitis chronica atrophicans**. Lokalizuje se převážně na extenzorové části končetin. Projevuje se jako pomalé progresivní onemocnění, nejprve ve formě akutního zánětu kůže s červenými makulami s prosáknutím. Po měsících dochází k přechodu na atrofickou fázi. Dochází k mizení elastických vláken a dilataci cév (Nadal 1988, Ohlenbusch 1996, Bartůněk a kol. 2006). Třetí fáze bývá spojena s otoky kloubů, bolestmi, únavou, očními příznaky, jako je keratitida, a neurologickými příznaky. Mezi neurologické příznaky lze zahrnout chronickou anoxální neuropatii, encefalopatii a encefalomyelitidu (Paola a Raoult 2001, Bartůněk et al. 2006, Nadal et al. 1988).

Onemocnění relabující horečkou

Borelie způsobující návratnou horečku lze rozdělit do epidemické formy, kde je přenašečem veš nesoucí *Borrelia recurrentis*, dále do formy endemické způsobené různými druhy borelií přenášenými měkkými klíšťaty rodu *Ornithodoros*. Do třetí skupiny, zde jsou přenašeči tvrdá klíšťata, patří *Borrelia miyamotoi*, *B. lonestaria* a *B. texasesnsis*, izolované z *Ixodes persulcatus*. Vyznačuje se opakujícími záchvaty horečky s bolestmi hlavy a nevolnostmi (Elbir et al. 2013, Forrester et al. 2015, Halperin 2011).

3.1.7 Laboratorní diagnostika *Borrelia burgdorferi*

Klinické příznaky by měly být základem pro diagnostiku lymeské boreliózy. Typické symptomy jako erythema migrans ulehčují prognózu, pokud jsou však příznaky neurčité, mají jen omezenou hodnotu pro diagnostiku.

Základní rozdělení laboratorních metod je na metody nepřímé a přímé. Mezi nepřímé metody pro identifikaci boreliové infekce lze zařadit sérologické metody nepřímou imunofluorescencí IFAT (imunofluorescence antibody test) a zjišťování protilátek imuno-enzymatickou metodou ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay). Stanovení protilátek IgM a IgG proti boreliím pomocí ELISA testu nebyla nikdy standardizována. Výsledky z různých laboratoří jsou proto velmi těžko porovnatelné (Štěpánová-Tresová et al. 2000, Robertson et al. 2000).

Mezi přímé metody se řadí mikroskopie, kultivace, dále metody histologické, elektrooptické a metody polymerázové řetězové reakce (PCR). Kultivace borelií je poměrně časově i finančně nákladná. Ke kultivaci je potřeba vysoce obohacených půd a také sterilní koňské a králičí sérum prosté protilátek. Kultivace se provádí z biopsie kůže z oblasti erythema migrans. Detekce boreliální DNA pomocí PCR je důležitá pro svou citlivost a specifčnost. Dokáže prokázat i méně než 10 borelií ve vzorku. Princip této metody je založen na cyklickém zmnožování cílové DNA sekvence za pomoci štěpení dvouřetězce. Následuje vazba synteticky připravených oligonukleotidových primerů na známý okraj sekvence. Pomocí termostabilní Taq polymerázy a za přítomnosti nadbytku deoxynukleosidtrifosfátů dochází k syntéze komplementárního vlákna. Opakováním tohoto cyklu 25x se získá asi milion kopií, které se prokáží v gelové elektroforéze (Parola a Raoult 2001, Gray et al. 2002, Bartůněk et al. 2006).

3.2 Protilátky

Protilátky jsou imunoglobuliny, které produkuje konečné stádium diferenciaci B lymfocytů neboli plazmatické buňky. K tomu, aby B lymfocyt začal produkovat protilátky, musí být stimulován antigenem. T-nezávislé antigeny, které jsou většinou polysacharidového charakteru, mohou stimulovat přímo B lymfocyt. U většiny antigenů (převážně proteinového charakteru) musí být nápomocen T lymfocytární systém, jinak by k diferenciaci na plazmatickou buňku a tvorbě protilátek nedošlo.

Povrchové imunoglobuliny na B lymfocytech se nazývají BCR (B-cell receptor), v případě T lymfocytu TCR (T-cell receptor). Protilátky pocházející z jedné plazmatické buňky mají stejnou afinitu jako BCR původního B lymfocytu. BCR vzniká během diferenciaci B lymfocytů genetickými procesy a umožňuje B lymfocytu rozeznat antigenní podněty.

3.2.1 Vývoj B lymfocytů

Lymfocytární řada podstupuje díky své účasti v imunitním systému velmi složitý vývoj. Celý proces je možné rozdělit do tří fází. Vývoj bez přítomnosti antigenu, vývoj s antigenní stimulací a diferenciaci do konečného stádia aktivovaného B lymfocytu za vzniku plazmatické buňky produkující protilátky.

Vývoj bez přítomnosti antigenu je zajištěn v kostní dřeni. Prekurzorem B lymfocytární řady jsou progenitorové buňky. Tyto buňky na svém povrchu exprimují molekulu CD34 typickou pro krvetvorné kmenové buňky, dále molekuly HLA DR a pan leukocytární molekulu CD 45. V cytoplazmě vyžívajících B lymfocytů se nacházejí molekuly CD79a a CD22. Specifický membránový znak CD19 se vyskytuje na B lymfocytech během celého vyžívání nezávislého i závislého na antigenu. Tuto molekulu B lymfocyt ztrácí až ve stádiu plazmatické buňky.

Bezprostřední kontakt se stromálními buňkami kostní dřeně je pro vývoj B lymfocytů nezbytný. Cytokin SCF (stem-cell faktor) tvořený stromálními buňkami je nezbytný pro vyžívání velmi raných stádií B lymfocytů.

V oblasti pod vnějším povrchem kosti nazývané subendotel jsou lokalizována nejčasnější stadia vývoje B lymfocytu. Po ukončení vývoje nezávislém na antigenu jsou exportovány do sekundárních lymfatických orgánů.

Stádium proB lymfocytu je nejranějším stádiem diferenciaci B lymfocytů a je pro něj typická exprese molekuly CD10 a CD38. V tomto stádiu dochází k produkci těžkého řetězce μ v cytoplasmě. Tuto produkci zajišťují genové segmenty D a J a později i V segment, jejichž postupné přeskupení zajišťují rekombinázové enzymy Rag-1 a Rag-2. Genové segmenty, které kódují lehké řetězce, se v tomto stádiu nepřeskupují. Na povrch je těžký řetězec μ transportován ve stadiu preB lymfocytu. Je zde vyjádřen s nepřeskupeným, dočasným lehkým řetězcem označovaným jako VpreB/ λ 5. Takto je vytvořen provizorní preB receptor pro antigen.

Působením rekombinázových systémů Rag-1 a Rag-2 dochází k přeskupení genových segmentů V a J kódujících lehký řetězec. Poté se dostává kompletní řetězec IgM na povrch B lymfocytu. Od této diferenciaci úrovně se buňka označuje jako nezralý B lymfocyt, který na svém povrchu vyjadřuje molekulu CD40. Nezralé B lymfocyty podstupují selekční procesy, které eliminují autoreaktivní buňky a testuje se jejich schopnost přežít v periferních lymfatických tkáních.

Buňky, které úspěšně prošly všemi těmito procesy, se označují jako naivní zralé B lymfocyty a recirkulují mezi periferními lymfatickými tkáněmi, dokud se nesetkají s příslušným antigenním podmětem. Tyto buňky mají na svém povrchu vyjádřeny molekuly IgM a receptor typu IgD, které slouží ke specifickému rozpoznávání antigenů. Společně s dalšími membránovými molekulami vytvářejí multimolekulový komplex, který zajišťuje přenos aktivačního signálu z receptoru pro antigen do nitra B lymfocytu. Pro aktivaci a proliferaci zralého B lymfocytu je zapotřebí odpovídající antigenní stimulace, která je poskytnuta v lymfatických tkáních.

Plazmatická buňka je konečné stádium diferenciaci B lymfocytů. Nachází se především v sekundárních lymfoidních orgánech a tvoří protilátky se stejnou specifitou

jakou má BCR daného B lymfocytu. Plazmatické buňky již ztrácí schopnost proliferace (Penka et al. 2011, Krejsek a Kopecký 2006).

3.2.2 Thymus independentní protilátková odpověď

Určitá skupina antigenů je schopna indukovat tvorbu protilátek přímo, bez spoluúčasti T lymfocytů. Jedná se především o tvorbu nízkoafinních protilátek třídy IgM. Antigeny z této skupiny se označují TI (Thymus Independent), antigeny nezávislé na thymu. Jedná se mikrobiální polysacharidy, lipopolysacharidy a polymerní formy bílkovin. Rozděluje se na dvě skupiny. První podskupina, která je označována jako TI-1, stimuluje přímo B lymfocyty a indukuje jejich proliferaci a diferenciaci. Tyto antigeny ve vysokých koncentracích se váží na receptor pro lipopolysacharidy a způsobují tak nescifickou stimulaci velkého množství B lymfocytů a také produkci protilátek. Antigeny podskupiny TI-1 působí jako mitogenní látky a stimulují polyklonální aktivaci zralých i nezralých B lymfocytů.

Druhá podskupina antigenů se označuje jako TI-2. Jedná se o bakteriální kapsulární polysacharidy složené z mnohokrát opakovaných základních jednotek. Tyto antigeny jsou schopny stimulovat pouze zralé B lymfocyty. Protilátky tvořené tímto způsobem jsou velmi důležité, protože kapsulární sacharidové bílkoviny jsou typické pro velmi významné mikrobiální patogeny, jako jsou opouzdřené mikroorganismy z rodu *Haemophilus*, *Streptokokus* a další (Hořejší 2013, Krejsek a Kopecký 2004, Coutinho 1974).

3.2.3 Thymus dependentní protilátková odpověď

Dokud se zralý B lymfocyt neseťká s antigenem, nazývá se naivní B lymfocyt. Většina antigenů tyto buňky těžko aktivuje, proto je zapotřebí kooperace s T lymfocyty. Na základě antigenně specifického receptoru BCR na B lymfocytu je tato buňka

schopna pohlitit dotyčný antigen a rozštěpit na peptidové fragmenty. Tyto antigenní fragmenty se navážou na molekuly HLA II. třídy a jsou prezentovány T lymfocytům stejné specifity jako dotyčný B lymfocyt. Aby došlo ke komunikaci mezi T lymfocyttem a B lymfocyttem, je třeba imunologické synapse. Stejně komplexy HLA II. třídy se tak objevují na povrchu antigen prezentujících buněk, které iniciují vznik příslušného klonu T lymfocytu. Dochází ke specifické, přímé pomoci T lymfocytů, jejichž TCR rozeznává stejný antigen jako BCR. Kromě BCR i molekuly CD19, receptory pro složky komplementu CD21 a CD81, výrazně zesilují odpověď B lymfocytů.

K úplné aktivaci B lymfocytu dochází až po interakci mezi molekulami CD40 na B lymfocytu a CD 154 (CD40L) exprimovaných na aktivovaném T lymfocytu. Tak se opět vytváří imunologická synapse. Jako první se tvoří imunoglobulin třídy IgM, který slouží jako součást BCR, a také je produkován do okolí. K produkci dalších tříd imunoglobulinů musí docházet po složitém procesu izotypového přepnutí syntézy těžkých řetězců imunoglobulinů. Aby došlo k tomuto procesu, musí být zprostředkována vazba molekul CD40 a CD40L. Pokud nedojde k této interakci, nemůže dojít k izotypovému přepnutí a dochází k produkci protilátek jen ve třídě IgM (Hořejší et al. 2013, Krejsek a Kopecký 2006, Gong et al. 2009).

3.2.4 Polyklonální protilátky

Polyklonální protilátky jsou směsicí stovek či tisíců odlišných nebo podobných molekul imunoglobulinů.

3.2.5 Monoklonální protilátky

Nejdůležitějším krokem v přípravě monoklonálních protilátek bylo v šedesátých a sedmdesátých letech 20. století zkonstruování hybridomu Cesarem Milsteinem a Georgem Kohlerem (Kohler a Milstein 1975, Nature 256: 495). Jejich objevu

předcházela myšlenka Nielse Kaj Jerneho o regulacích specifické imunity a tvorbě protilátek (Krejsek a Kopecký 2006).

Hybridomová technologie

Monoklonální protilátky jsou monovalentní imunoglobuliny, které se váží na stejný epitop a pocházejí z klonů jednoho B lymfocytu. Poprvé byly vyrobeny z myši v roce 1975 pomocí hybridomové technologie. Proces výroby hybridomů zahrnuje imunizaci antigenem proti určitému druhu epitopu pro získání B lymfocytů ze sleziny. Získané B lymfocyty se následně fúzí s buňkami myelomové linie neprodukujícími protilátky. Myelomové buňky nemají gen pro tvorbu enzymu hypoxantin-guanin fosforibosyl transferázy (HGPRT). Hybridomové buňky, které získaly HGPRT od lymfocytů, jsou následně kultivovány v selekčním mediu obsahujícím hypoxantin, aminopterin a thymidin. V tomto mediu jsou schopny přežít jen hybridomové buňky. Nesfúzované B lymfocyty se *in vitro* nemnoží a postupně hynou. Nesfúzované myelomové buňky nemohou syntetizovat DNA, protože aminopterin blokuje syntézu nukleotidů. Počáteční kultura hybridomů produkuje směs protilátek odvozených z mnoha různých B lymfocytů, z nichž každý vylučuje své vlastní protilátky. Každý jednotlivý klon je proto nutné oddělit ředěním do různých kultivačních jamek. Media jsou následně testována na produkci specifických protilátek. Dále se provádí charakterizace protilátek. Vytvořené hybridomy mohou být dlouhodobě skladovány v tekutém dusíku (Liu 2014, Kaur 2006).

3.2.6 Využití monoklonálních protilátek

Monoklonální protilátky mají široké biotechnologické využití. Již v 80. letech minulého století byl velký zájem o studie využití myších monoklonálních protilátek k léčbě leukémie a lymfomů. Některé studie z té doby prokázaly, že infuze monoklonální protilátky je schopna rychle a specificky odstranit leukemické buňky z periferní krve. Docházelo však k lýze protilátek *in vivo*, z důvodu cirkulujících antigenů, reaktivitě protilátek s normálními buňkami, imunitní odpovědi na myší protilátky a dalších.

V dnešní době je k léčbě schváleno používání více než 14 monoklonálních protilátek, samostatných nebo nesoucí antibiotika či radioaktivní izotopy.

Protilátky se také využívají jako nosiče různých látek jako jsou léky, cytotoxické látky (Ritz a Schlossman 1982, Vacchelli et al. 2013).

V diagnostice se využívají ke stanovení malých množství drog, toxinů či hormonů. Lze díky nim klasifikovat kmeny jednoho patogenu (URL 2).

4 Hypotézy

Hypotéza:

Příprava monoklonálních protilátek proti antigenům borelie.

5 Materiál a metody

5.1 Adjuvantní imunizace myši

Materiál:

Myši: BALB/c (ANCLAB Praha), dospělá samice SPF

Antigen: sonikovaný antigen z *Borrelia afzelii*, kmen CB 43 (435 µg proteinu/ml)

Metoda:

Myši byly imunizovány 100 µg proteinu spolu s kompletním Freundovým adjuvans aplikovaným intraperitoneálně (i.p.). Druhá dávka, 100 µg proteinu s inkompletním Freundovým adjuvans byla podána i.p. za 14 dnů po první dávce, třetí dávka obsahovala samotný antigen (100 µg) a byla podána 2 týdny po druhé dávce opět i.p. 3 dny po poslední dávce antigenu byla provedena fúze.

5.2 Testování odebrané krve na přítomnost specifických protilátek metodou ELISA

Materiál:

Vzorek myšního séra získaného z posledního článku myšního ocásku

Mikrotitrační destička 96 jamková s plochým dnem (Nunc, Dánsko)

Boreliový antigen CB 43

Vazebný roztok – 1,59 g Na₂CO₃; 2,93 g NaHCO₃ v 1l H₂O, pH 9,6

Blokovací pufr – 5% PTS v PBS

Promývací roztok – 0,05% Tween v PBS (T-PBS)

Ředící roztok – 2% PTS v PBS

Antimyšší protilátka značená peroxidázou (SwAM/Px, Abcam, UK)

Substrátový roztok – 5ml fosfocitrátového pufru, 2mg Ortho-phenylenediamine (OPD),

2 µl 30% H₂O₂

2M H₂SO₄

Metoda:

Tato metoda slouží k detekci specifických protilátek v séru nebo jiných tělních tekutin. Pokud je v testovaném vzorku přítomna protilátka, naváže se na ni enzymaticky značená sekundární protilátka. V přítomnosti substrátu vzniká barevný produkt, který se měří spektrofotometricky. Velikost absorpance je úměrná množství protilátky ve vzorku.

Pomocí vazebného roztoku se naváže 50 μl boreliového antigenu o koncentraci 10 $\mu\text{l/ml}$ na dno každé jamky mikrotitrační destičky. Po inkubaci přes noc při 4 °C ve vlhké komůrce se panel vysuší poklepem na filtrační papír. Nespecifické vazby se vyblokuje působením blokovacího pufru. Do každé jamky se nanese 100 μl blokovacího pufru. Následuje inkubace ve vlhké komůrce při 37 °C po dobu 45 minut. Po inkubaci se panel třikrát promyje promývacím roztokem T-PBS. V dalším kroku se do první jamky nanese 100 μl testovaného myššího séra naředěné 1:100 v ředicím roztoku. Do ostatních jamek v této řadě destičky se nanese 50 μl ředicího roztoku a vzorek se rozředí dvojkovou řadou. Po inkubaci po dobu 45 minut při 37 °C se panel třikrát promyje promývacím roztokem T-PBS. Do každé jamky se přidá 50 μl anti-myšší protilátky značené peroxidázou, která je ředěná v ředicím roztoku 1:1000. Nastává poslední inkubace po dobu 45 minut a 37 °C, po které následuje trojí promytí T-PBS. V další fázi se vyvolá enzymatická reakce. Substrát se připravuje těsně před použitím a nanáší se 50 μl do každé jamky. Podle intenzity zbarvení se reakce po 5–10 minutách zastaví 100 μl 2M H_2SO_4 . Absorbance se měří na vertikálním spektrofotometru (ELx 800 Fluorescence mikroplatereader, BioTek) při vlnové délce 490 nm.

5.3 Fúze slezinných buněk s myelomovými buňkami

Díky hybridomové technologii je možno spojit dvě buňky s odlišnými vlastnostmi. Zdrojem protilátek jsou krátce žijící, zralé B-lymfocyty. Nádorové myelomové buňky, které vznikají maligní transformací plazmatické buňky, dávají vzniklému hybridomu možnost „nekonečného“ dělení.

Material:

Imunizovaná myš BALB/c s dostatečným titrem protilátek v séru

Myelomová linie – myší myelom SP 2/0-Ag 14, který neprodukuje protilátky a pochází z myši BALB/c. Tyto buňky se kultivují v mediu RPMI-1640 s 5% bovinního fetálního séra (bofes) a antibiotiky (PNC, SMC)

Kultivační destičky 96 jamek pro tkáňové kultury (Nunc, Dánsko)

Media:

RPMI-1640 bez séra a ATB

RPMI-1640 s 10% bofes, 2-merkaptóetanol, ATB, HAT (hypoxantin, aminopterin, tymidin) (vše Sigma-Aldrich)

Roztok polyetylen glykolu – PEG 1500 (Sigma-Aldrich)

Metoda:

Myš BALB/c se v éterové narkóze nechá vykrváct a usmrtí zlomením vazů. Sterilně se vyjme slezina a vloží do media bez séra. Splenocyty se získají protlačením sleziny přes sítko a dvakrát se promyjí mediem bez séra pomocí centrifugace při 1000 ot./min. po dobu 5 minut.

Myelomové buňky by měly být v logaritmické fázi růstu, je proto nutné jim den před fúzí vyměnit medium. Buňky se dvakrát promyjí mediem bez séra v graduované centrifugační zkumavce.

Na jednu fúzi by se mělo použít asi 10^8 splenocytů a 3×10^7 myelomových buněk. Promyté myelomové buňky se smíchají se splenocyty a tato směs buněk o objemu přibližně 50ml se centrifuguje v graduované centrifuze rychlostí 1000 ot./min. po dobu 7 minut. Supernatant se odsaje do sucha a centrifugační zkumavka s buňkami se ponoří do vodní lázně o teplotě 37-39 °C. Za stálého míchání se během jedné minuty k buňkám nakape 1 ml vytemperovaného roztoku PEG 1500. Buňky se následně opatrně promíchávají ještě další minutu. Po promíchání se ke směsi přikapává za stálého míchání 10 ml vytemperovaného media bez séra po dobu 10 minut. Následně se buňky centrifugují rychlostí 1000 ot./min. po dobu 7 minut. Zcentrifugované buňky se resuspendují ve 100 ml kultivačního media s HAT a rozkapou po 200 μ l do deseti 96jamekových panelů. Inkubace probíhá při teplotě 37 °C a 5%CO₂.

Za 3-4 dny se začínají objevovat drobné kolonie hybridomových buněk. Po 5-6 dnech po fúzi se vymění polovina media za nové kultivační medium s HAT – pasážování.

5.4 Kultivace hybridomů v selektivním (HAT) médiu

Materiál:

RPMI-1640 s 10% bofes, 2-merkaptotanol, ATB, HAT (hypoxantin, aminopterin, tymidin, Sigma-Aldrich)

RPMI-1640 s 10% bofes, 2-merkaptotanol, ATB, glutamin, HT (hypoxantin, tymidin)

Sterilní destičky 96 jamek s plochým dnem (Sigma-Aldrich)

Metoda:

Odstranění nesfúzovaných buněk zajistí selektivní medium obsahující hypoxantin, aminopterin a thymidin. Aminopterin blokuje syntézu purinů a tím i syntézu DNA. V mediu jsou schopny přežít jen buňky vybavené enzymem hypoxantin-guanin fosforibosyl transferázou (HGPRT) a thymidin kinázou. Tento enzym umožňuje zapojení náhradní dráhy syntézy nukleotidů. Myelomové buňky tento enzym nemají a hybridomové buňky ho získávají od lymfocytů. Nesfúzované lymfocyty se *in vitro* nemnoží a postupně hynou.

Po dostatečném pomnožení hybridomů je třeba pasáž do nového media. Kdyby se vyčerpala energetická zásoba media, došlo by ke zničení buněk. Pasáž je proces, kdy se ve sterilním prostředí v boxu s laminárním prouděním přenesou přibližně 50-100 μ l buněk do nové 24jamkové destičky s 1 ml media s HT. Destička by měla být řádně označena, aby nedošlo k záměně vzorků. Tento proces se opakuje podle rychlosti růstu buněk, přibližně po 2-3 dnech. Inkubace probíhá při 37 °C a 5%CO₂.

5.5 Testování produkčních hybridomů metodou ELISA

Neředěné medium z jamek s rostoucími koloniemi hybridomů se testuje na přítomnost protilátek metodou ELISA.

Pozitivní hybridomy se pasážují za sterilních podmínek do 24jamkových panelů v kultivačním mediu s HT.

5.6 Mrazení produkčních hybridomů

Buňky se mohou zálohovat zmrazením. V tekutém dusíku je možno buňky uskladňovat po velmi dlouhou dobu.

Materiál:

Medium RPMI s 10% bofes, ATB, glutamin, merkaptoetanol

Mrazicí roztok dimethylsulfoxid (DMSO) – SigmaAldrich

Centrifugační zkumavky

Kryozkumavky

Metoda:

Jeden až pět milionů hybridomových buněk se centrifuguje po dobu 5 minut při 1000 otáčkách. Supernatant se slije a k sedimentu se přidá 900 μ l media. Směs se přenesou do kryozkumavky a přidá se 100 μ l mrazicího roztoku, který brání rozpadu buněk při zmrazení. Mrazicí roztok je pro buňky toxický, proto je nezbytné směs ihned zmrazit. Kryozkumavky s buňkami se zmrazí na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 3-4 hodiny ve zmrazovacím zařízení (rychlostí přibližně $1\text{ }^{\circ}\text{C}$ za minutu) a následně se přenesou do tekutého dusíku o teplotě $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$.

5.7 Klonování produkčních hybridomů metodou limitního ředění

Monoklonální protilátky, které mají jen jednu specifitu a jsou jednoho izotypu, jsou produkovány jedním klonem hybridomových buněk.

Material:

sterilní 96jamkové destičky (Nunc, Dánsko)

kultivační medium s HT.

Metoda:

Buňky obarvené trypanovou modří se spočítají v Bürkerově komůrce. Ředění se provádí tak, aby v jedné jamce, tedy ve 200 μ l, byla jen 1 nebo 5 buněk. Nejprve se naředí 48 buněk pro koncentraci jedna buňka na jamku a po 200 μ l se rozpipetuje do poloviny mikrotitrační destičky. Do druhé poloviny destičky se napipetuje 200 μ l media po pěti buňkách, to znamená, že v 9600 μ l media je 240 buněk.

Za 7-10 dnů se panely prohlížejí pod imerzním mikroskopem a vybírají se jamky jen s jednou kolonií. Tyto kolonie se testují na produkci protilátek. Pozitivní kolonie se pasážují do 24jamkových panelů.

5.8 Produkce monoklonálních protilátek do kultivačního media

Hybridomové buňky kultivované *in vitro* produkují protilátky do kultivačního media. Medium z kultivační lahve se zcentrifuguje, čímž se odstraní buňky a nečistoty. Následně se uchová zmrazené ve zkumavkách.

Monoklonální protilátky je možno získat také ve formě ascitických tekutin. Hybridomové buňky se inokulují do peritonea myši, kde se vytvoří ascit obsahující monoklonální protilátky.

5.9 Purifikace a zkoncentrování monoklonálních protilátek

K čištění monoklonálních i polyklonálních protilátek se nejčastěji používá protein A a protein G ve chromatografii. Pro snadné a rychlé čištění protilátek je určena sada Montage Antibody Purification Kit and Spin Columns with PROSEP – A Media. (MerckMillipore, Německo)

Material:

2 kolonky obsahující imobilizovaný protein A s kapacitou 20ml

Vazebný pufr A – 1,5 M glycin/NaOH, 3 M NaCl, pH 9,0

Vymývací pufr B1 – 0,1 M citát sodný, pH 5,5

Vymývací pufr B2 – 0,2 M glycin/HCl, pH 2,5

Neutralizační pufr C – 1 M Tris [tris(hydroxymethyl) aminomethan, THAM] /HCl, pH 9,0

Metoda:

Pro vytemperování kolonky se použije 10 ml pufru A. kolonka se vloží do centrifugační zkumavky a centrifuguje se při 500 x g po dobu 5 minut. Pufr, který prošel přes kolonku do centrifugační zkumavky, se odstraní.

Do prázdné a čisté kolonky se nanese 10 ml vzorku a 10 ml vazebného pufru A. Centrifuguje se při 100 x g po dobu 20 minut. Protilátky se v této fázi zachytí na imobilizovaném proteinu A kolonky. Prošlý roztok se opět vylije.

K odstranění nečistot se použije 10 ml pufru A. Odstředění se provádí při 500 x g po dobu 2 minut. Do prázdné kolonky se opět nanese 10 ml pufru A a odstředění se zopakuje.

Pokud není známa třída protilátky, provádí se dva kroky. Eluce vázané protilátky se provede nanesením 10 ml pufru B1 do kolonky. Na dno centrifugační zkumavky se nanese 0,5 ml neutralizačního pufru C pro zneutralizování pH roztoku, který projde skrz kolonku. Tento roztok obsahující promyté protilátky se uschová do zkumavky a uskladní při ledničkové teplotě. Centrifuguje se po dobu 5 minut při 500 x g. Další eluce se provede nanesením 10 ml pufru B2 do kolonky. Na dno centrifugační zkumavky se nanese 1,3 ml neutralizačního pufru C. Prošlý roztok se opět uschová.

Pro umytí kolonky pro další použití se nanese 10 ml pufru B2 a centrifuguje se po dobu 5 minut při 500 x g. Následné ustálení kolonky se provede 5 ml pufru A acentrifugací po dobu 2 minut při 500 x g. Vychytávací zátka kolonky se uskladní ve zkumavce s pufrům A.

Zkoncentrování protilátek

Koncentrování protilátek se provádí pomocí odstředivých filtračních zkumavek pro koncentrování a purifikaci biologických vzorků. (MerckMilipore, Německo)

6 Výsledky

6.1 Testování odebrané myší krve na přítomnost specifických protilátek metodou ELISA

Díky této metodě je možné zjistit hladinu protilátek v séru testované myši.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,055	0,051	0,058	0,059	0,054	0,051	0,057	0,05	0,049	0,058	0,05	0,049
B	0,05	0,05	0,05	0,052	0,054	0,049	0,05	0,05	0,049	0,049	0,048	0,05
C	0,051	0,05	0,051	0,05	0,052	0,058	0,05	0,05	0,053	0,048	0,054	0,061
D	0,052	0,052	0,052	0,05	0,041	0,05	0,049	0,049	0,052	0,05	0,05	0,057
E	1,444	1,372	1,269	1,108	0,949	0,771	0,611	0,394	0,198	0,046	0,054	0,045
F	0,051	0,05	0,053	0,051	0,05	0,057	0,05	0,05	0,05	0,056	0,056	0,117
G	0,053	0,05	0,05	0,051	0,052	0,05	0,052	0,05	0,055	0,052	0,051	0,049

Tabulka 1

Hladina protilátek v myším séru odpovídá titru 12 800. To znamená, že poslední pozitivní reakce probíhá v 8. jamce, kde je sérum naředěno 1:12 800. První jamka byla ředěna v poměru 1:100 a následující jamky se ředily dvojkovou řadou.

6.2 Testování produkčních hybridomů metodou ELISA

Díky této metodě je možno získat přehled o produktivitě hybridomů.

Panel 1

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,214	0,235	0,189	0,152	0,238	0,157	0,483	0,128	0,146	0,13	0,51	0,176
B	0,158	0,179	0,455	0,131	0,199	0,141	0,217	0,151	0,14	0,119	0,123	0,166
C	0,443	0,391	0,561	0,137	0,164	0,184	0,462	0,14	0,312	0,166	0,141	0,146
D	0,143	0,266	0,145	0,118	0,338	0,121	0,128	0,125	0,121	0,138	0,161	0,133
E	0,228	0,476	0,139	0,137	0,387	0,238	0,156	0,123	0,12	0,099	0,173	0,19
F	0,208	0,151	0,405	0,408	0,125	0,161	0,102	0,177	0,108	0,133	0,11	0,129
G	0,138	0,171	0,309	0,113	0,376	0,112	0,136	0,16	0,142	0,098	0,594	0,224
H	0,33	0,161	0,161	0,111	0,187	0,275	0,139	0,109	0,212	0,168	0,109	0,624

Pozitivní hybridomy: A7, A11, B3, C1, C3, C7, E2, F3, F4, G11

Pozitivní kontrola: H12

Panel 2

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,217	0,2	0,167	0,512	0,33	0,155	0,551	0,165	0,232	0,155	0,244	0,171
B	0,273	0,148	0,121	0,152	0,168	0,181	0,182	0,561	0,129	0,14	0,163	0,137
C	0,308	0,206	0,163	0,547	0,326	0,151	0,334	0,216	0,274	0,15	0,199	0,244
D	0,12	0,149	0,138	0,145	0,268	0,302	0,207	0,2	0,181	0,561	0,265	0,223
E	0,27	0,202	0,234	0,197	0,637	0,203	0,197	0,269	0,734	0,121	0,636	0,309
F	0,483	0,159	0,258	0,245	0,144	0,156	0,289	0,141	0,919	0,164	0,177	0,167
G	0,155	0,178	0,222	0,143	0,446	0,225	0,193	0,281	0,177	0,238	0,721	0,171
H	0,168	0,2	0,172	0,168	0,198	0,271	0,253	0,145	0,224	0,171	0,26	0,985

Pozitivní hybridomy: A4, A7, B8, C4, D10, E5, E9, E11, F9, G11

Pozitivní kontrola: H12

Panel 3

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,732	0,434	0,219	0,273	0,196	0,23	0,157	0,264	0,167	0,248	0,228	0,17
B	0,25	0,253	0,196	0,235	0,146	0,177	0,723	0,164	0,154	0,188	0,186	0,156
C	0,223	0,14	0,132	0,161	0,154	0,13	0,402	0,131	0,16	0,159	0,608	0,149
D	0,165	0,142	0,253	0,132	0,333	0,183	0,223	0,183	0,132	0,194	0,104	0,126
E	0,255	0,226	0,132	0,189	0,509	0,229	0,135	0,406	0,181	0,15	0,545	0,143
F	0,207	0,148	0,178	0,158	0,118	0,141	0,143	0,177	0,084	0,121	0,137	0,412
G	0,154	0,158	0,18	0,135	0,155	0,176	0,192	0,576	0,409	0,169	0,124	0,167
H	0,178	0,202	0,21	0,16	0,13	0,136	0,212	0,253	0,322	0,213	0,14	0,914

Pozitivní hybridomy: A1, B7, C11, E5, E11, G8

Pozitivní kontrola: H12

Panel 4

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,305	0,519	0,299	0,261	0,157	0,221	0,187	0,347	0,112	0,161	0,14	0,227
B	0,188	0,191	0,121	0,155	0,127	0,182	0,13	0,126	0,28	0,115	0,152	0,159
C	0,145	0,34	0,15	0,139	0,114	0,132	0,198	0,173	0,145	0,195	0,133	0,254
D	0,32	0,118	0,145	0,149	0,138	0,131	0,222	0,307	0,132	0,156	0,155	0,123
E	0,155	0,163	0,134	0,249	0,212	0,162	0,11	0,512	0,124	0,375	0,142	0,149
F	0,426	0,404	0,151	0,119	0,166	0,124	0,157	0,151	0,137	0,144	0,147	0,116
G	0,277	0,144	0,166	0,123	0,097	0,109	0,155	0,254	0,401	0,137	0,061	0,206
H	0,182	0,246	0,142	0,151	0,154	0,168	0,38	0,214	0,115	0,131	0,044	0,763

Pozitivní hybridomy: A2, E8, F1, F2, F9

Pozitivní kontrola: H1

Panel 5

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,09	0,403	0,134	0,437	0,095	0,116	0,168	0,098	0,142	0,155	0,358	0,217
B	0,107	0,12	0,103	0,075	0,098	0,093	0,075	0,346	0,1	0,106	0,085	0,09
C	0,109	0,36	0,186	0,386	0,342	0,221	0,31	0,114	0,114	0,12	0,11	0,149
D	0,405	0,096	0,238	0,113	0,127	0,098	0,075	0,129	0,137	0,218	0,086	0,419
E	0,178	0,085	0,21	0,581	0,083	0,148	0,121	0,082	0,18	0,107	0,166	0,12
F	0,107	0,087	0,105	0,107	0,112	0,39	0,441	0,08	0,099	0,407	0,093	0,147
G	0,144	0,171	0,108	0,076	0,163	0,076	0,087	0,156	0,116	0,101	0,068	0,392
H	0,156	0,119	0,109	0,094	0,105	0,323	0,115	0,192	0,1	0,098	0,122	0,711

Pozitivní hybridomy: A2, A4, D1, D12, E4, F7, F10

Pozitivní kontrola: H12

Panel 6

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,376	0,77	0,605	0,304	0,278	0,77	0,377	0,339	0,381	0,673	0,22	0,267
B	0,508	0,762	0,28	0,545	0,257	0,227	0,187	0,196	0,202	0,16	0,265	0,434
C	0,446	0,243	0,242	0,232	0,258	0,353	0,211	0,163	0,234	0,171	0,216	0,302
D	0,369	0,263	0,353	0,258	0,959	0,339	0,16	0,253	0,16	0,192	0,19	0,333
E	0,25	0,225	0,298	0,272	0,352	0,152	0,22	0,817	0,194	0,597	0,194	0,207
F	0,409	0,201	0,203	0,256	0,493	0,262	0,183	0,286	0,231	0,155	0,616	0,374
G	0,185	0,636	0,19	0,152	0,207	0,146	0,163	0,87	0,195	0,261	0,167	0,155
H	0,433	0,054	0,268	0,343	0,259	0,344	0,181	0,207	0,265	0,207	0,178	1,511

Pozitivní hybridomy: A2, A6, A10, B2, D5, E8, E10, F11, G2, G8

Pozitivní kontrola: H12

Panel 7

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,284	0,287	0,215	0,17	0,138	0,143	0,318	0,302	0,243	0,266	0,226	0,162
B	0,192	0,214	0,437	0,183	0,19	0,588	0,124	0,141	0,158	0,17	0,313	0,165
C	0,157	0,168	0,18	0,22	0,192	0,139	0,134	0,289	0,212	0,255	0,147	0,485
D	0,668	0,2	0,18	0,12	0,658	0,166	0,154	0,15	0,128	0,172	0,216	0,175
E	0,164	0,189	0,265	0,184	0,316	0,124	0,529	0,677	0,331	0,135	0,641	0,2
F	0,258	0,143	0,17	0,362	0,252	0,194	0,151	0,194	0,188	0,196	0,223	0,131
G	0,22	0,668	0,211	0,247	0,208	0,594	0,214	0,209	0,195	0,204	0,164	0,15
H	0,434	0,389	0,194	0,359	0,151	0,183	0,157	0,295	0,208	0,201	0,13	1,499

Pozitivní hybridomy: B6, D1, D5, E7, E8, E11, G2, G6

Pozitivní kontrola: H12

Panel 8

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,251	0,296	0,236	0,248	0,173	0,231	0,248	0,154	0,649	0,171	0,405	0,352
B	0,21	0,344	0,22	0,438	0,151	0,172	0,211	0,228	0,175	0,201	0,135	0,168
C	0,342	0,215	0,175	0,158	0,288	0,241	0,273	0,162	0,143	0,182	0,277	0,155
D	0,216	0,162	0,255	0,2	0,158	0,151	0,123	0,175	0,118	0,145	0,161	0,195
E	0,221	0,192	0,562	0,15	0,226	0,345	0,194	0,134	0,279	0,231	0,282	0,212
F	0,324	0,259	0,344	0,199	0,241	0,446	0,189	0,244	0,146	0,196	0,139	0,167
G	0,558	0,257	0,169	0,193	0,178	0,239	0,134	0,139	0,197	0,315	0,125	0,134
H	0,214	0,268	0,285	1,214	0,227	0,138	0,172	0,176	0,251	0,35	0,206	1,121

Pozitivní hybridomy: A9, B4, E3, F6, G1, H4

Pozitivní kontrola: H12

Panel 9

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,201	0,563	0,209	0,178	0,3	0,147	0,282	0,327	0,245	0,284	0,674	0,252
B	0,139	0,412	0,15	0,173	0,507	0,226	0,266	0,347	0,144	0,19	0,214	0,175
C	0,263	0,107	0,151	0,101	0,122	0,116	0,146	0,134	0,132	0,153	0,259	0,162
D	0,187	0,222	0,145	0,141	0,142	0,175	0,127	0,073	0,331	0,122	0,121	0,185
E	0,281	0,209	0,698	0,328	0,262	0,149	0,166	0,097	0,419	0,181	0,623	0,221
F	0,301	0,641	0,175	0,236	0,106	0,159	0,244	0,132	0,246	0,162	0,14	0,234
G	0,33	0,269	0,158	0,231	0,209	0,167	0,148	0,147	0,164	0,146	0,393	0,349
H	0,358	0,239	0,159	0,563	0,179	0,203	0,282	0,677	0,169	0,641	0,21	1,275

Pozitivní hybridomy: A9, A11, B5, E3, E11, F2, H4, H8, H10

Pozitivní kontrola: H12

Panel 10

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,271	0,278	0,212	0,248	0,633	0,217	0,452	0,244	0,171	0,283	0,218	0,195
B	0,37	0,22	0,317	0,172	0,234	0,226	0,146	0,132	0,129	0,19	0,192	0,14
C	0,19	0,295	0,375	0,226	0,208	0,221	0,247	0,193	0,16	0,285	0,235	0,163
D	0,351	0,208	0,152	0,196	0,143	0,127	0,115	0,186	0,316	0,143	0,102	0,178
E	0,361	0,194	0,052	0,358	0,181	0,17	0,304	0,183	0,143	0,455	0,282	0,178
F	0,201	0,289	0,343	0,196	0,317	0,355	0,217	0,209	0,407	0,25	0,304	0,125
G	0,388	0,68	0,288	0,183	0,479	0,253	0,191	0,192	0,136	0,243	0,419	0,42
H	0,313	0,443	0,275	0,196	0,59	0,205	0,23	0,125	0,235	0,242	0,243	1,459

Pozitivní hybridomy: A5, E10, G2, G5, H5

Pozitivní kontrola: H12

Celkem bylo vybráno 76 produkujících hybridomů. Tyto hybridomy se následně pasážovaly do 24jamkových panelů a zálohovaly zmrazením. Nejproduktivnější z těchto hybridomů byly klonovány.

Klonované hybridomy

Ke klonování byly použity následující hybridomy:

Panel 1 jamky A11 a C3

Panel 2 jamky B8 a F9

Panel 3 jamka C11

Panel 5 jamka E4

Panel 6 jamky D5, E8 a E10

6.3 Testování klonovaných hybridomů na produkci protilátek metodou ELISA

Z naklonovaných hybridomů se vybraly takové jamky, kde rostla kolonie pouze z jedné buňky. Ty se následně testovaly metodou ELISA. Nejproduktivnější se opět zmrazily a purifikovaly.

ELISA klonů E8, F9, C3 a E4

	1	2	3	4	5
A	0,237	0,115	0,8	0,085	0,1
B	0,294	0,108	0,094	0,077	0,091
C	0,141	0,155	1,186	0,107	0,149
D	0,087	0,1	0,083	0,075	0,126
E	0,077	0,097	0,088	0,078	0,083
F	0,081	0,096	1,835	0,074	0,087
G	0,086	0,104	0,085	1,343	0,09
H	0,085	0,102	2,055	0,894	3,77

Označení klonů E8, F9, C3 a E4

	1	2	3	4	5
A		E8 - E6	F9 - D6	F9 - A9	E4 - B2
B		E8 - G10	F9 - E4	F9 - A10	E4 - B6
C	E8 - A6	E8 - H6	F9 - G1	F9 - B10	E4 - C4
D	E8 - A12	E8 - H7	F9 - G4	F9 - F7	E4 - E2
E	E8 - B10	E8 - H8	F9 - H1	F9 - G7	E4 - E6
F	E8 - B12	F9 - C1	F9 - H2	C3 - C4	E4 - G3
G	E8 - D8	F9 - C4	F9 - H3	C3 - F4	E4 - F9
H	E8 - D11	F9 - C5	F9 - H4	C3 - G1	PK

ELISA klonů A11 a B8

	1	2	3	4	5
A	0,279	0,327	0,26	0,047	0,046
B	0,438	0,467	0,387	0,051	0,049
C	0,757	0,734	0,776	0,056	0,058
D	0,778	0,777	0,838	0,071	0,056
E	0,378	0,614	0,706	0,056	0,063
F	0,555	0,544	0,496	0,065	0,272
G	0,474	0,407	0,41	0,054	0,049
H	0,441	0,418	0,421	0,056	0,791

Označení klonů A11 a B8

	1	2	3	4	5
A	A11 - A5	A11 - D3	A11 - F4	B8 - A1	B8 - D5
B	A11 - A9	A11 - D4	A11 - G1	B8 - A10	B8 - D9
C	A11 - B1	A11 - D6	A11 - G2	B8 - B2	B8 - D11
D	A11 - B2	A11 - E1	A11 - G3	B8 - B4	B8 - E1
E	A11 - B3	A11 - E3	A11 - G4	B8 - C2	B8 - E2
F	A11 - C2	A11 - E5	A11 - G5	B8 - C4	B8 - E4
G	A11 - C3	A11 - E6	A11 - H5	B8 - C5	B8 - E6
H	A11 - D2	A11 - F3	A11 - H7	B8 - D2	PK

ELISA klonů C11, D5 a E10

	1	2	3	4	5
A	0,062	0,892	0,048	0,049	0,05
B	0,851	0,054	0,051	0,048	0,049
C	0,07	0,054	0,05	0,056	0,049
D	0,801	0,055	0,049	0,05	0,048
E	0,059	0,052	0,051	0,05	0,052
F	0,057	0,054	0,053	0,049	0,049
G	0,095	0,053	0,049	0,052	0,049
H	0,057	0,054	0,056	0,053	2,362

Označení klonů C11, D5 a E10

	1	2	3	4	5
A	C11 - A1	C11 - F3	D5 - B3	D5 - E2	E10 - D5
B	C11 - A2	C11 - H2	D5 - B4	D5 - F6	E10 - F3
C	C11 - A5	D5 - A1	D5 - B5	D5 - G1	E10 - F7
D	C11 - A6	D5 - A2	D5 - B11	E10 - A2	E10 - F9
E	C11 - B5	D5 - A3	D5 - C2	E10 - A9	
F	C11 - C2	D5 - A10	D5 - C3	E10 - B3	
G	C11 - F1	D5 - A11	D5 - C5	E10 - B5	
H	C11 - F2	D5 - A12	D5 - C9	E10 - B7	PK

6.4 Změření titru purifikovaných a zkoncentrovaných protilátek metodou ELISA

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,605	0,483	0,358	0,263	0,178	0,121	0,091	0,071	0,056	0,053	0,048	0,048
B	0,613	0,475	0,365	0,266	0,18	0,123	0,091	0,07	0,058	0,057	0,052	0,048
C	0,057	0,048	0,05	0,055	0,047	0,046	0,046	0,048	0,049	0,046	0,045	0,047
D	0,054	0,048	0,047	0,055	0,05	0,046	0,044	0,045	0,048	0,044	0,048	0,046
E	1,4	0,059	0,043	0,04	0,039	0,04	0,039	0,039	0,039	0,039	0,042	0,039

Tabulka 2

Vzorek F9 – H4 je vyznačen v řádcích A a B.

Vzorek A11 – G3 je vyznačen v řádcích C a D.

V jamce E1 byla nanesena pozitivní kontrola.

V prvních jamkách jsou vzorky ředěny 1:500. Následující jamky byly ředěny dvojkovou řadou.

U vzorku F9 – H4 probíhá poslední pozitivní reakce ve čtvrté jamce, kde je ředění 1:4000. Titr vzorku F9 – H4 je 4 000.

7 Diskuze

Při veškeré manipulaci s buňkami je důležité pracovat sterilně. Používat sterilní pomůcky a pracovat v boxu s laminárním prouděním. Při kontaminaci media s buňkami je vysoké riziko jejich úhynu. V případě kontaminace lze buňky zachránit jejich aplikací do peritonea myši BALB/c.

Cílem této práce byla příprava monoklonálních protilátek proti antigenům borelie. Celý proces od imunizace myši, přes fúzi a klonování proběhl úspěšně.

Při fúzi byl dostatek solenocytů díky zvětšené slezině pokusné myši. Z deseti mikrotitračních destiček o celkovém počtu 960 jamek bylo po otestování metodou ELISA na produkci protilátek vybráno 76 produkujících jamek. To je 7,9% pozitivních hybridomů.

Z těchto hybridomů bylo 9 nejproduktivnějších jamek vyklonováno. Každá vyklonovaná jamka pokryla celou destičku o 96 jamkách, celkem tedy 864 jamek vyklonovaných hybridomů. Monoklonální protilátky produkují jamky, kde se nachází kolonie pocházející pouze z jedné buňky. Těchto jamek bylo 112 tedy 12,9 %.

Purifikační proces podstoupily dva vzorky. Metoda ELISA prováděna po tomto procesu odhalila ztrátu protilátek v jednom ze vzorků. Ve druhém vzorku byl titr roven 4000.

Zamrazeno bylo 20 nenaklonovaných hybridomů, 5 naklonovaných hybridomů a 4 media s protilátkami po cca. 50 ml.

Hypotéza, příprava monoklonálních protilátek, byla potvrzena.

Připravené protilátky je možno dále charakterizovat. Pomocí imunoglobulinové izotypizace, lze určit třídu imunoglobulinu. Pro identifikaci antigenu, se kterým protilátka reaguje, lze použít imunobloting. Pomocí rovnovážné dialýzy lze určit afinitu protilátky pro antigen.

Mnou vyrobené monoklonální protilátky budou dále využívány pro identifikaci borelií na Katedře medicínské biologie Přírodovědecké fakulty JU.

Využití monoklonálních protilátek pro diagnostiku a výzkum borelií

Analýza 136 kmenů *B. burgdorferi* sensu lato elektroforézou v polyakrylamidovém gelu za přítomnosti dodecylsulfátu sodného (SDS-PAGE) a imunoblotováním pomocí panelu monoklonálních protilátek namířených proti různým epitopům OspA proteinu Wilske a kol., potvrdila korelaci mezi určitými OspA sérotypy a různými projevy nemocí. SDS-PAGE a barvením Coomassie modří bylo zjištěno, že 8 ze 136 kmenů nemá vyjádřený OspA protein. Byly označeny jako OspA sérotyp 0. Zbylých 128 kmenů pozitivních na OspA bylo podle imunoblotu s osmi monoklonálními protilátkami se skupeno do osmi typů - sérotypy 1-7 a sérotyp X, zahrnující heterogenní skupinu lišící se v molekulové hmotnosti a reaktivitě (Wilske et al 1993).

Další práce zjišťuje specifitu a citlivost monoklonálních protilátek pro typizaci *Borrelia burgdorferi* sensu lato izolátů. Bretz a kol. analyzoval 210 izolátů *B. burgdorferi* patřící do osmi genospecies ke zjištění citlivosti a specifity čtyř monoklonálních protilátek specifických pro druh (D6, I17.3, A116k a H3TS). Monoklonální protilátka H3TS měla odhadem 100% citlivost pro *B. burgdorferi* sensu stricto, ale byla také reaktivní s některými izoláty *B. bissettii*. Monoklonální protilátka I17.3 byla 100% citlivá a specifická pouze pro izoláty *B. afzelii*. Monoklonální protilátka D6 byla reaktivní se všemi izoláty *B. garini* s výjimkou jednoho izolátu z Koreje. Odhadovaná citlivost byla 98,5 % a specifita 100 %. Specifita monoklonální protilátky A116k byla 100% a citlivost se rovnala přibližně 83,5 %. OspA, na který se tato monoklonální protilátka váže, vykazuje heterogenní reakce u *B. valasiana* izolátů. Pomocí elektroforetické pohyblivosti bylo možno rozeznat tři z pěti evropských druhů na základě mobility OspA a OspB proteinů. Z výsledků elektroforetické pohyblivosti OspA a OspB a reaktivity monoklonálních protilátek vyplývá, že fenotypová charakterizace izolátů evropských borelií je efektivní (Bretz et al. 2001).

Monoklonální protilátky použila Štěpánová (Štěpánová-Tresová a spol. 2000) k identifikaci druhů borelií izolovaných v jižních Čechách. Z devíti izolátů bylo 6 identifikováno jako *B. burgdorferi* sensu stricto.

8 Závěr

- Úspěšná příprava hybridomů produkující monoklonální protilátky.
- Monoklonální protilátky v mediu se zjištěným titrem.
- Purifikace monoklonálních protilátek.
- Připravené monoklonální protilátky budou dále využívány pro identifikaci borelií v klíšťatech.

9 Použitá literatura:

Bartůněk, P., Bojar, M., Calda, P., Diblík, P., Hercogová, J., Hoza, J. Hulínská, D., Janovská, D., Pícha, D., Valešová, M. (2006): Lymeská borelióza, 3. vyd., Praha: Grada Publishing

Bauchman, R. W. (2006): Microbiology, San Francisco, Pearson International Edition

Bretz, A.G., Ryffel, K., Hutter, P., Dayer, E., Péter, O (2001): Specificities and Sensitivities of Four Monoclonal Antibodies for Typing of *Borrelia burgdorferi* Sensu Lato Isolates. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. 8: 376-384.

Cook, M. (2015): Lyme borreliosis: a review of data on transmission time after tick attachment. *International Journal of General Medicine*. 8: 1-8.

Countiho, A., Gronowicz, E., Bullock, W.W., Möller, G. (1974): Mechanism of thymus-independent immunocyte triggering. Mitogenic activation of B cells results in specific immune responses. *The Journal of Experimental Medicine*. 139: 74-92.

Derdáková, M., Beati, L., Pet'ko, B., Stanko, M., Fish, D. (2003): Genetic variability within *Borrelia burgdorferi* sensu lato genospecies established by PCR-single-strand conformation polymorphism analysis of the rrfA-rrlB intergenic spacer in *Ixodes ricinus* ticks from the Czech Republic. *Applied and Environmental Microbiology*. 69: 509-516

Elbir, H., D. Raoult, Drancourt, M. (2013): Relapsing fever *Borreliae* in Africa. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 89: 288-292.

Feder, H.M., Johnson, B.J., O'Connel, S., Shaphiro, E.D., Steere, A.C., Wormser, G.P. (2008): A critical appraisal of "chronic Lyme disease". *New England Journal of Medicine*. 358: 1422-1430.

Forrester, J.D., Kjemtrup, A.M., Fritz, C.L., Marsden-Haug, N., Nichols, J.B., Tengelsen, L.A., Sowadsky, R., DeBess, E., Cieslak, P.R., Weiss, J., Evert, N., Ettestad, P., Smelser, C., Iralu, J., Nett, R.J., Mosher, E., Baker, J.S., Van Houten, C., Thorp, E., Geissler, A.L., Kugeler, K., Mead, P. (2015): Tick-borne relapsing fever – United States, 1990 – 2011. *Morbidity Mortality Weekly Report*. 64: 58-60.

Fraser, C.M., Casjens, S., Huang, W.M., Sutton, G.G., Clayton, R., Lathigra, R., White, O., Ketchum, K.A., Dodson, R., Hickey, E.K., Gwinn, M., Dougherty, B., Tomb, J.F., Fleischmann, R.D., Richardson, D., Peterson, J., Kerlavage, A.R., Quackenbush, J., Salzberg, S., Hanson, M., van Vugt, R., Palmer, N., Adams, M.D., Gocayne, J., Weidman, J., Utterback, T., Wathley, L., McDonald, L., Artiach, P., Bowman, C., Garland, S., Fuji, C., Cotton, M.D., Horst, K., Roberts, K., Hatch, B., Smith, H.O., Venter, J.C. (1997): Genomic sequences of a Lyme disease spirochaete, *Borrelia burgdorferi*; *Nature*. 390: 580-586.

Gong, Y.-F., Xiang, L.-X., Shao, J.-Z. (2014): CD154-CD40 interactions are essential for thymus-dependent antibody production in zebrafish: insights into the origin of costimulatory pathway in helper T cell-regulated adaptive immunity in early vertebrates. *Journal of Immunology*. 9: 7749-7762.

Goodman, J.L., Dennis, D.T., Sonenshine, D.E. (2005): Tick-borne diseases of humans. Washington, D.C.: ASM Press

Gray, J.S., Kahl, O., Lane, R.S., Stanek, G. (2002): Lyme borreliosis: Biology, Epidemiology, and Control. Wallingford: CABI publishing

Halperin, J. J. (2011): Lyme disease: an evidence based approach. Cambridge, MA: CABI

Hořejší, V., Bartůňková, J., Brdlička, T., Špišek, R. (2013): Základy imunologie. 5. vyd. Praha: Triton

Kaur, J., Badyal, D. K., Khosla, P. P. (2007): Monoclonal antibodies: Pharmacological relevance. *Indian Journal of Pharmacology*. 39: 5-14.

Kopecký, J., Tomková, E., Grubhoffer, L., Melnikova, Y.E. (1991): Monoclonal antibodies to tick-borne encephalitis (TBE) virus: their use for differentiation of the TBE complex viruses. *Acta virologica*. 35: 365-372.

Krejsek, J., Kopecký, O. (2004): *Klinická imunologie*. 1. vyd. Hradec Králové: Nucleus

Kuthejlová, M., Kopecký, J., Štěpánová, G., Macela, A. (2001): Tick Salivary Gland Extract Inhibits Killing of *Borrelia afzelii* Spirochetes by Mouse Macrophages. *Infection and Immunity*. 69: 575–578.

Liu, J.K.H., (2014): The history of monoclonal antibody development – Progress, remaining challenges and future innovations, *Annals of Medicine and Surgery*. 3:113 – 116.

Murray, T.S., Shapiro, E.D. (2010): Lyme Disease. *Clinics in Laboratory Medicine*. 30: 311-328

Nadal, D., Gundelfinger, R., Flueler, U., Boltshauser, E. (1988): Acrodermatitis chronica atrophicans. *Archives of Disease in Childhood*. 63: 72-74.

Ohlenbusch, A., Matuschka, F.-R., Richter, D., Christen, H.-J., Thomssen, R., Spielman, A., Eiffert. (1996): Etiology of the acrodermatitis chronica atrophicans lesion in Lyme disease: study of Czech Lyme borreliosis patients having both syndromes. *Journal of Infectious Diseases*. 174: 33-37.

Parola, P., Raoult, D. (2001): Ticks and tick-borne bacterial diseases in humans: An emerging infectious threat. *Clinical Infectious Diseases*. 32: 897-928.

Penka, M., Tesařová, E., Blatný, J., Bourková, L., Buliková, A., Čech, Z., Jelínková, M., Kissová, J., Kořístek, Z., Kovářová, L., Kuglík, P., Matýšková, M., Novotný, J., Pospíšilová, Š., Slánská, M., Smejkal, P., Trnavská, I., Zapletal, O., Zavřelová, J. (2011): *Hematologie a transfuzní lékařství*. 1. vyd. Praha: Grada Publishing

Ritz, J., Schlossman, S.F. (1982): Utilization of monoclonal antibodies in the treatment of leukemia and lymphoma. *Blood*. 59: 1-11.

Robertson, J., Guy, E., Andrews, N., Wilske, B., Anda, P., Granström, M., Hauser, U., Moosman, Y., Sambri, V., Shellekens, J., Stanek, G., Gray, J. (2000): A European multicenter study of immunoblotting in serodiagnosis of Lyme borreliosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 38: 2097–2102.

Steere, A.C. (2006): Lyme borreliosis in 2005, 30 years after initial observations in Lyme Connecticut. *Wiener Klinische Wochenschrift* 118: 625-633.

Steere, A.C. (2001): Lyme Disease, *New England Journal of Medicine*. 345:115-125.

Štěpánová-Tresová, G., Kopecký, J., Kuthejlová, M. (2000): Identification of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *Borrelia garinii* and *Borrelia afzelii* in *Ixodes ricinus* ticks from southern Bohemia using monoclonal antibodies. *Zentralblatt für Bakteriologie*. 289: 797-806.

URL 1: <http://sn2000.taxonomy.nl/Main/Classification/526.htm>[online]

URL 2: <http://www.bio.davidson.edu/Courses/molbio/MolStudents/01rakarnik/mab.html>
[online]

Vacchelli, E., Eggermont, A., Galon, J., Sautés-Fridman, C., Zitvogel, L., Kroemer, G., Galluzzi, L. (2014): Trial watch: Monoclonal antibodies in cancer therapy. *OncoImmunology*. 2: 28-37.

Vasudevan, B., Chatterjee, M., Kroemer, G. (2013): Lyme borreliosis and skin. *Indian Journal of Dermatology*. 58: 167-174

Wetter, D.A., Ruff, C.A. (2011): Erythema migrans in Lyme disease. *Canadian Medical Association Journal*. 183: 1281-1281

Wilske, B., Preac-Mursic, V., Göbel, U.B., Graf, B., Jauris, S., Soutschek, E., Schwab, E., Zumstein, G. (1993): An OspA serotyping system for *Borrelia burgdorferi* based on reactivity with monoclonal antibodies and OspA sequence analysis. *Journal of Clinical Microbiology*. 31: 340-350.