

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra speciální zootechniky



**Polyklonální protilátky pro detekci specifických antigenů
nádorových buněk**

Diplomová práce

Autor práce: Dana Tůmová

Obor studia: Zájmové chovy

Vedoucí práce: doc. Ing. Lukáš Zita, Ph.D.

© 2017 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci " Polyklonální protilátky pro detekci specifických antigenů nádorových buněk" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 13. 4. 2017

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala vedoucímu své diplomové práce doc. Ing. Lukáši Zitovi, Ph.D. za vstřícnost a ochotu při psaní diplomové práce, dále bych chtěla velice poděkovat pracovníkům Ústavu molekulární genetiky za cenné rady a připomínky, za pomoc a umožnění vypracování mé diplomové práce, jmenovitě Ing. Jiřímu Plachému, CSc., Mgr. Vítězslavu Křížovi, Ph.D. a RNDr. Martině Vojtěchové, Ph.D.

Polyklonální protilátky pro detekci specifických antigenů nádorových buněk

Souhrn

Cílem diplomové práce bylo ověřit možnost přípravy polyklonálních protilátek ve slepičích vejcích, jejich izolaci z vaječného žloutku a následné otestování v diagnostickém testu.

Výhoda polyklonálních protilátek oproti monoklonálním spočívá v jednodušší a méně nákladné přípravě. Polyklonální protilátky se připravují imunizací zvířat vybraným antigenem, pro imunizaci se nejvíce využívá králík a myši, v menší míře jsou využívána i další zvířata.

Pro přípravu slepičích polyklonálních protilátek byl použit slepičí model chovaný na pracovišti Ústavu molekulární genetiky v Kolči, do imunizace byly zařazeny roční slepice v plné snášce. Slepice byly imunizovány vybranými antigeny TEAD2 a ETV4. Imunizace probíhala ve dvou měsíčních cyklech a po té vždy následoval sběr vajec a odběr krve na sérum. Vrchol tvorby protilátek je asi čtvrtý den od poslední imunizace a od toho se také odvíjel sběr vajec a odběr krve na sérum.

Krevní séra byla otestována na přítomnost protilátek pomocí imunocytochemie, ale tento test přítomnost protilátek nepotvrdil, což mohlo být dáno strukturou sér, kdy se krev na séra hůře srážela a obsahovala velké množství lipidů.

Izolace protilátek IgY z vaječného žloutku byla provedena precipitací pomocí polyethylenglykolu PEG 6000, izolované protilátky byly otestovány metodou Western blot, kde se specificky projevila jedna protilátka TEAD6065, která detekovala i endogenní expresi proteinu v buňkách. Ostatní protilátky detekovaly protein pouze v buňkách, kde byl nadměrně exprimován. Nejdůležitější pro potvrzení specifity protilátek bylo jejich otestování pomocí imunohistochemie na parafinových histologických řezech. Na histologických řezech se specificky potvrdila opět protilátka TEAD6065, ostatní protilátky vykazovaly nespecifické barvení buněk. Protilátka TEAD6065 v obou testech potvrdila svou specifitu proti antigenu TEAD2.

Klíčová slova: kuřecí polyklonální protilátky, specifické antigeny, nádorové buňky

Polyclonal antibodies to detect specific antigens of tumor cells

Summary

The aim of the thesis was to evaluate the possibility of preparing polyclonal antibodies in chicken eggs, their isolation from the egg yolk and subsequent testing in a diagnostic test.

The advantage compared to polyclonal antibodies, monoclonal involves simpler and less expensive to prepare. Polyclonal antibodies are prepared by immunizing an animal with a selected antigen for the immunization of the rabbit and used most mice, to a lesser extent are used by other animals.

For the preparation of chicken polyclonal antibodies were used chicken behavior model on the Institute of Molecular Genetics, in Koleč, were placed in full annual hens lay. Hens were immunized with the selected antigen TEAD2 and ETV4. Immunization was carried out in two monthly cycles and then always follow egg collection and the collection of blood serum. The peak of antibody production is about four days after the last immunization and since it is also unfolded egg collection and the collection of blood serum.

The sera were tested for the presence of antibodies by immunocytochemistry, but this test confirmed the presence of antibodies, which could be due to the structure of serum when blood serum to less clotted and contained a large amount of lipids.

Isolation of IgY antibodies from egg yolk by precipitation with polyethylene glycol PEG 6000, an isolated antibody were tested by Western blot, wherein the antibody specifically manifested one TEAD6065 to detect both endogenous protein expression in cells. Other protein antibodies were detected only in cells where the overexpressed. Most important to confirm the specificity of the antibody was their testing by immunohistochemistry on paraffin histological sections. On histological sections specifically confirmed again TEAD6065 antibody, other antibody showed unspecific staining cells. Antibody TEAD6065 both tests confirmed its specificity to the antigen TEAD2.

Keywords: chicken polyclonal antibodies specific antigens, tumor cells

Obsah

1. Úvod.....	8
2. Cíl práce a hypotéza	9
3. Literární rešerše	10
3. 1. Úvod do imunitního systému	10
3. 1. 2. Specifika ptačího imunitního systému.....	11
3. 2. Buňky imunitního systému a jejich diferenciaci.	11
3. 3. Molekuly imunitního systému.....	13
3. 3. 1. Protilátky	16
3. 3. 2. Polyklonální a monoklonální protilátky	20
3. 3. 3. Využití polyklonálních protilátek.....	21
3. 4. Obratlovci využívání pro přípravu protilátek.....	22
3. 4. 1. Králík.....	22
3. 4. 2. Kuře	22
3. 4. 3. Myš.....	23
3. 4. 4. Potkani, křečci, morčata	23
3. 4. 5. Hospodářská zvířata	24
3. 5. Nádorové markery (antigeny)	24
3. 5. 1. Protein ETV4.....	25
3. 5. 2. Protein TEAD2.....	25
4. Materiál a metody	27
4. 1. Kuřecí modely chované na farmě UMG v Kolči	27
4. 2. Imunizace slepic.....	28
4. 3. Izolace protilátek ze žloutku	31
4. 4. Testování krevních sér pomocí imunocytochemie.....	32
4. 5. Western blot	33

4. 6. Imunohistochemie na parafinových řezech.....	33
5. Výsledky	36
5. 1. Imunocytochemie	36
5. 2. Western blot	36
5. 2. 1. Protilátky TEAD2.....	36
5. 2. 2. Protilátky ETV4.....	38
5. 3. Imunohistochemie na parafinových řezech.....	39
5. 3. 2. Protilátky ETV4.....	41
6. Diskuze	44
7. Závěr	46
8. Seznam literatury	47

1. Úvod

Široké spektrum nádorových onemocnění je v České republice druhá nejčastější příčina úmrtí. Časně zachycená nádorová onemocnění mohou být úspěšně léčitelná, proto je důležitá včasná diagnostika onkologických onemocnění a zahájení jejich léčby. Stanovení hladiny nádorových antigenů je důležitou součástí vyšetřovacích metod pro včasné zachycení nemoci, stanovení diagnózy a pro kontrolu průběhu nemoci.

Pro stanovení nádorových antigenů mohou být použity protilátky polyklonální nebo monoklonální. Polyklonální protilátky se připravují imunizací zvířat, jejich příprava oproti monoklonálním protilátkám je jednodušší a méně nákladná. Pro přípravu polyklonálních protilátek se používají nejvíce králíci a myši, při požadavku na velké množství protilátek jsou používána hospodářská zvířata, hlavně při komerčním využití. Příprava slepičích polyklonálních protilátek má výhody ve vysoké výtěžnosti imunoglobulinů Y z vaječného žloutku a také nepředstavuje pro zvíře invazivní zákrok v podobě odběru krve pro získání protilátek. Výhoda slepic také spočívá ve fylogenetické vzdálenosti od savců, a tudíž mohou být výhodné při přípravě protilátek proti vysoce konzervovaným savčím proteinům.

2. Cíl práce a hypotéza

Primárním cílem diplomové práce je ověřit možnost přípravy polyklonálních protilátek proti vybraným antigenům, imunizací slepic.

Hypotéza: Vytvořené protilátky jsou účinné v imunohistochemickém diagnostickém testu na histologických tkáňových řezech.

3. Literární řešerše

3. 1. Úvod do imunitního systému

Imunitní systém zajišťuje obranu organismu proti cizorodým molekulám. Základní funkcí imunitního systému je obranyschopnost, autotolerance a imunitní dohled (Penka a kol., 2012). Imunitní mechanismy lze rozdělit do dvou základních kategorií, nespecifické (neadaptivní) a antigenně specifické (adaptivní).

Nespecifické imunitní mechanismy jsou evolučně starší a jsou založeny na molekulách a buňkách, které jsou v organismu připraveny předem a jsou obvykle účinné proti mnoha různým patogenům. Nespecifické imunitní mechanismy jsou tvořeny složkami buněčnými a humorálními. Buněčné nespecifické složky jsou reprezentovány fagocytujícími buňkami a přirozeně cytotoxickými buňkami. Humorální složky nespecifické imunity tvoří komplementový systém, interferony, lektiny a jiné sérové proteiny.

Antigenně specifické mechanismy reagují na každou cizorodou strukturu prostřednictvím vysoce specifických molekul a aktivují se až po setkání s daným antigenem. Patří mezi ně mechanismy humorální, založené na protilátkách a mechanismy buněčně zprostředkované, založené hlavně na T lymfocytech. Charakteristickým rysem těchto reakcí je imunologická paměť. K úplnému rozvoji specifické imunitní reakce je zapotřebí několika dní až týdnů (Hořejší, Bartůňková a kol., 1998).

Látka schopna vyvolat imunitní reakci je nazývána antigen, po chemické stránce to jsou většinou proteiny nebo glykoproteiny (proteiny plus cukerná složka), ale mohou to být i látky tukové povahy (lipidy, fosfolipidy, glykolipidy) a cukerné (polysacharidy). Jako exoantigen označujeme antigen zevního původu, nejčastěji to jsou složky mikroorganismů. Autoantigeny jsou složky vlastních tkání, proti nimž se vyvine imunitní reakce. Malé molekuly, které vyvolají imunitní odpověď pouze po vazbě na makromolekulární nosič se nazývají hapteny (např. léky). Epitop je malá oblast antigenu, která je rozeznávána imunitními receptory (Bartůňková a Paulík, 2011).

3. 1. 2. Specifika ptačího imunitního systému

Lymfatický systém ptáků tvoří primární lymfatické orgány (thymus, Fabriciova burza) a sekundární lymfatické orgány (slezina, Harderova žláza, lymfatické uzliny, lymfatická tkáň zažívacího traktu – Peyerovy plaky a cekální tonzily). Systém lymfatických cév není u ptáků tak vyvinut jako u savců. V primárních lymfatických orgánech se diferencují lymfocyty, které pak migrují do sekundárních lymfatických orgánů. Fabriciova burza je místem diferenciac kmenových buněk na B-buňky, zatímco thymus je místem diferenciac kmenových buněk na T-buňky (Schade a kol., 2005).

U kura je thymus uložen ve ventrální krajině krční ve formě laločnatých útvarů. Laloky se dělí na sekundární lalůčky. Lalůčky thymu jsou tvořeny tmavší kůrou na povrchu a světlejší dřeví uprostřed. Thymus roste od vylíhnutí asi až do 12-17. týdne věku a po dosažení pohlavní dospělosti, tj. u kura přibližně mezi 20-24. týdnem, involuje. V thymu se nacházejí lymfocyty v různém stupni zrání a diferenciac a stromální buňky (dendritické buňky, fibroblasty, epiteliální buňky), (Ciriaco a kol., 2003).

Fabriciova burza je zvláštní orgán vyskytující se u ptáků, který poskytuje mikroprostředí pro zrání a diferenciac B-lymfocytů, začíná se objevovat asi čtvrtý den embryogeneze jako vychlípenina membrány kloaky. Skládá se z několika vchlípených krypt funkčně uspořádaných do váčků. Fabriciova burza je během embryonálního vývoje kolonizována relativně malým množstvím prekurzorů B-buněk, které vznikly v intraembryonálním mezenchymu a které prošly produktivním přeskupením zárodečných genů pro imunoglobuliny, u těchto buněk nastane proliferační expanze. B-buňky, které mají neproduktivní uspořádání genů lze nalézt v mezenchymální tkáni burzy, tyto buňky nemigrují do lymfatických folikulů uvnitř burzy. Počáteční kolonizace folikulů burzy představuje zásadní a časný kontrolní bod ve vývoji B-lymfocytů (Ratcliffe, 2002; Ciriaco a kol., 2003).

3. 2. Buňky imunitního systému a jejich diferenciac.

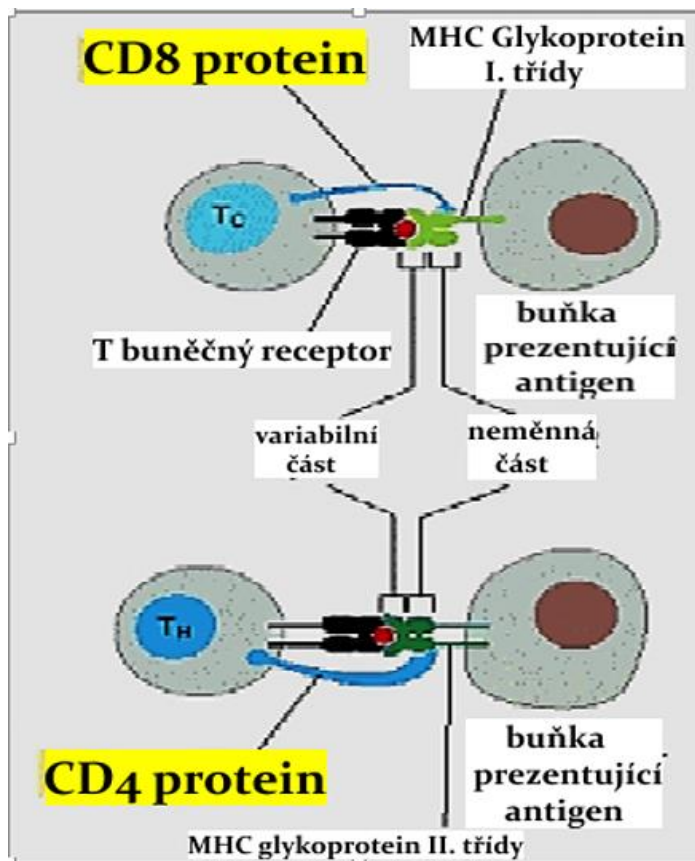
Vývoj imunitních buněk je řízen transkripčními faktory, jsou to proteiny, které vazbou na regulační sekvence DNA ovlivňují u eukaryotní buňky přepis genetické informace z DNA do RNA. Kromě transkripčních faktorů řídících provozní geny existují i speciální transkripční faktory, které jsou indukované při diferenciaci různých buněčných typů. V organismu je asi 200

typů buněk vznikajících diferenciací v genovém vyjádření a řada z nich je v imunitním systému (Toman a kol., 2009).

Podstatnou část imunitního systému tvoří různé druhy leukocytů. Všechny druhy leukocytů pocházejí z pluripotentních kmenových buněk přítomných v kostní dřeni. Dvě základní linie vznikající z kmenových buněk jsou linie myeloidní a lymfoidní. Z myeloidní linie vznikají monocyty, granulocyty mezi které patří neutrofilny, eozinofily a bazofily, dále tato vývojová řada zahrnuje dendritické buňky (Hořejší, Bartůňková a kol., 1998). U ptáků jsou ekvivalentem k neutrofilním granulocytům heterofilní granulocyty (heterofily), (Toman a kol., 2009). Všechny druhy myeloidních buněk tvoří základ nespecifické části imunitního systému. Většina z nich má schopnost fagocytózy a jsou producenty cytokinů a dalších rozpustných mediátorů. Dendritické buňky, makrofágy a monocyty působí jako buňky prezentující antigen (APC) pro lymfocyty (Ferenčík a kol., 2011).

Z lymfoidní linie se diferencují buňky NK, lymfocyty B a T. Vývoj B lymfocytů probíhá u savců v kostní dřeni a dokončuje se po setkání s antigenem v sekundárních lymfatických orgánech (uzliny, sleziny, Peyerovy plaky). Konečným diferenciačním stadiem B lymfocytů jsou plazmatické buňky (plazmocyty), které produkují protilátky (Hořejší, Bartůňková a kol., 1998). Periferní lymfatická tkáň je u ptáků, na rozdíl od savců, organizována spíše difuzně, mízní uzliny u mnoha druhů chybí (Toman a kol., 2009).

Hlavní část vývoje T lymfocytů probíhá v thymu. Thymus opouštějí dvě hlavní skupiny fenotypicky odlišitelných prekurzorů, prekurzory pomocných T buněk (Th), které mají na svém povrchu znak CD4 (afinita k MHC II) a prekurzory cytotoxických T buněk (T_C), které na svém povrchu mají znak CD8 (afinita k MHC I), na povrchu všech lymfocytů T jsou diferenciační znaky CD2 a CD3 (**obr. 1**). Regulační T lymfocyty (Treg), které exprimují ve velké míře tlumivé cytokiny interleukin 10 (IL-10) a transformující růstový faktor beta (TGF-β), sehrávají dle nejnovějších poznatků významnou roli v protinádorové imunitě a také u různých autoimunitních onemocnění (Shevach, 2002). Treg jsou skupinou buněk, která je schopna účinně tlumit imunitní odpověď. Jsou to buňky s imunosupresivní aktivitou, která patří ke klíčovým mechanismům zabezpečujícím udržení imunologické tolerance k vlastním antigenům. Poruchy jejich aktivity mají za následek vznik autoimunitních a chronických zánětlivých procesů (Ferenčík a kol., 2011).



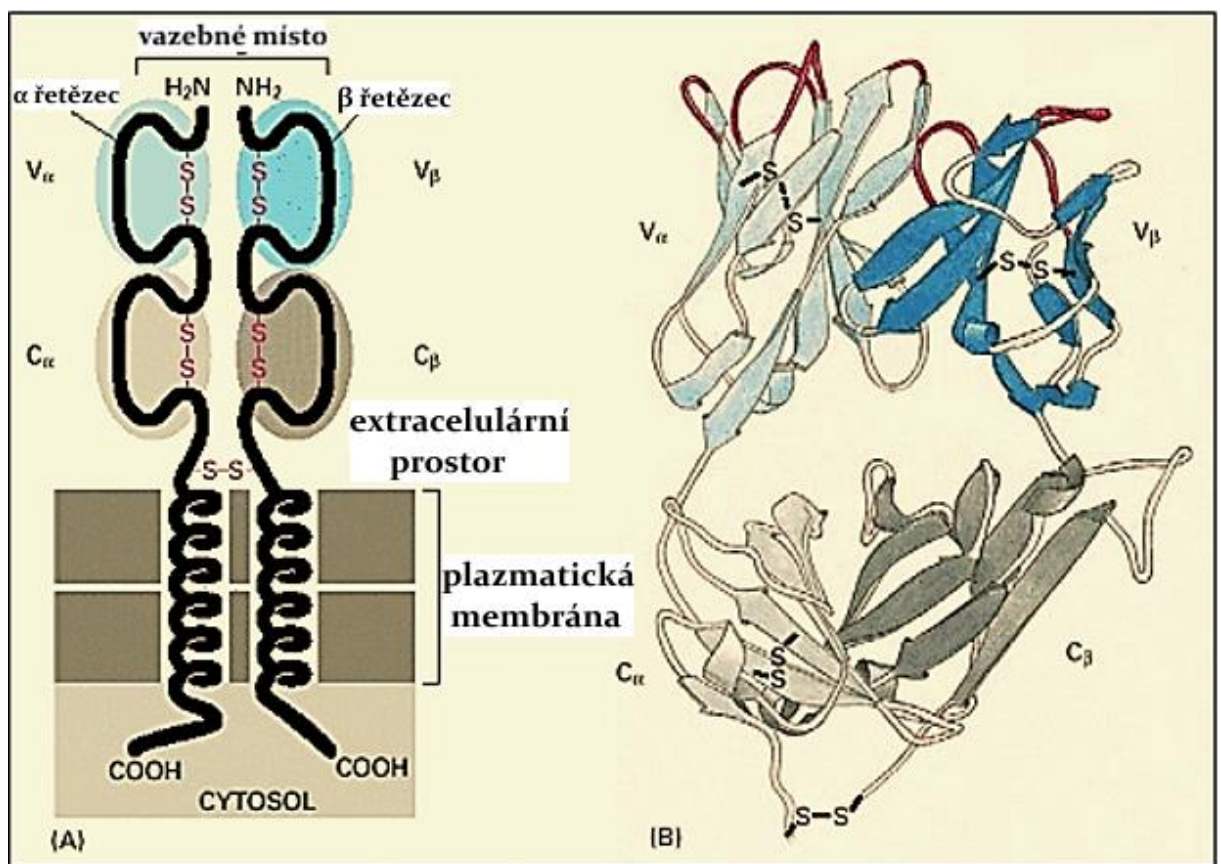
Obr. 1. T lymfocyty a jejich vazba k MHC (převzato a upraveno z Alberts a kol., 2002).

Vedle lymfocytů B a T tvoří třetí hlavní subpopulaci lymfocytů NK buňky, nemají na svém povrchu receptor pro antigen ani znak CD3. Ve svých granulích obsahují dva typy cytotoxických látek, perforiny a granzymy. Usmrcují zejména nádorové buňky a buňky napadené viry (Hořejší, Bartůňková a kol., 1998, Ferenčík a kol., 2011).

3. 3. Molekuly imunitního systému.

Imunitní systém není tvořen pouze imunocyty a lymfatickými orgány a tkáněmi, ale rovněž specifickými molekulami. Jedná se o specifické receptory pro antigen na povrchu B lymfocytů (BCR – B-cell receptor) a T lymfocytů (TCR – T-cell receptor), MHC glykoproteiny I. a II. třídy (major histocompatibility complex) – u lidí označované jako HLA molekuly (human leukocyte antigens), imunoglobuliny (protilátky) a řadu dalších molekul, např. cytokiny a jejich

receptory nebo složky komplementového systému. Tyto molekuly jsou buď součástí buněčné membrány, nebo jsou různými typy buněk secernovány (Hořejší, Bartůňková a kol., 1998). Komplex TCR se skládá z modulu rozeznávajícího antigen a z asociovaného komplexu několika proteinů, který je podstatný pro přenos signálu (**obr. 2**). Část komplexu TCR, která váže antigen je strukturálně podobná imunoglobulinům. TCR obsahuje dvojici polypeptidových řetězců α a β (asi 95% T-lymfocytů) nebo γ a δ , je spojen do komplexu se znakem CD3, který se skládá z pěti polypeptidových řetězců a je důležitý pro přenos signálu z TCR do nitra buňky.



Obr. 2. Komplex TCR (převzato a upraveno z Alberts a kol., 2002).

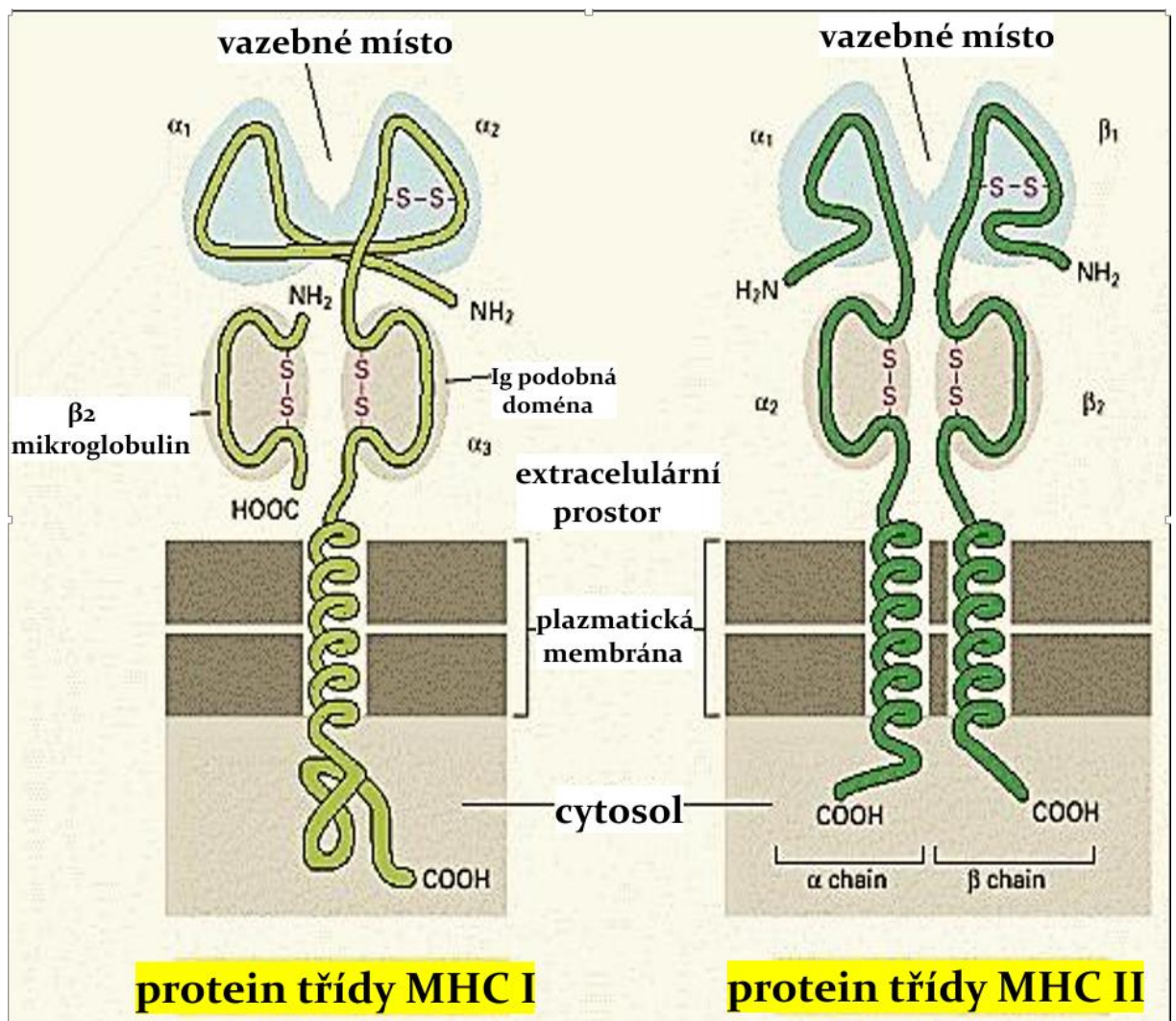
Komplex BCR se skládá z vlastního povrchového imunoglobulinu a asociovaných signalizačních molekul. Povrchový imunoglobulin se skládá ze dvou těžkých (H) a dvou lehkých (L) řetězců, povrchové imunoglobuliny patří nejčastěji k třídám IgM a IgD. Signály spuštěné vazbou antigenu na BCR mohou být výrazně zesíleny spoluprací BCR s dalším povrchovým receptorem B lymfocytů, komplementovým receptorem CR2 (CD21), který váže degradační produkt C3dg. Propojení BCR a CR2 antigenními částicemi opsonizovanými

fragmenty C3dg zřejmě lépe aktivuje protein-kinázy spojené s oběma receptory. Aktivované kinázy pak fosforylují další cytoplazmatické proteiny, což vede ke spuštění složitých signalizačních kaskád. To nakonec společně s dalšími nezbytnými signály může vést ke změnám transkripce některých genů, buněčnému dělení, diferenciaci B buňky na plazmatickou buňku a sekreci velkého množství protilátek (Hořejší, Bartůňková a kol., 1998, Ferenčík a kol., 2011).

Hlavní histokompatibilní komplex – MHC (major histocompatibility complex) je imunologicky významnou oblastí genomu obratlovců. Zahrnuje skupinu genů, které mají různé funkce. V této geneticky komplexní oblasti leží i geny, které primárně se základní funkcí MHC nesouvisí, mohou i nemusí mít imunitní funkce, proto je vhodné rozdělit geny MHC do tříd (Toman a kol., 2009). MHC byl poprvé objeven u myši v roce 1930 označován jako H2 komplex, u lidí je označován jako HLA komplex (Ryan a Cobb, 2012). Klasické třídy genů MHC I a MHC II kódují povrchové proteiny buněk, jejichž hlavní funkcí je prezentace antigenu T lymfocytům což usnadňuje rozpoznávání vlastních a cizorodých částic (**Obr. 3**), (Ferenčík a kol., 2011).

Molekuly třídy MHC I obsahují jeden transmembránový polypeptidový řetězec α kódovaný jediným genem a s ním nekovalentně asociovaný β_2 -mikroglobulin, z nichž oba jsou exprimovány na všech jaderných buňkách a prezentují hlavně endogenní antigeny (převážně virové) CD8⁺ T lymfocytům (Miller a kol., 2015).

Molekuly třídy MHC II obsahují dva transmembránové řetězce α a β , obě první domény α_1 a β_1 vytvářejí štěrbinu pro vazbu antigenního peptidu, každý řetězec je kódovaný samostatným genem. Molekuly MHC II se za fyziologických podmínek vyskytují jen na specializovaných buňkách prezentujících antigen, jako jsou makrofágy, dendritické buňky, B lymfocyty, monocyty a hemopoetické prekurzory a prezentují antigeny odvozené od extracelulárních patogenů (Miller a kol., 2015), ty jsou rozpoznány jen určitým klonem pomocných CD4⁺ T lymfocytů s TCR vázajícím daný epitop. Tyto pomocné lymfocyty pak aktivují B buňky pro tvorbu protilátek (Toman a kol., 2009).

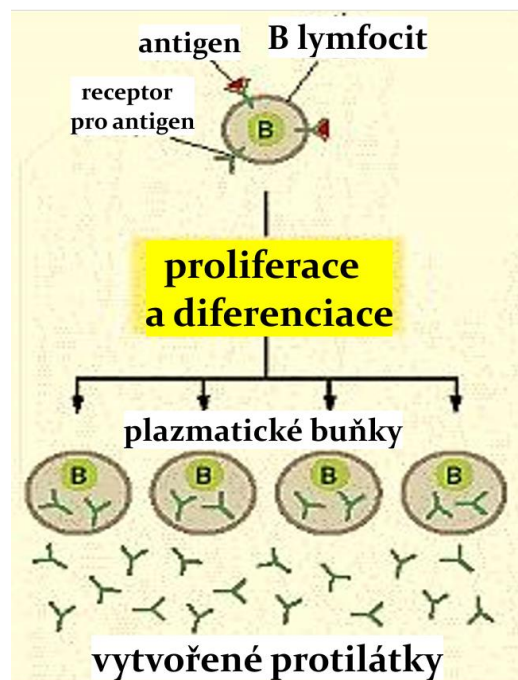


Obr. 3. Struktura proteinů třídy MHC I a proteinů třídy MHC II (převzato a upraveno z Alberts a kol., 2002).

3. 3. 1. Protilátky

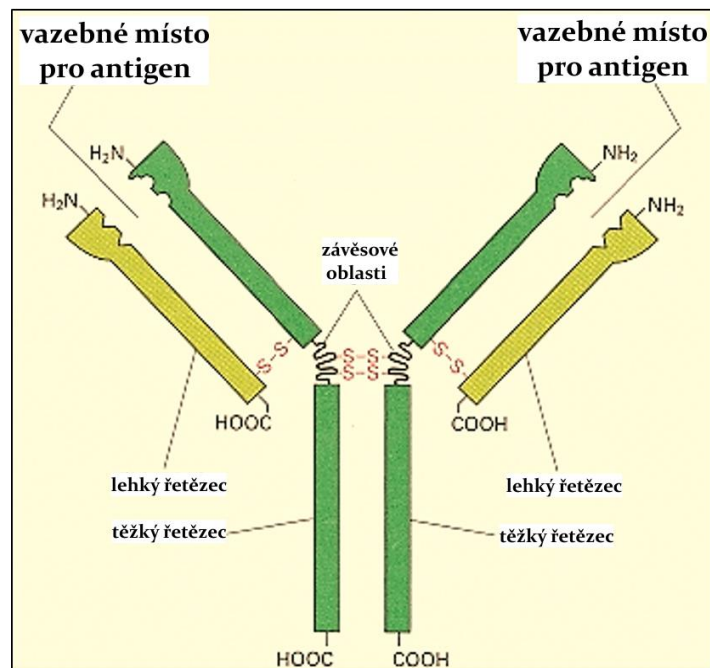
Protilátky se řadí mezi imunoglobuliny. Tvoří se v plazmatických buňkách, které vznikají z lymfocytů B po jejich aktivaci specifickým antigenem navázaným na membránové receptory (**obr. 4**), aktivace B-lymfocytů je složitý proces a vyžaduje účast několika typů dalších buněk, jako jsou T-pomocné lymfocyty, dendritické buňky a makrofágy (Ferenčík a kol., 2011, Hanly a kol., 1995). Jako první se humorální imunitní odpovědi obvykle účastní makrofágy a dendritické buňky (buňky prezentující antigen). V endosomálním prostoru degradují protein antigenu a vzniklé peptidy prezentují na svém povrchu pomocí molekul MHC II, dále jsou

aktivovány Th-lymfocyty (CD4+ T lymfocyty), ty se dočasně vážou na buňky prezentující antigen pomocí TCR, molekuly CD4 pomáhají rozpoznat proteiny MHC II třídy, Th-lymfocyty produkují cytokiny a dochází k aktivaci B-lymfocytů a k jejich proliferaci a diferenciaci do plazmatické buňky (Hanly a kol., 1995).



Obr. 4. Schéma tvorby protilátek po stimulaci antigenem (převzato a upraveno z Alberts a kol., 2002).

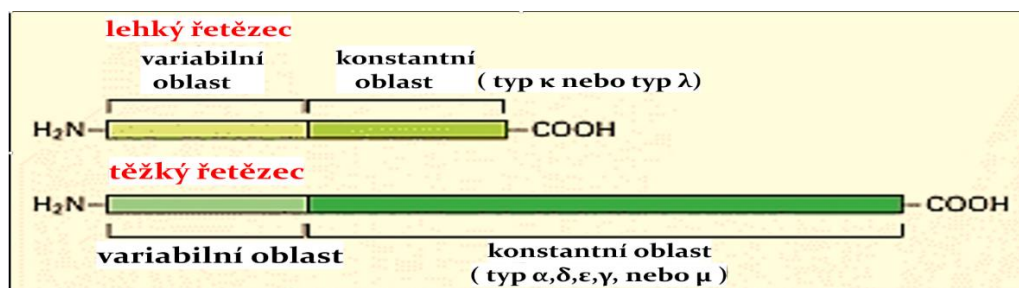
Polypeptidové řetězce, které tvoří molekulu imunoglobulinu, jsou kódovány geny, které se nedědí jako celé geny, ale dědí se jen jejich segmenty, ty nazýváme subgeny. Subgeny nemohou sami kódovat funkční polypeptid, příslušné geny se tvoří jejich spojováním během diferenciaci B-lymfocytů. Kombinací subgenů tak vznikají výsledné geny, které se navzájem liší (Rosypal, 1999). Základní strukturní jednotka molekuly protilátky se skládá ze čtyř polypeptidových řetězců, dvou identických lehkých (L) řetězců (každý obsahuje asi 220 aminokyselin) a ze dvou identických těžkých (H) řetězců (každý obsahuje obvykle okolo 440 aminokyselin). Struktura molekuly je uspořádána do tvaru připomínající písmeno Y (**Obr. 5**). Dva těžké řetězce jsou mezi sebou spojeny disulfidickými (cystinovými) můstky a zrovna tak jsou mezi sebou spojeny těžké a lehké řetězce (Alberts a kol., 2002).



Obr. 5. Základní strukturní jednotka molekuly protilátky (převzato a upraveno z Alberts a kol., 2002).

Těžké a lehké řetězce jsou tvořeny úseky, které se nazývají domény, každá doména je tvořena sekvencí 110 až 120 aminokyselin, lehké řetězce se skládají ze dvou domén (V_L -variabilní, C_L -konstantní) a těžké řetězce ze čtyř strukturně podobných domén (V_H , CH_1 , CH_2 , CH_3) u IgG, IgD, IgA nebo pěti domén (V_H , CH_1 , CH_2 , CH_3 , CH_4) u IgM, IgE. (Alberts a kol., 2002; Hořejší, Bartůňková a kol., 1998).

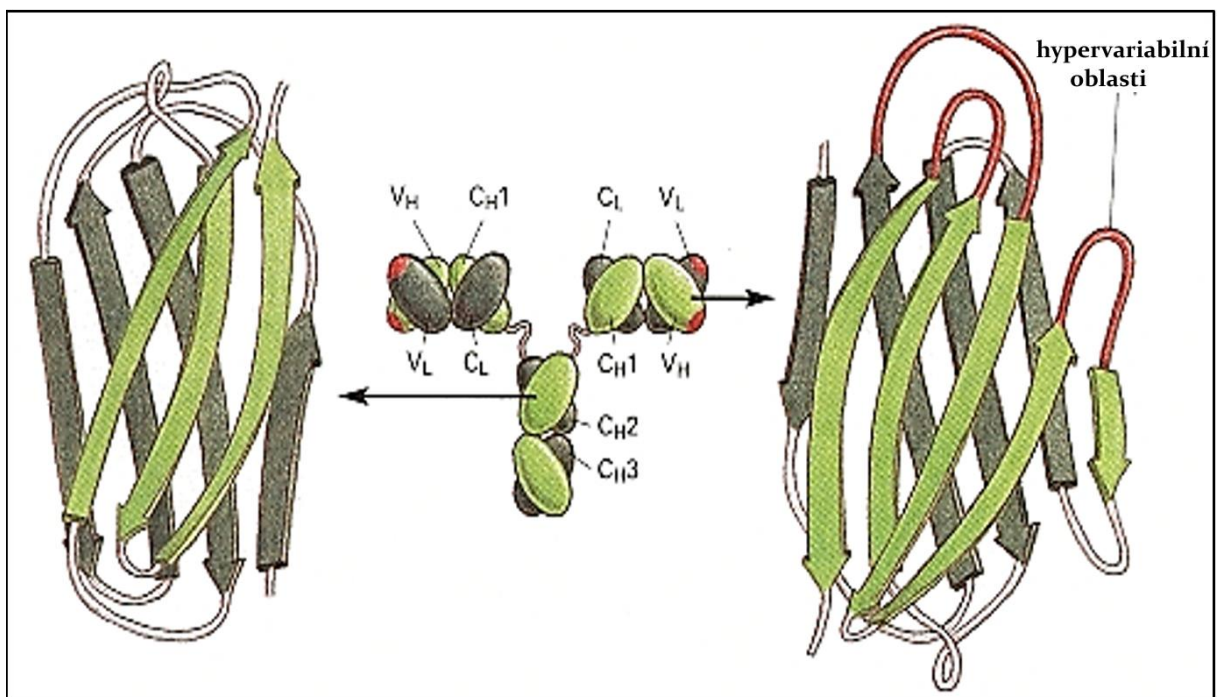
Lehké řetězce existují ve dvou typech kappa (κ) a lambda (λ), jsou si velmi podobné, ale nikdy se v jedné molekule nevyskytují oba typy najednou, imunoglobulin vždy obsahuje buď dva řetězce κ nebo dva řetězce λ , variabilní oblast tvoří asi polovinu řetězce na aminovém konci, druhá polovina je konstantní (**Obr. 6**), (Alberts a kol., 2002).



Obr. 6. Schéma lehkého a těžkého řetězce (převzato a upraveno z Alberts a kol., 2002).

Těžké řetězce jsou v pěti známých typech, které se liší strukturou konstantní oblasti. Jsou označovány jako α , γ , δ , ϵ a μ . Variabilní oblasti tvoří asi 1/4 aminového konce těžkého řetězce. Druhá část molekuly protilátky je konstantní (fragment Fc), podle této části se rozlišuje pět tříd imunoglobulinů IgG, IgM, IgA, IgD, IgE u savců a tři třídy IgY, IgM a IgA u ptáků. IgM a IgA často tvoří polymerní struktury, IgA tvoří dimery, trimery nebo tetramery a IgM pentamery (Alberts a kol., 2002).

Na variabilních doménách jsou oblasti polypeptidových řetězců, kde se ve zvýšené míře mohou vyměňovat jednotlivé aminokyseliny, těchto oblastí je celkem šest, tři se nacházejí na lehkém a tři na těžkém řetězci, označují se jako hypervariabilní oblasti a představují skutečné vazebné místo protilátky (**Obr. 7**)(Lipman a kol., 2005).



Obr. 7. Hypervariabilní oblasti (převzato a upraveno z Alberts a kol., 2002).

U ptáků je hlavním imunoglobulinem IgY, který je z krevního séra transferován přes folikulární epitel vaječnicků a hromadí se ve vaječném žloutku během oogeneze a slouží jako pasivní imunitní složka pro mládě, funkčně odpovídá savčímu IgG. IgM má u slepice pentamerní nebo tetramerní strukturu či směs obou u kachny je nejpravděpodobnější tetramerní struktura (Toman a kol., 2009).

3. 3. 2. Polyklonální a monoklonální protilátky

Většina antigenů jsou velmi složité komplexy a předkládají četné množství epitopů, které jsou rozpoznávány velkým počtem lymfocytů. Každý lymfocyt je aktivován k proliferaci a diferenciaci do plazmatické buňky a výslednou odpovědí jsou polyklonální protilátky. Oproti tomu monoklonální protilátky jsou protilátky produkované jedním B lymfocytárním klonem. Monoklonální protilátky byly poprvé rozpoznány v séru u pacientů s mnohočetným myelomem, ve kterém klonální expanze maligních plazmatických buněk produkuje vysoké hladiny identické protilátky, což vede k monoklonální gamapatii. V polovině sedmdesátých let Köhler a Milstein objevili techniku pro generování monoklonálních protilátek s požadovanou specifitou, za což jim byla udělena Nobelova cena. Monoklonální protilátky mají výhodu ve vysoké homogenitě, jsou produkovány ve větší koncentraci a čistotě, ale jejich příprava je časově a technicky náročnější, oproti tomu, ale i malé změny ve struktuře epitopu výrazně ovlivní funkci monoklonálních protilátek. Polyklonální protilátky mají často lepší specifitu, protože jsou vytvářeny velkým počtem B-lymfocytárních klonů a každý generuje protilátky na specifický epitop (Lipman a kol., 2005). Polyklonální antiséra odráží heterogenní populaci protilátek s různě silnou reaktivitou na jednotlivé cílové epitopy. Příprava polyklonálních protilátek probíhá imunizací zvířat specifickými antigeny (Crocker a Murray, 2003).

Míra vazebné síly protilátky pro monovalentní epitop se nazývá afinita a je popsána pomocí afinitní konstanty, přesnou afinitu lze zjistit jen u monoklonálních protilátek, protože jsou homogenní povahy u polyklonálních protilátek můžeme sílu afinity jen odhadnout. Protilátky s vysokou afinitou váží větší množství antigenu s větší stabilitou a v kratším čase. Celkovou vazebnou intenzitu mezi protilátkami a multivalentním antigenem prezentujícím více epitopů určuje avidita (Lipman a kol., 2005).

Protilátky rozpoznávají různě velké epitopy a mohou se na ně vázat pomocí některých nebo všech šesti hypervariabilních oblastí. Vazba epitopu a protilátky je reverzibilní a závisí na přesné konfiguraci antigen-protilátka i relativně malé změny ve struktuře antigenu mohou výrazně ovlivnit sílu interakce. Protože protilátky rozeznávají relativně malou část antigenu, mohou krossreagovat s epitopy jiných antigenů, obvykle ale s menší afinitou. Tato krossreakce může být užitečným nástrojem v určitých oblastech výzkumu, ale zároveň může způsobovat komplikace vykazováním epitopů nežádoucích antigenů. Specifičnost protilátky se vztahuje na její schopnost rozpoznat specifický epitop v přítomnosti dalších epitopů, protilátka s vysokou specifitou vykazuje menší krossreakce s jinými epitopy (Lipman a kol., 2005). Vazebná afinita většiny protilátek je ovlivněna konformačními determinantami a protilátky nemusí vázat stejný

protein v denaturovaném stavu (Nelson a kol., 1997). Tato charakteristika platí zejména u monoklonálních protilátek, které se zaměřují na jeden specifický epitop. Konformace může být pozměněna různými faktory jako je spojení s jinými proteiny, teplota, pH, postranlační modifikace. Dopad konformačních změn je menší u polyklonálních protilátek, protože nemohou ovlivnit všechny epitopy ve stejné míře (Lipman a kol., 2005).

3. 3. 3. Využití polyklonálních protilátek

Pasivní imunizace kuřecími protilátkami proti specifickým antigenům se ukazuje jako potenciální alternativa k antibiotické léčbě a k prevenci různých onemocnění člověka a zvířat (Gadde a kol., 2015).

Kuřecí protilátky IgY se ukázaly jako účinná ochrana při infekčním průjmu novorozených telat, který způsobují rotaviry skupiny A (RVA). Orální podávání prášku z vaječného žloutku v prvních sedmi dnech života výrazně snížilo průběh průjmu jeho závažnost a vylučování viru. Tato profylaktická léčba by mohla být výhodná pro stáda dojnic, kde je bovinní RVA velkým epidemiologickým problémem, výhodou je možnost podávání léčebného prostředku ve formě prášku z vaječného žloutku, s nímž je snadná manipulace a lze jej uchovávat při pokojové teplotě 12 – 16 měsíců (Vega a kol., 2015). IgY se mohou rovněž použít k léčbě a prevenci střevních infekčních patogenů u drůbeže (Gadde a kol., 2015). Vážným problémem je také průjem u novorozených a odstavených selat, hlavně ve velkých intenzivních chovech a při předčasném odstavení selat. Nejběžnější původce infekčního průjmu v chovu prasat je enterotoxigenní *Escherichia col.* Orální podávání IgY by mohlo mít profylaktický a terapeutický účinek v chovu prasat proti *E. Coli* (Lee a kol., 2015)

Generované protilátky IgY se mohou využít v rutinní screeningové analýze reziduí gentamicinu v potravinách. Gentamicin je aminoglykosidové antibiotikum používané v živočišné výrobě, jehož rezidua v potravinách mohou způsobovat zdravotní komplikace (He a kol., 2015).

3. 4. Obratlovci využívaní pro přípravu protilátek

Druhová selekce je důležitým aspektem při imunizaci savčími proteiny, protože fylogeneticky vzdálenější druhy budou lépe vytvářet protilátky proti větší řadě cizích epitopů než u blízké příbuzných druhů. Nejčastěji používaní savci pro přípravu polyklonálních protilátek jsou ovce, kozy a králík, hlavním důvodem je jejich velikost, dobrý přístup krevního řečiště a větší objem krve pro odběr séra. Z těchto savců je pro tvorbu protilátek nejčastěji využíván králík pro jednoduchost a menší nákladovost chovu (Lipman a kol., 2005). Jako nesavčí druh se využívají kuřata, která nabízejí mnoho výhod. Hlavní výhodou je fylogenetický rozdíl a snadná izolace protilátek IgY z vaječného žloutku (Gassman a kol. 1990). Obecně platí, že pro přípravu protilátek jsou nejlepší mladí dospělí jedinci, imunitní funkce zřejmě vrcholí v pubertě a pak postupně s věkem klesá. Pro přípravu protilátek se zahajuje imunizace u skupin zvířat nejdříve ve věku, myši 6 týdnů, potkani 6 – 8 týdnů, králíci 3 – 5 měsíců, kozy 6 – 7 měsíců, ovce 7 – 9 měsíců a kuřata 16 – 20 týdnů (Hanly a kol., 1995).

3. 4. 1. Králík

Králík je jedním z nejdůležitějších druhů pro přípravu protilátek. Jeho výhodou spočívá ve vhodné velikosti, snadné manipulaci se zvířetem a v dobrém přístupu krevních cév pro odběr krve, má vysoký titer protilátek v séru a je relativně dlouhověký (Stills, 1994). Používá se pro přípravu protilátek proti lidským proteinům a pro svou odlišnost od hlodavců i proti hlodavčím proteinům (Hanly a kol., 1995). Nicméně aby byla zajištěna vhodná protilátková odpověď je potřeba imunizovat větší počet zvířat (Lipman a kol., 2005).

3. 4. 2. Kuře

Kuřecí model poskytuje výraznou výhodu při přípravě savčích polyklonálních protilátek pro jejich významný fylogenetický rozdíl, což má za následek zvýšenou citlivost a snížení pozadí v imunologických testech, také je vysoce efektivní z hlediska nákladů při přípravě protilátek oproti savčím modelům (Larsson a kol., 1993). Snáška bývá okolo 300 vajec ročně a 15 ml objemu žloutku obsahuje 50 – 100 mg IgY, které mohou obsahovat 2 – 10% specifických protilátek, od jedné nosnice se takto dá získat až 22,5g celkového IgY za rok (Jiang a kol.,

2016). Shimizu a kol. (1992) uvádějí, že kuřecí IgY vykazuje menší stabilitu za extrémních podmínek než králičí IgG, stabilita IgG při denaturaci kyselinou byla mnohem vyšší než u IgY, což je způsobeno rozdíly ve struktuře, liší se v Hv řetězci. Nicméně IgY je ve vejci stabilní několik měsíců a purifikovaný IgY lze uchovávat stabilní v chladu za určitých podmínek několik let (Larsson a kol., 1993). Množství IgY získané z týdenního sběru vajíček je výrazně vyšší (asi desetkrát) než množství IgG získané za stejné období z králičí krve (Gassman a kol. 1990).

Jeho hlavní výhody jsou při použití intracelulárních savčích proteinů jako antigenů, které bývají v rámci savčích druhů ve svých sekvencích více konzervovány než extracelulární proteiny a protilátková odpověď je tak vyšší než u savců a pro účinnou imunitní odpověď stačí použít menší množství antigenu nebo v případech kdy dochází ke krossreaktivitě, protože IgY nekrossreaguje se savčími IgG. Další výhodou je, že IgY nereaguje se savčím revmatoidním faktorem. Revmatoidní faktor se vyskytuje zejména u pacientů trpících revmatoidní artritidou. Tato autoprotilátka se váže na savčí IgG, a tím může v testech vyvolávat falešně pozitivní výsledky. Kuřecí protilátky IgY na rozdíl od IgG neaktivují savčí komplementový systém, jehož aktivace vede v testech k falešně pozitivním výsledkům (Carlander a kol., 1999).

3. 4. 3. Myš

Myši jsou často využívány pro přípravu monoklonálních protilátek, při přípravě polyklonálních protilátek bývá překážkou jejich malá velikost pro potřebu dostatečného množství séra, aby bylo získáno potřebné množství polyklonálních protilátek, proto se u myši k získání polyklonálních protilátek využívají metody, kdy se získávají z ascitické tekutiny (Hanly a kol., 1995).

3. 4. 4. Potkani, křečci, morčata

Tyto druhy se k přípravě polyklonálních protilátek využívají méně než králík protože nenabízejí žádnou významnou výhodu oproti němu. Mají menší objem krve a pro odběr dostatečného množství krve je potřeba provést srdeční punkci. Nicméně jsou situace, kdy je použití těchto druhů výhodné. Některé inbrední kmeny potkanů nabízí i některé výhody ve srovnání s králíkem, přípravou protilátek v ascitické tekutině. Křečci a morčata jsou fylogeneticky vzdálenější myši než potkani a tak mohou být využíváni při přípravě protilátek proti myším

proteinům. Křečků se využívá více druhů, křeček zlatý *Mesocricetus auratus* je více využíván ve Spojených státech, v dospělosti dosahuje hmotnosti asi 80 – 120g, křečík šedý *Cricetulus migratorius* se často využívá pro přípravu protilátek zvláště monoklonálních proti myším proteinům. Morčata se dnes využívají méně než v minulosti, morčata však vykazovala vynikající reakce na prasečí inzulin pravděpodobně vzhledem k významnému rozdílu v sekvenci aminokyselin. Příprava protilátek v ascitu se u morčat využívá zřídka (Hanly a kol., 1995).

3. 4. 5. Hospodářská zvířata

Velká zvířata jako jsou ovce, kozy a koně se využívají hlavně v případech, kdy je potřeba velké množství antiséra. Tyto druhy jsou dlouhověké, relativně snadno se s nimi manipuluje a odběr krve lze provádět z krční žíly bez anestezie. Jejich chov je ale náročnější finančně, na prostor a na ošetřování. Využívají se hlavně pro komerční produkci antisér. Koňské protilátky jsou dodnes používány jako léčiva proti toxinům a jedům (Hanly a kol., 1995).

3. 5. Nádorové markery (antigeny)

Rakovina je definována jako soubor onemocnění vycházející z poruch genomu, např. mutace, delece, amplifikace nebo nedostatečné reparace genových defektů. Tyto poruchy vedou k poruchám regulace růstu a množení poškozených buněk. V současnosti nejsou dostupné léčebné postupy, které by tyto poruchy na úrovni DNA cíleně opravovaly. Časně zachycená nádorová onemocnění mohou být úspěšně léčitelná. Důraz je kladen především na včasnou diagnostiku onkologických onemocnění a léčbu s minimálními nežádoucími účinky a náklady. Onkologická onemocnění jsou po nemocech srdce a cév nejčastější příčinou úmrtí v ČR (Machová a kol., 2012).

Nádorovým markerem rozumíme molekuly převážně bílkovinné povahy, které se nacházejí v organismu v důsledku maligního zvratu. V nádorových buňkách se exprimuje řada genů, které za normálních okolností mají ve tkáních velmi nízkou nebo žádnou expresi, proto prokázání přítomnosti nádorových markerů je nedílnou součástí vyšetřovacích metod pro stanovení diagnózy, prognózy a kontroly průběhu léčby. Lokalizace nádorových markerů je rozmanitá. Mohou být přítomny přímo ve tkáni nádoru (buněčný nádorový marker) nebo jsou nádorem produkovány (s nádorem asociované antigeny) nebo jsou produkovány hostitelem jako

odpověď na přítomnost nádoru (indukované nádorové markery – proteiny akutní fáze). Mezi nejnovější rakovinné markery patří i detekce genových mutací (Wang a kol., 2016, Machová a kol. 2012).

3. 5. 1. Protein ETV4

ETV4 patří do rodiny ETS transkripčních faktorů, je zapojen do důležitých fyziologických procesů při vývoji embrya, souvisí s pohybem buněk během organogeneze a morfogeneze. V dospělém organismu je fyziologická exprese ETV4 omezená zejména na dobu při růstu mléčné žlázy u březích samic (Akagi a kol., 2015).

ETV4 je považován za onkoprotein, který je nadměrně exprimován v různých typech nádorových buněk, je striktně nadměrně exprimován v buňkách nádoru, je spojen s vyšším metastatickým potenciálem a kratším přežitím pacientů (Akagi a kol., 2015, Oh a kol., 2012). Některé studie naznačují, že nadměrná exprese ETV4 může být dostačující k iniciaci Ewingova sarkomu. ETV4 je nadměrně exprimován v kolorektálním karcinomu a jeho nadměrná exprese koreluje s kratší dobou přežití postižených pacientů, zvýšená exprese byla zaznamenána u adenokarcinomu žaludku. ETV4 je také nadměrně exprimován u adenokarcinomu jícnu, v ovariálních nádorech a v karcinomu prostaty (Oh a kol., 2012).

3. 5. 2. Protein TEAD2

TEAD2 patří do rodiny transkripčních faktorů TEAD (TEAD1 – TEAD4), jsou to vysoce konzervované savčí proteiny s DNA vazebnou TEA doménou z asi 75 aminokyselin. Všechny proteiny mají tuto doménu téměř identickou, TEAD2 jí má ze 100 %, TEAD3 z 99 % a TEAD4 z 94 % shodnou s TEAD1. Zbylé části proteinu vykazují mezi jednotlivými homology shodu v sekvenci okolo 70 % a to převážně v C-koncové oblasti (Lee a kol., 2016). Fyziologická funkce TEAD proteinů hraje důležitou roli v diferenciaci buněk a v buněčné proliferaci. TEAD2 je exprimován od raného embryonálního stadia nejvíce z TEAD proteinů, ovlivňuje vývoj nervového systému, je exprimován v proliferujících neuroepiteliálních buňkách plodu, v perinatálním období jeho exprese klesá. TEAD1 má důležitou funkci při vývoji srdečního svalu a byl přítomen v rakovinných buňkách děložního čípku, vaječníku, střev, mozku, v leukemických buňkách a v buňkách ledvin a placenty. (Malt a kol., 2016).

Při porušení Hippo signální dráhy v organismu, která za fyziologických podmínek zodpovídá za regulaci velikosti orgánů, se z cytoplazmy do jádra dostává koaktivátor TEAD proteinů YAP, který ovlivňuje jejich správnou funkci při růstu a diferenciaci orgánů. YAP v jádře interaguje s TEAD proteiny a spouští transkripci cílových genů a to vede k nadměrnému růstu orgánů a tím i k tvorbě nádorů (Pobbati a Hong, 2013).

4. Materiál a metody

Práce byla zaměřena na imunizaci slepic vybranými antigeny a následnou izolaci kuřecích protilátek z vaječného žloutku a jejich otestování v laboratoři. Práce byla částečně provedena na pracovišti Ústavu molekulární genetiky AV v Kolči, kde probíhala imunizace slepic a sběr vajec a laboratorní zpracování bylo provedeno na pracovišti Ústavu molekulární genetiky v Praze Krči.

4. 1. Kuřecí modely chované na farmě UMG v Kolči

Kuřecí modely jsou v Kolči systematicky chovány od 60. let 20. století. Původním účelem těchto modelů bylo studium retrovirů, imunologie a imunogenetiky, postupně se ukázaly jako perspektivní i ve výzkumu v oblasti onkologie, epigenetiky, vývojové biologie a transgeneze. V současné době bývá často nahrazován myším modelem pro snadnější manipulaci a menší nákladovost chovu, i když stále jsou oblasti výzkumu, kde je použití tohoto modelu výhodné.

V Kolči jsou chovány vysoce inbrední linie C, H6, L15, M a Wa s koeficientem inbreedingu $F_x > 0.99$. Linie C je chována v jedenácti kongenních liniích se společným genetickým pozadím a u každé linie je jeden privátní gen (haplotyp) většinou z hlavního histokompatibilního komplexu (MHC). První skupinu tvoří systém kongenních linií odvozených z původní dvojice CB a CC. Další kongenní linie byly postupně odvozeny převedením různých MHC haplotypů na pozadí těchto linií pomocí opakovaného zpětného křížení s pravidelnou serologickou a transplantační kontrolou. V několika případech jde o unikátní rekombinované haplotypy. Haplotyp MHC je u inbredních linií základním rozlišovacím znakem. Kromě haplotypu MHC je u inbredních linií definována řada vlastností jako rezistence a citlivost k virovým onemocněním z komplexu aviárních leukóz (ALV) a Markově chorobě, erytrocytární antigeny, polymorfní proteiny, endogenní virové sekvence, genetická determinanta barvy opeření atd. Linie CB a CC je také významná pro mezinárodní spolupráci.

Dále jsou zde chovány geneticky definované tři outbrední linie SH, BL a P. Základní charakteristikou linie BL je genotyp C/E (receptory pro ALV). Unikátní je linie P, v jejímž genomu nejsou přítomny endogenní virové sekvence ALV.

V chovu se používá výhradně umělá inseminace, vede se individuální evidence, rodokmenová plemenitba. U outbredních linií se do rodokmenové plemenitby zařazují jedinci na základě co nejnižšího koeficientu inbreedingu, vždy jeden kohout a pět slepiček v jednom kmeni, před

zařazením do plemnitby se u outbredních i inbredních linií provádí zdravotní testy na ALV. U inbredních linií se ve stáří 3 – 4 měsíců provádí kontrola správnosti původu testováním specifických erytrocytárních antigenů, které jsou pro jednotlivé linie specifické. Do jednotlivých kmenů jsou výhradně zařazováni vlastní sourozenci, vždy jeden kohout a tři až čtyři slepičky. Kuřata jsou líhnuta po vybraných matkách a ihned po vylíhnutí jsou očíslována křídelními známkami.

4. 2. Imunizace slepic

Pro pokus byla vybrána outbrední linie BL (Brown leghorn). Slepice byly umístěny v individuálních klecích s řízeným světelným režimem 13 hodin světla a krmeny standardní krmnou směsí pro nosnice NP od firmy Primagra, napájeny byly kapátkovými napáječkami s nepřetržitým přístupem k vodě. Vrchol tvorby protilátek nastává čtvrtý den po poslední aplikaci antigenu *in venum*. Imunizace probíhala pod vedením Ing. Jiřího Plachého.

1.

Pro imunizaci byly vybrány antigeny TEAD2 a ETV4, které byly připraveny na pracovišti UMG v Praze v Krči na Oddělení buněčné a vývojové biologie a zamraženy v mikrozkuvkách typ Eppendorf 1,5ml (Scientific Specialties Inc.).

2.

Každý antigen byl při jednotlivých imunizacích rozdělen na dvě dávky pro dvě slepice.

TEAD2 slepice číslo 6065 a 6063

ETV4 slepice číslo 6051 a 6177

3.

Slepice se imunizovaly v prvním cyklu ve třech termínech, po té následoval kontrolní odběr sér a sběr vajec. Přibližně dva měsíce od poslední imunizace následoval druhý cyklus imunizace opět ve třech termínech s konečným odběrem sér a sběrem vajec.

- První cyklus imunizace.

1ml TEAD2 – 5mg/ml v PBS/4M urea (po třech zamražených mikrozkuvkách)

1ml ETV4 – 0,5mg/ml v PBS/4M urea (po třech zamražených mikrozkuvkách)

První imunizace byla subkutánní, bylo aplikováno 0,5ml antigenu + 0,5ml inkompletní Freundovo adjuvans (Sigma-Aldrich) pro lepší imunitní odpověď organismu. Antigeny byly rozmrazeny při pokojové teplotě těsně před aplikací a smíchány s adjuvans a aplikovány do podkoží na hřbetě pomocí 5ml stříkačky s jehlou 0,60 x 25mm (Braun).

Druhá imunizace se opakovala po sedmi dnech a aplikace byla také subkutánní s inkompletním adjuvans se stejným objemem antigenu jako u první.

Třetí imunizace se opakovala po přibližně čtrnácti dnech od druhé imunizace a byla *in venum*, 0,5ml antigenu + 1 ml sterilního fosfátového pufru (PBS - NaCl 8 g/l; KCl 0,2 g/l; KH₂PO₄ 0,2 g/l; Na₂HPO₄ 1,15 g/l) kvůli lepší aplikaci.

Čtyři dny od poslední *in venum* aplikace antigenu se provedl kontrolní odběr sér na přítomnost protilátek a začala se sbírat vejce pro izolaci protilátek ze žloutku. Vejce se sbírala čtrnáct dní.

Číslo slepice	Antigen	Datum imunizace		
6065	TEAD2	03.11.2015	10.11.2015	26.11.2015
6063	TEAD2	03.11.2015	10.11.2015	26.11.2015
6051	ETV4	03.11.2015	10.11.2015	26.11.2015
6177	ETV4	03.11.2015	10.11.2015	26.11.2015

odběr sér	sběr vajec od
30.11.2015	30.11.2015

Tab. 1. Schéma prvního cyklu imunizace.

- Druhý cyklus imunizace.

1ml TEAD2 - 5mg/ml v PBS/4M urea (po třech zamražených mikrozkuvkách)

1ml ETV4 – 1,1mg/ml v PBS/4M urea (po třech zamražených mikrozkuvkách)

První aplikace antigenu byla subkutánně na hřbetní části slepice. Objem antigenu byl doplněn sterilním puřrem PBS do 1ml a přidáno 1ml inkompletní Freundovo adjuvans.

Druhá aplikace byla *in venum* s odstupem dva týdny v dávce 0,5ml antigenu + 1ml sterilního PBS.

Třetí aplikace se opět opakovala po dvou týdnech *in venum* v dávce 0,5ml antigenu + 1ml sterilního PBS.

Čtyři dny od poslední aplikace antigenu se opět provedl kontrolní odběr sér a začal čtrnáctidenní sběr vajec.

Číslo slepice	Antigen	Datum imunizace		
6065	TEAD2	18.01.2016	01.02.2016	16.02.2016
6063	TEAD2	18.01.2016	01.02.2016	16.02.2016
6051	ETV4	18.01.2016	01.02.2016	16.02.2016
6177	ETV4	18.01.2016	01.02.2016	16.02.2016

odběr sér	sběr vajec od
20.02.2016	20.02.2016

Tab. 2. Schéma druhého cyklu imunizace.

- Odběr krve na sérum

Krev byla odebírána ze žíly na krku v objemu 20ml od každého zvířete do předem popsaných injekčních stříkaček o objemu 20 ml (Braun), odebraná krev se v jednotlivých popsaných stříkačkách nechala srazit v termostatu při teplotě 37°C, sražený krevní koláč se nechal ve stříkačkách a sérum bez krevních elementů se stočilo do cetrifugačních zkumavek se šroubovacím víčkem 15 ml (Kartell S.p.A.). Zkumavka se sérem se následovně stočila v centrifuze (Jouan) při 1200 otáčkách po dobu 4 minuty. Sérum se odsálo pomocí pipety do čistých totožných zkumavek a popsalo datem odběru a číslem slepice a zamrazilo při -20°C.

- Sběr vajec

Vejsce se sbírala vždy čtvrtý den od poslední aplikace antigenu a sběr vajec trval čtrnáct dní. Vejce byla uchovávána v chladničce při teplotě 8°C, vejce vždy byla popsána datem snášky a číslem slepice a byla skladována v platech za sebou po jednotlivých slepicích pro větší přehlednost. Od každé slepice bylo za jedno čtrnáctidenní období nasbíráno okolo deseti vajec, což bylo dostačující pro následnou izolaci protilátek. Pro konečnou izolaci protilátek ze žloutku byla využita pouze vejce po druhém cyklu imunizace pro větší předpoklad obsahu námi požadovaných protilátek.

4. 3. Izolace protilátek ze žloutku

Na izolaci kuřecích protilátek byla použita metoda, která využívá precipitaci IgY pomocí polyethylenglykolu (Pauly a kol., 2011).

- Nejdříve se odseparoval žloutek od bílku klasickým způsobem.
- Oddělený žloutek se dal do centrifugačních zkumavek popsaných číslem slepice o objemu 50ml (Kartell S.p.A.) a doplnil fosfátovým pufrem PBS na dvojnásobek objemu, v tomto případě byl objem doplněn do 50ml.

- Navázilo se 1,75g polyethylenglykolu PEG 6000 (Sigma-Aldrich), aby byl v koncentraci 3,5 % a 15 minut se míchal při pokojové teplotě v ruce pomalým překlápěním. Roztok získal světle žlutou barvu a bylo patrné srážení.
- Po předchozím promíchání se zkumavky vložili do centrifugy (Beckman Coulter, USA) a stočily při 5000g po dobu 20 minut při pokojové teplotě 20°C.
- Přes trychtýř s gázou se supernatant přelil do čistých popsanych zkumavek a doplnilo se stejné množství chloroformu a zkumavky se promíchaly otáčením, až se objevila polotuhá fáze. Obsah se po té přelil do skleněných zkumavek, aby při centrifugování chloroform nepoškodil plastové zkumavky a stočil se při 3000g po dobu 20 minut při pokojové teplotě.
- Opatrně se odsál supernatant a přendal do čistých popsanych uzavíratelných zkumavek. Přidal se PEG6000 na finální koncentraci 15 % a zkumavky se míchaly se přibližně 30 minut při pokojové teplotě
- Zkumavky se stočily v centrifuze při 5000g po dobu 30 minut při pokojové teplotě.
- Supernatant se odstranil pryč a sediment na dně zkumavek se rozpustil v PBS a nechal přes noc při 4°C pro dokonalé rozpuštění.
- Poté se izolované protilátky rozplnily do mikrozkušavek 1,5 ml.

4. 4. Testování krevních sér pomocí imunocytochemie

Buňky byly uchovávány v mediu Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM) - (Sigma-Aldrich).

Buňky se nasadily do petriho misky, přidalo se fetální bovinní sérum (FBS), antibiotika a L-Glutamin. Buňky se nechaly do druhého dne růst.

Buňky se resuspendovaly a daly do destiček s jamkami (300 µl). Buňky se jedenkrát promyly 100 µl PBS, poté se fixovaly methanolem po dobu 20 min, následně se pětkrát promyly 100 µl PBS, přidalo se 50 µl primární protilátky (séra od jednotlivých slepic 6065, 6063, 6051, 6177) na dobu 60 min., poté se třikrát promyly 100 µl PBS. Přidalo se 50 µl sekundární protilátky Goat anti-Chicken IgY (Invitrogen Molecular Probes) asociované s peroxidázou na dobu 45

minut. Třikrát se promyly 100 μ l PBS. V temnu se rozmrazil 3-amino-9-ethyl-carbazol (AEC), který je uchováván při -20°C , k AEC se přidalo 1% H_2O_2 (5 μ l H_2O_2 /1ml AEC) a aplikovalo se 50 μ l. Inkubovalo se v temnu 10-15min. Výsledek se zhodnotil pod mikroskopem.

4. 5. Western blot

Před samotným Western blotem byla pro rozdělení proteinů použita SDS elektroforéza na 10% akrylamidovém gelu, která byla připravena v laboratoři Oddělení buněčné a vývojové biologie. Metoda Western blot byla provedena za pomoci Mgr. Martiny Vojtěchové Phd.

Z gelu byly rozdělené proteiny přeneseny metodou elektropřenosu na membránu, kde byly proteiny detekovány pomocí slepičích protilátek.

Gel z elektroforézy se dal do blotovacího pufru, složil se sendvič pro přenos proteinů, na anodu se umístil filtrační papír navlhčený v přenosovém pufru, na filtrační papír se položila v pufru navlhčená membrána, na membránu se položil oříznutý gel z elektroforézy a ten se překryl filtračním papírem navlhčeným v přenosovém pufru a takto poskládaný sendvič se k sobě důkladně přitiskl, aby nikde nebyly žádné vzduchové bubliny a vše se přiklopilo víkem s katodou. Přenos trval 30 minut. Membrána byla blokována v 5% odtučněném mléku při 4°C , aby se zablokovala místa, na které se nepřenesly proteiny z gelu a předešlo se tak nespecifickým reakcím. Membrána se vložila do zkumavky, kde se ovinula okolo vnitřní stěny. Na membránu se aplikovala primární protilátka (naše slepičí protilátky) při stálém omývání přes noc při 4°C . Membrána se třikrát promyla v PBS a aplikovala se sekundární protilátka Goat anti-Chicken IgY na jednu hodinu. Membrána se převedla na film a vyvolala na fotopapír a naskenovala do počítače.

4. 6. Imunohistochemie na parafinových řezech

Byla použita imunohistochemická metoda využívající barvení tkáňových řezů (Beranová a Tonar, 2002).

Do racku se naskládaly skla, na kterých jsou fixovány tenké tkáňové řezy a zavodňovací řadou se deparafinizovaly, skla s tkáňovými řezy nesmí vyschnout až do odvodnění.

Deparafinizace (zavodňovací řada)

- xylen deparafinizační 8 minut
- vyměnit xylen 8 minut
- xylen : ethanol (EtOH) 1:1 3-5 minut
- 100% EtOH 5 minut
- vyměnit 100% EtOH 5 minut
- 96% EtOH 3 minuty
- 70% EtOH 3 minuty

Při fixaci tkáně na skla došlo k zamaskování antigenních míst a ty se musí odkrýt, aby bylo možné navázat protilátku.

Skla se po zavodnění přendala do zeleného racku a ten se umístil do kádinky o objemu 1litr s 800 ml citrátového pufru (10mM citrát sodný; pH 6). Vršek kádinky se zakryl alobalem s dostatečným překryvem, aby dovnitř nevnikla voda. Kádinka se vložila do papiňáku. Do papiňáku se nalila voda, aby její hladina byla zároveň s hladinou pufru v kádince, a nechalo se to 15 minut vařit. Po uvaření se kádinka ve dřezu chladila pomalu studenou vodou (řezy nesmí projít prudkou změnou teploty, došlo by k poškození epitopů pro navázání protilátky). Po zchladnutí se dvakrát po pěti minutách promyly v Tris-Buffered Saline (TBS - 50mM Tris, 150mM NaCl; pH 7,6), (Sigma-Aldrich).

Následovala blokáce endogenních peroxidáz roztokem 0,3% H₂O₂ v methanolu po dobu 25 minut při pokojové teplotě, pak se řezy promyly 5 minut v PBS. Následovala blokáce endogenních imunoglobulinů roztokem 5% kozího séra smíchaného s 1% sérem bovinní albuminové sérum (BSA)(Sigma-Aldrich), řezy se obkroužily PAP-PENem a nakapalo se potřebné množství séra a nechalo se hodinu ve vlhké komůrce inkubovat.

Inkubace s primární protilátkou. Primární protilátka se naředila do roztoku 5% kozího séra smíchaného s 1% sérem BSA a přidal se azid (NaN₃) do výsledné koncentrace 0,01% (roztok se potom nekazí a může se použít opakovaně), řezy se opět obkroužily PAP-PENem a nakapalo se přiměřené množství naředěné protilátky a inkubovaly se přes noc ve vlhké komůrce. Ráno se skla nechala vytemperovat na pokojovou teplotu. Skla se promyla v TBS + 1% TritonX-100 (Sigma-Aldrich) 5 minut při pokojové teplotě a dále se třikrát po pěti minutách promyla v TBS. Inkubace se sekundární protilátkou. Byla použita biotinylovaná sekundární protilátka Goat anti-Chicken IgY (GACHi) v koncentraci 1:750 v 5% kozím séru v TBS. Skla s řezy se inkubovala hodinu při pokojové teplotě ve vlhké komůrce. Po inkubaci se skla poprvé promyla v TBS + 0,01% TritonX100 po dobu 5 minut při pokojové teplotě, pak se čtyřikrát promyla pouze v TBS vždy 5 minut.

Mezi promýváním se připravil roztok Vectasian kit ABC (Vector Laboratories) – avidin-biotinylovaná peroxidasa, na 5 ml TBS se dalo 50 µl 10% roztoku TritonX-100 a 1 kapka roztoku A + 1 kapka roztoku B v kitu. Roztok se nechal stát 30 minut při pokojové teplotě.

Amplifikace signálu systémem ABC. Skla se umístila do vlhké komůrky a na řezy se aplikoval roztok ABC a nechalo se inkubovat 60 minut při pokojové teplotě. Po inkubaci se skla poprvé promyla v TBS + 0,01% TritonX100 po dobu 5 minut při pokojové teplotě, pak se čtyřikrát promyla pouze v TBS vždy 5 minut.

Barvení řezů. 90 ml 50 mM Tris (pH 7,6) se ohřálo ve skleněné kyvetě ve vodní lázni na 37°C, poté se přidalo 60 µl 30% H₂O₂ a 30 mg 3,3'-Diaminobenzidin (DAB)(Sigma-Aldrich), DAB je silný karcinogen. DAB se nejprve rozpustil v 1 ml tkáňové vody a po rozpuštění se napipetoval do kyvety. Skla s řezy se nachala vyvíjet v kyvetě a neustále se sledovala, zda začínají hnědnout, nesmí se tam nechat déle než 5 minut, pak se začíná nespecificky barvit pozadí. Po třech minutách se skla s obarvenými řezy přendala do destilované vody a tím se stopla reakce barvení.

Dehydratační řada - 70% ethanol 3 minuty

- 96% ethanol 3 minuty

- 100% ethanol 5 minut

- 100% ethanol 5 minut

- ethanol : xylen v poměru 1 : 1 5 minut

- xylen 8 minut

- xylen 8 minut

Po vytažení z xylenu se skla nechala lehce okapat, spodní strana se otřela a na řezy se nakapalo montovací medium DPX Mountant (Sigma-Aldrich). Pomalu se přiložilo krycí sklíčko, aby se montovací medium pravidelně rozlilo a pod sklíčkem se nevytvořily malé bubliny. Potom se skla dala do digestoře a nechala do druhého dne vytvrdnout. Po vytvrdnutí se skla dají skladovat v krabici při pokojové teplotě.

Vyhotovené preparáty se vyhodnotily pod mikroskopem DM6000 (Leica).

5. Výsledky

Cílem diplomové práce bylo připravit kuřecí protilátky imunizací slepic proti dvěma proteinům TEAD2 a ETV4 a prokázat jejich specifitu detekcí endogenních proteinů na histologických řezech. Všechny obrázky a fotografie z testů byly pořízeny za pomoci Mgr. Vítězslava Kříže, Ph.D.

5. 1. Imunocytochemie

Pro imunocytochemické otestování sér byly použity buňky transfekované konstruktem exprimující buď protein TEAD2 nebo ETV4.

Test byl opakován dvakrát. Výsledky z imunocytochemie neprokázaly přítomnost protilátek v séru. Neprokázání přítomnosti protilátek lze vysvětlit buď nevhodností slepičích sér, které obsahovaly vysoký podíl lipidů a jejich konzistence byla hustá až gelovitá nebo mohla nastat chyba v protokolu při testování sér.

5. 2. Western blot

Protilátky izolované z vaječného žloutku byly otestovány metodou western blot, jako vzorky pro detekci příslušné protilátky byly použity jak netransfekované buňky tak buňky overexprimující sledovaný protein (transfekované konstruktem exprimující tagovaný protein buď ETV4-flag nebo TEAD2-myc), ty sloužily jako kontrolní vzorky pro detekci sledovaného proteinu.

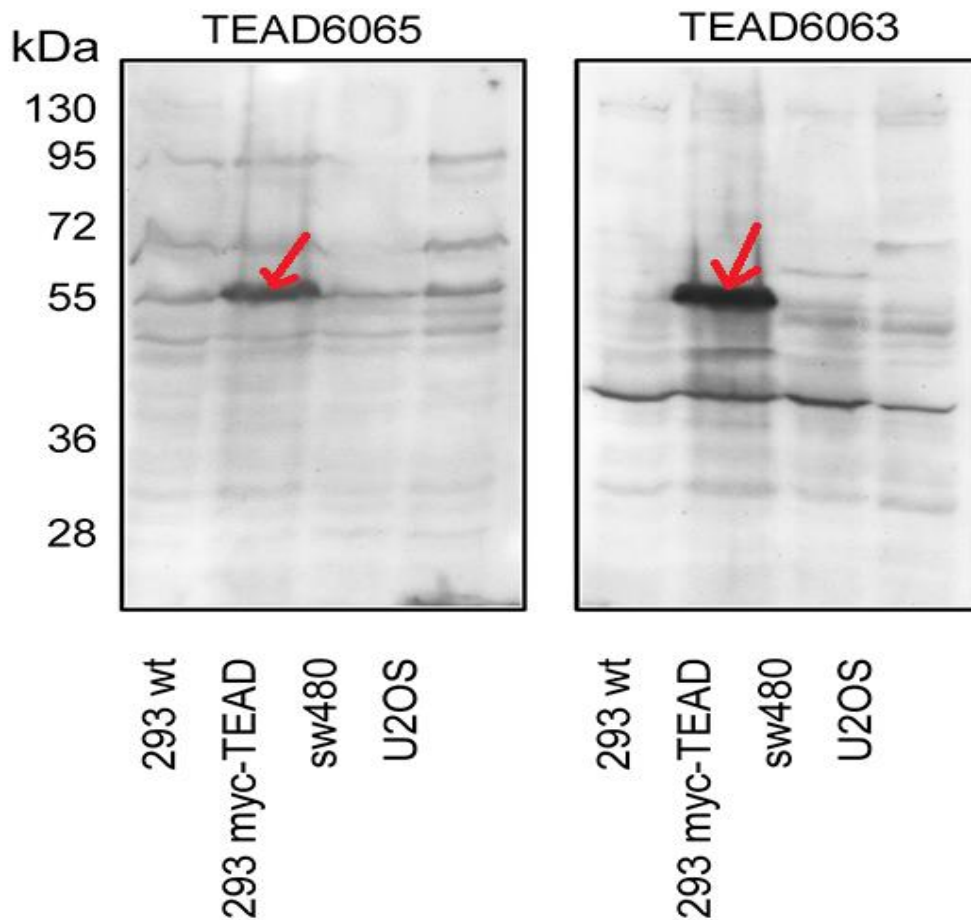
5. 2. 1. Protilátky TEAD2

Pro protein TEAD2 byly použity protilátky č. TEAD6065 a TEAD6063.

U protilátky TEAD6065 byla vyhodnocením western blotu prokázána detekce u transfekovaných i netransfekovaných lidských buněk, to znamená, že protilátka detekovala i endogenní expresi proteinu a to ukazuje na specifčnost protilátky což je důležité pro imunologické testy. Výsledek je vidět na obrázku č. kdy je detekce charakterizována proužkem na hodnotě 55kDa, který je charakteristický pro protein TEAD2, kde se ukazuje i u netransfekovaných buněk, jako kontrolní vzorek slouží buňky s overexprimovaným genem pro

daný protein, kde je proužek na hodnotě 55 kDa jasně viditelný. Protilátka TEAD6065 se dá považovat za specifickou.

U protilátky TEAD6063 nebyla specifčnost prokázána, nebyla zde detekována endogenní exprese proteinu, ale jen exprese u overexprimovaných buněk u buněk netransfekovaných chybí charakteristický proužek na hodnotě 55 kDa. Protilátka rozpozná pouze silný signál u overexprimovaného proteinu, kdy je protein přítomen ve velké míře, detekce proužků na dalších hodnotách je dána povahou polyklonálních protilátek, kdy jsou detekovány i podobné epitopy.

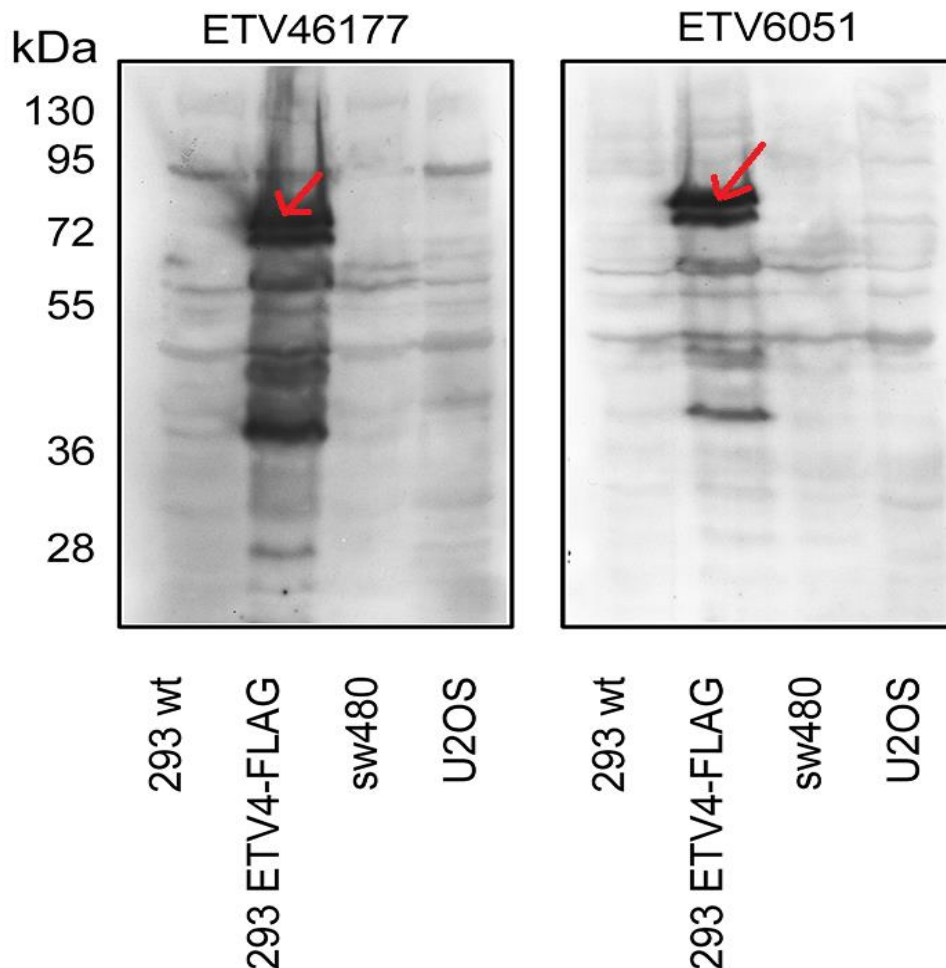


Obr. 8. Vyhodnocení Western Blotu pro TEAD2. 293wt – epiteliální buňky z lidských embryonálních ledvin (HEK293), 293 myc-TEAD – buňky s overexprimovaným TEAD2, sw480 - buňky odvozené od kolorektálního karcinomu, U2OS – osteosarkomální buňky. Červená šipka ukazuje na proužek charakteristický pro protein TEAD2

5. 2. 2. Protilátky ETV4

Pro protein ETV4 byly použity protilátky ETV6051 a ETV6177.

U protilátek proti proteinu ETV4 se metodou Western blot specifita protilátek nepotvrdila. Na výsledku je vidět, že u netransfekovaných buněk v oblasti hodnoty 72 kDa, nelze detekovat charakteristický proužek, který pokud by se jednalo o specifické protilátky, by měl být v této hodnotě viditelný, ale byl viditelný jen u buněk s overexprimovaným genem pro protein ETV4, jak ukazuje červená šipka na obrázku. Specifita se nepotvrdila u protilátky ETV6051 ani u ETV6177.



Obr. 9. Vyhodnocení Western Blotu pro ETV4. 293wt – epiteliální buňky z lidských embryonálních ledvin (HEK293), 293 ETV4-flag – buňky s overexprimovaným ETV4, sw480 - buňky odvozené od kolorektálního karcinomu, U2OS – osteosarkomální buňky. Červená šipka ukazuje na proužek charakteristický pro protein ETV4.

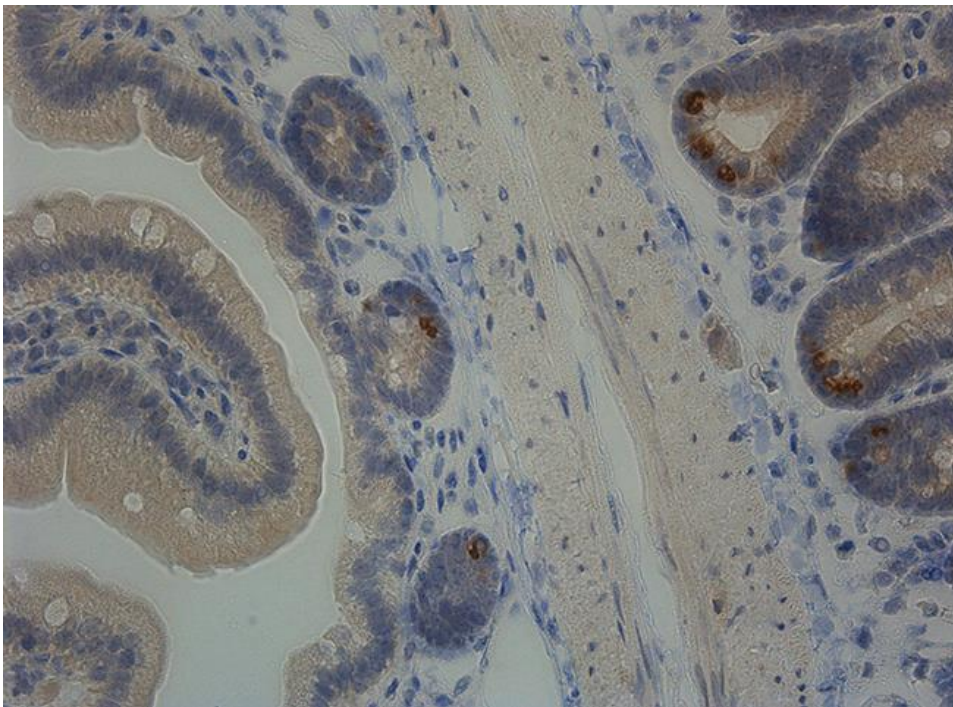
5. 3. Imunohistochemie na parafínových řezech

Výsledek imunohistochemie byl pro ověření specifických protilátek nejdůležitější a nejprůkaznější, protilátku, která fungovala na parafínových řezech, lze považovat za specifickou proti vybranému antigenu. Jako negativní kontrola byly použity řezy, na které nebyla aplikována primární slepičí protilátka, ale pouze sekundární protilátka Goat anti-chicken IgY (GACHi)

5. 3. 1. Protilátky TEAD2



a)

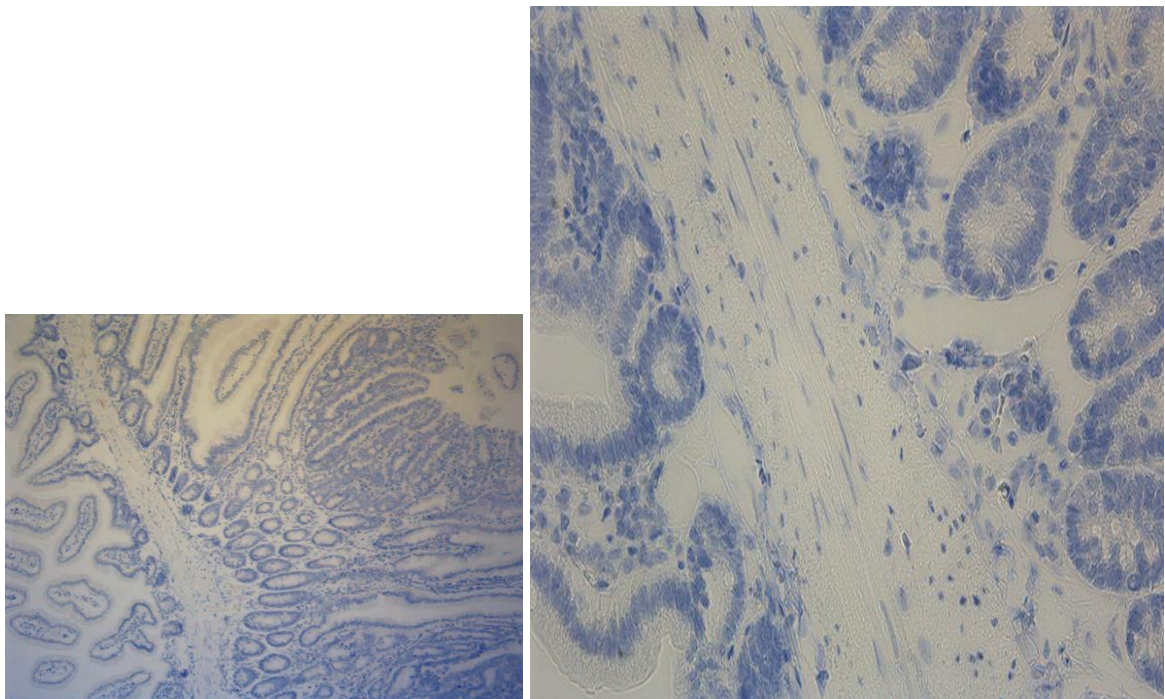


b)

Obr. 10.

Obr. 10. Kuřecí protilátka TEAD6065, a) zvětšeno 100x, b) zvětšeno 400x, je patrné hnědé zbarvení v oblasti buněčných jader v buňkách střevních krypt.

U protilátky TEAD6065 (**obr. 10**) je po obarvení sekundární protilátkou vidět, že se buňky střevních krypt specificky hnědě obarvily v oblasti buněčných jader, kde se protein TEAD2 jako transkripční faktor nachází. Protilátka TEAD6065 se prokázala v tomto testu jako specifická. To ukazuje i obrázek se vzorkem negativní kontroly, kdy byla použita pouze sekundární protilátka proti IgY a nedošlo zde k žádnému hnědému barvení (**obr. 11 a 12**).



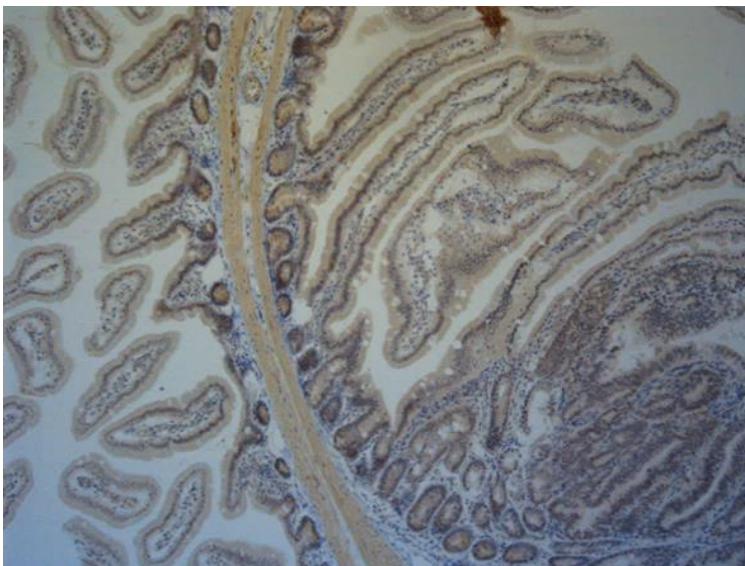
Obr. 11. Negativní kontrola. Byla použita pouze sekundární protilátka proti kuřecímu IgY, není patrné žádné barvení jako u předchozího obrázku.



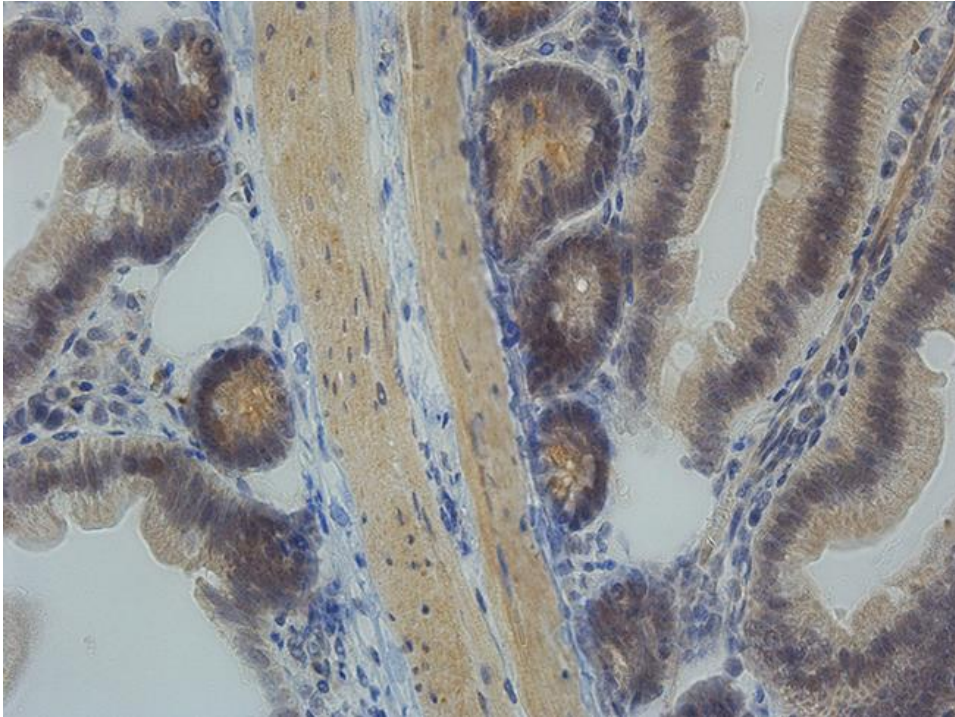
Obr. 12. Negativní kontrola, není patrné žádné barvení buněk.

5. 3. 2. Protilátky ETV4

U protilátek ETV6051 a ETV6177 (**Obr. 13, 14 a 15**), se specifita na parafinových řezech neprokázala, hnědé barvení buněk bylo patrné v jádrech i cytoplasmě a pozitivní buňky nejsou lokalizovány ve střevních kryptách, kde by měly být. Protilátky proto nelze považovat za specifické.



Obr. 13. Kuřecí protilátka ETV6051, zvětšeno 100x, hnědé obarvení buněk je patrné jak v jádrech, tak v cytoplasmě.



Obr. 14. Kuřecí protilátka ETV6051, a) zvětšeno 100x, b) zvětšeno 400x, hnědé obarvení buněk je patrné jak v jádrech, tak v cytoplazmě.



Obr. 14. Kuřecí protilátka ETV6177, zvětšeno 100x, hnědé obarvení buněk je patrné jak v jádrech, tak v cytoplazmě.



Obr. 15. Kuřecí protilátka ETV6177, zvětšeno 400x, hnědé obarvení buněk je patrné jak v jádrech, tak v cytoplasmě.

6. Diskuze

U protilátek připravených imunizací slepic bylo zjištěno, že slepičí polyklonální protilátky mohou fungovat v imunologických testech, specificky prokazatelně fungovala jedna protilátka ze čtyřech. Pro přípravu polyklonálních protilátek je vhodné použít pro imunizaci větší počet zvířat, což souvisí s povahou polyklonálních protilátek, kdy při imunizaci dochází ke stimulaci různých B lymfocytů a k produkci protilátek proti různým epitopům daného antigenu, specifita získaných protilátek závisí na imunizačním protokolu a v jaké fázi imunitní odpovědi zvířete jsou protilátky získávány, což je v souladu s výsledky autorů Hanly a kol. (1995).

Proteiny TEAD2 i ETV4 jsou vysoce konzervované proteiny, které se v savcích hůře připravují a proto, bylo vhodné pro imunizaci použít slepice, jako fylogeneticky vzdálenější druh, který bude proti těmto antigenům lépe vytvářet protilátky, to se shoduje s výsledky Larsson a kol., (1993), Gassman a kol., (1990), jako alternativu za králičí polyklonální protilátky uvádějí využití slepičích protilátek z vaječného žloutku i Schade a kol., (2005).

Testování sér pomocí imunocytochemie neprokázalo přítomnost protilátek, což může souviset s problematickým získáváním sér od slepic, které jsou v plné snášce, kdy se krev hůře sráží, v některých případech nebylo možné úplně oddělit krevní elementy od séra, sérum také obsahuje velké množství lipidů, což je shodné s výsledky Comert a kol., (2016). Struktura sér byla dost hustá až skoro gelovitá, vhodnější pro získávání protilátek z krevních sér jsou proto mladé slepičky nebo kohoutci to uvádí i Hanly a kol. (1995), což v tomto případě nebylo splněno.

Dále byly otestovány protilátky izolované z vaječného žloutku. Na western blotu fungovaly všechny naše protilátky na transfekovaných buňkách, ale specificky se prokázala pouze protilátka TEAD6065, která detekovala i endogenní expresi proteinu. Protilátka TEAD6063 detekovala pouze nadexprimovaný protein, v buňkách které nebyly nadexprimovány protilátka protein neviděla, to mohlo být způsobeno slabou imunitní odpovědí organismu na daný antigen. I když při imunizaci slepic bylo použito Freundovo adjuvans což zvyšuje imunitní odpověď organismu, Barinova a kol., (2017) uvádějí, že adjuvans způsobuje částečnou denaturaci proteinu a tím vznikají protilátky proti nativní i denaturované formě proteinu, což je při western

blotu výhodné. U protilátky TEAD6063 byla na Western blotu patrná detekce i v jiné oblasti než 55 kDa, to mohlo být způsobeno povahou polyklonálních protilátek, kdy byly detekovány podobné epitopy příbuzných proteinů, což může být nevýhoda polyklonálních protilátek v imunologických testech, to se schoduje i s Hanly a kol., (1995). V imunologických testech se při použití polyklonálních protilátek nejvíce využívají protilátky králíčí, to uvádějí Schade a kol., (2006), Hanly a kol., (1995). Zheng a kol., (2016) ve své studii uvádějí přípravu a použití polyklonálních protilátek pro identifikaci onkoproteinu E7 na Western blotu a při imunohistochemických metodách, který je exprimován v buňkách nádoru děložního krčku. Využití slepičích polyklonálních protilátek jako velice výhodných a účinných dokazuje také Nie a kol., (2014) ve své práci, kdy byly použity pro diagnostiku motolice žlučové *clonorchis sinensis*, protilátky byly připraveny proti cysteinové proteáze, která je produkována dospělými motolicemi, získané IgY specificky detekovaly cysteinovou proteázu na Western blotu a slepice se ukázaly jako velmi efektivní při přípravě IgY.

Při testování na histologických parafinových řezech fungovala specificky jedna protilátka TEAD6065, ostatní testované protilátky specificky nefungovaly. Příčina může být v proteinu ETV4, který je z rodiny transkripčních faktorů ETS a protilátka tak mohla reagovat s podobnými epitopy příbuzných proteinů což by potvrzoval i výsledek na Western blotu, kdy tato protilátka také nevyšla specificky, to je v souladu s výsledky Smith a kol., (2017), kde se, ale jednalo o protilátku monoklonální. Při další imunizaci by se muselo zkusit použít jen určitou specifickou část proteinu ETV4, zda by připravená protilátka fungovala specificky. Také mohlo dojít k nějaké chybě v imunizačním protokolu, ale to je méně pravděpodobné vzhledem k tomu, že všechny slepice byly imunizovány stejně.

Při další přípravě slepičích polyklonálních protilátek izolovaných z vajec, by bylo lepší zařadit do imunizace mladší zvířata, která by byla na začátku snášky, jak pro lepší imunitní odpověď mladšího organismu, tak i pro získávání protilátek z krevního séra, které se u starších zvířat ukázalo jako problematické.

7. Závěr

Cílem práce bylo ověřit možnost přípravy polyklonálních protilátek z vaječného žloutku imunizací slepic a jejich následné využití v diagnostických imunologických testech.

Specifita byla prokázána u protilátky TEAD6065, která svou specifitu potvrdila při testování metodou Western blot i na histologických řezech.

V diplomové práci byla potvrzena hypotéza, že použití slepičích polyklonálních protilátek v imunologických diagnostických testech je možné, všechny protilátky detekovaly nadexprimovaný protein na Western blotu, endogenní expresi detekovala pouze jedna protilátka, ale tento výsledek se dá pokládat za významný.

Pro tuto práci byly použity u savců vysoce konzervované proteiny, které se v savcích hůře připravují kvůli vysoké podobnosti v rámci savčích druhů, proto byly použity pro přípravu slepičích protilátek kde je větší fylogenetická vzdálenost a dá se předpokládat lepší imunitní odpověď.

Velká výhoda těchto protilátek spočívá hlavně v jednoduché přípravě, kdy pro získávání protilátek není nutné odebrat krev z cévního řečiště zvířete nebo z ascitické tekutiny a tudíž je tato metoda přípravy pro zvíře šetrná a nezpůsobuje mu trauma. I následná izolace z vaječného žloutku je poměrně rychlá a nenáročná metoda. Tyto výhody by mohly přispět k většímu využívání slepičích protilátek v praxi.

8. Seznam literatury

Akagi, T., Kuure, S., Uranishi, K., Koide, H., Costantini, F., Yokota, T. 2015. ETS-related transcription factors ETV4 and ETV5 are involved in proliferation and induction of differentiation-associated genes in embryonic stem (ES) cells. *The Journal of Biological Chemistry*. 290 (37). 22460-22473.

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. 2002. *Molecular Biology of the Cell*. Garland Science. New York. p. ISBN: 100815340729

Barinova, K. V., Khomyakova, E. V., Kuraysky, M. L., Schmalhausen, E. V., Muronetz, V. I. 2017. Denaturing action of adjuvant affects specificity of polyclonal antibodies. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 482 (4). 1265-1270.

Bartůňková, J., Paulík, M., 2011. *Vyšetřovací metody v imunologii*. Grada. Praha. p. 172. ISBN: 9788024735337.

Beranová, M., Tonar, Z. 2002. *Principy a příklady imunohistochemie*. Ústav histologie a embryologie LF UK v Plzni. p. 31.

Carlander, D., Ståhlberg, J., Larsson, A. Chicken antibodies: a clinical chemistry perspective. *Upsala Journal of Medical Sciences*. 104 (3). 179-189.

Ciriaco, E., Pinera, P. P., Diaz-Esnal, B., Laura, R. 2003. Age-Related Changes in the Avian Primary Lymphoid Organs (Thymus and Bursa of Fabricius). *Microscopy Research and Technique*. 62. 482-487.

Cömert, M., Şayan, Y., Kırkpınar F., Bayraktar, Ö. H., Mert, S. 2016. Comparison of Carcass Characteristics, Meat Quality, and Blood Parameters of Slow and Fast Grown Female Broiler Chickens Raised in Organic or Conventional Production System. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*. 29 (7). 987-997.

Crocker, J., Murray, G. P., 2003. *Molecular Biology in Cellular Pathology*. John Wiley & Sons Ltd. Chichester, West Sussex. p. 380. ISBN: 0470844752

Ferenčík, M., Rovenský, J., Mařha, V., Utěšený, J. 2011. *Ilustrovaný slovník imunologie a alergologie*. Galén. Praha. p. 364. ISBN: 9788072627622

Gadde, U., Rathinam, T., Lillehoj, H. S. 2015. Passive immunization with hyperimmune egg-yolk IgY as prophylaxis and therapy for poultry diseases – A review. *Animal Health Research Reviews*. 16 (2). 163-176.

Gassmann, M., Thommes, P., Weiser, T. 1990. Efficient production of chicken egg yolk antibodies against a conserved mammalian protein. *FASEB Journal*. 4. 2528-2532.

Hanly, W., Artwohl, J. E., Bennett, B. T. 1995. Review of Polyclonal Antibody Production Procedures in Mammals and Poultry. *ILAR journal*. 37 (3). 93-118.

He, J., Hu, J., Thirumalai, D., Schade, R., Du, E. 2015. Development of indirect competitive ELISA using egg yolk-derived immunoglobulin (IgY) for the detection of Gentamicin residues. *Journal of Environmental Science and Health*. 51. 8-13.

Hořejší, V., Bartůňková, J. 1998. *Základy imunologie*. Triton. Praha. p. 219. ISBN: 808587573X

Jiang, X., Diraviyam, T., Zhang, X. 2016. Affinity purification of egg yolk immunoglobulins (IgY) using a human mycoplasma protein. *Journal of Chromatography*. 1012. 37-41.

Landin-Malt, A., Benhaddou, A., Zider, A., Flagiello, D. 2016. An evolutionary, structural and functional overview of the mammalian TEAD1 and TEAD2 transcription factors. *Gene*. 291 (1). 292-303.

Larsson, A., Balow, R., Lindahl, T. L., Forsberg, P. 1993. Chicken antibodies: Taking Advantage of Evolution-A review. *Poultry Science*. 72. 1807-1812.

Lee, D. H., Jeon, Y., Park, Ch., Kim, S., Lee, D. S., Lee, Ch. 2015. Immunoprophylactic effect of chicken egg yolk antibody (IgY) against a recombinant S1 domain of the porcine epidemic diarrhea virus spike protein in piglets. *Archives of Virology*. 160 (9) 10.

Lee, D. S., Vornrhein, C., Albarado, D., Raman, C. S., Veeraraghavan S. 2016. A Potential Structural Switch for Regulating DNA-Binding by TEAD Transcription Factors. *Journal of Molecular Biology*. 428 (12). 2557-2568.

Lipman, S. N., Jackson, R. L., Trudel, J. L., Weis-Garda, F. 2005. Monoclonal versus polyclonal antibodies: Distinguishing characteristics, applications, and information Resources. *ILAR Journal*. 46 (3). 258-268.

Machová, I., Brázdová, A., Fusek, M., Zídková, J. 2012. Nádorové markery a jejich využití v klinické praxi. *Chemické listy*. 106. 16-19.

Miller, C. H., O'Meally, D., Ezaz, T., Amemiza, Ch., Marschall-Graves, J. A., Edwards, S. 2015. Major Histocompatibility Complex Genes Map to Two Chromosomes in an Evolutionarily Ancient Reptile, the Tuatara *Sphenodon punctatus*. *Genes, Genomes, Genetics*. 5. 1439-1451.

Nelson, P. N., Westwood, O. M., Jefferis, R., Goodall, M., Hay, F. C. 1997. Characterisation of anti-IgG monoclonal antibody A57H by epitope mapping. *Biochemical Society Transaction*. 25 (2). 373.

Nie, G., Wang, T., Lu, S. J., Liu, W. Q. 2014. Detection of *Clonorchis sinensis* Circulating Antigen in Sera from Chinese Patients by Immunomagnetic Bead ELISA Based on IgY. *Plos One*. 9 (12).

Oh, S., Shin, S., Janknecht, R. 2012. ETV1, 4 and 5: an oncogenic subfamily of ETS transcription factors. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*. 1826 (1). 1-12.

Pauly, D., Chacana, P. A., Calzado, E. G., Brembs, B., Schade, R. IgY Technology: Extraction of Chicken Antibodies from Egg Yolk by Polyethylene Glycol (PEG) Precipitation. 2011. *JoVE Journal*. 51. 3084.

Penka, M., Tesařová, E., 2012. *Hematologie a transfuzní lékařství II, Transfuzní lékařství*. Grada. Praha. p. 192. ISBN: 9788024734606.

Pobbati, A. V., Hong, W. 2013. Emerging roles of TEAD transcription factor and its coactivators in cancers. *Cancer Biology and Therapy*. 14. 390-398.

Ratcliffe, J. H. M., 2002. B cell development in gut associated lymphoid tissues. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 87. 337-340.

- Rosypal, S. 1999. Úvod do molekulární biologie. Díl druhý, (Makromolekulární biologie eukaryot). Brno. p. 304-600. ISBN: 809025621X
- Ryan, S. O., Cobb, A. B. 2012. Roles for major histocompatibility complex glycosylation in immune function. *Seminars in Immunopathology*. 34 (3) 425-441.
- Shevach, M. E., 2002. CD4+CD25+ suppressor T cells: more questions than answers. *Nature Reviews Immunology* 2. 389-400.
- Shimizu, M., Nagashima, H., Sano, K., Hashimoto, K., Ozeki, M., Tsuda, K., Hatta, H. 1992. Molecular stability of chicken and rabbit immunoglobulin G. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 56 (2). 270-274.
- Schade, R., Calzado, E. G., Sarmiento, R., Chacana, P. A., Porankiewicz-Asplund, J., Terzolo, H. R. 2005. Chicken Egg Yolk Antibodies (IgY-technology): A Review of Progress in Production and Use in Research and Human and Veterinary Medicine. *ATLA*. 33. 1-26.
- Smith, S. C., Palanisamy, N., Martin, E., Almenara, J., McHugh, J. B. 2017. The utility of ETV1, ETV4 and ETV5 RNA in-situ hybridization in the diagnosis of CIC-DUX sarcomas. *Histopathology*. 70 (4). 657-663.
- Toman, M. 2009. *Vetrinární imunologie*. Grada. Praha. p. 392. ISBN: 9788024724645.
- Vega, C., Bok, M., Saif, L., Fernandez, F., Parreno, V. 2015. Egg yolk IgY antibodies: A therapeutic intervention against group A rotavirus in calves. *Research in Veterinary Science*. 103. 1-10.

Wang, Ch., Lin, B., Chen, Ch. 2015. An aptamer targeting shared tumor-specific peptide antigen of MAGE-A3 in multiple cancers. *International Journal of Cancer*. 138. 918-926.

Zheng, Q. L., Wang, T., Jiang, S. J., Han, R. 2016. Production of Polyclonal Antibody to the HPV58 E7 Protein and Its Detection in Cervical Cancer. *Plos One*. 11 (12).