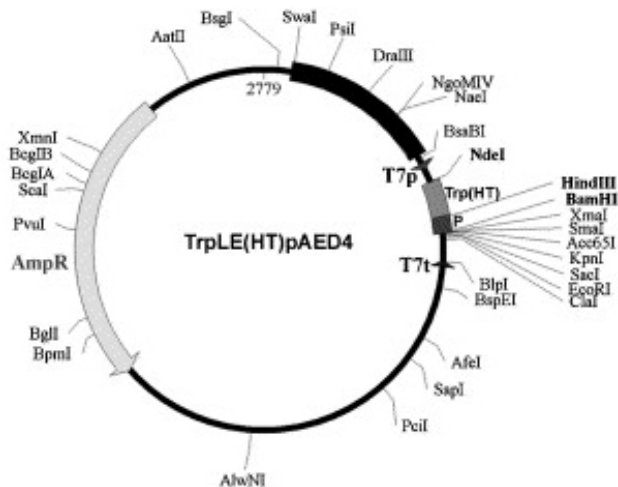
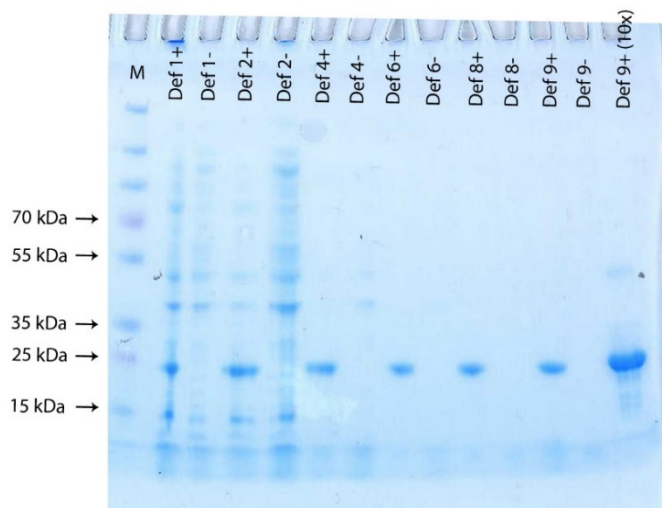


Kit pro detekci autoprotilátek proti enterickým alfa-defensinům

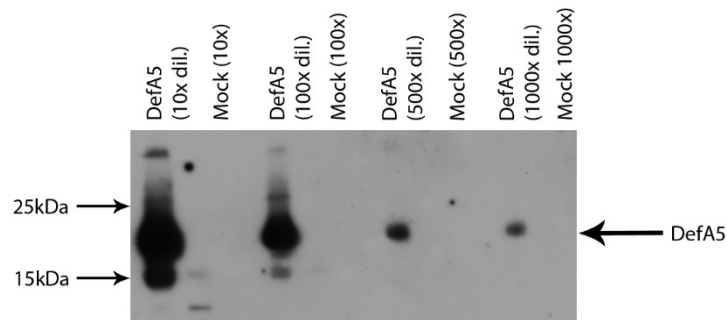
Lidský enterický α -defensin HD5 byl naší laboratoří již dříve popsán jako nový a klinicky důležitý autoantigen autoimunitního onemocnění zvané APECED (Dobeš et al, 2015, *Gastroenterology* 149:139-50). Protože až 30% APECED pacientů vykazuje v séru přítomnost autoprotilátek proti HD5, detekce jejich přítomnosti by mohla být využita jako marker tohoto autoimunitního onemocnění. Pro zavedení detekce přítomnosti sérových HD5 autoprotilátek do experimentální i klinické praxe jsme překlonovali rekombinantní protein HD5 (rHD5) do expresního vektoru a dále testovali na specifitu a sensitivitu pro séra HD5 seropozitivních pacientů. Gen HD5 byl zaklonován do TrpLE(HT)pAED4 vektoru (obr.1) a jeho produkt byl vyprodukován v bakteriích, následně izolován a detekován na gelu Coomassie barvením (obr.2). Následující experimenty potvrdily, že rHD5 může být senzitivně rozpoznán jak komerčně dostupnou protilátkou, tak i pomocí sér APECED pacientů pozitivních na defensin (obr. 4 a 5), přičemž sérum zdravého jedince bylo použito jako negativní kontrola (obr.4).



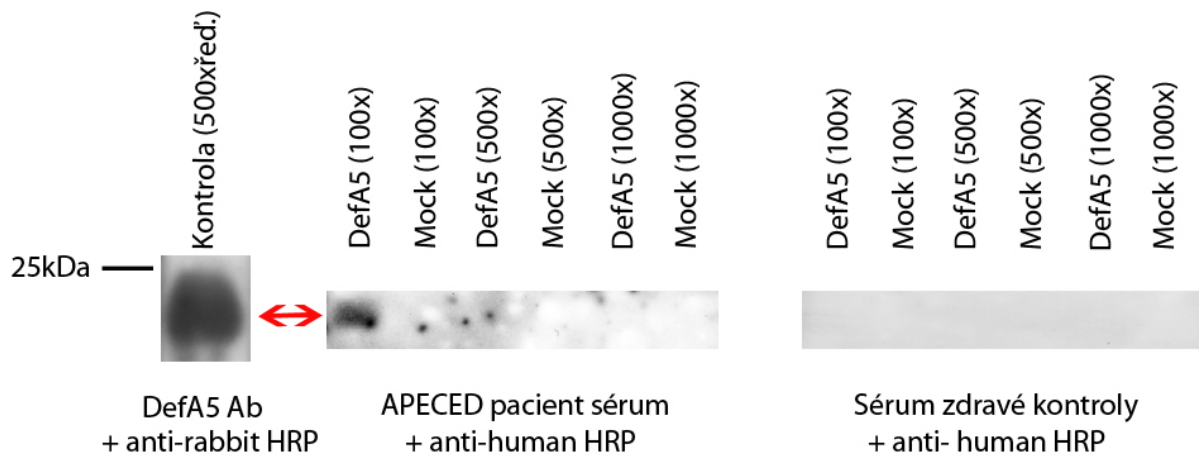
Obr.1 Schematické znázornění expresního vektoru pAED s vloženými sekvencemi kódujícími tryptofanový operon *E. coli* (*trp* Δ LE 1413) a $(\text{His})_6$ afinitní značku (Trp(HT)). P (umístěné mezi restrikcími místy HindIII a BamHI) označuje pozici DNA sekvencí kódujících α -defensiny (M Pazgier, J Lubkowski, Expression and purification of recombinant human α -defensins in *Escherichia coli*, Protein Expr Purif. 2006 Sep;49(1):1-8.).



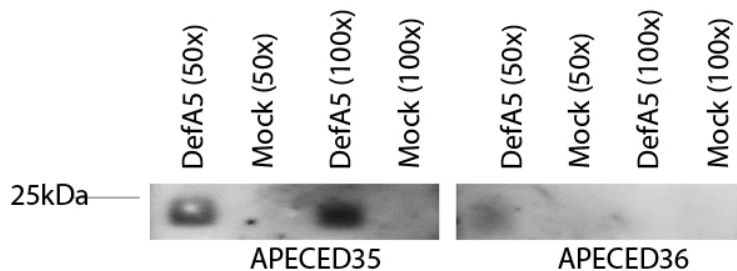
Obr.2 Gel obarvený za použití Coomassie blue znázorňuje DEFA5 protein izolovaný z *E. coli* po indukci isopropyl β -D-1-thiogalactopyranosidem (IPTG). Def1+ až Def9+ představuje 1. až 9. frakci TrpLE(HT)pAED4-DefA5 získanou během uvolňování proteinu z inkluzních tělísek bakterií. Def1- až Def9- představuje prázdný vektor TrpLE. Def9+ (10x) představuje konečný produkt TrpLE(HT)pAED4-DefA5 izolace a byl na gel nanesen v 10x vyšší koncentraci oproti ostatním frakcím.



Obr.3 Western blot proteinu DEFA5 (23kDa) izolovaného z E.coli po indukci IPTG a jeho uvolnění z bakteriálních inkluzních tělísek. Gel byl označen králičí polyklonální protilátkou proti DEFA5 (Abnova) a sekundární protilátkou konjugovanou HRP.



Obr. 4 Western blot séra APECED pacienta a zdravé kontroly. Séra byla testována na přítomnost autoreaktivních protilátek proti lidskému proteinu DEFA5.



Obr.5 Western blot sér APECED pacientů č.35 a č.36, která byla testována na přítomnost autoreaktivních protilátek proti lidskému proteinu DEFA5.

Závěr: Výsledky ukazují, že nově připravený rekombinantní lidský enterický defensin HD5 (rHD5) je vhodný substrát pro detekci přítomnosti autoprotiátek u pacientů trpících APECED, ale i jinými typy střevních autoimunitních onemocnění. Výroba ELISA kitu pro detekci HD-5 specifických protilátek je v přípravě.

V případě zájmu o další informace ohledně rHD5, nebo zakoupení neexklusivní licence na jeho produkci, se obraťte na **Centrum pro Transfer Technologii**, ÚMG AVČR, Vídeňská 1083, 14220 Praha 4, Tel. (420-241 063 227 nebo 420-602 892 876).