

# Inimese ionotroopse purinoretseptori P2X4 vastaste monoklonaalsete antikehade loomine ja osaline iseloomustamine

Bakalaureuse töö  
Taavi Salo

## Kokkuvõte

Käesoleva töö eesmärgiks oli leida monoklonaalsed antikehad, mis tunneksid ära inimese P2X4 retseptori ekstratsellulaarse osa. Monoklonaalsete antikehade eeliseks on väga kõrge spetsiifilisus ja seega sobivad need kasutamiseks edasistes teadustöodes, diagnostikas ja immuunravis.

P2X4 kuulub puriinergiliste retseptorite perekonda. Tegemist on katioonkanalitega, mille peamiseks ligandiks on rakuväline ATP. Kuna P2X4 retseptorid on ekspresseeritud suures hulgas just kesknärvisüsteemis ja gliiarakkudes siis on nende osalus väga suur mitmetes neuroloogilistes protsessides. P2X4 seost neuropaatilise valu, põletiku põhjustatud valu ning alkoholi eelistusega on kirjeldatud ka käesolevas töös. Tänu P2X4 ekstratsellulaarset osa ära tundvatele antikehadele oleks võimalik luua uudseid ravimeid retseptori vahendavate protsesside reguleerimiseks.

Monoklonaalsete antikehade saamiseks immuniseeriti neli C57BL/6 hiirt. Antigeenina kasutati inimese P2X4 retseptori ekstratsellulaarset osa, mis kloonitati pET11C vektorisse ja üle-ekspresseeriti *Escherichia coli* abil (Viiu Paalme töö). Fusiooniks valiti kaks suurima P2X4 retseptori vastaste antikehade tiitriga hiirt. Hübridoomi rakud saadi põrnarakkude liitmisel Sp2/0 HAT-tundlike hiire müleoomi rakkudega (viidi läbi Sirje Rüütel-Baudinot ja Viiu Paalme poolt). Hübridoomide kultuuri supernatandid skriinitsi ELISA meetodil kasutades inimese

rekombinantset P2X4 ekstratsellulaarse osa valku. Positiivset tulemust (antikeha tootvad rakud) näidanud hübriidoomidest isoleeriti üksikud rakud piirlahjenduse meetodil, et tagada ühest rakust alguse saanud rakukultuurid.

Saadud kultuurid testiti omakorda ELISA meetodil ning positiivsed tulemused kinnitati üle ka FACS analüüsil kasutades inimese P2X4 retseptoriga transfekteeritud HEK293 rakke. Negatiivseks kontrolliks tehti paralleelselt katse mittetransfekteeritud HEK293 rakkudega. Kogutud ja testitud supernatandid osutusid positiivseks ka Orsay Ülikooli tehtud kontrollkatsetes, kus kasutati inimese kroonilise müeloidse leukeemia (K562) ja hiire lümfoomi (BW5147) rakuliine. Positiivseks osutunud rakukultuuridest osa rakke ka külmutati avamaks võimaluse kasutada neid rakke ka tuleviku katsetes. Töö käigus leiti 20 monoklonaalset hübriidoomi mis osutusid inimese P2X4 vastaste antikehade tootmise suhtes positiivseks. Nendest valiti välja 6 kultuuri millega viidi läbi edasised katsed ELISA ja FACS abil.

Hetkel turul olevad P2X4 vastased antikehad on spetsiifilised retseptori intratsellulaarsele osale. Antud töö näitab, et toodetud monoklonaalsed antikehad on võimelised spetsiifiliselt ära tundma inimese puriinergilise retseptori P2X4 ekstratsellulaarset osa. Projekti pikaajaliseks eesmärgiks on antikehi kasutades uurida P2X4 retseptori rolli neuropaatilise ja inflamatooorse valu signaliseerimise protsessides ning võimalusi uudsete ravimite väljatöötamiseks.