

Otrzymywanie przeciwciał IgY specyficznych wobec białka tNOX i jego wybranych epitopów

mgr inż. Maria Łęcka

Prezentowana rozprawa doktorska wpisuje się w tematykę badań dotyczących otrzymywania przeciwciał specyficznych wobec markerów nowotworowych oraz ich potencjalnego wykorzystania w projektowaniu testów diagnostycznych. Podstawowymi materiałami będącymi przedmiotem niniejszej rozprawy są przeciwciała klasy Y specyficzne wobec białka ENOX2 i jego wybranych epitopów.

Rozprawa doktorska zaczyna się od wprowadzenia, w którym scharakteryzowano białko ENOX2 oraz przeciwciała klasy Y oraz opisano ich potencjalne zastosowanie w diagnostyce nowotworowej.

W dalszej kolejności przedstawiono motywację oraz cele badawcze, którymi były: 1) immunizacja kur peptydowymi koniugatami i rekombinowanym białkiem ENOX2 oraz izolację specyficznych przeciwciał Y, 2) analizę biochemiczną otrzymanych przeciwciał Y, 3) detekcję białka ENOX2 w komórkach nowotworowych i surowicach pacjentów chorych na nowotwory oraz opracowanie prototypu testu diagnostycznego do wykrywania białka ENOX2 w próbkach biologicznych.

Następny, najobszerniejszy, rozdział przedstawia opis i dyskusję wyników przeprowadzonych badań. Pierwsza część badań opisuje analizę *in silico* sekwencji oraz struktury białka ENOX2, na podstawie której wybrane zostały fragmenty białka ENOX2, wykorzystane następnie do wygenerowania specyficznych przeciwciał Y. Zwierzęta immunizowano koniugatami białek nośnikowych z peptydowymi fragmentami białka ENOX2 lub rekombinowanym białkiem ENOX2, a następnie IgY izolowano z żółtka jaja kurzego metodą precipitacyjną. Dalej w części eksperymentalnej przeprowadzono charakterystykę przeciwciał Y polegającą na oznaczeniu ich specyficzności zarówno wobec białka ENOX2 jak i jego wybranych epitopów. Ponadto metodami ELISA oraz Western blot wyznaczono limit detekcji antygeny przez specyficzne IgY oraz ich miano. Następnie opisano modyfikacje przeciwciał Y, które umożliwiły zastosowanie znakowanych IgY m.in. w mikroskopii fluorescencyjnej. Modyfikowane przeciwciała wykorzystano do detekcji białka ENOX2 na powierzchni komórek nowotworowych, w lizatach komórek nowotworowych oraz próbkach surowicy pacjentów nowotworowych. Modyfikowane IgY wykorzystano również w prototypie testu diagnostycznego opartego o metodę sandwich ELISA, w której przeciwciała Y wykorzystano zarówno do wyłapywania antygeny, jak i jego detekcji. W ostatniej części badań eksperymentalnych opisano barwienie preparatów tkanek nowotworowych z wykorzystaniem specyficznych przeciwciał Y.

Ostatni rozdział rozprawy opisuje najważniejszych metod eksperymentalnych, które posłużyły do charakteryzacji uzyskanych przeciwciał Y (ELISA, Western blot, Dot blot, mikroskopia fluorescencyjna oraz immunohistochemia).

Podsumowując, pokazano, że przeciwciała Y wygenerowane wobec peptydowych fragmentów białka ENOX2 rozpoznają specyficznie zarówno antygen wobec którego zostały wygenerowane jak i rekombinowane białko ENOX2. Dla wszystkich grup przeciwciał Y udało się wyznaczyć miano oraz limit detekcji antygeny. Ponadto wygenerowane przeciwciała Y wykorzystano w prototypie testu diagnostycznego do detekcji białka ENOX2. Niestety niejednoznaczne wyniki mikroskopii fluorescencyjnej oraz immunohistochemii nie pozwoliły na potwierdzenie przydatności wygenerowanych przeciwciał Y w wymienionych technikach