

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

PETER MATELIČ

**MODELIRANJE VARIABILNEGA DELA MONOKLONSKEGA
PROTITELESA PROTI CITOKERATINOM**

**MODELLING OF THE VARIABLE REGION OF MONOCLONAL ANTIBODY
AGAINST CYTOKERATINS**

Ljubljana, 2009

Diplomsko nalogo sem opravljal na Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom prof. dr. Janka Kosa in somentorstvom doc. dr. Bojana Doljaka. Modeliranje variabilnega dela protitelesa so opravili na Univerzi v Bath-u in na Univerzi UCSF v San Franciscu.

ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem doc. dr. Bojanu Doljaku za načrtovanje, vodenje in pomoč pri eksperimentalnem delu, njegovo dobro voljo in potrpežljivost in prof. dr. Janku Kosu za pregled diplomske naloge.

Zahvaljujem se tudi Samu Turku, ki je opravil prileganje obeh modelov variabilnega dela protitelesa in Petru Cimermančiču, ki je opravil modeliranje protitelesa na univerzi UCSF.

Hvaležen sem tudi svojim najbližjim, ki so mi stali ob strani z vzpodbudnimi besedami in me finančno podpirali.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo samostojno izdelal pod mentorstvom prof. dr. Janka Kosa in somentorstvom doc. dr. Bojana Doljaka.

Peter Matelič

Kazalo

1. Uvod.....	1
1.1 Intermediarni filamenti.....	1
1.1.1 Razdelitev in vloga.....	1
1.2 Citokeratini.....	3
1.2.1 Struktura CK	4
1.2.2 Funkcija repa in glave	5
1.2.3 Rekonstitucija IF <i>in vitro</i>	6
1.2.4 Izražanje CK.....	7
1.2.5 Vloga CK.....	10
1.2.6 CK kot diagnostični označevalci pri rakavih obolenjih	10
1.3 Monoklonska protitelesa	12
1.3.1 Proizvodnja monoklonskih protiteles.....	13
1.3.2 Monoklonsko protitelo proti citokeratinom	15
1.4 Modeliranje proteinov	16
1.4.1 Rentgenska difrakcija.....	16
1.4.2 Proteinska nuklearna magnetna resonanca (pNMR).....	17
1.4.3 Ab initio oz. de novo modeliranje proteinov.....	17
1.4.4 Modeliranje s primerjanjem homologije (homology modelling).....	19
1.4.5 Modeliranje protiteles	20
1.5 Principi analitskih metod.....	21
1.5.1 Imunoencimska metoda na trdni podlagi - ELISA.....	21
1.5.2 Elektroforeza	23
2. Namen dela.....	26
3. Materiali in metode	27
3.1 Materiali	27
3.1.1 Reagenti.....	27
3.1.2 Proteini	28
3.1.3 Pufri.....	28
3.1.4 Gojišča.....	30
3.1.5 Oprema	31
3.2 Metode.....	32
3.2.1 Priprava proti-CK mPt (serija 2)	32
3.2.2 Izolacija in čiščenje proti-CK mPt (serija 2).....	33
3.2.3 Imunoencimska metoda na trdni podlagi - ELISA.....	35
3.2.4 Elektroforeza	38
3.2.5 Točkovni nanos (dot blot)	42
3.2.6 Določitev 3D strukture proti-CK mPt	44
4. Rezultati	46
4.1 Priprava proti-CK mPt	46
4.1.1 Izolacija in čiščenje protiteles	46
4.1.2 Določitev koncentracije protiteles.....	48
4.2 Imunoencimska metoda na trdni podlagi – ELISA	48

Modeliranje variabilnega dela monoklonskega protitelesa proti citokeratinom

4.2.1 ELISA s CK8	48
4.2.2 ELISA z oktapeptidi	49
4.3 NaDS-PAGE	50
4.3.1 Nativna PAGE CK8	52
4.3.2 Nativna PAGE IF CK8/CK18	53
4.4 Točkovni nanos (dot blot)	53
4.5 Modeliranje proti-CK mPt	54
5. Razprava	58
5.1 Preverjanje vezave na rekombinantne CK	58
5.2 Modeliranje proti-CK mPt	61
5.3 Zaključek	62
6. Sklepi	63
7. Literatura	64

Seznam preglednic

<i>Preglednica I: Razdelitev CK po Schweizer-ju</i>	<i>3</i>
<i>Preglednica II: Stopnje priprave mišjih monoklonskih protiteles.....</i>	<i>14</i>
<i>Preglednica III: Laboratorijska oprema in aparature, uporabljene pri praktičnem delu diplomske naloge.</i>	<i>31</i>
<i>Preglednica IV: Redčitvena vrsta primarnih protiteles.</i>	<i>37</i>
<i>Preglednica V: Redčitvena vrsta primarnih protiteles.....</i>	<i>37</i>
<i>Preglednica VI: Potek poskusa NaDS-PAGE s 100 ng CK8.....</i>	<i>39</i>
<i>Preglednica VII: Potek poskusa NaDS-PAGE.</i>	<i>40</i>
<i>Preglednica VIII: Potek poskusa NaDS-PAGE lizata celic MCF-10A neoT.</i>	<i>40</i>
<i>Preglednica IX: Potek poskusa NaDS-PAGE CK18.</i>	<i>41</i>
<i>Preglednica X: Potek poskusa nativne PAGE CK8.....</i>	<i>41</i>
<i>Preglednica XI: Potek poskusa nativne PAGE IF CK8/CK18.....</i>	<i>42</i>
<i>Preglednica XII: Elucija mPt s kolone z elucijskim pufrom pH 2,5 (nanos 1).....</i>	<i>46</i>
<i>Preglednica XIII: Elucija mPt s kolone z elucijskim pufrom pH 2,5 (nanos 2).</i>	<i>46</i>
<i>Preglednica XIV: Elucija mPt s kolone z elucijskim pufrom pH 2,5 (nanos 3).</i>	<i>47</i>
<i>Preglednica XV: Elucija mPt s kolone z elucijskim pufrom pH 2,5 (nanos 4).....</i>	<i>47</i>
<i>Preglednica XVI: Elucija mPt s kolone z elucijskim pufrom pH 2,5 (nanos 5).</i>	<i>47</i>
<i>Preglednica XVII: Rezultati vezave proti-CK mPt (serija 1 in 2) na antigen CK8 različnih koncentracij.</i>	<i>48</i>
<i>Preglednica XVIII: Rezultati vezave proti-CK8 mPt na antigen CK8 različnih koncentracij.</i>	<i>49</i>
<i>Preglednica XIX: Rezultati vezave proti-CK mPt (serija 2) na antigen CK8 različnih koncentracij.</i>	<i>49</i>
<i>Preglednica XX: Rezultati vezave proti-CK mPt (serija 2) na peptide A, B in C.</i>	<i>50</i>
<i>Preglednica XXI: Verjetnost napovedi natančnosti modela glede na % ujemanja z znanim modelom.</i>	<i>56</i>

Seznam slik in grafa

<i>Slika 1: Shematičen prikaz zvitja v heterodimer</i>	<i>4</i>
<i>Slika 2: Shematski prikaz načinov povezave dimerov</i>	<i>5</i>
<i>Slika 3: Nastanek IF od enostavnega monomera do popolno zvitega IF debeline 8-12 nm</i>	<i>5</i>
<i>Slika 4: Omrežje citokeratinov obarvanih z imunofluorescenco</i>	<i>8</i>
<i>Slika 5: Shematski prikaz mesta delovanja encima kaspaze na CK18</i>	<i>12</i>
<i>Slika 6: Shematični prikaz imunoglobulina G</i>	<i>12</i>
<i>Slika 7: Posnetek zaslona osebnega računalnika na katerem teče proces preračunavanja zvitja proteina</i>	<i>18</i>
<i>Slika 8: Shema algoritma reševanja strukture protitelesa na spletnem strežniku WAM</i>	<i>21</i>
<i>Slika 9: Potek indirektnega testa ELISA in direktnega (sandwich) testa ELISA</i>	<i>22</i>
<i>Slika 10: Prikaz aparature za elektroforezo in ločitve mešanice makromolekul</i>	<i>24</i>
<i>Slika 11: Postopek izvajanja prenosa western</i>	<i>25</i>
<i>Slika 12: NC membrana inkubirana s proti-CK mPt (a) in s proti-CK8 mPt (Abcam)(b)</i>	<i>51</i>
<i>Slika 13: NC membrana blokirana v mleku</i>	<i>51</i>
<i>Slika 14 NC membrana lizatov celic MCF-10 neoT</i>	<i>52</i>
<i>Slika 15: NC membrana po nativni PAGE antigena CK8 in prenosu western</i>	<i>53</i>
<i>Slika 16: NC membrana po točkovnem nanosu</i>	<i>54</i>
<i>Slika 17: NC membrana po točkovnem nanosu</i>	<i>54</i>
<i>Slika 18: Lahka in težka veriga variabilne regije proti-CK mPt modeliranega z WAM</i>	<i>55</i>
<i>Slika 19: Primerjava strukture lahke verige modelirane s pomočjo strežnika WAM in strukture modelirane na univerzi UCSF</i>	<i>56</i>
<i>Slika 20: Primerjava strukture težke verige modelirane s pomočjo strežnika WAM in strukture modelirane na univerzi UCSF</i>	<i>56</i>
<i>Slika 21: Shema prileganja lahke verige s funkcijo autoalign spletnega strežnika WAM</i>	<i>57</i>
<i>Slika 22: Shema prileganja težke verige s funkcijo autoalign spletnega strežnika WAM</i>	<i>57</i>
<i>Graf 1: Primerjava absorbance pri vezavi proti-CK mPt in proti-stefin B mPt na peptide A, B, C</i>	<i>50</i>

Seznam okrajšav

Ag	antigen
AK	aminokislina
CDR	hipervariabilna regija (complementarity determining region)
CHAPS	3-[(3-kloroaminopropil)dimetilamino]-1-propansulfonska kislina
CK	citokeratin
CK IF	citokeratinski intermediarni filament
DAB	3,3'-diaminobenzidin
DMEM	eaglov medij, modificiran po Dulbeccu
DNA	deoksiribonukleinska kislina
DTT	ditiotreitol
EDTA	etilendiaminotetraacetat
EGF	epidermalni rastni faktor
ELISA	imunoencimska metoda na trdni podlagi
F12	rastni medij z L-glutaminom
Fc	konstantna regija protitelesa
FCS	telečji fetalni serum
Fv	variabilna regija protitelesa
GIT	gastrointestinalni trakt
HAT	hipoksantin, aminopterin, timidin
HEPES	4-(2-hidroksietil)-1-piperazineta sulfonska kislina
IF	intermediarni filament
IF CK8/CK18	intermediarni filament, sestavljen iz para CK8/CK18
Ig	imunoglobulin
MEM	minimalni esencialni Eaglov medij
MF	mikrofilamenti
mPt, MPt	monoklonsko protitelo
MT	mikrotubuli
NaDS	natrijev dodecilsulfat
NaDS-PAGE	poliakrilamidna gelska elektroforeza z natrijevim dodecilsulfatom
NC (membrana)	nitrocelulozna membrana
PBST 0,05%	PBS pufer z 0,05 % TWEEN 20
PDB	proteinska baza podatkov (protein database)
PEG	polietilenglikol
pNMR	Proteinska nuklearna magnetna resonanca
proti-CK mPt	monoklonsko protitelo proti citokeratinom
PVDF	poliviniliden fluorid
RNKRNA	ribonukleinska kislina
TEMED	tetrametiletildiamin
TRIS	2-amino-2-hidroksimetilpropan-1,3-diol

Povzetek

Napovedovanje strukture proteinov je pomembno, saj s pomočjo uspešno rešenih struktur proteinov, ki so tarča številnih zdravilnih učinkovin, lahko napovemo in izdelamo takšno molekulo, ki se bo na želeni protein kar najuspešneje vezala. Namen te diplomske naloge je bil preučiti epitetop na citokeratinih, ki ga prepozna monoklonsko protitelo proti citokeratinom.

Monoklonsko protitelo proti citokeratinom smo pripravili z gojenjem hibridomske celične linije v kompletnem gojišču za hibridome. Iz gojišča smo protitelesa izolirali s filtracijo, ultrafiltracijo in afinitetno kromatografijo. Za iskanje epitetopov na citokeratinih 8 in 18 ter intermediarnem filamentu iz citokeratinov 8 in 18 smo uporabili imunoencimsko metodo na trdni podlagi, točkovni nanos in poliakrilamidno gelsko elektroforezo s prenosom western. Z omenjenimi testi nismo uspeli potrditi vezave protiteles na omenjene tri antigene. Smo pa potrdili vezavo protitelesa na oktapeptide, katerih aminokislinsko zaporedje je skupno tem citokeratinom.

Na podlagi aminokislinskega zaporedja monoklonskega protitelesa proti citokeratinom smo s pomočjo raziskovalcev na univerzah v Bath-u (Velika Britanija) in San Franciscu (ZDA) z metodo prileganja zaporedja proteinov z znano tridimenzionalno strukturo pripravili prostorski model variabilnega dela monoklonskega protitelesa proti citokeratinom, ki bi ga lahko uporabili za nadaljnje raziskave na področju struktur, ki jih izbrano protitelo prepozna.

Abstract

Protein structure prediction is important since it enables to successfully solve structures of proteins, that act as a target for numerous drugs. On this way we can construct the molecule that would bind to the protein as efficiently as possible. The purpose of our experiments was to investigate a monoclonal antibody against cytokeratins and its epitope located on cytokeratins. Moreover, a three-dimensional structure model of the monoclonal antibody was prepared which will be useful for docking of small peptide structures mimicing the epitope.

The monoclonal antibody against cytokeratins was prepared by growing cell line in complete hybridoma medium. Filtration, ultrafiltration and affinity chromatography were used to isolate antibodies from the medium. Enzyme-linked immunosorbent assay, dot blot and electrophoresis in polyacril gel with Western blot were used to identify the epitope on recombinant cytokeratins 8, 18 and intermediate filament CK8/CK18, but no binding to these proteins was found. However, we showed that the antibody binds to three octapeptides, sharing the aminoacid sequence motif with cytokeratins.

A three dimensional structure of the variable region of monoclonal antibody against cytokeratins was constructed on the basis of amino acid sequence of the monoclonal antibody by researchers on the University of Bath (Great Britain) and the University of San Francisco using homology modelling which can be used in further studies of peptide structures recognized by the antibody.

1. Uvod

1.1 Intermediarni filamenti

Intermediarni filamenti (IF) so heterogena skupina sorodnih proteinov, ki si delijo podobne strukturne lastnosti in aminokislinska (AK) zaporedja ter so celično specifični (1). Danes poznamo okoli 70 različnih genov, ki kodirajo za različne proteine IF. Z elektronsko mikroskopijo so ugotovili, da so po premeru med mikrofilamenti (MF) (6 nm) in mikrotubuli (MT) (25 nm), zato so jih tudi poimenovali "intermediarni filamenti" (2). IF so dolgi, nitasti proteini s premerom od 8 nm (v keratinocitih in celicah glie) do 12 nm (dezmin in vimentin) in izhajajo iz sredine celice proti membrani (3).

Poleg premera se IF od mikrofilamentov in mikrotubulov ločijo še po naslednjih lastnostih:

- so netopni v pufrih visoke ionske moči (npr. 0,6 M KI, ki sicer raztopi MF in MT)
- njihove podenote so dolge dimerne obvite vijačnice dolžine več kot 40 nm (aktin in tubulin, ki sestavljata MT in MF, pa sta globularna proteina)
- dimerne podenote so usmerjene antiparalelno, zato so IF v nasprotju z MF in MT nepolarni
- njihove viskoelastične lastnosti jim omogočajo, da se upirajo mehničnemu raztezanju
- po denaturaciji (npr. z 6-8 M ureo) se IF lahko renaturirajo, če jim ponovno omogočimo fiziološke pogoje, na primer z dializo v fiziološkem pufru (2).

1.1.1 Razdelitev in vloga

Glede na podobnosti v AK zaporedju in strukturi jih delimo v 5 skupin:

Tip I in tip II:

Kisli in bazični keratini, v nadaljevanju poimenovani citokeratini (CK), ki se dalje delijo na:

- keratine epitelija (okoli 20 podtipov) - v celicah epitelija.
- trihocitne keratine (okoli 13 podtipov) - tvorijo lase, nohte, rogove pri živalih in luske pri plazilcih.

Tip III:

- dezmin - je strukturni element sarkomer v mišičnih celicah.
 - glia filamenti - v celicah glie in astrocitih.
 - periferin - v perifernih nevronih.
 - vimentin - je najbolj zastopan IF. Nahaja se v fibroblastih, levkocitih in žilnem epiteliju.
- Daje oporo celični membrani in sidra organele citoplazme.

Tip IV:

- alfa-interneksin
- neurofilamenti
- nestin
- sinemin
- sinkoilin

Tip V:

Lamini - so edini tip IF, ki so značilni za jedro celice. Tvorijo jedrno lamino, ki je gosta nitkasta mreža v jedru evkariontske celice. Poleg tega, da skrbi za mehansko oporo, tudi regulira pomembne celične procese, kot so podvajanje DNA, celična delitev in organizacija kromatina.

Tip VI:

Fakinin in filensin - v očesni leči. Se zelo razlikujeta od ostalih IF, vendar je genetska analiza pokazala, da sta evolucijska homologa ostalim IF, saj sta med evolucijo dolgo časa ostala nespremenjena (1).

IF imajo vlogo celične in tkivne integritete ter lokalizacije in delovanja celičnih organelov, kamor sodi: vzdrževanje mitohondrijev ob miofibrilah v mišični celici, vzdrževanje Golgijevega aparata ob celičnem jedru, razporejanje lizosomov, povezovanje jedra s transmembranskimi proteini, vzdrževanje oblike jedra (jedrna lamina) in usmerjanje proteinov na tarčna mesta.

1.2 Citokeratini

So podskupina intermediarnih filamentov. Zanje je značilna velika biokemijska raznolikost, saj je poznanih najmanj 20 podtipov. Veliki so od 40 kDa do 68 kDa, njihova izoelektrična točka pa je med 4,9 in 7,8. Leta 1982 so jih Moll in sodelavci (4) glede na molekulsko maso, določeno z uporabo 2D izoelektričnega fokusiranja in NaDS-PAGE elektroforeze poimenovali CK1-CK20, pri čemer ima CK1 največjo molekulsko maso. Poleg tega so jih na podlagi izoelektrične točke razdelili na tip I ali kisle (CK9-CK20) in na tip II ali bazične do nevtralne (CK1-CK8). Kasneje se je izkazalo, da obstaja še več citokeratinov. Te so poimenovali po tistem CK, ki mu je po velikosti najbližje in mu obenem dodali še črko.

Leta 2006 so Schweizer in sodelavci (5) predlagali novo poimenovanje, ki je vključilo tudi citokeratine drugih vrst sesalcev, in upoštevalo tudi gene iz katerih izhajajo posamezni CK. Razdelili so jih v 8 kategorij:

Preglednica I: Razdelitev CK po Schweizer-ju (5)

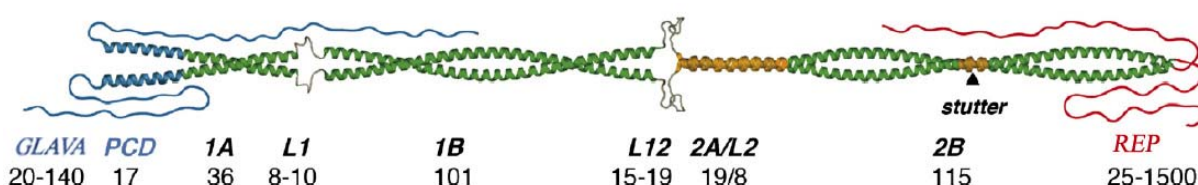
Kategorija	oštevilčenje
Humani epiteljski keratin tipa I	9-28
Humani lasni keratin tipa I	31-40
Nehumani epiteljski in lasni keratin tipa I	41-70
Humani epiteljski keratin tipa II	1-8 in 71-80
Humani lasni keratin tipa II	81-86
Nehumani epiteljski in lasni keratin tipa II	87-120
Keratinski psevdogen tipa II	121-220
Keratinski psevdogen tipa I	221→

Takšno spremenjeno poimenovanje keratinov sesalcev ohranja širše uporabljeno Mollovo poimenovanje za človeške keratine CK1-CK8 in CK9-CK20. Sprememba torej vključuje le na novo odkrite CK, poimenovanje že dolgo poznanih pa je nespremenjeno (5, 6).

1.2.1 Struktura CK

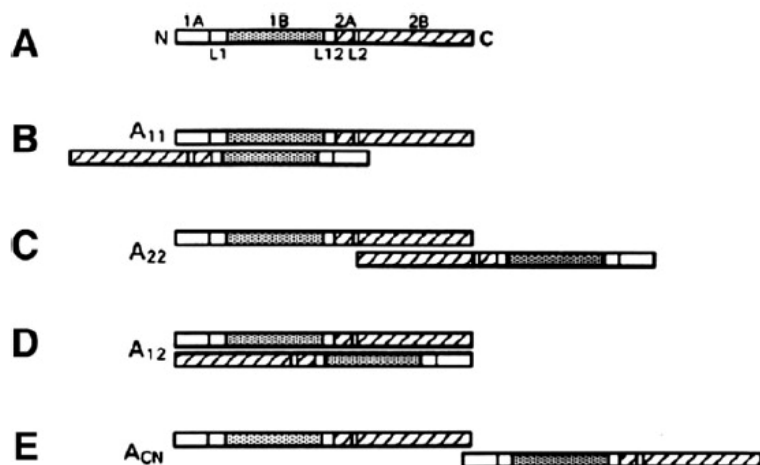
Vlakno citokeratinskega intermediarnega filamenta (CK IF) je zapletena struktura, ki jo sestavlja kopica med seboj prepletenih molekul CK. Sestava pa ni naključna, ampak poteka po določenih zakonitostih. V nasprotju z nekaterimi drugimi vrstami IF, se CK vedno povezujejo v heterodimere, kar pomeni, da se med seboj nikoli ne povežeta dve enaki molekuli CK. Pravilo je, da se vedno združita kislina molekula CK tipa I in bazična molekula CK tipa II. Franke in sodelavci (7) so sicer uspeli *in vitro* sintetizirati tudi homodimer CK IF, ki pa se ni sposoben združevati v daljše funkcionalne IF. Zato takšna zgradba v praksi in v živem organizmu ni mogoča, oz. nima fiziološke vloge (7).

Osnovna enota vsakega keratinskega IF sta torej dve monomerni enoti CK, od katere ena pripada kislemu podtipu, drugi pa bazičnemu. Vsak monomer je zvit v alfa-vijačnico, obe pa sta zviti še med seboj. Strukturo takšnega dimera imenujemo obvita vijačnica (*coiled-coils*). V takšni strukturi prepoznamo več domen: na amino in karboksi koncu najdemo glavo in rep, ki ne izkazujeta zvitja v vijačnico, aminokisliline v tem delu si med posameznimi tipi verig niso homologne. Nasprotno pa so si zaporedja sredinskih delov različnih verig močno homologna. Tukaj pride do medsebojnega zvijanja obeh verig, posamezne odseke zvitja imenujemo 1A, 1B, 2A in 2B. Ti deli so povezani z krajšimi odseki L1, L12, L2, ki niso zviti v alfa-vijačnico.

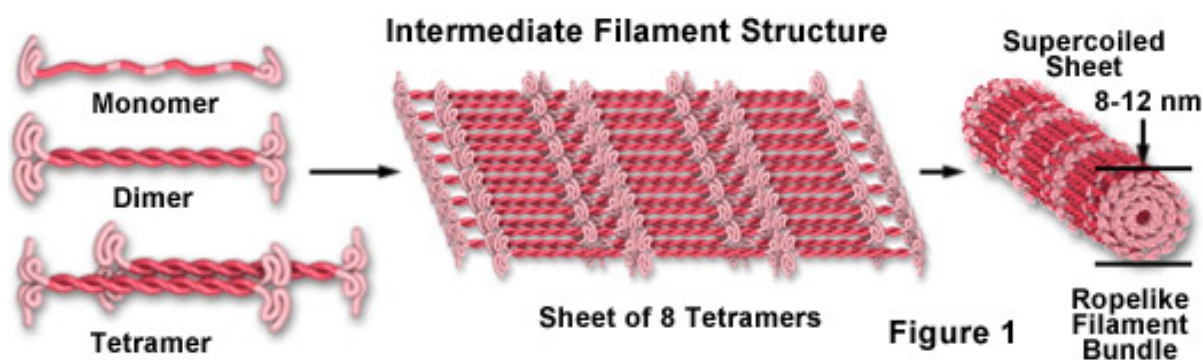


Slika 1: Shematičen prikaz zvitja v heterodimer. Na sliki so označena področja glave, repa in regije sredinskih delov 1A, 1B, 2B, L1 in L12 (3).

Dva takšna heterodimera se nato povežeta v tetramer na različne načine, kot prikazuje Slika 2. Osem nastalih tetramerov, ki so analogni aktinskemu monomeru in tubulinskemu heterodimeru, se dalje vzporedno poveže in zvije v gost snop. Vsak takšen snop sestoji iz 32 posameznih alfa-vijačnic. Opisan proces ponazarja Slika 3.



Slika 2: Shematski prikaz (A) ene domene IF dimera, (B) A₁₁ načina povezave pri katerem se prekrijeta dva 1B segmenta, (C) A₂₂ načina, pri katerem se prekrijeta 2B segmenta, (D) popolno prekrivanje dveh dimerov, (E) A_{CN} načina, kjer se povežeta glava enega dimera in rep drugega dimera (3).



Slika 3: Nastanek IF od enostavnega monomera do popolno zvitega IF debeline 8-12 nm (8).

Nastali snop je zaradi svojih strukturnih lastnosti lahko upogljiv, za kar so zaslužni deli, kjer ni alfa-vijačnic (L1, L2, L12), vendar neraztegljiv, kar mu daje potrebno trdnost in funkcionalnost za celico. Z njihovo pomočjo epiteljska celica do določene mere ohranja svojo obliko, s tem uspe preživeti in prispeva k trdnosti epiteljskega tkiva (3, 8).

1.2.2 Funkcija repa in glave

Bader in sodelavci (9) so preučevali vlogo repa in glave pri tvorbi in funkciji IF, sestavljenega iz para CK8/CK18 (IF CK8/CK18). Z metodama genske transfekcije in mRNA mikroinjiciranja so v neepiteljske celice vnesli gen za CK tipa I in II. V celicah

neepitelijskega izvora se ti geni navadno ne izražajo, zato v njih tudi ni CK. Sintetizirala sta se oba tipa CK in se tudi združila v snope in omrežje filamentov. Rezultat kaže na to, da za tvorbo CK IF niso potrebni drugi faktorji, ki bi bili značilni za epiteljske celice. Dovolj je, da se izrazi gen za CK, sinteza filamentov pa poteče spontano. Do izražanja CK v celicah, ki jih normalno ne vsebujejo, lahko pride tudi po indukciji z različnimi škodljivimi vplivi okolja ali bolezenskimi spremembami (9).

V neepiteljske celice so nato vnesli tudi mRNA za CK8 in CK18 brez dela, ki kodira za domeno repa. Ne glede na odsotnost repa so se takšni CK povezali v snope in tvorili omrežje CK. Torej pri tvorbi IF CK8/CK18 rep nima pomembne vloge. Te ugotovitve pa ne moremo posplošiti za vse vrste CK. V študijah na nekaterih drugih vrstah IF niso prišli do enakih ugotovitev (10, 11).

V nekaterih vrstah celic so se IF CK8/CK18 pojavljali tudi v jedru, kjer so normalno prisotni le lamini. Brez repov se torej IF CK8/CK18 prostorsko ne razporedijo pravilno, saj bi morali biti le v citoplazmi. Možni vzroki za to so lahko: rep ima lahko vlogo sidranja CK v citoplazmi ali pa ima rep vlogo restriktijskega faktorja, ki prepreči, da bi se CK normalno pojavil v jedru. Takšno domnevo potrjuje tudi poskus, ko so CK odstranili glavo, ne pa repa. Takšni CK so se nabirali le v citoplazmi. CK, ki sta jim manjkala tako glava kot rep so se nabirali v jedru, poleg tega pa tudi niso bili značilne vlaknaste oblike, kar nakazuje na to, da ima glava pomembno vlogo pri tvorbi pravilne oblike CK IF (9).

1.2.3 Rekonstitucija IF *in vitro*

In vivo se med seboj združujejo le določene vrste CK. Citokeratini vedno nastopajo v paru, tako da določen citokeratin tipa I vedno tvori nekovalenten heterodimer s citokeratinom tipa II v molarnem razmerju 1:1. Vedno je prisoten vsaj en protein vsakega tipa. Primer sta CK8 in CK18, ki sestavljata netopna, 10 nm debela vlakna, ki se raztezajo od jedra do notranje strani celične membrane. V laboratorijih pa lahko združimo kombinacije CK, ki jih navadno ne srečamo v živih celicah. Zadoščeno mora biti naslednjim pogojem: posamezne verige CK morajo biti čiste, denaturirane, ena veriga mora biti kislina in druga bazična. Raziskovalcem ni uspelo združiti le neobičajnih tipov CK med seboj, ampak tudi CK, ki pripadajo različnim živalskim vrstam. Združujemo lahko CK človeka s CK podgane, goveda... CK IF tvorijo tudi pari CK, ki se sicer v organizmih pojavljajo v različnih vrstah epitelija, kot na primer CK 8 (bazičen), ki je značilen za enostavni epitelij

in CK 9 (kisel), ki je značilen le za kožo podplatov in dlani. Te ugotovitve kažejo na to, da izražanje točno določenih vrst CK v določeni celici ni pogojeno s specifičnim parjenjem CK, temveč je uravnavano z regulacijskimi mehanizmi izražanja ustreznih genov med procesom diferenciacije. V določeni celici se izrazijo le geni za določene vrste CK, zato pride do transkripcije mRNA le teh CK, ki se združijo in tvorijo značilen vzorec za določeno celico (12).

1.2.4 Izražanje CK

V človeškem telesu se CK pojavljajo skoraj izključno v epitelijah tkivih. Izjema so le nekatere celice gladkih mišic, miofibroblasti in nekatere endotelijske celice. V epitelijah celicah pa se CK ne pojavljajo naključno, ampak je za vsako vrsto epitelija značilen drugačen vzorec CK. Na vzorec izražanja CK vpliva tudi stopnja diferenciacije celice. Zaradi teh lastnosti CK predstavljajo enega temeljnih kazalcev (markerjev) s katerim lahko določimo funkcijo nekega epitelija (6).

1.2.4.1 Normalna, zdrava tkiva

I. Enostavni epitelij

Zanj je najznačilnejši par CK8 in CK18. Najdemo ga v epiteliju jetrnih celic, acinusih trebušne slinavke, večini endokrinih celic in celicah proksimalnih ledvičnih tubulov. CK19 najdemo v epiteliju gastrointestinalnega trakta (GIT), žolčevodu in kanalih pankreasa, pljučnih alveolih, endometriju in ledvičnih zbiralcih. Folikelne celice ščitnice vsebujejo CK7, ne pa tudi CK19. CK20 izkazujejo najbolj omejeno ekspresijo: prisotni so v epiteliju GIT, želodčnih jamicah in v endokrinih Merklvih celicah v koži.

II. Kompleksni epitelij

Tu se pojavljajo CK, značilni za enostavni in večskladni epitelij. Takšno vrsto epitelija najdemo v dojkah, žlezi slinavki, znojnicah in prostati. Bazalne celice izražajo CK5, CK14 in CK17. Sekretorne epitelijske celice pa večinoma CK8, CK18, CK19 in CK7.

III. Mezotelij

Enako kot za kompleksni epitelij tudi za mezotelij velja, da izraža CK značilne za enostavni in večskladni epitelij.

IV. Prehodni epitelij

Za sečne poti je značilen poseben vzorec CK, ki poleg CK8, CK18, CK19 in CK7 vsebuje še CK20. V bazalnem/intermediarnem se nahajata tudi CK5 in CK13.

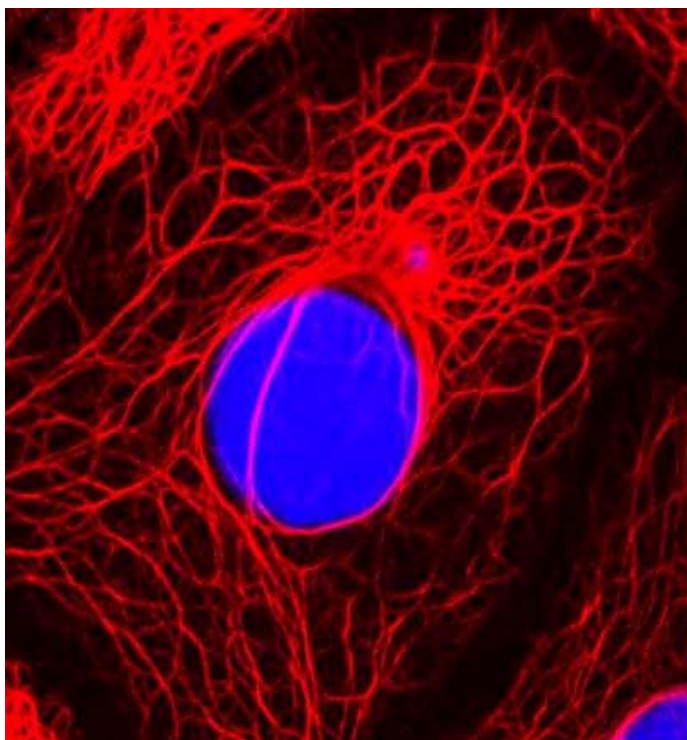
V. Večskladni epitelij

V bazalnem sloju sta večinoma prisotna CK5 in CK14, CK19 pa le v koži. V srednji in površinski plasti neporoženevajočega večplastnega ploščatega epitelija je par CK4 in CK13 (sluznica jezika, epitelij anusa, epitelij sapnika), v poroženevajočem epiteliju pa par CK1 in CK10. V normalnem neporoženevajočem večskladnem ploščatem epiteliju in tudi pri hiperproliferativnem epidermu najdemo CK6 in CK16.

VI. Neepitelijske celice

V nekaterih mezenhimskih celicah, za katere sta značilna mezenhimska IF vimentin in dezmin najdemo tudi CK8, CK18 in CK7. Primeri so celice gladkih mišic (zlasti stene žil in miometrij), miofibroblasti, celice možganske pajčevnice, fibroblastni retikulum bezgavk in redko endotelijske celice, kot tudi celice popkovine in srčne mišice.

CK se sopoljavljajo tudi z drugimi vrstami IF. Na primer CK in vimentin se pojavljata skupaj v celicah ledvic, ženskem genitalnem traktu in tkivu žleze ščitnice. CK in glialni kisli fibrilarni protein sta skupaj zastopana v žlezah slin, znojnicah in dojkah. CK in dezmin sobivajo v nekaterih celicah gladkih mišic.



Slika 4: Omrežje citokeratinov obarvanih z imunofluorescenco. V modro obarvanem jedru ni citokeratinov (12).

Določene poškodbe celic lahko povzročijo spremembo izražanja vzorca CK, ki lahko spominja na rakavo tvorbo. Ponavadi je vzrok tega proces regeneracije celice, kar lahko spremeni izražanje CK. Vnetni proces ali atrofija lahko v celici povzročita preklon iz CK8/CK18 na CK7/CK17. (12)

1.2.4.2 Izražanje CK8/CK18 v rakavih celicah

V večini karcinomov, z izjemo nekaterih diferenciranih karcinomov ploščatega epitelija, najdemo izražanje para CK8/CK18. Označena protitelesa proti CK8 in CK18 dajejo pozitivno reakcijo (obarvajo tkiva) pri večini adenokarcinomov, hepatoceličnih karcinomov, karcinomu ledvičnih celic in nevroendokrinih karcinomov. Poznanih je več monoklonskih protiteles (mPt) proti CK8, npr. mišje mPt CAM5.2 in proti CK18, npr. Ks18.04. S temi protitelesi je mogoče imunohistokemijsko določiti izvor in vrsto rakavega tkiva na podlagi dobljenih rezultatov – zmanjšano ali povečano izražanje para CK8 in CK18 (13).

Imunohistokemija je proces, pri katerem lokaliziramo protein v tkivu s pomočjo primarnih protiteles, ki se specifično vežejo na preiskovani protein. V uporabi sta dva načina detekcije antigena v tkivu: direktna in indirektna metoda. Pri obeh je potrebno najprej raztrgati celično membrano, kar dosežemo z uporabo detergenta, npr. Triton X-100.

Direktna metoda je enostopenjski proces, saj se uporabi le primarno protitelo, ki je označeno z barvilom ali encimom, ki po dodatku substrata obarva produkt. Tehnika je enostavna in hitra, vendar ima včasih premajhno občutljivost, zato se uporablja redkeje od indirektna metode.

Pri indirektni metodi se uporablja neoznačeno primarno protitelo, ki se veže na tkivni antigen. Po dodatku sekundarnega protitelesa proti primarnemu protitelesu pa dobimo odziv, saj je sekundarno protitelo označeno s fluorescenčnim barvilom ali encimom. Ta metoda je občutljivejša, saj se na eno primarno protitelo lahko veže več sekundarnih protiteles (14).

Citokeratini so tipično prisotni v citoplazmi celic, rakave celice dojke pa vsebujejo citokeratine tudi na površini celične membrane. To so dokazali tudi Doljak in sodelavci (15). Rakave celice dojke so rakave celice dojke obdelali z 2 % paraformaldehidom. Na ta način so ohranili celično membrano nepropustno. Po inkubaciji takšnih celic s proti-CK mPt, označenim s fluorescenčnim barvilom, so opazili obarvanje celične membrane.

Protitelesa so se vezala na citokeratine, ki so prisotni na zunanji strani celične membrane rakave celice. Takšne celice so obdelali tudi s Triton X-100. Membrana je postala propustna za proti-CK mPt in prišlo je do obarvanja mreže citokeratinov v citoplazmi.

1.2.5 Vloga CK

V razvoju zarodka najprej opazimo par CK8/CK18, ki sta kot kaže tudi evolucijsko najstarejša CK. V odraslem človeku sta edina prisotna v zdravih hepatocitih, epiteljskih celicah proksimalnih tubulov in acinarnih celicah pankreasa. Izražanje drugih tipov CK v teh celicah kaže na poškodbo ali nastajanje rakave tvorbe (13).

Raziskovalci so odkrili številne funkcije, ki jih opravljajo CK. Celici ohranjajo obliko in jo varujejo pred mehanskimi okvarami. Potekajo tudi skozi dezmosome, ki imajo vlogo povezovanja sosednjih celic med seboj. CK torej nimajo le funkcije na ravni ene celice, ampak pripomorejo k strukturiranju in obliki epitelija, saj ga fizično povezujejo s tkivom pod njim. Večja kot je potreba po moči povezave, večjo zgoščitev CK IF vlaken opazimo. V enostavnem epiteliju notranjih organov, ki je podvržen manjšemu mehanskemu stresu, je le malo vlaken CK IF, ki so redko razporejena po citoplazmi celic. V povrhnjici, ki je močno mehansko obremenjena, pa najdemo gosto omrežje CK IF, ki zagotavlja zadostno mehansko trdnost (13).

S tehnologijo izbitja gena (knock-out) so odkrili še druge funkcije: imajo pomembno vlogo pri pregradi placent, hepatocite pa varujejo pred apoptozo. Njihova odsotnost ali disfunkcija je povezana z boleznimi jeter. Okvare CK8/CK18 vodijo do ciroze jeter in kroničnega pankreatitisa, skupaj s stresnimi proteini *ubikvitinom* in *p62* pa tvorijo agregate, ki povzročajo bolezen jeter, znano pod imenom Mallory-Denk (13).

1.2.6 CK kot diagnostični označevalci pri rakavih obolenjih

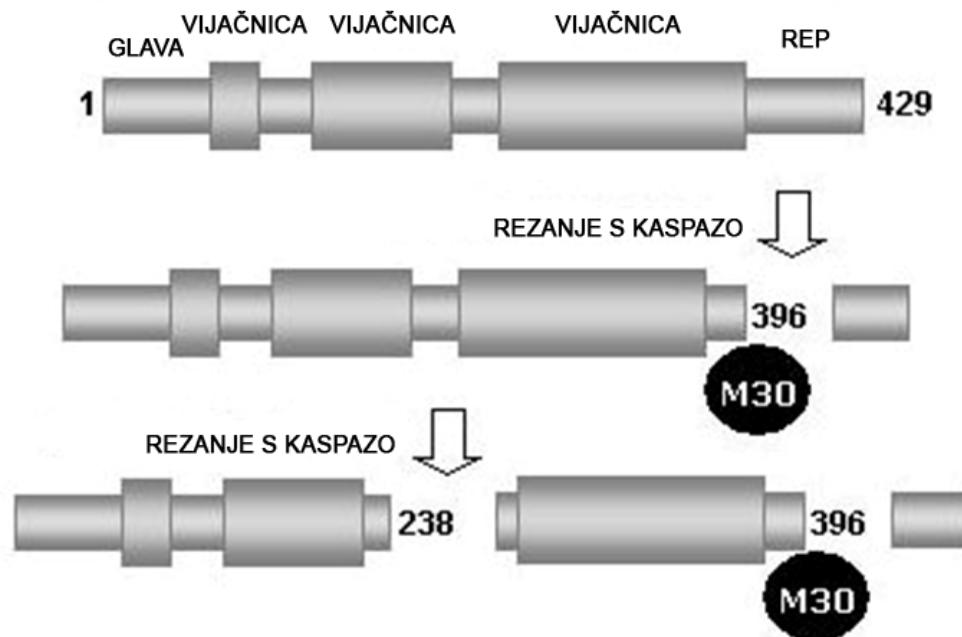
Eno pomembnejših področij uporabe znanja o CK in njihovem vzorcu izražanja v različnih vrstah celic je diagnoza različnih rakavih obolenj. S pomočjo specifičnih protiteles nam služijo kot imunohistokemijski označevalci. Metoda je uporabna predvsem, ko gre za slabo diferencirane tumorje, ko so razširjeni na več organov in še posebno pri metastazah neznanega izvora. (13)

Gradniki celičnega citoskeleta, CK se pri odmiranju epitelijskega rakavega tkiva sproščajo v krvni obtok, zato z ustreznimi diagnostičnimi metodami odkrijemo in ocenimo potek bolezni. Značilna lastnost CK je, da jih celice kostnega mozga in druge celice občutljive na protitumorno terapijo ne vsebujejo. Pri protitumorni terapiji odmirajo tudi te celice, vendar ob tem ne sproščajo CK v krvni obtok. Prisotnost CK v krvi je torej pokazatelj odmiranja tumorskih celic.

V uporabi so diagnostične metode, ki odkrivajo dele CK, ki krožijo po telesnih tekočinah in so pokazatelji učinkovitosti protitumorne terapije. Trije najbolj uporabljeni CK označevalci v kliniki so tkivni polipeptidni antigen (TPA), tkivni specifični polipeptidni antigen (TPS) in CYFRA 21-1. TPA test meri koncentracijo fragmentov citokeratinov 8, 18 in 19. TPS in CYFRA 21-1 pa sta bolj specifična in vključujeta le meritev koncentracije CK 18 (TPS) in CK19 (CYFRA 21-1). Metoda je uporabna za spremljanje rasti tumorja, metastaziranje in spremljanje poteka zdravljenja. CK označevalci lahko natančno predvidijo stanje bolezni pred konvencionalnimi invazivnimi metodami kot je na primer biopsija obolelega tkiva (16).

TPA in CYFRA 21-1: Buccheri in sodelavci so preučevali uporabnost markerjev TPA in CYFRA 21-1 pri diagnozi pljučnega raka. Ugotavljali so njuno učinkovitost v treh najpomembnejših diagnostičnih fazah; prva ocena razširjenosti tumorja, vrednotenje odziva tumorja na zdravljenje in spremljanje stanja po terapiji. Ugotovili so, da sta označevalca enako uporabna v vseh treh diagnostičnih fazah, zato predlagajo njuno rutinsko uporabo pri vseh pacientih z rakom pljuč (17).

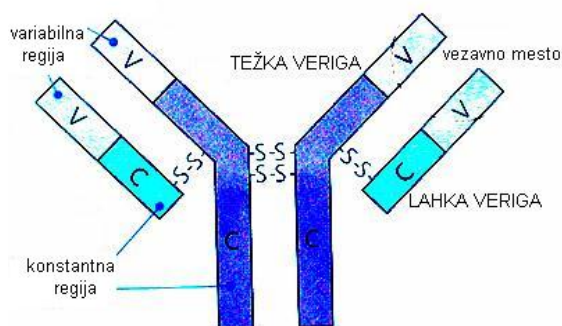
Linder in sodelavci (18) so preučevali uporabo CK18 kot serumskega biomarkerja za spremljanje s terapijo povzročene celične smrti. Pri apoptozi se v krvni obtok ne izloči nespremenjen CK18, kot je to značilno pri nekrozi, ampak je podvržen delovanju encima kaspaze, ki razreže CK18 na tri dele, pri tem pa nastane epitop M30, na katerega se veže monoklonsko protitelo. M30 se veže izključno na fragment CK18, ki nastane po delovanju kaspaze, ne pa na nativni CK18. Ker je le za apoptotični propad celice značilno fragmentiranje CK18, lahko s tem testom ločimo med apoptozo in nekrozo tumorja. Ta podatek pa je pomemben pri spremljanju poteka bolezni in odzivu na terapijo (18).



Slika 5: Shematski prikaz mesta delovanja encima kaspaze na CK18 (18)

1.3 Monoklonska protitelesa

Ideja o obstoju topne sestavine seruma z učinki, ki izničijo toksine in patogene, sega v zadnja leta 19. stoletja. Takrat je Behring kuncem vbrizgal majhno dozo tetanusnega toksina, ki ni bila smrtna. Kunci so proizvedli protitelesa proti tetanusnemu toksinu. Serum teh kuncev je nato uporabil za imunizacijo drugih kuncev, ki so preživeli tudi smrtne doze toksina tetanusa (19).



Slika 6: Shematični prikaz imunoglobulina G (20)

Protitelesa, imenovana tudi imunoglobulini (Ig), so glikoproteini plazme in drugih telesnih tekočin, ki imajo pomembno vlogo pri imunskem odzivu organizma. Pri proteinski elektroforezi jih uvrščamo med γ - globuline. Delimo jih v pet razredov: IgG, IgM, IgA,

IgD in IgE. Nastajajo v limforetikularnih tkivih pri humoralnem imunskem odzivu. Izdelujejo jih plazmatke kot odziv na prisotnost antigena (Ag), s katerim specifično reagirajo (22). Lahko povzročijo aglutinacijo in obarjanje Pt-Ag produkta, ki deluje kot signal za fagocitozo s pomočjo makrofagov, blokirajo virusne receptorje in stimulirajo druge poti imunskega odziva, kot je vezava komplemента, ki ima za posledico lizo celice (22).

Osnovna enota vsakega protitelesa je monomer, ki sestoji iz štirih polipeptidov. Pri ljudeh poznamo dve lahki verigi, tipa λ ali κ , in dve težki verigi, tipa γ , δ , α , μ ali ϵ , povezani z disulfidnimi vezmi, skupaj tvorita molekulo v obliki črke »Y« z variabilnim in konstantnim področjem. Variabilno področje sestavlja 110-130 aminokislin in določa specifičnost protitelesa za antigen, strukturno skladnost z vezavnim mestom ali epitopom na antigenu pa hipervariabilna regija (CDR – complementarity-determining region) v variabilnem delu. Konstantno področje določa pot za uničenje antigena in služi za klasifikacijo protiteles v posamezne razrede. Protitelesa so lahko monomerna, dimerna, trimerna, tetramerna, pentamerna, itd. (22).

1.3.1 Proizvodnja monoklonskih protiteles

Monoklonska protitelesa (mPt) pripravljamo s tehnologijo hibridomov. Tehniko zlitja limfocitov B oz. vranične celice imunizirane živali s tumorskimi celicami sta leta 1975 vpeljala Köhler in Milstein ter tako rešila problem gojenja klonov limfocitov B. Zlitje lahko dosežemo s Sendai virusom, z visoko koncentracijo polietienglikola (PEG) ali z elektrofuzijo. Po fuziji celic najprej nastanejo heterokarioni, ki so večjedrne celice. Ob naslednji delitvi pa se jedra združijo in dobimo hibridomske celice. Njihova lastnost je, da izločajo specifična protitelesa in so nesmrtni - se neomejeno delijo ter so tako primerna za gojenje v tkivnih kulturah (23).

Za selekcijo hibridomov se najpogosteje uporablja procedura po Littlefieldu. Temelji na uporabi HAT selekcijskega gojišča, ki vsebuje hipoksantin, aminopterin in timidin. Metoda izkorišča dejstvo, da hibridomi lahko uporabijo alternativno pot sinteze nukleotidov v primeru blokade glavne sintezne poti z aminopterinom iz gojišča. Alternativna pot sinteze purinskih nukleotidov poteka s pomočjo encima hipoksantin gvanin fosforibozil transferaze (HGRPT), ki uporablja hipoksantin iz gojišča. Za alternativno pot sinteze pirimidinskih nukleotidov pa je potreben encim timidin kinaza (TK), ki uporablja timidin

iz gojišča HAT. Mutirane mielomske celice HGRPT(-) ali TK(-), ki jih uporabimo za fuzijo v HAT gojišču, propadejo. Izgubimo tudi limfocite, kateri v *in vitro* pogojih ne rastejo. Ohranijo se le uspešno zlitih hibridomih, ki imajo sposobnost neomejene reprodukcije, produkcije monoklonskih protiteles ter sinteze HGRPT in TK encimov. (24) Hibridne celice so genetsko nestabilne in še nekaj tednov po fuziji oziroma po nekajkratnih delitvah so možne izgube kromosomov. Nekatere celične linije tako prenehajo rasti oziroma proizvajati protitelesa. Z dodatno selekcijo se take celične linije izločijo, ostanejo pa samo primerno rastoči hibridomih s stabilnim številom kromosomov. Stabilne celične linije še dodatno kloniramo, da osamimo klon, ki izdeluje specifična mPt. Celice lahko kloniramo z modificirano metodo omejenega redčenja, s kloniranjem v mehkem agarju ali z neposrednim izbiranjem ene celice iz tkivne kulture. Stabilnost in monoklonalnost celične linije zagotavljamo z vsaj dvakratnim kloniranjem (25).

Preglednica II: Stopnje priprave mišjih monoklonskih protiteles.

-
- 1 *priprava limfoblastov → imunizacija miši*
 - 2 *priprava tumorskih celic (mišje mielomske celice)*
 - 3 *fuzija → limfoblaste in tumorske celice pomešamo*
 - 4 *HAT selekcija → preživijo samo stabilni hibridi*
 - 5 *kloniranje in pridobivanje stabilnih celičnih linij → osamimo klon celic s stabilnim številom kromosomov, ki izdeluje specifična MPt*
 - 6 *testiranje hibridomskih celic → določitev monoklonskih protiteles z ELISA*
-

Mišja mPt nadalje lahko pripravimo z gojenjem hibridomskih celičnih linij v miših (kot ascitni tumor) ali z gojenjem hibridnih linij v celični kulturi. Slednja tehnika je v praksi bolj zaželjena. Sledi izolacija protiteles, čiščenje in testiranje specifičnosti. MPt so tako pripravljena za nadaljnjo uporabo. Za proizvodnjo protiteles v industrijskem merilu se uporabljajo pomnoževalne metode (scale-up), ki omogočajo kultiviranje hibridomov v velikih reaktorjih in produkcijo večjih količin čistih mPt (24).

Za terapevtske namene zamenjajo konstantno in del variabilne regije mišjega protitelesa z ustreznimi človeškimi analogi. Nastanejo humanizirana protitelesa, ki so manj alergena in imajo daljši razpolovni čas v serumu. (19).

1.3.2 Monoklonsko protitelo proti citokeratinom

Beketić-Oreškovič in sodelavci (26) so z imunokemijsko analizo tkiv ugotavljali reaktivnost monoklonskega protitelesa proti citokeratinom (proti-CK mPt) s tkivom raka dojke in nekaterimi drugimi tkivi. Dobili so pozitiven rezultat za 88 % vzorcev raka dojke, ki je bil histološko gledano invazivni duktalni karcinom. Obarvanje je bilo omejeno na citoplazmo. Intenziteta obarvanja je bila spremenljiva tako med posameznimi tumorji kot tudi znotraj samega tumorja. Vidne so bile površine, kjer so bile vse tumorske celice pozitivne oz. obarvane, poleg njih pa so bili otočki popolnoma negativnih oz. neobarvanih celic. Skupki rakavih celic so bili pozitivni, okoliški tkivni elementi (stroma, fibroblasti) pa negativni. Takšne vrste heterogenost je bila opažena pri večini proti CK mPt. Vzrok še ni popolnoma razjasnjen, saj obstaja več možnosti – različne subpopulacije celic znotraj enega klon, izguba sposobnosti modulacije enega od antigenov v tumorskih celicah, različne stopnje diferenciacije ali spremembe povezane s celičnim ciklom.

Poleg tega je bilo tudi 24 % vzorcev benignega tkiva pozitivno obarvanega s proti-CK mPt. Predvsem so se obarvali predeli, kjer je prišlo do hiperplazije celic, se pravi proliferacije celic brez atipije.

Pozitivno se je obarvalo tudi 15 % vzorcev normalnega tkiva dojke, vendar je bilo to tkivo neposredno ob rakavem. Verjetno je prišlo do pozitivne reakcije, ker se je v terminalnih duktih, ki so se obarvali, že začela maligna alteracija.

Proti-CK mPt, ki so ga uporabili, je mišjega izvora. Mišja mPt so se v velikem obsegu uporabljala za *in vitro* poskuse in *in vivo* aplikacije, kot so pasivna imunoterapija malignih obolenj. Vendar predstavljalo mišja mPt zelo velik problem pri klinični uporabi, saj sprožijo imunski odgovor proti mišjem protitelesu (proti konstantni regiji mišjega imunoglobulina).

V ta namen so Kopitar-Jerala in sodelavci (27) s pomočjo rekombinantne DNA tehnologije konstruirali himerno proti-CK mPt z mišjimi variabilnimi in humanimi konstantnimi regijami ter ga izrazili v mišjih mielomskih celicah. Tako so pridobili himerno protitelo, ki

povzroča manjšo imunogenost pri pacientih in je bolj primerno za uporabo pri zdravljenju raka.

1.4 Modeliranje proteinov

Napovedovanje strukture proteinov je glavni cilj bioinformatike in teoretične kemije. Njihov namen je določiti tridimenzionalno (3D) strukturo proteina na podlagi njenega aminokislinskega zaporedja. Namen je torej napovedati terciarno strukturo iz primarne strukture. Dobljeni rezultati so zelo pomembni pri raziskovanju mehanizma delovanja proteinov, inženiringu za izboljšanje lastnosti (bolj stabilni encimi, proteini), načrtovanju učinkovin (drug design), raziskovanju molekulske evolucije in raziskavah procesa zvitja proteina. (28)

1.4.1 Rentgenska difrakcija

Je metoda s katero določajo razporeditev atomov znotraj kristala in temelji na merjenju intenzitete sipanih žarkov in kotov sipanja. Na podlagi teh meritev izdelajo 3D sliko gostote elektronov v kristalu, s pomočjo le-te pa določijo povprečni položaj atomov in kemijskih vezi. Začetek uporabe sega v 50-ta leta 20. stoletja, do danes pa je bilo rešenih že preko 39.000 kristalnih struktur proteinov, DNA in drugih makromolekul.

Tehnika vključuje tri osnovne korake. Prvi, in ponavadi tudi najzahtevnejši, je tvorba ustreznega kristala preiskovane snovi. Biti mora dovolj velik (najmanj 100 μm), čist, homogena zgradbe in brez strukturnih nepravilnosti, kot so razpoke in vključki. Vse te nepravilnosti namreč znatno poslabšajo kakovost dobljenih rezultatov, iz katerih je nemogoče določiti pravilno razporeditev atomov. Pri kristalizaciji proteinov je ključnega pomena ohranitev terciarne strukture v času kristalizacije. Največkrat uporabljena metoda je postopno nižanje topnosti proteina v raztopini. Proces mora potekati izredno počasi, saj sicer ne nastane ustrezen kristal, ampak več manjših kristalov ali celo le amorfnega snov. Določitev ustreznih pogojev je zahteven in dolgotrajen postopek, zaradi česar je določitev 3D strukture proteina z rentgensko kristalografijo dolgotrajen proces. Opravljenih je veliko poskusov z različnimi pogoji kot so temperatura, pH in dodajanjem različnih polimerov, preden najdejo ustrezne pogoje, v katerih določen protein kristalizira v enoten, velik kristal.

V drugem koraku kristal vstavijo v goniometer, ki omogoča rotacijo v vseh smereh in merjenje odklona. Kristal obsevajo z monokromatskimi rentgenskimi žarki, ki se ob stiku s kristalom sipajo in tvorijo vzorec na zaslonu za kristalom. Posnetki velikega števila položajev kristala nato s pomočjo matematične metode Fourier-jeve transformacije in večkratnih izboljšav natančnosti določitve položaja atomov daje prostorski model preiskovanega proteina. (29)

1.4.2 Proteinska nuklearna magnetna resonanca (pNMR)

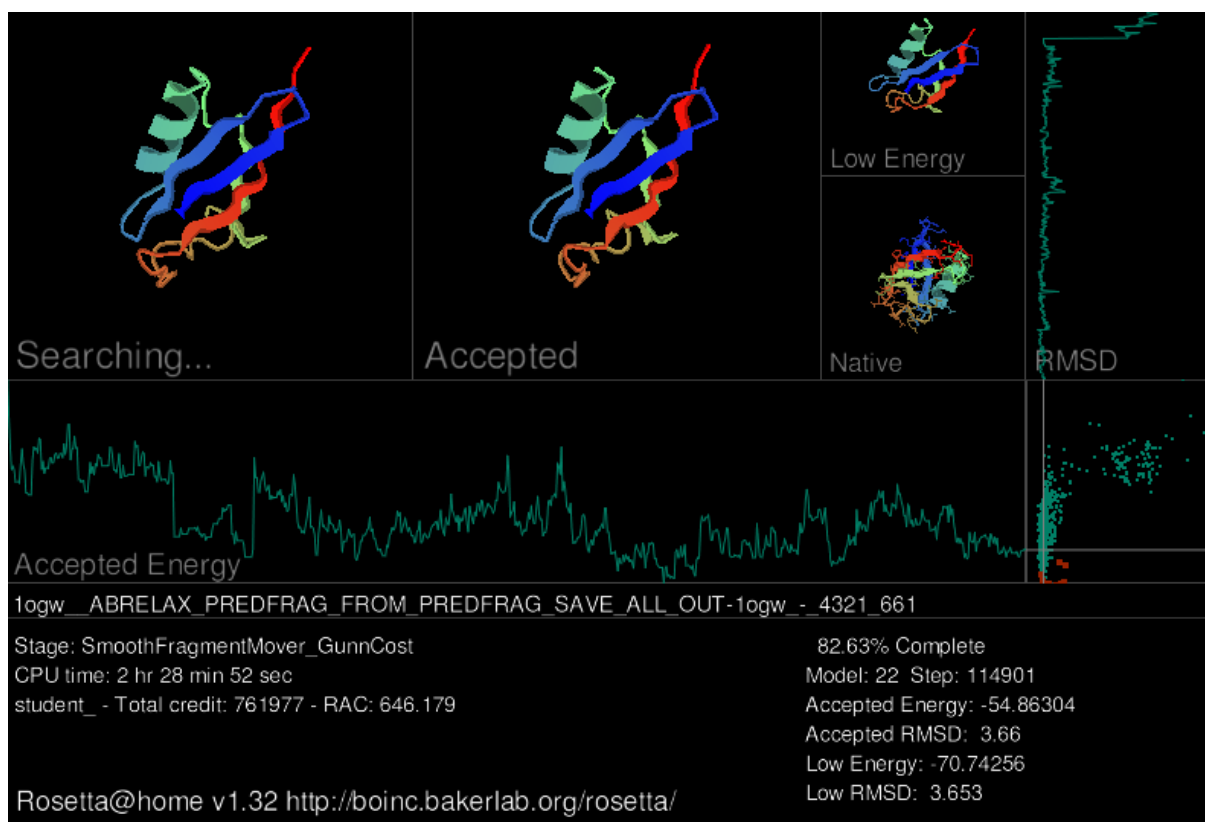
Za razliko od rentgenske kristalografije je pNMR mlajša metoda, s pomočjo katere je bilo rešenih le okoli 6.000 struktur. Vzorec predstavlja vodna raztopina visoko prečiščenega proteina v tanki stekleni cevki. Navadno vsebuje od 300 do 600 μL raztopine proteina koncentracije 0,1-3 μM .

Meritve so popolnoma nenevarne in temeljijo na interakciji atomskih jeder spojin v močnem magnetnem polju z elektromagnetnim valovanjem v območju radijskih valov. Frekvenca valovanja, ki ga neko jedro absorbira, je odvisna od jakosti magnetnega polja in neposredne okolice merjenega jedra. To slednje omogoča vpogled v strukturo spojin. Na osnovi izmerjenih spektrov določijo strukturo spojin in njihovo prostorsko obliko (30).

1.4.3 *Ab initio* oz. *de novo* modeliranje proteinov

3D struktura se izračunava na podlagi znane primarne strukture proteina brez drugih informacij, npr. znane strukture proteina s podobnim AK zaporedjem. Računalnik išče strukturo z najmanjšo prosto energijo. Ta pristop temelji na termodinamski hipotezi, da je nativna struktura tista z najmanjšo prosto energijo. Zvitje proteina je narekovano s seštevkom vseh sil, ki delujejo na posamezne atome, zato je najnatančnejša rešitev modela izračun sil na vsak atom proteina. To pa je glede na trenutni razvoj računalniških zmogljivosti še nemogoče. Za zmanjšanje težavnosti izračuna se uporabljajo metode, ki prinašajo določene poenostavitve. Ena možnost je, da dobi računalnik na voljo le določen razpon velikosti kotov med vezmi, saj je pri posameznih primerih mogoč le določen interval velikosti kota zaradi vplivov sosednjih atomov. Na ta način se do neke mere zmanjša zahtevnost in čas za izračun nekega modela. Še vedno pa je *ab initio* modeliranje

možno izvesti le za zelo majhne proteine. Za uporabo pri velikih proteinih bo potrebno izboljšati algoritme in imeti na voljo zmogljivejše računalnike (31, 32).



Slika 7: Posnetek zaslona osebnega računalnika na katerem teče proces preračunavanja zvitja proteina. Proces poteka le, ko procesor ni zaseden z drugimi procesi, ki jih zahteva njegov uporabnik (33).

Te ovire raziskovalci premagujejo na dva načina:

- I. Z uporabo superračunalnikov, ki so cenovno zelo nedostopni in na voljo le malo raziskovalcem. Za doseganje izrednih hitrosti superračunalniki hkrati uporabljajo več procesorjev, poslužujejo pa se tudi različnih drugih tehnik, na primer ohlajanja procesorjev na zelo nizke temperature, kar omogoča hitro delovanje vezij brez težav s pregrevanjem. Primera takšnih računalnikov sta MDGRAPE-3 na Japonskem in Blue Gene v ZDA.
- II. Z uporabo osebnih računalnikov prostovoljcev širom sveta. Vsak uporabnik osebnega računalnika si lahko naloži majhno programsko opremo, s pomočjo katere računalnik obdeluje podatke, ki jih je prejel s strežnika raziskovalne enote. Tak proces se izvaja le, ko je procesor osebnega računalnika nezaseden ali ko deluje ohranjevalnik zaslona. Obdelane podatke nato avtomatično posreduje na

strežnik, kjer zbrane podatke obdelajo. V takšno mrežo je vključenih na tisoče računalnikov širom sveta, vsak pa pripomore delček k rešitvi strukture nekega proteina. Primeri tako organiziranih mrež osebnih računalnikov so Folding@home, Rosetta@home in Human Proteome Folding Project (33). Na sliki 7 je primer programa Rosetta@home.

1.4.4 Modeliranje s primerjanjem homologije (homology modelling)

Modeliranje proteinov s pomočjo prileganja že znanim strukturam je bilo do sedaj najuspešnejše izmed vseh metod, ki temeljijo na izračunu strukture. Temelji na spoznanju, da proteini s podobnim AK zaporedjem tvorijo tudi podobne 3D strukture. Če torej določimo 3D strukturo proteinu A s pomočjo rentgenske kristalografije, lahko z metodo primerjanja homologije določimo strukture proteinov s podobno primarno strukturo, kot jo ima protein A. Natančnost določitve strukture je odvisna od stopnje ujemanja AK zaporedja in od števila razpoložljivih proteinov s podobnim AK zaporedjem. Pri 50 % ujemanju AK zaporedja je pričakovati, da bo relativna standardna deviacija (RMSD) med preiskovanim proteinom in podlago (template) znašala okoli 0,1 nm. Takšna metoda ponuja manj natančne določitve 3D strukture, vendar raziskovalcem daje dovolj informacij za načrtovanje raziskovanja (32, 34).

Metoda vključuje naslednje korake:

- I. Iskanje ustreznega proteina v bazi podatkov: programska oprema išče proteine v proteinski bazi podatkov (PDB), katerih AK zaporedja se ujemajo z zaporedjem preiskovanega proteina.
- II. Prileganje AK zaporedja novega proteina z zaporedjem podlage
- III. Grajenje ogrodja s posnemanjem položaja atomov podlage
- IV. Grajenje zank: ti deli proteina se ne ujemajo s strukturo podlage, zato programska oprema ponovno preišče PDB. Tokrat išče le fragmente proteinov, ki se najbolj ujemajo z zankami preiskovanega proteina. Pet fragmentov z najboljšim ujemanjem se uporabi za konstruiranje zanke.
- V. Dodajanje stranskih verig: imajo veliko možnih konformacij. Program izbere tisto, ki je glede na van der Waalsov izključitveni test najbolj verjetna.

VI. Nadaljnje optimiranje modela z metodami minimizacije energije CHARMM, AMBER ali GROMOS (33, 34).

1.4.5 Modeliranje protiteles

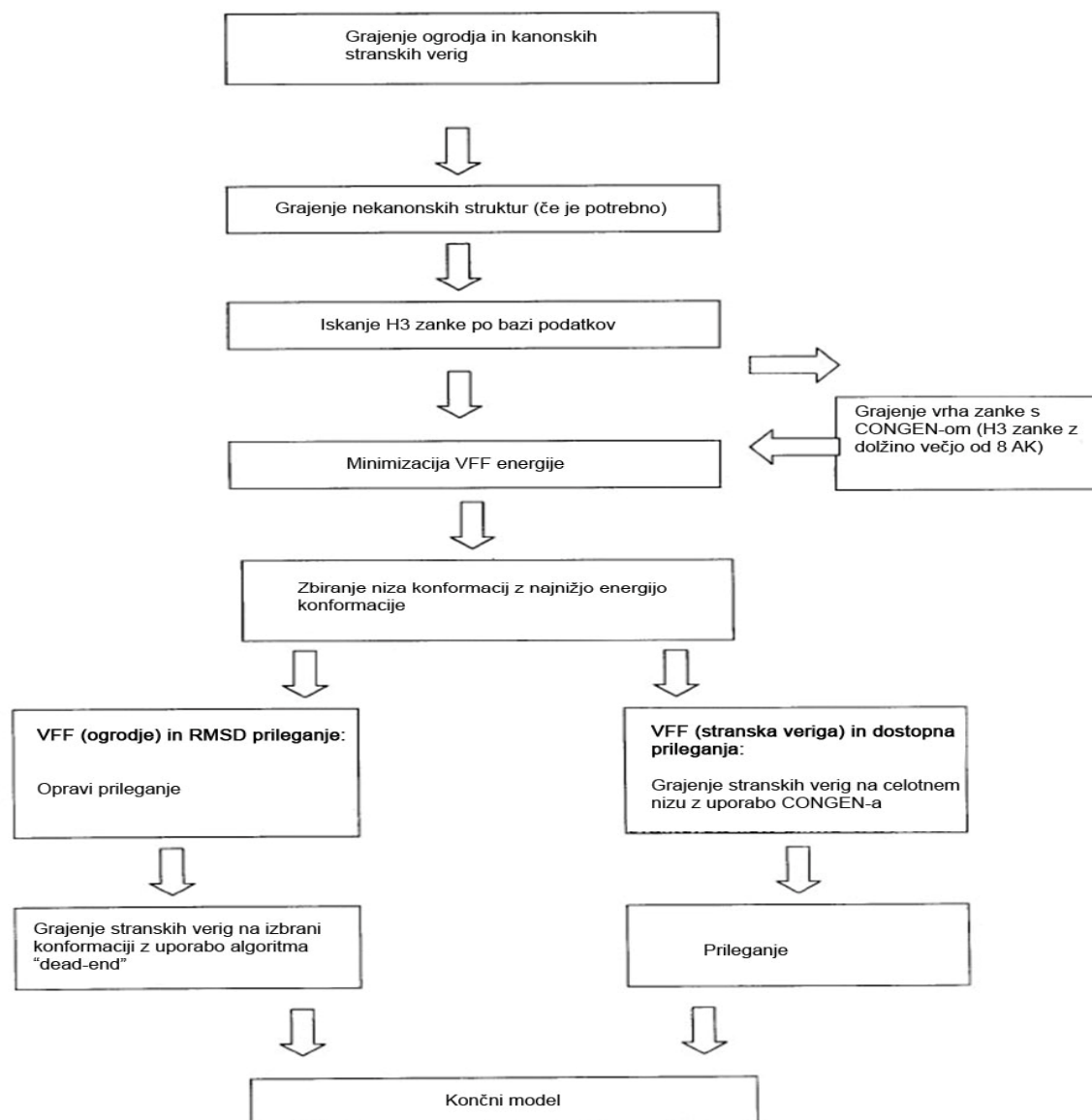
Zaradi dejstva, da imajo različna protitelesa veliko regij med seboj enakih ali zelo podobnih, je modeliranje protiteles enostavnejše od modeliranja ostalih proteinov. Pri določenem protitelesu je potrebno modelirati le variabilno regijo (Fv), konstantna regija (Fc) pa je pri vseh protitelesih določenega izotipa enaka. Njene strukture torej ni potrebno določati vedno znova. Tudi AK zaporedja ogrodja Fv regij so si med različnimi protitelesi podobna, zato jih lahko modeliramo s prileganjem že znanim strukturam protiteles z najbolj podobnim AK zaporedjem. Regije, ki zahtevajo največ napora so CDR regije, saj so si med različnimi protitelesi najmanj podobne. CDR lahke verige (L1, L2 in L3) in dve CDR težke verige (H1 in H2) ponavadi pripadajo enemu izmed razredov kanonskih struktur. Pripadniki določenega razreda kanonske strukture imajo približno enako strukturo ogrodja. Kateremu razredu kanonske strukture pripada določena CDR regija določata:

- I. dolžina zanke
- II. vrsta AK ostankov na CDR regiji in ogrodju Fv regije, ki ohranjajo CDR regijo v pravilni konformaciji z vodikovimi vezmi ter elektrostatskimi in hidrofobnimi interakcijami.

Programska oprema, ki določa strukturo protitelesa, na podlagi AK zaporedja določi kanonski razred vsaki CDR regiji posebej in jo zmodelira na podlagi najbolj ujemajoče strukture CDR regije z že znano 3D strukturo.

Največji problem predstavlja določitev 3D strukture CDR H3, ki se med različnimi protitelesi najbolj razlikujejo. V grobem poznamo tri pristope k rešitvi problema:

- I. iskanje najbolj podobne strukture po bazi podatkov že rešenih struktur protiteles ali iskanje po vsej bazi podatkov proteinov (PDB)
- II. *ab initio* metode
- III. kombiniranje obeh zgornjih metod (34)



Slika 8: Shema algoritma reševanja strukture protitelesa na spletnem strežniku WAM. CDR – hipervariabilna regija, H3 – zanka na hipervariabilni regiji težke verige, VFF – valenčno polje moči (valence force field), RMSD – standardni odklon (root mean square deviation) (35)

1.5 Principi analitskih metod

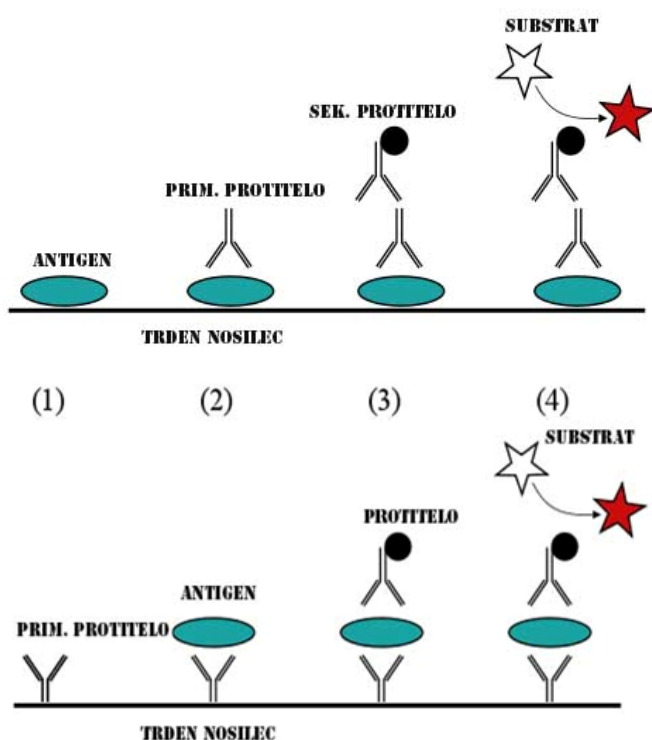
1.5.1 Imunoencimska metoda na trdni podlagi - ELISA

Imunoencimska metoda na trdni podlagi ali ELISA (angleško: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) je biokemijska metoda, ki se uporablja za detekcijo protiteles ali antigenov v vzorcu. Za določanje protiteles se uporablja indirektna ELISA. Direktna ali sendvič ELISA pa je prirejena za določanje antigenov. Pri obeh načinih ELISA je na

zadnje dodano protitelo vezan encim, ki omogoči spremembo barve substrata in tako detekcijo prisotnosti preiskovanega protitelesa ali antigena. Encimi za detekcijo so različnih vrst, povzročijo lahko nastanek kromogenega, luminiscenčnega ali fluorogenega produkta. Tvorba imunskega kompleksa in enostavno spiranje nevezanih komponent ustvarjata visoko razmerje signal/šum v primeru uspešne vezave protitelesa z antigenom.

V grobem delimo ELISA na direktno in indirektno. Ponavadi uporabljamo mikrotitrne ploščice z vdolbinicami. Pri indirektni metodi na dno mikrotitrne ploščice vežemo antigen s pasivno adsorpcijo. Nevezano količino antigena speremo, vezan antigen pa inkubiramo s primarnimi protitelesi, ki se vežejo na antigen. Po spiranju dodamo sekundarno protitelo, ki je konjugirano z encimom, ki po dodatku ustreznega substrata omogoča detekcijo nastalega kompleksa antigen-primarno protitelo-sekundarno protitelo. Intenziteta obarvanja je sorazmerna količini protiteles, vezanih na antigen.

Pri direktni ELISA pa na dno mikrotitrne ploščice vežemo znano protitelo za antigen, ki ga določamo. Po spiranju dodamo vzorec, ki vsebuje preiskovan antigen. Spiramo, da odstranimo nevezane antigene. Nato dodamo še drugo primarno protitelo, ki je specifično za vezani antigen in je označeno z encimom. Po dodatku ustreznega substrata dobimo obarvanje, katerega intenziteta je sorazmerna količini antigena vezanega na primarno protitelo (36, 37).



Slika 9: Potek indirektna ELISA (zgoraj) in direktna ELISA (spodaj).

1.5.2 Elektroforeza

Elektroforeza je tehnika, s katero lahko opazujemo gibanje nabitih molekul v električnem polju. Na gibanje molekul vpliva jakost električnega toka, nosilec, v katerem izvajamo elektroforezo, pa tudi velikost, oblika, naboj in kemijska sestava molekul, ki jih ločujemo. Elektroforeza je relativno hitra tehnika, uporabna za analizo ali čiščenje najrazličnejših biomolekul, predvsem pa beljakovin in nukleinskih kislin.

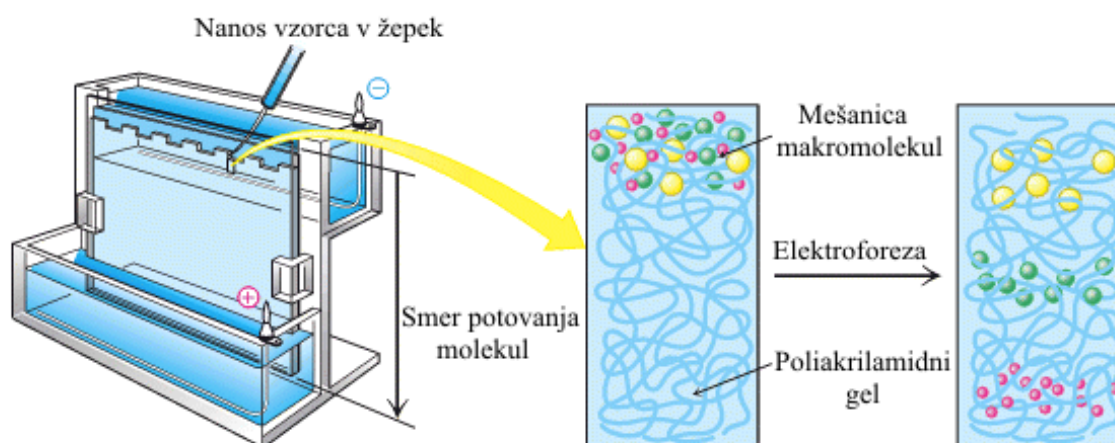
Nativna elektroforeza

Kot pove ime, se pri nativni elektroforezi ne uporablja snovi, ki bi lahko denaturirale elektroforezno ločene makromolekule. Molekule se ločujejo na osnovi naboja ali velikosti, struktura molekule pa se ohrani – ostane nativna. Nosilci pri nativni elektroforezi so navadno agarozni ali poliakrilamidni geli, ki imajo manjšo zamreženost (večje pore). Tudi napetost je sorazmerno majhna. Nativna elektroforeza se uporablja v preparativne namene in kadar želimo ohraniti biološko aktivnost molekul.

NaDS-PAGE – poliakrilamidna gelska elektroforeza v prisotnosti natrijevega dodecilsulfata

NaDS-PAGE (angl. NaDS-PAGE) elektroforeza je v biokemiji ena izmed pogosto uporabljenih analiznih tehnik. Z njeno pomočjo lahko določimo navidezno molekulsko maso proteinom oz. polipeptidom. Pri tej obliki elektroforeze, poliakrilamidnemu gelu kot nosilcu dodamo močan, negativno nabit detergent natrijev dodecilsulfat (NaDS) in zmes segrevamo pri 95°C. Detergent se veže na hidrofobne dele proteinskih molekul in s tem povzroči njihovo denaturacijo v ravne polipeptidne verige. Včasih proteinu dodamo še reducirajočo snov, kot je β -merkaptetanol, ki reducira in s tem prekine disulfidne vezi in tako povzroči ločitev podenot proteina na gelu. Na gram proteina se vedno veže 1,4 g NaDS, kar ustreza približno eni molekuli NaDS na dva aminokislinska ostanka. Izjeme so glikoproteini in proteini z disulfidnimi vezmi, ki vežejo manj NaDS. Velik negativni naboj, ki ga ima NaDS, prevlada nad nabojem beljakovinske molekule, zaradi česar se vsi proteini pod napetostjo premikajo proti pozitivni elektrodi. Proteini imajo tako po obdelavi

z NaDS enako razmerje naboj : masa in podobno obliko, zato potujejo v električnem polju le glede na njihovo relativno molekulske maso. Relativna prehodnost posameznega proteina skozi poliakrilamidni gel je tako linearno odvisna od logaritma njegove molekulske mase. Da lahko določimo molekulske mase, je potrebno na gel nanesti tudi standardno mešanico proteinov z znanimi molekulskimi masami (označevalec/standard velikosti) (38).



Slika 10: Prikaz aparature za elektroforezo in ločitve mešanice makromolekul (38)

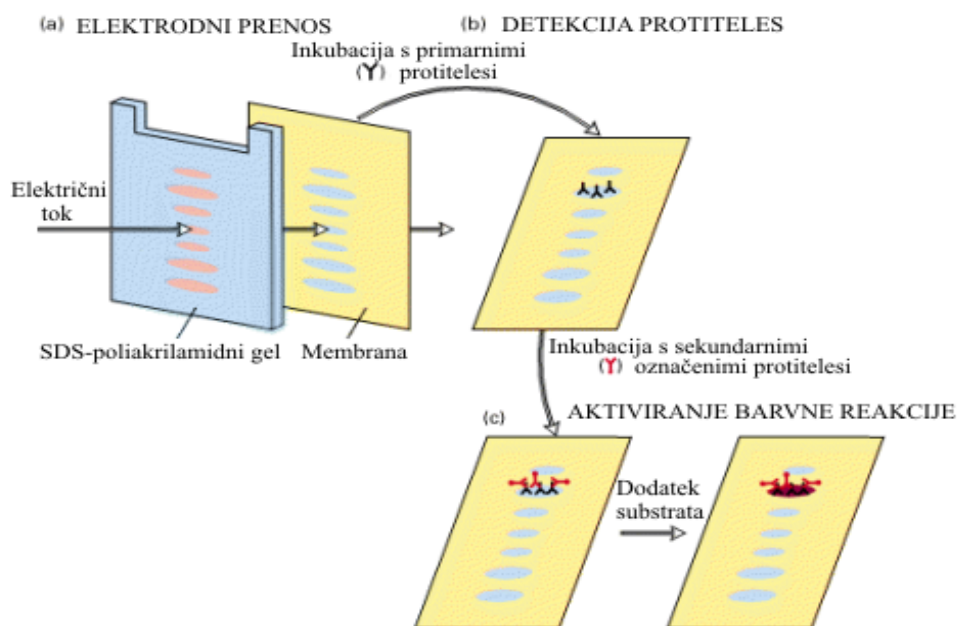
Barvanje in detekcija elektroforeznih lis

Proteini sami niso obarvani (razen če vsebujejo kakšno prostetično skupino, kot je npr. hem) zato jih moramo po tem, ko smo jih med seboj ločili, še vizualizirati. Uporabljamo lahko različne načine detekcije, s katerimi lahko hkrati določimo vse proteine v gelu ali pa le določene. Proteine v gelu lahko zaznamo z barvanjem, avtoradiografijo, pri radioaktivnih vzorcih pa z uporabo specifičnega substrata ali specifičnih protiteles.

Za barvanje proteinov se najpogosteje uporablja barvila kot je npr. Coomassie Brilliant Blue. Ta barvila se običajno vežejo na pozitivno nabite skupine lizina, arginina ali histidina, zato se močno bazični proteini obarvajo močneje, kisli pa šibkeje. 10- do 100-krat večjo občutljivost dosežemo z barvili na osnovi srebrovih soli. Barvilo fluoreskamin reagira s primarnimi amini, pri čemer nastanejo produkti, ki pod UV svetlobo fluorescirajo. Nukleinske kisline (tako eno- kot dvovertične) obarvamo z etidijevim bromidom, ki prav tako fluorescira pod UV (38).

Prenos western

To metodo specifične detekcije uporabimo, kadar imamo na voljo specifična protitelesa proti iskanemu proteinu. Proteine najprej prenesemo oz. odtisnemo (prenos western) na nitrocelulozno (NC), PVDF ali najlonsko membrano. Prenos poteka elektroforezno. Mesta na membrani, ki jih ni zasedel iskani protein, blokiramo z govejim serumskim albuminom ali pufrom PBST 0.05 %, da preprečimo kasnejšo nespecifično vezavo protiteles. Nato membrano inkubiramo v raztopini specifičnih protiteles, ki se vežejo le na iskani protein (primarna protitelesa). Membrano nato inkubiramo še v raztopini sekundarnih protiteles, ki prepoznajo oz. se specifično vežejo na primarna protitelesa. Sekundarna protitelesa morajo biti označena, da jih lahko zaznamo. Najpogosteje so protitelesa konjugirana z encimom (npr. alkalno fosfatazo ali hrenovo peroksidazo). Po dodatku substrata konjugirani encim povzroči pretvorbo substrata v obarvane produkte, ki se oborijo na membrani. Obarvano mesto tako pokaže lego iskanega proteina (38).



Slika 11: Postopek izvajanja prenosa western (38)

2. Namen dela

Do sedaj je bilo dokazano, da proti-CK mPt prepoznavajo antigene na površini in v notranjosti celic MCF-7. Z 2D-elektroforezo, prenosom western in masno spektrometrijo je bilo ugotovljeno, da so kandidati za antigen citokeratini CK1, CK2, CK8, CK10 in CK18. Na osnovi zaporedij teh citokeratinov je bil pripravljen dodekapeptid, ki je imel zaporedje sorodno vsem naštetim citokeratinom. Z imunoencimskim testom je bilo dokazano, da se proti-CK mPt vežejo na to zaporedje.

V okviru raziskovalnega dela smo si zastavili naslednje cilje:

A. Priprava proti-CK mPt

- Priprava hibridomskih celičnih linij, gojenje hibridomov, izolacija in čiščenje proti-CK mPt

B. Potrjevanje vezave proti-CK mPt na antigene CK8, CK18 in njune heterodimere

- Rekonstitucija heterodimera iz para CK8/CK18, ki bo služil kot eden od antigenov
- Imobilizacija antigena na nitrocelulozno (NC) membrano po prenosu western iz elektroforeznega gela in vezava protiteles na tako pripravljene antigene
- Imobilizacija antigena na NC membrano z metodo točkovnega nanosa (dot blot) in vezava protiteles na tako pripravljene antigene
- Preverjanje afinitete vezave proti-CK mPt na oktapeptide, katerih AK zaporedje izhaja iz citokeratinov 8 in 18, z metodo ELISA

C. Priprava prostorskega modela proti-CK mPt

- Priprava 3D modela
- Vrednotenje pripravljenega modela

3. Materiali in metode

3.1 Materiali

3.1.1 Reagenti

Pri poskusih smo uporabljali naslednje reagente:

- akrilamid/bis-akrilamid (Sigma, Steinheim, Nemčija)
- amonijev persulfat (Sigma, Steinheim, Nemčija)
- $C_6H_5Na_3O_7 \times 2H_2O$ (Riedel-deHaën, Hanover, Nemčija)
- $C_6H_8O_7 \times H_2O$ (Riedel-deHaën, Hanover, Nemčija)
- CHAPS - 3-[(3-kloroaminopropil)dimetilamino]-1-propansulfonska kislina - (Sigma, Steinheim, Nemčija)
- DAB - 3,3'-diaminobenzidin (Sigma, Steinheim, Nemčija)
- DMEM - Eaglov medij, modificiran po Dulbeccu (ICN Biomedicals Inc., Irvine, ZDA)
- DMSO - dimetilsulfoksid (Gibco BRL, Lofer, Avstrija)
- DTT - ditiotreitrol (MBI Fermentas, St Leon-Rot, Nemčija)
- EDTA - etilendiaminotetraacetat (0,5 M) (Promega, Mannheim, Nemčija)
- FCS - telečji fetalni serum (Hyclone, Logan, ZDA)
- EGF - epidermalni rastni faktor (Sigma, Steinheim, Nemčija)
- etanol (70 %, 96 %) (Riedel-deHaën, Hanover, Nemčija)
- F12 - rastni medij z L-glutaminom (Gibco BRL, Lofer, Avstrija)
- glicerol, brezvodni (Fluka, Buchs, Švica)
- L-glutamin (ICN Biomedicals Inc., Irvine, ZDA)
- HEPES - 4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetan sulfonska kislina (Sigma, Steinheim, Nemčija)
- hidrokortizon (Sigma, Steinheim, Nemčija)
- inzulin (Sigma, Steinheim, Nemčija)
- KH_2PO_4 (Riedel-deHaën, Hanover, Nemčija)
- MEM - minimalni esencialni Eaglov medij (Sigma, Steinheim, Nemčija)

- metanol (Fluka, Buchs, Švica)
- NaCl (Kemika, Zagreb, Hrvaška)
- Na₂CO₃ (Kemika, Zagreb, Hrvaška)
- NaHCO₃ (Riedel-deHaën, Hanover, Nemčija)
- NaH₂PO₄ x 2H₂O (Riedel-deHaën, Hanover, Nemčija)
- Na₂HPO₄ x 2H₂O (Riedel-deHaën, Hanover, Nemčija)
- očetna kislina (Fluka, Buchs, Švica)
- penicilin (Sigma, Steinheim, Nemčija)
- NaDS - dodecilsulfat (Sigma, Steinheim, Nemčija)
- streptomycin (Sigma, Steinheim, Nemčija)
- TEMED - Tetrametiletilendiamin (Sigma, Steinheim, Nemčija)
- Tris - 2-amino-2-hidroksimetilpropan-1,3-diol (Promega, Mannheim, Nemčija)
- Tween 20 - polisorbat 20 (Sigma, Steinheim, Nemčija)
- Urea (Sigma, Steinheim, Nemčija)
- vodikov peroksid (Sigma, Steinheim, Nemčija)

3.1.2 Proteini

- proti-CK mPt serije 1 in serije 2 (Katedra za farmacevtsko biologijo, UL-FFa)
- Rekombinantni citokeratin 8 (Prospec, Rehovot, Izrael)
- Rekombinantni citokeratin 18 (Prospec, Rehovot, Izrael)
- Kozja protikunčja protitelesa, konjugirana s HRP (Jackson Immuno Research, West Grove, ZDA)
- Kozja protimišja protitelesa, konjugirana s HRP (Jackson Immuno Research, West Grove, ZDA)
- Kozja protimišja protitelesa, konjugirana s HRP (Upstate, Lake Placid, ZDA)
- proti-CK8 monoklonsko protitelo (Abcam, Cambridge, Anglija)
- LMW standard (Bio-Rad, Hercules, Kalifornija, ZDA)
- LMW standard, prestained (Bio-Rad, Hercules, Kalifornija, ZDA)

3.1.3 Pufri

Pufer A (za vezavo antigenov oz. protiteles na mikrotitrsko ploščo pri ELISA).

1,6 mL Na_2CO_3 (15 mM), 2,94 g NaHCO_3 (35 mM), 0,2 g NaN_3 (15 mM)

Dopolnimo z destilirano vodo do 1 L, s HCl uravnamo pH na 9,6.

Pufer B (za spiranje mikrotitrne ploščice pri ELISA).

8,5 g NaCl (0,15 mM), 1,34 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ (7,5 mM), 2,94 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ (2,5 mM), 0,5 g TWEEN 20 (0,05 %)

Dopolnimo z destilirano vodo do 1 L in uravnamo pH na 7,2.

Pufer C (za blokiranje prostih mest na mikrotitrski ploščici ter za redčenje primarnih in sekundarnih protiteles). Za pripravo 100 mL pufra C odmerimo 2 g BSA v 100 mL pufra B.

Pufer D (za redčenje substrata TMB)

21 g citronske kisline (0,1 M) in 17,8 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ (0,1 M)

Dopolnimo z destilirano vodo do 1 L in uravnamo pH na 6.

PBS (fosfatni pufer z dodatkom NaCl):

1,8 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 0,24 g KH_2PO_4 , 8,0 g NaCl, 0,2 g KCl

Dopolnimo z destilirano vodo do 1 L in uravnamo pH na 7,4.

Lizirni pufer (za lizo celic in ekstrakcijo proteinov iz celic):

2,4 mg Tris (20 mM), 40 mg CHAPS (4 %), 3,2 mg DTT (20 mM), 540 mg urea (9 M), 5 mg inhibitorji proteaz

Raztopimo v 1 mL destilirane vode in premešamo.

Vezavni pufer (za vezavo protiteles na afinitetno kolono; 0,14 M fosfatni pufer, pH=8,2):

Raztopina A: 24,9 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ raztopimo v 1.000 mL destilirane vode.

Raztopina B: 1,9 g KH_2PO_4 raztopimo v 100 mL destilirane vode.

Raztopini A dodamo raztopino B do vrednosti pH 8,2.

Pufer za elucijo protiteles

(0,1 M citratni pufer, pH=2,5):

Raztopina A: 7,4 g $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \times 2\text{H}_2\text{O}$ raztopimo v 250 mL destilirane vode.

Raztopina B: 21 g $C_6H_8O_7 \times H_2O$ raztopimo v 1.000 mL destilirane vode.

Raztopini B dodamo raztopino A do vrednosti pH 2,5.

Raztopina za nevtralizacijo eluiranih frakcij protiteles

(1 M raztopina Tris pufra, pH=9,0):

Za pripravo 50 mL raztopine odmerimo 6,1 g Tris-a in ga raztopimo v 50 mL destilirane vode.

3.1.4 Gojišča

Eaglovo gojišče, modificirano po Dulbeccu (DMEM)

13,4 g DMEM, 1,85 g $NaHCO_3$, 2,38 g HEPES-a

Raztopimo v 1 L destilirane vode in premešamo na magnetnem mešalu ter uravnamo pH na 7.4. Tako pripravljeno gojišče steriliziramo skozi filter (0,22 μ m) in čez noč shranimo pri 37°C. Naslednji dan gojišče prenesemo v hladilnik in hranimo pri 4°C.

Kompletno gojišče za hibridome

100 mL DMEM, 15 mL FCS, 1,2 mL L-glutamina, 1,2 mL penicilina/streptomicina

Premešamo in do uporabe hranimo v hladilniku.

Zamrzovalno gojišče

0,75 mL nekompletnega gojišča DMEM (50 %), 0,6 mL FCS (40 %), 150 μ L DMSO (10 %)

Premešamo in do uporabe hranimo na ledu, da se primerno ohladi.

Kompletno gojišče za MCF-7 in MCF-10A neoT celice:

47 mL DMEM, 47 mL F12, 5 mL FCS, 1 mL L-glutamina, 100 μ L inzulina, 50 μ L hidrokortizona, 40 μ L EGF

TRIPSIN-EDTA V PBS (0,02 % EDTA in 0,05 % tripsin v EDTA)

Raztopino tripsin-EDTA pripravimo neposredno pred uporabo iz sterilne raztopine 0,02 % EDTA in sterilne raztopine 2,5 % tripsina v EDTA (tripsin-EDTA raztopina 10X).

Za pripravo 5 mL odmerimo 5 mL PBS z 0,02 % EDTA in 100 μ L tripsina

3.1.5 Oprema

Preglednica III: Laboratorijska oprema in aparature, uporabljene pri praktičnem delu diplomske naloge.

oprema	TIP in PROIZVAJALEC
analizna tehtnica	EXACTA 610 EB, Tehnica
avtomatski spiralec za mikrotitrne plošče	TECAN M8/2R, Columbus Plus
celični inkubator	BINDER
celulozni filter	150 mm Schleicher&Schwell, Nemčija
celulozno-acetatni filter	0,8 μm , Sartorius, Nemčija
centrifuga	Sorvall RT7
elektroforezna naprava	Bio-Rad
fluorescenčni mikroskop	OLYMPUS IX81
gojiščne platenke	25 cm^2 , 75 cm^2 , 150 cm^2 , TPP Tissue Culture Flasks
komora z laminarnim pretokom zraka	PIO SMBC 183 AV
konično mešalo (vorteks)	Vibromix 104EV, Tehnica
krovna stekelca (coverslips)	Alltra, d.o.o., Slovenija
magnetno mešalo	Roamix 550 MM, Tehnica
membranski filter za ultrafiltracijo	AMICON, YM3 62 mm
mikrotitrna plošča iz modulov	NUNC, F8 Maxisorp loose
naprava za prenos western	Fastblot B34 Biometra
pH meter	HANNA HI9321 microprocessor pH meter
avtomatske pipete	0,2-2 μL ; 2-20 μL ; 20-100 μL ; 100-1.000 μL , Eppendorf
posoda za filtracijo (nuča)	Sartorius, Nemčija
spektrofotometer Nanodrop	Nanodrop ND-1000 Spectrophotometer, Nanodrop Technologies, Inc. USA
spektrofotometer	UV/VIS Spectrophotometer Lambda 20, Perkin Elmer, ZDA
suhi inkubator	WTB BINDER, Nemčija
ultrafiltracijska posoda	AMICON, membrana YM3, Nizozemska
vakuumski koncentrador	BÜCHI Vacuum Controller V-800, Nemčija

3.2 Metode

3.2.1 Priprava proti-CK mPt (serija 2)

Priraščanje hibridomov

Predhodno pridobljene hibridomske celice, ki so bile zamrznjene v tekočem dušiku pri -197°C , smo odtajali v vodni kopeli pri 37°C . Hibridome smo prenesli v 5 ml kompletnega gojišča DMEM in jih centrifugirali 5 min pri 1300 obratih na minuto. Supernatant smo odlili, celice, ki so ostale na dnu pa smo resuspendirali v 5 ml kompletnega gojišča DMEM.

Gojenje hibridomov

Hibridome smo prenesli v gojiščno plastenko (75 cm^3) in jih gojili v celičnem inkubatorju v vlažni atmosferi s 5 % CO_2 , pri temperaturi 37°C in v sterilnih pogojih. Pod mikroskopom smo spremljali rast celic, postopoma dodajali gojišče in jih prenašali v dodatne gojiščne plastenke, da smo zagotovili eksponentno rast celic. Ko smo dobili zadostno količino celic, smo en del zamrznili, ostalim pa smo prenehali dodajati gojišče, kar je povzročilo, da so hibridomi začeli pospešeno izločati protitelesa v medij. Lizat celic smo filtrirali in filtrat zamrznili pri -20°C do nadaljnje izolacije.

Zamrzovanje hibridomov

Najprej smo določili število celic na mL suspenzije s pomočjo citometra na mikroskopu. Vzeli smo 100 μL gojišča s celicami, mu dodali 100 μL nigrozina, da so se obarvale mrtve celice in prešteli vse žive celice pod mikroskopom. Iz enačbe smo izračunali število celic.

$$N = N_{\text{povp}} * V * X * 10^4$$

N_{povp} =povprečno število prešteti celic, V =volumen medija, X =faktor redčenja, 10^4 =faktor mrežice v mikroskopu

Gojišče s celicami smo centrifugirali 5 min pri 1300 obratih na minuto. Nato smo odlili supernatant, celice resuspendirali v 0,15 ml nekompletnega gojišča DMEM in jih prenesli v 1,5 ml vialo za zamrzovanje. Dodali smo še 0,6 ml FCS in 150 μ l DMSO. DMSO prepreči nastanek kristalov med zamrzovanjem, zaradi katerih bi celice lahko lizirale. Vialo smo čez noč zamrznili pri -70°C , nato pa shranili v tekočem dušiku pri temperaturi -197°C .

3.2.2 Izolacija in čiščenje proti-CK mPt (serija 2)

Filtracija suspenzije celic

Suspenzijo celic smo centrifugirali in supernatant prefiltrirali skozi celulozni filter (črni trak), da smo odstranili sluz in trdne delce. Nato smo filtrirali z odsesavanjem skozi celulozno-acetatni pufer s premerom por 0,8 μm , da smo odstranili odmrle lizirane celice. Filtrat, ki je vseboval gojišče in protitelesa, smo zamrznili pri -70°C do nadaljnje obdelave.

Koncentriranje in dializa proti vezavnemu pufri

Filtrat smo koncentrirali na ultrafiltru γM3 do čim manjšega volumna. Ultrafiltracija je potekala v komori za ultrafiltracijo pod pritiskom dušika 3 atm in stalnim mešanjem z magnetnim mešalom. Gojišče smo odmrzovali počasi pri 4°C , da ni prišlo do napačnega zvitja protiteles, kar bi se lahko zgodilo pri večji hitrosti odmrzovanja. 1 L gojišča smo skoncentrirali v treh dneh. Ultrafilter prepušča le vodo in manjše molekule, molekule z molsko maso večjo od 3.000, med njimi tudi protitelesa, pa zadrži.

Koncentrirano raztopino protiteles smo dializirali proti vezavnemu pufri. 40 mL koncentrata smo dodali 100 mL vezavnega pufra, koncentrirali do 40 mL in postopek še enkrat ponovili ter raztopino skoncentrirali do približno 20 mL na ultrafiltru γM3 . S tem smo raztopino protiteles razsolili in ji uravnali pH. Dializat smo razdelili v 5 mikrocentrifugirk in jih zamrznili pri -20°C do nadalje obdelave.

Afinitetna kromatografija

Čiščenje protiteles smo izvedli s pomočjo afinitetne kromatografije. Afinitetna kromatografija je vrsta adsorpcijske kromatografije, kjer se molekule iz vzorca ob prehodu

skozi kolono specifično vežejo na ligand, ki je kovalentno vezan na nosilec. Ligand ostane med celotnim postopkom vezan na nosilec, medtem ko se molekule iz vzorca eluirajo s spiranjem kolone ob spremenjenih pogojih (pH, temperatura, ionska moč, pufer z denaturanti). Na ta način dobimo posamezne frakcije, v katerih se nahaja želena molekula. Uporabili smo kolono z nosilcem protein G sefarozo. Protein G je 30-35 kDa velik protein, izoliran iz β -hemolitičnih streptokokov, ki veže Fc regijo IgG imunoglobulinov. Protitelesa smo eluirali z zniževanjem pH in količino protiteles določili z merjenjem absorbance pri 280 nm.

Postopek izvajanja afinitetne kromatografije

- a. *Spiranje*: kolono smo 3-krat sprali z vezavnim pufrom z 0,03 % azida in pustili, da je pufer s kolone popolnoma odtekel.
- b. *Nanos vzorca*: s pipeto smo enakomerno nanесли vzorec na vrh gela. Ko se je vzorec posedel, smo zaprli kolono.
- c. *Inkubacija*: je potekala 60 min na sobni temperaturi, da je prišlo do vezave protiteles na protein G.
- d. *Spiranje*: z vezavnim pufrom, dokler nismo dosegli vrednosti absorbance eluata 0,010. Takrat je bila odstranjena večina nevezanih snovi.
- e. *Elucija*: z elucijskim pufrom s pH 2,5. Frakcije po 6 ml smo zbirali v epruvete in vsaki izmerili absorbance na spektrofotometru Nanodrop. Frakcije z visoko absorbance smo združili in z 1 M Tris pufrom uravnali na pH 7. Shranili smo na -20°C. Spiranje smo nadaljevali dokler ni padla absorbance pod 0,010.
- f. *Spiranje kolone*: kolono smo 3-krat sprali z vezavnim pufrom z 0,03 % azida.

Koncentriranje in dializa

Frakcije z visoko absorbance smo združili in z ultrafiltracijo skoncentrirali na 3 mL. Koncentrat protiteles smo dvakrat dializirali s 6 mL pufera PBS pH 7,4.

Sterilna filtracija in določanje koncentracije protiteles

Dializat smo prefiltrirali s pomočjo injekcijske brizge skozi sterilni filter s porami 0,22 μ m in mu izmerili absorbance ter izračunali koncentracijo protiteles v končni raztopini.

Koncentracijo protiteles smo določili spektrofotometrično. Pri prehodu UV svetlobe skozi snov se svetloba v snovi absorbira. Tisti del molekule, ki je odgovoren za absorpcijo, imenujemo kromofor. Kromofori so lahko konjugirane dvojne vezi, aromatski obroči, itd. V proteinih izrabljamo kromoforne skupine aminokislin triptofana, tirozina in disulfidne vezi, ki absorbirajo pri valovni dolžini 280 nm (38).

Absorpcija svetlobe je odvisna od valovne dolžine, temperature, absorpcijskega koeficienta, koncentracije snovi in dolžine kivete. Linearno odvisnost absorbance od koncentracije opisuje Beer-Lambertov zakon (38):

$$A = \varepsilon * c * l$$

A = absorbanca (ekstinkcija)

ε = ekstincijski koeficient

c = molarna koncentracija

l = dolžina kivete (dolžina poti svetlobe)

Opomba: proti-CK mPt serije 1 so bila predhodno pripravljena, uporabljali smo jih vzporedno s serijo 2, ki smo jo pripravili sami.

3.2.3 Imunoencimska metoda na trdni podlagi - ELISA

Postopek izvajanja indirektna ELISA:

a. Prekrivanje mikrotitrne ploščice:

Antigen smo razredčili na koncentracijo 1 $\mu\text{g/ml}$ v pufri A za ELISA in v vsako vdolbinico mikrotitrne plošče odpipetirali po 100 μl te raztopine ter ploščo prekrili s folijo.

b. Inkubacija: je potekala 12 ur čez noč na +4°C.

c. Spiranje in osušitev plošče:

S pomočjo avtomatskega spiranca smo sprali ploščo 3-krat s pufrom za spiranje in osušili.

d. Blokada:

V vsako vdolbinico smo odpipetirali po 150 μl PBST 0,05 % in pokrili s folijo.

e. Inkubacija: je potekala 30 min na sobni temperaturi. Nato smo z avtomatskim spiralcem ploščo 3-krat sprali s pufrom za spiranje in osušili.

f. Vezava primarnega protitelesa:

Za standardno krivuljo smo pripravili redčitveno vrsto 1:2000 do 1:32000 v PBST 0,05 % in v vsako vdolbinico odpipetirali po 100 μ l vzorca. Za kontrolo smo odpipetirali v zadnjo vrstico vdolbinic po 100 μ l PBST 0,05 %. Nato smo ploščo pokrili s folijo.

g. Inkubacija: je potekala 2 uri na 37°C.

h. Spiranje in osušitev plošče:

Z avtomatskim spiralcem smo ploščo 3-krat sprali s pufrom za spiranje in osušili.

i. Vezava sekundarnega protitelesa:

Sekundarno protitelo smo razredčili v razmerju 1:2.000 s 100 μ l PBST 0,05 % in v vsako vdolbinico odpipetirali po 100 μ l raztopine.

j. Inkubacija: je potekala 2 uri na 37°C.

k. Spiranje in osušitev plošče:

Z avtomatskim spiralcem smo ploščo 3-krat sprali s pufrom za spiranje in osušili.

l. Indikatorska reakcija s substratom:

Substrat H₂O₂ in TMB smo redčili s substratnim pufrom pH 6,0 v razmerju 1:1 in odpipetirali po 200 μ l v vsako vdolbinico. Pokrili smo s folijo in pustili na sobni temperaturi 15 min. Nato smo dodali v vsako vdolbinico po 50 μ l raztopine za prekinitev reakcije (2 M H₂SO₄) in količino hidroliziranega substrata določili z merjenjem absorbance pri 450 nm.

3.2.3.1 Testiranje CK8 s primarnimi protitelesi proti-CK mPt (serija 1), proti-CK mPt (serije 2) in proti-CK8 mPt (Abcam) z ELISA

Za inkubacijo čez noč smo v vsako vdolbinico odpipetirali po 100 μ L raztopine CK8 koncentracije 1 μ g/ml.

Za sekundarno protitelo smo uporabili kozje-protimišje protitelo, konjugirano s peroksidazo in redčeno v PBST 0,05 % v razmerju 1:2.000.

Preglednica IV: Redčitvena vrsta primarnih protiteles.

Protitelo	proti-CK mPt (serija 2)		proti-CK mPt (serija 1)		proti-CK8 mPt (Abcam)	
	1	2	1	2	1	2
Redčitev	1:2.000	1:2.000	1:2.000	1:2.000	1:8.000	1:8.000
	1:4.000	1:4.000	1:4.000	1:4.000	1:16.000	1:16.000
	1:8.000	1:8.000	1:8.000	1:8.000	1:32.000	1:32.000
	1:16.000	1:16.000	1:16.000	1:16.000	1:64.000	1:64.000
	1:32.000	1:32.000	1:32.000	1:32.000	1:128.000	1:128.000
	Slepa	Slepa				

3.2.3.2 Testiranje CK8 s primarnim protitelesom proti-CK mPt (serija 2) z ELISA

Za inkubacijo čez noč smo v vsako vdolbinico odpipetirali po 100 µL raztopine CK8 koncentracije 1 µg/ml.

Preglednica V: Redčitvena vrsta primarnih protiteles.

Protitelo	Protiti-CK mPt (serija 2)	
	1	2
Alikvot		
Redčitev	1:250	1:250
	1:4.000	1:4.000
	Slepa	Slepa

Za sekundarno protitelo smo uporabili kozje-protimišje protitelo, konjugirano s peroksidazo in redčeno v PBST 0,05 % v razmerju 1:2.000.

3.2.3.3. Testiranje oktapeptidov A, B, C s proti-CK mPt (serija 2) z ELISA

Doljak in sodelavci (15) so ugotovili, da se proti-CK mPt veže na dodekapeptid VKIALEVEIATY, ki je skupen za CK1, CK2, CK8, CK10 in CK18. Želeli smo bolj natančno določiti epitop za vezavo proti-CK mPt. Na podlagi dodekapeptida so bili sintetizirani trije oktapeptidi:

VKIALEVEIATY – oktapeptid A – prvih 8 AK

VKIALEVEIATY – oktapeptid B – zadnjih 8 AK

VKIALEVEIATY – oktapeptid C – srednjih 8 AK

Za inkubacijo čez noč, ki je trajala 16 ur, smo v vsako vdolbinico odpipetirali po 100 μ L raztopine oktapeptidov v koncentraciji 20 μ g/ml. Primarna protitelesa: proti-CK mPt (serija 1) in kontrolno protitelo proti stefinu B. Za sekundarno protitelo smo uporabili kozje-protimišje protitelo, konjugirano s peroksidazo in redčeno v PBST 0,05 % v razmerju 1:2.000.

3.2.4 Elektroforeza

Postopek izvajanja NaDS-PAGE

1. Najprej smo pripravili 15 % ločevalni gel. Zmešali smo 1,5 mL 40 % akrilamida, 1 mL 1,5 M Tris HCl (pH 8,8), 1,4 mL destilirane vode, 50 μ L 10 % NaDS in dobro premešali. Nato smo tik pred vlivanjem gela dodali še 50 μ L 10 % amonijevega persulfata (APS) in 1,7 μ L N,N,N',N'-tetra-metiletilendiamina (TEMED). Tako pripravljeno raztopino smo vlili do treh četrtin v nosilec vpeti stekleni sendvič, na vrh pa dodali še 1 mL 2-propanola za izravnavo površine.
2. Po 20 min, ko se je gel strdil, smo pripravili 5 % koncentracijski gel iz 188 μ L 40 % akrilamida, 195 μ L 1,5 M Tris-HCl (pH 6,8), 1 mL destilirane vode, 15 μ L 10 % NaDS, 15 μ L 10 % APS in 1,5 μ L TEMED. Odlili smo 2-propanol, vlili koncentracijski gel na ločevalni gel, vstavili glavnik in počakali 20 min, da je koncentracijski gel polimeriziral.
3. Odstranili smo glavnik in v žepke nanесли vzorce.

Postopek izvajanja prenosa western in barvanja

1. *Priprava aparature*: anodo in katodo aparata za prenos western smo očistili z destilirano vodo.
2. *Priprava »sendviča«*: Na anodo smo položili 3 sloje mokrega filter papirja, nanje položili NC membrano, ki smo jo predhodno aktivirali s pomakanjem v metanolu

za 5 min. Na membrano smo položili gel z vzorcem, nanj pa 3 sloje mokrega filter papirja.

3. *Prenos*: je potekal 2 uri pri 5 V
4. *Inkubacija*: po elektroforeznem prenosu smo membrano inkubirali 1 uro v 5 % mleku ali v PBST 0,05 %. Če smo uporabili mleko, smo še spirali 3-krat po 10 min s PBST 0,05 %.
5. *Vezava primarnih protiteles*: membrano smo stresali 1 uro pri sobni temperaturi v raztopini primarnih protiteles, redčenih v PBST 0,05 %
6. Membrano smo spirali 3-krat po 10 min s PBST 0,05 %
7. *Vezava sekundarnih protiteles*: membrano smo inkubirali v raztopini sekundarnih protiteles, redčenih 1:1.000 v PBST 0,05 % (izbira odvisna od izvora primarnih protiteles)
8. *Spiranje* 3-krat po 15 min s PBST 0,05 %
9. *Detekcija*: 10 mg substrata DAB (3,3'-diaminobenzidin) smo raztopili v 20 mL 50 mM Tris pH 7,5. Raztopini smo dodali 10 μ L 30 % H₂O₂. V tako pripravljeno raztopino smo pomočili membrano in razvijali dokler se niso pojavile rjave lise. Reakcijo smo prekinili v destilirani vodi in membrano posušili na zraku.

1. NaDS-PAGE s 100 ng CK8

Preglednica VI: Potek poskusa NaDS-PAGE s 100 ng CK8.

<i>Št. žepka</i>	1	2	3
<i>Količina CK8</i>	100 ng	100 ng	100 ng
<i>Ditiotreitol</i>		1,5 μ L	
<i>Blokada</i>	Mleko		
<i>Primarno protitelo</i>	proti-CK mPt (serija 2) (1:300)	proti-CK8 mPt (Abcam) (1:1250)	
<i>Sekundarno protitelo</i>	Kozje protimišje (1:1.000)	Kozje protikunčje (1:1.000)	

2. NaDS-PAGE s 500 ng CK8 in dvema načinoma blokade NC membrane – mleko in PBST 0.05 %

Preglednica VII: Potek poskusa NaDS-PAGE.

Št. žepka	1	2	3
Količina CK8	12,5 µL	12,5 µL	12,5 µL
Blokada	Mleko		PBST 0,05 %
Primarno protitelo	proti-CK mPt (serija 2) (1:150)	SLEPA	proti-CK mPt (serija 2) (1:150)
Sekundarno protitelo	Kozje protimišje (1:1.000)		

3. NaDS-PAGE lizata celic MCF-10A neoT

Preglednica VIII: Potek poskusa NaDS-PAGE lizata celic MCF-10A neoT.

Št. žepka	1	2	3	4	5	6
Lizat celic MCF-10A neoT	2 µL	10 µL	2 µL	10 µL	2 µL	10 µL
Blokada	PBST 0.05 %					
Primarno protitelo	proti-CK mPt (serija 2) (1:150)	proti-CK mPt (serija 1) (1:150)	SLEPA			
Sekundarno protitelo	Kozje protimišje (1:1.000)					

Priprava lizata:

Celično linijo MCF-10A neoT predhodno namnožimo v 75 mL gojiščni plastenki. Dodamo 6 mL PBS pufra, speremo in odlijemo, da odstranimo serum iz gojišča. Nato dodamo 5 mL PBS pufra z 0.2 % EDTA in 100 µL tripsina in inkubiramo 5-10 min na 37 °C. Dodamo 5 mL kompletnega gojišča in centrifugiramo 5 min pri 1500 obratih na minuto. Supernatant odlijemo, celicam pa dodamo lizirni pufer pH 5.5. Na 10⁶ celic dodamo 70 µL lizirnega pufra. Celice premešamo na koničnem mešalu (vorteks) in nato zamrznemo za 30 min na -80 °C. Sledi ultrazvočna kopel dvakrat po 15 sekund in centrifugiranje za 30 min pri maksimalni hitrosti.

4. NaDS-PAGE CK18

Preglednica IX: Potek poskusa NaDS-PAGE CK18.

Št. žepka	1	2	3	4	5
Količina CK18	400 ng	400 ng	400 ng	400 ng	400 ng
blokada	PBST 0.05 %				
Primarno protitelo	proti-CK mPt (serija 2) (1:150)	proti-CK mPt (serija 1) (1:150)	proti-CK8 mPt (Abcam) (1:1250)	SLEPA	SLEPA
Sekundarno protitelo	Kozje protimišje (1:1.000)		Kozje protikunčje (1:1.000)	Kozje protimišje (1:1.000)	Kozje protikunčje (1:1.000)

Vzorec, ki je vseboval CK8 smo predhodno kuhali 7 minut na 99°C, da smo dosegli popolno denaturacijo.

Nativna PAGE elektroforeza

Postopek izvajanja nativne PAGE je enak izvajanju NaDS-PAGE s to razliko, da pri pripravi gela ne dodamo NaDS in da elektroforezni pufer ne vsebuje sredstva za denaturacijo, kot sta β -merkaptetanol ali ditiotritol.

*1. Nativna PAGE CK8***Preglednica X: Potek poskusa nativne PAGE CK8.**

Št. žepka	1	2
Količina CK8	500 ng	500 ng
Blokada	PBST 0,05 %	
Primarno protitelo	proti-CK mPt (serija 2) (1:150)	SLEPA
Sekundarno protitelo	Kozje protimišje (1:1.000)	

2. Nativna PAGE IF CK8/CK18

Preglednica XI: Potek poskusa native PAGE IF CK8/CK18.

Št. žepka	1	2	3	4	5	6	7	8
vzorec	1	2	1	2	1	2	1	2
Količina IF CK8/CK18	1,5 µg	3,0 µg	1,5 µg	3,0 µg	1,5 µg	3,0 µg	1,5 µg	3,0 µg
blokada	PBS 0.05 % Tween							
Primarno protitelo	proti-CK mPt (serija 2) (1:150)		proti-CK mPt (serija 1) (1:150)		proti-CK8 mPt (Abcam) (1:1.000)		SLEPA	
Sekundarno protitelo	Kozje proti-mišje (1:1.000)				Kozje proti-kunčje (1:1.000)			Kozje proti-mišje

Rekonstitucija IF CK8/CK18 in vitro

IF sestavljen iz para CK8 in CK18 je mogoče pripraviti *in vitro*, saj je CK8 bazičnega, CK18 pa kislega tipa, torej je zadoščeno pogojem za povezavo v IF. Rekonstitucijo smo izvedli po postopku iz članka Hermann in sodelavci (2). Za rekonstitucijo CK8/CK18 velja, da v ustreznem pufru in pri 21°C pride do tvorbe zgodnjih oblik IF že po 2 sekundah. Daljše, polimerne strukture pa se tvorijo že po nekaj minutah.

Postopek

1. raztopini CK8 in CK18 smo predhodno izsušili v vakuumskem sušilniku
2. izvedli smo rekonstitucijo v dveh mikrocentrifugirkah:
 - a) 5 mg CK8 in 5 mg CK18 smo raztopili v 100 µL pufra (vzorec 1)
 - b) 5 mg CK8 in 5 mg CK18 smo raztopili v 500 µL pufra (vzorec 2)

Obe paralelki smo inkubirali na 21 °C 2 uri.

Uporabljen pufer je vseboval 10 mM Tris-HCl (ph 7,5), 1 mM DTT in 1 mM EDTA.

3.2.5 Točkovni nanos (dot blot)

Točkovni nanos uporabljamo za hitro določanje prisotnosti določenega antigena, brez predhodne ločitve na PAGE. Vzorec nanesimo direktno na NC ali PVDF membrano v obliki kapljice.

Postopek

V našem primeru bi pozitivna reakcija po dodatku substrata pomenila, da se je proti-CK mPt vezalo na CK8, CK18 oz. IF CK8/CK18, s čimer bi dokazali, da to protitelo prepozna epitop na teh proteinih.

Uporabili smo nitrocelulozno membrano, ki smo jo najprej aktivirali s pomakanjem v metanolu za 5 minut. Na NC membrano smo nanegli 5 μL raztopine antigena s koncentracijo 0,4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Počakali smo, da je topilo izparelo in membrano inkubirali v pufri PBST 0,05 % čez noč (16 ur), da smo blokirali nezasedena mesta na membrani. Membrano smo nato prenesli v raztopino primarnih protiteles in stresali na stresalniku 1 uro. Nato smo membrano spirali 3-krat po 10 min s PBST 0,05 % in jo prenesli v raztopino sekundarnih protiteles ter inkubirali 1 uro. Po inkubaciji smo membrano ponovno spirali s PBST 0,05 % 3-krat po 10 min. Sledila je detekcija, ki smo jo izvedli z 20 mL raztopine 50 mM Tris pufra pH 7,5, 10 mg substrata DAB in 10 μL 30 % H_2O_2 . Razvijali smo 15 min, nato pa smo membrano prestavili v dH_2O , da smo ustavili barvno reakcijo.

1. Točkovni nanos CK8, CK18 in IF CK8/CK18

Za analizo smo pripravili IF CK8/CK18 po postopku rekonstitucije CK8/CK18 *in vitro* (2). Uporabili smo 125 μL raztopine CK8 s koncentracijo 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in 125 μL raztopine CK18 koncentracije 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Na NC membrano smo nanegli po 2 μg CK8, CK18 in IF CK8/CK18. Nanose smo testirali s proti-CK mPt (serija 1), proti-CK mPt (serija 2) in dvema slepima poskusoma. Za proti-CK mPt (serija 1), proti-CK mPt (serija 2) in slepo 1 smo kot sekundarno protitelo uporabili kozja proti-mišja protitelesa proizvajalca Jackson Immuno Research, za slepo 2 pa kozja proti-mišja protitelesa proizvajalca Upstate.

Redčenje protiteles:

Primarna protitelesa:

-proti-CK mPt (serija 1) – 1:300

-proti-CK mPt (serija 2) – 1:100

Sekundarna protitelesa:

-kozja proti-mišja protitelesa proizvajalca Jackson Immuno Research – 1:1.000

-kozja proti-mišja protitelesa proizvajalca Upstate – 1:1.000

2. Točkovni nanos s sekundarnimi protitelesi proizvajalca Upstate

Na NC membrano smo nanесли 3-krat po 2 μg CK8, CK18 in IF CK8/CK18. Nanose smo testirali s proti-CK mPt (serija 1 in 2) ter slepim poskusom. Povsod smo uporabili sekundarna protitelesa proizvajalca Upsate.

Redčenje protiteles:

Primarna protitelesa:

- proti-CK mPt (serija 1) – 1:300

- proti-CK mPt (serija 2) – 1:300

Sekundarna protitelesa:

- kozja proti-mišja protitelesa proizvajalca Upstate – 1:1.000

3.2.6 Določitev 3D strukture proti-CK mPt

Za določitev 3D strukture variabilnega dela proti-CK mPt, smo uporabili njegovo AK zaporedje, ki je objavljeno v članku Kopitar-Jerala in sodelavci (27). Na svetovnem spletu je na voljo več internetnih strežnikov, ki ponujajo modeliranje z metodo primerjanja znanim, homolognim strukturam (homology modelling). Primeri so:

- Swiss-model (<http://swissmodel.expasy.org/>)
- RosettaAntibody (<http://antibody.graylab.jhu.edu/>)
- WAM – Web Antibody modelling univerze v Bath-u (Velika Britanija) (<http://antibody.bath.ac.uk/index.html>)

Izbrali smo strežnik WAM univerze v Bath-u, ki ponuja priročno avtomatsko prileganje primarne strukture našega protitelesa s primarnimi strukturami protiteles z znano 3D strukturo in posreduje rezultate v povprečno 14 dneh. Funkcija *AUTOALIGN* nam omogoča, da vnesemo ustrezno AK zaporedje variabilne regije našega protitelesa, brez

potrebe po ročnem prileganju. Program s pomočjo določenih pravil najde CDR regije in opravi prileganje.

Za primerjavo smo isto AK zaporedje poslali še na univerzo UCSF v San Franciscu. Za napovedovanje 3D strukture so uporabili program Modeller (Sali, 1993). S funkcijo *BUILD_PROFILE* so s tremi iteracijami poiskali in prilegali zaporedja proteinov z znano 3D strukturo, katerih aminokislinsko zaporedje je bilo našemu najbolj podobno. Nato so s funkcijo *AUTOMODEL* petkrat zgradili model našega proteina. Kot končni model so uporabili tistega z najmanjšo DOPE-vrednostjo (ta pove, kako dobra je napovedana 3D struktura). Izboljševanja zank v strukturi modela niso uporabili, ker je njihova konformacija fleksibilna in odvisna od vezanega liganda.

4. Rezultati

4.1 Priprava proti-CK mPt

4.1.1 Izolacija in čiščenje protiteles

Rezultati čiščenja z afinitetno kromatografijo na protein A sefarozi so zbrani v preglednicah XII, XIII, XIV, XV, XVI. Osenčenim frakcijam smo z 1 M pufrom Tris uravnali pH na 7 in jih shranili v zamrzovalniku na -20 °C za nadaljnjo uporabo. Izmerjena absorbanca teh frakcij je bila namreč višja od 0,010, kar je pomenilo, da je bila tam velika večina protiteles.

Preglednica XII: Elucija mPt s kolone z elucijskim pufrom pH 2,5 (nanos 1).

ŠT. EPRUVETE	ABSORBANCA pri 280 nm po spiranju z elucijskim pufrom	Volumen frakcije (mL)
1	0,000	5
2	0,330	5
3	0,010	5
4	-0,023	5
5	0,012	15

Preglednica XIII: Elucija mPt s kolone z elucijskim pufrom pH 2,5 (nanos 2).

ŠT. EPRUVETE	ABSORBANCA pri 280 nm po spiranju z elucijskim pufrom	Volumen frakcije (mL)
1	0,000	5
2	0,410	5
3	0,000	5
4	-0,015	5
5	0,021	15

Preglednica XIV: Elucija mPt s kolone z elucijskim pufrom pH 2,5 (nanos 3).

ŠT. EPRUVETE	ABSORBANCA pri 280 nm po spiranju z elucijskim pufrom	Volumen frakcije (mL)
1	0,010	5
2	0,330	5
3	-0,006	5
4	0,003	5
5	0,012	15

Preglednica XV: Elucija mPt s kolone z elucijskim pufrom pH 2,5 (nanos 4).

ŠT. EPRUVETE	ABSORBANCA pri 280 nm po spiranju z elucijskim pufrom	Volumen frakcije (mL)
1	0,010	5
2	0,310	5
3	0,050	5
4	0,020	5
5	0,014	15

Preglednica XVI: Elucija mPt s kolone z elucijskim pufrom pH 2,5 (nanos 5).

ŠT. EPRUVETE	ABSORBANCA pri 280 nm po spiranju z elucijskim pufrom	Volumen frakcije (mL)
1	0,040	5
2	0,270	5
3	0,010	5
4	0,000	5
5	0,009	15

4.1.2 Določitev koncentracije protiteles

Po koncentriranju smo koncentrat redčili s PBS pufrom do 3,70 mL. Tako pripravljeni raztopini smo izmerili koncentracijo s spektrofotometrom Nanodrop in odčitali vrednost 1,78 mg/mL.

Izračunali smo količino pridobljenih protiteles:

$$m(\text{protiteles}) = c(\text{protiteles}) * V(\text{protiteles}) = 1,78 \text{ mg/mL} * 3,70 \text{ mL}$$

$$m(\text{protiteles}) = 6,59 \text{ mg}$$

Protitelesa smo dalje redčili, da smo dobili končno koncentracijo 1,5 mg/mL.

4.2 Imunoencimska metoda na trdni podlagi – ELISA

4.2.1 ELISA s CK8

Pripravili smo redčitveno vrsto antigena CK8 1:2.000 do 1:32.000. Analizirali smo s proti-CK mPt (serija 1 in 2). ELISA ni pokazala povezave med obsegom vezave monoklonskih protiteles in naraščanjem koncentracije antigena CK8. Pripravili smo tudi redčitveno vrsto od 1:8.000 do 1:128.000 in analizirali s komercialno dostopnim monoklonskim protitelesom proti CK8 (proti-CK8 mPt). Tudi obseg vezave tega protitelesa ni naraščal sorazmerno s koncentracijo antigena CK8.

Preglednica XVII: Rezultati vezave proti-CK mPt (serija 1 in 2) na antigen CK8 različnih koncentracij.

redčitev	proti-CK mPt (serija 2)		proti-CK mPt (serija 1)	
	1	2	1	2
1:2.000	0,607	0,248	0,259	0,222
1:4.000	0,260	0,242	0,339	0,279
1:8.000	0,242	0,221	0,274	0,404
1:16.000	0,347	0,218	0,254	0,324
1:32.000	0,236	0,210	0,263	0,322

Preglednica XVIII: Rezultati vezave proti-CK8 mPt (Abcam) na antigen CK8 različnih koncentracij.

Redčitev	proti-CK8 mPt (Abcam)	
	1	2
1:8.000	0,246	0,246
1:16.000	0,284	0,602
1:32.000	0,318	0,450
1:64.000	0,211	0,326
1:128.000	0,233	0,290
slepa	0,386	0,248

Po zgornjih neuspešnih poskusih smo mikrotitrne ploščice prekrili z CK8 višje koncentracije.

Uporabili smo proti-CK mPt (serija 2), vendar absorbanca ni bila sorazmerna s koncentracijo antigena. Absorbanci slepih poskusov sta bili celo višji od nekaterih absorbanc, kjer je dejansko bil prisoten antigen CK8.

Preglednica XIX: Rezultati vezave proti-CK mPt (serija 2) na antigen CK8 različnih koncentracij.

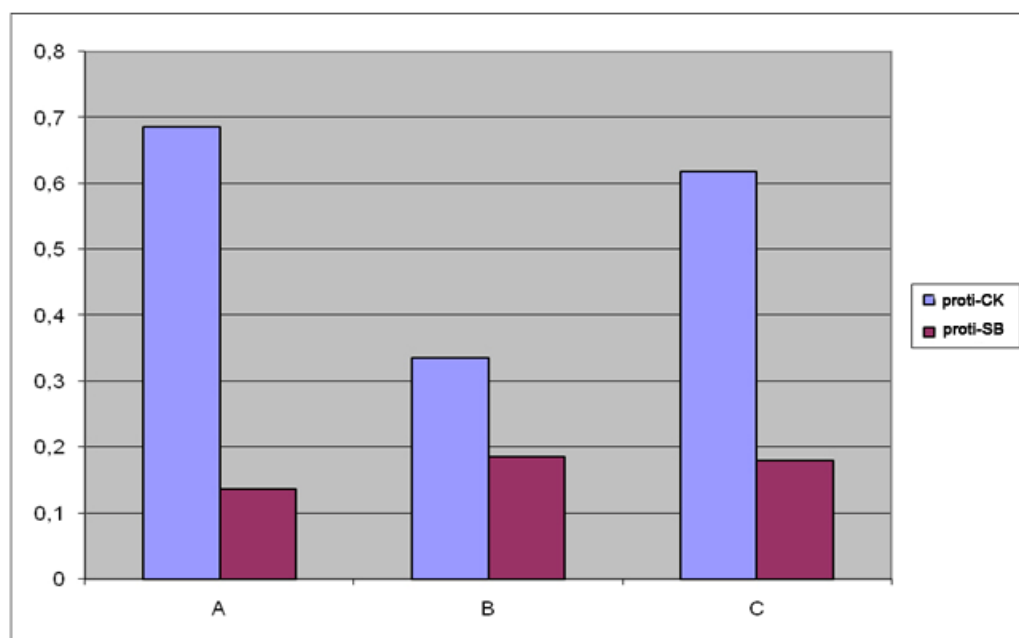
Redčitev	proti-CK mPt (serija 2)	
	1	2
1:250	0,4363	0,4331
1:400	0,5638	0,6323
slepa	0,6669	0,8873

4.2.2 ELISA z oktapeptidi

Proti-CK mPt smo analizirali s peptidi A, B, C. Afiniteto vezave smo primerjali s proti-stefin B mPt, ki je služilo kot kontrolno protitelo.

Preglednica XX: Rezultati vezave proti-CK mPt (serija 2) na peptide A, B in C.

	proti-CK mPt (serija 2)	proti-stefin B mPt	slepa
A	1,1434	0,4354	0,3202
	0,8544	0,4649	0,3059
B	0,681	0,5308	0,3458
	0,7096	0,558	0,372
C	0,8833	0,6256	0,3681
	1,148	0,5302	0,4262

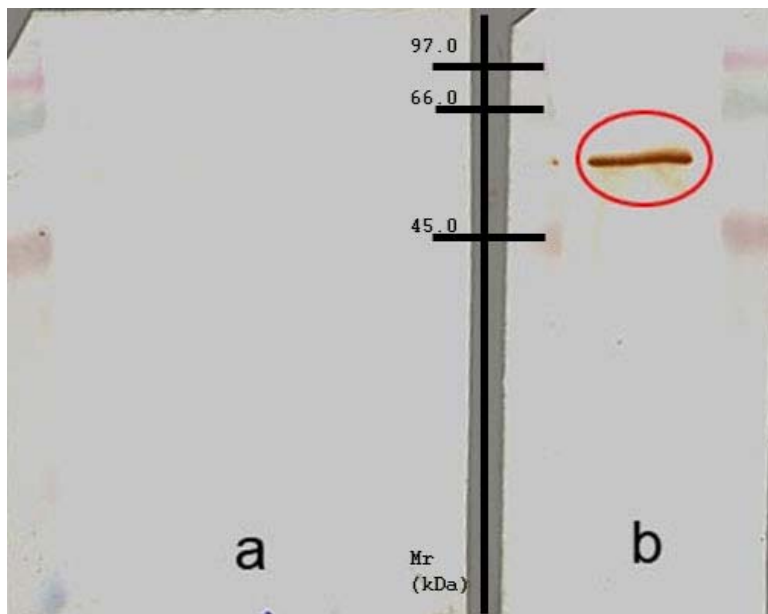
**Graf 1: Primerjava absorbance pri vezavi proti-CK mPt (serija 2) in proti-stefin B mPt na peptide A, B, C, če od vrednosti absorbanc odštejemo slepo vrednost.**

4.3 NaDS-PAGE

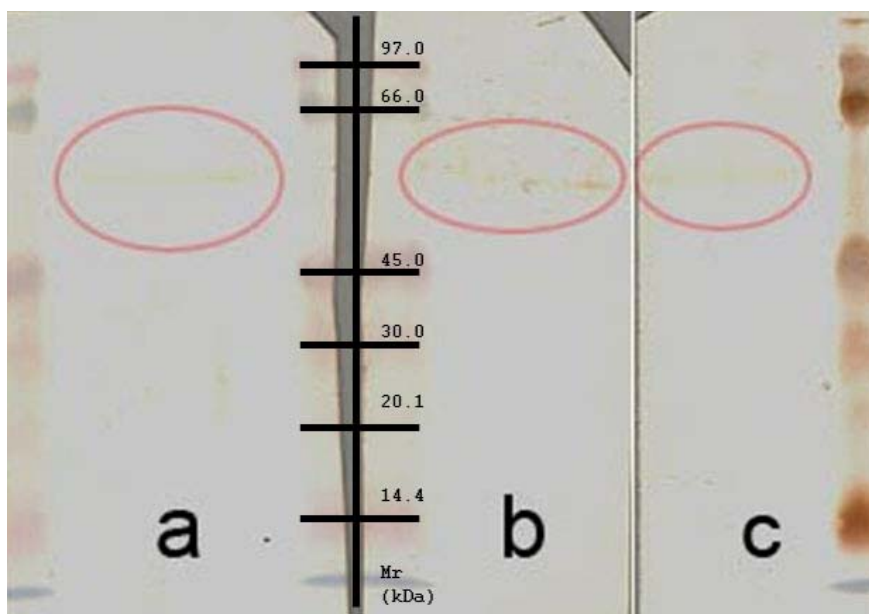
NaDS-PAGE s 100 ng CK8

Vzorce smo najprej ločili z NaDS-PAGE in nato smo izvedli prenos western na NC membrano. Membrano smo inkubirali z različnimi primarnimi protitelesi. Po inkubaciji s sekundarnimi protitelesi, smo izvedli barvno reakcijo s substratom DAB, membrano osušili

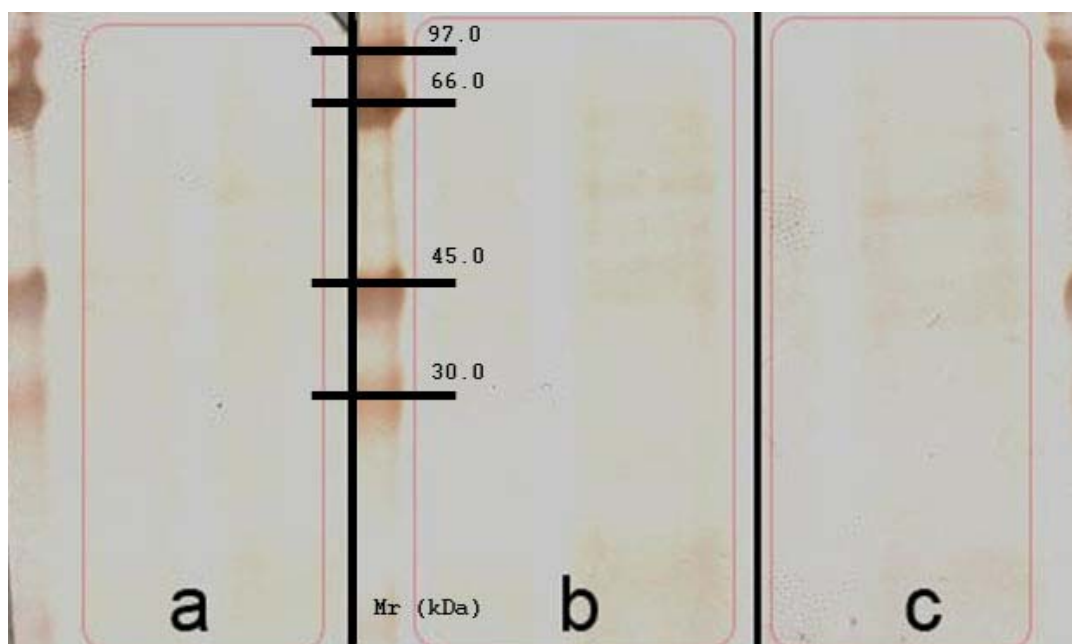
in skenirali. Rezultati so prikazani na slikah 12, 13, 14, 15. Na sliki 12b je prikazan rezultat poskusa, pri katerem smo želeli s komercialnim protitelesom proti CK8 pokazati, kje na membrani pričakujemo pojav obarvane lise. Ta rezultat nam je bil v pomoč pri iskanju lokacije pojava lis pri poskusih z našimi protitelesi (slike 13, 14, 15).



Slika 12: NC membrana inkubirana s proti-CK mPt (serija 2) (a) in s proti-CK8 mPt (Abcam) (b). Količina nanesenega antigena CK8 je 100 ng. Pri (a) ni prišlo do vezave proti-CK mPt na antigen. Na sliki (b) je jasno vidna lisa, ki ustreza velikosti rekombinantnega CK8.



Slika 13: NC membrana blokirana v mleku in inkubirana s proti-CK mPt (serija 2) (a), blokirana v mleku in brez inkubacije s proti-CK mPt (serija 2) (b) in blokirana s PBST 0,05 % ter inkubirana s proti-CK mPt (serija 2). Na vseh membranah so vidne zelo šibke lise, ki ustrezajo velikosti CK8 (53,5 kDa).



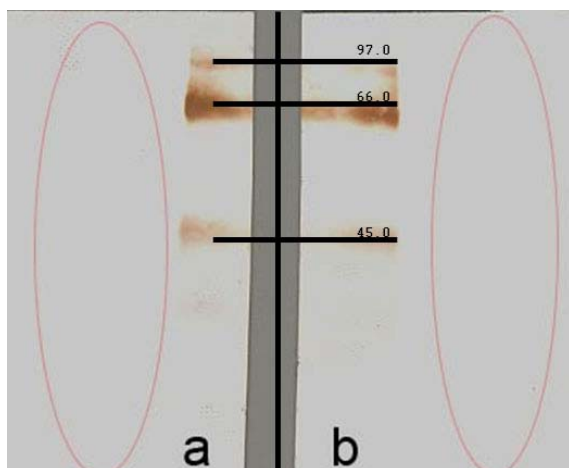
Slika 14 NC membrana lizatov celic MCF-10 neoT, blokirana s PBST 0,05 % in inkubirana s proti-CK mPt (serija 1) (a), s proti-CK mPt (serija 2) (b) in brez inkubacije s primarnimi protitelesi (c). Na vseh membranah so vidne šibke lise, ki so razporejene po celotni membrani, torej so zelo različnih velikosti.

NaDS-PAGE CK18

NaDS-PAGE smo izvedli tudi s CK18. Po prenosu western smo NC membrano inkubirali s proti-CK mPt (serija 1 in 2) in s proti-CK8 mPt (Abcam). Po barvni reakciji nismo zaznali obarvanih lis na membrani.

4.3.1 Nativna PAGE CK8

Z nativno PAGE smo želeli preveriti, če je za vezavo protiteles na CK8 potrebna nativna oblika. Izkazalo se je, da se proti-CK mPt ne vežejo na nativno obliko CK8, saj se na NC membrani ni pojavila lisa (slika 15).



Slika 15: NC membrana po nativni PAGE antigena CK8 in prenosu western, inkubirana s proti-CK mPt (serija 2) (a) in brez inkubacije s proti-CK mPt (serija 2) (b). Na membranah ni opaziti obarvanih lis.

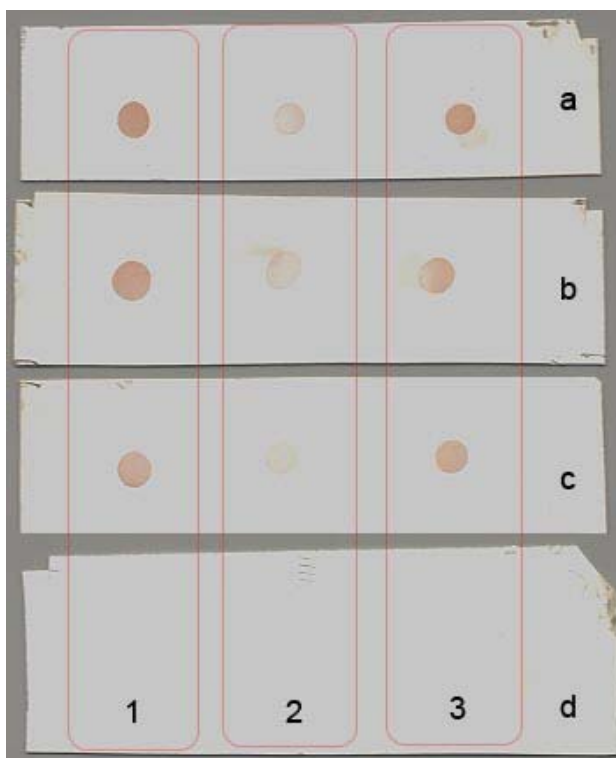
4.3.2 Nativna PAGE IF CK8/CK18

Enako, kot v primeru 4.3.1, smo izvedli nativno PAGE tudi z rekonstituiranim IF CK8/CK18. Po prenosu western smo NC membrane inkubirali s primarnimi protitelesi: proti-CK mPt (serija 1) proti-CK mPt (serija 2) in proti-CK8 mPt. Šibke lise so se pojavile le na NC membrani inkubirani s proti-CK8 mPt (Abcam). Proti-CK mPt (serija 1 in 2) niso prepoznavale CK8/CK18 kompleksa. Proti-CK8 mPt (Abcam) pa je prepoznalo samo CK8 monomerno obliko.

4.4 Točkovni nanos (dot blot)

S to metodo smo želeli preveriti, če je za vezavo protitelesa potrebna večja količina antigena CK8. Ugotovili smo, da tudi pri večji količini nanešenega CK8 ne pride do vezave proti-CK mPt, obarvanje točk pa smo pripisali nespecifični vezavi sekundarnih protiteles.

Slika 16: NC membrane po točkovnem nanosu CK8 (1), CK18 (2) in IF CK8/CK18 (3), inkubirana s proti-CK mPt (serija 2) (a), proti-CK mPt (serija 1) (b), brez inkubacije s primarnimi protitelesi (c,d) in inkubirana s sekundarnimi protitelesi Jackson Immuno Research (a, b, c) in s sekundarnimi protitelesi proizvajalca Upstate (d).



Slika 16: NC membrana inkubirana s sekundarnimi protitelesi Jackson Immuno Research (a, b, c) in s sekundarnimi protitelesi proizvajalca Upstate (d).

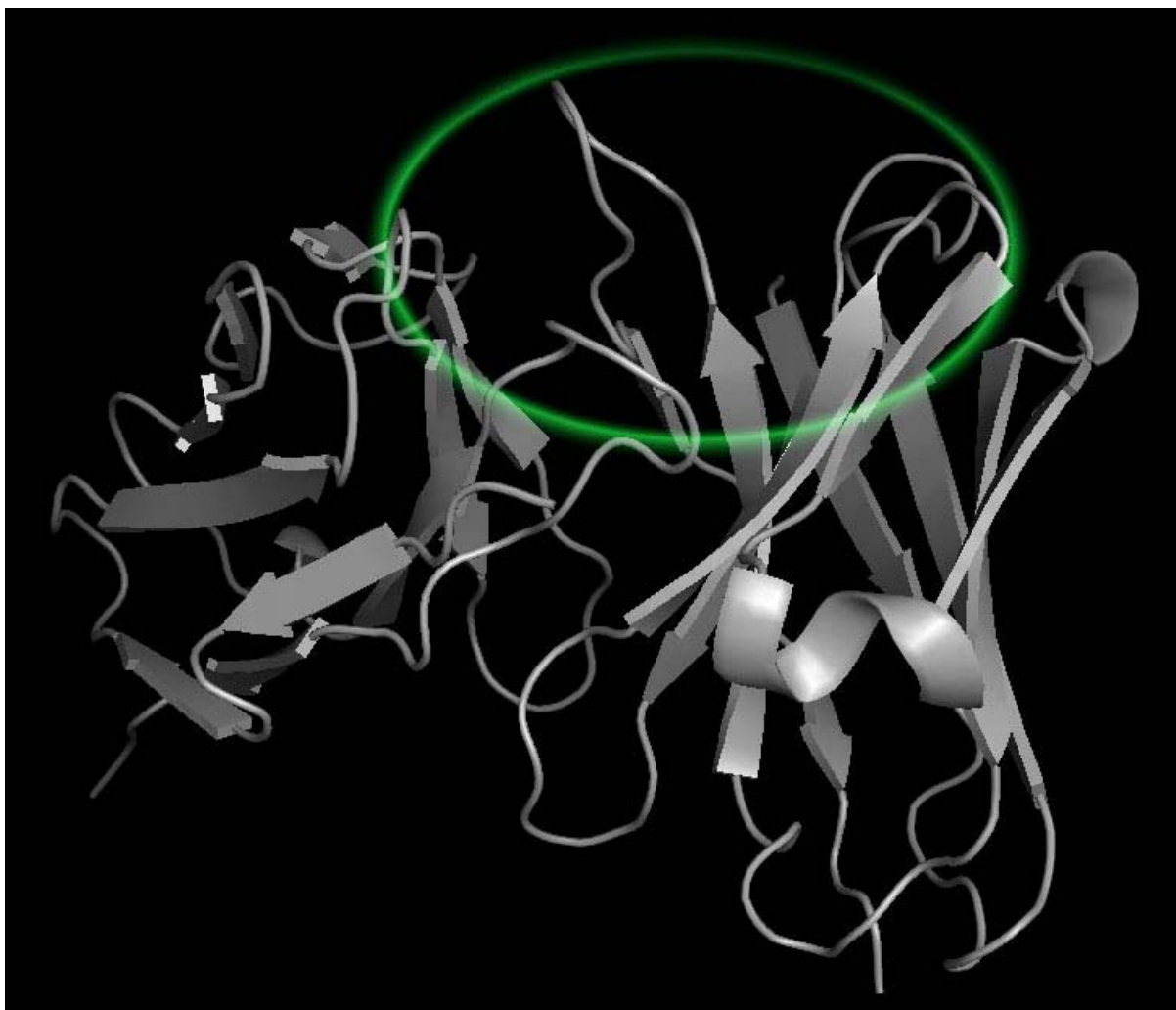


Slika 17: NC membrana inkubirana s sekundarnimi protitelesi proizvajalca Upstate.

Slika 17: NC membrana po točkovnem nanosu CK8 (1), CK18 (2) in IF CK8/CK18 (3), inkubirana s proti-CK mPt (serija 1) (a), proti-CK mPt (serija 2) (b), brez inkubacije s primarnimi protitelesi (c). Vse membrane so bile inkubirane s sekundarnimi protitelesi proizvajalca Upstate. Šibko obarvane lise so vidne le pri antigenu CK8, vendar tudi pri slepem poskusu.

4.5 Modeliranje proti-CK mPt

S pomočjo spletnega strežnika WAM smo zgradili 3D model variabilne regije proti-CK mPt (slika 18). Vidimo, da protein vsebuje značilne oblike β ploskev in α vijačnic, v območju, ki ga obkroža zelena elipsa pa vsebuje CDR regije v obliki zank. Na tem področju pride do vezave antigena.



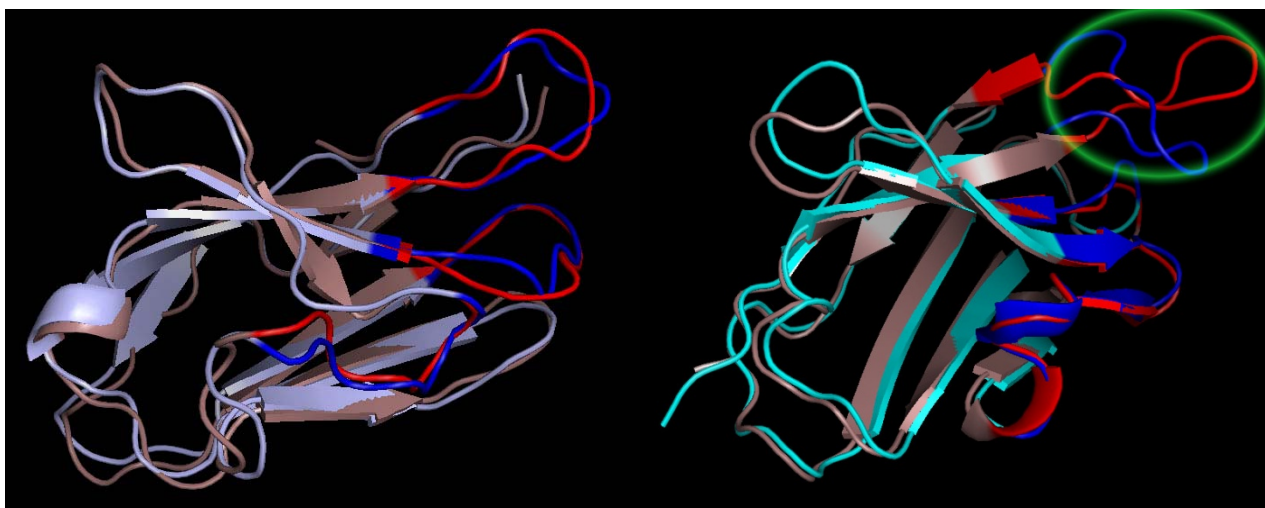
Slika 18: Lahka in težka veriga variabilne regije proti-CK mPt modeliranega z WAM.

Na podlagi ugotovitev v preglednici XXI lahko ocenimo pravilnost modela, zgrajenega s pomočjo strežnika WAM. Pri lahki verigi je bilo identičnih 88 od skupno 106 AK ali 83 %. Pri težki verigi pa je bilo identičnih 54 od skupno 118 AK ali 46 %. Iz preglednice XXI ocenimo, da je pravilnost modela za lahko verigo med 0,1 nm in 0,2 nm, za težko verigo pa med 0,3 nm in 0,4 nm.

Opravili smo tudi prekrivanje modela, izdelanega s pomočjo strežnika WAM, z modelom izdelanim na Univerzi UCSF ter izračunali RMSD (root mean square deviation), ki nam pove, kako podobna sta si modela med seboj (slika 19 in 20). Za prekrivanje modelov je bila uporabljena programska oprema FlexX Docking. Za lahko verigo smo dobili rezultat 0,1094 nm, za težko verigo pa 0,1831 nm. Največ razlik je bilo pri CDR H3 regiji, ki jo je tudi sicer najtežje modelirati.

Preglednica XXI: Verjetnost napovedi natančnosti modela glede na % ujemanja z znanim modelom (37).

% ujemanja zaporedja	Št. Modelov	% modelov z RMSD <0,1 nm	% modelov z RMSD >0,2 nm	% modelov z RMSD >0,3 nm	% modelov z RMSD >0,4 nm	% modelov z RMSD >0,5 nm	% modelov z RMSD < 0,5 nm
25-29	125	0	10	30	46	67	33
30-39	222	0	18	45	66	77	23
40-49	156	9	44	63	78	91	9
50-59	155	18	55	79	86	91	9
60-69	145	38	72	85	91	92	8
70-79	137	42	71	82	85	88	12
80-89	173	45	79	86	94	95	5
90-95	88	59	78	83	86	91	9



Slika 19: Primerjava strukture lahke verige modelirane s pomočjo strežnika WAM in strukture modelirane na univerzi UCSF

Slika 20: Primerjava strukture težke verige modelirane s pomočjo strežnika WAM in strukture modelirane na univerzi UCSF. Regija CDR H3 je na sliki označena z zeleno elipso.

Sliki 21 in 22 predstavljata prileganje lahke oziroma težke verige proti-CK8 mPt z znanimi zaporedji, ki jih hranijo v bazi podatkov. Program jih samodejno poišče v bazi podatkov in uporabi za gradnjo 3-D modela. Zadnji dve zaporedji predstavljata poravnavo zaporedja proti-CK8 mPt z najboljše ujemajočim zaporedjem iz baze podatkov. Poravnava je bila opravljena s programom ClustalW XXL. Rdeče obarvana področja so CDR regije, ki vsebujejo delecije (-) in se med seboj najmanj ujemajo.

5. Razprava

Doljak in sodelavci (15) so v svoji raziskavi dokazali, da so možni kandidati za vezavo proti-CK mPt citokeratini CK1, CK2, CK8, CK10 in CK18. Za imunizacijo miši in pripravo proti-CK mPt so uporabili ekstrakt tumorskih celic MCF-7, zato antigen na začetku ni bil poznan. Z 2-D elektroforezo so komponente ekstrakta ločili glede na izoelektrično točko in velikost. Tako ločene sestavine ekstrakta so prenesli na PVDF membrano in jo inkubirali v raztopini proti-CK mPt. Po ustrezni barvni reakciji se je pojavilo več obarvanih lis, za katere se je, po analizi s masno spektrometrijo, izkazalo, da ustrezajo citokeratinom CK1, CK2, CK8, CK10 in CK18.

Želeli smo natančneje določiti epitop, ki ga prepozna proti-CK mPt na CK8 in CK18, saj sta v rakavih celicah epiteljskega tkiva še posebej močno izražena. V primeru zadostne afinitete proti-CK mPt do citokeratinov, bi protitelo lahko služilo za dostavo protitumornih učinkovin tumorskim celicam. S tem bi se izognili številnim neželenim učinkom, ki jih učinkovina povzroča na zdrave celice, povečala bi se uspešnost zdravljenja in čas preživetja. Uporaba bi bila mogoča tudi v diagnostiki. Na protitelo, ki se specifično veže le na rakave celice, bi vezali signalni sistem, s katerim bi lahko vizualizirali rakavo tkivo, kar bi nam omogočilo boljšo oceno razširjenosti tumorja, primerno izbiro načina zdravljenja in natančnejšo kirurško odstranitev.

5.1 Preverjanje vezave na rekombinantne CK

Pri našem raziskovalnem delu smo uporabili proti-CK mPt iz predhodno pripravljene hibridomske celične linije. Celice smo gojili do največje gostote in izolirali protitelesa z afinitetno kromatografijo. Pomembna je izbira ustreznega pH elucijskega pufru, saj je izkoristek pri različnih pH različen. Preizkusili smo elucijski pufer pH 2,5 in pH 3,5. Elucija s pufrom pH 3,5 je bila nezadostna, učinkovitejši je bil pufer pH 2,5, s katerim smo uspeli pridobiti zadostno količino protiteles za vsa načrtovana testiranja. Še nižji pH bi lahko povzročil denaturacijo protiteles, postala bi neuporabna.

Da bi dokazali, da se proti-CK mPt veže na rekombinantni CK8, smo izvedli ELISA. Pri eksperimentalnem delu smo kot antigen uporabili človeški rekombinantni protein CK8 podjetja Prospec, izražen v bakteriji *E. coli*. Testiranja smo izvajali z različnimi

koncentracijami protiteles, vendar nismo uspeli odkriti povezave med koncentracijo protitelesa in izmerjeno absorbanco. Ti dve količini bi morali biti sorazmerni, kar bi pomenilo, da se z večanjem količine protiteles veča obseg vezave, s čimer bi dokazali, da proti-CK mPt selektivno prepozna CK8. Naši rezultati ne kažejo na to, saj so nekatere absorbance bolj redčenih protiteles celo višje od manj redčenih, kar je v nasprotju z zgoraj opisano hipotezo. Kot kaže, je prišlo le do nespecifične vezave primarnih ali sekundarnih protiteles na mikrotitrsko ploščico.

Po neuspelih ELISA smo želeli potrditi vezavo na rekombinantni CK8 s prenosom po westernu z uporabo native in NaDS poliakrilamidne gelske elektroforeze. Najprej smo testirali, ali res uporabljamo ustrezen citokeratin. Na elektroferogramu smo opazili liso, ki ustreza velikosti CK8 (53,5 kDa) (Slika 12b). CK8 smo potrdili z označevanjem s komercialno dostopnim proti-CK8 mPt podjetja Abcam, ki zanesljivo prepozna rekombinanten CK8.

Nato smo s prenosom po westernu testirali proti-CK mPt, ki smo jih pripravili sami. Poiskovali smo z različnimi količinami nanesenega CK8 (100 ng in 500 ng). S 100 ng CK8 ni prišlo do obarvanja, kar smo pripisali prenizki količini CK8 (Slika 12a). S 500 ng CK8 je prišlo do šibkega obarvanja lis (Slika 13), ki pa se je pokazalo tudi pri kontrolnem poskusu (Slika 13c), zato smo zaključili, da je pojav lis posledica šibke nespecifične vezave sekundarnih protiteles na antigen CK8. Domnevali smo, da izbira različne vrste blokade lahko vpliva na rezultat, vendar smo to hipotezo s tem poskusom ovrgli, saj je prišlo do enako intenzivne lise ne glede na vrsto blokade. Enake rezultate dobimo, ne glede na to ali za blokado membrane uporabimo mleko ali PBST 0,05 %.

Tudi poskus vezave proti-CK mPt na lizat celic MCF-10 neoT je potrdil, da pojav lis izvira iz nespecifične vezave sekundarnih protiteles. Na membrani se je pojavilo veliko število obarvanih lis zelo različnih velikosti. Če bi naše protitelo specifično prepoznalo katerega od citokeratinov, bi na sliki 14 opazili intenzivno liso. Lizat vsebuje številne proteine različnih velikosti, med drugim tudi CK8. Iz množice lis pa ne moremo z gotovostjo razbrati, pri kateri lisi gre za CK8. Dodaten dokaz, da pojava lis ne gre pripisati vezavi proti-CK mPt, je obarvanje na kontrolni membrani (Slika 14c). Tudi tokrat so se lise obarvale zaradi nespecifične vezave sekundarnih protiteles.

Sklepali smo, da je za vezavo na rekombinantni CK8 potrebna nativna oblika tega proteina in da protitelo prepozna epitop, ki ima prostorsko strukturo. Da bi preverili to domnevo,

smo izvedli nativno PAGE, vendar tudi v tem primeru ni prišlo do vezave protitelesa (Slika 15).

Želeli smo preveriti, če je za potrditev vezave na rekombinantni CK8 potrebna večja količina antigena. Zato smo uporabili tehniko točkovnega nanosa, pri kateri lahko uporabimo večje količine antigena. Po inkubaciji s primarnimi protitelesi smo uporabili sekundarna protitelesa dveh proizvajalcev. Po prvem poskusu (slika 16) je kazalo, da se sekundarna protitelesa proizvajalca Upstate ne vežejo nespecifično, saj v kontrolnem poskusu s temi protitelesi nismo opazili obarvanih točk (slika 16d), medtem ko je pri kontrolnem poskusu s sekundarnimi protitelesi proizvajalca Jackson Immuno Research prišlo do nespecifične vezave (Slika 16c). To domnevo pa smo ovrgli s poskusom, v katerem smo uporabili le sekundarna protitelesa proizvajalca Upstate. (slika 17) Enako močno so se namreč obarvale točke, kjer smo dodali primarno protitelo in kjer ga nismo (slepi poskus). Vzrok za vse dobljene lise je torej nespecifična vezava sekundarnega protitelesa na CK8, proti-CK mPt pa ne prepoznavajo uporabljenih antigenov.

Domnevali smo, da epitop za proti-CK mPt leži na intermediarnem filamentu iz para CK8 in CK18. Protitelo bi namreč lahko prepoznavalo epitop, sestavljen iz aminokislin CK8 in CK18, ki so si v heterodimeru CK8/CK18 prostorsko blizu. Zato smo *in vitro* pripravili IF CK8/CK18 po postopku Hatzfeld in sodelavci (12), opravili prenos western in barvali z ustreznimi protitelesi. S proti-CK mPt ni prišlo do obarvanja membrane, torej se ne vežejo na kompleks CK8/CK18. Kot kaže, se proti-CK mPt na tak način z epitopom ne morejo vezati. Šibko obarvane lise smo opazili le na membrani, ki je bila inkubirana s komercialnim proti-CK8 mPt (Abcam), ne pa na kontrolni membrani. To protitelo dokazano prepozna rekombinantni CK8. V raztopini kompleksa CK8/CK18 je gotovo ostala tudi monomerna oblika CK8, saj izkoristek reakcije rekonstitucije CK8/CK18 po postopku Hatzfeld in sodelavci (12) ni bil 100 %. Obarvana lisa, ki smo jo opazili po inkubaciji s komercialnim proti-CK8 mPt, je torej posledica vezave na monomerni rekombinanten CK8.

Zaključili smo, da proti-CK mPt ne prepozna uporabljenih antigenov, ker:

- I. blokada prekrije tudi epitop na antigenu, zato se primarno protitelo ne veže na antigene
- II. protitelo proti-CK mPt se morda veže na bolj kompleksen epitop.
- III. Heterodimer, ki ga tvorita rekombinantna CK8 in CK18, ne tvori epitopa, ki se nahaja na nativnih proteinih.

Vezava na oktapeptide

Doljak in sodelavci (15) so s pomočjo računalniškega programa ClustalW XXL naredili poravnavo AK zaporedij petih citokeratinov (CK1, CK2, CK8, CK10 in CK18), ki jih prepozna proti-CK mPt in določili zaporedje AK, ki se pri vseh petih CK popolnoma ali v zelo velikem deležu ujema. Na podlagi ujemanj AK, so izbrali končni peptid s 27 AK. Tega so razdelili v tri dodekapeptide, katerih zaporedja se deloma prekrivajo. S pomočjo ELISA so ugotovili, da proti-CK mPt prepozna le dodekapeptid, ki izvira iz sredinskega dela peptida, dolgega 27 AK (VKIALEVEIATY).

Dodekapeptid, katerega proti-CK mPt prepozna, smo razdelili v tri oktapeptide, da bi natančneje določili epitop:

VKIALEVEIATY – oktapeptid A – prvih 8 AK

VKIALEVEIATY – oktapeptid B – zadnjih 8 AK

VKIALEVEIATY – oktapeptid C – srednjih 8 AK

Z ELISA (Preglednica XX) smo ugotovili, da proti-CK mPt bistveno bolje prepozna posamezne oktapeptide od kontrolnega protitelesa proti stefinu B. Iz grafa 1 je razvidno, da je najboljša vezava na peptida A in C, medtem ko je na peptid B vezava slabša, ampak še vedno 2x boljše od kontrolnega protitelesa proti stefinu B. Očitno je, da omenjeni oktapeptidi bolje ponazarjajo epitop na citokeratinih, ki ga prepozna proti-CK mPt kot rekombinantni proteini.

Peptide A, B in C bi lahko uporabili za prileganje (docking) na prostorski model proti-CK mPt in s tem *in silico* potrdili ter kvantificirali interakcijo oktapeptidov in protitelesa.

5.2 Modeliranje proti-CK mPt

Na podlagi AK zaporedja variabilne regije monoklonskega protitelesa proti citokeratinom smo s pomočjo raziskovalcev na Univerzah v Bathu in San Franciscu pripravili dva prostorska modela. Ker sta bila modelirana neodvisno, se nekoliko razlikujeta. S prekrivanjem obeh modelov smo ugotovili, da se lahki verigi v povprečju razlikujeta za 0,1094 nm, težki pa za 0,1831 nm. Največ razlik je v strukturah vseh CDR regij in na površini protitelesa, saj je tu najmanj steričnih ovir, ki bi te predele sidrale v stabilni konformaciji. Jedro protitelesa pa je z obema metodama zelo podobno modelirano, saj so ti predeli dobro sidrani zaradi vpliva sosednjih skupin. (Slika 19, 20)

Ocena pravilnosti modela modeliranega s pomočjo strežnika WAM

Poiskali smo AK zaporedje podlage, ki je bila uporabljena za modeliranje s prileganjem in ki se je od vseh uporabljenih podlag najbolj ujemala v AK zaporedju s proti-CK mPt. Izvedli smo prileganje z programom ClustalW XXL in prešteli, koliko AK je identičnih (Slika 21, Slika 22) in izračunali % ujemanja. Iz preglednice XXI smo ocenili, da je RMSD za lahko verigo med 0,1 nm in 0,2 nm, za težko verigo pa med 0,3 nm in 0,4 nm. Za natančno modeliranje sidranja antigena na aktivno mesto protitelesa bi morali modele še dodatno izboljšati, da bi zmanjšali napake, predvsem v CDR regijah.

5.3 Zaključek

V diplomski nalogi smo obravnavali vezavo monoklonskih protiteles proti-CK mPt na človeška rekombinantna citokeratina 8 in 18 ter na njun heterodimer. Z ELISA in prenosom western na nitrocelulozno membrano smo dokazali, da se protitelesa ne vežejo niti na rekombinantne citokeratine tipa 8 in 18, niti na kompleks iz teh dveh citokeratinov. Pozitivni rezultati z oktapeptidi kažejo na to, da se epitop lahko nahaja na preostalih CK (CK1, CK2 in CK10), ali pa da je le-ta kompleksne narave in zavzema le določene aminokislinske preostanke v kompleksu CK8/CK18. Očitno je, da oktapeptid, izpeljan iz AK zaporedja omenjenih citokeratinov, bolje ponazarja tak epitop. Protitelo bi lahko uporabili v diagnostične namene ali za ciljno dostavo protitumornih učinkovin celicam, ki izražajo povišan nivo citokeratinov.

Pri tem bi nam bil lahko v pomoč računalniški model protitelesa, ki bi ga uporabili za simulacijo vezave epitopa ali pa vezave podobnih peptidov.

6. Sklepi

Pri našem delu smo prišli do naslednjih sklepov:

1. Protitelesa proti citokeratinom se ne vežejo niti na rekombinantne citokeratine tipa 8 in 18, niti na kompleks iz teh dveh citokeratinov.
2. Epitop se lahko nahaja na preostalih vrstah citokeratinov ali pa je le-ta kompleksne narave in zavzema le določene aminokislinske preostanke v kompleksu citokeratina 8 in 18.

S tem smo dosegli namen diplomske naloge.

7. Literatura

1. Ishikawa H, Bischoff R, Holtzer H: Mitosis and intermediate-sized filaments in developing skeletal muscle. *The Journal of cell biology*. 1968; 38: 538–555
2. Herrmann H, Haner M, Brettel M, Ku N, Aebi U: Characterization of distinct early assembly units of different intermediate filament proteins. *Mol. Biol.* 1999; 286: 1403-1420
3. Parry D A, Strelkov S V, Burkhard P, Aebi U, Herrmann H: Towards a molecular description of intermediate filament structure and assembly. *Experimental cell research*. 2007; 313: 2204–2216
4. Moll R, Franke W W, Schiller D L, Geiger B, Krepler R: The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell*. 1982; 31: 11–14.
5. Schweizer J, Bowden P E, Coulombe P A, Langbein L, Lane E B, Magin T M, Maltais L, Omary M B, Parry D A D, Rogers M A, and Wright M W: New consensus nomenclature for mammalian keratins. *J Cell Biol.* 2006; 17: 169–174
6. http://www.mubio.com/frameset2/antibodies/body_cytokeratins.htm (dostopano december 2008)
7. Hatzfeld M, Franke W W: Pair formation and promiscuity of cytokeratins: Formation in vitro of heterotypic complexes and intermediate-sized filaments by homologous and heterologous recombinations. *J Cell Biol.* 1985; 101: 1826-1841
8. <http://www.molecularexpressions.com/cells/intermediatefilaments/intermediatefilaments.html> (dostopano december 2008)
9. Bader B L, Magin T M, Freudenmann M, Stumpp S, and Franke W: Intermediate filaments formed de novo from tail-less cytokeratins in the cytoplasm and in the nucleus. *J Cell Biol.* 1985; 115: 1293-1307
10. Gill S R, Wong P C, Monteiro M J, Cleveland D W: Assembly properties of dominant and recessive mutations in the small mouse neurofilament. (NF-L) subunit. *J Cell Biol.* 1990; 111: 2005-2019
11. Wong P C, Cleveland D W: Characterization of dominant and recessive assembly defective mutations in mouse neurofilament. *J. Cell Biol.* 1990; 111: 1987-2003

12. Hatzfeld M, Franke W W: Pair formation and promiscuity of cytokeratins: Formation in vitro of heterotypic complexes and intermediate-sized filaments by homologous and heterologous recombinations. *J Cell Biol.* 1985; 101: 1826-1841
13. Moll R, Divo M, Langbeinurified L: The human keratins: biology and pathology. *Histochem Cell Biol.* 2008; 129(6): 705–733.
14. Ramos-Vara J A: Technical aspects of immunohistochemistry. *Vet Pathol.* 2005; 42: 405–426
15. Doljak B, Obermajer N, Jamnik P, Kos J: Monoclonal antibody to cytokeratin VKIALEVEIATY sequence motif reduces plasminogen activation in breast tumour cells. *Cancer Lett.* 2008; 267: 75-84
16. Barak V, Goike H, Panaretakis K W, Einarsson R: Clinical utility of cytokeratins as tumor markers. *Clinical Biochemistry.* 2004; 37: 529-540
17. Buccheri G, Torchio P, Ferrigno D: Clinical equivalence of two cytokeratin markers in non-small cell lung cancer. *Chest* 2003; 124: 622-632
18. Linder S, Mandic Havelka A, Ueno T, Shoshan M C: Determining tumor apoptosis and necrosis in patient serum using cytokeratin 18 as a biomarker. *Cancer letters.* 2004; 214: 1-9
19. Stern M, Herrmann R: Overview of monoclonal antibodies in cancer therapy: present and promise. *Elsevier health.* 2005; 54: 11-29
20. <http://academic.brooklyn.cuny.edu/biology/bio4fv/page/aviruses/immune-system-part.html> (dostopano december 2008)
21. Strašek B: Imunokemijsko določanje katepsina B v tumorskih celičnih linijah B16 in MCF neoT, Diplomaska naloga, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani, Ljubljana, 1999
22. Vozelj M.: Temelji imunologije, DZS, Ljubljana 2000, 60-62
23. Köhler G, Milstein C: Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature.* 1975; 256 : 495–497
24. Vozelj M.: Temelji imunologije, DZS, Ljubljana 2000, 66-71
25. <http://pathmicro.med.sc.edu/mayer/IgStruct2000.htm> (dostopano december 2008)
26. Beketič-Oreskovič L, Sarcevič B, Malenica B, Novak D: Immunocytochemical reactivity of a mouse monoclonal antibody CDI 315 raised against human breast carcinoma. *Neoplasma.* 1993; 40: 69-74

27. Kopitar-Jerala N, Bestagnol M Fan X, Novak-Despot D, Burrone O, Kos J, Skrk J, Gubenšek F: Molecular cloning and chimerisation of CDI315 monoclonal antibody. *Eur J Physiol.* 2000; 439: 79-80
28. Lengauer T, Zimmer R: Protein structure prediction methods for drug design. *Briefings in bioinformatics.* 2000; 3: 275-278
29. http://en.wikipedia.org/wiki/X-ray_crystallography (dostopano februar 2009)
30. http://en.wikipedia.org/wiki/Protein_NMR (dostopano februar 2009)
31. Bernasconi A, Segre A M: Ab initio methods for protein structure prediction: A new technique based on ramachandran plots. *ERCIM News.* 2000; 43
32. Zhang Z: An Overview of Protein Structure Prediction: From Homology to Ab Initio. Final Project For Bioc218, Computational Molecular Biology, dostopno na spletu februar 2009: [http://biochem218.stanford.edu/Projects %202003/Zhang.pdf](http://biochem218.stanford.edu/Projects%202003/Zhang.pdf)
33. <http://boinc.bakerlab.org/rosetta/> (dostopano februar 2009)
34. Whitelegg R J, Rees A R: WAM: an improved algorithm for modelling antibodies on the WEB. *Protein engineering.* 2000; 13: 819-824
35. http://swissmodel.expasy.org/SM_LikelyPrecision.html#Table (dostopano februar 2009)
36. Breznik M, Kmetec V, Kreft S, Kristl A, Osredkar J, Planinšek O, Pukl M, Urleb U, Zega A, Kikelj D: Vaje iz instrumentalne farmacevtske analize. Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2003: 31-36
37. Crowther R. J: ELISA, Theory and Practice, Institut for animal health, Woking, UK, 1995: 35-41
38. <http://veterinarji06.zverinice.com/Kemija/vaje/Elektroforeza.doc> (dostopano februar 2009)