

ZÁPADOČESKÁ UNIVERZITA V PLZNI
FAKULTA ZDRAVOTNICKÝCH STUDIÍ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2022

Klára Mičkeová

FAKULTA ZDRAVOTNICKÝCH STUDIÍ

Studijní program: B0914P3600004 Laboratorní diagnostika ve zdravotnictví

Klára Mičkeová

Studijní obor: Laboratorní diagnostika ve zdravotnictví

Ověřování protilátek pro imunohistochemické stanovení

Bakalářská práce

Vedoucí práce: Ing. Tomáš Vlas

PLZEŇ 2022

ZÁPADOČESKÁ UNIVERZITA V PLZNI

Fakulta zdravotnických studií

Akademický rok: 2021/2022

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Klára MIČKEOVÁ**
Osobní číslo: **Z19B0077P**
Studijní program: **B0914P360004 Laboratorní diagnostika ve zdravotnictví**
Téma práce: **Ověřování protilátek pro imunohistochemické stanovení**
Zadávající katedra: **Katedra záchranářství, diagnostických oborů a veřejného zdravotnictví**

Zásady pro vypracování

Zpracovat seznam odborné literatury na vybrané téma
Stanovit cíl kvalifikační práce
Zpracovat teoretickou a praktickou část práce dle požadavků FZS
Popsat metodiku praktické části
Vypracovat diskuzi a závěr kvalifikační práce
Dodržet formální úpravu kvalifikační práce dle požadavků FZS
Dodržet citační normu

Rozsah bakalářské práce:
Rozsah grafických prací:
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

- BARTŮŇKOVÁ, HOŘEJŠÍ. Základy imunologie – 5. vydání. TRITON s.r.o., 2013. 330 s. ISBN 978-80-7387-713-2.
- KREJSEK, Jan, ANDRÝS, Ctirad, KRČMOVÁ, Irena. Imunologie člověka. 1. vydání. Hradec Králové. Garamon s.r.o., 2016. 495 s. ISBN 978-80-86472-74-4.
- BERANOVÁ, Milena, TOLAR, Zbyněk. Principy a příklady imunohistochemie [online]. Plzeň. 2002. Dostupné z: http://histologie.lfp.cuni.cz/education/guides/ihc_hi_res.pdf
- LUKÁŠ, Zdeněk, a další. Základy histopatologických vyšetřovacích metod [online]. 2008. Dostupné z: <https://atlases.muni.cz/atlases/stud/pdf/histemet.pdf>
- TAYLOR, Clive R., RUDBECK, Lars. Immunohistochemical Staining Methods [online]. 2013. Dostupné z https://www.agilent.com/cs/library/technicaloverviews/public/08002_ihc_staining_methods.pdf

Vedoucí bakalářské práce:

Ing. Bc. Tomáš Vlas

Katedra záchranářství, diagnostických oborů
a veřejného zdravotnictví

Datum zadání bakalářské práce: **17. června 2020**

Termín odevzdání bakalářské práce: **31. března 2022**



PhDr. Lukáš Štich, MBA
děkan



Mgr. Stanislava Reichertová
vedoucí katedry

V Plzni dne 31. ledna 2022

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval/a samostatně a všechny použité prameny jsem uvedl/a v seznamu použitých zdrojů.

V Plzni dne 31. 3. 2022.

.....

vlastnoruční podpis

Abstrakt

Příjmení a jméno: Mičkeová Klára

Katedra: Katedra záchranářství, diagnostických oborů a veřejného zdravotnictví

Název práce: Ověřování protilátek pro imunohistochemické stanovení

Vedoucí práce: Ing. Tomáš Vlas

Počet stran – číslované: 44

Počet stran – nečíslované: 61

Počet příloh: 2

Počet titulů použité literatury: 24

Klíčová slova: nepřímá imunofluorescence, protilátka, imunohistochemie, průtoková cytometrie, imunofluorescence, PCNA

Souhrn:

Tato práce se zabývá detekcí vazby několika druhů monoklonálních protilátek, s hlavním zaměřením na anti-PCNA protilátku. Ověřování funkčnosti protilátek bylo provedeno několika metodami, které jsou schopné zobrazit či kvantifikovat vazbu dané protilátky. Schopnost vazby anti-PCNA protilátky se lišila mezi jednotlivými metodami. Skupina protilátek proti cytokeratinům vykazovala vždy pozitivitu, naopak u protilátek anti-alfa/beta tubulin dimerů byl vždy negativní výsledek (protilátky se nebyly schopny navázat na hledaný antigen).

Abstract

Surname and name: Mičkeová Klára

Department: Department of Rescue Services, Diagnostic Fields and Public Health

Title of thesis: Validation of antibodies used for immunohistochemistry

Consultant: Ing. Tomáš Vlas

Number of pages – numbered: 44

Number of pages – unnumbered: 61

Number of appendices: 2

Number of literature items used: 24

Keywords: indirect immunofluorescence, antibody, immunohistochemistry, flow cytometry, PCNA, antibodies validation

Summary:

This bachelor thesis is focused on detecting and validating bonds of different types of monoclonal antibodies, mainly on the anti-PCNA antibody. The validation process of these antibodies has been done using several methods, which can show or quantify the bond of the antibody-antigen complex.

The bonding ability of the anti-PCNA antibody differed between methods used. The antibody group against cytokeratins always showed positive results. Antibodies against alpha/beta tubulin dimers showed no signs of bonding with the antigen (negative results).

Předmluva

Účelem mé práce bylo ověřování vazby protilátek pro jejich následující využití v provozu laboratoře. Dané monoklonální protilátky lze aplikovat pro různé laboratorní metody, já jsem se ve své praktické části nejvíce zaměřovala na imunofluorescenci. Ověření vazby protilátek se provádí k nalezení optimálního postupu pro jejich používání v praxi.

Poděkování

Mé poděkování patří panu Ing. Tomáši Vlasovi za odborné vedení práce, poskytování rad, materiálních podkladů a za vstřícnost při konzultacích. Kvalifikační práce byla financována firmou EXBIO Praha a.s.

OBSAH

SEZNAM OBRÁZKŮ	12
SEZNAM TABULEK	13
SEZNAM ZKRATEK	14
ÚVOD.....	15
TEORETICKÁ ČÁST	16
1 SLOŽKY IMUNITNÍHO SYSTÉMU.....	16
1.1 Protilátky	16
1.1.1 Monoklonální protilátky	17
1.2 Antigen	17
2 IMUNOHISTOCHEMIE.....	18
2.1 Základní definice a princip	18
2.1.1 Přímá metoda.....	18
2.1.2 Nepřímá (dvoustupňová) metoda	18
2.2 Historie imunohistochemie.....	19
2.3 Imunofluorescence (IF)	19
2.3.1 Fluorescence	19
2.3.1 Imunofluorescence.....	20
2.4 IF přímá	20
2.4.1 Uplatnění přímé IF.....	20
2.4.2 Zpracování vzorku pro přímou IF	20
2.5 IF nepřímá.....	20
2.5.1 Uplatnění nepřímé IF.....	21
2.5.2 Postup pro nepřímou IF	21
2.6 Průtoková cytometrie.....	21
2.6.1 Princip metody.....	22
2.6.2 Odečítání výsledků, grafické znázornění populací.....	22
2.6.3 Využití průtokové cytometrie	22
3 PCNA (PROLIFERATING CELL NUCLEAR ANTIGEN, PROLIFERAČNÍ BUNĚČNÝ JADERNÝ ANTIGEN).....	23
3.1 Funkce PCNA.....	23
3.2 Struktura PCNA.....	23
3.2.1 Průkaz PCNA antigenu.....	24
3.2.2 Průkaz anti-PCNA protilátky nepřímou IF.....	24
4 PROTEINY CYTOSKELETU	25
4.1 Cytokeratiny	25
4.1.1 Cytokeratin 18	26

4.2	Mikrotubuly	26
4.2.1	Složení mikrotubulu	26
4.2.2	Funkce mikrotubulů.....	26
4.2.3	Inhibitory mikrotubulů	26
5	OVĚŘOVÁNÍ PROTILÁTEK	27
5.1	Úskalí ověřování protilátek pro ICH	27
5.1.1	Preanalytické faktory	27
5.1.2	Analytické faktory	28
5.1.3	Postanalytická fáze	29
	PRAKTICKÁ ČÁST	30
6	CÍL A ÚKOLY PRÁCE	30
6.1	Hlavní cíl	30
6.2	Dílčí cíle	30
7	VÝZKUMNÉ PROBLÉMY/OTÁZKY	31
8	CHARAKTERISTIKA SLEDOVANÉHO SOUBORU	32
8.1	Využité substráty pro detekci vazby protilátek	32
8.2	Charakteristika využitých protilátek.....	32
9	METODIKA PRÁCE	33
9.1	Ověřování vazby protilátek metodou imunofluorescence	33
9.1.1	Postupy pro ověření vazby anti-PCNA protilátky:.....	33
9.1.2	Postup pro ověření ostatních protilátek:	36
9.2	Ověřování vazby anti-PCNA protilátek průtokovou cytometrií.....	37
9.3	Ověřování vazby anti-PCNA protilátky ve stimulovaných lidských lymfocytech ..	37
10	ANALÝZA A INTERPRETACE VÝSLEDKŮ	39
10.1	Ověřování vazby anti-PCNA protilátky:	39
10.2	Ověřování vazby anti-cytokeratins protilátky	43
10.3	Ověřování vazby anti-cytokeratin 18 protilátky.....	45
10.4	Ověřování vazby anti-alfa/beta tubulin dimer protilátky	47
10.5	Ověřování vazby anti-PCNA protilátek průtokovou cytometrií.....	48
10.6	Ověřování vazby anti-PCNA protilátky na stimulovaných lidských lymfocytech ..	49
10.7	Ověřování vazby anti-PCNA protilátek metodou imunoblotu	49
	DISKUZE	50
	ZÁVĚR.....	52
	Souhrnné tabulky s hodnocením vazby protilátek.....	53
11	SEZNAM LITERATURY	55
	SEZNAM OBRÁZKŮ	58
	SEZNAM PŘÍLOH	59

PŘÍLOHY	61
Příloha A a B – Výsledky imunoblotu (detekce anti-PCNA protilátek)	61

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1.....	17
Obrázek 2.....	17
Obrázek 3.....	19
Obrázek 4.....	23
Obrázek 5.....	26
Obrázek 6.....	39
Obrázek 7.....	39
Obrázek 8.....	40
Obrázek 9.....	40
Obrázek 10.....	41
Obrázek 11.....	41
Obrázek 12.....	42
Obrázek 13.....	42
Obrázek 14.....	43
Obrázek 15.....	43
Obrázek 16.....	44
Obrázek 17.....	44
Obrázek 18.....	45
Obrázek 19.....	45
Obrázek 20.....	46
Obrázek 21.....	46
Obrázek 22.....	47
Obrázek 23.....	46
Obrázek 24.....	47
Obrázek 25.....	48
Obrázek 26.....	49
Obrázek 27.....	49
Obrázek 28.....	50

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1, anti-PCNA:	53
Tabulka 2, anti-PCNA:	53
Tabulka 3, anti-PCNA:	53
Tabulka 4, anti-PCNA:	53
Tabulka 5, anti-PCNA:	54
Tabulka 6, anti-PCNA:	54
Tabulka 7, anti-cytokeratins:	54
Tabulka 8, anti-cytokeratin 18:.....	54
Tabulka 9, anti-alfa/beta tubulin dimer:	54

SEZNAM ZKRATEK

ANA.....	Antinukleární protilátky
ASMA	Protilátky proti hladké svalovině (anti smooth muscle antibodies)
IF	Imunofluorescence
IIF	Imunofluorescence nepřímá
ICH	Imunohistochemie
Ig	Imunoglobulin
FBS	Fetální hovězí sérum (fetal bovine serum)
FITC.....	Fluoresceinizoithiokyanát
GIT.....	Gastrointestinální trakt
SLE.....	Systémový lupus erythematodes
PBS	Fosfátový pufr (phosphate buffered saline)
PCNA.....	Proliferační buněčný jaderný antigen (proliferating cell nuclear antigen)
PHA	Phytohaemagglutinin

ÚVOD

Monoklonální protilátky představují nedílnou součást nespočtu imunohistochemických laboratorních metod. Daly rozvoj rychlé a citlivé detekci požadovaných struktur v tkáních či jiných analytech, což je nepostradatelný prvek mnoha diagnostických a screeningových metod, nejen ve zdravotnictví.

V imunologické a alergologické laboratoři mají své uplatnění při diagnostice autoimunitních onemocnění či jiných defektů imunitního systému, a to převážně metodou nepřímé imunofluorescence. Ke stanovení počtu a správné funkce jednotlivých složek imunitního systému se používá zejména průtoková cytometrie, se svojí pestrou škálou diagnostických setů protilátek.

TEORETICKÁ ČÁST

1 SLOŽKY IMUNITNÍHO SYSTÉMU

Imunitní systém můžeme rozdělit na dvě velké skupiny: nespecifickou a specifickou (adaptivní) část. Obě části imunity vzájemně spolupracují a jsou důležité pro spuštění a průběh efektivní imunitní odpovědi.

Nespecifická i specifická imunita má svojí buněčnou a humorální složku.

Do humorální složky nespecifické imunity řadíme komplementový systém, interferony a další sérové proteiny. Buněčná součást nespecifické imunity je tvořena buňkami schopnými fagocytovat a tzv. přirozenými zabíječi (NK buňky).

Humorální komponentu specifické imunity představují protilátky produkované plazmatickými buňkami. T lymfocyty řadíme do buněčných mechanismů adaptivních. (1)

1.1 Protilátky

Imunoglobuliny (Ig) jsou proteiny syntetizovány plazmatickými buňkami (konečné vývojové stadium B lymfocytů). Náleží do humorální složky specifické imunity. Imunoglobuliny mají charakteristickou strukturu: dva těžké (H) a dva lehké (L) řetězce. Těžké řetězce jsou kovalentně pospojovány disulfidickými můstky, stejný typ vazby je i mezi H a L řetězci. Každý řetězec imunoglobulinu se skládá z variabilní (V) a konstantní (C) domény. Konstantní domény na těžkém řetězci rozdělují imunoglobuliny na třídy: IgM, IgD, IgG (podtřídy IgG1 – IgG4), IgA (podtřídy IgA1 – IgA2) a IgE. Variabilní domény se u jednotlivých imunoglobulinů svojí strukturou odlišují. Variabilní domény na těžkém a lehkém řetězci jsou vazebná místa pro antigeny. (1)

Další podstatnou oblastí na protilátkách je Fc fragment, kterým se protilátky váží na buněčný povrch či na komplementový protein C1. Při proteolytickém rozštěpení enzymem papianem in vitro získáme dva identické fragmenty imunoglobulinu zvané Fab, každý obsahující jedno místo pro vazbu antigenu. (1)

1.1.1 Monoklonální protilátky

Od klasických (polyklonálních) protilátek sekretovaných fyziologicky se odlišují specifitou vazebného místa. Variabilní část u monoklonálních protilátek je namířena pouze na jeden určitý epitop antigenu. (1)

Příprava in vitro:

Imunizací zvířete (nejčastěji myši) požadovaným antigenem se získá specifický klon plazmatických buněk. Dále se provede fúze odebraných buněk s buňkami myelomu. Takto vytvořené buněčné kultury se rychle dělí a produkují stejný izotyp protilátek jako původní B lymfocyt. Imunoglobuliny jsou jedné třídy a utváří vazby pouze s jedním specifickým epitopem na antigenu. (1)

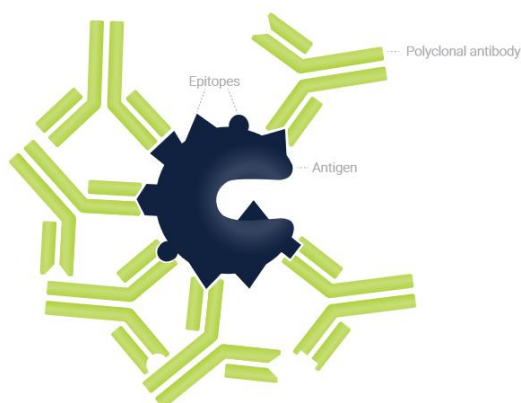
In vivo:

V organismu dochází k tvorbě monoklonálních protilátek za patologických okolností, a to v přítomnosti tzv. plazmocytomu (myelom). Jedná se o nádor z plazmatických buněk, takto chorobně pozměněné buňky se nekontrolovatelně množí a produkují specifické protilátky jednoho izotypu. (1)

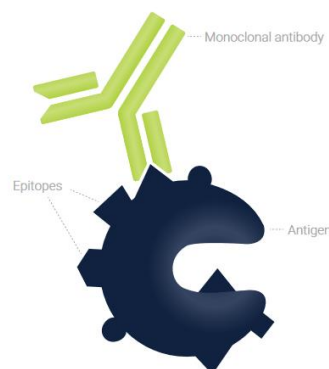
1.2 Antigen

Jako antigen se označuje látka rozpoznána imunitním systémem jako cizí, spouští mechanismy imunitní odpovědi. Malá část antigenu nazývaná epitop je místem vazby pro protilátky. Antigen může mít na svém povrchu mnoho různých epitopů. Komplexy antigenu a protilátky se nazývají imunokomplexy. Nejčastěji jsou antigeny z vnějšího prostředí – cizorodé. Antigeny vyskytující se v organismu nejsou cizorodé, označují se jako autoantigeny. (1)

Obrázek 1. Polyklonální protilátky



Obrázek 2. Monoklonální protilátka



2 IMUNOHISTOCHEMIE

2.1 Základní definice a princip

Imunocytochemie, ICH:

Imunohistochemie je souhrn metod využívajících imunologické principy ke studiu a zobrazení buněk či tkání. Prvotním krokem pro zvýraznění určitých struktur v tkáních je vytvoření komplexů antigen-protilátka. Dalšími postupy se pak tyto komplexy dají zviditelnit. K pozorování daných struktur se využívá světelný či fluorescenční mikroskop.

Ve vzorku tkáně můžeme hledat určité antigeny a používat specifické protilátky proti nim namířené, nebo je žádoucí najít protilátky v séru namířené proti určitým antigenům vyskytujících se v (na) buňkách.

Průkaz protilátek v séru se provádí za pomoci tkáňových řezů (typ tkáně závisí na druhu stanovení). Na buňky se nanese sérum, a jsou-li v něm přítomné hledané protilátky, naváží se na antigeny, proti kterým jsou namířeny. Přítomnost vzniklých vazeb se vizualizuje, nejčastěji fluorochromy.

Pro průkaz antigenů pomocí protilátky i průkazu protilátek v séru je potřeba použít látku schopnou zachytit přítomnost vytvořených imunokomplexů. V případě imunofluorescence se využívají k detekci fluorochromy. V běžné ICH jsou to enzymy (nejčastěji peroxidáza či alkalická fosfatáza).

Imunohistochemické metody můžeme rozdělit na přímé a nepřímé. (2)

2.1.1 Přímá metoda

Protilátka značena fluorochromem či enzymem se přímo váže na hledaný antigen. (3)

2.1.2 Nepřímá (dvoustupňová) metoda

Na hledaný antigen se naváže specifická primární protilátka bez značky. Ve druhém kroku se přidá sekundární protilátka se značkou, která se naváže na primární protilátku. (3)

2.2 Historie imunohistochemie

První cestou ke zviditelnění tkáňových struktur byla v 40. letech minulého století protilátka značená fluorochromem s využitím fluorescenční mikroskopie. O dvacet let později se vyvinula metoda s protilátkami vázaných na enzymy, kde se používá optický mikroskop.

V roce 1975 vyvinuli Köhler a Milstein postup k získání monoklonálních protilátek z hybridních buněk. Tento objev byl velkým průlomem v metodách ICH. Začaly se hojně využívat, docházelo k rychlému pokroku a objevování nových postupů. Monoklonální protilátky hrají klíčovou roli v rozvoji ICH a její úlohu v diagnostice nádorových onemocnění. (4)

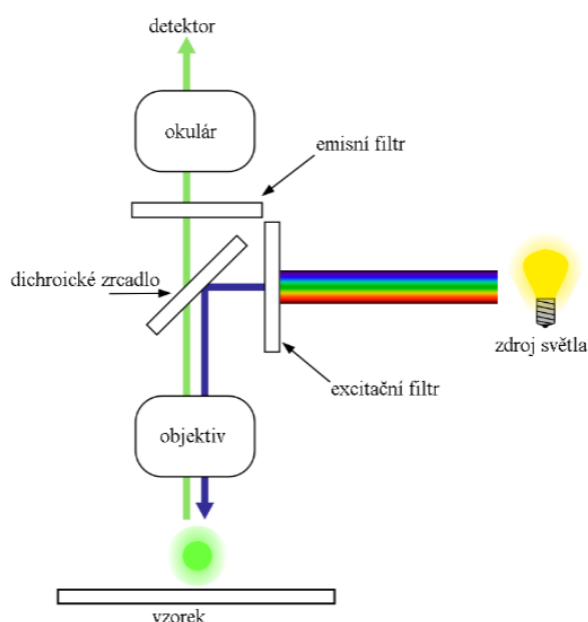
2.3 Imunofluorescence (IF)

2.3.1. Fluorescence

Fluorescence je založena na absorpci záření o určité vlnové délce, kdy elektrony přejdou do vyšších energetických vrstev, a emisi monochromatického záření s nižší energií (delší vlnové délce než původní záření), po přechodu elektronů do základního energetického stavu, tzv. Stokesův posun. Emise přetrvává pouze po dobu, kdy je látka vystavena danému záření (10^{-8} až 10^{-5} s). V imunofluorescenci se používá fluorescenční mikroskop, jehož zdroj světla je halogenová žárovka (např. rtuťová výbojka) nebo LED dioda. (5)

System excitačních filtrů a zrcadel vyčlení pouze požadovanou část světla (část spektra nezbytnou k excitaci), v tomto případě

Obrázek 3. Schéma fluorescenčního mikroskopu



modré záření (495 nm). Vzorek modré záření absorbuje, fluorescenční látka přejde do stavu s vyšší energií a poté jí uvolní při následném přechodu na základní energetickou hladinu. Tímto dojde k emisi určitého spektra záření (okem viditelné zelené záření, 520 nm), které má nižší energii než modré záření. Emisní filtr propouští pouze emisní část spektra, ostatním vlnovým délkám zabraňuje v průchodu. (5)

2.3.1 Imunofluorescence

IF je jednou z imunohistochemických technik, která využívá k zobrazení daných struktur monoklonální protilátky značené fluorescenčním barvivem (tzv. fluorochrom, nejčastěji FITC – fluoresceinizothiokyanát). Zviditelnit lze rozličné množství struktur a jednotlivých antigenů na celých tkáňových řezech či jednotlivých buňkách. (6)

Imunofluorescence našla uplatnění v mnoha vědních oborech. Slouží k diagnostice široké škály onemocnění, lze ji využít i na poli výzkumu, a to nejen v medicíně.

2.4 IF přímá

Tato metoda se používá k detekci antigenů v buňkách (různé proteiny, stavební prvky buněk, orgány, patogenní proteiny...). Protilátka konjugovaná s fluorochromem se přímo váže na hledaný antigen. (7)

2.4.1 Uplatnění přímé IF

Přímá IF je podobně jako nepřímá IF využívána k diagnostice autoimunitních onemocnění kůže, onemocnění pojivové tkáně nebo ledvin. Provádí se diagnostika např. autoimunitního puchýřnatého onemocnění skupiny pemphigus, či zánětlivých onemocnění krevních cév nebo diagnostika SLE. Nejčastěji se prokazují patologická ložiska imunoglobulinů či složek komplementu (C3) nahromaděné ve tkáních. (7)

2.4.2 Zpracování vzorku pro přímou IF

Vzorek tkáně pacienta získaný při biopsii se transportuje zmražený v tekutém dusíku do laboratoře, kde se na mikrotomu zhotoví histologické řezy, které se poté zpracují dle správného operačního postupu pro přímou IF. Důležitá je inkubace ve tmě po přidání protilátky s fluorochromem. (7)

2.5 IF nepřímá

Nepřímá IF je využívána k detekci specifických protilátek v séru pacienta, zejména autoprottilátek. Využívají se dvě sady protilátek – primární a sekundární. Primární protilátka se váže na hledaný imunoglobulin a sekundární protilátka (značená fluorochromem) se poté naváže na primární protilátku, proti které je namířena. (5)

2.5.1 Uplatnění nepřímé IF

Metoda se používá v imunologii a věnuje se především diagnostice autoimunitních onemocnění (výskytu autoprotilátek v séru pacienta), určení její závažnosti a sledování průběhu léčby pacientů. Nejčastěji se diagnostikují autoimunitní onemocnění kůže či pojivové tkáně (SLE, pemphigus, polymyozitida, ...). (8)

2.5.2 Postup pro nepřímou IF

Sérum pacienta se zředí a nanese na speciální mikroskopické sklíčko obsahující jamky potažené HEp-2 buňkami. V tomto kroku se na dané antigeny naváží autoprotilátka, vyskytují-li se v séru. V druhém kroku se přidá konjugát (sekundární protilátka) s fluorescenční látkou (FITC) pro zviditelnění vzniklých imunokomplexů. (8)

HEp-2 je buněčná linie získaná z karcinomu hrtanu. Mohou se použít i sklíčka potažené jinými buňkami. Další antigenní substrát může být prvok *Crithidia luciliae* (detekce dsDNA), neutrofilní granulocyty (ANCA – detekce antigenů cytoplazmy neutrofilů), či zvířecí buňky (potkaní ledviny, opičí jícen, krysí játra). Pro experimentální či výzkumné účely lze vytvořit sklíčka potažené jakýmikoliv buňkami. (8)

V pozitivním případě sledujeme pod fluorescenčním mikroskopem charakteristické zelené světlo o různé intenzitě. Pro správné porovnání se do jedné jamky nanese pozitivní kontrola a do další negativní kontrola. Dle použitého typu protilátky je zobrazena daná struktura. Existuje mnoho typů fluorescence (zrnitá, homogenní, nukleární, centromerová ...), rozličné množství protilátek (antinukleární, proti cytoplazmě neutrofilů, antimitochondriální, proti cytoskeletu, ...). Určitý typ fluorescence je charakteristický pro daný typ autoimunitní choroby a intenzita záření poukazuje na závažnost choroby. IIF je metodou velmi subjektivní, pro hodnocení výsledků je třeba zkušeného laboratorního pracovníka, odečítání výsledků je však možno i automatizovat. (5, 8)

Ve své práci jsem se věnovala průkazu PCNA, detekci cytokeratinů, cytokeratinu 18 a alfa/beta dimerům mikrotubulů.

2.6 Průtoková cytometrie

Tato metoda umožňuje sledování exprese požadovaných buněčných znaků. Průtokový cytometr je přístroj, který kombinuje metodu přímé imunofluorescence s analyzátozem krevních částic. (2) Buňky v suspenzi označíme monoklonální protilátkou s navázaným fluorochromem. Lze stanovit několik buněčných znaků během jednoho měření. Tyto protilátky se poté naváží na hledané antigeny na či vně buněk, jsou-li přítomny. (9)

2.6.1 Princip metody

V analyzátoru se buňky řadí jedna za druhou a prochází měřicí jednotkou. Na buněčný povrch zde dopadá laserový paprsek. Míra rozptylu a odrazu paprsku informuje o granularitě a velikosti buněk a počítač je dokáže zařadit do jednotlivých populací. Laserový paprsek zároveň excituje fluorochrom navázaný na antigenech, který emituje záření o určité vlnové délce. (9)

2.6.2 Odečítání výsledků, grafické znázornění populací

Software ukládá informace o struktuře a vyzářovaném signálu každé buňky, výsledkem cytometrického měření je několik grafů.

- Side scatter (SSc) – parametr odraženého světla
- Forward scatter (FSc) – vyjadřuje úhel rozptylu paprsku
- Údaje o emisi fluorescenční značky

V případě analýzy leukocytů lze vytvořit tzv. gate, který vybere pouze námi požadovanou populaci (nejčastěji lymfocyty), se kterou dále pracujeme. Existuje několik způsobů grafického znázornění výsledků měření, každý zařazuje buňky v suspenzi do různých populací, v závislosti na intenzitě exprese znaku.

- Histogram
- Dot plot – každá buňka je na grafu zobrazena jako tečka. Nachází se v různém kvadrantu, v závislosti na míře exprese znaku. Na osy x a y se může libovolně zvolit, jaký parametr chceme na graf vynést.

V počítačovém softwaru lze spočítat i přesný počet buněk, který na sobě nesou požadovaný antigen, výsledek měření tedy může být vydán jako procentuální zastoupení buněk i jejich přesný počet v suspenzi. (9)

2.6.3 Využití průtokové cytometrie

Průtoková cytometrie má mnoho využití, v imunologické laboratoři se nejčastěji používá ke stanovení jednotlivých subpopulací T-lymfocytů a k určení HLA haplotypu u pacientů s různými poruchami imunity. Průtoková cytometrie našla své uplatnění i v onkologii, kde se stanovují maligní buňky s atypickými CD znaky a tím umožňují určit závažnost nemoci a účinnost léčby. (9)

3 PCNA (PROLIFERATING CELL NUCLEAR ANTIGEN, PROLIFERAČNÍ BUNĚČNÝ JADERNÝ ANTIGEN)

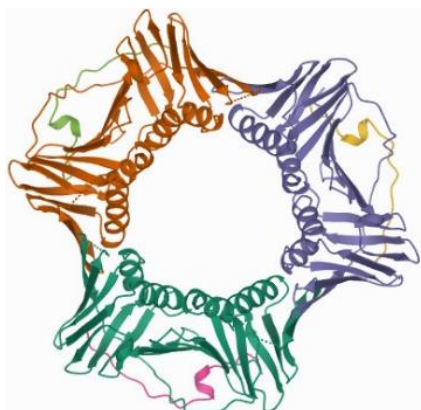
3.1 Funkce PCNA

PCNA, též označovaný jako svírací protein (anglicky ‚sliding clamp‘) se vyskytuje v jádrech dělících se živočišných buněk. Prvně byl objeven v bakterii *E. coli*. V lidských buňkách byl svírací protein nalezen nezávisle dvěma skupinami vědců. Miyachi a kolektiv jej objevil v séru některých pacientů se systémovým lupusem erythematosus, a jelikož zjistili, že se tento protein vyskytuje nejvíce v proliferujících buňkách, pojmenovali ho PCNA. Bravo a Celis identifikovali nový protein syntetizovaný v S-fázi buněčného cyklu a pojmenovali ho cyklín. Další výzkum zjistili, že obě skupiny popisovaly stejný antigen. (10)

PCNA hraje zásadní roli v metabolismu a tvorbě nukleových kyselin (RNA i DNA). Protein se dokáže sevřít okolo DNA molekuly a navázat na sebe enzymy a jiné molekuly nutné pro zahájení replikace. Podporuje funkci DNA-polymeráz – je to tzv. asistenční protein DNA-polymerasy δ a ϵ , čímž urychluje a zvyšuje produktivitu replikace. PCNA je nezbytný pro DNA rekombinace, opravné procesy a následně tvorbě chromatinu. PCNA také interaguje s dalšími proteiny zodpovědnými za regulaci a kontrolu buněčného cyklu (skupina proteinů vyskytujících se v buněčném cyklu se označuje jako cyklíny). (11)

3.2 Struktura PCNA

Bílkovina PCNA je kruhově uspořádaný trimer. Průměr otvoru proteinu má rozměr přibližně 35 Å. Mezi živočišnými druhy je struktura a funkce PCNA velmi podobná. Každý ze tří dimerů se skládá ze dvou globulinových domén obsahující α helixy a β podjednotky. Alfa helixy se nachází ve středu proteinu, vnější obal tvoří šest β podjednotek. Aminokyseliny v α helixech jsou převážně pozitivního náboje, který umožňuje snadný pohyb po molekule DNA. Vnější část PCNA je bohatá na negativně nabitě aminokyseliny (10)



Obrázek 4. Lidský PCNA

3.2.1 Průkaz PCNA antigenu

Jelikož se jedná o protein nejvíce exprimovaný v S-fázi, hrající úlohu v replikaci DNA a regulaci buněčného cyklu, používá se, spolu s dalšími proteiny (např. Ki67) jako marker proliferace při diagnóze nádorových onemocnění. Proliferační aktivita nádorových buněk se používá jako ukazatel závažnosti nádoru. Zpravidla se uvádí, že čím vyšší exprese proliferčních proteinů, tím horší je prognóza pacienta. Zvýšená proliferční aktivita znamená rychlé dělení nádorových buněk a pravděpodobně agresivní formu onemocnění. (12)

Imunocytochemické barvení na přítomnost PCNA se využívá při diagnóze a stanovení proliferční aktivity buněk karcinomů, například karcinomu prsu (12), bazocelulárního karcinomu, (13) nebo karcinomu přechodného epitelu močového měchýře (14).

Stanovení míry proliferace pomocí PCNA imunohistochemického barvení není limitováno jen na rakovinné buňky, využívá se i pro jiné patologické stavy, kde může dojít k neefektivnímu či nadměrnému buněčnému dělení. Při stavech, kdy dochází k ischemii a následnému obnovení krevního oběhu a okysličení tkání (tzv. reperfuze) je v dané tkáni zvýšená exprese PCNA. Po provedení resekce jaterní tkáně se k monitoraci míry proliferace hepatocytů (tzn. obnova jaterních buněk) využívá stanovení PCNA. (15)

PCNA má tedy pestrou škálu využití, jakožto podstatný ukazatel proliferace a nenahraditelný asistent syntézy a metabolismu nukleových kyselin.

3.2.2 Průkaz anti-PCNA protilátky nepřímou IF

Tento druh protilátky spadá do skupiny ANA (autoprotilátky proti jaderným antigenům). Byla prvně popsána před více než 40 lety. Jejich přítomnost lze prokázat u pacientů se systémovým revmatickým onemocněním, jako je např. systémový lupusem erythematos (SLE), polymyozitida či Sjögrenův syndrom. Detekce anti-PCNA protilátek však není rutinní záležitostí, ani pozitivních výsledků není příliš. Pro diagnostiku SLE se prosadilo stanovení jiných jaderných autoprotilátek. (16)

Anti-PCNA protilátky nejsou specifické, jelikož se nevyskytují jen u autoimunitních systémových revmatických onemocnění, byly přítomny též v sérech pacientů s malignitami a dalšími patologickými stavy (např. hepatitida B a jiné virové infekce). (17)

3.2.2.1 SLE (systémový lupus erythematoses) - závažné imunopatologické onemocnění

Toto autoimunitní onemocnění se řadí mezi systémové zánětlivé choroby pojivové tkáně. Dochází ke vzniku zánětu, který se postupně rozšiřuje po celém těle. Zasažen je pohybový aparát (šlachy, klouby, svaly) a životně důležité orgány (plíce, ledviny, srdce, GIT). (18)

3.2.2.2 Příčina vzniku SLE

Příčina vzniku těchto onemocnění není zcela známá. Roli ve vzniku zřejmě hrají genetické a vlivy vnějšího prostředí (UV záření, chemické látky, některé léky). U vnímavého jedince může dojít ke vzniku autoimunitního onemocnění například při virové či bakteriální infekci. (18)

Dochází ke změnách exprese genů v HLA systému a k porušení mechanismu apoptózy. Apoptická tělíčka nejsou správnými mechanismy odstraňována, z pozůstatků se uvolňují různé druhy antigenů, které dají k rozvoji autoimunitního onemocnění s následným poškozením orgánů. (18)

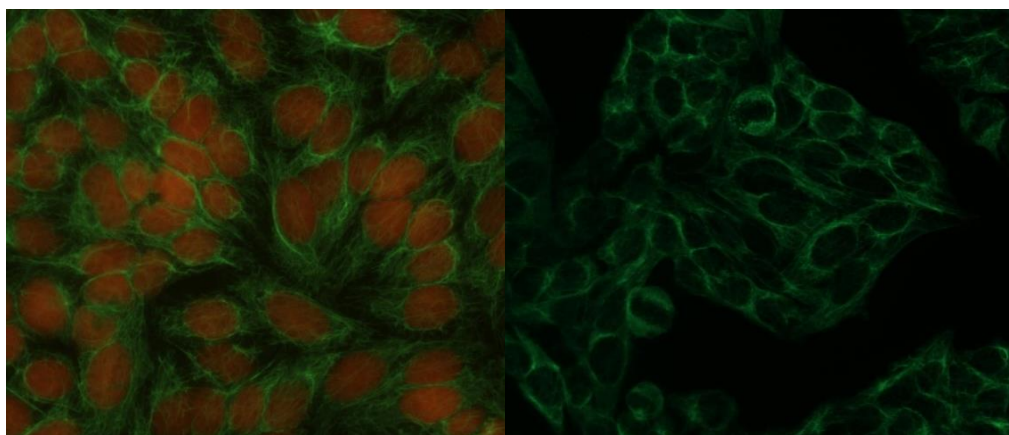
Typickým nálezem u SLE jsou autoprotilátky proti histonům, nukleové kyselině a jaderným enzymům. Autoprotilátky vytváří s antigeny imunokomplexy, které se mohou ukládat v různých tkáních. Ukládání imunokomplexů spouští imunitní odpověď a zesiluje zánětlivou reakci. (18)

4 PROTEINY CYTOSKELETU

4.1 Cytokeratiny

Intermediální filamenta (IF) epitelových buněk jsou tvořeny pestrou škálou proteinů, které se nazývají cytokeratiny. IF vytváří spolu s mikrofilamenty a mikrotubuly cytoskelet – síť proteinů uvnitř buňky. Cytoskelet hraje roli v buněčném dělení, pohybu organel a proteinů v buňce, umožňuje mezibuněčný transport. Cytoskelet také pomáhá udržovat tvar buňky a ukotvuje ji k bazální membráně a k sousedním buňkám. Proteiny cytoskeletu jsou schopny samosestavení – polymerace, a následného rozložení – depolymerace. (19)

Obrázek 5. Průkaz cytokeratinů, IF



4.1.1 Cytokeratin 18

Spolu s cytokeratinem 8 jsou hlavní složkou intermediálních filament v buňkách jednovrstevnatého epitelu. Vyskytuje se např. v játrech, prostatě, ledvinách a dalších orgánech. Vysoká exprese tohoto proteinu je v karcinomech z těchto epitelů, což lze prokázat pomocí imunohistochemických metod (např. karcinom prsu, děložního čípku, močového ústrojí). (20)

4.2 Mikrotubuly

4.2.1 Složení mikrotubulu

Mikrotubuly jsou složeny z α a β globulinových podjednotek, které se seskupují do dutých tubulů o průměru 25 nm. α a β globuliny dohromady polymerují v tzv. tubulinové dimery – hlavní stavební prvky mikrotubulu. (19)

4.2.2 Funkce mikrotubulů

Uplatňují se při transportu organel, jako mechanická opora a při buněčném dělení zprostředkovávají transport chromozomů (tvoří mitotické vřeténko). Rozeznáváme (-) a (+) konec mikrotubulu. Svým (-) koncem je mikrotubul ukotven k centrosomu a (+) konce, které jsou schopny rychlého růstu a rozpadu, zasahují do cytosolu. (19)

4.2.3 Inhibitory mikrotubulů

Důležitá role mikrotubulů při buněčném dělení našla své uplatnění v léčbě nádorových onemocnění (různé typy leukémií, karcinomy i ostatní nádory všech tkání). Byly objeveny látky, které po navázání na mikrotubuly inhibují jejich funkci. Na mikrotubuly působí několika mechanismy. Může dojít k depolymeraci mikrotubulu po navázání látky na tubulinové dimery, nebo zástavě jeho růstu a působením inhibičních mechanismů ztratí svoji funkci. Spousta těchto tzv. mitotických jedů je přírodního původu (rostliny i živočichové),

nyní už jsou však synteticky vyráběny. Mezi nejznámější inhibitory mikrotubulů rostlinného původu patří tzv. vinca alkaloidy a alkaloid kolchicin z ocunu podzimního. (21)

5 OVĚŘOVÁNÍ PROTILÁTEK

Aby se monoklonální protilátky daly v praxi použít, musí být specifické a reprodukovatelné pro další použití. Protilátky mají široké spektrum využití, jak ve výzkumné i diagnostické oblasti. Nejčastěji se protilátky využívají pro Western blot, imunoprecipitaci, ELISA metody, nepřímou a přímou imunofluorescenci a ostatní ICH metody (např. průtoková cytometrie). (22)

5.1 Úskalí ověřování protilátek pro ICH

U imunohistochemických metod je ověřování protilátek náročné, jelikož jejich efektivita je ovlivněna několika faktory. Jako každé laboratorní stanovení, lze je rozdělit do tří velkých skupin (preanalytické, analytické a postanalytické). (4)

5.1.1 Preanalytické faktory

Předchází samotné analýze, řadíme sem odebrání, transport a přípravu vzorku. (4)

5.1.1.1 Typ preparátu

Lze zhotovit tkáňové řezy, buněčnou kulturu nebo jen suspenzi buněk. Všechny preparáty musí být fixovány a správně zpracovány. (6)

5.1.1.2 Zpracování tkáně

Fixace je naprosto nepostradatelný krok při přípravě preparátů. Zabraňuje autolýze buněk, zachovává strukturu tkání a ponechává ve vzorku všechny požadované antigeny. Fixace musí být provedena včas a tkáň je nutno fixačním roztokem dokonale prosytit. Nejčastěji používaný fixační roztok je 4% formaldehyd, dle typu tkáně a stanovení požadovaných struktur lze použít i jiné chemikálie (např. methanol). V případě tkáňových řezů následuje po fixaci proces odvodnění a prosycení parafinem, dokončené samotným zalitím do parafinu a vytvoření tkáňových bloků, které se poté krájí na mikrotomech a natahují na sklíčka. (6)

Stejně jako zachování antigenů požadovaných pro stanovení, je podstatné ostatní antigenní epitopy zakrýt, aby nedocházelo k nespecifickým vazbám protilátek. Blokování ostatních antigenů může být provedeno aplikací např. 10 % FBS v PBS na preparáty. (6)

5.1.2 Analytické faktory

Výsledek ICH může být ovlivněn i typem použité protilátky a přístrojovým vybavením sloužící k zhotovení výsledků analýzy.

5.1.2.1 Použité protilátky

Nejhojněji využívané protilátky v ICH jsou monoklonální protilátky získané hybridomovou metodou. Takto připravené monoklonální protilátky se pyšní vysokou specifitou (vazba jen na jeden požadovaný epitop), mohou být ovšem méně senzitivní. Lze použít i polyklonální protilátky získané imunizací králíka, zde ale hrozí riziko vazeb na více epitopů. (4)

Výsledek ICH barvení ovlivňuje i naředění (diluce), tzv. titr protilátky. Naředění protilátky je optimální, jsou-li zobrazeny jen požadované struktury (antigeny) v dostatečné intenzitě, a nedochází k nespecifickému barvení pozadí a okolní tkáně. (4) Optimální titr protilátky se získá po zpracování a analýze preparátů s použitím několika různých naředění (např 1:50, 1:100, 1:200, 1:400). Inkubace protilátky s preparátem je také důležitý faktor, který by potencionálně mohl ovlivnit intenzitu barvení. (4)

Kvalitní protilátka bude vykazovat tyto charakteristiky:

- Váže se a je prokazatelná pouze na požadovanou buněčnou strukturu.
- S vzrůstající dilucí protilátky klesá stupeň obarvení tkáně.
- Danou protilátku je možné použít pro různé metody. (22)

5.1.2.2 Detekční systém

V ICH je k detekci výsledků používán optický či fluorescenční mikroskop (v případě průtokové cytometrie to je detekční systém v průtokovém cytometru). Odečítání výsledků je tedy ovlivněno subjektivitou. Ke každému preparátu musí být vždy zhotovena pozitivní a negativní kontrola sloužící k porovnávání s preparátem. Existují i počítačové programy schopné odečítat a hodnotit barvení, možné je i pořizování snímků daného preparátu, např. pro výzkumné a vzdělávací účely. (4)

Nevýhodou počítačového programu na odečítání výsledků je jeho cena, povinnost zaučení personálu pro jeho obsluhu a omezená schopnost odečítání a hodnocení preparátů. (23)

5.1.3 Postanalytická fáze

Po samotné analýze následuje interpretace a vydávání výsledků. Hodnocení preparátu jako pozitivní/negativní již není dostačující, důležití je okomentovat i intenzitu (lze hodnotit na křížky, nebo používat některý ze imunohistochemických skórovacích systémů). Dle typu preparátu lze zhodnotit i množství obarvených struktur a zhodnotit morfologii buněk. (23)

Neexistuje žádný univerzální způsob ověřování protilátek, postupy se mohou v různých laboratořích lišit. (22)

PRAKTICKÁ ČÁST

6 CÍL A ÚKOLY PRÁCE

6.1 Hlavní cíl

Hlavním cílem mé práce bylo ověřit funkčnost komerčně dodaných setů monoklonálních protilátek a jejich senzitivitu při různých naředění dané protilátky.

6.2 Dílčí cíle

1. Ověření vazby anti-PCNA protilátky metodou imunofluorescence na několika typech buněčných kultur:
 - i) HEp-2 (s různým způsobem prvotní inkubace, viz metodika práce)
 - ii) ASMA (hepatocyty, buňky ledvin, žaludeční buňky – krysí)
 - iii) Lidské lymfocyty stimulované PHA
2. Ověření vazby anti-PCNA protilátky metodou průtokové cytometrie
3. Ověření vazby cytoskeletárních protilátek metodou imunofluorescence na:
 - i) HEp-2 buňkách
 - ii) Jaterních buňkách
4. Ověření vazby anti-PCNA protilátky metodou imunoblotu

7 VÝZKUMNÉ PROBLÉMY/OTÁZKY

- Jaké jsou optimální podmínky fixace a inkubace substrátu pro ověření vazby anti-PCNA protilátky?
- Jaký je optimální titr protilátek pro využití v praxi?
- Liší se schopnost vazby anti-PCNA protilátky mezi jednotlivými metodami?

8 CHARAKTERISTIKA SLEDOVANÉHO SOUBORU

8.1 Využité substráty pro detekci vazby protilátek

Pro ověření vazby protilátek bylo využito několik substrátů, nejčastěji používané byly mikroskopická sklíčka potažená HEp-2 buňkami.

Dalšími substráty byly:

- a) ASMA sklíčka – zvířecí hepatocyty a buňky žaludku
- b) Lymfocyty stimulované PHA – suspenze fixovaná na sklíčku, i suspenze lymfocytů v roztoku stimulačního roztoku

Sklíčka potažená buňkami se uplatňují v metodách imunofluorescenčních, suspenzi lymfocytů v roztoku jsem využila k měření na průtokovém cytometru.

8.2 Charakteristika využitých protilátek

Všechny protilátky využitě v mé práci byly dodány firmou EXBIO Praha a.s. Jedná se o monoklonální protilátky, které jsou schopny vazby na specifické epitopy na antigeny, proti kterým jsou namířeny. V praktické části se zaměřuji na sledování schopnosti vazby zvolené protilátky na dané epitopy a optimalizaci postupu pro získání pozitivních výsledků.

9 METODIKA PRÁCE

9.1 Ověřování vazby protilátek metodou imunofluorescence

Protilátky pro IF:

- Primární:
Anti-PCNA (Purified, Clone PC10, EXBIO Praha a.s.)
Anti-Cytokeratins (Purified, Clone C-11, EXBIO Praha a.s.)
Anti-Cytokeratin 18 (Purified, Clone DC-10, EXBIO Praha a.s.)
Anti-alpha/beta-Tubulin dimer (Purified, Clone TU-10, EXBIO Praha a.s.)
Anti-alpha/beta-Tubulin dimer (Purified, Clone TU-8, EXBIO Praha a.s.)
- Sekundární:
Anti-Mouse IgG, Fc gama Fragment specifická (Alexa Fluor[®] 488 -conjugated AffiniPure Goat)

Potřebné roztoky:

- PBS – Připraveno z 10x DPBS (Dulbecco's Phosphate Bufferered Saline), (25 ml DPBS do 250 ml destilované vody)
- 3 % FBS v PBS (1,5 ml FBS do 50 ml PBS)
- 10 % FBS v PBS = neutralizující pufr (5 ml FBS do 50 ml PBS)
- FBS (Fetal Bovine Serum)
- PBS pH 7,2 (promývací roztok)
- 4,2 % formaldehyd
- 0,1 % triton (připraveno z 1% Triton X-100, 20 µl Tritonu + 200 µl PBS)
- Jádrové barvivo (propidium jodid s 3 % FBS v PBS – v poměru 1:1)

Druhy sklíček:

- HEp-2 buňky 1 x 5, 1 x 10 (potažených 5 či 10 pozic na sklíčku)
- ASMA – zvířecí hepatocyty a buňky žaludku 1 x 5

9.1.1 Postupy pro ověření vazby anti-PCNA protilátky:

- 1) HEp-2 s inhibicí 10 % FBS v PBS
- 2) HEp-2 bez inhibice
- 3) ASMA bez inhibice
- 4) HEp-2 s inkubací v 4,2 % formaldehydu a následná inhibice 10 % FBS v PBS
- 5) HEp-2 s inkubací v 0,1 % tritonu a následná inhibice 10 % FBS v PBS

Pracovní postup pro 1):

1. Na každou jamku jsem napipetovala 26 μ l 10 % FBS v PBS
2. Inkubace 15 minut při laboratorní teplotě
3. Naředila jsem primární protilátku v 3 % FBS v PBS
Ředění:
 - 1:50 (4 μ l protilátky + 200 μ l 3 % FBS v PBS)
 - 1:100 (100 μ l z prvního ředění + 100 μ l 3 % FBS v PBS)
 - 1:200 (100 μ l z předchozího ředění + 100 μ l 3 % FBS v PBS)
 - 1:400 (100 μ l z předchozího ředění + 100 μ l 3 % FBS v PBS)

4. Takto naředěné protilátky jsem napipetovala na sklíčka (26 μ l na jamku):
 1. jamka: negativní kontrola – bez primární protilátky

 2. jamka: titr protilátky 1:50

 3. jamka: titr protilátky 1:100

 4. jamka: titr protilátky 1:200

 5. jamka: titr protilátky 1:400

5. Inkubace 60 minut při 4 °C
6. Preparát jsem omyla 2x v PBS pH 7,2 po dobu 5 minut
7. Připravila jsem sekundární protilátku (dle výrobce, tj. 1:200 v dH₂O).
8. Sekundární protilátku jsem dále naředila 1:200 v 3 % FBS v PBS (5 μ l protilátky + 1 ml 3 % FBS v PBS)
9. Protilátku jsem napipetovala na každou jamku (26 μ l)
10. Inkubace 60 minut při 4 °C v temnu.
11. Preparát jsem omyla 2x v PBS pH 7,2 po dobu 5 minut
12. Roztok PI (propidium jodid) jsem naředila s 3 % FBS v PBS
13. Jádra jsem dobarvila pomocí PI
14. Inkubace 2 minuty
15. Preparát jsem omyla 2x v PBS pH 7,2 po dobu 5 minut
16. Sklíčka jsem montovala do glycerinu

Přidání 10 % FBS v PBS sloužilo k maskování ostatních antigenů, zabraňuje tvorbě nespecifických vazeb.

Pracovní postup pro 2) a 3) se lišil pouze vynecháním 1. kroku. Tzn. na tyto řezy jsem aplikovala primární protilátku bez předešlé inkubace v 10 % FBS v PBS.

Pracovní postup pro 4):

1. Na všechny pozice jsem napipetovala 26 μ l 4,2 % formaldehydu (fixace buněk)
2. Inkubace 12 minut při laboratorní teplotě
3. Preparát jsem omyla 2x v PBS pH 7,2 po dobu 5 minut
4. Na všechny jamky jsem napipetovala 26 μ l 10 % FBS v PBS (maskování ostatních antigenů)
5. Inkubace 30 minut
6. Primární protilátku jsem naředila v 3 % FBS v PBS (26 μ l na jamku)
 - 1. jamka: negativní kontrola – bez primární protilátky
 - 2. jamka: titr protilátky 1:6
 - 3. jamka: titr protilátky 1:12
 - 4. jamka: titr protilátky 1:24
 - 5. jamka: titr protilátky 1:48
7. Inkubace sklíček 60 min při 4 °C
8. Preparát jsem omyla 2x v PBS pH 7,2 po dobu 5 minut
9. Předem připravenou sekundární protilátku jsem naředila 1:200 v 3 % FBS v PBS (5 μ l protilátky + 1 ml 3 % FBS v PBS)
10. Inkubace 60 min při 4 °C v temnu
11. Preparát jsem omyla 2x v PBS pH 7,2 po dobu 5 minut
12. Poté jsem na každou jamku napipetovala 26 μ l PI
13. Inkubace 1 minutu
14. Preparát jsem omyla 2x v PBS pH 7,2 po dobu 5 minut
15. Sklíčko jsem poté montovala do glycerinu

Pracovní postup pro 5)

1. Na každou jamku jsem napipetovala 26 μ l 0,1 % tritonu
2. Inkubace 12 minut
3. Dále se postup shoduje s návodem 4)

Triton se použil z důvodu zlepšení fixace buněk a ulehčení vazby protilátky.

9.1.2 Postup pro ověření ostatních protilátek:

1. Naředila jsem primární protilátku v 3 % FBS v PBS

Ředění:

- 1:50 (4 μ l protilátky + 200 μ l 3 % FBS v PBS)
- 1:100 (100 μ l z prvního ředění + 100 μ l 3 % FBS v PBS)
- 1:200 (100 μ l z předchozího ředění + 100 μ l 3 % FBS v PBS)
- 1:400 (100 μ l z předchozího ředění + 100 μ l 3 % FBS v PBS)

2. Takto naředěné protilátky jsem napipetovala na sklíčka (26 μ l na jamku):

1. jamka: negativní kontrola – bez primární protilátky

2. jamka: titr protilátky 1:50

3. jamka: titr protilátky 1:100

4. jamka: titr protilátky 1:200

5. jamka: titr protilátky 1:400

3. Inkubace 60 minut při 4 °C

4. Preparát jsem omyla 2x v PBS pH 7,2 po dobu 5 minut

5. Připravila jsem sekundární protilátku (dle výrobce, tj. 1:200 v dH₂O).

6. Sekundární protilátku jsem dále naředila 1:200 v 3 % FBS v PBS
(5 μ l protilátky + 1 ml 3 % FBS v PBS)

7. Protilátku jsem napipetovala na každou jamku (26 μ l)

8. Inkubace 60 minut při 4 °C v temnu

9. Preparát jsem omyla 2x v PBS pH 7,2 po dobu 5 minut

10. Roztok PI (proprium jodid) jsem naředila s 3 % FBS v PBS

11. Jádra jsem dobarvila pomocí PI

12. Inkubace 1 minutu

13. Preparát jsem omyla 2x v PBS pH 7,2 po dobu 5 minut

14. Sklíčka jsem montovala do glycerinu

9.2 Ověřování vazby anti-PCNA protilátek průtokovou cytometrií

Protilátky pro průtokovou cytometrii:

- Anti-PCNA (Purified, Clone PC10)
- CD 45 KO
- CD 3 PB
- CD 25

Roztoky:

- Roztok č. 1: fixační roztok (fixative reagent)
- Roztok č. 2: perforační roztok (Permafix)
- Roztok č. 3: ukončovací roztok

Pracovní postup:

1. Cytometrické zkumavky s buněčnou suspenzí jsem dala centrifugovat 1800 ot/min po dobu 3 minuty
2. Suspenzi jsem promíchala a odebrala 50 µl do nové zkumavky
3. Přidala jsem 5 µl fixačního roztoku a promíchala
4. Inkubace 15 minut ve tmě, laboratorní teplota
5. Poté jsem přidala 300 µl perforačního roztoku
6. Promíchala jsem a ihned přidala směs protilátek – 5 µl každé protilátky – důležité je měnit špičky na pipetě
7. Inkubace 30 minut ve tmě
8. Připravila jsem ukončovací roztok (0,5 ml roztoku č. 3 a 4,5 ml destilované vody)
9. Přidala jsem 1,8 ml ukončovacího roztoku do každé zkumavky
10. Centrifugace 3 min, 1800 ot/min
11. Po centrifugaci jsem slila obsah zkumavek a přidala 500 µl ukončovacího roztoku

9.3 Ověřování vazby anti-PCNA protilátky ve stimulovaných lidských lymfocytech

Na sklíčka byla nanášena suspenze stimulovaných (PHA) lidských lymfocytů.

Sklíčko 1: Negativní kontrola, bez primární protilátky

Sklíčko 2: S nanášenou primární protilátkou

Použité protilátky:

Primární:

- Anti-PCNA (Purified, Clone PC10)

Sekundární:

- Anti-Mouse IgG, Fc gama Fragment specifická (Alexa Fluor® 488 -conjugated AffiniPure Goat)

Pracovní postup:

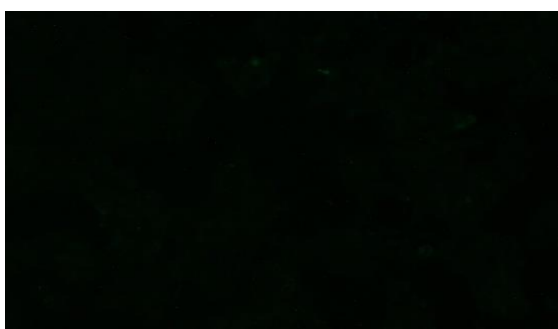
- 1) Buňky jsem fixovala 4% roztokem paraformaldehydu v PBS po dobu 15 minut při laboratorní teplotě
- 2) Preparát jsem omyla 2x v PBS pH 7,2 po dobu 5 minut
- 3) Preparát permeabilizuji 0,1 % tritonem v PBS po dobu 10 minut při laboratorní teplotě
- 4) Preparát jsem omyla 2x v PBS pH 7,2 po dobu 5 minut
- 5) Inkubace v 10 % FBS v PBS po dobu 30 minut
- 6) Primární protilátku jsem naředila 1:100 v 3 % FBS v PBS
- 7) Na sklíčko 2 jsem napipetovala primární protilátku
- 8) Inkubace 60 min, při 4 °C v temnu
- 9) Preparát jsem omyla 2x v PBS pH 7,2 po dobu 5 minut
- 10) Naředila jsem sekundární protilátku 1:200 v 3 % FBS v PBS a aplikovala na obě sklíčka
- 11) Inkubace 60 min, při 4 °C v temnu
- 12) Preparát jsem omyla 2x v PBS pH 7,2 po dobu 5 minut
- 13) Jádra buněk jsem dobarvila roztokem PI – inkubace 1 až 2 minuty
- 14) Preparát jsem omyla 2x v PBS pH 7,2 po dobu 5 minut
- 15) Montování do glycerinu

10 ANALÝZA A INTERPRETACE VÝSLEDKŮ

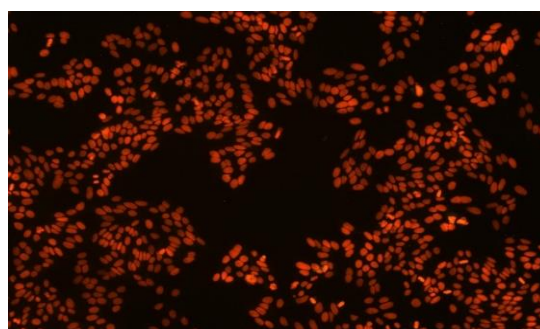
Metoda imunofluorescence je zatížena subjektivitou hodnocení výsledků, proto je podstatné zhotovit ke každému preparátu negativní kontrolu, na které není primární protilátka přítomna, a proto nedojde k požadované imunofluorescenci. Dalším problémem může být nedostatečná specifita vazby protilátky, kdy se může navázat i na epitopy jiných antigenů, a tak způsobit falešnou pozitivitu. Nutné je také dodržovat správné operační postupy při přípravě preparátů (tj. dostatečně promývat a dodržovat podmínky a čas inkubace).

10.1 Ověřování vazby anti-PCNA protilátky:

Obr. 6:



Anti-PCNA, HEp-2



Anti-PCNA (PI), HEp-2

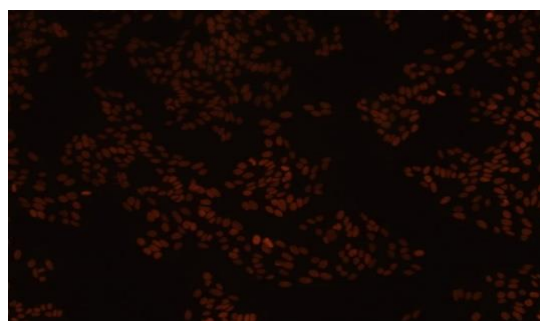
Obr. 6: Ředění primární protilátky 1:50, Anti-PCNA (Purified, Clone PC10), sekundární protilátka Anti-Mouse IgG, Fc gama Fragment specifická (Alexa Fluor® 488 -conjugated AffiniPure Goat), ředění 1:200

Negativní výsledek

Obr. 7:



*Anti-PCNA, HEp-2
s inhibicí v 10 % FBS v PBS*

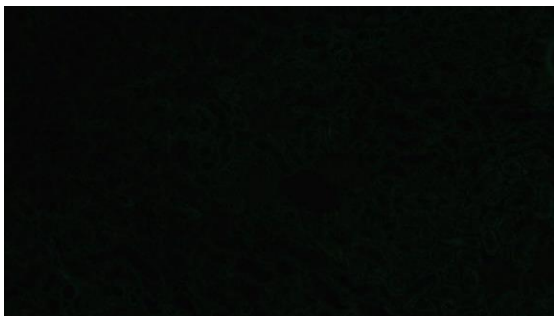


*Anti-PCNA (PI), HEp-2
s inhibicí v 10 % FBS v PBS*

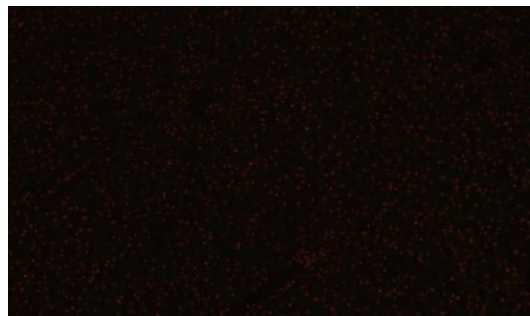
Obr. 7: Řezy byly prvotně inkubovány v 10 % FBS v PBS po dobu 10 minut. Ředění primární protilátky 1:100 Anti-PCNA (Purified, Clone PC10), sekundární protilátka Anti-Mouse IgG, Fc gama Fragment specifická (Alexa Fluor® 488 -conjugated AffiniPure Goat), ředění 1:200

Negativní výsledek

Obr. 8:



Anti-PCNA, hepatocyty

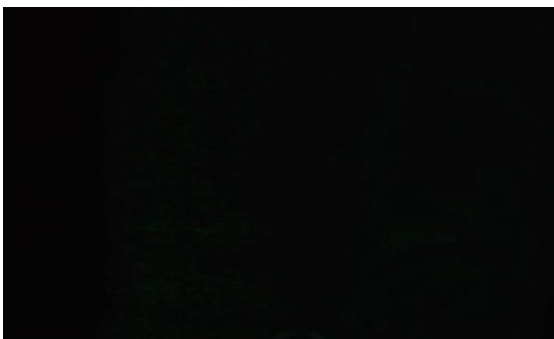


Anti-PCNA (PI), hepatocyty

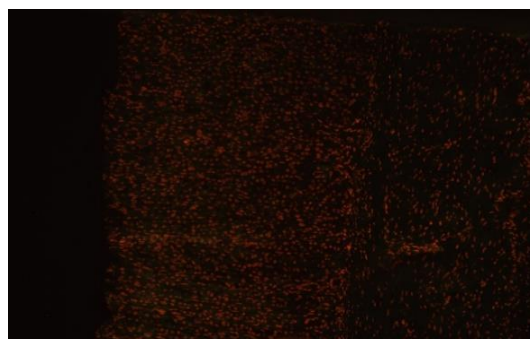
Obr. 8: Primární protilátka Anti-PCNA (Purified, Clone PC10), ředění 1:100, sekundární protilátka Anti-Mouse IgG, Fc gama Fragment specifická (Alexa Fluor® 488 -conjugated AffiniPure Goat), ředění 1:200

Negativní výsledek

Obr. 9:



Anti-PCNA, buňky žaludku

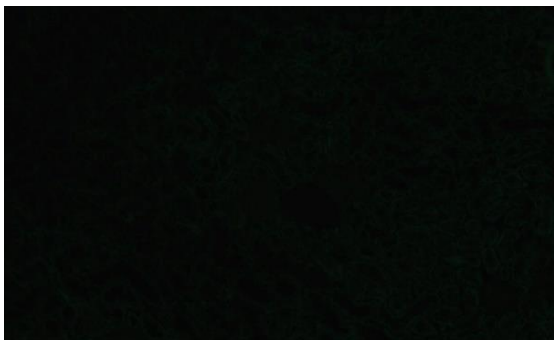


Anti-PCNA, buňky žaludku (PI)

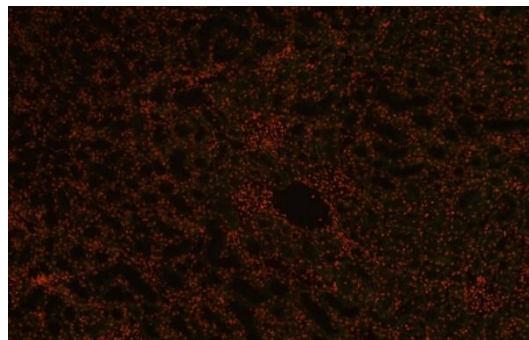
Obr. 9: Primární protilátka Anti-PCNA (Purified, Clone PC10), ředění 1:100, sekundární protilátka Anti-Mouse IgG, Fc gama Fragment specifická (Alexa Fluor® 488 -conjugated AffiniPure Goat), ředění 1:200

Negativní výsledek

Obr. 10:



Anti-PCNA, buňky ledvin

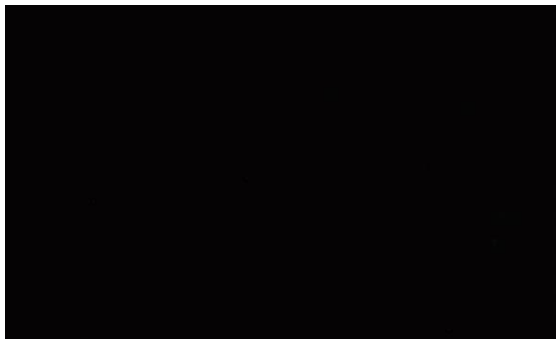


Anti-PCNA, buňky ledvin (PI)

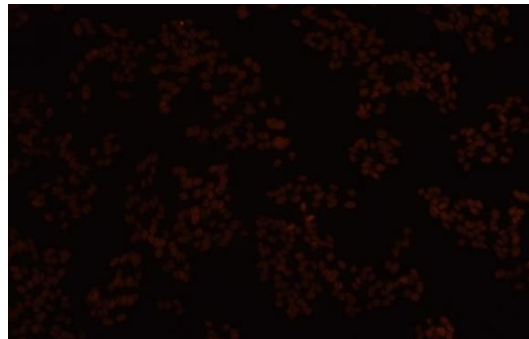
Obr. 10: Primární protilátka Anti-PCNA (Purified, Clone PC10), ředění 1:100, sekundární protilátka Anti-Mouse IgG, Fc gama Fragment specifická (Alexa Fluor® 488 -conjugated AffiniPure Goat), ředění 1:200

Negativní výsledek

Obr. 11:



Anti-PCNA, HEp-2, inkubace s tritonem

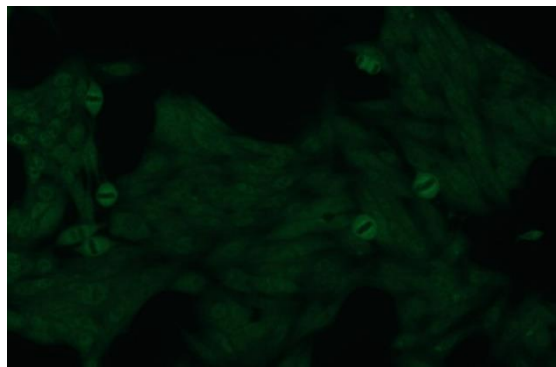


Anti-PCNA, HEp-2, inkubace s tritonem (PI)

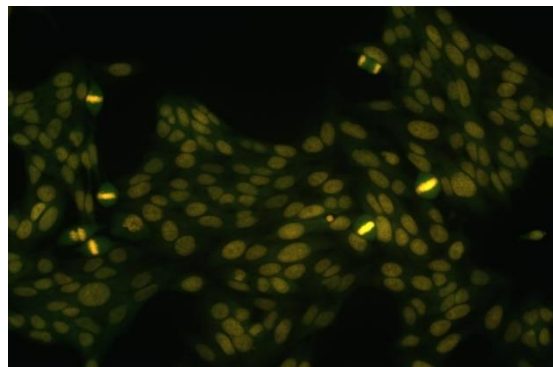
Obr. 11: Řezy byly permeabilizovány 0,1 % tritonem. Primární protilátka Anti-PCNA (Purified, Clone PC10), ředění 1:100. Sekundární protilátka Anti-Mouse IgG, Fc gama Fragment specifická (Alexa Fluor® 488 -conjugated AffiniPure Goat), ředění 1:200

Negativní výsledek

Obr. 12:



Anti-PCNA, HEp-2, fixace 4 % paraformaldehydem v PBS

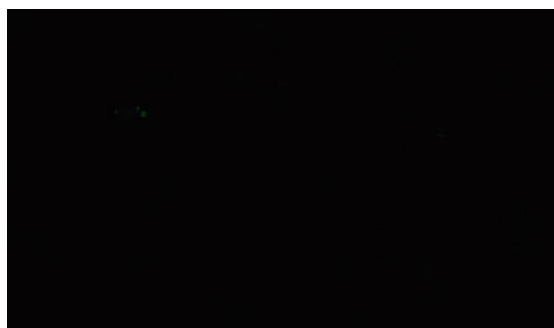


Anti-PCNA, HEp-2, fixace 4 % paraformaldehydem v PBS (PI)

Obr. 12: Řezy Hep-2 buněk byly před zpracováním fixovány 4 % paraformaldehydem. Primární protilátka Anti-PCNA (Purified, Clone PC10), ředění 1:6. Sekundární protilátka Anti-Mouse IgG, Fc gama Fragment specifická (Alexa Fluor® 488 -conjugated AffiniPure Goat), ředění 1:200

Pozitivní výsledek

Obr. 13:



Anti-PCNA, HEp-2, fixace 4 % paraformaldehydem v PBS



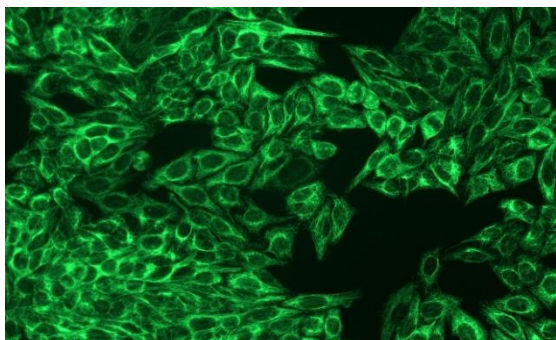
Anti-PCNA, HEp-2, fixace 4 % paraformaldehydem v PBS (PI)

Obr. 13: Řezy Hep-2 buněk byly před zpracováním fixovány 4 % paraformaldehydem. Primární protilátka Anti-PCNA (Purified, Clone PC10), ředění 1:12. Sekundární protilátka Anti-Mouse IgG, Fc gama Fragment specifická (Alexa Fluor® 488 -conjugated AffiniPure Goat), ředění 1:200

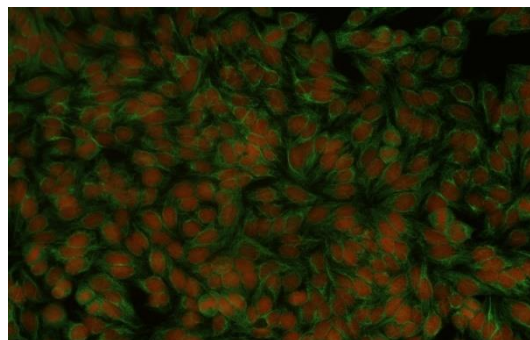
Negativní výsledek

10.2 Ověřování vazby anti-cytokeratins protilátky

Obr. 14:



Anti-cytokeratins, HEp-2

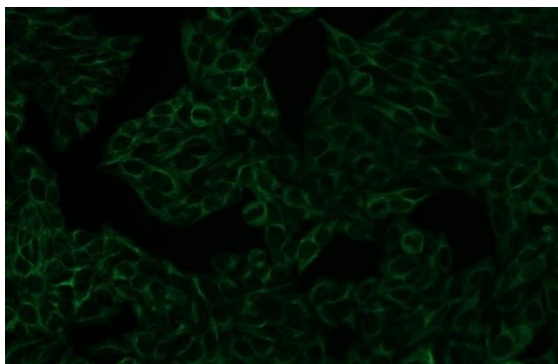


Anti-cytokeratins, HEp-2 (PI)

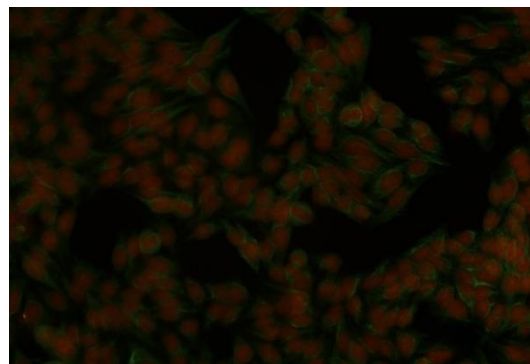
Obr. 14: Primární protilátka Anti-Cytokeratins (Purified, Clone C-11), ředění 1:50. Sekundární protilátka Anti-Mouse IgG, Fc gama Fragment specifická (Alexa Fluor® 488 -conjugated AffiniPure Goat), ředění 1:200

Pozitivní výsledek

Obr. 15:



Anti-cytokeratins, HEp-2

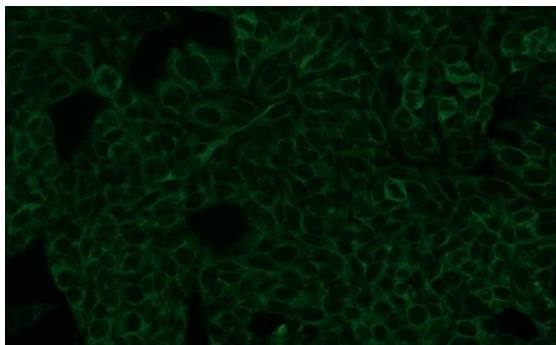


Anti-cytokeratins, HEp-2 (PI)

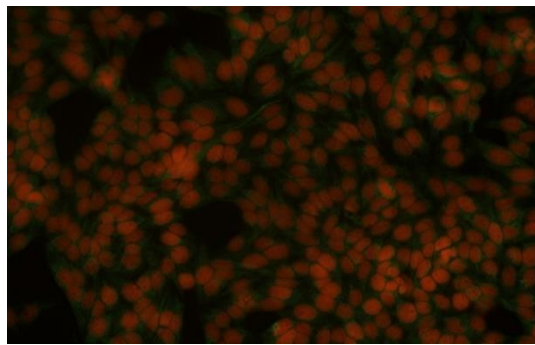
Obr. 15: Primární protilátka Anti-Cytokeratins (Purified, Clone C-11), ředění 1:100. Sekundární protilátka Anti-Mouse IgG, Fc gama Fragment specifická (Alexa Fluor® 488 -conjugated AffiniPure Goat), ředění 1:200

Pozitivní výsledek

Obr. 16:



Anti-cytokeratins, HEp-2

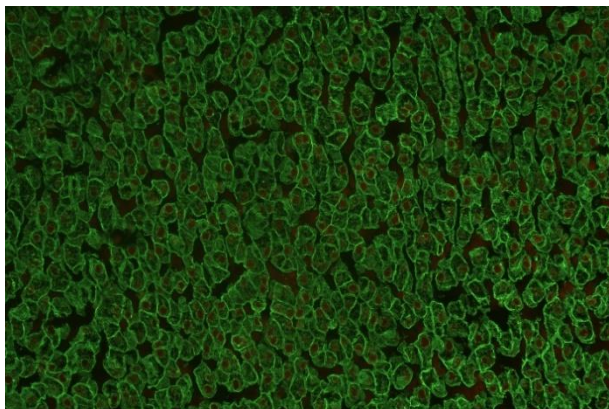


Anti-cytokeratins, HEp-2 (PI)

Obr. 16: Primární protilátka Anti-Cytokeratins (Purified, Clone C-11), ředění 1:200. Sekundární protilátka Anti-Mouse IgG, Fc gama Fragment specifická (Alexa Fluor® 488 -conjugated AffiniPure Goat), ředění 1:200

Pozitivní výsledek

Obr. 17:



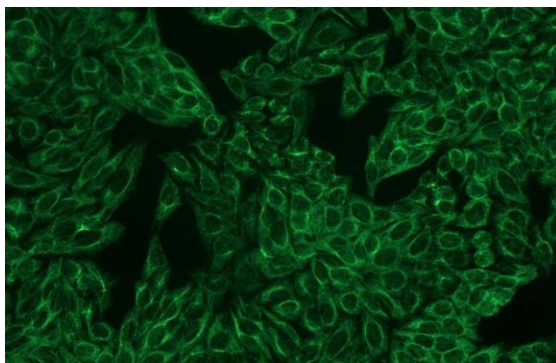
Anti-cytokeratins, hepatocyty (PI)

Obr. 17: Primární protilátka Anti-Cytokeratins (Purified, Clone C-11), ředění 1:50. Sekundární protilátka Anti-Mouse IgG, Fc gama Fragment specifická (Alexa Fluor® 488 -conjugated AffiniPure Goat), ředění 1:200

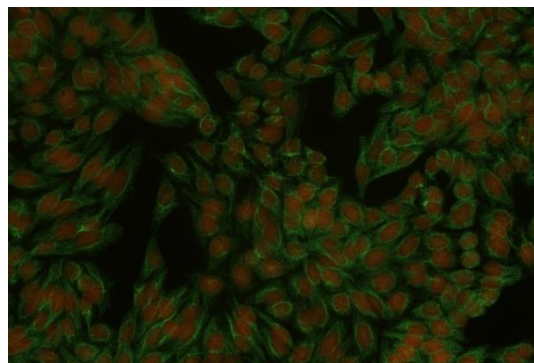
Pozitivní výsledek

10.3 Ověřování vazby anti-cytokeratin 18 protilátky

Obr. 18:



Anti-cytokeratin 18, HEp-2

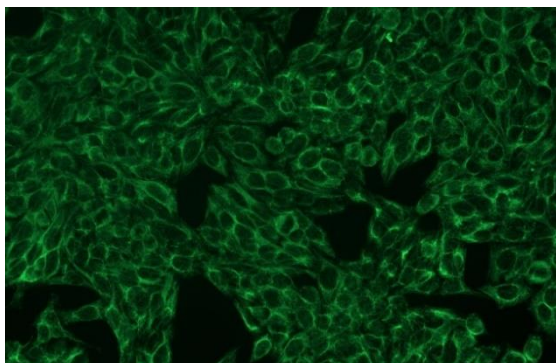


Anti-cytokeratin 18, HEp-2 (PI)

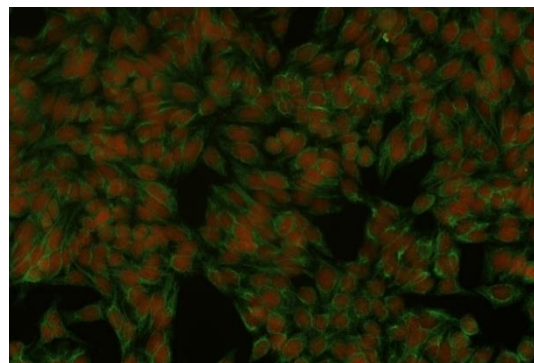
Obr. 18: Primární protilátka Anti-Cytokeratin 18 (Purified, Clone DC-10), ředění 1:50. Sekundární protilátka Anti-Mouse IgG, Fc gama Fragment specifická (Alexa Fluor® 488 -conjugated AffiniPure Goat), ředění 1:200

Pozitivní výsledek

Obr. 19



Anti-cytokeratin 18, HEp-2

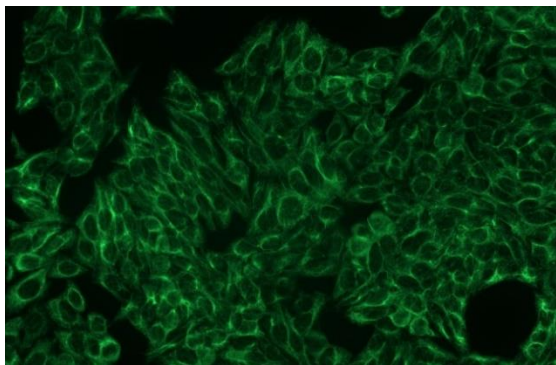


Anti-cytokeratin 18, HEp-2 (PI)

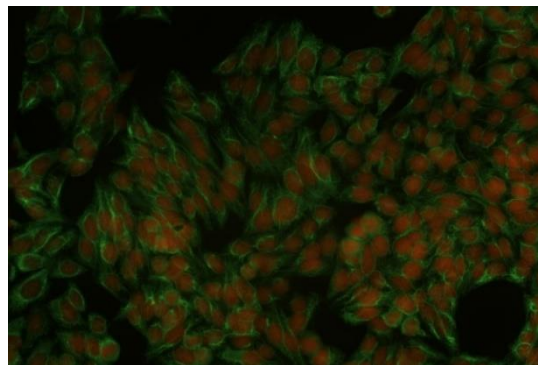
Obr. 19: Primární protilátka Anti-Cytokeratin 18 (Purified, Clone DC-10), ředění 1:100. Sekundární protilátka Anti-Mouse IgG, Fc gama Fragment specifická (Alexa Fluor® 488 -conjugated AffiniPure Goat), ředění 1:200

Pozitivní výsledek

Obr. 20:



Anti-cytokeratin 18, HEp-2

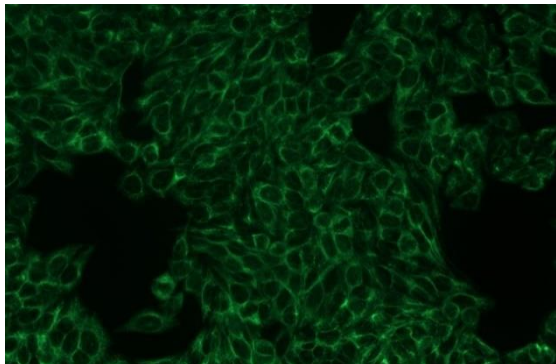


Anti-cytokeratin 18, HEp-2 (PI)

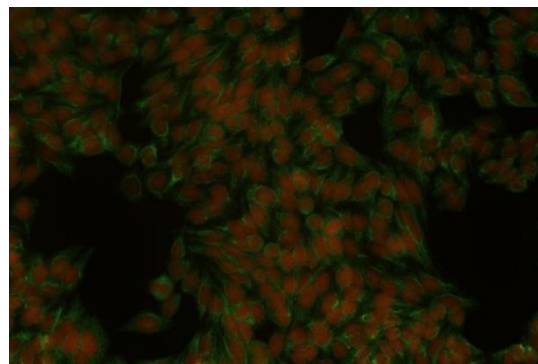
Obr 20: Primární protilátka Anti-Cytokeratin 18 (Purified, Clone DC-10), ředění 1:200. Sekundární protilátka Anti-Mouse IgG, Fc gama Fragment specifická (Alexa Fluor® 488 -conjugated AffiniPure Goat), ředění 1:200

Pozitivní výsledek

Obr. 21:



Anti-cytokeratin 18, HEp-2



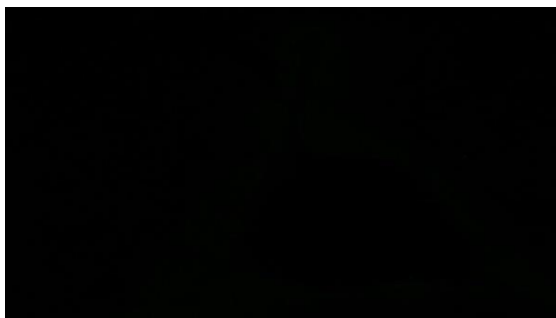
Anti-cytokeratin 18, HEp-2 (PI)

Obr. 21: Primární protilátka Anti-Cytokeratin 18 (Purified, Clone DC-10), ředění 1:400. Sekundární protilátka Anti-Mouse IgG, Fc gama Fragment specifická (Alexa Fluor® 488 -conjugated AffiniPure Goat), ředění 1:200

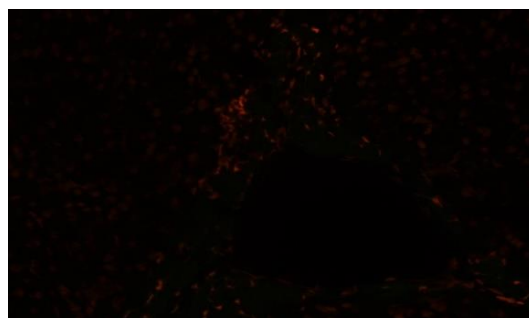
Pozitivní výsledek

10.4 Ověřování vazby anti-alfa/beta tubulin dimer protilátky

Obr. 22:



Anti-alfa/beta tubulin dimer, hepatocyty



Anti-alfa/beta tubulin dimer, hepatocyty (PI)

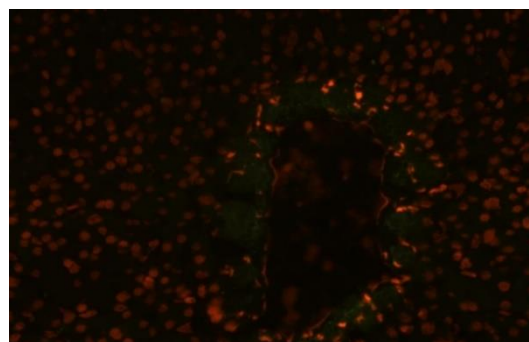
Obr. 22: Primární protilátka Anti-alfa/beta Tubulin dimer (Purified, Clone TU-10), ředění 1:50. Sekundární protilátka Anti-Mouse IgG, Fc gama Fragment specifická (Alexa Fluor® 488 -conjugated AffiniPure Goat), ředění 1:200

Negativní výsledek

Obr. 23:



Anti-alfa/beta tubulin dimer, hepatocyty

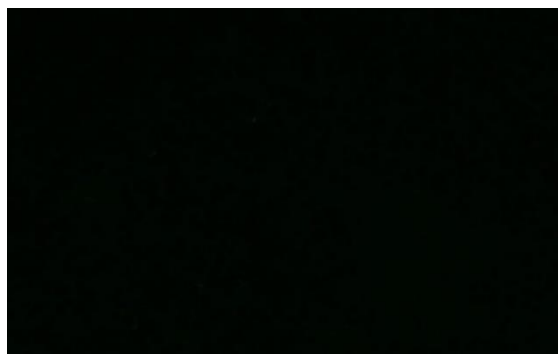


Anti-alfa/beta tubulin dimer, hepatocyty (PI)

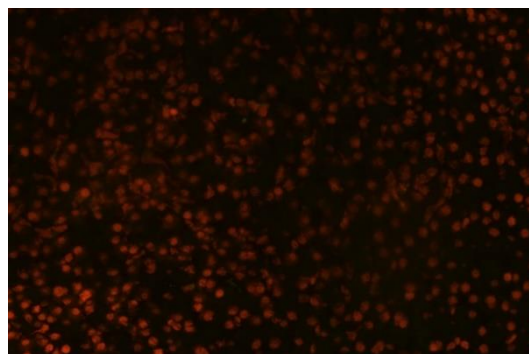
Obr. 23: Primární protilátka Anti-alfa/beta Tubulin dimer (Purified, Clone TU-8), ředění 1:100. Sekundární protilátka Anti-Mouse IgG, Fc gama Fragment specifická (Alexa Fluor® 488 -conjugated AffiniPure Goat), ředění 1:200

Negativní výsledek

Obr. 24



Anti-alfa/beta tubulin dimer, hepatocyty



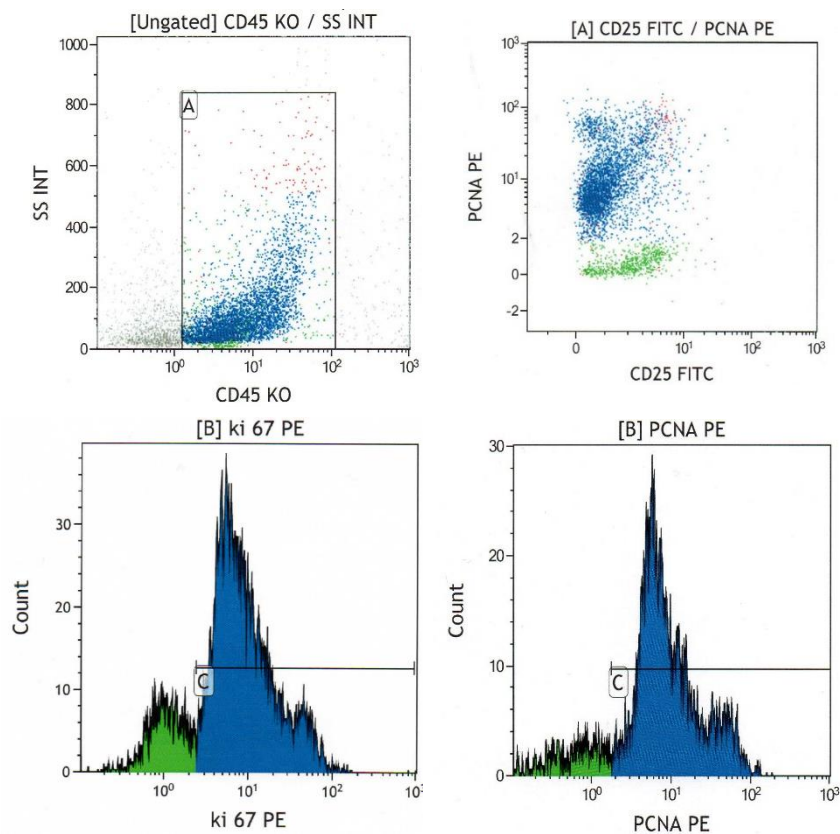
Anti-alfa/beta tubulin dimer, hepatocyty (PI)

Obr. 24: Primární protilátka Anti- α/β Tubulin dimer (Purified, Clone TU-8), ředění 1:200. Sekundární protilátka Anti-Mouse IgG, Fc gama Fragment specifická (Alexa Fluor® 488 -conjugated AffiniPure Goat), ředění 1:200

Negativní výsledek

10.5 Ověřování vazby anti-PCNA protilátek průtokovou cytometrií

Obr. 25:

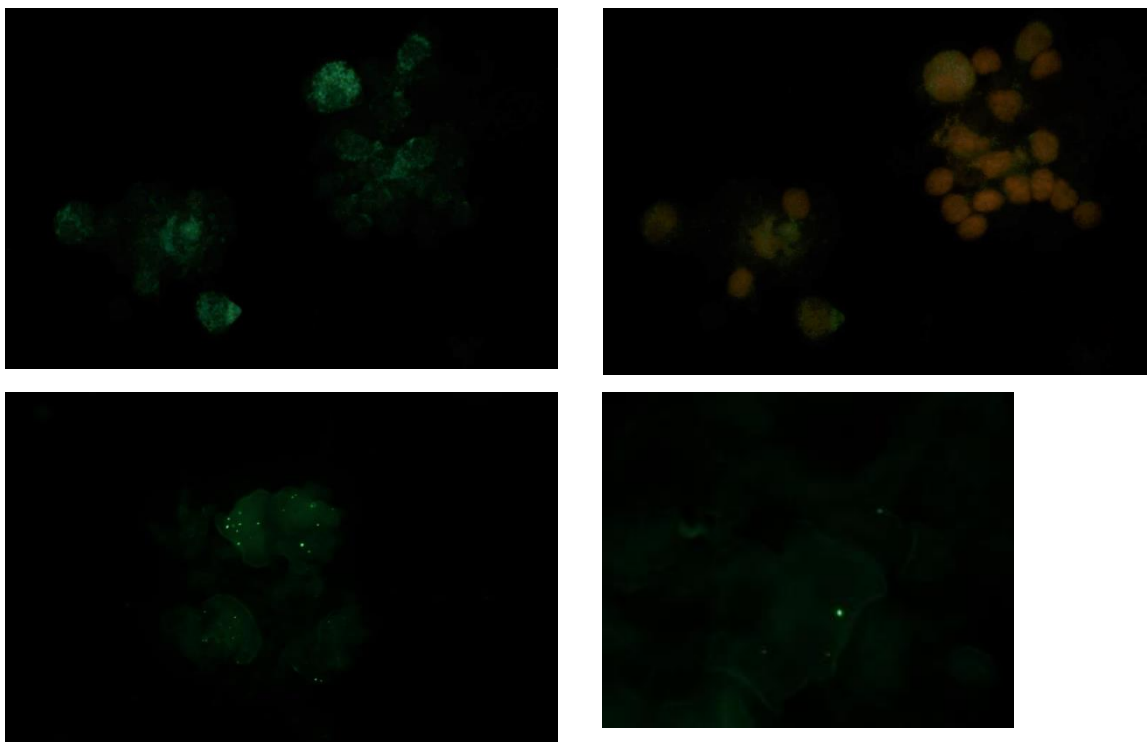


Nahoře: Dot ploty, vpravo pozitivní pro PCNA

Dole: Histogramy, vlevo pro detekci Ki67 antigenu, vpravo detekce PCNA

10.6 Ověřování vazby anti-PCNA protilátky na stimulovaných lidských lymfocytech

Obr. 26:



Stimulované lymfocyty, anti-PCNA

Obr 26: Primární protilátka Anti-PCNA (Purified, Clone PC10), ředění 1:100. Sekundární protilátka Anti-Mouse IgG, Fc gama Fragment specifická (Alexa Fluor® 488 - conjugated AffiniPure Goat), ředění 1:200

Pozitivní výsledek

10.7 Ověřování vazby anti-PCNA protilátek metodou imunoblotu

Obr. 27:



Detekce anti-PCNA protilátek

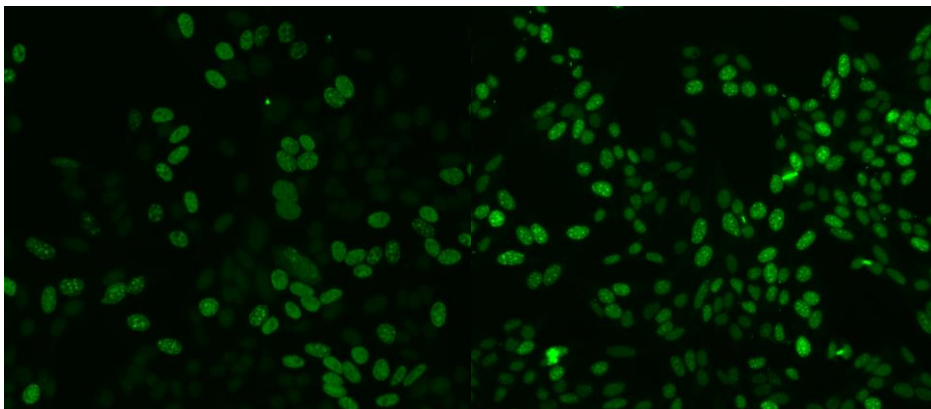
Obr. 27: Výsledek imunoblotu pro detekci anti-PCNA protilátky (použitý materiál: Anti-PCNA, Purified, Clone PC10), vlevo je zřetelná pozitivní kontrola, uprostřed pozitivní výsledek pro anti-PCNA protilátku

DISKUZE

Ze získaných dat vyplívá, že protilátka Anti-PCNA (Purified, Clone PC10) je schopná vazby pouze v příliš nízkých titrech (1:6) a při fixaci substrátu 4 % paraformaldehydem. Takto nízký titr protilátek je pro praxi v imunologické laboratoři nevyužitelný, v nepřímé imunofluorescenci se protilátky používají ve vysokých titrech naředění v patientském séru (např. 1:200).

V imunologické laboratoři se lze setkat s diagnostikou anti-PCNA protilátek v séru pacientů s autoimunitním onemocněním (např. SLE), kdy tělo syntetizuje protilátky proti vlastnímu PCNA. (16) PCNA je protein nejvíce exprimovaný v S-fázi buněčného cyklu, přičemž autoprottilátky (u SLE se jedná o imunoglobuliny typu IgG) se musí pro prokázání positivity navázat pouze na volnou PCNA (nesmí být navázán na žádné jiné proteiny či jiné molekuly), jelikož místo vazby autoprottilátek na PCNA je totožné s místem, na které se váží ostatní funkční molekuly potřebné pro replikaci DNA. (24)

Obr. 28:



Průkaz anti-PCNA, nepřímá IF

Monoklonální protilátky klonu PC 10, získané z myši, izotypu IgG2a kappa, namířené proti PCNA jsou dle dodavatele využitelné pro následující metody: průtoková cytometrie, imunoblotting a imunohistochemické metody. Výrobce udává reaktivitu se zvířecí (krysy, primáti) i lidskou PCNA.¹

Na stimulovaných lidských lymfocytech vykazovala anti-PCNA protilátka pozitivitu, a to i při titru 1:100. Efektivita vazby je tedy pravděpodobně závislá na druhu substrátu

¹ *Anti-PCNA Purified* [online]. [cit. 2022-03-30]. Dostupné z: <https://www.exbio.cz/research-product/antibodies/nucleus/anti-pcna-purified>

či typu fixace. Je také možné, že lidské lymfocyty stimulované PHA lépe exprimovaly antigenní epitopy PCNA nežli HEp-2 buňky.

Průtoková cytometrie a imunoblotting jsou analytické metody schopné detekce určitých antigenních znaků ve velmi heterogenních vzorcích, a to i při nízké koncentraci daného antigenu. (9) Obě tyto metody byly schopné prokázat schopnost vazby anti-PCNA protilátky. Pro tyto stanovení se ovšem používá protilátka nenařaděná, a to by mohl být další důvod pozitivivity (vazby protilátky na daný antigen).

Vazba protilátek Anti-Cytokeratins (Purified, Clone C-11) a Anti-Cytokeratin 18 (Purified, Clone DC-10) byla prokazatelná ve všech využitých titrech a na rozdílných substrátech. Nebyla třeba žádná úprava v předchozí fixaci substrátu ani zvolení alternativního titru protilátek. Tyto protilátky jsou plně funkční, využitelné v laboratorním provozu.

Při ověřování protilátek Anti-alpha/beta Tubulin dimer (Purified, Clone TU-10) jsem nedocílila žádných pozitivních výsledků. Nebyly provedeny žádné úpravy fixace substrátu (HEp-2 buňky), ani změny v stupni nařazení protilátek.

K využití v přímé i nepřímé imunofluorescenci by měly být zvolené protilátky schopné vazby na hledané antigeny, a to v rozsahu nařazení 1:50 až 1:400. Pro analytické a diagnostické účely je potřeba funkčních setů protilátek, z tohoto důvodu se provádí jejich ověřování, za použití několika metod, v různých stupních nařazení.

Posuzování pozitivních výsledků v IF je zatíženou subjektivitou, odečítající osoba musí mít znalosti o strukturách daných buněk a orientovat se v preparátu při určování pozitivivity či negativity. (9)

ZÁVĚR

Závěrem mé práce jsou následující poznatky:

- a) Průkaz vazby anti-PCNA protilátek (Purified, Clone PC10) metodou imonofluorescence vyšel pozitivní pouze při titru 1:6, v praxi nepoužitelné
- b) Anti-PCNA (Purified, Clone PC10) protilátka je schopná vazby na PHA stimulovaných lymfocytech při titru 1:100
- c) Protilátky proti cytokeratinům (Purified, Clone C-11) a cytokeratinu 18 (Purified, Clone DC-10) jsou funkční, využitelné v praxi
- d) Protilátky anti-alfa/beta tubulin dimer (Purified, Clone TU-8) nevykazují schopnost vazby, jsou nefunkční
- e) Anti-PCNA protilátky (Purified, Clone PC10) lze aplikovat pro měření na průtokovém cytometru a metodu imunoblotu pro detekci PCNA v buněčných suspenzích

Souhrnné tabulky s hodnocením vazby protilátek

Tabulka 1, anti-PCNA:

Protilátka	Titř protilátky	Typ tkáňě	Výsledek
Anti-PCNA	1:50	Hep-2	Negativní
		Hep-2 s inhibicí 10 % FBS	Negativní
		ASMA	Negativní
		Hep-2, inkubace s 4,2 % paraformaldehydem	Negativní
		Hep-2, inkubace s 0,1 % tritonem	Negativní

Tabulka 2, anti-PCNA:

Protilátka	Titř protilátky	Typ tkáňě	Výsledek
Anti-PCNA	1:100	Hep-2	Negativní
		Hep-2 s inhibicí 10 % FBS	Negativní
		ASMA	Negativní
		Hep-2, inkubace s 4,2 % paraformaldehydem	Negativní
		Hep-2, inkubace s 0,1 % tritonem	Negativní

Tabulka 3, anti-PCNA:

Protilátka	Titř protilátky	Typ tkáňě	Výsledek
Anti-PCNA	1:200	Hep-2	Negativní
		Hep-2 s inhibicí 10 % FBS	Negativní
		ASMA	Negativní
		Hep-2, inkubace s 4,2 % paraformaldehydem	Negativní
		Hep-2, inkubace s 0,1 % tritonem	Negativní

Tabulka 4, anti-PCNA:

Protilátka	Titř protilátky	Typ tkáňě	Výsledek
Anti-PCNA	1:400	Hep-2	Negativní
		Hep-2 s inhibicí 10 % FBS	Negativní
		ASMA	Negativní
		Hep-2, inkubace s 4,2 % paraformaldehydem	Negativní
		Hep-2, inkubace s 0,1 % tritonem	Negativní

Tabulka 5, anti-PCNA:

Protilátka	Titř protilátky	Typ tkáňe	Výsledek
Anti-PCNA	1:6	Hep-2, inkubace s 4,2 % paraformaldehydem + inhibice 10 % FBS	POZITIVNÍ
	1:12	Hep-2, inkubace s 4,2 % paraformaldehydem + inhibice 10 % FBS	Negativní
	1:24	Hep-2, inkubace s 4,2 % paraformaldehydem + inhibice 10 % FBS	Negativní
	1:48	Hep-2, inkubace s 4,2 % paraformaldehydem + inhibice 10 % FBS	Negativní

Tabulka 6, anti-PCNA:

Protilátka	Titř protilátky	Typ tkáňe	Výsledek
Anti-PCNA	1:100	Stimulované lidské lymfocyty (PHA)	POZITIVNÍ

Tabulka 7, anti-cytokeratins:

Protilátka	Titř protilátky	Typ tkáňe	Výsledek
Anti-cytokeratins	1:50	Hep-2	POZITIVNÍ
		Hepatocyty	
	1:100	Hep-2	POZITIVNÍ
	1:200	Hep-2	POZITIVNÍ
	1:400	Hep-2	POZITIVNÍ

Tabulka 8, anti-cytokeratin 18:

Protilátka	Titř protilátky	Typ tkáňe	Výsledek
Anti-cytokeratin 18	1:50	Hep-2	POZITIVNÍ
	1:100	Hep-2	POZITIVNÍ
	1:200	Hep-2	POZITIVNÍ
	1:400	Hep-2	POZITIVNÍ

Tabulka 9, anti-alfa/beta tubulin dimer:

Protilátka	Titř protilátky	Typ tkáňe	Výsledek
Anti- α , β tubulin dimer	1:50	Hepatocyty	Negativní
	1:100	Hepatocyty	Negativní
	1:200	Hepatocyty	Negativní
	1:400	Hepatocyty	Negativní

11 SEZNAM LITERATURY

- 1) BARTŮŇKOVÁ, HOŘEJŠÍ. Základy imunologie - 5. vydání. TRITON s.r.o., 2013. 330 s. ISBN 978-80-7387-713-2.
- 2) LUKÁŠ, Zdeněk, a další. Základy histopatologických vyšetřovacích metod [online]. 2008. Dostupné z: <https://atlases.muni.cz/atlases/stud/pdf/histemet.pdf>
- 3) BERANOVÁ, Milena, TOLAR, Zbyněk. Principy a příklady imunohistochemie [online]. Plzeň. 2002. Dostupné z: http://histologie.lfp.cuni.cz/education/guides/ihc_hi_res.pdf
- 4) TAYLOR, Clive R., RUDBECK, Lars. Immunohistochemical Staining Methods [online]. 2013. Dostupné z https://www.agilent.com/cs/library/technicaloverviews/public/08002_ihc_staining_methods.pdf
- 5) BEJDÁK, Petr. Imunofluorescence [online]. Ústav klinické imunologie a alergologie. Fakultní nemocnice u sv. Anny a Lékařská fakulta MU. 2016. Dostupné z: <https://is.muni.cz/el/1411/podzim2016/BLKIM051c/um/imunofluorescence.pdf>
- 6) IM, Kyuseok, Sergey MARENINOV, M Fernando Palma DIAZ a William H. YONG. An Introduction to Performing Immunofluorescence Staining. Biobanking. [online]. New York. 2019. Methods in Molecular Biology. ISBN 978-1-4939-8933-1. Dostupné z: doi: 10.1007/978-1-4939-8935-5_26
- 7) ZHANG George. Direct immunofluorescence. 2017. [online]. Dostupné z: <https://dermnetnz.org/topics/direct-immunofluorescence>
- 8) CHHABRA S, Minz RW, Saikia B. Immunofluorescence in dermatology. *Indian Journal of Dermatology, Venereology, and Leprology*. [online]. Dostupné z: doi: 10.4103/0378-6323.102355.
- 9) BARTŮŇKOVÁ, Jiřina, Milan PAULÍK, et al. Vyšetřovací metody v imunologii. 2., přepracované a doplněné vydání. Praha: Grada Publishing, a.s., 2011. ISBN 978-80-247-3533-7
- 10) GONZÁLEZ-MAGAÑA A., Blanco FJ. Human PCNA Structure, Function and Interactions. *Biomolecules*. 2020. [online]. Dostupné z <https://doi.org/10.3390/biom10040570>

- 11) KELMAN Zvi. PCNA: structure, functions and interactions. *Oncogene*. 1997. Feb 13;14(6):629-40. DOI: 10.1038/sj.onc.1200886. [online]. Dostupné z <https://www.nature.com/articles/1200886.pdf>
- 12) JURÍKOVÁ, Miroslava, Ľudovít DANIHEL, Štefan POLÁK a Ivan VARGA. Ki67, PCNA, and MCM proteins: Markers of proliferation in the diagnosis of breast cancer. In: *Acta Histochemica* [online]. 2016, 2020, **118**(5), s. 544-552. ISSN 00651281. Dostupné z: doi:10.1016/j.acthis.2016.05.002
- 13) TOTH, D. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA); prognostic value in the clinical recurrence of primary basal cell carcinoma: Markers of proliferation in the diagnosis of breast cancer. In: *Journal of Dermatological Science* [online]. 1996, s. 36-40. ISSN 09231811. Dostupné z: doi:10.1016/0923-1811(95)00417-3
- 14) SHIINA, H., IGAWA, M., NAGAMI, H., YAGI, H., URAKAMI, S., YONEDA, T., SHIRAKAWA, H., ISHIBE, T., KAWANISHI, M. Immunohistochemical analysis of proliferating cell nuclear antigen, p53 protein and nm23 protein, and nuclear DNA content in transitional cell carcinoma of the bladder. *Cancer*. [online]. 1996 Dostupné z: [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0142\(19961015\)78:8<1762::AID-CNCR17>3.0.CO;2-W](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0142(19961015)78:8<1762::AID-CNCR17>3.0.CO;2-W)
- 15) LINDSTRÖM, Mikael S.; WALLIN, Keng-Ling. Prognostic role of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in cancer and other diseases. *Proliferating Cell Nuclear Antigen*, 2006. [online]. Dostupné z https://www.researchgate.net/profile/Mikael-Lindstroem-6/publication/244987997_Prognostic_role_of_proliferating_cell_nuclear_antigen_PCNA_in_cancer_and_other_diseases/links/552399860cf29dcabb0f060e/Prognostic-role-of-proliferating-cell-nuclear-antigen-PCNA-in-cancer-and-other-diseases.pdf
- 16) MAHLER, Michael, Kiyomitsu MIYACHI, Carol PEEBLES a Marvin J. FRITZLER. The clinical significance of autoantibodies to the proliferating cell nuclear antigen (PCNA). *Autoimmunity Reviews* [online]. 2012. ISSN 15689972. Dostupné z: doi:10.1016/j.autrev.2012.02.012

- 17) TZANG, B.-S., T.-Y. CHEN, T.-C. HSU, Y.-C. LIU a G. J TSAY. Presentation of auto-antibody to proliferating cell nuclear antigen in patients with chronic hepatitis B and C virus infection. *Annals of the Rheumatic Diseases* [online]. 1999. ISSN 0003-4967. Dostupné z: doi:10.1136/ard.58.10.630
- 18) KREJSEK, Jan, ANDRÝS, Ctirad, KRČMOVÁ, Irena. *Imunologie člověka*. 1. vydání. Hradec Králové. Garamon s.r.o., 2016. 495 s. ISBN 978-80-86472-74-4.
- 19) LÜLLMANN-RAUCH, Renate. *Histologie*. 1. vydání. Praha : Grada, 2012. 576 s. ISBN 978-80-247-3729-4.
- 20) MENZ, A., Weitbrecht, T., Gorbokon, N. Diagnostic and prognostic impact of cytokeratin 18 expression in human tumors: a tissue microarray study on 11,952 tumors. *Mol Med* **27**, 16 (2021). [online]. Dostupné z <https://doi.org/10.1186/s10020-021-00274-7>
- 21) PATOČKA, J., Strunecká, A. a Stiborová, M. 2001. Microtubule Inhibitors. *Chemické listy*. 95, 11 (pro. 2001). [online]. Dostupné z <http://www.chemicke-listy.cz/ojs3/index.php/chemicke-listy/article/view/2368/2368>
- 22) BORDEAUX Jennifer, a další. Antibody validation. *BioTechniques* [online]. 2010. ISSN 0736-6205. Dostupné z: doi:10.2144/000113382
- 23) FEDCHENKO, Nickolay a Janin REIFENRATH. Different approaches for interpretation and reporting of immunohistochemistry analysis results in the bone tissue – a review. *Diagnostic Pathology* [online]. 2014. ISSN 1746-1596. Dostupné z: doi:10.1186/s13000-014-0221-9
- 24) KOGURE, Toshiaki, Yoshinari TAKASAKI, Ken TAKEUCHI. Autoimmune responses to proliferating cell nuclear antigen multiprotein complexes involved in cell proliferation are strongly associated with their structure and biologic function in patients with systemic lupus erythematosus [online]. 2002. ISSN 0004-3591. Dostupné z: doi:10.1002/art.10606

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1: TAYLOR, Clive R., RUDBECK, Lars. Immunohistochemical Staining Methods [online]. 2013. Dostupné z https://www.agilent.com/cs/library/technicaloverviews/public/08002_ihc_staining_methods.pdf

Obr. 2: TAYLOR, Clive R., RUDBECK, Lars. Immunohistochemical Staining Methods [online]. 2013. Dostupné z https://www.agilent.com/cs/library/technicaloverviews/public/08002_ihc_staining_methods.pdf

Obr. 3: BEJDÁK, Petr. Imunofluorescence [online]. Ústav klinické imunologie a alergologie. Fakultní nemocnice u sv. Anny a Lékařská fakulta MU. 2016. Dostupné z: <https://is.muni.cz/el/1411/podzim2016/BLKIM051c/um/imunofluorescence.pdf>

Obr. 4: <https://www.rcsb.org/structure/1AXC>

Obr. 5 až 28: Zdroj vlastní

SEZNAM PŘÍLOH

- Příloha A – imunoblotting pro anti-PCNA protilátky

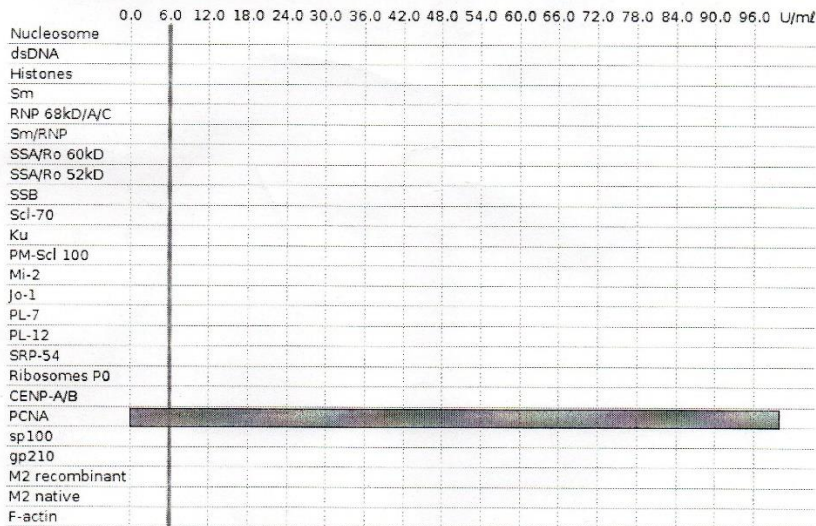
Name	Value
Kit	ANA25Q-24 - EA211078 - strip 8
Operator	uia
Scan date	1/14/22 11:28:08 AM
ID sample	kontrola
Warnings	First RC absent/not found. Invalid substrate : bad slope 0.00. Last RC absent/not found.
Modifications	Dots interpolated by uia "sp100" modified by uia "gp210" modified by uia "M2 recombinant" modified by uia "M2 native" modified by uia "F-actin" modified by uia "Nucleosome" modified by uia "dsDNA" modified by uia "Histones" modified by uia "Sm" modified by uia "RNP 68kD/A/C" modified by uia "Sm/RNP" modified by uia "SSA/Ro 60kD" modified by uia "SSA/Ro 52kD" modified by uia "SSB" modified by uia "Scl-70" modified by uia "Ku" modified by uia "PM-Scl 100" modified by uia "Mi-2" modified by uia "Jo-1" modified by uia "PL-7" modified by uia "PL-12" modified by uia "SRP-54" modified by uia "Ribosomes P0" modified by uia "CENP-A/B" modified by uia

RED : positive ; BLACK : Negative or Borderline

Image	Nr	Name	A(U/ml)	B(U/ml)	C(U/ml)	Mean	Result	CO value	Std dev
		First RC	6 AU	5 AU	5 AU	5 AU			0.29
	1	Nucleosome					-	6.00	
	2	dsDNA					-	6.00	
	3	Histones					-	6.00	
	4	Sm					-	6.00	
	5	RNP 68kD/A/C					-	6.00	
	6	Sm/RNP					-	6.00	
	7	SSA/Ro 60kD					-	6.00	
	8	SSA/Ro 52kD					-	6.00	
	9	SSB					-	6.00	
	10	Scl-70					-	6.00	
	11	Ku					-	6.00	
	12	PM-Scl 100					-	6.00	
	13	Mi-2					-	6.00	
	14	Jo-1					-	6.00	
	15	PL-7					-	6.00	
	16	PL-12					-	6.00	
	17	SRP-54					-	6.00	
	18	Ribosomes P0					-	6.00	
	19	CENP-A/B					-	6.00	
	20	PCNA	100	100	100	100	+	6.00	0.00
	21	sp100					-	6.00	
	22	gp210					-	6.00	
	23	M2 recombinant					-	6.00	
	24	M2 native					-	6.00	
	25	F-actin					-	6.00	
		Cal. 0 U/ml	0 AU	0 AU	0 AU	0 AU			0.00

- Příloha B – imunoblotting pro anti-PCNA protilátky

Image	Nr	Name	A(U/ml)	B(U/ml)	C(U/ml)	Mean	Result	CO value	Std dev
		Cal. 6 U/ml	1 AU	1 AU	1 AU	1 AU			0.10
		Cal. 12 U/ml	1 AU	1 AU	1 AU	1 AU			0.06
		Cal. 25 U/ml	1 AU	1 AU	1 AU	1 AU			0.05
		Cal. 50 U/ml	1 AU	1 AU	1 AU	1 AU			0.25
		Cal. 100 U/ml	3 AU	2 AU	3 AU	3 AU			0.51
		Conjugate IgG	69 AU	69 AU	69 AU	69 AU			0.17
		Conjugate IgM	0 AU	0 AU	1 AU	1 AU			0.23
		Conjugate IgA	0 AU	0 AU	0 AU	0 AU			0.05
		Substrate Control 1	1 AU	0 AU	1 AU	0 AU			0.28
		Substrate Control 2	0 AU	0 AU	0 AU	0 AU			0.12
		Substrate Control 3	1 AU	0 AU	0 AU	0 AU			0.22
		Last RC	1 AU	1 AU	2 AU	1 AU			0.30



Calibration curve	Line	
	Line	% black
	0 U/ml	0.00
	6 U/ml	0.69
	12 U/ml	0.73
	25 U/ml	0.75
	50 U/ml	0.97
	100 U/ml	2.94

PŘÍLOHY

Příloha A a B – Výsledky imunoblotu (detekce anti-PCNA protilátek)

Zdroj vlastní.