

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická

Zavedení metody pro průkaz a kvantifikaci specifických anti-ENO1 protilátek  
v séru pacientů s mnohočetným myelomem v remisi

Diplomová práce

2022

Hana Vimmerová

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Akademický rok: 2021/2022

# ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Hana Vimmerová**  
Osobní číslo: **C20489**  
Studijní program: **N0914P360001 Bioanalytická laboratorní diagnostika ve zdravotnictví**  
Téma práce: **Zavedení metody pro průkaz a kvantifikaci specifických anti-ENOL protilátek v séru pacientů s mnohočetným myelomem v remisi**  
Téma práce anglicky: **Implementation of Analytical Methods For Detection and Quantification of Specific Anti-Enol IgG In Serum of Patients With Multiple Myeloma In Remission**  
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

## Zásady pro vypracování

### Teoretická část:

- 1) Stručný popis onemocnění mnohočetný myelom – patogeneze onemocnění, symptomy, laboratorní diagnostika, terapie, metody používané k monitorování průběhu onemocnění a k ověřování účinnosti terapie – současný stav poznání.
- 2) Protinádorová imunita – popis složek IS, které se na vyhledávání nádorových buněk a na vlastní protinádorové imunitě podílejí. Větší prostor věnovat tzv. difúzním nádorům, hematologickým onemocněním. Jakou roli hrají nebo mohou hrát tzv. autoprotilátky v případě difúzních nádorů, jsou nedílnou součástí protinádorové imunity? Je možné je použít k imunoterapii pacientů s tímto typem onemocnění?
- 3) Princip metody ELISA, její využití pro průkaz a kvantifikaci specifických protilátek. Princip elektroforetické separace sérových proteinů s imunochemickou detekcí na membráně.

### Experimentální část:

- 1) Použití elektroforetických technik a Western Blot metody pro analýzu proteinů v lidských sérech.
- 2) Vývoj a optimalizace metody pro analýzu imunoproteomu a průkaz specifických (auto)protilátek u pacientů s mnohočetným myelomem v remisi.
- 3) Optimalizace podmínek pro rutinní stanovení anti-ENOL protilátek v reálných vzorcích séra nebo plazmy odebraných pacientům s MM.

Rozsah pracovní zprávy: **35 s.**  
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**  
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

K textu použít relevantní internetové zdroje, průběžně sledovat novinky v oboru.

Vedoucí diplomové práce: **prof. RNDr. Zuzana Bílková, Ph.D.**  
Katedra biologických a biochemických věd  
Konzultant diplomové práce: **Mgr. Marcela Slováková, Ph.D.**  
Katedra biologických a biochemických věd  
Datum zadání diplomové práce: **18. prosince 2021**  
Termín odevzdání diplomové práce: **6. května 2022**

**prof. Ing. Petr Kalenda, CSc. v.r.**  
děkan

L.S.

**prof. Mgr. Roman Kandár, Ph.D. v.r.**  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2022

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 6.5. 2022

Hana Vimmerová

## PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych zde poděkovala vedoucí mé diplomové práce prof. RNDr. Zuzaně Bílkové, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady a připomínky, profesionální přístup. Dále bych chtěla poděkovat doc. RNDr. Lucii Korecké, PhD. a Mgr. Marcele Slovákové, PhD. za pomoc při práci v laboratoři. Poděkování patří také mé rodině za podporu po celou dobu studia.

## ANOTACE

Práce se zabývá vývojem metod, kterými by se daly prokázat a kvantifikovat specifické anti-ENO1 protilátky v séru pacientů s mnohočetným myelomem v remisi. V teoretické části práce je nejprve popsáno onemocnění mnohočetný myelom s důrazem na jeho diagnostiku. Dále je podrobněji popsána role enolázy v průběhu nádorového bujení a jakým způsobem se uplatňuje funkce imunitního systému v boji proti nádorům. V závěru teoretické části je přehled a základní charakteristika metod, pomocí nichž lze prokazovat a kvantifikovat specifické protilátky. Mezi tyto metody patří mj. ELISA a Dot blot. V experimentální části jsou tyto tři základní metody použity pro průkaz a kvantifikaci specifických anti-ENO1 protilátek v séru pacientů s mnohočetným myelomem v období remise. Součástí experimentu bylo i zavedení metody pro stanovení aktivity rekombinantní formy enzymu ENO1. Vzhledem k omezené reaktivitě specifických protilátek s rekombinantní formou enolázy ENO1 byla zařazena i metoda SERPA pomocí níž bylo možné monitorovat reaktivitu přirozených patientských protilátek s nativní formou enzymu ENO1.

## KLÍČOVÁ SLOVA

Mnohočetný myelom,  $\alpha$ -enoláza, ELISA, anti-ENO1 protilátky

## TITLE

Implementation of Analytical Methods for Detection and Quantification of Specific Anti-ENO1 IgG in Serum of Patients with Multiple Myeloma in Remission

## ANNOTATION

This thesis deals with the development of methods that could be used to detection and quantification specific anti-ENO1 antibody in the serum of patients with multiple myeloma in remission. The theoretical part of this thesis describes the disease multiple myeloma with emphasis on its diagnosis. Then it is described in more detail the role of enolase during tumor growth and the function of the immune system works in the fight against tumors. The conclusion of the theoretical part is an overview and basic characteristics of methods that can be used to detection and quantification specific antibodies. These methods are ELISA and Dot blot. In the experimental part, these three basic methods are used for the detection and quantification of specific anti-ENO1 antibodies in the serum of patients with multiple myeloma in remission. Part of the experiment was the introduction of a method for determining the activity of the recombinant form of enzyme ENO1. Due to limited reactivity of specific antibodies with the recombinant form of enolase ENO1, it was included the SERPA method, which made it possible to monitor the reactivity of natural patient antibodies with the native form of the enzyme ENO1.

## KEYWORDS

Multiple myeloma,  $\alpha$ -enolase, ELISA, anti-ENO1 antibodies

# OBSAH

SEZNAM OBRÁZKŮ .....	10
SEZNAM TABULEK.....	12
SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK.....	13
ÚVOD .....	17
1 Teoretická část .....	18
1.1 Mnohočetný myelom .....	18
1.1.1 Patogeneze mnohočetného myelomu a průběh onemocnění.....	18
1.1.2 Klinický obraz mnohočetného myelomu .....	19
1.1.3 Diagnostika mnohočetného myelomu.....	21
1.1.4 Metody používané při diagnostice mnohočetného myelomu.....	22
1.1.5 Monitorování průběhu onemocnění a ověřování účinnosti terapie .....	30
1.1.6 Terapie mnohočetného myelomu .....	31
1.2 Nádorové buňky .....	35
1.2.1 Myelomová buňka.....	36
1.3 Protinádorová imunita .....	38
1.3.1 Složky imunitního systému podílející se na protinádorové imunitě .....	38
1.3.2 Autoimunita.....	41
1.3.3 Role autoprotilátek v protinádorové imunitě .....	42
1.4 Enoláza.....	43
1.4.1 Struktura a funkce $\alpha$ -enolázy .....	43
1.4.2 Vztah enolázy a onemocnění mnohočetný myelom.....	45
1.5 Přehled metod pro průkaz specifických protilátek v kapalných vzorcích.....	47
1.5.1 Princip metody ELISA.....	47
1.5.2 Využití metody ELISA pro průkaz specifických protilátek.....	50
1.5.3 Validace metody ELISA .....	50
1.5.4 Metody sloužící k ověřování analytických parametrů metody .....	51
1.5.5 Western blot .....	53
1.5.6 Dot blot .....	55
1.5.7 Turbidimetrie v prostředí PEG.....	56
2 Cíle diplomové práce .....	57
3 Experimentální část.....	58
3.1 Přístroje a pomůcky.....	58
3.2 Chemikálie a reagenty .....	60
3.3 Enzymy, protilátky, buněčné linie a další bioaktivní látky .....	63
3.4 Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v prostředí dodecylsulfátu sodného (SDS-PAGE)	64
3.5 Stanovení aktivity enolázy .....	67



3.6	ELISA .....	69
3.7	DOT BLOT .....	71
3.8	SERPA .....	73
3.8.1	Příprava buněčného lyzátu .....	73
3.8.2	Rehydratace gelových proužků .....	73
3.8.3	Izoelektrická fokuzace .....	74
3.8.4	2D SDS-PAGE a ekvilibrace gelový proužeků.....	74
3.8.5	Semi-Dry Western blot .....	76
3.8.6	Barvení proteinů na membráně .....	76
3.8.7	Imunodetekce na promývače Flexi Wash 400 a detekce imunoreaktivních spotů.....	77
4	Výsledky a diskuze .....	78
4.1	Ověření kvality a množství rekombinantního enzymu ENO1 pomocí metody SDS-PAGE .	79
4.2	Zavedení metody pro stanovení aktivity enzymu v roztoku pomocí Warburgova testu.....	80
4.2.1	Stanovení absorpčního maxima fosfoenolpyruvátu .....	80
4.2.2	Stanovení aktivity enolázy při vlnové délce 230 nm .....	81
4.2.3	Stanovení aktivity enolázy při vlnové délce 240 nm .....	81
4.2.4	Stanovení aktivity ENO1 v reakčním prostředí se stoupající koncentrací substrátu.....	82
4.3	Zavedení metody ELISA sendvičového typu pro průkaz a kvantifikaci anti-ENO1 protilátek 84	
4.3.1	Metoda ELISA v sendvičovém uspořádání pro stanovení množství specifických protilátek s titrací séra obsahující anti-CHT protilátky .....	85
4.3.2	Metoda ELISA – optimalizace množství antigenu a biokonjugátu.....	86
4.3.3	Titrace anti-ENO1 protilátek.....	87
4.4	Ověření reaktivity anti-ENO1 protilátek metodou Dot blot.....	90
4.5	Metoda SERPA pro semikvantitativní stanovení anti-ENO1 IgG .....	91
4.5.1	Ověření reaktivity anti-ENO1 protilátek ze séra pacienta s nativní formou ENO1 .....	91
4.5.2	Průběh semikvantitativního stanovení anti-ENO1 protilátek v sérech pacientů s MM .	92
5	Závěr .....	94
6	Literatura .....	95
7	Přílohy .....	110

## SEZNAM OBRÁZKŮ

<b>Obrázek 1:</b> Karyotyp pacienta s MM, šipkami jsou označeny translokace t(14q32) a t(8q24.1).....	24
<b>Obrázek 2:</b> Denzitometrické vyhodnocení elektroforézy proteinů ze séra zdravého člověka s porovnáním pacienta s MM .....	25
<b>Obrázek 3:</b> Vlevo je záznam výsledku analýzy séra pacienta, kterému diagnostikovali MM metodou imunofixace.....	26
<b>Obrázek 4:</b> RTG snímky lebky, hrudníku a paže pacienta s MM.....	27
<b>Obrázek 5:</b> Porovnání snímku bederní páteře z MRI pacienta s mnohočetným myelomem a zdravého člověka. ....	29
<b>Obrázek 6:</b> Metoda Hevylite pro analýzu páru lehkých a těžkých řetězců Ig $\kappa$ a $\lambda$ .....	31
<b>Obrázek 7:</b> Schéma znázorňující působení Bortezomibu .....	33
<b>Obrázek 8:</b> Schéma HDT-ASCT u pacienta s MM .....	34
<b>Obrázek 9:</b> Krevní nátěr pacienta s MM .....	37
<b>Obrázek 10:</b> Kooperace jednotlivých složek protilátkové a buněčné imunity při napadení organismu patogenem. ....	40
<b>Obrázek 11:</b> 3D struktura ENO1 .....	44
<b>Obrázek 12:</b> Schéma zapojení a terapeutický potenciál ENO1i jako imunometabolického cíle.....	46
<b>Obrázek 13:</b> Schéma 4 typů ELISA testu: přímé, nepřímé, sendvičové a kompetitivní uspořádání ....	48
<b>Obrázek 14:</b> Schematické znázornění postupu Western blotu a následný průkaz.....	54
<b>Obrázek 15:</b> Schematický diagram metody Dot blot.....	56
<b>Obrázek 16:</b> Záznam SDS-PAGE – ověření kvality a množství ENO1. ....	79
<b>Obrázek 17:</b> Měření absorpčního spektra fosfoenolpyruvátu na spektrofotometru Libra S22.....	80
<b>Obrázek 18:</b> Závislost změny absorbance v čase při stanovení aktivity enolázy při vlnové délce 230 nm na spektrofotometru Libra S22 .....	81
<b>Obrázek 19:</b> Závislost enzymové aktivity v čase při vlnové délce 240 nm.....	82
<b>Obrázek 20:</b> Stanovení aktivity enzymu ENO1 spektrofotometrickou metodou: závislost změny absorbance v čase při 30 °C. ....	83
<b>Obrázek 21:</b> Stanovení aktivity enzymu ENO1 spektrofotometrickou metodou: závislost změny absorbance v čase při 37 °C .....	83
<b>Obrázek 22:</b> Stanovení aktivity enzymu ENO1 spektrofotometrickou metodou: závislost změny absorbance v čase při 25 °C .....	84
<b>Obrázek 23:</b> Titrace specifických anti-CHT protilátek metodou ELISA ve čtyřech opakováních. ....	85
<b>Obrázek 24:</b> Výsledek Dot blotu s anti-ENO1 protilátkami při různém množství ENO1.....	90
<b>Obrázek 25:</b> Schéma metody SERPA s následným vyhodnocením .....	91
<b>Obrázek 26:</b> Výsledek imunoblotové analýzy kontrolního pozitivního séra ředěného 1: 500. ....	92
<b>Obrázek 27:</b> Výřez gelů z 2D mapy, kde se nachází enzym ENO1. ....	92

<b>Obrázek 28:</b> Výřez ENO1 z gelů z 2D mapy. ....	93
<b>Obrázek 29:</b> Výsledek metody SERPA, ředění séra 1:1000, červeným kroužkem je označena ENO1 .....	110
<b>Obrázek 30:</b> Výsledek metody SERPA, ředění séra 1:1500, červeným kroužkem je označena ENO1 .....	110
<b>Obrázek 31:</b> Výsledek metody SERPA, ředění séra 1:2000, červeným kroužkem je označena ENO1 .....	111
<b>Obrázek 32:</b> Výsledek metody SERPA, ředění séra 1:500, červeným kroužkem jsou označeny 2 izoformy ENO1.....	111
<b>Obrázek 33:</b> Výsledek metody SERPA, ředění séra 1:1000, červeným kroužkem jsou označeny 2 izoformy ENO1.....	111
<b>Obrázek 34:</b> Výsledek metody SERPA, ředění séra 1:1500, červeným kroužkem jsou označeny 4 izoformy ENO1.....	111

## SEZNAM TABULEK

<b>Tabulka 1:</b> Kritéria mnohočetného myelomu dle Durieho a Salmona. ....	21
<b>Tabulka 2:</b> Diagnostika mnohočetného myelomu .....	22
<b>Tabulka 3:</b> Příprava gelu pro elektroforézu. ....	66
<b>Tabulka 4:</b> Příprava vzorků pro měření na spektrofotometru.....	68
<b>Tabulka 5:</b> Příprava směsného roztoku dle počtu gelových proužků .....	73
<b>Tabulka 6:</b> Schéma optimalizace testu ELISA. ....	86
<b>Tabulka 7:</b> Naměřené hodnoty absorbance pozitivních a negativních sér.....	87
<b>Tabulka 8:</b> Vypočtené hodnoty poměr pozitivních a negativních sér. ....	87
<b>Tabulka 9:</b> Schéma aplikace vzorků do destičky.....	88
<b>Tabulka 10:</b> Naměřené výsledné absorbance sér.....	88
<b>Tabulka 11:</b> Schéma aplikace vzorků do destičky.....	89
<b>Tabulka 12:</b> Naměřené výsledné absorbance sér.....	89

## SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

Ab	protilátka (z angl. „Antibody“)
Ag	antigen (z angl. „Antigen“)
ANA	antinukleární protilátky (z angl. „Antinuclear Antibodies“)
APC	antigen prezentující buňka (z angl. „Antigen Presenting Cell“)
ATP	adenosintrifosfát (z angl. „Adenosine Triphosphate“)
β2-MG	beta2-mikroglobulin
Breg	regulační B-lymfocyt (z angl. „Regulatory B Cell“)
CD	diferenciační skupina (z angl. „Cluster of Differentiation“)
CEA	karcioembryonální antigen (z angl. „Carcinoembryonic Antigen“)
CNS	centrální nervová soustava
CRP	C-reaktivní protein
CT	výpočetní tomografie (z angl. „Computed Tomography“)
CTL	cytotoxický T-lymfocyt (z angl. „Cytotoxic T Lymphocyte“)
CV	variační koeficient (z angl. „Coefficient of Variation“)
DAA	antigeny asociované s onemocněním (z angl. „Disease-Associated Antigens“)
DNA	deoxyribonukleová kyselina (z angl. „Deoxyribonucleic Acid“)
EIA	enzymová imunoanalytická metoda (z angl. „Enzyme Immunoassay“)
ELISA	enzymová imunoanalýza (z angl. „Enzyme-Linked Immunosorbent Assay“)
ENO1	lidská enoláza 1
ENO1i	inhibitor enolázy 1
FISH	fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace
FLC	volné lehké řetězce (z angl. „Free Light Chain“)
FW	sedimentace erytrocytů (z angl. „Fahraeus Westergren“)

G-CSF	granulocyty stimulující faktor (z angl. „Granulocyte Colony Stimulating Factor“)
HBsAg	povrchový antigen HBV (z angl. „Hepatitis B Surface Antigen“)
HBV	virus hepatitidy B (z angl. „Hepatitis B Virus“)
hCG	choriový gonadotropin (z angl. „Human Chorionic Gonadotropin“)
HDAC	histon deacetyláza (z angl. „Histone Deacetylases“)
HDT-ASCT	vysokodávkovaná chemoterapie s autologní transplantací krvetvorných buněk (z angl. „High Dose Therapy with Autologous Stem Cell“)
HHV	lidský herpes virus (z angl. „Human Herpesvirus“)
HIV	lidský virus imunitní nedostatečnosti (z angl. „Human Immunodeficiency Virus“)
HLA	histokompatibilitní komplex (z angl. „Human Leucocyte Antigen“)
HLC	těžké/lehké řetězce (z angl. „Heavy/Light Chain“)
CHT	chymotrypsin
IgA	imunoglobulin třídy A
IgD	imunoglobulin třídy D
IgE	imunoglobulin třídy E
IgG	imunoglobulin třídy G
IgH	těžký řetězec imunoglobulinu (z angl. „Imunoglobulin Heavy Chain“)
IgL	lehký řetězec imunoglobulinu (z angl. „Imunoglobulin Light Chain“)
IgM	imunoglobulin třídy M
IEF	izoelektrická fokuzace
IκB	IkappaB kináza
IL	interleukin

IMiDs	imunomudační léky na bázi thalidomidu (z angl. „Immunomodulatory Imide Drugs“)
INF	interferon
IP	indukovatelný protein (z angl. „Induced Protein“)
LOD	mez detekce (z angl. „Limit of Detection“)
LOQ	mez stanovitelnosti (z angl. „Limit of Quantification“)
MAPK	mitogenem aktivované proteinkinázy (z angl. „Mitogen Activated Protein Kinases“)
MG	monoklonální gamapatie (z angl. Monoclonal Gammopathy“)
MGUS	monoklonální gamapatie neurčitého významu (z angl. „Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance“)
MM	mnohočetný myelom (z angl. „Multiple Myeloma“)
MRI	magnetická rezonance (z angl. „Magnetic Resonance Imaging“)
MSE	svalově specifická enoláza (z angl. Muscle Specific Enolase)
mRNA	jednovláknová templátová ribonukleová kyselina (z angl. Messenger Ribonucleic Acid“)
NC	nitrocelulóza
NF- $\kappa$ B	nukleární faktor kappa B – transkripční faktor
NK	přirození zabíječi (z angl. „Natural Killer“)
NNE	non-neurální enoláza (z angl. „Non-Neural Enolase“)
NSE	neuron-specifická enoláza (z angl. „Neuron-Specific Enolase“)
p53	protein 53
PBMC	periferní krev mononukleárních buněk (z angl. „Peripheral Blood Mononuclear Cell“)

PD	programovaná buněčná smrt (z angl. „Programed Cell Death“)
pDC	plazmocytoidní dendritická buňka (z angl. „Plasmacytoid Dendritic Cell“)
PET	pozitronová emisní tomografie
PSA	prostatický specifický antigen
PVDF	polyvinylidendifluorid
RI	radioimunoanalýza (z angl. „Radioimmunoassay“)
RTG	rentgen
SDS-PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v prostředí dodecylsulfátu sodného (z angl. „Sodium Dodecylsulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis“)
SERPA	metoda pro analýzu imunoproteomu (z angl. „Serological Proteome Analysis“)
SMM	doutnající mnohočetný myelom (z angl. „Smoldering Multiple Myeloma“)
TAA	antigeny asociované nádory (z angl. „Tumor-Associated Antigen“)
TAA-AAbs	autoprotilátky proti antigenům asociovaných s nádory (z angl. „Tumor-Associated Antigens Autoantibodies“)
TCR	T-buněčný receptor (z angl. „T-Cell Receptor“)
TIL	lymfocyty infiltrující nádory (z angl. „Tumor Infiltrating Lymphocytes“)
TNF	faktor nádorové nekrózy (z angl. „Tumor Necrosis Factor“)
TSA	nádorově specifický antigen (z angl. „Tumor-Specific Antigen“)
Treg	regulační T-lymfocyt (z angl. „Regulatory T cell“)



## ÚVOD

Mnohočetný myelom je druhou nejčastější lymfoproliferativní poruchou, která se vyznačuje abnormální expanzí monoklonálních plazmatických buněk, tzv. myelomových buněk, které mají tendenci ukládat se v kostní dřeni. Maligní plazmatické buňky produkují velké množství imunoglobulinů. Tyto identické imunoglobuliny jsou známy pod názvem monoklonální protein nebo také paraprotein. Pomocí elektroforézy a následné imunofixace lze identifikovat frakci sérového proteinu a třídu imunoglobulinů. Dalšími laboratorními metodami, jak podpořit diagnózu MM je cytogenetické vyšetření karyotypu. Nedílnou součástí diagnostiky MM je i vyšetření zobrazovacími metodami jako jsou např. RTG, CT, MRI a PET a analýza buněk kostní dřene v bioptickém vzorku tkáně.

Diagnostika u pacientů s MM by měla být včasná, aby se co nejdříve zahájila léčba. K monitorování léčby slouží metody FDG-PET metoda, dále lze použít FDG-PET/CT a Hevylite<sup>TM</sup>. Důležité je vědět, zda se do boje proti nádorovým buňkám zapojil i vlastní imunitní systém. Pokud u pacienta funguje protinádorová imunita, bude pacient lépe odpovídat na léčbu, a o to dříve má pacient dosáhnout tzv. kompletní remise. Nižší je poté i frekvence relapsů. Protinádorová imunita spočívá v tvorbě specifických cytotoxických buněk a v syntéze specifických protilátek. Tyto protilátky jsou nejčastěji namířeny proti strukturám specifických pro nádorové buňky. Jednou z cílových struktur, jak dokazují i mnohé vědecké práce, je i enzym enoláza.

Tento enzym, především jeho izoforma ENO1, je glykolytickým enzymem v cytoplazmě prokaryotických a eukaryotických buněk. Je exprimována na povrchu několika typů buněk, kde působí jako plasminogenní receptor. Účastní se řady procesů, jako je autoimunita, tolerance k hypoxii a buněčný růst. ENO1 je exprimována v širokém spektru lidských nádorů, což z ní činí kandidáta na biomarker rakoviny. Lokalizace ENO1 na povrchu rakovinných buněk také poskytuje vynikající příležitost pro vývoj malých molekul s vysokou afinitou k tomuto proteinu, což umožňuje cílenou destrukci nádorových buněk.

# 1 TEORETICKÁ ČÁST

## 1.1 Mnohočetný myelom

Termín mnohočetný myelom (MM) či jinak nazývaný plazmocytom byl poprvé použit již v roce 1873. Poprvé tento název použil von Rustizky, který popsal i vzhled myelomových buněk. Profesor Kahler v roce 1889 charakterizoval obraz této nemoci. Z tohoto důvodu bývá mnohočetný myelom někdy nazýván Kahlerova nemoc. Pacienti s MM dnes tvoří asi 1 % pacientů s malignitami a asi 10 % pacientů s hematologickými malignitami. MM je symptomatické onemocnění [1]. MM postihuje především pacienty ve vyšším věku, nad 40 % pacientů je ve věku 75 roků a výše. V České republice je incidence MM udávána na 2,65/100 000 obyvatel, ale v kategorii 75 – 79 let incidence MM stoupá na 15,57/100000 obyvatel. Naopak ve věku 20 – 40 let se toto onemocnění vyskytuje vzácně. Poměr zastoupení mužů a žen mezi pacienty je asi 3:2 [2].

Mnohočetný myelom je druhou nejčastější lymfoproliferativní poruchou, která se vyznačuje abnormální expanzí monoklonálních plazmatických buněk. Pre-maligní klon migruje do kostní dřeně, kde expanduje a může být klinicky rozpoznán jako monoklonální gamapatie neurčitěho významu (MGUS) nebo doutnající mnohočetný myelom, který je prokazatelný prakticky u všech pacientů, roky až desetiletí před diagnózou mnohočetného myelomu. Poté následuje stádium symptomatického mnohočetného myelomu, refrakterního myelomu až plazmocelulární leukémie [3,4].

### 1.1.1 Patogeneze mnohočetného myelomu a průběh onemocnění

Patogeneze mnohočetného myelomu je velmi složitý proces na úrovni buněčných i tkáňových změn, které souvisí se změnami mikroprostředí kostní dřeně, produkcí cytokinů, aberací chromozomů, genových mutací a také s epigenetickými změnami. Mutacemi jsou mj. zasaženy geny zajišťující translaci mRNA do proteinů a následné posttranslační úpravy [5]. Mezi další geny s klinickou významností, v nichž byly u pacientů s MM popsány mutace, patří geny signalizační kaskády NF- $\kappa$ B (nukleární faktor kappa B) a geny pro různé adhezivní a receptorové molekuly tyrozin-kinázových signalizačních kaskád [1]. Důležité je stanovení jednotlivých chromozomálních abnormalit, a to především u pacientů, kteří podstupují vysokodávkovou chemoterapii s autologní transplantací. V posledních letech je výskyt

chromozomových změn v myelomových buňkách považován za jeden z nejdůležitějších prognostických parametrů ovlivňujících stratifikaci pacientů do jednotlivých podskupin. Nejčastějšími strukturními přestavbami u MM jsou chromozomové translokace zahrnující lokus pro těžký řetězec imunoglobulinu (IgH) v oblasti 14q32, které jsou popisovány u 10 – 60 %. Méně často se mohou vyskytovat i přestavby zahrnující IgL lokus v oblasti 22q11. Taková přestavba se vyskytuje asi u 17 % pacientů. IgH translokace jsou obvykle přítomny až v 95 % případů a pravděpodobně vznikají jako primární změna [6, 7]. Nález translokace t(4;14)(p16;q32) snižuje medián přežití z 44,9 na 25,5 měsíců a translokace t(14;16)(q32;q23) z 41,1 na 15,7 měsíců. Přítomnost delece 17p13 snižuje dobu přežití na 19,5 měsíců. Pacienti bez této delece by jinak žili 50 měsíců [8].

Zralé B-lymfocyty produkují lehké i těžké řetězce imunoglobulinu G (IgG) a za fyziologického stavu je zrání B-lymfocytů řízeno pomocí stimulace expozicí antigenu specifického pro tyto imunoglobuliny. Mnohočetný myelom vzniká maligní transformací B-lymfocytů a dále tyto klonny buněk způsobují poruchu vyžívání plazmocytů. Pozměněné plazmocyty neprodukují protilátky IgG, ale pouze jejich fragmenty, tzv. paraprotein neboli monoklonální imunoglobulin, které není schopen plnit svou ochrannou funkci. To má za následek poruchu protilátkové imunity, což souvisí s vysokou incidencí infekcí, které se pojí s mnohočetným myelomem [9]. U 37 % pacientů s MM byla při diagnostice zjištěna nadprodukce interleukinu-6 (IL-6) a zvýšená hladina C-reaktivního proteinu (CRP) v plazmě. IL-6 je produkován mnoha buňkami včetně osteoblastů, monocytů, makrofágů a stromálních buněk kostní dřene [10]. Hematopoetické cytokiny jako jsou faktor stimulující kolonie granulocytů a makrofágů, IL-3, IL-5, G-CSF (z angl. Granulocyte Colony Stimulating Factor) synergizují s IL-6, aby podpořily proliferaci myelomových buněk. Interferon- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ) a TNF (z angl. Tumor Necrosis Factor) indukují autokrinní produkci IL-6 v myelomových buněčných liniích a umožňují autonomní růst těchto buněčných linií. Naopak interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) zcela inhibuje proliferaci myelomových buněk zprostředkovanou IL-6 [11].

### **1.1.2 Klinický obraz mnohočetného myelomu**

Mezi první nespecifické příznaky mnohočetného myelomu patří únava, nevykonnost a bolesti kostí. Tyto bolesti jsou způsobené poškozením skeletu MM. Jsou zpravidla velmi silné a často bývají migrující [12]. Základní projevy myelomu se označují zkratkou CRAB (z angl. Calcium Elevation, Renal Insufficiency, Anemia and Bone Abnormalities), tj. hyperkalcemie, renální insuficience, anémie a projevy myelomové kostní nemoci [13]. Hyperkalcemie znamená,

že hladina kalcia v séru je vyšší než 2,6 mmol/L. Vápník je vitálně důležitým druhým poslem a je nezbytný pro srážení krve svalovou kontrakci, pro funkci nervů a řadu buněčných aktivit. Hyperkalcemie působí přímo na nefron a brání normální reabsorpci vody. Klinické příznaky hyperkalcemie jsou poruchy nervového systému a porucha zažívacího traktu. Příčiny hyperkalcemie mohou být: zvýšená kostní resorpce, zvýšená absorpce kalcia střevem, snížené vylučování kalcia ledvinami či snížená kostní novotvorba [14]. Renální insuficience je narušení funkce ledvin v důsledku jejich onemocnění, které se projevuje poklesem glomerulární filtrace a neschopností ledvin očistit tělo od nepotřebných látek a zplodin metabolismu. Renální insuficience se jako první příznak projevuje až u 20 % pacientů s myelomem [15]. Patofyziologie renálního selhání u mnohočetného myelomu je často multifaktoriální, hlavní příčinou bývá vysoká exkrece volných lehkých řetězců (Bence Jonesova bílkovina) [16]. Anémie neboli chudokrevnost bývá u pacientů s mnohočetným myelomem způsobena mechanickým útlakem nádorové tkáně nebo také působením cytokinů. Další příčina anémie je poškození ledvin. Některé buňky ledvin produkují látku zvanou erythropoetin, která působí jako stimulační faktor růstu erytrocytů. Erythropoetin je tvořen v těle z 90 % v ledvinových buňkách, zbylých 10 % je tvořeno Kupfferovými buňkami v játrech [17].

Pacienty s MM nejčastěji trápí bolesti hrudní a bederní páteře. U některých nemocných se může vyvinout i neurologický deficit způsobený patologickou frakturou při poškození pevnosti kosti nebo v případě růstu myelomových hmot mimo kost do páteřního kanálu [12], někteří pacienti mohou amyloidózou [18]. Hromadění depozitů amyloidu ve více orgánech předpovídá horší prognózu ve srovnání s depozity amyloidů v jediném orgánu a management léčby se také liší. Když je primární amyloidóza asociována s MM, ukládání lehkých řetězců může mít za následek nefunkčnost více orgánových systémů. Amyloidóza běžně postihuje srdce, ledviny, gastrointestinální trakt, játra a periferní nebo autonomní nervový systém. Příznaky amyloidózy u pacientů s MM se liší podle příslušného orgánu. Dále se u 2 – 6 % pacientů může objevit hyperviskózní syndrom, který je způsobem zvýšením cirkulujících imunoglobulinů, zejména pak IgG3 a IgA. Pacientů s MM, kteří mají zvýšené IgM, je méně než 1 %. Hyperviskózní syndrom se může projevit slizničním krvácením, zraťovými poruchami i různorodými neurologickými projevy. Ovšem postižení centrální nervové soustavy (CNS) u pacientů s mnohočetným myelomem je velmi vzácné, udává se jen u 1 % nemocných [17, 19].

### 1.1.3 Diagnostika mnohočetného myelomu

Diagnózu stanovuje klinický lékař na základě porovnání rentgenologických, biochemických a cytologických nebo histologických nálezů s přijatými diagnostickými kritérii pro tuto chorobu. Diagnóza mnohočetného myelomu je jasná, pokud se u pacienta vyskytne hlavní a jedno vedlejší kritérium, anebo jsou-li diagnostikována kritéria a+ b a dále kritérium c nebo d. V tabulce č. 1 jsou vypsána hlavní a vedlejší kritéria.

**Tabulka 1:** Kritéria mnohočetného myelomu dle Durieho a Salmona, převzato z [20].

Hlavní kritéria	Vedlejší kritéria
1) plasmocytom (histologie tkáně)	a) v kostní dřeni 10 – 30 % plasmocytů
2) počet plasmocytů v kostní dřeni > 30 %	b) koncentrace M-Ig nižší než v bodě 3
3) sérové koncentrace monoklonálního imunoglobulinu (M-Ig): M-IgG > 35 g/l, M-IgA > 20 g/l, nebo množství lehkých řetězců v moči za 24 hodin > 1 g	c) přítomna osteolytická ložiska d) snížení ostatních fyziologických imunoglobulinů (< 50 % normální hodnoty) IgM < 0,5 g/l IgA < 1,0 g/l IgG < 6,0 g/l

**Tabulka 2:** Diagnostika mnohočetného myelomu, převzato z [21].

Screeningové testy při podezření na myelom, pokud je jeden výsledek z nich patologický, je nutno pokračovat testy, které mohou potvrdit diagnózu	Testy, které mohou potvrdit diagnózu	Testy, které zjišťují velikost myelomové masy a prognózu	Testy pro zjištění poškození tkání a orgánů myelomem (ROTI)	Speciální testy indikované u některých nemocných
krevní obraz, sedimentace erytrocytů	aspirát kostní dřeně, případně trepanobiopsie	cytogenetické vyšetření kostní dřeně + FISH	krevní obraz	Imunohistologie a flowcytometrie kostní dřeně
ionty včetně Ca, kreatinin, urea, kyselina močová, albumin, celková bílkovina,	Imunofixační vyšetření přítomnosti monoklonálního Ig v krvi a moči	kvantifikace monoklonálního imunoglobulinu v krvi a moči (denzitometrické stanovení)	urea, kreatinin, clearance kreatininu, Ca, albumin	vitamin B <sub>12</sub> a kyselina listová v případě makrocytózy
elektroforéza séra a moče	volné lehké řetězce v krvi	Ca, albumin, β <sub>2</sub> -mikroglobulin	LD, CRP	MR, CT, FDG-PET, MIBI
kvantifikace polyklonálních imunoglobulinů			kvantitativní stanovení polyklonálních imunoglobulinů	
rtg snímek suspektní oblasti	rtg vyšetření skeletu	rtg vyšetření skeletu		

#### 1.1.4 Metody používané při diagnostice mnohočetného myelomu

Z tabulky č. 2 vyplývá, že soubor základních vyšetření pro diagnostiku MM je následující: stanovení krevního obrazu, vyšetření kostní dřeně, rentgenové vyšetření skeletu v bolestivé lokalizaci, vyšetření sedimentace erytrocytů, základní biochemické vyšetření krve i moči, kvantitativní vyšetření imunoglobulinů IgG, IgM a IgA v séru (izolované zvýšení koncentrace jednoho typu imunoglobulinu a snížení dalších signalizuje MM), dále se ještě provede elektroforéza bílkovin séra.

#### Laboratorní metody diagnózy mnohočetného myelomu

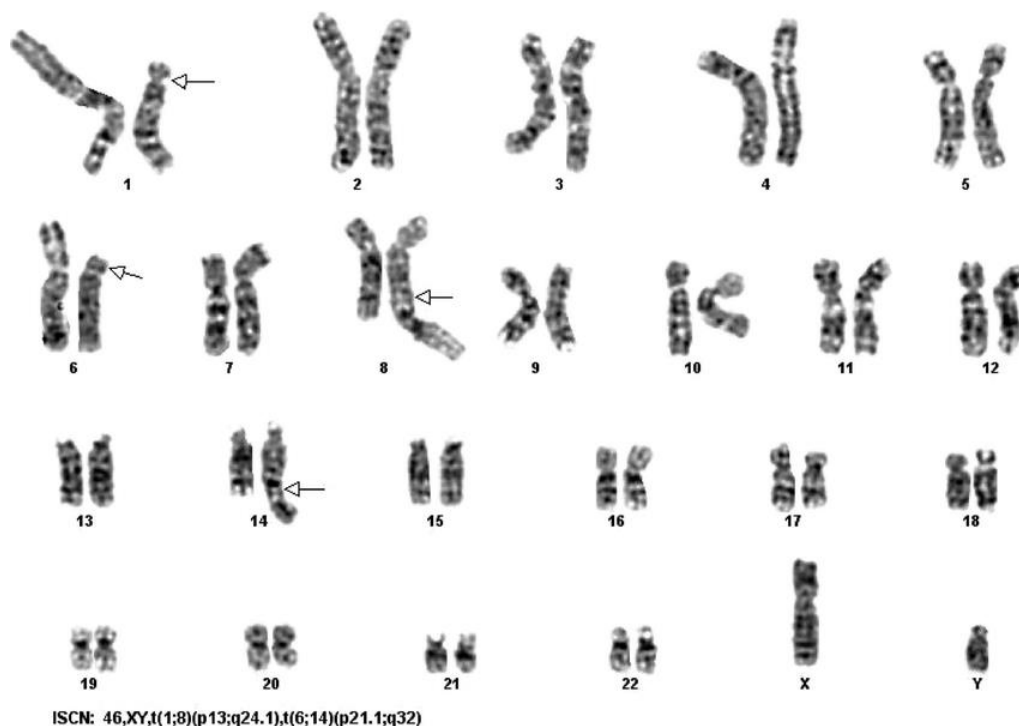
Mezi základní laboratorní metody pro stanovení diagnózy onemocnění patří biochemické vyšetření krve (séra) i moči, krevní obraz, kvantitativní proteinurie ze sběru moči za 24 hodin a vyšetření glomerulární filtrace. Ze séra se stanovuje koncentrace urey, kreatininu, iontů včetně kalcia, celkové bílkoviny a albuminu, CRP a sedimentaci erytrocytů. Pokud je sedimentace erytrocytů velmi rychlá (vysoká hodnota FW) může to souviset s přítomností monoklonálního imunoglobulinu. To však neplatí pro Bence-Jones typ mnohočetného myelomu. Koncentrace celkové bílkoviny v séru je zvýšená naopak koncentrace albuminu v séru je nízká. Koncentrace urey, kreatininu, a elektrolytů včetně kalcia v séru jsou zvýšené. Dále se provádí kvantitativní

denzitometrické stanovení monoklonálního imunoglobulinu, kvantitativní denzitometrické stanovení lehkých řetězců v moči a kvantitativní stanovení polyklonálních imunoglobulinů, vyšetření volných lehkých řetězců v séru včetně stanovení  $\kappa/\lambda$  indexu. Dále se stanovuje beta-2 mikroglobulin v séru [22, 23].

Sternální punkce nebo trepanobiopsie lopaty kosti kyčelní jsou indikovány při podezření na onemocnění vyplývající z biochemického nebo rentgenového vyšetření. Hodnocení aspirace kostní dřevě ze sternální punkce je omezena. Rozhoduje zde kvalita aspirátu. Výsledné hodnocení, počet plazmatických buněk je totiž závislý na tom, kolik periferní krve je aspirováno spolu s kostní dřeví. Trepanobiopsie má výhodu v tom, že toto zkreslení aspirací periferní krve odpadá. Barvením na kappa a lambda řetězce je možné prokázat klony plazmocytů [24].

#### *Cytogenetické vyšetření*

K základním metodám cytogenetického vyšetření u MM patří konvenční cytogenetická analýza prováděná na mitózách nádorových buněk pomocí G-pruhování chromozomů. Výchozím materiálem je 24 hodin kultivovaná kostní dřev. Klonální chromozomové aberace se vyskytují při konvenční cytogenetické analýze asi jen u 20 – 30 % nemocných s MM [25]. Značný pokrok v cytogenetice MM znamenal v posledních letech zavedení moderních molekulárně cytogenetických metod, zejména techniky fluorescenční hybridizace *in situ* (FISH), která využívá k detekci chromozomových změn specifické DNA sondy. Od poloviny 80. let minulého století se nejčastěji používají DNA sondy značené fluorescenčním barvivem. K vyššímu záchytu chromozomových aberací u pacientů s MM se proto používá selektivní imunofluorescenční značení nádorových plazmatických buněk v kostní dřeví pomocí monoklonálních protilátek proti  $\lambda$  a  $\kappa$  řetězcům cytoplazmatických imunoglobulinů, případně molekulárně cytogenetické vyšetření myelomových buněk získaných pomocí magneticky aktivních částic [26].

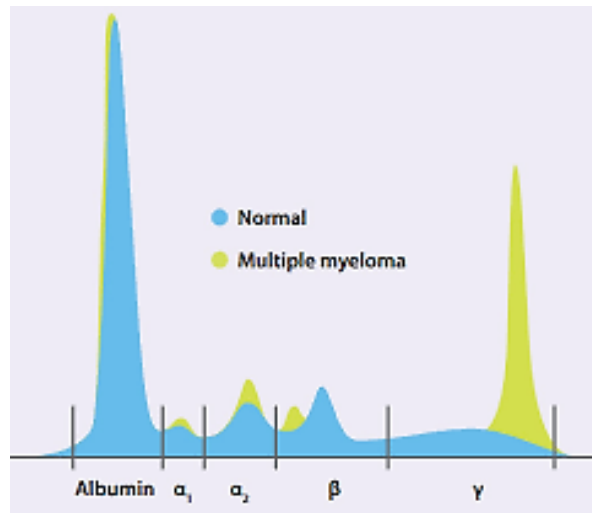


**Obrázek 1:** Karyotyp pacienta s MM, šipkami jsou označeny translokace t(14q32) a t(8q24.1), převzato z [27].

### *Elektroforetická separace sérových proteinů*

Ke specifickým laboratorním vyšetřením se řadí elektroforéza séra a/nebo zahuštěné moče. Elektromigrační metody, které dělí frakce proteinů, jsou vhodnými postupy pro elektroforézu bílkovin v séru. Elektroforéza bílkovin séra je určena především pro tzv. screening monoklonálních gamapatií a k semikvantitativnímu stanovení paraproteinu. Kvantitativně se hodnoty uvádí v g/L. Elektroforetický systém musí mít vysoké rozlišení, aby byl schopen detekovat malé monoklonální pásy (nebo monoklonální imunoglobuliny o nízké koncentraci), které mohou migrovat s ostatními proteiny v oblasti frakce beta nebo případně i ve frakci alfa. Doporučuje se používání diagnostik dělících sérové proteiny na frakce albumin,  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  a  $\gamma$ . Ačkoli je elektroforéza považován za semikvantitativní test, má několik limitů, jako jsou vysoké pozadí gama oblasti, nízká koncentrace M-proteinu a společná migrace s globuliny umístěnými v alfa a beta oblastech. Tyto faktory mohou vést k nepřesné kvantifikaci, a proto elektroforéza v tomto uspořádání nemůže být použita k identifikaci paraproteinů. K identifikaci monoklonality imunoglobulinů je vhodná metoda imunofixace [28, 29]. Na obrázku č. 2 je výsledek elektroforézy zdravého člověka a pacienta s MM.



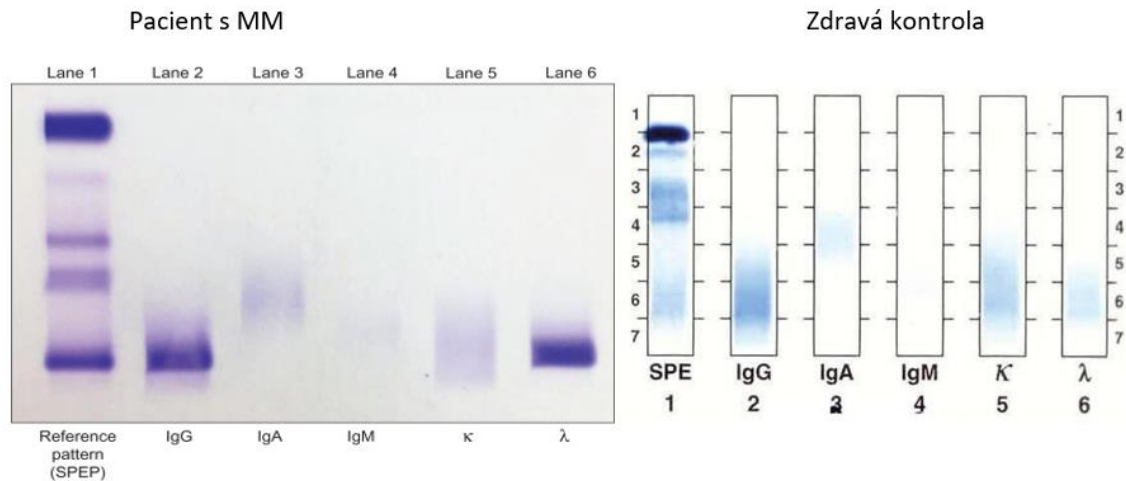


**Obrázek 2:** Densitometrické vyhodnocení elektroforézy proteinů ze séra zdravého člověka (modrý záznam) s porovnáním pacienta s MM (žlutý záznam), převzato z [30].

### *Imunofixace*

Tato metoda se skládá ze dvou kroků – vlastní elektroforetická separace sérových proteinů a poté následuje krok imunofixace. Imunofixaci je nutno provést vždy u pacientů, u nichž je dle klinických příznaků a výsledků zobrazovacích metod podezření na MM, a to i přesto že je elektroforéza sérových proteinů negativní. Imunofixace bílkovin séra a moče slouží k určení typu M-proteinu, a také se používá jako screening u podezření na primární amyloidózu, při které kvantita M-proteinů může být tak nízká, že není možná jejich detekce při elektroforéze. Jak již bylo řečeno výše, v prvním kroku jsou elektroforeticky na agarózovém gelu rozděleny bílkoviny na jednotlivé frakce. V druhém kroku se monoklonální bílkoviny fixují pomocí antisér. Používají se antiséra anti-IgG, anti-IgA, anti-IgM, anti-kappa a anti-lambda. U některých případů přítomnosti monoklonálních lehkých řetězců a zároveň negativy imunofixace s antiséry proti IgA, IgG a IgM následuje ještě imunofixace s antiséry proti IgD a IgE. Imunofixační proužky jsou porovnány s odpovídajícími frakcemi referenčního vzorku (odpovídající proužek by měl mít stejnou migrační pozici). Touto metodou zjistíme původ M-proteinu [23]. Tato metoda je desetkrát citlivější než elektroforéza, a může tedy odhalit část M-proteinů o nízké koncentraci, které běžná elektroforetická separace nezachytí. Metoda je rychlejší, výsledky analýzy jsou do 3 hodin. Koncentrace M-proteinu v séru pacientů s MM se pohybuje kolem hodnot 0,2 g/L v séru a v moči kolem 0,04 g/L. Imunofixace může být částečně automatizovaná, výsledky analýz jsou na rozdíl od dříve používané metody imuno elektroforézy jednoznačné s malým vlivem subjektivních chyb [31].

Na obrázku č. 3 je vlevo výsledek imunofixace bílkovin ze séra. Původ M-proteinu je ze třídy IgG a typ lehkého řetězce je  $\lambda$ . Vpravo je výsledek zdravé kontroly.



**Obrázek 3:** Vlevo je záznam výsledku analýzy séra pacienta, kterému diagnostikovali MM metodou imunofixace, vpravo je zdravá kontrola, převzato a upraveno z [32].

Také stanovení koncentrace  $\beta$ -2 mikroglobulinu ( $\beta$ -2 MG) je důležitým prognostickým faktorem u pacientů s MM. Koncentrace beta-2 mikroglobulinu v séru i v moči je závislá na funkci ledvin. Protože snížená glomerulární filtrace zvyšuje hodnoty  $\beta$ -2 MG v séru a poškození tubulů naopak snižuje jeho hodnoty v séru, musí být hodnoty  $\beta$ -2 MG posuzovány ve vztahu k funkci ledvin. Detekce a kvantifikace M-proteinu je nezbytná pro posouzení odpovědi na léčbu. Koncentrace M-proteinu v séru koreluje s progresí onemocnění nebo reakcí na léčbu [23, 28].

Správné určení diagnózy MGUS vyžaduje nejenom odlišení od iniciálních forem maligních monoklonálních gamapatií (MG), ale i od MG asociovaných s B lymfoproliferativními nebo jinými nemaligními nemocemi. V průběhu sledování pacienta s MGUS je doporučen standardní panel vyšetření (krevní obraz, základní biochemické vyšetření, kvantitativní stanovení Ig, FLC (z angl. Free Light Chains) vyšetření, imunoelktroforéza séra a moči). Vyšetření kostní dřeně by mělo být součástí diagnostického algoritmu pro všechny pacienty s MGUS typu IgA a IgM [33]. Aby byl MGUS diagnostikován, musí být přítomnost sérového monoklonálního proteinu  $< 3$  g/dl a  $< 10$  % klonálních plazmatických buněk kostní dřeně. MGUS může progredovat do pokročilejšího asymptomatického stadia SMM (z angl. Smoldering Multiple Myeloma). U pacientů s M proteinem typu IgG  $\leq 15$  g/l a při M proteinu typu IgA  $\leq 10$  g/l bez kostních

bolestí není doporučeno zobrazovací vyšetření. U všech ostatních pacientů, je vhodné provedení RTG celého skeletu, celotělové MRI (z angl. Magnetic Resonance Imaging), PET/CT nebo PET/MRI vyšetření [34, 35].

### **Zobrazovací metody sloužící k diagnóze mnohočetného myelomu**

Zobrazovací metody jako jsou rentgenové vyšetření, počítačová tomografie, magnetická rezonance a pozitronová emisní tomografie jsou klíčové v diagnostice mnohočetného myelomu. Jejich volba, vzájemná kombinace a návaznost jsou důležité pro včasné a správné určení této diagnózy.

#### *Rentgenové vyšetření*

Rentgenové zobrazovací metody (RTG) patří stále mezi nejdůležitější diagnostické metody používané v medicíně. Poskytuje především morfologickou (anatomickou) informaci o pacientovi. Princip vyšetření je založen na schopnosti RTG záření pronikat lidským tělem. Výsledkem je obraz zachycený na detektoru přístroje [34]. Zhruba 80 % pacientů s MM má v době diagnózy zřetelná osteolytická ložiska na snímku. Nejčastěji postiženými oblastmi jsou obratle, a dále se tyto ložiska nachází na žebrech, lebce, pažních kostech, pánvi, dlouhých kostech. Výhodou vstupního RTG vyšetření je rychlé získání informací o stavu skeletu. Nevýhodou je nízká senzitivita [36]. Na obrázku č. 4 jsou snímky z RTG pacienta s MM.



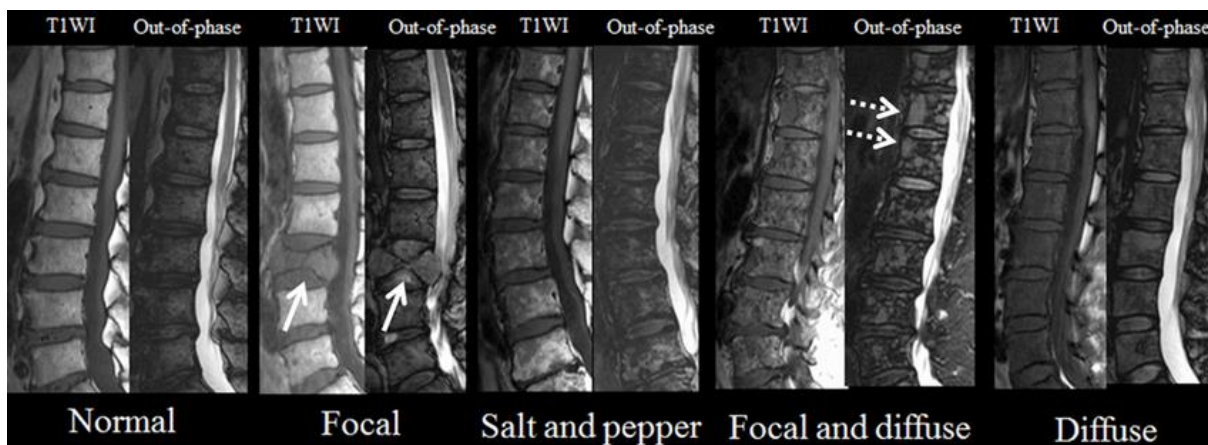
**Obrázek 4:** RTG snímky lebky, hrudníku a paže pacienta s MM, převzato z [37].

### *Výpočetní tomografie (CT)*

CT je radiologická zobrazovací metoda, která pomocí rentgenového záření umožňuje neinvazivní zobrazení vnitřních orgánů a tkání člověka. CT je vhodné pro zobrazení těch částí skeletu (lopatka, žebra), které nelze dobře zviditelnit klasickým rentgenovým snímkem. Dále také pomocí CT velmi dobře zobrazit obratle a zjistit případnou expanzi myelomových hmot do páteřního kanálu. Díky vysoké rozlišovací schopnosti lze s pomocí CT dobře zobrazit malá osteolytická ložiska. CT zobrazuje přesněji minerální struktury hydroxyapatitu, nemá však potenciál tak dobře prokázat patologickou měkkotkáňovou infiltraci kostí [38].

### *Magnetická rezonance*

Velký význam má ve zhodnocení poškození skeletu magnetická rezonance. MRI je moderní zobrazovací vyšetření, které se využívá k zobrazení vnitřních orgánů lidského těla. Metoda využívá chování některých atomových jader umístěných v silném magnetickém poli při interakci s vysokofrekvenčním elektromagnetickým zářením. Pomocí MRI je lékař schopen získat řezy vybrané části lidského těla. Na snímcích z MRI lze rozeznat kromě poškození minerální struktury kostí i patologickou infiltraci kostní dřeně, která předchází rozvoji osteolytických ložisek. Navíc také přesněji znázorní poškození nervových struktur [39]. Výsledky MR zobrazení mají prognostickou informaci. Nález více než 10 ložisek v páteři výrazně zvyšuje pravděpodobnost patologické fraktury v této oblasti. Nálezy patologické infiltrace na MRI mohou dlouho předcházet vzniku jednoznačného osteolytického ložiska. Změny v kostní dřeni po léčbě je však obtížnější interpretovat, proto MRI skeletu se standardně nepoužívá k hodnocení úspěchu léčby [40, 41]. Na obrázku č. 5 je snímek bederní páteře pacienta s MM. Tento snímek ukazuje infiltraci mnohočetného myelomu. Bílé šipky ukazují ve fokálním vzoru zvýšenou intenzitu signálu v odpovídajících oblastech. Ve vzoru sůl a pepř (salt and pepper) jsou promísené hyper- a hypointenzivní signály. Ve fokálních a difuzních vzorcích je zobrazení difuzně snížené intenzity signálu obratlů a jsou také vidět ohniskové oblasti sníženého signálu (bílá tečkované šipky) [42].



**Obrázek 5:** Porovnání snímku bederní páteře z MRI pacienta s mnohočetným myelomem a zdravého člověka (vlevo), převzato z [42].

### *Pozitronová emisní tomografie*

Technologie pozitronové emisní tomografie (PET) byla poprvé vyvinuta v roce 1973, první celotělový PET skener v roce 1977 a integrovaný hybridní PET s komponentou počítačové tomografie byl představen na počátku devadesátých let minulého století. Principem zobrazování pozitronovou emisní tomografií je možnost detekce a následné registrace změn metabolismu v patologicky změněné tkáni. Při transformaci zdravých buněk v buňky nádorové lze funkční změny odhalit dříve než změny anatomické, a proto se patologický proces ve tkáních může zachytit pomocí PET dříve než pomocí zobrazovacích metod. Při samostatném PET vyšetření však chybí anatomické informace a není zřejmý vztah zobrazené patologické léze k ostatním anatomickým strukturám. Tento nedostatek byl v klinické praxi odstraněn nedávným zavedením hybridních přístrojů. Fúzí obrazů získaných při jediném PET/CT vyšetření lze přesně určit, ve které anatomické struktuře se patologická léze nachází [43, 44].

Nejčastěji používaným radiofarmakem při PET vyšetření je analog glukózy 2-[ $^{18}\text{F}$ ]-fluoro-2-deoxy-D-glukóza ( $^{18}\text{F}$ -FDG). Nádorové buňky včetně plazmocytů MM vykazují hypermetabolismus glukózy a při FDG-PET vyšetření v nich detekujeme zvýšenou akumulaci  $^{18}\text{F}$ -FDG.  $^{18}\text{F}$ -FDG-PET/CT vyšetření dovolí u MM demonstrovat nádorové postižení skeletu jak difuzního typu, tak fokální ještě před výskytem anatomických změn [45].

### *Radioizotopové zobrazení pomocí $^{99}\text{Tc}$ -sestamibi*

Druhou běžně používanou radioizotopovou vyšetřovací metodou je zobrazení pomocí látky sestamibi, přesněji  $^{99}\text{mTc}$ -2-methoxy-isobutyryl-isonitril, zkráceně MIBI. Tato metoda používá

ke značení radioaktivní technecium. Sestamibi je látka, která se mimo jiné kumuluje v mitochondriích, kterých je v myelomových buňkách více než v okolních strukturách. Proto lze pomocí MIBI také zobrazit rozsah mnohočetného myelomu a zjistit případná extramedulární ložiska [40]. Při interpretaci je vhodné přihlídnout ke skutečnosti, že MIBI znázorňuje přítomnost myelomových ložisek, zatímco FDG-PET znázorňuje aktivitu buněk těchto ložisek [46].

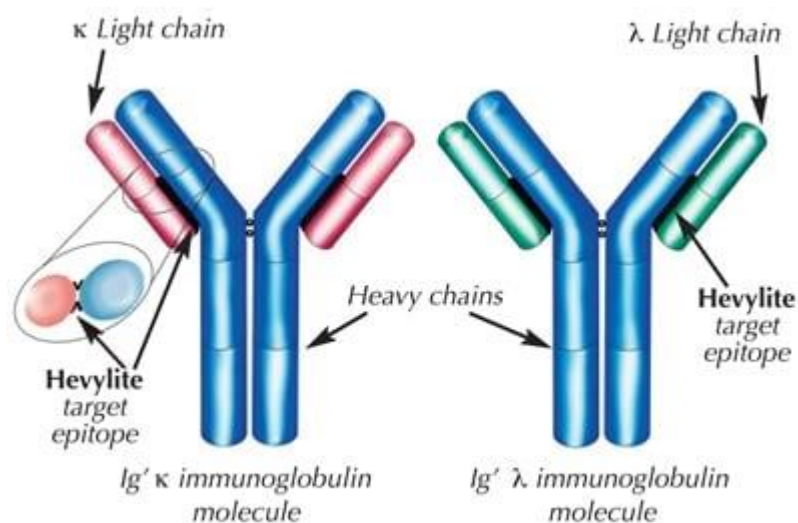
### **1.1.5 Monitorování průběhu onemocnění a ověřování účinnosti terapie**

Pro monitorování průběhu onemocnění MM se používá FDG-PET metoda, dále lze použít FDG-PET/CT a metoda Hevylite<sup>TM</sup>, kterou objevil pan Bradwell. Ovšem MR není vhodná metoda pro ověření účinnosti terapie MM.

FDG-PET je pozitronová emisní tomografie, která využívá deoxyglukózu značenou radioaktivním fluorem (FDG). Tato metoda umožňuje funkční vyšetření metabolismu nádorových buněk, má vyšší senzitivitu než běžně používané CT a MRI vyšetření. FDG-PET zobrazení je možné použít k vyhodnocení účinnosti radioterapie v případě velkých solitárních plazmocytomů. Přetrvávání aktivity po léčbě je signálem pro nepříznivou prognózu a nedostatečně účinnou léčbu. Někteří autoři popsali vyhodnocení efektu cytostatické léčby a příznivou prognózu u nemocných s normalizací původně patologického nálezu na FDG-PET. Přetrvávající pozitivita PET po ukončení vysokodávkované chemoterapie korelovala s nepříznivou prognózou těchto nemocných [47]. Další metodou, kterou lze použít k průběžnému monitorování průběhu MM, je FDG-PET/CT. Umožňuje citlivou detekci reziduální perzistence aktivních medulárních i extramedulárních lézí, a to zejména u nemocných s nesekreční formou MM a k posouzení výsledku léčby v případě myelomových ložisek >5 cm, jež často nereagují na terapii. Přetrvávající aktivita signalizuje nedostatečně účinnou léčbu a nepříznivou prognózu. Při hodnocení je nutno ovšem zohlednit možnost falešné negativy v případě malých (<5 mm) ložiskových lézí a velkých lézí s nedostatečnou akumulací FDG. Aby výsledky nebyly falešně negativní je nutný více než čtyřtýdenní odstup od předchozí chemoterapie, tříměsíční odstup od radioterapie a pětidenní interval od skončení léčby kortikosteroidy [48].

Limitaci standardních metod odstraňuje metoda Hevylite<sup>TM</sup>, kterou zavedl v roce 2009 Bradwell [48]. Metoda je založena na principu nefelometrie, případně turbidimetrie a umožňuje přesnou kvantitativní analýzu páru lehkých a těžkých řetězců Ig  $\kappa$  a  $\lambda$  (HLC- $\kappa$  a HLC- $\lambda$ ). Analýza je zajištěna díky přípravě vysoce specifických, avidních polyklonálních protilátek proti

funkčním epitopům umístěných mezi konstantními doménami těžkých a lehkých řetězců Ig. Metoda je přesnější a přínosnější, neboť poskytuje reprodukovatelné výsledky hladin nejen monoklonálního, ale i normálního izotypu imunoglobulinu. Oproti monitoraci M-proteinu s pomocí elektroforézy má sledování hodnoty HLC-r (poměr hladin HLC- $\kappa$  a HLC- $\lambda$ ) vyšší senzitivitu v rozpoznání nedostatečné léčebné odezvy a schopnost časného rozpoznání relapsu či progresu MM, což je cenné zejména u oligosekreční formy MM [49]. Obrázek č. 6 znázorňuje princip metody Hevylite.



**Obrázek 6:** Metoda Hevylite pro analýzu páru lehkých a těžkých řetězců Ig  $\kappa$  a  $\lambda$ , převzato z [50].

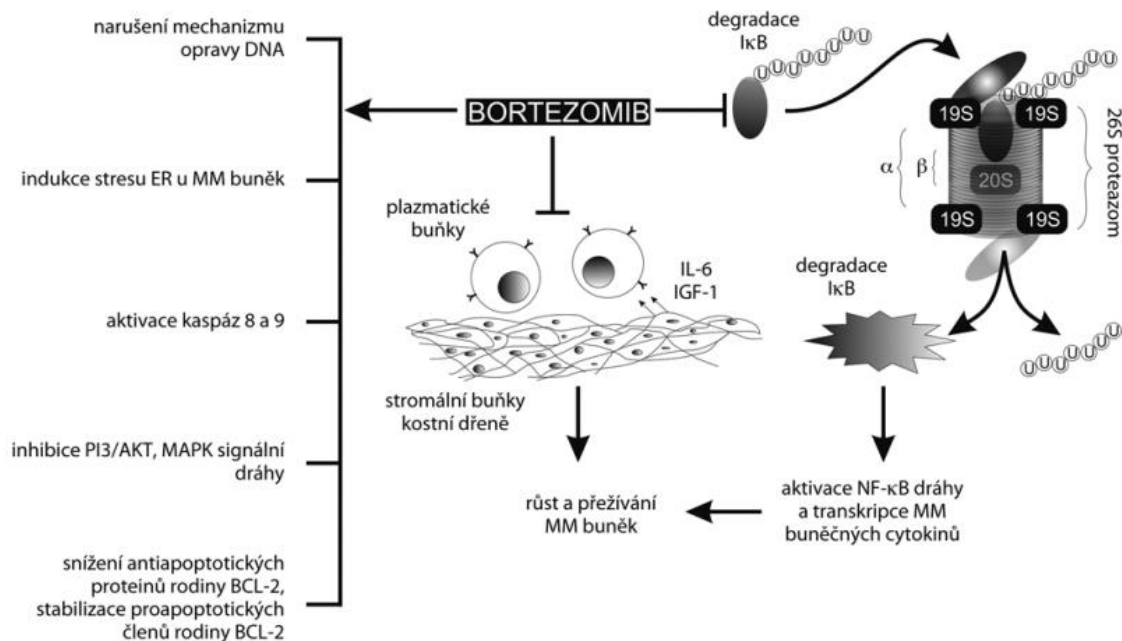
### 1.1.6 Terapie mnohočetného myelomu

Léčba mnohočetného myelomu je systémová a skládá se nejčastěji z trojkombinace alkylačního, antracyklinového nebo antimetabolitového cytostatika, kortikosteroidu a jednoho z tzv. nových léčiv. Do této skupiny léčiv patří bortezomib, talidomid, lenalidomid. Klíčovou součástí léčby mladších pacientů je vysokodávkovaná chemoterapie s následnou transplantací štetpu autologních hematopoetických buněk [40]. Pro nově diagnostikovaného pacienta s MM do 65 let primoléčba zahrnuje 4 cykly indukčního režimu VCD (Velcade (bortezomib) + cyklofosfamid + dexamethason) nebo CTD (cyklofosfamid + thalidomid + dexametazon) nebo 3 – 5 cyklů indukčního režimu VAD (vinkristin + doxorubicin + dexametazon) [51].

Významnou skupinou jsou léčiva ze skupiny inhibitorů proteazomu [52]. Proteazom jako nová buněčná struktura byl poprvé identifikován na počátku 70. let skupinou doktora Harrise [53].

Ostatní objevy se uskutečnily, koncem 70. let a počátkem 80. let a bylo zjištěno, že jeho funkce spočívá v ATP-dependentní degradaci intracelulárních proteinů a jeho specifita je dána interakcí pouze s takovými proteiny, které jsou označeny polyubikvitinovým řetězcem anebo obsahují specifickou sekvenci aminokyselin [54, 55]. Proteazom je útvar, který se skládá ze čtyř homologních prstenců tvořených sedmi podjednotkami  $\alpha$  nebo  $\beta$ , které jsou nad sebou uspořádány v pořadí  $\alpha$ - $\beta$ - $\beta$ - $\alpha$ . K inhibici funkce proteazomu postačuje pouze zablokování podjednotky  $\beta 5$ , která vykazuje chymotrypsinovou aktivitu [56, 57]. V hematopoetických buňkách je hlavním typem proteazomu jeho inducibilní izoforma, tzv. imunoproteazom, jehož výskyt koreluje s hladinou cytokinů [58]. Použití inhibitorů proteazomu patří v současné době mezi jedny z neúspěšnějších strategií pro léčbu mnohočetného myelomu [59]. Konečným důsledkem inhibice proteazomu v myelomových buňkách je indukce apoptotických drah, překonání rezistence ke konvenční chemoterapii a senzitivizace vůči dalším terapeutikům. První generace inhibitorů proteazomu je Bortezomib. Je prvním a jediným inhibitorem proteazomu, který byl doposud oficiálně schválen pro klinickou praxi [60]. Na obrázku č. 7 je popsán mechanismus působení Bortezomibu. Bortezomib blokuje proces degradace I $\kappa$ B kinázy, která je klíčem k aktivaci NF- $\kappa$ B. Dále bortezomib snižuje adhezi plazmatických buněk ke stromálním buňkám kostní dřeně a navozuje apoptózu aktivací kaspáz. Bortezomib v buňce narušuje mechanismus opravy DNA, indukuje apoptózu narušením membrány endoplazmatického retikula, inhibuje MAPK signální dráhy, snižuje hladiny antiapoptotických proteinů a stabilizuje hladiny proapoptotických proteinů [61].





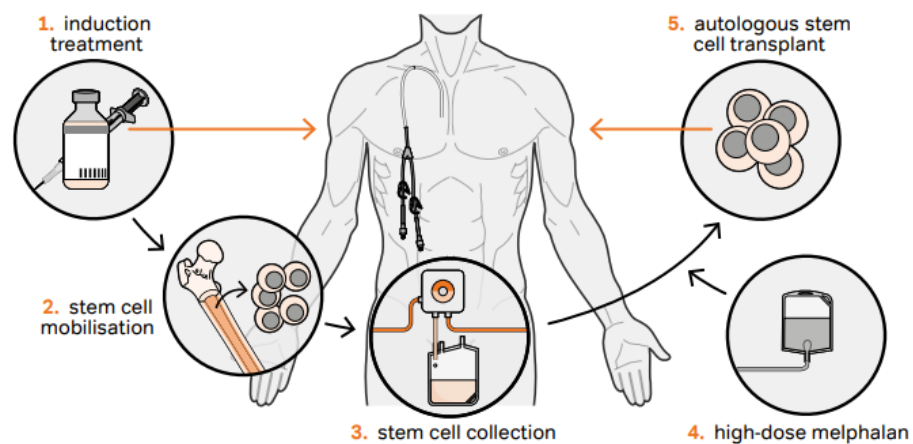
**Obrázek 7:** Schéma znázorňující působení Bortezomibu, který blokuje proces degradace IκB a snižuje adhezi plazmatických buněk, a tak ovlivňuje růst a přežití MM buněk převzato [61].

Novější skupinou léků používaných k léčbě MM jsou imunomodulační léky (IMiDs) na bázi thalidomidu. Tyto léky jsou syntetické deriváty kyseliny glutamové. Do této skupiny patří thalidomid, lenalidomid a pomalidomid. Stimulují imunitu, především CD4+ a CD8+ T lymfocyty i NK (z angl. Natural Killer) buňky. Dále mají antiangiogenní účinek, protizánětlivý účinek a antiosteoklastickou aktivitu. Ovšem mnohé imunomodulační léky jsou také teratogenní. Nevýhodou je i vysoká cena [62].

Velice významnou součástí terapie MM je podpůrná léčba, podílející se na zvládnání průvodních projevů nemoci a zlepšení kvality života. U nemocných s klinickými projevy anemického syndromu lze namísto krevních převodů použít působky s erytropoetickým účinkem, nejběžněji rekombinantní lidský erythropoetin (rHuEPO). V případě závažné febrilní neutropenie, zejména v důsledku intenzivní chemoterapie či aktinoterapie je plně indikováno použití leukocytárních růstových faktorů (především G-CSF), které zkracuje trvání neutropenie a významně tak přispívá ke zvládnutí zánětlivých komplikací [63].

V současnosti je léčba mnohočetného myelomu jednou z nejdynamičtěji se rozvíjejících odvětví hematologie. Standardní chemoterapie užívaná do 90. let 20. století vedla k dosažení době přežití okolo 30 měsíců [64]. Zásadní nevýhoda chemoterapie je neschopnost bezpečně podávat vysoké dávky. Vysoké dávky jsou velmi toxické a mohou vážně postihnout produkci

krvinek. To má za následek, že jejich počet nebezpečně klesá, což může způsobit život ohrožující komplikace. Vysokodávková chemoterapie s autologní transplantací krvetvorných buněk (HDT-ASCT) poskytuje řešení tohoto problému. Použitím HDT-ASCT může být umrceno více myelomových buněk, než by bylo možné tradiční cytostatickou léčbou [65]. Tudiž tato metoda vede k vyššímu počtu léčebných odpovědí a k prodloužení bezpříznakového období do nástupu relapsu onemocnění. Další výhody autologní transplantace jsou, že trvá kratší dobu ve srovnání s konvenční léčbou a je spojená s nižší celkovou zátěží pro lidský organismus [66]. Obrázek č. 8 znázorňuje schéma proces HDT-ASCT u pacientů s MM.



**Obrázek 8:** Schéma HDT-ASCT u pacienta s MM 1: indukční léčba, 2: mobilizace kmenových buněk, 3: sběr kmenových buněk, 4: vysoké dávky melfalanu, 5: transplantace autologních kmenových buněk, převzato z [66].

## 1.2 Nádorové buňky

Existují dva typy nádorových buněk, a to maligní a benigní. Benigní buňky se nešíří do okolí. Vytvářejí struktury, které se podobají strukturám výchozí tkáně, ovšem tyto struktury však nejsou zapojeny do funkční tkáně orgánu [67]. Nejsou pro organismus tolik nebezpečné jako jsou maligní buňky, pokud při svém růstu neohrožují funkci orgánů, ze kterých vzešly. Pokud nezačne nádorová masa omezovat průtok krve a výživu zdravých buněk. Léčba je zpravidla chirurgická, pokud je možno odstranit nádor celý, nedochází zpravidla k recidivě. Z některých benigních nádorů, nejčastěji u nádorů kůže a tlustého střeva, se mohou stát maligní. Benigní nádory mají obecně pomalejší rychlost růstu než nádory maligní a benigní buňky jsou obvykle diferencovanější [68].

Na rozdíl od buněk benigních se v pozdějších stádiích maligní rakovinné buňky uvolňují z primárního nádoru a mají schopnost invazivity a prorůstání do okolních tkání, tzv. metastazují [69]. Maligní buňky se odlišují od normálních buněk v morfologii, obsahu regulačních a růstových proteinů, transkripčních faktorů a dalších proteinů, které se jakkoliv zapojují do buněčného dělení. Se změnou složení proteinů v cytoplasmě, v jádře, v membráně takových buněk souvisí i skladba látek uvolňovaných z buněk do extracelulárního prostoru a také složení tzv. exozomů uvolňovaných buňkami do svého okolí. Maligní buňky nereagují na signály, které řídí buněčné dělení a schopnost apoptózy. Postupem času tyto buňky ztrácí kontrolu nad průběhem a regulaci buněčného dělení až nereagují na kontrolní signály buněčného dělení. Maligní buňky ignorují signály iniciující programovanou buněčnou smrt, a to navzdory skutečnosti, že kvůli jejich četným abnormalitám by se z nich normálně staly hlavní cíle pro apoptózu. Například mohou navodit stav imunitních buněk tak, že místo aby nádorové buňky vyhledávaly a ničily, tak vytváří jakousi obranou bariéru kolem nádorové masy. Toto platí pro solidní nádory [69, 70].

Morfologicky je nádorová buňka charakterizována velkým jádrem, které má nepravidelnou velikost a tvar, jádérka jsou výrazná, cytoplazma je řídká a intenzivně zbarvená nebo je naopak bledá. Jádro nádorových buněk má díky svým změnám hlavní roli v hodnocení nádorové malignity. Ultrastrukturální charakteristiky souvisí se segmentací jádra, invaginacemi, změnami chromatinu, jako je redukce heterochromatinu, nárůst interchromatinových a perichromatinových granulí, zvětšení pórů jaderné membrány či tvorba inkluzí. Jadérko je charakterizováno hypertrofií, makro- a mikrosegregací, jeho pohybem směrem k membráně, početním nárůstem a tvorbou intranukleárních kanálků mezi jadernou membránou a jádérkem. Nádorové buňky mají vyšší počet mitóz, objevují se atypické formy mitózy s defekty

v mitotickém vřetenku a atypické formy chromozomů [71]. U nádorových buněk se hromadí mutace v chromozomech, a proto mají buňky dvojnásobek normálního počtu chromozomů. Jedna z nejběžnějších mutací souvisí s genem p53, který způsobuje sekreci autoprotilátky anti-p53 v lidském séru před nástupem klinických příznaků rakoviny [72].

Rakovinné buňky obsahují genové mutace, které mohou být zděděné nebo se mohou vyvíjet v průběhu času kvůli opotřebování genů. Jejich genotyp se postupně mění. Nádorová transformace buňky a následné nádorové bujení je velmi složitý proces, který probíhá dlouhodobě, stupňovitě, a ne vždy ovlivňuje celý organismus. Mutageny se rozdělují na chemické (formaldehyd, benzen), fyzikální (ionizující záření poškozující DNA somatických buněk), onkogenní viry. Onkogenní viry se dělí na RNA (retroviry) a DNA (adenoviry, herpesviry, HBV virus). Následuje porucha regulace buněčného cyklu. Selhání reparačních mechanismů DNA je dáno poruchou protoonkogenů, které normálně regulují buněčné dělení (proliferaci), vznikají tzv. onkogeny odpovědné za maligní bujení. Na buněčný cyklus působí ještě nádorové supresorové geny, které působí jak v somatických, tak v zárodečných buňkách, a proto se můžou dědit. Třetí skupinou genů podílejících se na maligní transformaci jsou geny reparace DNA, kdy dojde při mutaci k narušení jejich enzymové skladby a vážnou opravu mutovaných genů [73, 74].

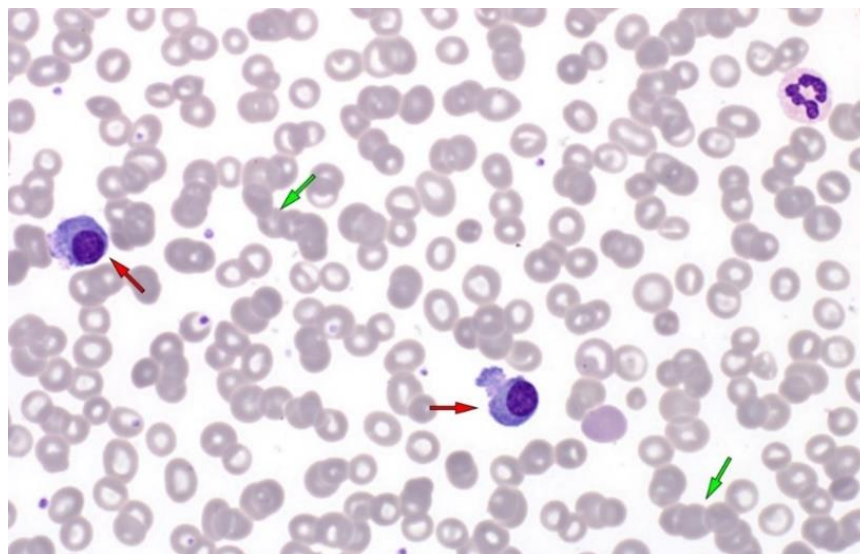
Plazmatické buňky se stanou nádorovými, pokud dojde k určitým změnám v jejich DNA. Ke změně v DNA dochází, když se v kostní dřeni vytváří nové plazmatické buňky [75]. Dalšími rizikovými faktory pro vznik myelomových buněk jsou záření nebo azbest, benzen, pesticidy a vysoké úrovně radiace (při práci v jaderné elektrárně) [75, 76]. Stres narušuje imunitní systém, a kromě toho může stresový hormon noradrenalin přímo vyvolat růst rakovinných buněk. Lidský herpesvirus-8 (HHV-8) je detekovatelný v nemaligních dendritických buňkách kostní dřeni u většiny pacientů s myelomem. Navíc je HHV-8 detekován také v periferní krvi většiny pacientů s myelomem [77]. Všechny tyto faktory se v těle hromadí a přispívají k vývoji myelomových buněk.

### **1.2.1 Myelomová buňka**

Zdravé plazmatické buňky vytvářejí protilátky, které pomáhají tělu bojovat s infekcemi a nemocemi. Vše se děje až po určitým stimulu, podnět přicházející jak z vnějšího, tak i vnitřního prostředí. Dojde-li však ke ztrátě kontroly buněčného dělení u těchto buněk, jedná se o buňky maligní. Buňky mnohočetného myelomu jsou tedy abnormální plazmatické buňky s maligním potenciálem, které mají tendenci se ukládat v kostní dřeni [78]. Se zvyšujícím

se počtem buněk se zvyšuje i množství protilátek v krvi a dalších tělních tekutinách, protože myelomové buňky si zachovaly schopnost vytvářet velké množství protilátek monoklonálního původu. Maligní plazmatické buňky pacientů s mnohočetným myelomem produkují velké množství imunoglobulinu nebo produkují nadbytek jednoho z lehkých, vzácně jednoho z těžkých řetězců. Tyto identické imunoglobuliny nebo lehké řetězce jsou známy pod názvem monoklonální protein nebo M-protein nebo také paraprotein [79].

V cytoplazmě myelomových buněk se nachází tzv. Dutcherova tělíska, Russellova tělíska a inkluze tvořené Mottovými buňkami. Všechny tyto abnormality obsahují i vyšší hladiny imunoglobulinů [78]. Pro myelomové buňky je typický povrchový znak syndekan–1 (CD138). Je to transmembránový proteoglykan [80], který se může přímo vázat na proteiny mezibuněčné hmoty, u MM se váže na kolagen typu I. V kostní dřeni je u pacientů s MM syndekan–1 detekován pouze na buňkách z B lymfoidní linie a míra jeho exprese se mění se stupněm diference [9]. Mezi další znaky myelomových buněk patří získání CD117, CD20, CD28 nebo nižší exprese CD27 a CD81 [81]. Na obrázku č. 9 je krevní nátěr pacienta, kterému diagnostikovali MM.



**Obrázek 9:** Krevní nátěr pacienta s MM, červené šipky ukazují na myelomové buňky a dále zelené šipky ukazují tzv. „rouleaux“, či „penízkovatění“ erytrocytů, převzato z [82].

## 1.3 Protinádorová imunita

Nádorové bujení je podmíněno akumulací genetických poruch v buňce, vedoucí k aktivaci buněčných protoonkogenů a inaktivaci antionkogenů [83]. Imunitní systém se podílí na kontrole růstu nádorových buněk, především při počátku karcinogeneze. Imunitní reakce na nádorovou buňku má komplexní povahu a účastní se jí všechny imunitní mechanismy [84]. Především dendritické buňky hrají klíčovou roli při iniciaci a regulaci protinádorové imunitní odpovědi. Dendritické buňky pocházejí z progenitorů kostní dřeně, které jsou společné pro monocyty, makrofágy a granulocyty, což jsou hlavní buněčné složky přirozené imunity [85]. S pokročilým růstem nádoru se imunitní mechanismy víceméně paralyzují a mnohdy mají naopak podpurný účinek ve prospěch proliferace nádorových buněk [84].

### 1.3.1 Složky imunitního systému podílející se na protinádorové imunitě

Imunitní systém bojuje proti nádorům pomocí přirozené (nespecifické) a adaptivní (specifické) imunity. Oba typy imunity tvoří dále ještě buněčná a humorální složka. Buněčná složka přirozené imunity obsahuje neutrofilů, monocytů, makrofágů, dendritické buňky a další antigen prezentující buňky (APC), eozinofily, mastocyty, bazofily, NK buňky a trombocyty. Humorální složky přirozené imunity tvoří proteiny akutní fáze, komplement a cytokiny. Buněčná složka specifické imunity zahrnuje T-lymfocyty, B-lymfocyty a plazmatické buňky. Do humorální složky patří především protilátky a cytokiny.

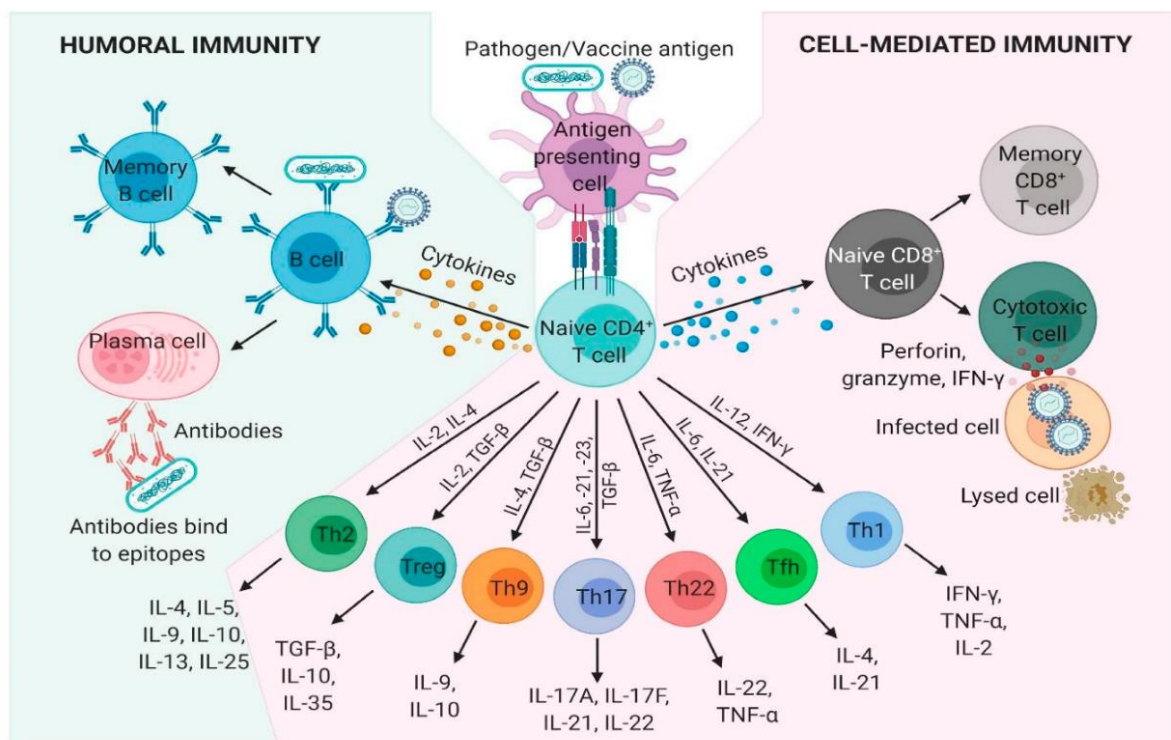
#### Přirozená imunita

Významnou součástí protinádorové imunity jsou NK buňky, které identifikují nádorové buňky prostřednictvím receptorů. NK buňky se podílejí na obraně proti nádorům regulačně i efektorově, protože umí identifikovat nádorové buňky zhodnocením míry exprese molekul HLA I. třídy (z angl. Human Leucocyte Antigen). Změněná exprese HLA I. třídy je běžným znakem nádorových buněk. NK buňky jsou významným zdrojem cytokinů ( $INF\gamma$ ,  $TNF\alpha$ ), které mají protinádorový efekt [86]. Jaderné buňky produkují interferony, a ty mají antiproliferativní, cytostatický a významný imunomodulační účinek. Zvyšují expresi HLA I. třídy na nádorových buňkách, a tím je zcitlivují k působení specifických cytotoxických T-lymfocytů, podporují účinnější zpracování a prezentaci nádorových antigenů a stimulují vyžívání T-lymfocytů do subpopulace Th1 a vyžívání dendritických buněk [87]. Dendritické buňky jsou APC, jejichž hlavní funkcí je zachytit cizí antigeny a zpracovat a prezentovat je na buněčném povrchu

v komplexech s molekulami HLA třídy I a II naivním T buňkám. Tato interakce vede ke zrání a aktivaci nádorově specifických cytotoxických T lymfocytů schopných migrovat do nádorových míst, identifikovat nádorové buňky a zničit je [85]. V protinádorové imunitě se uplatňuje i vliv humorální specifické imunity, a to buď přímým protinádorovým účinkem protilátek, či zprostředkovaně [88].

### **Adaptivní imunita**

K nejdůležitějším imunitním protinádorovým zbraním se patří cytotoxické T-lymfocyty (CTL). Ty rozeznávají pomocí svých receptorů TCR (z angl. T-Cell Receptor) buňky napadané virem či buňky jinak abnormální, tj. buňky poškozené stresem či některé nádorové buňky, a ničí je mechanismy závislémi na těsném kontaktu mezi CTL a napadanou buňkou. Imunitní odpověď založená na CTL je zahájena v lymfatických uzlinách tak, že T lymfocyty musí nejprve rozeznat komplexy HLA I. a II. třídy s antigenními peptidy, což mohou být fragmenty virových proteinů nebo produkty onkogenů, které se nachází na povrchu aktivovaných APC (z angl. Antigen Presenting Cell). Tyto buňky musí mít patřičné adhezivní molekuly a kostimulační molekuly (nejdůležitější je molekula CD28) [89]. Také se uplatňují také Th1 lymfocyty, které jsou zodpovědné za cytotoxickou specifickou buněčnou reaktivitu namířenou proti nádoru. Produkují cytokiny jako  $INF\gamma$ ,  $TNF\alpha$ , IL18 a IP-10, a tak dochází k útlumu aktivity nádorového bujení [90]. Na obrázku č. 10 je schéma zapojení protilátkové a buněčné složky imunity v boji proti patogenům. V protilátkové (humorální) složce imunity se zapojují paměťové B-lymfocyty a B-lymfocyty, ze kterých se stanou plasmatické buňky, které produkují imunoglobuliny. V buněčné složce imunity se zapojují CTL, které produkují perforinů a granzymů, díky kterým dojde k lýze patogenu.



**Obrázek 10:** Kooperace jednotlivých složek protilátkové a buněčné imunity při napadení organismu patogenem, převzato z [91].

Nově se objevuje i úloha B-lymfocytů. Regulační B-lymfocyty (*Bregs*) jsou podskupinou B-lymfocytů, u kterých bylo prokázáno, že hrají klíčovou roli při regulaci imunitní reakce, která je zapojená do zánětu, autoimunity a v poslední době i rakoviny. *Bregs* mohou potlačit různorodé subtypy buněk, včetně T-lymfocytů, prostřednictvím sekrece protizánětlivých mediátorů, jako je IL-10 a usnadňují přeměnu T lymfocytů na regulační T lymfocyty (*Tregs*), a tak zmírňují protinádorové imunitní reakce. Ačkoli se současné imunoterapeutické strategie široce zaměřují na posílení imunity zprostředkované T-lymfocyty, B-lymfocyty jsou stále více oceňovány jako klíčoví hráči v terapii rakoviny [92].

Protilátky se v protinádorové obraně uplatňují tím, že se navazují na povrchové nádorové antigeny TSA (z angl. Tumor Specific Antigens), a tak dochází k opsonizaci, čímž umožňují jejich napadání fagocyty či NK buňkami. Důležitá může být i aktivace komplementu, protože protilátky některých izotypů navázané na povrch nádorové buňky mohou aktivovat klasickou cestu komplementu, což přispívá k opsonizaci, chemotaxi fagocytů a rozvoji zánětlivé reakce. Vazba protilátek na určité povrchové receptory může vyvolat v takto napadené nádorové buňce i její apoptickou smrt [93]. Imunitního systému má schopnost detekovat TSA pomocí tzv. imunosurveillance, což je proces, při kterém může tělo normálně odstranit nově vytvořené



nádorové buňky dříve, než se jejich růst stane nekontrolovaným. Únik před imunitním dozorem je ve skutečnosti jedním z hlavních mechanismů vedoucích k růstu nádoru a v posledních letech byl řešen některými inovativními imunoterapeutickými přístupy, mezi něž patří protilátky anti-PD-1 [94]. Přítomnost specifických TSA na rakovinných buňkách lze prokázat pouze analýzami hmotnostní spektrometrií. Většina TSA je kódována nemutovanými nekanonickými transkripty, které vznikají ze specifických aberací. Při hledání TSA je proto důležité provádět analýzy hmotnostní spektrometrie, které zkoumají všechny čtecí rámce celého překladu [95].

### **1.3.2 Autoimunita**

Autoimunita je jev, při kterém reagují protilátky nebo T buňky proti normálním složkám člověka. Tyto složky se nazývají autoantigeny a jsou tvořeny z proteinů. Protilátky a T lymfocyty, které rozpoznávají autoantigeny, se nazývají autoprottilátky a autoreaktivní T buňky. Nedávné studie odhalily, že takové autoprottilátky nebo autoreaktivní T buňky existují i u zdravých jedinců. Imunitní systém má různé mechanismy k potlačení imunitní odpovědi a narušení těchto mechanismů má za následek autoimunitní onemocnění [96, 97]. Zatímco autoimunitní onemocnění je patologický stav, autoimunita se přesto odvozuje ze stejných mechanismů, které jsou základem normální imunitní odpovědi na cizí antigeny [98]. Další důkaz, že autoprottilátky a autoreaktivní T buňky mohou být přítomny u jedinců, kteří nemají klinický důkaz autoimunitního onemocnění, pochází z nových typů léčby rakoviny založené na imunoterapii. U pacientů s rakovinou, kteří jsou léčeni inhibitory imunitních kontrolních bodů se rozvine široká aktivace jejich efektorových T buněk, která je základem pro eliminaci nádorových buněk. Tato široká aktivace efektorových T buněk však v relativně krátké době uvolní řadu imunitních vedlejších účinků, které se podobají autoimunitním onemocněním vyskytujícím se v nepřítomnosti imunoterapie rakoviny. Výskyt těchto autoimunitních příhod po použití imunoterapie rakoviny silně naznačuje, že autoreaktivní T buňky a autoreaktivní B buňky (tj. autoprottilátky) u zdravých jedinců existují, ale jsou udržovány pod kontrolou regulačními mechanismy [96].

T buňky rozpoznávají známé TAA (z angl. Tumor-Associated Antigens), ovšem tyto antigeny byly nalezeny i u lidí, kteří nikdy neměli rakovinu a předpokládá se, že mohly být získány v souvislosti s jinými imunologickými stavy, např. s akutním infekčním onemocněním. Proto se navrhlo, aby tyto antigeny v současnosti označované jako TAA byly přejmenovány na antigeny spojené s onemocněním, tzv. DAA (Disease-Associated Antigens) [99].

### 1.3.3 Role autoprotilátek v protinádorové imunitě

Autoprotilátky jsou heterogenní skupinou protilátek. Tvorba autoprotilátek může být indukovaná různými patogenetickými mechanismy nebo může probíhat bez indukce jako součást tvorby přirozeného repertoáru obrany (přirozené autoprotilátky). Přirozené autoprotilátky se fyziologicky účastní první linie v obraně proti infekci, imunoregulace, obvykle jsou přítomny v nižších titrech, mají relativně nízkou afinitu k odpovídajícímu antigenu. Většina patří do třídy IgM [100]. Autoprotilátky zacílené na antigeny spojené s nádorem TAA-AAbs (z angl. Tumor-Associated Antigens Autoantibodies), se objevují při různých imunogenních stimulů souvisejících s nádorem a lze je považovat za očitě svědky protinádorové imunitní reakce. TAA-AAbs mohou být snadno detekovány v periferní krvi a značí pro přítomnost konkrétního nádoru exprimujícího TAA. Byl identifikován značný počet TAA vyvolávajících autoprotilátkovou odpověď spojenou s nádorem [101]

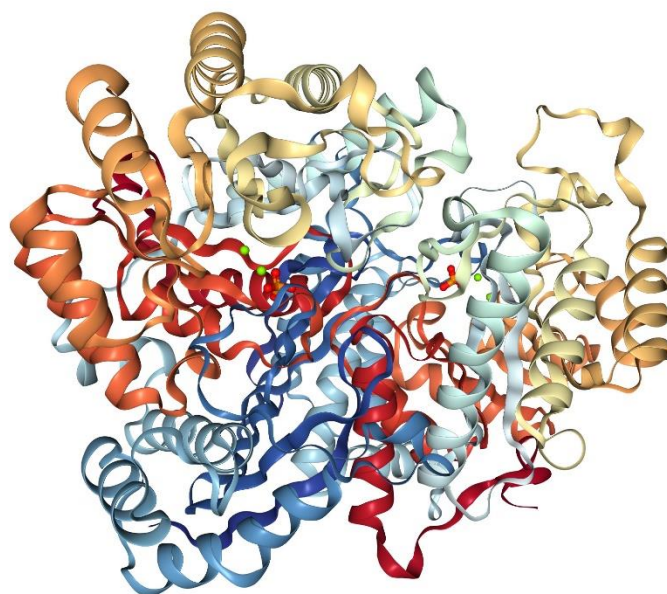
TAA-AAbs jsou rozpustné cirkulující proteiny a lze je snadno stanovit v nepatrném množství séra nebo plazmy pomocí konvenčních robustních metod (ELISA) nebo nejmodernějších multiplexních testů [102]. TAA-AAbs byly primárně identifikovány a studovány se záměrem dosáhnout včasné detekce rakoviny, především díky pozoruhodné schopnosti TAA-AAbs signalizovat přítomnost rakoviny dlouho předtím, než se život ohrožující nádor stane klinicky evidentním [103]. Například cirkulující TAA-AAbs anti-p53 (p53-AAbs) mohou být detekovány dlouho (až 11 let) před rozvojem angiosarkomu jater [104]. Autoprotilátka anti-p53 byla exprimována u různých malignit, jako jsou játra, vaječníky, prsa, plíce a jícen. Ke kvantifikaci autoprotilátek anti-p53 se používá několik metod včetně enzymatické imunoanalýzy, elektrochemiluminiscence a Western blotu. V poslední době byly vyvinuty různé elektrochemické biosenzory pro detekci autoprotilátek anti-p53 [105].

## 1.4 Enoláza

Lidská  $\alpha$ -enoláza (ENO1), známá jako fosfopyruváthydratáza, je enzym, který v lidských buňkách katalyzuje přeměnu 2-fosfoglycerátu na fosfoenolpyruvát. Tato reakce je 9. a tedy předposledního krok glykolýzy. Enoláza patří do rodiny lyáz, konkrétně hydrolyáz, které štěpí vazby uhlík-kyslík [106]. U lidí existují celkem tři podjednotky enolázy, a to  $\alpha$ ,  $\beta$  a  $\gamma$ , z nichž každá je kódována samostatným genem, který se může kombinovat za vzniku pěti různých izoenzymů:  $\alpha\alpha$ ,  $\alpha\beta$ ,  $\alpha\gamma$ ,  $\beta\beta$  a  $\gamma\gamma$ . Tři z těchto izoenzymů se vyskytují častěji v dospělých lidských buňkách než ostatní. Jsou to  $\alpha\alpha$  či non-neuronální enoláza (NNE). Také známá jako enoláza 1. Dále  $\beta\beta$  což je svalově specifická enoláza (MSE). Také známá jako enoláza 3. Tento enzym je z velké části omezen na svaly, kde je ve svalech přítomen ve velmi vysokých hladinách. Poslední je  $\gamma\gamma$  nebo také neuron-specifická enoláza (NSE). Také známá jako enoláza 2. Exprimovaná ve velmi vysokých hladinách v neuronech a nervových tkáních, kde může tvořit až 3 % celkového rozpustného proteinu [107]. Enoláza je přítomna ve všech tkáních a organismech schopných glykolýzy nebo fermentace. Enzym byl objeven Lohmannem a Meyerhofem v roce 1934 [108]. Od té doby byl izolován z různých zdrojů včetně lidských svalů a erytrocytů [106].

### 1.4.1 Struktura a funkce $\alpha$ -enolázy

$\alpha$ -enoláza je klíčovým glykolytickým enzymem v cytoplazmě prokaryotických a eukaryotických buněk a je považována za multifunkční protein. Její molekulová hmotnost je 47 kDa, teoretický izoelektrický bod je na hodnotě 6,99 a je exprimována na povrchu několika typů buněk, kde působí jako plasminogenový receptor [109, 110]. Na jednu podjednotku ENO1 se vážou dva ionty  $Mg^{2+}$  vázané na Glu292, Asp317, Asp244, Ser39 a molekuly vody [111]. Část reagující na hypoxii se nachází v promotoru ENOL-1 a umožňuje enzymu fungovat v aerobní glykolýze a přispívat k Warburgovu efektu v nádorových buňkách [112]. Globální struktura lidské ENO1 je výrazně podobná kvasinkové enoláze [111]. Obrázek č. 11 je 3D struktura enzymu ENO1.



**Obrázek 11:** 3D struktura ENO1, převzato z [113].

ENO1 se účastní řady fyziologických procesů, jako je autoimunita, tolerance k hypoxii a buněčný růst [114]. Alternativní sestřih tohoto genu vede ke kratší izoformě, u které bylo prokázáno, že se váže na promotor c-myc a funguje jako nádorový supresor.  $\alpha$ -enoláza byla také identifikována jako autoantigen u Hashimotovy encefalopatie [109]. Nadměrná exprese ENO1 je spojována s mnoha nádory včetně gliomu [112], neuroendokrinních nádorů [115], neuroblastomu [116], rakoviny slinivky [117], rakoviny prostaty [118], rakoviny plic [119], hepatocelulárního karcinomu [120] a rakoviny prsu [121]. V mnoha z těchto nádorů ENO1 podporovala buněčnou proliferaci regulací signální dráhy PI3K/AKT a navozovala karcinogenezi aktivací plazminogenu. Kromě toho je ENO1 exprimována na povrchu nádorových buněk během patologických stavů, jako je zánět, autoimunita a malignita. Její role jako receptoru plazminogenu vede k degradaci extracelulární matrix a invazi rakoviny. Díky své povrchové expresi umožňuje ENO1 selektivní zacílení na nádorové buňky [112]. Navíc u nádorů, jako jsou non-Hodgkinovy lymfomy a rakovina prsu, inhibice exprese ENO1 snižovala toleranci k hypoxii a zároveň zvyšovala citlivost na radiační terapii, což naznačuje, že ENO1 by mohla napomáhat chemorezistenci [122].

Jak bylo již zmíněno, ENO1 je exprimována v širokém spektru lidských nádorů, což z ní činí kandidáta na biomarker rakoviny. Lokalizace ENO1 na povrchu rakovinných buněk také poskytuje vynikající příležitost pro vývoj malých molekul s vysokou afinitou k tomuto proteinu, což umožňuje jeho přímé zacílení na povrch nádoru pro diagnostické zobrazování

a terapeutika [123]. Byla pozorována zvýšená exprese ENO1 v různých typech rakovinných buněk rezistentních na léky, což naznačuje potenciální použití ENO1 jako biomarkeru lékové rezistence a jako cíle pro léčbu rakoviny [124]. ENO1 má několik klíčových charakteristik ideálního biomarkeru rakoviny jako je lokalizace na buněčném povrchu, nadměrná exprese v rakovinných buňkách s nízkou expresí v normálních tkáních a nadměrná exprese korelující s prognózou a klinickými výsledky. ENO1 urychluje progresi rakoviny pomocí tří mechanismů: podporuje glykolýzu nádoru, aktivuje signální dráhy rakoviny a řídí migraci, invazi a metastázy nádoru.  $\alpha$ -enoláza si lze tedy představit jako vynikající biomarker pro vedení léčby pacienta a změnu časové osy onemocnění. Nakonec by povrchové zobrazování ENO1 mohlo být potenciálně použito pro screening okultních rakovin [123].

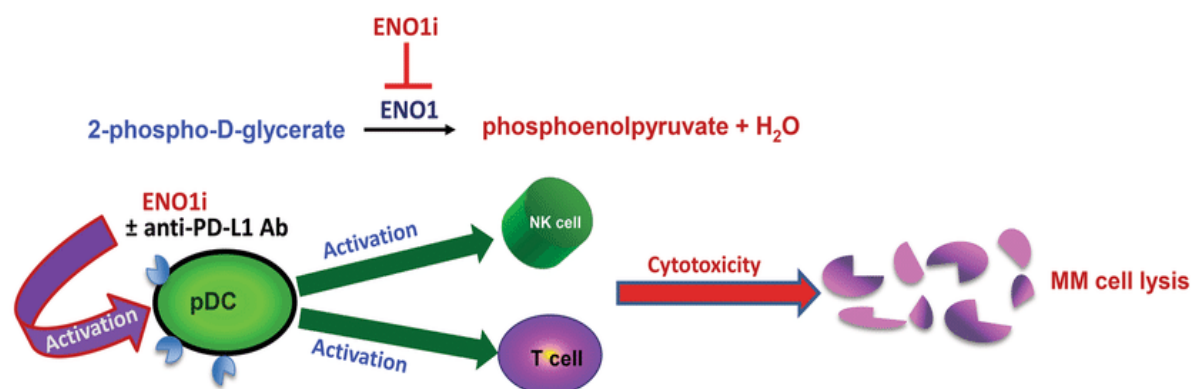
#### **1.4.2 Vztah enolázy a onemocnění mnohočetný myelom**

Neuron-specifická enoláza je jedním z nádorových markerů a její aplikace v klinické praxi se v posledních letech postupně zvyšuje s významnými diagnostickými hodnotami. NSE se podílí na tumorigenezi neuroendokrinního původu [137]. Vědci uvedli případ, kdy pacient s MM vykazoval zvýšené hladiny NSE. Pacienti s MM, kteří měli zvýšené hladiny NSE, měli horší prognózu než pacienti s normálními hladinami NSE. Pacienti se zvýšenými hladinami NSE vykazovali kratší přežití. Ačkoliv neexistovala žádná korelace mezi hladinou exprese NSE a věkem, pohlavím, typem M proteinu, hemoglobinem nebo sérovým kreatininem, existovala významná korelace mezi expresí NSE a množstvím plazmatických buněk myelomu a hladinou exprese  $\beta$ 2-MG v krvi [114]. Hladiny NSE a  $\beta$ 2-MG jsou dva nezávislé prognostické faktory, které ovlivňují přežití MM. Exprese NSE byla zvýšena v buněčné linii myelomu U266 u 67 % pacientů s MM. Kromě toho exprese NSE stoupala s progresí závažnosti onemocnění a se zvyšujícím se stupněm kostní destrukce [125].

Plazmocytoidní dendritické buňky kostní dřeně (pDC) u pacientů s mnohočetným myelomem podporují růst nádoru, přežití, rezistenci na léky a potlačení imunity. Pomocí oligonukleotidových čipů jsme zjistili, že interakce pDC s MM indukují metabolický enzym ENO1 v pDC i myelomových buňkách. Analýza exprese proteinu ukázala, že ENO1 je exprimována v buňkách pDC [126]. Kokultura pDC-MM dále zvyšuje expresi ENO1 v MM buňkách i pDC. Biochemická inhibice ENOL-1 s inhibítozem ENO1 (ENO1i) aktivuje pDC a také zvyšuje MM-specifické CD8<sup>+</sup> CTL a NK buňky indukované pDC [127]. Interakce buněk pDC-T-NK-MM stimulují proliferaci nádoru, chemorezistenci a imunosupresi. Preklinické studie potvrdily inhibici kontrolního bodu k obnovení imunitní funkce pDC

a inhibici růstu MM buněk. ENO1 stimuluje aktivitu cytotoxických T lymfocytů a NK buněk. Navíc kombinace inhibitoru ENO1i buď s anti-PD-L1 (z angl. Programmed Death-Ligand 1) Ab nebo inhibitoru HDAC6 (z angl. Histone Deacetylases) synergicky zvyšují aktivitu autologní CD8+ T buňky specifické pro mnohočetný myelom [128, 129]. U pacientů s MM exprese PD-L1 přímo koreluje s progresí onemocnění. Blokáda signální osy PD-L1-PD-1 pomocí anti-PD-L1 protilátky zvyšuje cytolytickou aktivitu MM buněk zprostředkovanou NK buňkami [130]. Další výzkum ukazuje modifikaci peptidů pocházející z proteinu ENO1, které mohou stimulovat CD8+ T buňky a CD4+ T buňky, PBMC (z angl. Peripheral Blood Mononuclear Cell) a nádorovou infiltraci lymfocytů (TIL) k uvolnění cytokinů, jako je IFN- $\gamma$  TNF- $\alpha$  a CD107a [131].

Na základě výsledků experimentů lze usuzovat, že inhibice ENO1 může zlepšit imunitní funkce pDC pacienta s MM. Inhibitor ENO1i aktivuje pDC, což dokazuje zvýšení markerů aktivace pDC (CD80/CD83/CD40). Léčba pDC pacientů s MM pomocí ENO1i spouští proliferaci autologních T buněk, stejně jako jejich aktivaci na základě exprese CD69. Aktivace pDC může stimulovat imunitní funkce CTL a NK buněk u pacientů s MM [127, 128]. Na obrázku č. 12 je schéma terapeutického potenciálu ENO1i. Léčba MM-pDC antagonisty ENO1 (ENO1i), buď samostatně, nebo v kombinaci s anti-PD-L1 protilátkou, také vytváří anti-MM-specifickou CD8+ CTL aktivitu, protože zvyšuje cytotoxicitu anti-MM buněk zprostředkovanou NK buňkami [132].



**Obrázek 12:** Schéma zapojení a terapeutický potenciál ENO1i jako imunometabolického cíle, převzato z [132].

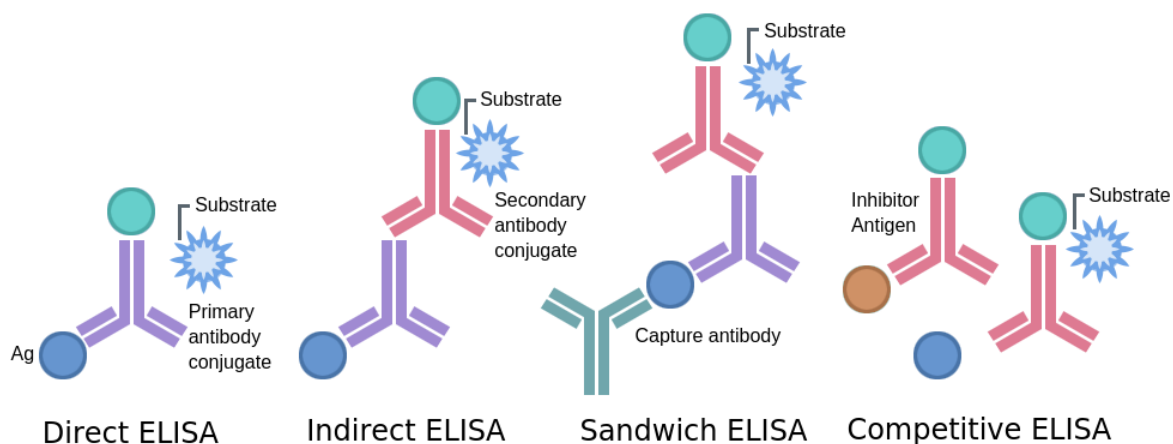
## 1.5 Přehled metod pro průkaz specifických protilátek v kapalných vzorcích

Stanovení protilátek se řadí mezi základní imunologická vyšetření. Rozlišujeme stanovení kvantitativní, kvalitativní a stanovení specifických protilátek. Při kvantitativním stanovení určujeme koncentraci celkových protilátek nebo koncentraci určitého izotypu. Kvalitativní stanovení zohledňuje druh izotypu či podtřídu protilátek. Stanovení specifických protilátek vůči určitému antigenu je v podstatě podmnožina kvalitativního stanovení, můžeme ovšem stanovit i koncentrace těchto specifických protilátek. Protilátky se nejčastěji stanovují v séru, lze je ale stanovit v celé řadě dalších tělních tekutin jako jsou plazma, moč, mozkomíšni mok a výpotek. Stanovení protilátek se dnes nejčastěji provádí nefelometricky nebo turbidimetricky. Lze také použít stanovení radiální difúzí. Specifické protilátky se nejčastěji stanovují ELISA (z angl. Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay) nebo RIA (radioimunoanalýza) metodou. Dále lze stanovit protilátky pomocí aglutinačních metod, nepřímé imunofluorescence a Western blotu, Dot blotu a turbidimetrie v prostředí PEG [133].

### 1.5.1 Princip metody ELISA

Metody enzymové imunoanalýzy (EIA) představují velkou skupinu imunoanalytických metod, které využívají jako značku enzym. Jednou z EIA metod je tzv. ELISA. Je pro ni typické, že buď antigen, nebo protilátka jsou pevně zakotveny na pevné fázi, kterou může být povrch jamek mikrotitrační destičky. ELISA metody dělíme na kompetitivní, nekompetitivní (sendvičové), přímé a nepřímé. Schéma všech těchto typů uspořádání je zakreslen na obrázku č. 13. Základní složky metody jsou antigen a protilátka, které mohou být detekovány v testovaném vzorku nebo mohou být komerčně připravovány. Další složkou je konjugát, což je protilátka proti primární protilátce (sekundární protilátka). Konkrétně proti druhově specifickým imunoglobulinům příslušného izotypu, na kterou je navázaný enzym. Ke značení se používá enzym křenová peroxidáza a její substrát peroxid vodíku, který v přítomnosti chromogenu 1,2-diaminobenzenu dává měřitelný žlutooranžový produkt. Dalším enzymem, který se využívá ke značení imunokomplexů, je  $\beta$ -Dgalaktosidasa a její substrát o-nitrofenyl- $\beta$ -D-galaktopyranosid, který je přeměňován na měřitelný žlutý nitrofenolový produkt. Ke značení se také často používá alkalická fosfatáza a její substrát p-nitrofenylfosfát, který je přeměňován na nitrofenolát [133]. Peroxidázová reakce se zastavuje 1M kyselina sírová, která zároveň stabilizuje konečný

barevný produkt enzymové reakce. U souprav, které používají alkalickou fosfatázu se enzymová reakce zastavuje roztokem hydroxidu sodného.



**Obrázek 13:** Schéma 4 typů ELISA testu: přímé, nepřímé, sendvičové a kompetitivní uspořádání, převzato z [136].

### *Kompetitivní ELISA*

Kompetitivní ELISA se používá k detekci antigenu nebo haptenu. Využívá kompetitivní vazebnou reakci na pevné fázi. U tohoto typu stanovení soutěží o vazbu na omezený počet vazebných míst na pevném povrchu imobilizovaných protilátek neznačený ligand s ligandem značeným enzymem. Po krátké inkubaci je separován volný komplex od komplexu vázaného. Po promytí je přidán substrát a enzym přítomný ve vázané frakci. Ten jej přemění na barevný produkt. Množství vzniklého produktu je nepřímo úměrné koncentraci neznačeného ligandu v testovaném vzorku. Kompetitivní metodu ELISA je možné použít ke stanovení protilátek. V tomto případě soutěží neznačené protilátky v analyzovaném vzorku s určitou danou koncentrací značených protilátek o vazbu na omezené množství antigenu imobilizovaného na pevném povrchu (vnitřní povrch polystyrenových zkumavek nebo jamek mikrotitračních destiček) [134].

### *Nekompetitivní ELISA*

Nekompetitivní ELISA, spíše známá jako sendvičová, je nejvíce používanou metodou ELISA pro stanovení antigenů, které mají nejméně dvě různé antigenní determinanty. Základem stanovení jsou polystyrenové kuličky s adsorbovaným nadbytkem specifické protilátky (většinou monoklonální) proti antigenu. Tyto kuličky jsou specifické pro jednu antigenní determinantu na sledovaném antigenu. Vzorek je inkubován s kuličkami povlečenými



protilátkou, aby se všechen antigen navázal na imobilizované protilátky na kuličkách. Poté se odstraní nenavázané látky a stanoví se množství navázaného antigenu pomocí další enzymem značené protilátky, která je namířena proti druhé antigenní determinantě na stejném antigenu. Po druhé inkubaci je stanovena aktivita enzymu, který je navázán na sendviči, přidáním vhodného substrátu. Množství vzniklého produktu je přímo úměrné množství antigenu ve vzorcích. Změna zabarvení je přímo úměrná množství antigenu ve vzorku [134].

#### *ELISA na pevné fázi*

Používá se upravený polystyrén ve formě mikrotitračních destiček, kuliček, hřebenů a pruhů. Důležitá je vhodná polymerizační teplota a délka polymerizace. Při přehnaně vysokých sorpčních vlastnostech by docházelo k navázání nežádoucích látek, a tím ke snížení citlivosti a specifity reakce. Nízké sorpční vlastnosti by nezabezpečovaly dostatečně souvislý a stabilní imunosorpční povrch. Součástí imunotestů na pevné fázi, jako je ELISA, je imobilizace biomolekul, zejména proteinů, na povrch pomocí pasivních nebo kovalentních interakcí. Schopnost povrchu interagovat s proteiny a jinými biomolekulami je samozřejmě zásadní vlastnost. Nespecifická vazba jiných proteinů nebo biomolekul na neobsazená místa na povrchu během následujících kroků testu však může snižovat specifitu a citlivost výsledků metody [135].

Při průkazu antigenu je pevná fáze pokryta specifickou protilátkou. Z vyšetřovaného vzorku se na tuto protilátku naváže antigen. Po promytí se na navázaný antigen váže opět protilátka, tentokrát značená (konjugovaná) s enzymem. Po opětovném promytí je přidán substrát. Výsledné zabarvení konečného produktu je přímo úměrné koncentraci antigenu ve vzorku [134].

#### *ELISA v roztoku*

Koncentrace celkového IgE se vyšetřují nefelometricky nebo turbidimetricky. Pro nízkou koncentraci IgE v séru se přidávají latexové kuličky k usnadnění detekce vznikajících imunokomplexů. Specifické protilátky třídy IgE proti alergenům vyžadují pro svoji nízkou koncentraci velmi senzitivní testy. Nejsnáze dostupnou metodou pro stanovení specifických protilátek IgE je metoda ELISA. Vyšetřovaný alergen je navázán buď na pevnou fázi, nebo se v průběhu reakce použije ve fázi kapalně. Významným pokrokem v použití vyšetřovacích metod ke stanovení specifických IgE je použití dvoukrokové chemiluminiscenční metody, která využívá kinetiky kapalně fáze. Vyšetřované alergeny jsou při tomto postupu kovalentně vázány na rozpustnou matrix, označenou ligandem. Tato matrix může pojmout větší množství alergenu.

Citlivost záchytu specifických IgE ve vyšetřovaných vzorcích se u těchto metod pohybuje v nanogramech na ml séra [163].

### **1.5.2 Využití metody ELISA pro průkaz specifických protilátek**

Sendvičová ELISA se využívá ke stanovení celé řady klinicky významných proteinů, nejen v klinické praxi, ale také v dalších odvětvích. V medicíně je metoda především určena ke stanovení specifických protilátek, jako jsou protilátky proti nejrůznějším infekčním agens, autoprottilátky namířené proti vlastním strukturám nebo IgE protilátky proti jednotlivým alergenům [134]. Uplatnění této metody je stručně řečeno neomezené. Jediné omezení je dostupnost specifických protilátek pro stanovovaný analyt.

ELISA testy se používají v mnoha diagnostických testech. Některá z použití testu může zahrnovat průkaz přítomnosti protilátek v krvi, a to především autoprottilátky (anti-dsDNA, ANA atd.), protilátky proti infekčním onemocněním (antibakteriální, antivirové, protiplísňové), hepatitida A, B, C, HIV. Dále detekci a odhad hladiny nádorových markerů jako jsou prostatický specifický antigen (PSA) a karcinoembryonální antigen (CEA). Další použití je pro detekci hladiny hormonů, např. luteinizační hormon, prolaktin a testosteron, lidský choriový gonadotropin (hCG). Dále lze metodu využít pro sledování propuknutí nemoci nebo pro detekci dřívějších expozic virem HIV a hepatitidy. ELISA metoda je vhodná i pro screening darované krve na možné virové kontaminanty (anti-HIV-1/2, anti-HCV a HBsAg). Další možné využití testu je pro detekci drog v séru. Nejčastěji pro amfetamin, metamfetamin, 3,4-methylendioxyamfetamin a kokain [138]. Přehled využití ELISA testů je v review od Alhajj a Farhana.

### **1.5.3 Validace metody ELISA**

Validace metody je ověření platnosti zvoleného analytického postupu. Provádí se pomocí reálných vzorků pro celý předepsaný koncentrační rozsah a různé matrice. Norma uvádí, že laboratoř musí validovat metody nenormalizované, vyvinuté, rozšířené, modifikované, normalizované mimo zamýšlený rozsah. Závěrem je vypracování validačního protokolu, který obsahuje získané výsledky, postup využití pro validaci a prohlášení, že metoda vyhovuje zamýšlenému použití [139]. Validace metody ELISA pro kvantifikaci biomarkerů, léčiv, biologických produktů a jejich metabolitů v dané biologické materiálu (např. krev, plazma, sérum nebo moč), jsou rozhodující pro úspěšné provádění klinických studií. Metodologie pro validaci bioanalytických metod se musí řídit doporučením referenčních institucí jako

je EMEA nebo WHO [140]. Validace ELISA podle těchto doporučení znamená stanovení následujících charakteristik metody: specifická, citlivost, linearita, robustnost, limit detekce, přesnost, preciznost a pravdivost. Kritéria přijetí by měla být prospektivně definována na základě zamýšleného použití metody [141]. Vývoj a validace metody musí probíhat v laboratořích, kde se pracuje v režimu správné laboratorní praxe.

#### 1.5.4 Metody sloužící k ověřování analytických parametrů metody

Metoda musí být specifická a citlivá, musí tedy odlišit cílový analyt od všech ostatních složek matrice. Proto je důležité testovat „příbuzné molekuly“ nebo fyzikálně-chemicky podobné sloučeniny, které interferují s výsledky a mohou tak poskytnout falešnou pozitivitu. Hodnocení specifčnosti může být provedeno během optimalizace a validace, když bude k dispozici více údajů o chování analytu. Specifická by měla být testována se vzorky kontroly kvality. Kritériem pro přijetí výsledků získaných se vzorky kontroly kvality je, že se naměřená hodnota neliší o více než 25 % od nominální hodnoty. Specifita je dána záchytnou protilátkou. Podle vzorce pro specifitu (pravdivě negativní / (falešně pozitivní + pravdivě negativní)) [142]. Senzitivita testu neboli citlivost testu, vyjadřuje úspěšnost, s níž test zachytí přítomnost sledovaného stavu (nemoci). Vypočítá se jako (počet skutečně pozitivních / (počet skutečně pozitivních + počet falešně negativních)). Citlivost je nejnižší detekční úroveň markeru, kterou může pár protilátek použitý v soupravě ELISA detekovat. To závisí především na afinitě protilátky na pevné fázi podle zákona o hromadném působení. Monoklonální protilátky mohou mít velmi vysokou afinitu k antigenu, a proto i vyšší specifitu než polyklonální protilátky. Monoklonální protilátka se používá jako detekční protilátka v sendvičové ELISA za účelem poskytnutí zlepšené specifity. Citlivost v ELISA se může široce lišit podle typu ELISA (kompetitivní, nepřímá nebo sendvičová ELISA), použitých antigenů a mAb a bude muset být stanovena experimentálně. Kompetitivní metoda ELISA nabízí citlivou metodu pro kvantifikaci antigenu s nízkou molekulovou hmotností obecně nižší než 10 000 Daltonů, protože jsou méně imunogenní. Citlivost se měří pomocí  $\Delta \text{Abs} / \Delta \text{koncentrace}$  (změna absorbance / změna koncentrace). Citlivost testu může být vyšší než nejnižší standardní bod [143]. Minimální počet vzorků je 100, což je dostatek k vyhodnocení jak citlivosti, tak specifčnosti většiny screeningových nebo diagnostických testů.

Linearitu analytické metody lze vysvětlit jako její schopnost ukázat výsledky, které jsou přímo úměrné koncentraci analytu ve vzorku. Bohužel analytická odezva metody není vždy lineární. Linearita je důležitá, protože potvrzuje citlivost metody pro analýzu koncentrace

v definovaném rozmezí. Přesnost analytické metody popisuje blízkost hodnot, které se stanoví danou metodou. V praxi, protože referenční materiál je vzácný a všeobecně potřebný, je prvním krokem vytvoření dostatečného množství vzorků pro kontrolu kvality. Poté lze vzorek kontroly kvality použít pro stanovení validačních charakteristik [141]. Počet kalibračních vzorků je minimálně 5 a pro každou koncentrační hladinu se stanoví nejméně dvakrát (tzn. minimálně 10 údajů). Proveďte se regresní analýza všech dat. Směrnice kalibrační křivky se ověřuje před každou analýzou (nejméně ze dvou bodů) [144]. Testování robustnosti metody zahrnuje sledování účinků malých neúmyslných chyb na kvantitativních a kvalitativních charakteristikách metody, kde jsou chyby, které se týkají vnitřních parametrů popsanych v předpisu metody. Např. teplota pufru, teplota inkubace, doba inkubace vzorku a sekundární doba inkubace protilátky. Tato vlastnost ukazuje spolehlivost metody i přes drobné odchylky ve výkonu [145].

Mez detekce je nejnižší možná koncentrace, při které může metoda detekovat (ale ne kvantifikovat) analyt v matrici s určitým stupněm spolehlivosti. LOD (z angl. Limit of Detection) je definován jako  $3 \times$  směrodatná odchylka slepého vzorku (minimálně 10 měření) [146]. Většina komerčních souprav ELISA uvádí LOD v rozsahu ng/mL. Pro proteinové analyty existuje významný počet produktů ELISA, které mají velmi nízké LOD, a to v pg/mL [147]. Limit kvantifikace je nejnižší možná koncentrace analytu, kterou lze metodou spolehlivě kvantifikovat. Spolehlivě znamená, že musí existovat a být prokázána vhodná přesnost a pravdivost. Pro měření LOD je potřeba minimálně sedmi vzorků s přidaným analytem a sedm slepých vzorků. Vzorky použité pro LOD musí být připraveny alespoň ve třech dávkách. LOQ (z angl. Limit of Quantitation) je definovaný jako  $10 \times$  směrodatná odchylka slepého vzorku [146]. Horní mez kvantifikace a dolní mez kvantifikace jsou nejvyšší a nejnižší body standardní křivky, které lze ještě použít pro kvantifikaci. Jsou to hodnoty pod a nad, kterými lze získat kvantitativní výsledky se specifikovaným stupněm spolehlivosti nebo nejvyšší/nejnižší koncentrace analytu, kterou lze přesně měřit. Horní a dolní mez kvantifikace společně definují rozsah kvantifikace pro test. Limity kvantifikace jsou specifické pro matrici, metodu a analyt [148].

Přesnost metody je těsnost shody mezi výsledkem zkoušky a pravou hodnotou měřené veličiny. Výsledek se vyjadřuje jako nejistota, tj. odhad rozmezí hodnot, mezi nimiž leží na určité hladině spolehlivosti skutečná hodnota. Preciznost je těsnost souhlasu mezi nezávislými výsledky zkoušek získaných za dohodnutých podmínek. Závisí pouze na rozdělení náhodných chyb a nemá žádný vztah ke správné hodnotě. Vypočítá se jako směrodatná odchylka výsledků

zkoušek z opakovaných měření [149]. Počet paralelních opakování k určení směrodatné odchylky pro danou koncentrační hladinu musí být minimálně sedm a relativní směrodatná odchylka musí být 3 % pro každou koncentrační hladinu. Průměrná výtěžnost se musí pohybovat mezi 95 % a 105 % pro každou koncentrační hladinu. Srovnávací vzorky musí pokrývat celý koncentrační obsah analytu a koncentrační hladina odpovídá většinou 50 % až 200 % nominální koncentrace analytu ve vzorku. Obvykle se volí minimálně tři koncentrační hladiny [144]. Pravdivost je těsnost shody mezi výsledkem aritmetického průměru nekonečného počtu opakovaných naměřených hodnot veličiny a přijatou referenční hodnotou. Představuje obecné systematické chyby nebo vychýlení (bias). Vychýlení je rozdíl mezi střední hodnotou zkoušek a přijatou referenční hodnotou. Musí se brát průměr více stanovení, protože jednotlivá hodnota může být zatížena náhodnou chybou. Dohodnutá referenční hodnota zastupuje skutečnou hodnotu, která je ve skutečnosti vždy neznámá [149].

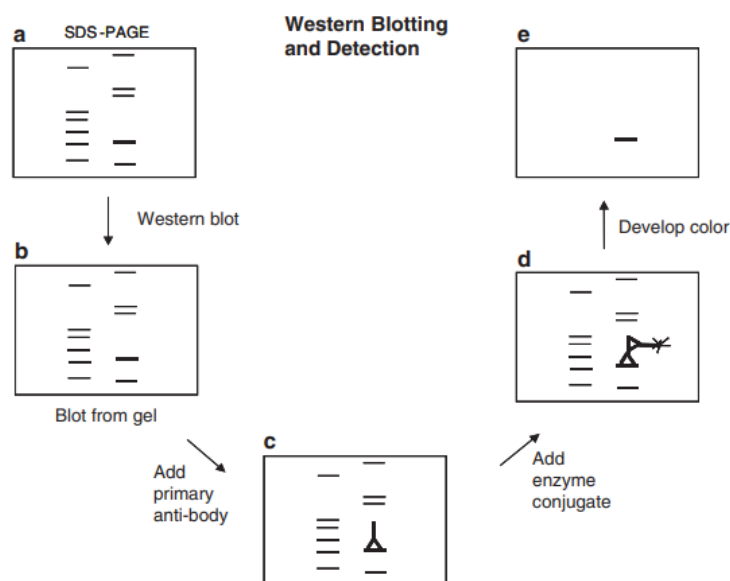
Aby bylo možné vyjádřit přesnost nebo opakovatelnost výsledků metody ELISA, uvádějí se dvě měření variačního koeficientu (CV). První je Inter-Assay CV a druhé Intra-Assay CV. Intra-assay CV je mírou rozptylu mezi datovými body v rámci testu, což znamená, že duplikáty vzorků probíhaly na stejné destičce. Inter-assay CV je míra rozptylu mezi průběhy duplikátů vzorků na různých destičkách, které lze použít k posouzení konzistence mezi destičkami. CV mezi testy je vyjádřením konzistence mezi destičkami, která se vypočítá ze středních hodnot pro vysokou a nízkou kontrolu na každé destičce. V rámci testu by mělo být CV menší než 10 %, ovšem 15 % je ještě přijatelné [150].

### **1.5.5 Western blot**

Western blot je metoda, která se používá pro kvalitativní nebo semikvantitativní detekci určitého proteinu ve vzorku. Metoda zahrnuje tři základní kroky: elektroforetickou separaci proteinů, přenos separovaných proteinů a detekci proteinů. Pro separaci proteinů se nejčastěji využívá gelová elektroforéza, nejčastěji je to SDS-PAGE (z angl. Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis). Vlivem SDS jsou proteiny denaturovány a poté získávají záporný náboj a cestují tak v elektrickém poli od záporného pólu ke kladnému. Při elektroforéze jsou proteiny děleny podle své hmotnosti [151]. Ty jsou poté přeneseny na membránu, která se inkubuje s primárními protilátkami, které jsou specifické pro každý protein. Nenavázaná protilátka se odmyje, přičemž zůstává pouze navázaná primární protilátka ke sledovanému proteinu. Konjugát se naváže na primární protilátku [152]. Výsledkem metody jsou proužky,

kteře odpovídají množství sledovaných proteinů. Poloha proužku umožňuje identifikovat protein, intenzita signálu pak určit množství proteinu [153].

Western blot se používá v poslední době při průkazu specifických protilátek např. proti jednotlivým povrchovým antigenům nebo některým nukleárním antigenům. V mnoha případech se Western blot používá v kombinaci s enzymatické imunisorbční testy nebo imunohistochemií, což jsou důležité alternativní metody detekce založené na protilátkách. Immunoblotting je důležitý ke stanovení specifity protilátek používaných pro imunohistochemii. Vysoce specifická interakce mezi antigenem a protilátkou je důležitá pro úspěšný Western blot. Nastává interakce mezi malou částí antigenu (epitopu) a místy rozpoznané na Fab oblasti molekuly protilátky (paratop). Protilátky, které jsou vybrány pro imunodetekci by měly být testovány analýzou Western blot. Protilátky mohou být polyklonální nebo monoklonální. Polyklonální protilátky se vážou na různé epitopy nalezený na jediném proteinu. Monoklonální protilátky se na druhé straně vážou pouze na jediný epitop v antigenu. Oba druhy protilátek se používají pro Western blot, ovšem polyklonální protilátky mohou poskytnout vyšší pozadí a zkříženou reaktivitu ve srovnání s monoklonálními protilátkami díky detekci více epitopů. Polyklonální protilátky jsou však citlivější než monoklonální, protože signál je v důsledku toho zesílen díky vazbě několika protilátek na antigenní cíl [154]. Kompletní schéma této metody je na obrázku č. 14.



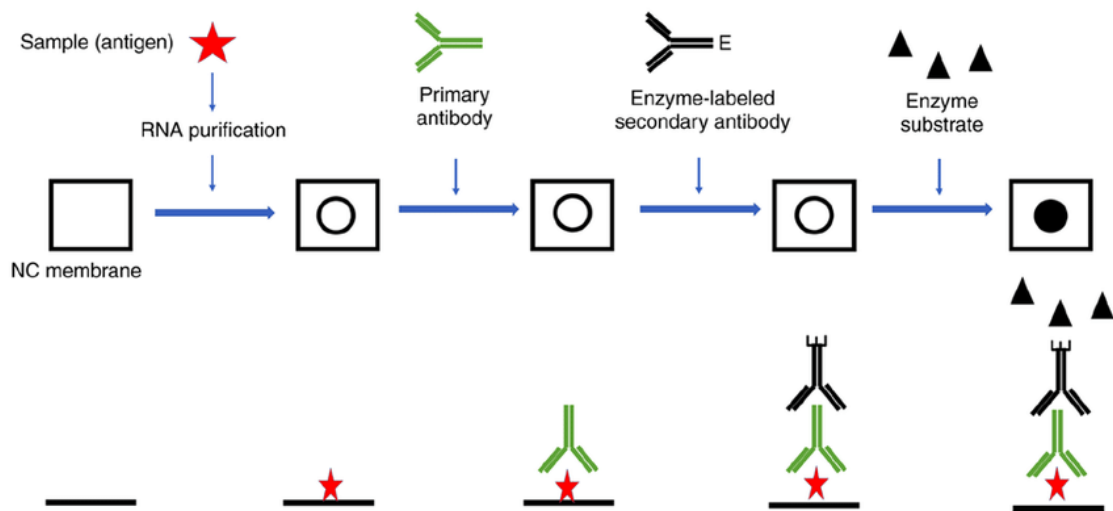
**Obrázek 14:** Schematické znázornění postupu Western blotu a následný průkaz, převzato a upraveno z [155].

Membrána s proteiny může být detekován kolorimetricky nebo chemiluminiscenčně. Kolorimetrická detekce je založena na reakci s chromogenním substrátem, kdy dojde k přeměně rozpustného bezbarvého substrátu na nerozpustný barevný substrát. Chemiluminiscenční detekce využívá reakce s chemiluminiscenčním substrátem a vzniká nestabilní produkt, který se stabilizuje vyzářením světelného kvanta. Následuje detekce použitím CCD kamer a denzitometrické stanovení množství proteinu [152].

Kvantifikace proteinů metodou Western blot se provádí měřením signálu vyzařovaného zájmovým proteinovým pásem. Intenzita signálu pásma je přímo úměrná koncentraci cílového proteinu. Analýzou intenzity signálu lze určit, zda se exprese cílového proteinu v jednom vzorku zvýšila nebo snížila ve srovnání s jiným vzorkem nebo kontrolou. Nástroje, které lze použít pro analýzu jsou tzv. „volume box“ (objemový rámeček) a „lane and band“ (pásma a pruhy). Jedním ze způsobů, jak kvantifikovat pásmo, je jednoduše nakreslit rámeček kolem něj a kvantifikovat signál v rámečku. Rámečky by měly být nakresleny kolem pásma tak, aby zahrnovaly veškerou intenzitu pásma s minimálním množstvím okolního pozadí. Další přístup pro kvantifikaci Western blotů je běžně označován jako nástroj pruhů a pásma. Tento přístup využívá dvoukrokový postup, kdy je na snímku identifikováno každé pásmo blotu a poté je uvnitř každého pruhu identifikováno jednotlivé pásmo [156].

### **1.5.6 Dot blot**

Dot blot je technika používaná k detekci proteinů. Představuje zjednodušení metody Western blot s tou výjimkou, že proteiny, které mají být detekovány, nejsou nejprve separovány elektroforézou. Místo toho se vzorek aplikuje přímo na nitrocelulóзовou nebo PVDF membránu v jediném místě a provede se blotování. Na membránu se nanese 1–2  $\mu$ l vzorku. Vzorky mohou být ve formě supernatantů tkáňových kultur, krevního séra, buněčných extraktů nebo jiných přípravků. Membrána se inkubuje v blokovacím pufru, aby se zabránilo nespecifické vazbě. Poté se membrána inkubuje s primární protilátkou a následně s konjugátem. Po navázání protilátky se membrána inkubuje s chemiluminiscenčním substrátem [157]. Dot blot se také provádí pro screening schopnosti vazby protilátky a její specificitu a pro epitopové mapování [158]. Princip metody je na obrázku č. 15.



**Obrázek 15:** Schématický diagram metody Dot blot, převzato z [159].

### 1.5.7 Turbidimetrie v prostředí PEG

Turbidimetrie je běžná analytická metoda, která se v klinické biochemii používá zejména ke stanovení specifických proteinů v solubilní formě, nekorpuskulárních. Metoda je založená na měření procházejícího světla zeslabeného rozptylem na částicích. V klinické biochemii je celá řada metod založených na měření stupně zákalu, tzv. turbidity. Nejvýznamnější z nich je soubor imunochemických metod, které využívají precipitační reakce mezi antigenem a protilátkou. Při turbidimetrických měřeních je důležité získat reprodukovatelně suspenzi měřené reakční směsi, která je dostatečně stálá. K tomu účelu se používají ochranné polymery (nejčastěji polyetylenglykol). Polyetylenglykol podporuje tvorbu zákalu. Již samotný roztok PEG poskytuje jemný zákal, a proto je nutné připravit slepé vzorky pro každou koncentraci PEG ve vyšetřovacím vzorku [160].



## 2 CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE

Cílem této diplomové práce bylo zavést metodu, která by sloužila pro průkaz a kvantifikaci specifických anti-ENO1 protilátek v lidském séru u pacientů s mnohočetným myelomem. Tato práce byla realizována v rámci projektu, který vyvíjí techniku průkazu přirozených anti-ENO1 protilátek nacházejících se v séru pacientů s mnohočetným myelomem, kteří dobře odpovídají na léčbu a dosáhli kompletní remise.

Dílčí cíle diplomové práce:

1. Ověření kvality a množství rekombinantního enzymu ENO1 pomocí metody SDS-PAGE
2. Zavedení metody pro stanovení aktivity enzymu v roztoku pomocí Warburgova testu
3. Zavedení metody ELISA sendvičového typu pro průkaz a kvantifikaci anti-ENO1 protilátek.
4. Ověření reaktivity anti-ENO1 protilátek (zdroj lidské sérum) s rekombinantní formou ENO1 metodou Dot blot
5. Ověření reaktivity s možností kvantifikace anti-ENO1 protilátek po vazbě na nativní enzym z buněčného lyzátu pomocí metody SERPA
6. Shrnutí a diskuze výsledků všech experimentů s návazností na realizaci výše zmíněného projektu

## 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 3.1 Přístroje a pomůcky

- analytické váhy Scaltec SBC 32 (Scaltec Instruments, GmbH, Göttingen, Německo)
- aparatura pro blotovací přenos Trans-Blot® SD Semi-Dry (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)
- aparatura pro diskontinuální elektroforézu Mini-PROTEAN Tetra Cell (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)
- automatické pipety Eppendorf Research (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- bloková digitální lázeň pro mikrokumavky BTD (Grant Instruments, Cambridge, Velká Británie)
- blotovací membrána Trans-Blot® Transfer Medium, porozita 0,2  $\mu\text{m}$  (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)
- blotovací membrána Immun-Blot® PVDF Membrane (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)
- centrifuga MiniSpin (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- destička mikrotitrační 96 jamek s plochým dnem (typ P) (Anicrin, Scorzè, Itálie)
- Dot-Blot DHM-96 (Scie-Plas, Cambridge, Velká Británie)
- fotografovací stanice G: BOX se softwarem GeneTools from SynGene (SynGene, Cambridge, Velká Británie)
- fotografovací stanice ChemiDoc™ XRS+ System obsahující CCD kameru s Image Lab™ softwarem (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)
- gelové proužky s imobilizovaným gradientem pH Immobiline™ DryStrip pH 3-10 NL, 7 cm (GE Healthcare, Uppsala, Švédsko)
- inkubátor Model INE 400 (Memmert, GmbH, Schwabach, Německo)
- krycí skla Mini-PROTEAN® Short Plates (Bio-rad, Praha 4, Česká republika)

- laboratorní úpravna vody Halios 40 Type 1 + 2 ultrapure + pure water (Neptec, Elbtal, Německo)
- mikrozkuřavky (BioTech a.s., Praha, ČR a Eppendorf, Hamburg, Německo)
- miniodstředivka (Fisher Scientific, Pardubice, Česká republika)
- Multi-functional Orbital Shaker PSU-20i (BioSan SIA, Riga, Lotyšsko)
- pH metr Orion 420 (Thermo Electron Corporation, Massachusetts, USA)
- programovatelná třepačka Multi Bio 3D (BioSan SIA, Riga, Lotyšsko)
- promývací stanice FlexiWash FW400 (Cellagen Technology, Praha, ČR)
- předvážky KERN 440-33N (Kern & Sohn GmbH, Balingen, Německo)
- skla s výřezem Mini-PROTEAN® podložní sklo s 0.75–1.0 mm mezerou (Bio-rad, Praha 4, Česká republika)
- skleněná kyveta 10 mm s víčkem PTFE (Hellma Optik GmbH, Jena, Germany)
- spektrofotometr BioTek PowerWave 340 (BioTek, Winooski, USA)
- spektrofotometr Libra S22 UV/VIS (Biochrom, Cambridge, Velká Británie)
- špičky eppendorf Gel-Loading (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- vakuová tlaková pumpa (Merck Millipore, Burlington, USA)
- ultrasonikátor UP200H (Hielsches, Teltow, Německo)
- zařízení pro izoelektrickou fokuzaci PROTEAN® IEF Cell (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)
- zdroj napětí PowerPac 200 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)

### 3.2 Chemikálie a reagensy

- 2-(+)-fosfoglycerát (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- 3-[(3 - Cholamidopropyl) dimethylammonio] -1-propansulfonat – CHAPS (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- agaróza (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- AgNO<sub>3</sub> (Lach:ner, Neratovice, Česká republika)
- akrylamid (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- bromfenolová modř (Lach:ner, Neratovice, ČR)
- butanol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- citrát sodný (Penta, Chrudim, Česká republika)
- destilovaná voda
- DeStreak Reagent (GE Healthcare, Uppsala, Švédsko)
- dithiothreitol – DDT (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- dodecylsulfát sodný – SDS (Serva, Heidelberg, Německo)
- ethanol 96 % (Penta, Chrudim, Česká republika)
- fenylmethylsulfonyl fluorid-PMSF (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- FeSO<sub>4</sub> (Lachema, Brno, Česká republika)
- formaldehyd 37 % (Penta, Chrudim, česká republika)
- glutaraldehyd 50 % (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- glycerol (Penta, Chrudim, Česká republika)
- glycin (Sima-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30 % (Sima-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Lach:ner, Neratovice, Česká republika)
- HCl 36 % (Penta, Chrudim, Česká republika)

- hexakynoželezitan draselný (Penta, Chrudim, Česká republika)
- hovězí sérový albumin – BSA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- imidazol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- jodacetamid-IAA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- KCl (Penta, Chrudim, Česká republika)
- $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Lach:ner, Neratovice, Česká republika)
- kyselina citrónová (Lachema, Brno, Česká republika)
- kyselina octová (Penta, Chrudim, Česká republika)
- metanol (Lach:ner, Neratovice, Česká republika)
- $\text{MgSO}_4$  (Penta, Chrudim, Česká republika)
- minerální olej (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)
- močovina (Lach:ner, Neratovice, ČR)
- N, N, N, N-tetramethylenethyldiamin – TEMED (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- N,N-methylenbisakrylamid (Serva, Heidelberg, Německo)
- $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$  (Lach:ner, Neratovice, Česká republika)
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  (Lach:ner, Neratovice, Česká republika)
- $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  (Lach:ner, Neratovice, Česká republika)
- NaCl (Lach:ner, Neratovice, Česká republika)
- $\text{NaHCO}_3$  (Lach:ner, Neratovice, Česká republika)
- $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (Lach:ner, Neratovice, Česká republika)
- NaOH (Penta, Chrudim, Česká republika)
- odtučněné sušené mléko (Aditiva CZ, Praha, Česká republika)
- o-Phenylenediamine – OPD (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Opti-4CN<sup>TM</sup> Substrate kit (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)

- persíran amonný (Lachema; Brno, Česká republika)
- směs amfolytů Pharmalyte™ pH 3 – 10 pro IEF (GE Healthcare, Uppsala, Švédsko)
- směs amfolytů Pharmalyte™ pH 8 – 10,5 pro IEF (GE Healthcare, Uppsala, Švédsko)
- standard molekulových hmotností (10 – 250 kDa) Precision Plus Protein Dual Color Standards (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)
- standard molekulových hmotností Marker Precision Plus Protein™ Unstained Standards (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)
- substrát pro imunodetekci Clarity Western ECL Substrate (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)
- thiomčovina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- tris (hydroxymethyl) aminomethan – TRIS (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Tween 20 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- vodný roztok amoniaku 26 % (Lach:ner, Neratovice, Česká republika)

### 3.3 Enzymy, protilátky, buněčné linie a další bioaktivní látky

- enzym: rekombinantní lidská enoláza ENO1 (Novus Biologicals, Centennial, USA)
- enzym: chymotrypsin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- konjugát: anti-human IgG (whole molecule) – peroxidáza – A8667 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- konjugát: rabbit anti-pig IgG – peroxidáza (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- lidská nádorová buněčná linie (suspenzní): RPMI 8226 – pocházející z B-lymfocytů izolovaných od pacientů s MM
- prasečí sérum s Ab anti-CHT třídy IgG

#### *Pacientská séra*

- séra od pacientů s MM s Ab anti-ENOL1 třídy IgG

Pacienti s MM podepsali informovaný souhlas a byli poučeni o výkonu a účelu odběru. Odběr vzorků byl schválen etickou komisí Fakultní nemocnice v Brně.

Séra pro negativní kontrolu byla získána od dobrovolných dárců, kteří poskytli tzv. informovaný souhlas a v době odběru netrpěli žádným nádorovým ani autoimunitním onemocněním.

Pro kontrolní testy byl jako zlatý standard využit vzorek séra od pacientky s MM, který poskytla Klinika hematologie a transfúziologie LF UK a UN Bratislava (MUDr. Ján Lakota, Csc.). Vzorek séra vykazuje velmi silnou a specifickou imunoreaktivitu oproti ostatním pacientským vzorkům.

### 3.4 Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v prostředí dodecylsulfátu sodného (SDS-PAGE)

#### Použité roztoky a reagensie:

##### *Roztoky pro přípravu gelu na SDS-PAGE*

- Roztok A: 11,68 g akrylamidu a 0,32 g bisakrylamidu se rozpustí ve 12 ml destilované vody a nechá se 30 minut třepat. Po úplném rozpuštění se objem roztoku doplní na 40 ml.
- Roztok B: 7,26 g TRIS se doplní na 40 ml destilovanou vodou. Postupným přidáváním 6M HCl do roztoku se pH upraví na 8,8.
- Roztok C: 4,84 g TRIS se doplní na 40 ml destilovanou vodou. Postupným přidáváním 6M HCl do roztoku se pH upraví na 6,8.
- Roztok D: 1 g SDS se rozpustí v 10 ml destilované vody.
- Roztok E: 0,1 g persíranu amonného se rozpustí v 1 ml destilované vody.

##### *Roztoky pro ředění vzorků*

- PBS pufr (pH 7,4): 2 g NaCl, 0,05 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,725 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ , 0,05 g KCl, doplnit destilovanou vodou do 250 ml.
- Roztok G: 100mM Tris-HCl pufr (pH 6,8) s 4 % SDS, 20 % glycerol, 0,2 % bromfenolová modř.

##### *Roztok pro elektroforézu*

- Elektrodotový pufr (pH 8,3 – 8,6): 3,03 g TRIS, 1 g SDS a 14,4 g glycinu se rozpustí a doplní destilovanou vodou do 1 l.

##### *Roztoky pro barvení amoniakálním stříbrem*

- Fixační roztok: 50 ml kyseliny octové, 500 ml ethanolu a doplnit destilovanou vodou do 1 l.
- 10 % roztok glutaraldehydu: 20 ml 50 % glutaraldehydu, 80 ml destilovanou vodou.



- Roztok amoniakálního stříbra: 21 ml destilované vody, 1,4 ml vodného roztoku amoniaku, 239  $\mu$ l 9M NaOH. K roztoku se pomalu přidá roztok 20 % AgNO<sub>3</sub> do vzniku hnědého zabarvení. Výsledný hnědý roztok se doplní do 100 ml destilovanou vodou.
- Vyvolávací roztok: 250 mg kyseliny citrónové, 540  $\mu$ l 37 % formaldehydu, 500 ml destilované vody.
- Ustalovací roztok: 50 ml kyseliny octové a poté doplnit destilovanou vodou do 1 l.

### **Pracovní postup:**

#### *Příprava gelů, elektroforéza*

Aparatura a skla se nejprve očistí pomocí ethanolu a poté osuší. Sklo se vloží do aparatury a k němu se přidá krycí sklo. Svorky se zavřou a po celé délce dolní hrany skle se natáhne parafilmu. Poté se celá aparatura přesune do digestoře a celá práce se provádí v rukavicích. Nejprve se do skleněné zkumavky připraví dělicí gel. Podle tabulky č. 3 se nejprve napipetuje destilovaná voda, roztoky A, B, D a TEMED. Obsah zkumavky se opatrně promíchá. Jako poslední se do zkumavky přidá roztok E. Zkumavka se uzavře a její obsah se opatrně promíchá a co nejrychleji napipetuje mezi skla. Roztok se pipetuje do výšky 2 – 2,5 cm od vrchního okraje menšího skla. Při pipetování se nevypouští celý obsah pipety, aby v gelu nebyly bubliny. Po napipetování se gel převrství destilovanou vodou. Doba tvrdnutí gelu je 30 minut. Než gel ztuhne, tak se připraví 5 % zaostřovací gel dle tabulky č. 3, tj. do zkumavky se napipetuje destilovaná voda, roztoky A, B, D, TEMED. Když dělicí gel zpolymeruje, odsaje se přebytečná voda pomocí filtračního papíru, která je nad dělicím gelem. Filtrační papír se nesmí dotknout gelu. Do zkumavky se ještě přidá roztok E a celý obsah se promíchá a opět rychle napipetuje mezi skla. Pipetování musí být bez bublin. Pipetuje se po vrchní hranu menšího skla. Následně se do mezery mezi skly vloží očištěný hřebínek, pomocí něhož se vytvoří jamky. Gel tuhne 20 minut. Po ztuhnutí se gel přenesse do elektroforetické vany a nalije se elektrodový pufr. Opatrně a rovnoměrně se vyndá hřebínek a jamky se několikrát propláchnou elektrodovým pufrem. Připravené vzorky se smíchají s roztokem G v poměru 1:1. Tato směs se 3 minuty povaří v termobloku při 100 °C. Následně se vzorky napipetují do propláchnutých jamek. V elektroforetické vaně jsou vyznačeny rysky, po které se dolije elektrodový pufr a vana se uzavře víkem. Následně se elektroforetická vana připojí ke zdroji napětí a nastaví podmínky pro elektroforézu. Na zdroji se navolí napětí o 180 V, proud 30 mA pro každý z gelů a spustí čas. Po 60 minutách se elektroforéza vypne. Gel se opatrně přesune ze skla do Petriho misku za pomoci proudu destilované vody.

**Tabulka 3:** Příprava gelu pro elektroforézu.

	<b>12 % dělicí gel (ml)</b>	<b>5 % zaostřovací gel (ml)</b>
<b>destilovaná voda</b>	1,68	1,4
<b>roztok A: 30 % AA a bisAA</b>	2,0	0,33
<b>roztok B: 1,5 M Tris, pH 8,8</b>	1,25	----
<b>roztok C: 1 M Tris, pH 6,8</b>	----	0,25
<b>roztok D: 10 % SDS</b>	0,05	0,02
<b>TEMED</b>	0,002	0,002
<b>roztok E: 10 % APS</b>	0,05	0,02

*Barvení roztokem amoniakálního stříbra*

Po elektroforéze se gel v Petriho misce propláchne vodou a fixuje ve fixačním roztoku 30 minut při laboratorní teplotě za mírného míchání. Lze jej fixovat i přes noc při 4 °C. Po fixaci se gel rehydratuje v destilované vodě po dobu 30 minut za mírného třepání. Po rehydrataci se gel inkubuje 30 minut v 10 % roztoku glutaraldehydu při laboratorní teplotě za mírného třepání. Následuje promytí gelu v destilované vodě. Promytí se 6x opakuje po 10 minutách za mírného třepání. Po promytí se ke gelu přidá roztok amoniakálního stříbra a následuje inkubace 15 minut při laboratorní teplotě. Opět při mírném třepání. Po inkubaci se gel propláchne destilovanou vodou a do Petriho misky se přidá vyvolávací roztok. S miskou se mírně třepe, dokud se nezačnou objevovat proužky na gelu. Po vyvolání se gel přenesse do ustalovacího roztoku. Výsledek gelu se vyfotí na detekční stanici ChemiDoc™ XRS.

### 3.5 Stanovení aktivity enolázy

#### Použité roztoky a reagensie:

- Imidazolový pufr (pH 7,4): 0,034 g imidazolu, 0,0584 g NaCl, doplnit do 100 ml rdH<sub>2</sub>O, poté upravit 1M HCl pH. Pufr musí být vždy čerstvý.
- Reakční směs: k imidazolovému pufru přidat 400 mM KCl (2,982 g) a 1mM MgSO<sub>4</sub> (0,012 g).
- Množství enzymu: 0,5 - 2 µg.
- Koncentrace 2-(+)-fosfoglycerátu (substrát): 0,5 - 2,5 mM. Lepší je připravit si zásobní roztok 100 mM. Substrát se doplní do imidazolovým pufr. Zásobní roztok se dělá čerstvý vždy s novým imidazolovým pufr.

#### Pracovní postup:

Do spektrofotometru se vloží Peltier, který slouží pro regulaci teploty a vkládá se do něj kyveta. V počítači se spustí program BioDC. Až poté lze zapsat podmínky měření do spektrofotometru. Měření probíhá kineticky (na spektrofotometru se vybere Simple kinetic) a potom se nastaví teplota, vlnová délka, interval měření a doba měření. Tyto podmínky se přenesou do programu v počítači. Následně se připraví vzorky pro měření do mikrozkušavek a zásobní roztok substrátu. Objem vzorku a substrátu musí být dohromady 500 µl, aby se vešel do kyvety, která má stejný objem. Zvolené množství enzymu, tj. 0,5 – 2 µg se napipetuje do určitého objemu reakční směsi a promíchá. Viz tabulka č. 4.

Kyveta se opatrně očistí ubrouskem, aby na ní nebyly nečistoty. Vnitřek kyvety se 3x propláchne rdH<sub>2</sub>O a vysuší. Do kyvety se napipetuje reakční směs (bez enzymu). Kyveta se vloží do Peltieru, přístroj se zavře a spustí se měření. Tento vzorek je blank, tudíž je absorbance 0. Poté se kyveta znova propláchne rdH<sub>2</sub>O, osuší, očistí ubrouskem a napipetuje se do ní reakční směs s příslušným množstvím enzymu. Kyveta se vloží do Peltieru, nechá se 1 – 2 minuty vytemperovat a pomocí špiček Gel-loading se do kyvety napipetuje substrát. Pomocí pipety se celá směs promíchá, přístroj se zavře a spustí měření po dobu 10 minut.

**Tabulka 4:** Příprava vzorků pro měření na spektrofotometru.

<i>Koncentrace substrátu (mM)</i>	<i>Objem reakční směsi (μl)</i>	<i>Množství enzymu (μg)</i>	<i>Objem substrátu ze 100 mM zásobního roztoku (μl)</i>
<b>0,5</b>	497,5	0,5	2,5
<b>1</b>	495	0,5	5
<b>1,25</b>	493,7	0,5	6,3
<b>1,5</b>	492,5	0,5	7,5
<b>1,75</b>	491,25	0,5	8,8
<b>2</b>	490	0,5	10
<b>2,5</b>	487,5	0,5	12,5

## 3.6 ELISA

### Použité roztoky a reagensie:

- PBS pufr (pH 7,4): 4 g NaCl, 0,1 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1,45 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ , 0,1 g KCl, doplnit destilovanou vodou do 500 ml.
- Fosfátový pufr (pH 6,2): 2,275 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,2985 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ , doplnit destilovanou vodou do 250 ml.
- Uhličitanový pufr (pH 9,49): 2,145 g  $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ , 1,465 g  $\text{NaHCO}_3$ , doplnit destilovanou vodou do 500 ml.
- Následující roztoky se připravují vždy čerstvé.
- 2,5 % roztok glutaraldehydu: 0,5 ml 50 % glutaraldehydu, doplnit uhličitanovým pufrem do 10 ml.
- Blokovací roztok 1 % BSA: 0,1 g BSA, doplnit PBS pufrem do 10 ml.
- Ředící roztok pro vzorky: 1 ml 1 % BSA, 9 ml PBS pufru, 5  $\mu\text{l}$  Tween 20 (5  $\mu\text{l}/10$  ml).
- Roztok pro ředění konjugátu: 0,01 g BSA, 10 ml uhličitanového pufru, 5  $\mu\text{l}$  Tween 20.
- Substrátový roztok: 0,005 g OPD (5 mg/ 10 ml), 10 ml fosfátový pufr, 50  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  (50  $\mu\text{l}/10$  ml).

### Pracovní postup:

Nejprve se připraví mikrotitrační destičku typu P. Poté se upraví povrch jamek 150  $\mu\text{l}$  2,5 % glutaraldehydem. Destička se přiklopí víčkem a inkubuje 2 hodiny při laboratorní teplotě. Obsah destičky se vyklepne a do jamek se přidá 100  $\mu\text{l}$  antigenu o určité koncentraci. Takto připravená destička se inkubuje při 4 °C minimálně 20 hodin, nejdéle 5 dní. Po inkubaci se destička vyklepne a 3x promyje destilovanou vodou. Následně se obsah jamek blokuje napipetováním 150  $\mu\text{l}$  blokující roztoku. Destička se inkubuje 1 hodinu při 37 °C. Během inkubace se připraví roztok pro ředění séra. Sérum se vyndá z mrazáku cca 30 minut před skončením inkubace. Sérum je vhodné ředit v rozmezí 1:1000 až 1:2000. Po skončení inkubace se obsah destičky vyklepne, bez promytí a do jamek se napipetuje 100  $\mu\text{l}$  zředěného séra. Destička se séry se inkubuje 1 hodinu při 37 °C. Během inkubace se připraví roztok pro ředění konjugátu. Ředění konjugátu je vhodné od 1:5000 do 1:10 000. Konjugát se do roztoku přidá

až před skončením inkubace. Po skončení inkubace se destička vyklepne a jamky se 3x promyjí destilovanou vodou. Poté se do jamek přidá 100  $\mu$ l vhodně naředěného konjugátu. Destička se opět inkubuje 1 hodinu při 37 °C. Před skončením inkubace se připraví substrátový roztok. Nádobka s roztokem se obalí alobalem. Po skončení inkubace se destička vyklepne a jamky minimálně 5x promyjí destilovanou vodou. Nyní se k substrátovému roztoku přidá peroxid vodíku a napipetuje se do jamek 100  $\mu$ l roztoku. Celá destička se zabalí do alobalu, zde je nutná inkubace ve tmě. Destička se dá do termostatu inkubovat při 37 °C po dobu 15 minut. Pokud sérum obsahuje protilátky, tak se jamka zbarví do žlutooranžové barvy. Zbarvení je přímoúměrné absorbanci. Po 15 minutách se do každé jamky přidá 50  $\mu$ l 1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, aby se reakce zastavila. Barevný odstín roztoku se měří při 490 nm na spektrofotometru BioTek PowerWave 340.

### 3.7 DOT BLOT

#### Použité roztoky a reagensie:

- Ekvilibrační a promývací roztok: PBS-T: PBS pufr (pH 7,4): 4 g NaCl, 0,1 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1,45 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ , 0,1 g KCl, doplnit destilovanou vodou do 500 ml. Přidat 250  $\mu\text{l}$  Tween 20 (100  $\mu\text{l}$ /200 ml pufru).
- Blokovací roztok 5 % BSA: 0,5 g BSA, doplnit do 10 ml PBS-T pufr.
- Roztok pro ředění primárních protilátek: 0,025g BSA, doplnit do 10 ml PBS-T pufru.
- Roztok pro ředění konjugátu: PBS-T pufr
- Substrátový roztok: Opti-4CN™ Substrate Kit: Opti-4CN™ Diluent (5,4 ml  $\text{rdH}_2\text{O}$  + 0,6 ml diluentu), Opti-4CN™ Substrate (120  $\mu\text{l}$ /6 ml).
- Fosfátový pufr pH 7,3: 3,58 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  a doplnit do 10 ml destilovanou vodou, z toho odebrat 0,845 ml; 1,56 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  a doplnit do 10 ml destilovanou vodou, z toho odebrat 0,155 ml a doplnit do 100 ml destilovanou vodou.
- Zásobní roztok BSA: 2,5 mg/500  $\mu\text{l}$  fosfátového pufru.
- Negativní kontrola: 3  $\mu\text{g}$  BSA/ml: 4,2  $\mu\text{l}$  BSA ze zásobního roztoku + 695,8  $\mu\text{l}$  fosfátového pufru (celkem 700  $\mu\text{l}$ , pipetuje se 100  $\mu\text{l}$  do jamky).

#### Pracovní postup:

Nejprve se připraví všechny vzorky včetně negativní kontroly a blanku. Jako blank se použije fosfátový pufr. Teprve potom si lze připravit aparaturu na dot blot. Podle šablony se vystříhne PVDF membrána a pomocí pinzety se vloží do Petriho misky s metanolem na 1 minutu. S membránou se pracuje v rukavicích pomocí pinzety po celou dobu experimentu. Poté se membrána přenesse na aparaturu a zapne se vakuová pumpa. Membránu je ještě třeba zastříhnout, aby přesně seděla na aparatuře. Až poté se na membránu na destička s 96 jamkami a celá aparatura se zajistí šrouby. Dále se membrána ekvilibruje 100  $\mu\text{l}$ / jamka PBS-T pufr. Je třeba kontrolovat, zda se pufr dostal na membránu a jamka je prázdná. Ekvilibrace se provádí 2x před nanesením vzorků. Při Dot blotu se pracuje v uskupení čtverce, takže antigen se dává do levého horního rohu, negativní kontrola pod vzorek a blank vedle negativní kontroly. Jamka vedle vzorku je prázdná. Opět se pipetuje všeho 100  $\mu\text{l}$ / jamka. Poté se membrána promyje 100  $\mu\text{l}$  PBS-T pufru. Pokud jsou všechny jamky prázdné, mohou se uvolnit

šrouby a dolní roh membrány se nadzvedne pinzetou, aby se uvolnit podtlak. Až poté se může vypnout vakuová pumpa. Membrána se opatrně přenesse na fólii a nechá uschnout. Následně se rozstříhá na čtverečky, podle toho, jak se pipetovaly vzorky (vždy je ve čtveřici: vzorek, prázdná jamka, negativní kontrola a blank). Membrána se pinzetou přenesse do speciální Petriho misky, která je dělená na čtverečky. Poté se membrána blokuje 1ml/ čtvereček 5 % roztokem BSA a 1 hodinu inkubuje na třepačce. Po blokaci se membrána 3x rychle promyje 1 ml PBS-T pufrem. Na membránu se aplikuje 1ml séra, které se ředí 1:1000 ředícím roztokem pro primární protilátky. Membrána se 1 hodinu inkubuje na třepačce. Po inkubaci se membrána 3x rychle promyje PBS-T pufrem. Dále se znova membrána 3x promyje, ovšem pomaleji. K membráně se přidá 1 ml PBS-T pufru a miska se dá na 5 minut na třepačku. Po promytí se aplikuje 1 ml konjugát, který se ředí 1:1000 ředícím roztokem. Membrána se 1 hodinu inkubuje na třepačce. Po inkubaci se membrána opět 3x rychle a 3x pomalu promyje. Poté se připraví substrátový roztok Opti-4CN<sup>TM</sup>, kterého se aplikuje 1 ml na membránu (zde záleží na velikosti membrány). Membrána se s roztokem 30 minut inkubuje. Lze i méně, pokud se dříve objeví pozadí. Poté se k membráně přidá PBS-T pufr, ve kterém je možné membránu uchovat. Výsledek experimentu byl vyfocen na detekční stanici G: BOX se softwarem GeneTools.



## 3.8 SERPA

### 3.8.1 Příprava buněčného lyzátu

#### Použité roztoky a reagensie:

- Lyzační roztok: 7 M močovina, 2 M thiomočovina, 4 % CHAPS, 1 % DTT, 0,2 % Pharmalyte, 1 mM PMSF.

#### Pracovní postup:

Buněčný lyzační roztok, který je čerstvě připravený, se přidá v objemu 400  $\mu$ l peletě RPMI buněčné linie, která byla předtím zmrazena na  $-80^{\circ}\text{C}$ . Pipetou se vše řádně promíchat a přenese do nové 1,5 ml mikroskopické zkumavky. Poté se zahájí sonikace (20 s, Amplituda 80 %, cyklus 1), aby se rozrušili buňky. Po sonikaci se buňky centrifugují po dobu 10 min a 12 300 rpm. Poté se odebere supernatant do nové 1,5 ml mikroskopické zkumavky.

### 3.8.2 Rehydratace gelových proužků

#### Použité roztoky a reagensie:

- Rehydratační roztok: 6 M močovina, 2 M thiomočovina, 4 % CHAPS, 40 mM TRIS, 1,2 % DeStreak, bromfenolová modř. Příprava směsného roztoku do 1,5 ml zkumavky.

**Tabulka 5:** Příprava směsného roztoku dle počtu gelových proužků

Směsný roztok	1 gelový proužek (120 $\mu$ l)	5 gelových proužků (600 $\mu$ l)
Rehydratační roztok	80 $\mu$ l	343 $\mu$ l
Buněčný lyzáat	60 $\mu$ l	257 $\mu$ l
Pharmalyte 3 – 10	1,3 $\mu$ l	5,6 $\mu$ l
Pharmalyte 8 – 10,5	0,65 $\mu$ l	2,8 $\mu$ l

#### Pracovní postup:

Gelové proužky s pH rozmezím od 3 do 10 se před použitím rehydrují. Na dno plastové kazetky je napipetováno 120  $\mu$ l směsného roztoku. Jeho příprava je v tabulce č. 5. Z gelových proužků se sundá folie a gelový proužek se položí gelem dolů na nadávkovaný roztok tak, aby pod ním nezůstaly bublinky. Poté se gelový proužek převrství 1 ml minerálního oleje. Kazetka s proužky se rehydratuje přes noc. Doba rehydratace je 16 – 18 hodin při  $20^{\circ}\text{C}$  v přístroji na IEF.

### 3.8.3 Izoelektrická fokuzace

#### Pracovní postup:

Po rehydrataci se gelový proužek opláchnou destilovanou vodou a lehce se osuší filtračním papírem. Gelový proužek se položí gelem dolů (plus koncem k plus straně kazetky) na elektrody s namočenými filtračními papírky. Gelový proužek se převrství 1 ml minerálního oleje a přikryjí víkem kazetky, aby se gelový proužek přitlačil k elektrodě. Gelový proužek se vloží do přístroje (PROTEAN® IEF systém), ve kterém probíhá izoelektrická fokuzace. Doba separace je 7,5 až 8 hodin, během jednotlivých kroků by hodnota proudu neměla přesáhnout 90  $\mu\text{A}$ , a proto se nastaví 75  $\mu\text{A}$  / gelový proužek. Přístroj se může vypnout, až hodnota (Vh) na přístroji dosáhne rozmezí 9 000 – 10 000 Vh. Poté se gelový proužek opláchnou destilovanou vodou, osuší filtračním papírkem a může se uchovat v kazetkách pro další analýzu. Kazetky se zabalí do fólie a zamrazí při  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### 3.8.4 2D SDS-PAGE a ekvibrace gelový proužeků

#### Použité roztoky a reagensie:

##### *Roztoky pro přípravu gelu a elektroforézu*

- Roztok A: 11,68 g akrylamidu a 0,32 g bisakrylamidu se rozpustí ve 12 ml destilované vody a nechá se 30 minut třepat. Po úplném rozpuštění se objem roztoku doplní na 40 ml.
- Roztok B: 7,26 g TRIS se doplní na 40 ml destilovanou vodou. Postupným přidáváním 6M HCl do roztoku se pH upraví na 8,8.
- Roztok C: 4,84 g TRIS se doplní na 40 ml destilovanou vodou. Postupným přidáváním 6M HCl do roztoku se pH upraví na 6,8.
- Roztok D: 1 g SDS se rozpustí v 10 ml destilované vody.
- Roztok E: 0,1 g persíranu amonného se rozpustí v 1 ml destilované vody.
- Elektrodotový pufr (pH 8,3 – 8,6): 3,03 g TRIS, 1 g SDS a 14,4 g glycinu se rozpustí a doplní destilovanou vodou do 1 l.

### *Roztoky pro ekvilibraci gelových proužků*

- Ekvilibrační roztok na 50 ml (připravit čerstvý nebo den předem a uchovat v lednici): 18 g močoviny, 15 ml 50 % glycerolu, 1,006 g SDS, 1,67 ml roztoku B.
- Roztok DTT 10 ml (4 gelové proužky): 0,1 g DTT rozpustit v 10 ml ekvilibračního roztoku.
- Roztok IAA 10 ml (4 gelový proužky): 0,4 g IAA rozpustit v 10 ml ekvilibračního roztoku.
- Převrstvovací roztok: 0,5 % agaróza v elektrodo­vém pufru.

### **Pracovní postup:**

Pro 2D SDS-PAGE se používají 1 mm skla, která se vyleští ethanole. Poté se sestaví aparatura. Do zkumavky se připraví 12 % dělicí gel a 5 % zaostřovací gel (roztok E přidat až po ztuhnutí dělicího gelu), viz tabulka č. 3, který se napipetuje mezi skla. Dělicí gel se převrství butanolem a nechá alespoň 30 – 40 minut zpolymerovat. Poté se odsaje butanol filtračním papírem a napipetuje zaostřovací gel až po horní okraj krycího skla a vloží se po straně hřebínek. Gel ztuhne do 20 minut. Nakonec se gel vloží do elektroforetické vany a zalije elektrodo­vým pu­frem. Jamka pro gelový proužek se propláchne a před vložením proužku se pomocí filtračního papíru odsaje přebytečný elektrodo­vý pufr z jamky.

Po rozmrazení se gelový proužek ekvilibruje 15 minut v 1,5 ml roztoku DTT (množství pro jeden proužek) na třepačce, poté se opláchne a osuší. Gelový proužek se dále opět 15 minut ekvilibruje na třepačce ve tmě v 1,5 ml roztoku IAA. Mezitím se zapne termoblok a agaróza se vytemperuje na 100 °C, aby byla tekutá. Proužky se opláchnou destilovanou vodou, osuší se filtračním papírem a zastříhnou se, aby se vešly do jamky. Pak lze gelový proužek zasunout mezi skla gelem ke kratší straně. Kovovými kopisty se proužek přitlačí až ke gelu, tak aby mezi proužkem a gelem nezůstala žádná bublinka a (+) konec proužku byl v levém rohu, tj. hned vedle jamky pro standard molekulových hmotností. Filtračními papíry se opatrně odsaje pufr nad proužkem a nalije se 0,5 % agaróza s bromfenolovou modří. Agaróza nesmí být příliš horká a nesmí se dostat do jamky pro standard. Po ztuhnutí agarózy se vana doplní elektrodo­vým pu­frem po rysku. Molekulový standard se dávkuje na gel jako poslední v objemu 4 ul. Poté se vana uzavře a připojí ke zdroji napětí. Prvních 5 minut probíhá separace při napětí 60 V a až pak se napětí navýší na 180 V, proud je nastaven 30 mA / gel. Elektroforéza probíhá zhruba

1 hodinu a je potřeba, aby barvivo, které je obsaženo v molekulovém markeru, opustilo gel. Po dokončení elektroforézy následuje blotování gelu na NC membránu.

### 3.8.5 Semi-Dry Western blot

#### Použité roztoky a reagensie:

- PBS-T pufr pH 7,4: 8 g NaCl, 0,2 g KCl, 0,2 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 2,9 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ , 4 ml Tween 20 a doplnit  $\text{dH}_2\text{O}$  na 1 litr.
- Transferový pufr (Towbin): 3,03g Tris, 14,4g glycin, 200 ml metanol a doplnit  $\text{dH}_2\text{O}$  na 1 litr.
- Blokovací roztok 5 % mléko: 5 g odtučněného sušeného mléka na 100 ml PBS-T pufru.

#### Pracovní postup:

Po proběhnutí elektroforetické separace se gel vyjme z aparatury, oddělí se od sebe skla a pomocí nástrojů se odřízne část gelu s proužkem. Gel se z jednoho skla přenesse do Petriho misky s transferovým pufrem. Do transferového roztoku se také namočí tlusté filtrační papíry a membrána NC, která se ustříhne podle šablony. V případě většího počtu gelů lze membrány popsat tužkou číslem (do horního rohu). Smočením membrány do pufru dojde tak k aktivaci jejího povrchu. Víko aparatury pro Semi-dry Western blot se odklopí a odstraní se vrchní elektroda (katoda). Na spodní elektrodu (anodu) se vloží navlhčený tlustý filtrační papír, který se uhladí válečkem, aby se vytlačily vzduchové bubliny. Následně se na filtrační papír pinzetou nanese NC membrána a na ni se přenesse gel. Vše je zakryto dalším mokrým filtračním papírem a vše se opět uhladí válečkem. Poté se vrátí zpět vrchní elektroda a kryt aparatury. Aparatura se připojí ke zdroji a na přístroji se nastaví napětí 12 V, proud 0,3 A/gel a čas 70 minut. Během blotování se připraví blokovací roztok, který se následně pomocí nálevky a filtračního papíru přefiltruje, aby se zamezilo přítomnosti nerozpuštěných částic. Filtrací roztoku se předejde zanešení hadiček promývací stanice FlexiWash 400. Po ukončení blotování se membrány promyjí na třepačce 3x po 5 minutách v destilované vodě a barví se roztokem  $\text{AgNO}_3$ .

### 3.8.6 Barvení proteinů na membráně

#### Použité roztoky a reagensie:

- Barvicí roztok: 0,16 g  $\text{AgNO}_3$ , 0,8 g  $\text{FeSO}_4$ , 2 g citrátu sodného a doplnit do 100 ml destilovanou vodou.

- Odbarvovací roztok: 1,24 g thiosulfátu sodného, 0,494 g hexakynoželezitanu draselného a doplnit do 100 ml destilovanou vodou.

#### **Pracovní postup:**

Po promytí destilovanou vodou se k membráně přidá barvicí roztok koloidního stříbra a membrána se 6 minut barví na třepačce. Membrána se několikrát rychle promyje a poté se vyfotí na stanici Genesys. Následně se membrána odbarví v odbarvovacím roztoku pomocí krouživých pohybů, dokud se barva zcela nevymyje. Membrána se přesune do nové misky a dvakrát promyje v roztoku PBS-T pufru. Nyní lze pokračovat v imunodetekci.

### **3.8.7 Imunodetekce na promývačce Flexi Wash 400 a detekce imunoreaktivních spotů**

#### **Použité roztoky a reagenty:**

- Blokovací roztok 5 % mléko: 5 g odtučněného sušeného mléka na 100 ml PBS-T pufru.

#### **Pracovní postup:**

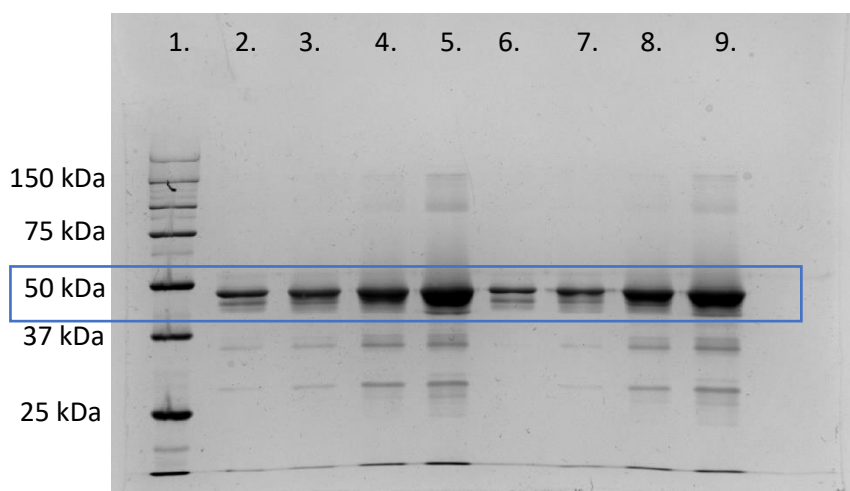
Nejprve se promývačka promyje redestilovanou vodou, zapne se program Clean a poté se ještě stanice promyje 600 ml PBS-T pufru. Připraví se blokovací roztok, kterým se ředí primární protilátka (sérum) a konjugát. Sérum se ředí nejčastěji 1:500 a konjugát 1:5 000. Membrána se položí do plastových misek u promývací stanice, ve kterých podle předem nastaveného programu dojde k následujícím krokům: blokace membrány pomocí blokovacího roztoku, inkubace s primární protilátkou, promytí pomocí roztoku PBS-T a následná inkubace s konjugátem. Program se spouští tak, aby probíhal přes noc (cca 17–18 hodin). Následující den se membrána přenese z misky od promývačky do Petriho misky s PBS-T pufrem. Připraví se 2 ml roztoku ECL/membrána pro chemiluminiscenční detekci. Příprava probíhá za minimálního přísunu světla. Inkubace s roztokem probíhá za kývavého pohybu po dobu 30 sekund, poté se membrána osuší filtračním papírem a přenese na desku detekční stanice. Na detekční stanici G: BOX se softwarem GeneTools.

## **4 VÝSLEDKY A DISKUZE**

Experimentální část této práce je zaměřena na zavedení metody pro průkaz a kvantifikaci specifických anti-ENO1 protilátek v lidském séru. K průkazu ale i ke kvantifikaci specifických protilátek je s oblibou používána metoda ELISA. Dalšími tzv. konfirmačními metodami jsou např. Western blot či Dot blot. Alternativou je také metoda SERPA, kde lze sledovat reaktivitu specifických protilátek s nativní formou enzymu pocházejícím z buněčného lyzátu nádorové buňky. Součástí diplomové práce bylo i zavedení metody stanovení aktivity enzymu ENO1.

## 4.1 Ověření kvality a množství rekombinantního enzymu ENO1 pomocí metody SDS-PAGE

Prvním úkolem bylo ověřit kvalitu a zároveň množství rekombinantního enzymu ENO1 (Novus Biologicals) v komerčním balení pomocí metody SDS-PAGE (viz. kapitola 3.4). Byl použit 12 % gel a výsledek byl obarven amoniakálním stříbrem. Kvalita a množství ENOL-1 byly ověřeny u dvou různých šarží rekombinantního enzymu ENO1. Do 1. jamky byl nanesen standard molekulových hmotností a do ostatních jamek byl pipetován vzorek enolázy ve čtyřech různých koncentracích. Výsledek gelu byl vyfocen na detekční stanici ChemiDoc<sup>TM</sup>XRS+System se softwarem ImageLab<sup>TM</sup>.



**Obrázek 16:** Záznam SDS-PAGE – ověření kvality a množství ENO1. Modře je označeno, kde se nachází ENO1. 1: standard molekulových hmotností; 2: ENO1 šarže 1 0,5  $\mu$ g; 3: 1  $\mu$ g; 4: 2  $\mu$ g; 5: 4  $\mu$ g; 6: ENO1 šarže 2 0,5  $\mu$ g; 7: 1  $\mu$ g; 8: 2  $\mu$ g; 9: 4  $\mu$ g.

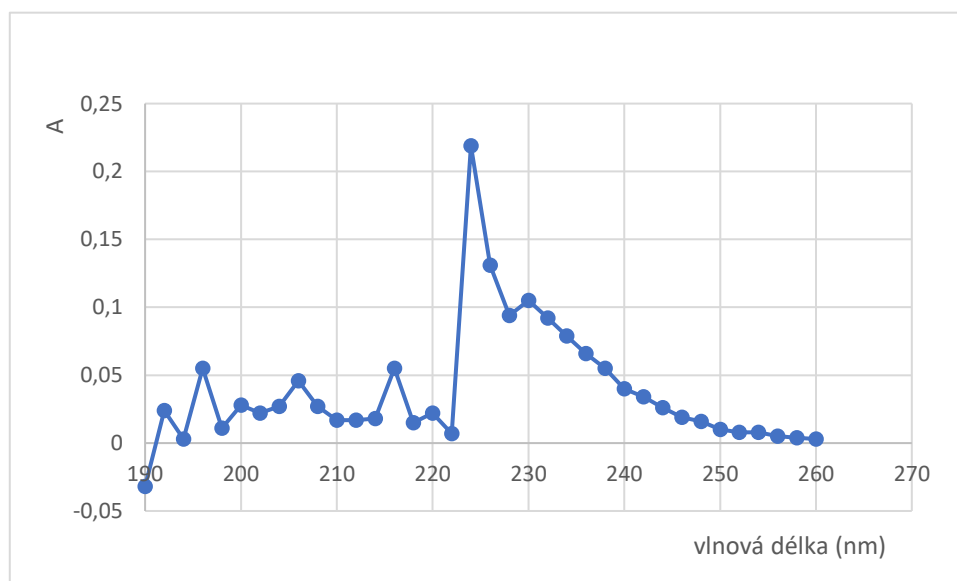
ENO1 má molekulovou hmotnost 47 kDa. Toto bylo ověřeno u obou šarží, protože obě ENO1 se nacházejí pod hranicí 50 kDa. Dále bylo ověřeno i množství enzymu. Z výsledku gelu vyplývá, že komerčně dodávaný enzym je v požadované kvalitě i kvantitě.

## 4.2 Zavedení metody pro stanovení aktivity enzymu v roztoku pomocí Warburgova testu

### 4.2.1 Stanovení absorpčního maxima fosfoenolpyruvátu

Při zavádění této metody bylo vycházeno ze článku z roku 1979, který popisuje tzv. Warburgův test. Ke stanovení aktivity bylo využito schopnosti enolázy přeměnit substrát 2-(+)-fosfoglycerát na produkt fosfoenolpyruvát. Tato změna byla měřena při vlnové délce 240 nm a za teploty 30 °C [159].

Abychom mohli měřit aktivitu enzymu ENO1 s maximální citlivostí a specificitou, je vhodné si v rámci optimalizace a zavedení protokolu proměřit absorpční spektrum produktu a určit vlnovou délku, kdy bude absorbance záření co nejvyšší. Spektrum bylo měřeno na spektrofotometru Libra S22. Do skleněné kyvety bylo k 500  $\mu$ l imidazolového pufru přidáno 0,5  $\mu$ g enolázy a 1,5 mM substrátu. Reakce proběhla za teploty 30 °C.



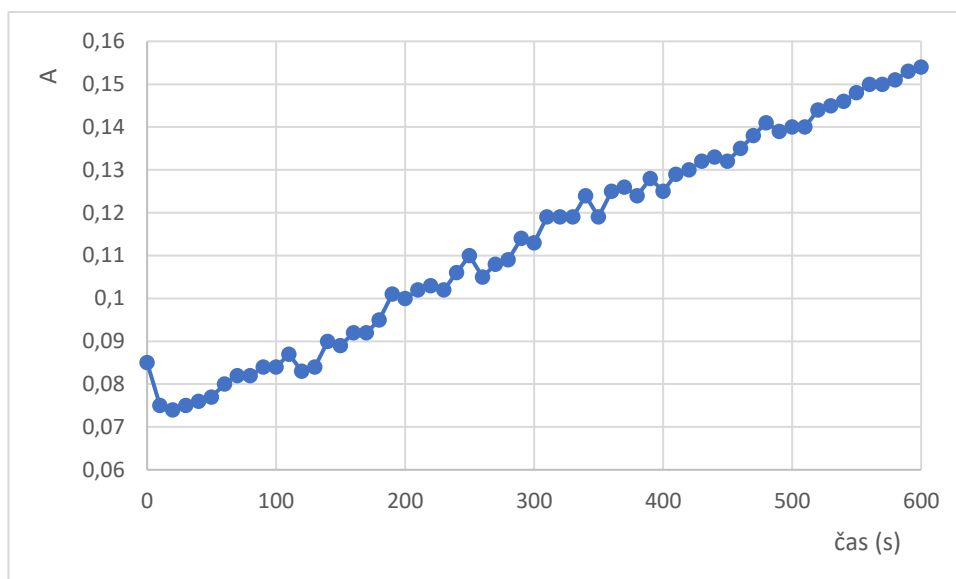
**Obrázek 17:** Měření absorpčního spektra fosfoenolpyruvátu na spektrofotometru Libra S22. Reakční objem: 500  $\mu$ l, množství enzymu: 0,5  $\mu$ g, koncentrace substrátu: 1,5 mM, teplota: 30°C.

Z obrázku č. 17 vyplývá, že maximální absorpce u vznikajícího produktu byla při vlnové délce 225 nm. Ovšem při této vlnové délce absorbuje i mnoho nízkomolekulárních a dalších kontaminujících látek ze vzorku. Proto jsme se rozhodli, že budeme množství produktu monitorovat při druhém absorpčním maximu, což bylo 230 nm.



#### 4.2.2 Stanovení aktivity enolázy při vlnové délce 230 nm

Do kyvety s 0,5 ml reakční směsi bylo přidáno 0,5  $\mu\text{g}$  enolázy a poté se do kyvety přidal substrát 2-(+)-fosfoglycerát tak, aby výsledná koncentrace byla 1,5 mM. Měření probíhalo na spektrofotometru Libra S22 při teplotě 30 °C po dobu 600 s a přístroj zaznamenával změnu absorbance každých 10 s.



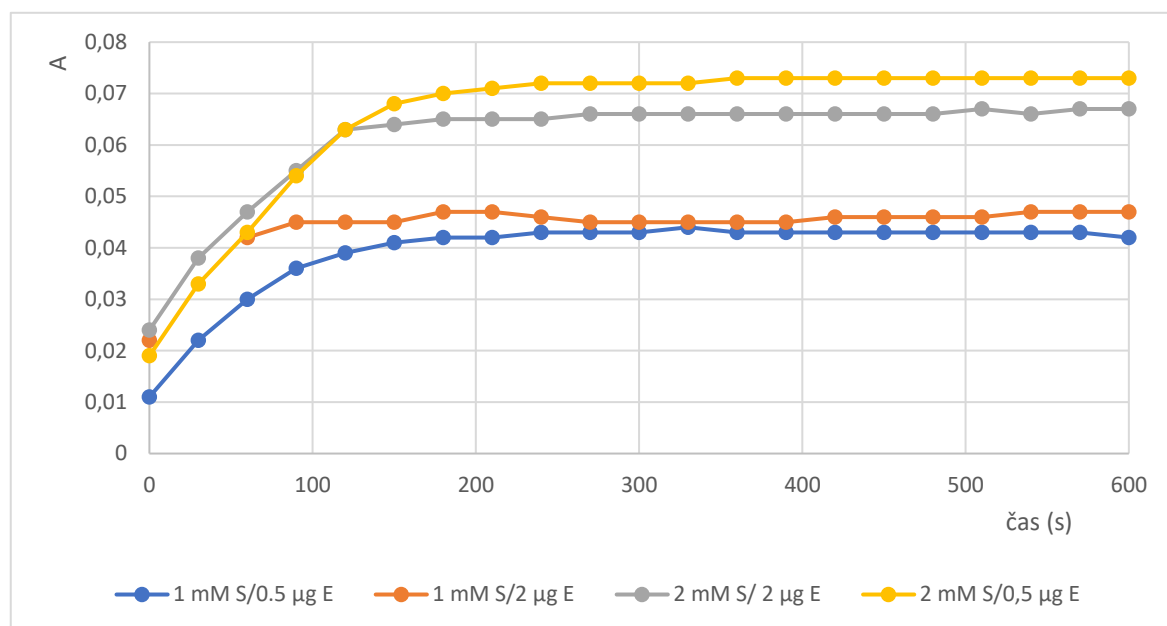
**Obrázek 18:** Závislost změny absorbance v čase při stanovení aktivity enolázy při vlnové délce 230 nm na spektrofotometru Libra S22 při teplotě 30 °C, E = 0,5  $\mu\text{g}$ , S = 1,5 mM.

Při vlnové délce 230 nm jsme schopni prokázat přeměnu substrátu na produkt s vyšší citlivostí než při doporučené vlnové délce 240 nm. avšak závislost absorbance v čase vykazovala určitou míru nestability a proto jsme se rozhodli proměřovat absorbanci v roztoku při vyšší doporučené vlnové délce 240 nm, kde je efekt interference s dalšími látkami a nestabilita signálu nižší [161].

#### 4.2.3 Stanovení aktivity enolázy při vlnové délce 240 nm

Podmínky pro následující měření aktivity enzymu byly: teplota 30 °C a vlnová délka 240 nm (viz. kapitola 3.5), reakční objem 0,5 ml. V rámci tohoto experimentu byly použity vzorky s různou. Dalším cílem bylo zjistit vhodné množství enzymu a substrátu, kde byly testovány podmínky: pro 0,5  $\mu\text{g}$  enolázy s 1 mM a 2 mM substrátem v reakční směsi; pro 2  $\mu\text{g}$  enolázy

bylo množství substrátu stejné jako v předchozích měřeních, tj. 1 mM a 2 mM. Výsledek měření zobrazuje obrázek č. 19

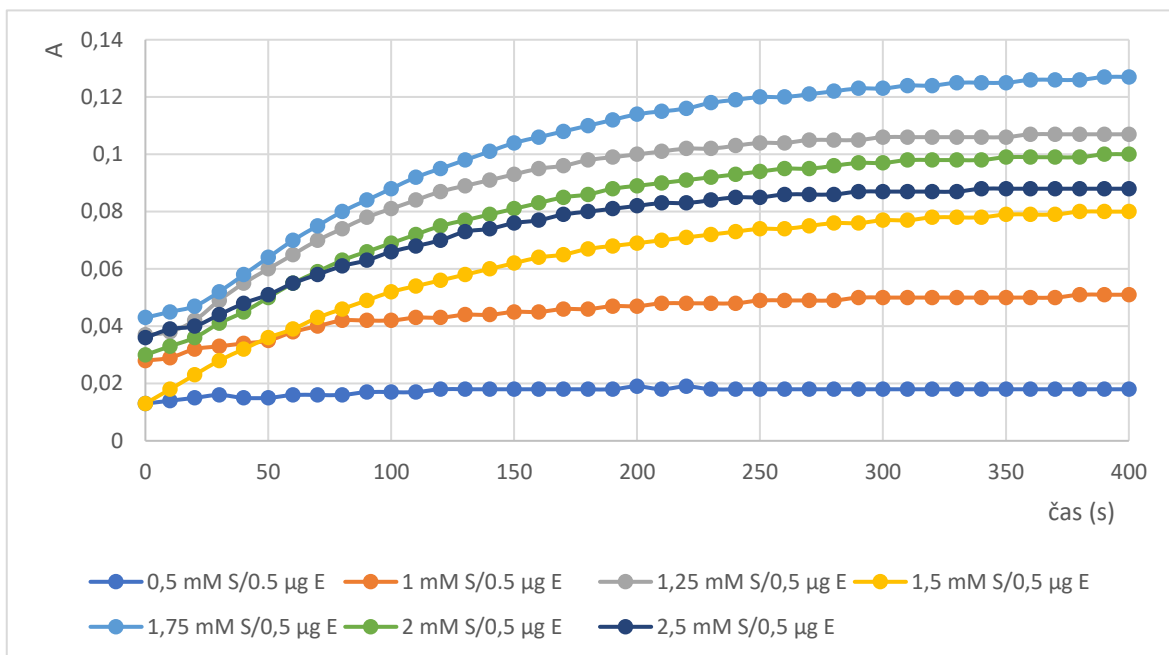


**Obrázek 19:** Závislost enzymové aktivity v čase při vlnové délce 240 nm a teplotě 30 °C. Typ reakce: jednoduchá kinetika, S = substrát (fosfoglycerát), který se mění na produkt fosfoenolpyruvát, E = enzym (rekombinantní ENO1).

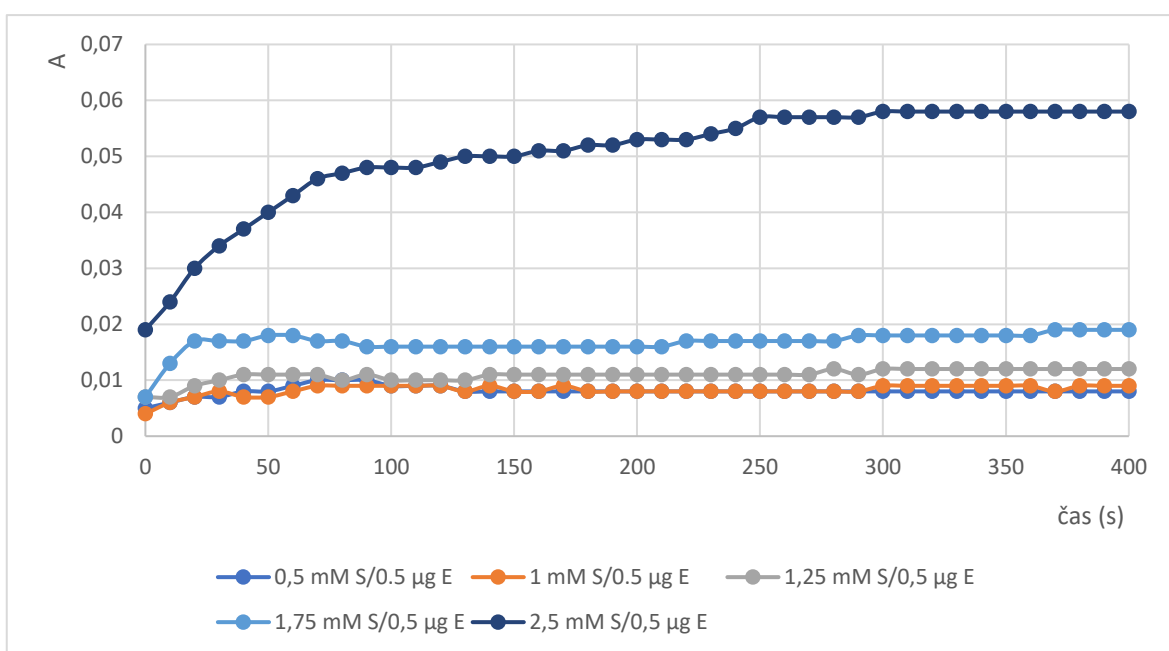
Z výsledků jasně vyplývá, že naměřené hodnoty absorbance jsou sice velice nízké, avšak průběh přeměny substrátu na produkt je v čase lineární. Vzhledem k nízké koncentraci substrátu v reakčním prostředí a molárnímu poměru substrátu k množství enzymu přidávaného do reakce docházelo ve velice krátkém čase (nad 100 s) k vyčerpání substrátu. Pro metodu stanovení množství enzymu enolázy ve vyšetřovaném vzorku bude nutné upravit reakční podmínky tak, aby množství substrátu nebylo limitujícím faktorem a množství vznikajícího substrátu za určitý časový úsek bylo odvislé pouze od množství enzymu ve vzorku.

#### 4.2.4 Stanovení aktivity ENO1 v reakčním prostředí se stoupající koncentrací substrátu

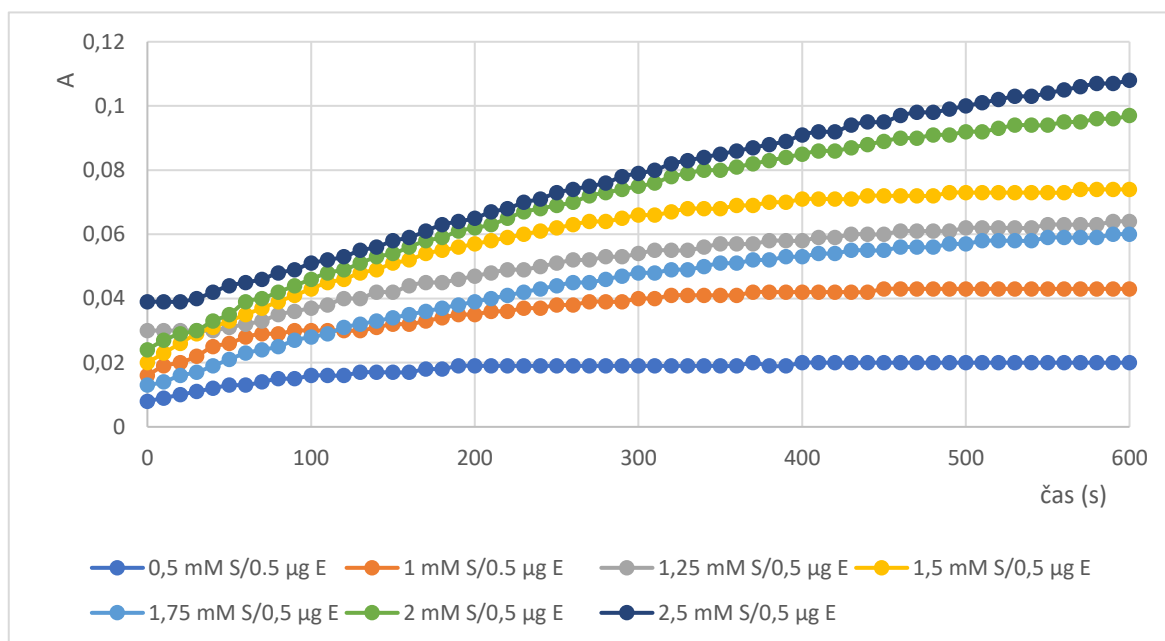
Z důvodů uvedených v předcházející kapitole bylo do reakce přidáno větší množství rekombinantního enzymu ENO1 (konkrétně 0,5 µg) a byla zvolena koncentrační řada substrátu od 0,5 do 2,5. Tento experiment byl proveden ve 3 sériích, kde se měnila teplota reakce a to 30 °C, 37 °C a 25 °C. Výsledky jsou zaznamenány ve formě grafů na obrázcích č. 20, 21 a 22.



**Obrázek 21:** Stanovení aktivity enzymu ENO1 spektrofotometrickou metodou: závislost změny absorbance v čase při 30 °C se stoupající koncentrací substrátu 0,5 - 2,5 mM. Typ reakce: jednoduchá kinetika, S = substrát (fosfoglycerát), který se mění na produkt fosfoenolpyruvát, E = enzym (rekombinantní ENO1).



**Obrázek 20:** Stanovení aktivity enzymu ENO1 spektrofotometrickou metodou: závislost změny absorbance v čase při 37 °C se stoupající koncentrací substrátu 0,5 - 2,5 mM. Typ reakce: jednoduchá kinetika, S = substrát (fosfoglycerát), který se mění na produkt fosfoenolpyruvát, E = enzym (rekombinantní ENO1).



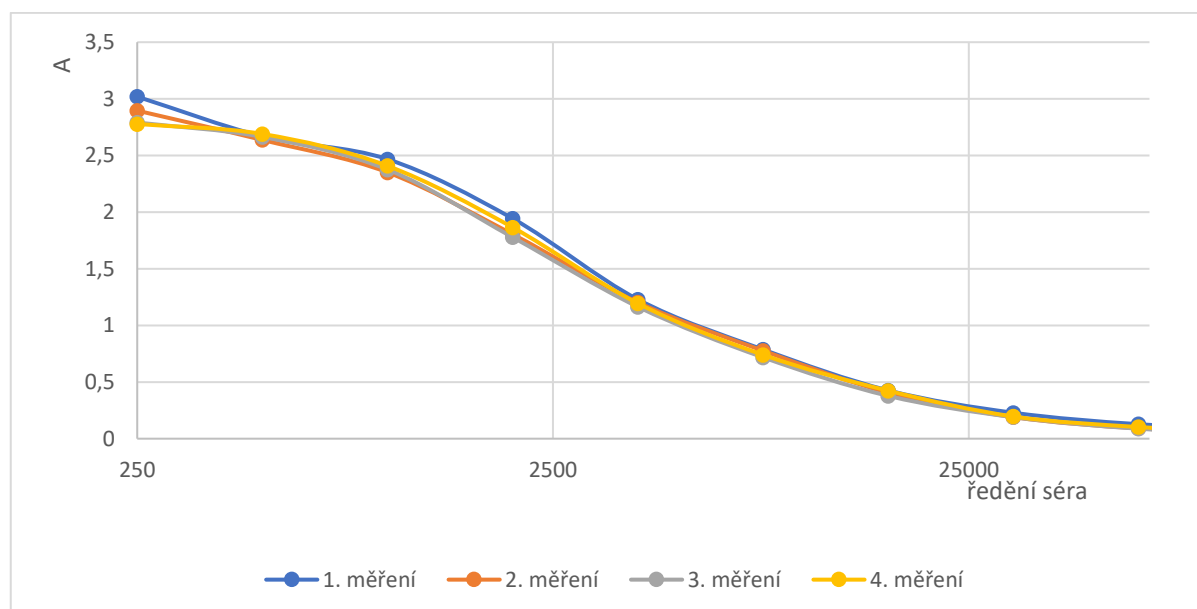
**Obrázek 22:** Stanovení aktivity enzymu ENO1 spektrofotometrickou metodou: závislost změny absorbance v čase při 25 °C se stoupající koncentrací substrátu 0,5 - 2,5 mM. Typ reakce: jednoduchá kinetika, S = substrát (fosfoglycerát), který se mění na produkt fosfoenolpyruvát, E = enzym (rekombinantní ENO1).

Při stanovení enzymové aktivity byla za daných reakčních podmínek nejvyšší absorbance při teplotě 30 °C, tudíž teplota doporučená autory metody se potvrdila. Podmínky pro stanovení aktivity enzymu ENO1 ve vyšetřovaném kapalném vzorku byly ověřeny. Podmínky pro kvantifikaci množství ENO1 ve vzorku a měření její enzymové aktivity za různých podmínek budou ještě optimalizovány. Cílem je získat nástroj, jak *in vitro* sledovat vliv specifických anti-ENO1 autoprotilátek na aktivitu enzymu.

### 4.3 Zavedení metody ELISA sendvičového typu pro průkaz a kvantifikaci anti-ENO1 protilátek

#### 4.3.1 Metoda ELISA v sendvičovém uspořádání pro stanovení množství specifických protilátek s titrací séra obsahující anti-CHT protilátky

Prvním úkolem bylo získat dovednosti nutné pro sestavení funkčního testu ELISA pro stanovení titru specifických protilátek, konkrétně protilátek proti enzymu ENO1. Pro nácvik metody byl použit biospecifický pár Ag – Ab, chymotrypsin a anti-CHT IgG. V jamkách mikrotitrační destičky typu P byl pomocí glutaraldehydu kovalentně navázán antigen v předem určeném množství. Poté byly napipetovány aliquoty dvojkově ředěného séra s anti-CHT protilátkami (viz. kapitola 3.6). Titrace byla provedena ve čtyřech opakováních a počáteční ředění séra bylo vždy od 1: 250. Dále se postupovalo dvojkovým ředěním a poslední ředění séra bylo 1: 68 000. Koncentrace antigenu byla 40  $\mu\text{g}/\text{ml}$  a konjugát byl ředěn 1:8000. Barevný odstín zákalu byl měřen při vlnové délce 490 nm na spektrofotometru BioTek PowerWave 340.



**Obrázek 23:** Titrace specifických anti-CHT protilátek metodou ELISA ve čtyřech opakováních.

### 4.3.2 Metoda ELISA – optimalizace množství antigenu a biokonjugátu

Cílem tohoto experimentu bylo naučit se optimalizovat množství antigenu vázaného na stěnu jamek mikrotitrační destičky a současně množství biokonjugátu v sendvičovém uspořádání. Opět bylo použito modelové sérum s anti-CHT protilátkami a jako antigen byl použit chymotrypsin. Mikrotitrační destička byla nejprve pokryta glutaraldehydem, na který byl navázán chymotrypsin v různých koncentracích podle schéma v tabulce č. 6. Po 20hodinové inkubaci v chladu byly na chymotrypsin navázány anti-CHT protilátky pozitivního prasečího séra, které bylo napipetováno do lichých sloupců. Do sudých sloupců bylo napipetováno negativní sérum, bez protilátek. Obě séra byla naředěna 1: 1000. Dále byly na anti-CHT navázán konjugát, který byl různě naředěn. Schéma ředění konjugátu je podle tabulky č. 6. Barevný odstín roztoku byl měřen při vlnové délce 490 nm na spektrofotometru BioTek PowerWave 340.

**Tabulka 6:** Schéma optimalizace testu ELISA.

	1 P	2 N	3 P	4 N	5 P	6 N	7 P	8 N	9 P	10 N	11 P	12 N
A	Ag Konj.	100 µg/ml 1: 2000	100 µg/ml 1: 4000	100 µg/ml 1: 8000	100 µg/ml 1: 16000	100 µg/ml 1: 32000	100 µg/ml 1: 64000					
B	Ag Konj.	75 µg/ml 1: 2000	75 µg/ml 1: 4000	75 µg/ml 1: 8000	75 µg/ml 1: 16000	75 µg/ml 1: 32000	75 µg/ml 1: 64000					
C	Ag Konj.	50 µg/ml 1: 2000	50 µg/ml 1: 4000	50 µg/ml 1: 8000	50 µg/ml 1: 16000	50 µg/ml 1: 32000	50 µg/ml 1: 64000					
D	Ag Konj.	40 µg/ml 1: 2000	40 µg/ml 1: 4000	40 µg/ml 1: 8000	40 µg/ml 1: 16000	40 µg/ml 1: 32000	40 µg/ml 1: 64000					
E	Ag Konj.	30 µg/ml 1: 2000	30 µg/ml 1: 4000	30 µg/ml 1: 8000	30 µg/ml 1: 16000	30 µg/ml 1: 32000	30 µg/ml 1: 64000					
F	Ag Konj.	15 µg/ml 1: 2000	15 µg/ml 1: 4000	15 µg/ml 1: 8000	15 µg/ml 1: 16000	15 µg/ml 1: 32000	15 µg/ml 1: 64000					
G	Ag Konj.	7,5 µg/ml 1: 2000	7,5 µg/ml 1: 4000	7,5 µg/ml 1: 8000	7,5 µg/ml 1: 16000	7,5 µg/ml 1: 32000	7,5 µg/ml 1: 64000					
H	Ag Konj.	0 µg/ml 1: 2000	0 µg/ml 1: 4000	0 µg/ml 1: 8000	0 µg/ml 1: 16000	0 µg/ml 1: 32000	0 µg/ml 1: 64000					

V tabulce č. 7 jsou výsledky naměřených absorbancí každé jamky. Kritéria pro výběr vhodných koncentrací antigenu spolu s konjugátem je poměr mezi absorbancí P/N sér, který musí být nejvyšší při dodržení těchto parametrů: absorbance pro pozitivní séra větší jak

0,6 a pro negativní vzorek nižší absorbance než 0,15. Žlutě jsou označeny dvojice P/N splňující kritéria. Výsledné vypočtené poměry jsou v tabulce č. 8.

**Tabulka 7:** Naměřené hodnoty absorbance pozitivních a negativních sér.

	1 P	2 N	3 P	4 N	5 P	6 N	7 P	8 N	9 P	10 N	11 P	12 N
A	3,698	0,184	3,059	0,143	2,114	0,111	1,266	0,075	0,684	0,062	0,362	0,092
B	3,744	0,197	3,062	0,129	2,01	0,096	1,213	0,078	0,674	0,077	0,376	0,058
C	3,587	0,174	3,028	0,112	2,028	0,089	1,178	0,066	0,662	0,061	0,357	0,06
D	3,695	0,244	3,045	0,121	1,915	0,078	1,086	0,068	0,61	0,065	0,346	0,065
E	3,609	0,229	2,992	0,176	1,8	0,084	1,042	0,071	0,588	0,066	0,347	0,062
F	3,552	0,231	2,893	0,092	1,837	0,091	1,094	0,061	0,586	0,055	0,325	0,051
G	3,1	0,233	2,694	0,113	1,872	0,097	0,995	0,07	0,49	0,06	0,303	0,056
H	0,183	0,079	0,132	0,071	0,103	0,06	0,101	0,06	0,089	0,058	0,085	0,079

**Tabulka 8:** Vypočtené hodnoty poměr pozitivních a negativních sér.

Koncentrace CHT ( $\mu\text{g/ml}$ )	P5/N6	P7/N8	P9/N10
100	19,04505	16,88	11,03226
75	20,9375	15,55128	8,753247
50	22,78652	17,84848	10,85246
40	24,55128	15,97059	9,384615
30	21,42857	14,67606	
15	20,18681	17,93443	
7,5	19,29897	14,21429	

Z tabulky č. 8 vyplývá, že nejvhodnější koncentrace chymotrypsinu ve vazebném roztoku je 40  $\mu\text{g/ml}$  a k tomu ředění konjugátu 1: 8000.

Osvojila jsem si metodu ELISA v sendvičovém uspořádání. Toto uspořádání experimentu bylo použito i pro optimalizaci podmínek tvorby imunokomplexu a následné reakce s konjugátem. Cílem bylo zavést metodu pro rutinní průkaz specifických anti-ENO1 protilátek v séru pacientů s MM nacházejícími se v remisi onemocnění.

### 4.3.3 Titrace anti-ENO1 protilátek

Pro optimalizaci a zavedení metody ELISA byly použity vzorky sér pacientů s již prokázanou pozitivitou na anti-ENO1 protilátky třídy IgG. Nejprve byly na destičku napipetovány různé koncentrace antigenu. Jako antigen byl použit rekombinantní enzym ENO1. Dále bylo

k enzymu přidáno pozitivní patientské sérum do lichých sloupců a do sudých sloupců bylo přidáno sérum zdravých dárců. Obě séra byla naředěna 1: 1000. Konjugát byl naředěn od 1: 2500 do 1: 20 000 dvojkovým ředěním. Schéma přípravy destičky je v tabulce č. 9. Barevný odstín roztoku byl měřen při vlnové délce 490 nm na spektrofotometru BioTek PowerWave 340.

**Tabulka 9:** Schéma aplikace vzorků do destičky.

		3 P	4 N	5 P	6 N	7 P	8 N	9 P	10 N
C	Ag	48 µg/ml		48 µg/ml		48 µg/ml		-----	
	Konjugát	1: 2500		1:5000		1:10000			
D	Ag	24 µg/ml		24 µg/ml		24 µg/ml		-----	
	Konj.	1: 2500		1: 5000		1: 10000			
E	Ag	12 µg/ml		12 µg/ml		12 µg/ml		12 µg/ml	
	Konj.	1: 2500		1: 5000		1: 10000		1: 20000	

**Tabulka 10:** Naměřené výsledné absorbance sér.

	3 P	4 N	5 P	6 N	7 P	8 N	9 P	10 N
C	0,569	0,591	0,499	0,348	0,211	0,251	-----	-----
D	0,496	0,448	0,33	0,302	0,204	0,170	-----	-----
E	0,449	0,39	0,274	0,258	0,174	0,155	0,114	0,100

Jedním ze sledovaných faktorů byla koncentrace antigenu, a proto byla nastavena koncentrační řada. Dále byla pro všechny zvolené koncentrace Ag pipetována různá ředění zásobního roztoku konjugátu anti-human IgG. Naměřené absorbance byly ve srovnání s předchozí ELISA metodou u pozitivních sér velmi nízké, a naopak u negativních sér byla absorbance vysoká. Z hodnot absorbancí vyplývá, že intenzita zabarvení roztoku v jamkách částečně korelovala s množstvím přidávaného konjugátu bez ohledu na množství antigenu a specifických protilátek. Jednalo se tedy pouze o tzv. nespecifickou sorpci konjugátu a výsledky nebylo možné vyhodnotit.

Experiment byl proveden znovu, ovšem za jiných podmínek, které byly nastaveny po diskuzi se školitelem. V každé jamce byla stejná koncentrace antigenu (10 µg/ml) a konjugát se ředil 1: 5000. Jako pozitivní kontrola bylo použito sérum od pacienta s MM, ve kterém již byly anti-ENO1 prokázány, sérum bylo naředěno od 1: 500 do 1: 8000 dvojkovým ředěním. Stejně ředění bylo použito i u séra od zdravého dárce. Schéma destičky je v tabulce č. 11 a naměřené absorbance v tabulce č. 12. Barevný odstín roztoku byl měřen při vlnové délce 490 nm na spektrofotometru BioTek PowerWave 340.



**Tabulka 11:** Schéma aplikace vzorků do destičky.

		5 P	6 N
B	Ag	10 µg/ml	10 µg/ml
	Sérum	1:500	1:500
	Konjugát	1:5000	1:5000
C	Ag	10 µg/ml	10 µg/ml
	Sérum	1:1000	1:1000
	Konj.	1:5000	1:5000
D	Ag	10 µg/ml	10 µg/ml
	Sérum	1:2000	1:2000
	Konj.	1:5000	1:5000
E	Ag	10 µg/ml	10 µg/ml
	Sérum	1:4000	1:4000
	Konj.	1:5000	1:5000
F	Ag	10 µg/ml	10 µg/ml
	Sérum	1:8000	1:8000
	Konj.	1:5000	1:5000

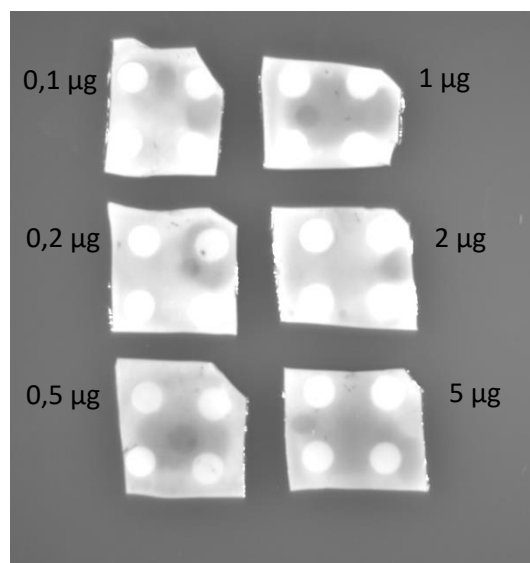
**Tabulka 12:** Naměřené výsledné absorbance sér.

	5 P	6 N
B	0,583	0,505
C	0,419	0,397
D	0,297	0,274
E	0,222	0,189
F	0,124	0,109

Výsledky, hodnoty absorbancí, byly velice podobné výsledkům v předcházejícím experimentu a po diskuzi se školitelem bylo konstatováno, že pravděpodobně nedochází k reakci specifické anti-ENO1 IgG s antigenem. Enzym ENO1 byl na stěnu jamek mikrotitrační destičky vázán silně reaktivním činidlem. Jednou z možných příčin nereaktivity byla deformace struktury enzymu v důsledku vícenásobného provázání s glutaraldehydem. Z tohoto důvodu jsme se rozhodli ověřit vazbu specifických anti-ENO1 protilátek s rekombinantním enzymem pomocí metody Dot blot. Zde je antigen pouze sorbován na povrch membrány a nedochází tak k deformaci nativní konformace enzymu reaktivním glutaraldehydem.

#### 4.4 Ověření reaktivity anti-ENO1 protilátek metodou Dot blot

Další metodou, kterou lze ověřit reaktivitu protilátek je Dot blot (viz. kapitola 3.7). Reakce probíhala na PVDF membráně s rekombinantním enzymem ENO1. Tato metoda je velmi citlivá a šetrná vůči konformaci reagujících složek. Koncentrace enzymu nanesených na terčíky byla od 0,1  $\mu\text{g}$  do 5  $\mu\text{g}$ . Dále bylo k antigenu přidáno kontrolní pozitivní sérum jako zdroj primárních anti-ENO1 protilátek a konjugát anti-human IgG. Pozitivní sérum i konjugát byly ředěny 1: 1000. Výsledek experimentu byl vyfocen na detekční stanici G: BOX se softwarem GeneTools.



**Obrázek 24:** Výsledek Dot blotu s anti-ENO1 protilátkami při různém množství ENO1.

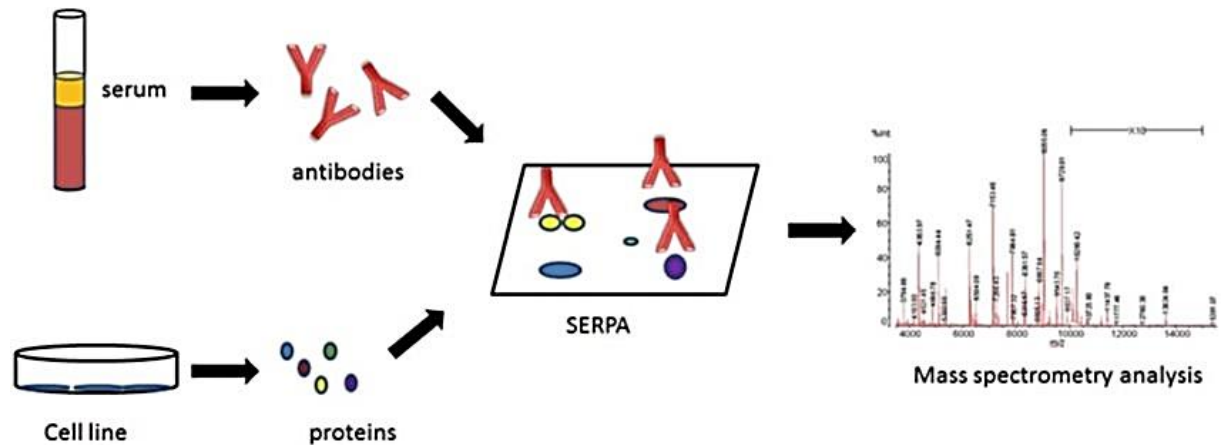
Dot blot nepotvrdil naši hypotézu o deformaci rekombinantní ENO1 glutaraldehydem jako důvod nereaktivity. Rekombinantní ENO1 nereaguje se specifickými anti-ENO1 protilátkami při žádné výchozí koncentraci enzymu ani v tomto případě.

Dalším alternativním způsobem, jak ověřit reaktivitu specifických anti-ENO1 protilátek ze séra pacientů je metoda SERPA. Zdrojem enzymu ENO1 je v tomto provedení buněčný lyzát, kde se enzym nachází, pokud možno v nativní konformaci a je přirozeného původu. Jedním z možných důvodů pozorované nereaktivity anti-ENO1 protilátek může být i odlišná struktura rekombinantního enzymu (His-tag kotva, jiná kvalita případně kvantita posttranslačních modifikací), což může výrazně ovlivnit již dříve ověřenou deklarovanou reaktivitu patientských anti-ENO1 protilátek s antigenem.

## 4.5 Metoda SERPA pro semikvantitativní stanovení anti-ENO1 IgG

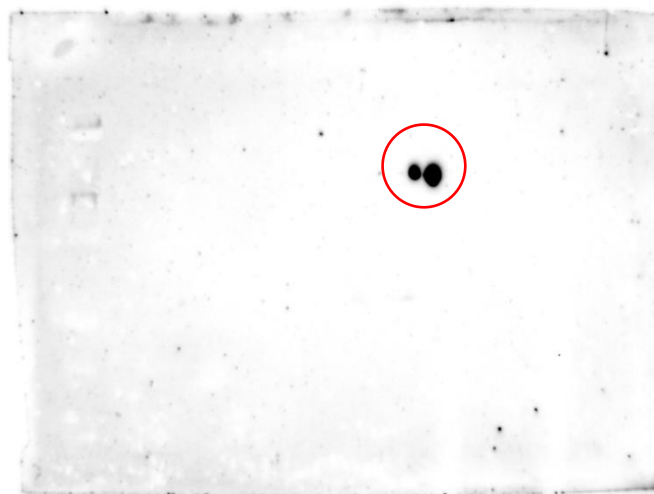
### 4.5.1 Ověření reaktivity anti-ENO1 protilátek ze séra pacienta s nativní formou ENO1

Metoda, vhodná k průkazu a případně pro semikvantitativním stanovení specifických protilátek, je metoda SERPA. Princip metody SERPA je na obrázku č. 25.



**Obrázek 25:** Schéma metody SERPA s následným vyhodnocením, převzato z [162].

Jako zdroj antigenu zde byl použit buněčný lyzát myelomových buněk, konkrétně nádorová buněčná linie RPMI 8226, kde je cílová struktura ENO1 v nativní formě. Byla provedena 2D elektroforetická separace, kde první směr byla separace dle pI proteinů v gradientu pH (tzv. izoelektrická fokuzace) a poté druhý směr, kde byla provedena separace proteinů dle Mw (SDS-PAGE). Celý postup přípravy lyzátu, stripů a 2D mapy je shrnut v kapitole 3.8. Na NC membránu bylo pomocí promývací stanice FlexiWash 400 nadávkováno pozitivní patientské sérum, které bylo ředěné 1: 500 (viz. kapitola 3.8.7). Konjugát byl naředěn 1: 5000, což bylo pro všechny membrány společné. Pozice enzymu ENO1 ve 2D mapě byla určena podle Mr a pI. Na obrázku č. 26 je ENO1 označena kroužkem.

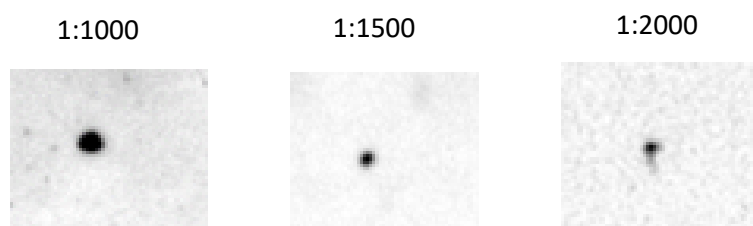


**Obrázek 26:** Výsledek imunoblotové analýzy kontrolního pozitivního séra ředěného 1: 500.

V tomto uspořádání a metodou SERPA byla potvrzena reaktivita séra s cílovým antigenem.

#### 4.5.2 Průběh semikvantitativního stanovení anti-ENO1 protilátek v sérech pacientů s MM

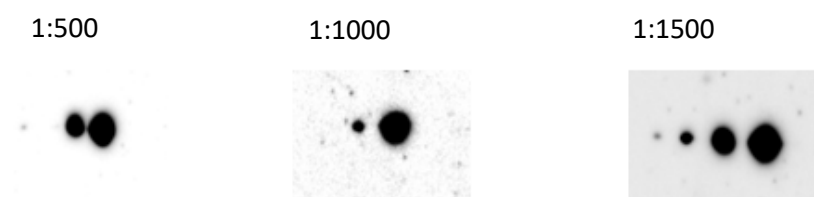
Tento experiment probíhal ve spolupráci se studenty: Kateřinou Štěpařovou, Tomášem Mikešem a Michaelovou Dvořákovou. Byla provedena ředící řada kontrolního pozitivního séra od ředění 1:500 až 1:2000. Konjugát se ředil 1:5000. Výsledky byly vyfoceny na detekční stanici G: BOX se softwarem GeneTools. Na obrázku č. 27 je výřez gelů se spoty (skvrny), kde lze očekávat ENO1. Výsledky jsou ze série experimentů s ředěním vyšetřovaného pozitivního séra 1:1000, 1:1500 a 1:2000.



**Obrázek 27:** Výřez gelů z 2D mapy, kde se nachází enzym ENO1. Různé ředění séra od 1:1000 až 1:2000.

V očekávané oblasti antigenu byly skvrny, jejichž velikost byla úměrná klesajícímu množství specifické protilátky jen částečně. V případě vyššího stupně naředění velikost a intenzita skvrn nekoreluje.

Pro ověření, zda je tato metoda vhodná pro průkaz a semikvantitativní stanovení anti-ENO1 protilátek byl tento experiment zopakován. Další série experimentů byla za podmínek: ředění kontrolního pozitivního séra 1:500, 1:1000 a 1:1500, ředění konjugátu 1:5000. Výsledky byly vyfoceny na detekční stanici G: BOX se softwarem GeneTool. Na obrázku č. 28 je výřez gelů se skvrny, kde lze očekávat ENO1.



**Obrázek 28:** Výřez ENO1 z gelů z 2D mapy. Různé ředění séra od 1:500 až 1:1500

Sice se plně nepotvrdil předpoklad, že velikost a intenzita skvrn bude přímo korelovat s množstvím specifických protilátek ve vzorku, ale získaná data poskytla další hodnotné informace. Jasně se ukázalo, že pomocí této metody lze prokazovat reaktivitu specifických anti-ENO1 protilátek s různými izoformami enzymu ENO1. Z výsledků totiž vyplývá, že při vyšším ředění séra a pečlivém provedení všech kroků této náročné metody lze prokázat přítomnost až 4 izoform enzymu ENO1 a že v séru pacienta jsou anti-ENO1 IgG, které s danými izoformami reagují. Zastoupení jednotlivých izoform je rozdílné, množství klesá směrem k nižším hodnotám pI. Lze se domnívat, že se jedná o rozdílný charakter posttransalčních modifikací, např. v rámci glykosylace nebo fosforylace. Toto bude tématem navazující diplomové práce, kde se výzkum zaměří na detailní analýzu prokázaných izoform a to kombinací metody SERPA s metodou in-gel-digest a hmotnostní spektrometrií. Práce bude čerpat z dosažených výsledků a metodických postupů zde prezentovaných a výzkum tak plynule naváže na tuto diplomovou práci.

## 5 ZÁVĚR

V této práci byly použity tři různé metody pro ověření reaktivity a kvantifikaci specifických anti-ENO1 protilátek u pacientů s MM v remisi. Jako první metoda, která byla optimalizována pro specifické protilátky je ELISA. Nejdříve byla metoda ELISA optimalizována modelovými protilátkami anti-CHT, a až poté byly použity specifické anti-ENO1 protilátky. Ovšem specifické anti-ENOL protilátky z pozitivního séra pacienta s MM za uvedených protilátek nereagovaly s rekombinantní enolázou ENO1. Z hodnot absorbancí vyplývá, že intenzita zabarvení roztoku v jamkách částečně korelovala s množstvím konjugátu, a jednalo se tedy o tzv. nespecifickou sorpci konjugátu. Jednou z možných příčin nereaktivity byla deformace struktury enzymu ENO1 v důsledku vícenásobného provázání s glutaraldehydem. Z tohoto důvodu jsme se rozhodli ověřit vazbu specifických anti-ENO1 protilátek s rekombinantním enzymem pomocí metody Dot blot. V této metodě je antigen pouze sorbován na povrch membrány a nedochází zde k deformaci nativní konformace enzymu glutaraldehydem. Avšak ani tato metoda neprokázala vazbu enzymu ENO1 na specifické anti-ENO1 protilátky. Pouze bylo pomocí Dot blotu vyloučeno, že důvodem nereaktivity je deformace enzymu glutaraldehydem. Jedním z důvodů nereaktivity anti-ENO1 protilátek je i odlišná struktura rekombinantního enzymu.

Dalším alternativním způsobem, jak ověřit reaktivitu specifických anti-ENO1 protilátek ze séra pacientů s MM je metoda SERPA. Zdrojem enzymu ENO1 je v tomto provedení buněčný lyzát, kde se enzym nachází, pokud možno v nativní konformaci a je přirozeného původu. Kontrolní pozitivní sérum bylo naředěno 1:500, 1: 1000, 1: 1500 a 1:2000. Ředění bylo provedeno proto, abychom zjistili, zda se metoda dá použít pro semikvantitativní stanovení specifických anti-ENO1 protilátek. U všech ředěních séra byl prokázán enzym ENO1. Dosažené výsledky poskytly hodnotné výsledky. Sice se plně nepotvrdil předpoklad, že velikost a intenzita skvrn bude přímo korelovat s množstvím specifických protilátek ve vzorku, ale získaná data poskytla další hodnotné informace. Metoda SERPA je v tomto uspořádání vhodná pro průkaz a jen částečně pro kvantifikaci specifických anti-ENO1 protilátek. Přínosem této metody je i možnost identifikovat reaktivitu specifických anti-ENO1 protilátek s různými izoformami enzymu ENO1 a tyto izoformy studovat. Cíle diplomové práce se podařilo naplnit.

## 6 LITERATURA

- [1] Diagnostika a léčba mnohočetného myelomu, Supplementum 1, Transfuze Hematol. dnes. 18/2012. str. 89.
- [2] Dušek L, Mužík J, Kubásek M, Koptíková J, Žaloudík J, Vyzula R. Epidemiologie zhoubných nádorů v České republice. Masarykova univerzita, 2005, ISSN 1802–8861.
- [3] Jill Corre, Nikhil Munshi, Hervé Avet-Loiseau, Genetics of multiple myeloma: another heterogeneity level?, Blood, 2015. 125(12). 1870-1876, <https://doi.org/10.1182/blood-2014-10-567370>.
- [4] Robert A. Kyle, S. Vincent Rajkumar, Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance and Smoldering Multiple Myeloma, Hematology/Oncology Clinics of North America, 2007. 21(6). 1093-1113, <https://doi.org/10.1016/j.hoc.2007.08.005>.
- [5] Jingping Hu, Wei-Xin Hu, Targeting signaling pathways in multiple myeloma: Pathogenesis and implication for treatments, Cancer Letters, Volume 414, 2018, 214-221, <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2017.11.020>.
- [6] Cremer FW, Bila J, Buck I, et al. Delineation of distinct subgroups of multiple myeloma and a model for clonal evolution based on interphase cytogenetics. Genes Chromosomes Cancer 2005; 44(2):194-203.
- [7] Fonseca R, Blood E, Rue M, et al. Clinical and biologic implications of recurrent genomic aberrations in myeloma. Blood 2003;101:4569–4575.
- [8] Fonseca R, Bersagel PL, Chesi M et al: Integration of Genetics in a Comprehensive Pathogenesis Model for Myeloma. Haematologica, 2005; 90, 4-5.
- [9] Klein B, Bataille R. Cytokine network in human multiple myeloma. Hematol Oncol Clin North Am. 1992 Apr;6(2):273-84.
- [10] Sati H, Apperley JF, Greaves M et al. Interleukin-6 is expressed by plasma cells from patients with multiple myeloma and monoclonal gammopathy of undetermined significance. Br J Haematol 1998; 101(2): 287–295.
- [11] Longo DL, Harrison TR. Harrison's principles of internal medicine. Vol. 1 Vol. 1. New York: McGraw-Hill, Medical; 2012.

- [12] Kyle RA, Rajkumar SV. Criteria for diagnosis, staging, risk stratification and response assessment of multiple myeloma. *Leukemia* 2009; 23: 3–9.
- [13] Adam Z, Bačovský J, Flochová E, et al. Diagnostika a léčba mnohočetného myelomu. *Transfúze a hematologie dnes* 2005; 1 Supl. 1: 3–50.
- [14] Broulík, P. Hyperkalcemie: na co je třeba myslet a jaká vyšetření provést? *Interní Med.* 2011; 13(7 a 8): 314–317.
- [15] Adam, Z., L. Pour, M. Krejčí, S. Štěpánková, I Svobodová, K. Veselý A R. Hájek. Poškození ledvin při mnohočetném myelomu a dalších monoklonálních gamapatiích. *Vnitřní lékařství.* 2008, roč. 54, č. 9, s. 847–861.
- [16] Tesař, V., T. Zima, J. Racek, V. Teplan, B. Fridecký, J. Kratochvíla, J. Granátová a Z. Kubíček. Doporučení České nefrologické společnosti a České společnosti klinické biochemie ČLS JEP k vyšetřování proteinurie. *Klinická biochemie a metabolismus.* 2011, roč. 19, č. 1, s. 28–35.
- [17] Straub, J., et al. Mnohočetný myelom – časná diagnostika. *Medicína pro Praxi.* 2009; 6(4): 197–199.
- [18] Nieuwenhuizen L, Biesma DH. Central nervous system myelomatosis: review of the literature. *Eur J Haematol* 2008; 80: 1–9.
- [19] Bahlis NJ, Lazarus HM. Multiple myeloma-associated AL amyloidosis: is adisinctive therapeutic approach warranted?. *Bone Marrow Transplant* 2006;38:7–15.
- [20] Durie BGM, Salmon SE. A clinical staging system for multiple myeloma cell mass with presenting clinical features, response to treatment and survival. *Cancer* 1975;36:842–854.
- [21] Guidelines on the Diagnosis and Management of Multiple Myeloma 2005, *Brit J Heamatolog*, 2005, 13, 410-451
- [22] Adam Z, Bačovský J, Flochová E, et al. Diagnostika a léčba mnohočetného myelomu. Doporučení vypracované Českou myelomovou skupinou, Myelomovou sekcí České hematologické společnosti a experty Slovenské republiky pro diagnostiku a léčbu mnohočetného myelomu. *Transfúze a hematologie dnes.* 2005; 11(Supl. 1): 3–50.
- [23] Tichý M, Maisnar V: Laboratorní průkaz monoklonálních imunoglobulinů. *Vnitřní Lék.*, 2006; 52: 41-45



- [24] Ščudla V: Diagnostický význam a úskalí hodnocení roztěrového preparátu kostní dřeně u mnohočetného myelomu. *Vnitřní Lék.*, 2006; 52: 55-65.
- [25] Jarošová M, Ščudla V, Indrák K et al. Cytogenetic study in multiple myeloma. *Vnitř Lék* 1990; 36: 1072–1080
- [26] Ahman G, Jalal S, Juneau A et al. A novel three-color, clone specific fluorescence in situ hybridization procedure for monoclonal gammopathies. *Cancer Genet Cytogenet* 1998; 101: 7–11.
- [27] Mailankody, S. Molecular and biologic markers of progression in monoclonal gammopathy of undetermined significance to multiple myeloma. *Leukemia & lymphoma*. 2010. 51(12):2159-70. doi: 10.3109/10428194.2010.525725.
- [28] Vávrová J., Kušnierová P., Maisnar V., Šolcová L. Doporučení České společnosti klinické biochemie a České myelomové skupiny k laboratorní diagnostice monoklonálních gamapatií. *Klin. Biochem. Metab.*, 28 (49), [Online] 2020 [Citace: 1. 10. 2021.] No. 1, p. 26–34. Dostupné z: <https://www.cskb.cz/wp-content/uploads/2020/04/dop-GP.pdf>
- [29] G. Merlini, P. Piro, F. Pavesi, R. Epis, F. Aguzzi, Detection and identification of monoclonal components: immunoelectrophoresis on agarose gel and immunofixation on cellulose acetate compared, *Clin. Chem.* 27 (11) (1981) 1862–1865.
- [30] Kyle, C. Making sense of serum protein bands. Best tests. [Online] July 2011 [Citace: 22. 03. 2022.] Dostupné z: [https://bpac.org.nz/bt/2011/july/docs/best\\_tests\\_jul2011\\_serum\\_protein\\_pages\\_2-9.pdf](https://bpac.org.nz/bt/2011/july/docs/best_tests_jul2011_serum_protein_pages_2-9.pdf)
- [31] Ghrairi N, Bouakkez H, Dahmouni A, et al. Difficultés au cours de l'immunofixation sérique. *Immunoanalyse & Biologie Spécialisée*. 2009; 24(2): 100-3
- [32] Joesph R. Wiencek, Show-Hong Duh, Robert H. Christenson, Chapter 22 - Proteins: analysis and interpretation in serum, urine, and cerebrospinal fluid, Editor(s): William Clarke, Mark A. Marzinke, *Contemporary Practice in Clinical Chemistry (Fourth Edition)*, Academic Press, 2020, 365-390, ISBN 9780128154991
- [33] Palumbo, A, Johnsen, HE et al. The clinical relevance and management of monoclonal gam mopathy of undetermined significance and related disorders: recommendations from the European Myeloma Network. *Haematologica* 2014; 99(6): 984–996. doi: 10.3324/haematol.2013.100552

- [34] Kyle, R. A., Therneau, T. M., Rajkumar, S. V. et al. A long-term study of prognosis in monoclonal gammopathy of undetermined significance. *N. Engl. J. Med.*, 2002, 346, p. 564–569.
- [35] Michálek, T. Vznik RTG obrazu. Internetový portal RTG. [Online] 2010 [Citace: 23.3. 2022.] Dostupné z:  
[http://rtg.fbmi.cvut.cz/index.php%3Foption=com\\_content&view=article&id=58&Itemid=64.html](http://rtg.fbmi.cvut.cz/index.php%3Foption=com_content&view=article&id=58&Itemid=64.html)
- [36] Lecouvet FE, Malghem J, Michaux L et al. Skeletal survey in advanced multiple myeloma: radiographic versus MR imaging survey. *Br J Haematol* 1999; 106: 35–39
- [37] Minařík, J. a kol. Srovnání přínosu konvenčního RTG, celotělové magnetické rezonance a celotělového nízkodávkového CT v diagnostice myelomové kostní nemoci. *Osteologický bulletin*: 2013, 18(4), str. 143-147
- [38] Horger M, Claussen CD, Bross-Bach U et al. Whole-blood low-dose multidetector row-CT in the diagnosis of multiple myeloma: an alternative to conventional radiography. *Eur J Radiol* 2005; 54: 289–297.
- [39] Dimopoulos M, Kyle R, Fermand JP, et al. Consensus recommendations for standard investigative workup: report of the International Myeloma Workshop Consensus Panel 3. *Blood* 2011; 117: 4701–4705.
- [40] Uetani M, Hashmi T, Hayashi K. Malignant and benign compression fractures: differentiation and diagnostic pitfalls on MRI. *Clin Radiol* 2004; 59, 124–131.
- [41] D'Sa, Abildgaard N, Tighe J et al. Guidelines for the use of imaging in the management of myeloma. *Br J Haematol* 2007; 137: 49–63.
- [42] Takasu M, Kaichi Y, Tani C, Date S, Akiyama Y, Kuroda Y, et al. Iterative Decomposition of Water and Fat with Echo Asymmetry and Least-Squares Estimation (IDEAL) Magnetic Resonance Imaging as a Biomarker for Symptomatic Multiple Myeloma. *PLOS ONE* 2015, 10(2): doi:10.1371/journal.pone.0116842
- [43] Durie GM, Waxman A, D'Agnolo A et al. Whole-Body 18F-FDG PET Identifies High-Risk Myeloma. *J Nucl Med* 2002; 43: 1457–1463.
- [44] Bělohávek, O, Fenc, P. Hybridní zobrazování výpočetní a pozitronovou emisní tomografií. *Interní medicína pro praxis*. 2004, 2, 61-63.

- [45] Walker RC. Imaging tools for 2006, 13–14. In: Focus on Myeloma and Plasma Cell Disorders, Intercontinental Miami – Miami, Florida. Presentation Summarie. Miami, March 24–25, 2006.
- [46] Alper E, Gurel M, Evrensel T et al.  $^{99m}\text{Tc}$ -MIBI scintigraphy in untreated stage III multiple myeloma. Comparison with X-ray skeletal survey and bone scintigraphy. Nucl Med Commun 2003; 24: 537–242.
- [47] Vlastimil Ščudla, Miroslav Heřman, Miroslav Mysliveček. Současné možnosti diagnostiky myelomové kostní nemoci. [Online] Onkologie 2011; 5(3): 131–137. [Citace: 4. 10. 2021.] Dostupné z: <https://www.onkologiecs.cz/pdfs/xon/2011/03/03.pdf>
- [48] Bradwell AR et al. Assessment of monoclonal gammopathies by nephelometric measurement of individual immunoglobulin kappa/lambda ratios. Clin Chem. 2009; 55(9), 1646-1655.
- [49] Lakomy D, Lemaire-Ewing S, Denimal D, et al. Evaluation of the new Hevylite<sup>TM</sup> IgA assay for the diagnosis and follow-up of monoclonal gammopathies. Ann Biol Clin 2013; 71: 157-163.
- [50] Hevylite<sup>®</sup> Heavy/Light Chain Assays by Binding Site. Selectscience.net. [Online] [Citace: 11.4. 2022.] Dostupné z: <https://www.selectscience.net/products/hevylite-heavy+light-chain-assays/?prodid=203847>
- [51] Roussel M, et al. Bortezomib and high-dose melphalan as conditioning regimen before autologous stem cell transplantation in patients with de novo multiple myeloma: a phase 2 study of the Intergroup Francophone du Myelome (IFM). Blood 2010; 115(1): 32–37.
- [52] Terpos E, Morgan G, Dimopoulos MA, Drake MT, Lentzsch S, Raje N, et al. International Myeloma Working Group recommendations for the treatment of multiple myeloma-related bone disease. J Clin Oncol 2013;31:2347–57.
- [53] Harris JR. The proteins released from intact erythrocyte ghosts<sup>4</sup> at low ionic strength. Biochem J 1971; 122(5): 38P–40P.
- [54] Ciehanover A, Hod Y, Hershko A. A heat-stable polypeptide component of an ATP-dependent proteolytic system from reticulocytes. Biochem Biophys Res Commun 1978; 81(4): 1100–1105.

- [55] Ciechanover A. The ubiquitin-proteasome pathway: on protein death and cell life. *EMBO J* 1998; 17(24): 7151–7160.
- [56] Unno M, Mizushima T, Morimoto Y et al. The structure of the mammalian 20S proteasome at 2.75 Å resolution. *Structure* 2002; 10(5): 609–618.
- [57] Arendt CS, Hochstrasser M. Identification of the yeast 20S proteasome catalytic centers and subunit interactions required for active-site formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94(14): 7156–7161.
- [58] Parlati F, Lee S, Aujay M et al. Carfilzomib can induce tumor cell death through selective inhibition of the chymotrypsin-like activity of the proteasome. *Blood* 2009; 114(16): 3439–3447.
- [59] Adam Z, Ščudla V, Neubauer J. Mnohočetný myelom. In: Adam Z, Vorlíček J, Adamová Z et al. *Hematologie II: Přehled maligních hematologických nemocí*. Praha: Grada 2001: 461–498.
- [60] Goldberg AL. Introduction to the proteasome and its inhibitors. In: Adams J. *Proteasome inhibitors in cancer therapy*. New Jersey: Humana Press 2004: 17–39.
- [61] Ševčíková S. Inhibitory proteazomu v léčbě mnohočetného myelomu. *Klin Onkol* 2013; 26(1): 11–18.
- [62] Martina Novosadová. Léčba mnohočetného myelomu včera, dnes a zítra – repertorium pro lékárníky. [Online] *Prakt. lékařn.* 2016; 12(5e): e25–e37. [Citace: 5. 10. 2021.] Dostupné z: <https://www.praktickelekarenstvi.cz/pdfs/lek/2016/92/05.pdf>
- [63] Kyle RA, Rajkumar SV. Multiple myeloma. *Blood* 2008; 111: 2962–2972.
- [64] Hájek R, Krejčí M, Pour, et al. Multiple myeloma, *Klin Onkol* 2011; 24: 10–13.
- [65] Krivanova A, Hajek R, Krejci M, et al. Second autologous transplantation for multiple myeloma patients relapsing after the first autograft – a pilot study for the evaluation of experimental maintenance therapies. Report of the prospective non-randomized pilot study of the Czech Myeloma Group. *Onkologie* 2004;27:275–279.
- [66] High-dose therapy and autologous stem cell transplantation. *Myeloma* [Online] 2021 [Citace: 23. 3. 2022.] Dostupné z: <https://www.myeloma.org.uk/wp->

<content/uploads/2021/11/Myeloma-UK-High-dose-therapy-and-autologous-stem-cell-transplantation-Infoguide.pdf>

[67] Fayed, L. Differences Between a Malignant and Benign Tumor. Very well health. [Online] 2021 [Citace: 24.3. 2022.] Dostupné z: <https://www.verywellhealth.com/what-does-malignant-and-benign-mean-514240#toc-benign-tumors-noncancerous>

[68] Wilson KA, Waugh A, Chambers G, Grant A, Ross J. Ross and Wilson anatomy and physiology in health and illness. Edinburgh: Churchill Livingstone. 2006. 53–54. ISBN 0-443-10101-9.

[69] National Cancer Institute: is this cancer?. [Online] 05. 05. 2021. [Citace: 14.12. 2021.] Dostupné z: <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>

[70] Cell division and cancer. Nature.com [Online] 2014 [Citace: 24. 3. 2022.] Dostupné z: <https://www.nature.com/scitable/topicpage/cell-division-and-cancer-14046590/>

[71] Baba AI, Catoi C. Comparative Oncology, Chapter 3 Publishing House of the Romanian Academy. 2007. ISBN-10: 973-27-1457-3

[72] B. Sadikovic, K. Al-Romaih, J. Squire, M. Zielenska, Cause and consequences of genetic and epigenetic alterations in human cancer, Curr. Genom. 2008, 9 (6), 394–408.

[73] Kapounková K, Pospíšil Z. Nádorové bujení. Fsp.s.muni.cz [Online] 2013 [Citace: 24.3. 2022.] Dostupné z: [https://www.fsp.s.muni.cz/inovace-RVS/kurzy/patofyziologie/bunka\\_nador.html](https://www.fsp.s.muni.cz/inovace-RVS/kurzy/patofyziologie/bunka_nador.html)

[74] How cancer starts, grows and spreads. Cancer.ca [Online] 2014 [Citace: 24.3. 2022.] Dostupné z: <https://cancer.ca/en/cancer-information/what-is-cancer/how-cancer-starts-grows-and-spreads>

[75] Understanding Myeloma. Cancer.org.au [Online] September 2020 [Citace: 24.3. 2022.] Dostupné z: <https://www.cancer.org.au/cancer-information/types-of-cancer/myeloma>

[76] Multiple Myeloma: Risk factors. Cancer.net [Online] srpen 2021 [Citace: 24.3. 2022.] Dostupné z: <https://www.cancer.net/cancer-types/multiple-myeloma/risk-factors>

[77] Sjak-Shie NN, Vescio RA, Berenson JR. The role of human herpesvirus-8 in the pathogenesis of multiple myeloma. Hematol Oncol Clin North Am. 1999 Dec;13(6):1159-67. doi: 10.1016/s0889-8588(05)70118-0.

- [78] Crocker J, Curran RC. Quantitative study of the immunoglobulin-containing cells in trephine samples of bone marrow. *J Clin Pathol*. 1981; 34: 1080–1082.
- [79] National cancer institute. Plasma Cell Neoplasms (Including Multiple Myeloma). *cancer.gov*. [online]. Dostupné z: <https://www.cancer.gov/types/myeloma/hp>
- [80] Børset M, Hjertner O, Yaccoby S, Epstein J, Sanderson RD. Syndecan-1 is targeted to the uropods of polarized myeloma cells where it promotes adhesion and sequesters heparin-binding proteins. *Blood*. 2000 Oct 1;96(7):2528-36. PMID: 11001907.
- [81] Rawstron, A.C. et al. European Myeloma Network. 2008. Report of the European Myeloma Network on multiparametric flow cytometry in multiple myeloma and related disorders. *Haematologica*. 93(3): 431-438.
- [82] Atlas of Haematological Cytology [online]. 2016 [cit. 2022-3-06]. Dostupné z: <http://www.leukemia-cell.org/atlas>
- [83] Hoeijmakers JHJ. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* 2001; 411: 366–374.
- [84] Bartůňková J., Protinádorová imunita. <https://zdravi.euro.cz/>. [Online] 08. 02. 2012. [Citace: 04. 12. 2021.] Dostupné z: <https://zdravi.euro.cz/clanek/postgradualni-medicina/protinadorova-imunita-463471>
- [85] Markov, O V et al. “Molecular and Cellular Mechanisms of Antitumor Immune Response Activation by Dendritic Cells.” 2016, 8(3), str. 17-30.
- [86] Moretta A, Bottino C, Vitale M et al. Receptors for HLA class-I molecules in human natural killer cells. *Annu Rev Immunol* 1996; 14: 619–648.
- [87] Bukowski RM, Rayman P, Molto L et al. Interferon- $\gamma$  and CXCL chemokine induction by interleukin 12 in renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 1999; 5: 2780–2789.
- [88] Wang JM, Su S, Gong W et al. Chemokines, receptors, and their role in cardiovascular pathology. *Int J Clin Lab Res* 1998; 28: 83–90.
- [89] Coulie PG, Van den Eynde BJ, van der Bruggen P et al. Tumour antigens recognized by T lymphocytes: at the core of cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer* 2014; 14(2): 135–146. doi: 10.1038/nrc3670.

- [90] Krejsek J, Kopecký O. Klinická imunologie. Hradec Králové: Nucleus HK 2004: 385–405, 541–566.
- [91] Schijns, V., et al. Rational Vaccine Design in Times of Emerging Diseases: The Critical Choices of Immunological Correlates of Protection, Vaccine Antigen and Immunomodulation. *Pharmaceutics* 2021, 13, 501. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13040501>
- [92] Anushruti S, Alejandro M, Aurore S. *Cellular & Molecular Immunology*. 2017, 14, 662–674; doi:10.1038/cmi.2017.35
- [93] Hořejší, V., Protinádorové zbraně imunitního systému. *Klinická Onkologie* 2015, 28 (Suppl 4), str 15 – 22, <http://dx.doi.org/10.14735/amko20154S15>
- [94] Rosenblatt J., Glotzbecker B., Mills H., Vasir B., Tzachanis D., Levine J.D., Joyce R.M., Wellenstein K., Keefe W., Schickler M., et al. PD-1 blockade by CT-011, anti-PD-1 antibody, enhances ex vivo T-cell responses to autologous dendritic cell/myeloma fusion vaccine. *J. Immunother.* 2011;34:409–418. doi: 10.1097/CJI.0b013e31821ca6ce.
- [95] Löffler, M.W.; Mohr, C.; Bichmann, L.; Freudenmann, L.K.; Walzer, M.; Schroeder, C.M.; Trautwein, N.; Hilke, F.J.; Zinser, R.S.; Mühlenbruch, L.; et al. Multi-omics discovery of exome-derived neoantigens in hepatocellular carcinoma. *Genome Med.* 2019, 11, 1–16.
- [96] Definition of autoimmunity. *Pathology.jhu.edu*. [Online] [Citace: 26.3. 2022.] Dostupné z: <https://pathology.jhu.edu/autoimmune/definitions/>
- [97] Yamamoto, K. Mechanisms of Autoimmunity. *JMAJ*, September 2004—Vol. 47, No. 9, 403-406
- [98] Davidson A, Diamond B. Autoimmune diseases. *N Engl J Med* 2001; 345:340.
- [99] K. Elkon, P. Casali, Nature and functions of autoantibodies, *Nat. Clin. Pract. Rheumatol.* 4 (2008) 491–498, <https://doi.org/10.1038/ncprheum0895>.
- [100] Hrdá P, Šterzl I, Vyšetření autoprotílátek – současné možnosti. *Interní medicína pro praxi.* 2003, 8, 410-413
- [101] Simpson, A.J.G.; Caballero, O.L.; Jungbluth, A.; Chen, Y.-T.; Old, L.J. Cancer/testis antigens, gametogenesis and cancer. *Nat. Rev. Cancer* 2005, 5, 615–625.

- [102] Lu, H.; Goodell, V.; Disis, M.L. Humoral Immunity Directed against Tumor-Associated Antigens As Potential Biomarkers for the Early Diagnosis of Cancer. *J. Proteome Res.* 2008, 7, 1388–1394.
- [103] Desmetz, C.; Mange, A.; Maudelonde, T.; Solassol, J. Autoantibody signatures: Progress and perspectives for early cancer detection. *J. Cell. Mol. Med.* 2011, 15, 2013–2024.
- [104] Trivers, G.E.; Cawley, H.L.; DeBenedetti, V.M.G.; Hollstein, M.; Marion, M.J.; Bennett, W.P.; Hoover, M.L.; Prives, C.C.; Tamburro, C.C.; Harris, C.C. Anti-p53 Antibodies in Sera of Workers Occupationally Exposed to Vinyl Chloride. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* 1995, 87, 1400–1407.
- [105] R. Elshafey, M. Siaj, A.C. Tavares, Au nanoparticle decorated graphene nanosheets for electrochemical immunosensing of p53 antibodies for cancer prognosis, *Analyst*, 2016, 141 (9), 2733–2740.
- [106] Pancholi, V. Multifunctional alpha-enolase: its role in diseases. *Cellular and Molecular Life Sciences.* 2001. 58 (7): 902–920. doi:10.1007/pl00000910
- [107] Peshavaria, M. Molecular structure of the human muscle-specific enolase gene (ENO3). *The Biochemical Journal.* 1991. 275. 427–433. doi:10.1042/bj2750427
- [108] Lohman, K, Meyerhof, O. Über die enzymatische umwandlung von phosphoglyzerinsäure in brenztraubensäure und phosphorsäure. Enzymatic transformation of phosphoglyceric acid into pyruvic and phosphoric acid. *Biochemische Zeitschrift.* 1934. 273: 60–72.
- [109] Ramos A, Borrellas A, Melero A, Alemany R,  $\alpha$ -Enolase, a Multifunctional Protein: Its Role on Pathophysiological Situations, *BioMed Research International*, 2012, 1-12, <https://doi.org/10.1155/2012/156795>
- [110] Liu YQ, Huang ZG, Li GN, Du JL, Ou YP, Zhang XN, et al. Effects of  $\alpha$ -enolase (ENO1) over-expression on malignant biological behaviors of AGS cells. *Int J Clin Exp Med* (2015) 8(1):231–9.
- [111] Kang, H.J., Jung, S.K., Kim, S.J., Chung, S.J. Structure of human alpha-enolase (hENO1), a multifunctional glycolytic enzyme. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 2008. 64(6): 651-65. DOI: 10.1107/S0907444908008561



- [112] Song Y, Luo Q, Long H, Hu Z, Que T, Zhang X, Li Z, Wang G, Yi L, Liu Z, Fang W, Qi S. Alpha-enolase as a potential cancer prognostic marker promotes cell growth, migration, and invasion in glioma. *Molecular Cancer* 13. 2014. 65. doi:10.1186/1476-4598-13-65
- [113] ENO1 Protein Overview: Sequence, Structure, Function and Protein Interaction. *Sinobiological.com*. [Online] [Citace: 20.4. 2022.] Dostupné z: <https://www.sinobiological.com/resource/eno1/proteins>
- [114] Bae S, Kim H, Lee N, Won C, Kim HR, Hwang Y, II, et al.  $\alpha$ -Enolase expressed on the surfaces of monocytes and macrophages induces robust synovial inflammation in rheumatoid arthritis. *J Immunol (Baltimore Md 1950)* (2012) 189(1):365–72. 10.4049/jimmunol.1102073
- [115] Zhao, Mengyang et al. “Enolase-1 is a therapeutic target in endometrial carcinoma.” *Oncotarget* vol. 6,17 (2015): 15610-27. doi:10.18632/oncotarget.3639
- [116] Ejeskär K, Krona C, Carén H, Zaibak F, Li L, Martinsson T, Ioannou PA. Introduction of in vitro transcribed ENO1 mRNA into neuroblastoma cells induces cell death. *BMC Cancer*. 2005 Dec 16;5:161. doi: 10.1186/1471-2407-5-161.
- [117] Cappello P, Tomaino B, Chiarle R, Ceruti P, Novarino A, Castagnoli C, Migliorini P, Perconti G, Giallongo A, Milella M, Monsurro V, Barbi S, Scarpa A, et al. An integrated humoral and cellular response is elicited in pancreatic cancer by alpha-enolase, a novel pancreatic ductal adenocarcinoma-associated antigen. *Int J Cancer*. 2009;125(3):639–648.
- [118] Yu, Lin et al. “Estrogen promotes prostate cancer cell migration via paracrine release of ENO1 from stromal cells.” *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)* vol. 26,9 (2012): 1521-30. doi:10.1210/me.2012-1006
- [119] Li HJ, Ke FY, Lin CC, Lu MY, Kuo YH, Wang YP, Liang KH, Lin SC, Chang YH, Chen HY, Yang PC, Wu HC. ENO1 Promotes Lung Cancer Metastasis via HGFR and WNT Signaling-Driven Epithelial-to-Mesenchymal Transition. *Cancer Res*. 2021 Aug 1;81(15):4094-4109. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-20-3543.
- [120] Hamaguchi T, Iizuka N, Tsunedomi R, et al. Glycolysis module activated by hypoxia-inducible factor 1alpha is related to the aggressive phenotype of hepatocellular carcinoma. *Int J Oncol*. 2008;33(4):725–731.
- [121] Cancemi P, Buttacavoli M, Roz E, Feo S. Expression of Alpha-Enolase (ENO1), Myc Promoter-Binding Protein-1 (MBP-1) and Matrix Metalloproteinases (MMP-2 and MMP-9)

Reflect the Nature and Aggressiveness of Breast Tumors. *Int J Mol Sci.* 2019;20(16):3952. doi:10.3390/ijms20163952.

[122] Gao J, Zhao R, Xue Y, Niu Z, Cui K, Yu F, Zhang B, Li S. Role of enolase-1 in response to hypoxia in breast cancer: exploring the mechanisms of action. *Oncology Reports.* 2013. 29 (4). 1322–32. doi:10.3892/or.2013.2269

[123] Almaguel Frankis A., Sanchez Tino W., Ortiz-Hernandez Greisha L., Casiano Carlos A. Alpha-Enolase: Emerging Tumor-Associated Antigen, Cancer Biomarker, and Oncotherapeutic Target. *Frontiers in Genetics.* 2021. 11, 1835. doi:10.3389/fgene.2020.614726

[124] Nishimura K, Tsuchiya Y, Okamoto H, Ijichi K, Gosho M, Fukayama M, et al. Identification of chemoresistant factors by protein expression analysis with iTRAQ for head and neck carcinoma. *Br J Cancer* (2014) 111(4):799–806. 10.1038/bjc.2014.395

[125] Gao W, Li H, Li X, Li Bin, He Di, et al. Expression of NSE in myeloma-related bone diseases. *Journal of Chinese General Practice.* 2012. 10: 337–338

[126] Chauhan D, Singh AV, Brahmandam M, Carrasco R, Bandi M, Hideshima T, et al. Functional interaction of plasmacytoid dendritic cells with multiple myeloma cells: a therapeutic target. *Cancer Cell* 2009;16:309–23.

[127] Chauhan D et al, Functional interaction of plasmacytoid dendritic cells with multiple myeloma cells: a therapeutic target. *Cancer Cell.* 2009 Oct 6;16(4):309-23. doi: 10.1016/j.ccr.2009.08.019.

[128] Ray A, Tian Z, Das DS, Coffman RL, Richardson P, Chauhan D, et al. A novel TLR-9 agonist C792 inhibits plasmacytoid dendritic cell-induced myeloma cell growth and enhance cytotoxicity of bortezomib. *Leukemia.* 2014;28:1716–24.

[129] Ray A, Das DS, Song Y, Richardson P, Munshi NC, Chauhan D, et al. Targeting PD1-PDL1 immune checkpoint in plasmacytoid dendritic cell interactions with T cells, natural killer cells and multiple myeloma cells. *Leukemia.* 2015;29:1441–4.

[130] Ray A, Das DS, Song Y, Hideshima T, Tai YT, Chauhan D, Anderson KC. Combination of a novel HDAC6 inhibitor ACY-241 and anti-PD-L1 antibody enhances anti-tumor immunity and cytotoxicity in multiple myeloma. *Leukemia.* 2018 Mar;32(3):843-846. doi: 10.1038/leu.2017.322.

- [131] Chia J-S, Tuan C-H, Lay F-Y, Ye J-H, Chiu Y-L. Anti-alpha-enolase T cell response in oral squamous cell carcinoma. *J Immu.* 2019 May 1;202(1 Supplement):138.8-138.8
- [132] Arghya, R. Preclinical validation of Alpha-Enolase (ENO1) as a novel immunometabolic target in multiple myeloma. *Oncogene.* 2020. 39. doi:10.1038/s41388-020-1172-0.
- [133] Metody stanovení protilátek. *Is.muni.cz* [Online] 18.02.2010  
[Citace: 27.12. 2021.] Dostupné z: [https://is.muni.cz/el/sci/jaro2010/Bi5220c/9\\_Metody\\_stanoveni\\_protilatek.dvojita\\_radialni\\_i\\_munodifuze.pdf](https://is.muni.cz/el/sci/jaro2010/Bi5220c/9_Metody_stanoveni_protilatek.dvojita_radialni_i_munodifuze.pdf)
- [134] Zajoncová, L. Imunochemické metody. *Pfd.upl.cz.* [Online] 27.7.2009  
[Citace: 27.4. 2022.] Dostupné z: [https://www.prf.upol.cz/fileadmin/userdata/PrF/katedry/biochemie/Dokumenty/Materialy\\_k\\_vyuce/KBC-KBC\\_Imunochemicke\\_metody.pdf](https://www.prf.upol.cz/fileadmin/userdata/PrF/katedry/biochemie/Dokumenty/Materialy_k_vyuce/KBC-KBC_Imunochemicke_metody.pdf)
- [135] Tománek, R. Efektivní blokovací postupy v ELISA. *Baria.cz* [Online]  
[Citace: 27.4. 2022.] Dostupné z: <https://www.baria.cz/blog/efektivni-blokovaci-postupy-v-elisa/>
- [136] Types of ELISA. *Theory.labster.com* [Online] 2017  
[Citace: 15.3. 2022.] Dostupné z: <https://theory.labster.com/types-elisa/>
- [137] Kaiser, E., Kuzmits, R., Pregant, P. et al. Clinical biochemistry of neuron specific enolase. *Clin. Chim. Acta*, 1989, 183, p. 13–31.
- [138] Alhajj M, Farhana A. Enzyme Linked Immunosorbent Assay. In: StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022. PMID: 32310382.
- [139] SOP a validace metod. *is muni.cz.* [Online] podzim 2015 [Citace: 31.12. 2021.] Dostupné z: [https://is.muni.cz/el/sci/podzim2015/C5920/um/SOP\\_a\\_validace\\_metod.pdf](https://is.muni.cz/el/sci/podzim2015/C5920/um/SOP_a_validace_metod.pdf)
- [140] EMEA, Note for Guidance on Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology. London, England:E.M.A.1995.1-15.
- [141] Minic R., Zivkovic I. Optimization, Validation and Standardization of ELISA. *Intechopen.* 3.12.2020. DOI: 10.5772/intechopen.94338

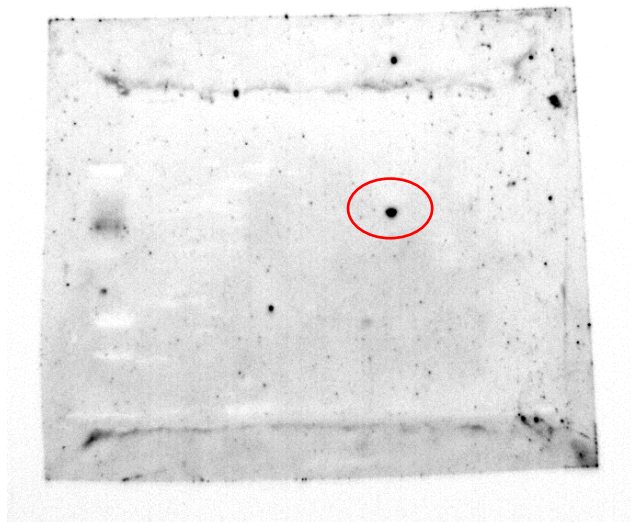
- [142] Azadeh M, Sondag P, Wang Y, Raines M, Sailstad J. Quality controls in ligand binding assays: Recommendations and best practices for preparation, qualification, maintenance of lot to lot consistency, and prevention of assay drift. *The AAPS Journal*. 2019;21(5):89
- [143] Kuman, A. Why are Sensitivity and Specificity Important Parameters for an ELISA? *Enzolifesciences.com*. [Online] 2019 [Citace: 12.4. 2022.] Dostupné z: <https://www.enzolifesciences.com/science-center/technotes/2019/september/why-are-sensitivity-and-specificity-important-parameters-for-an-elisa?/>
- [144] Validační program pro statistické zpracování analytických dat. *Hplc.cz*. [Online] [Citace: 17.4. 2022.] Dostupné z: [http://www.hplc.cz/Validace/program\\_validace.htm#\\_ftn2](http://www.hplc.cz/Validace/program_validace.htm#_ftn2)
- [145] Andreasson U, Perret-Liaudet A, van Waalwijk van Doorn L, Blennow K, Chiasserini D, Engelborghs S, et al. A practical guide to immunoassay method validation. *Frontiers in Neurology* 2015, 6:179
- [146] Ghosh-Roy, A. What is meant by the limit of detection and quantification (LOD / LOQ)? Method validation. [Online] 22.5. 2018 [Citace: 30.3. 2022.] Dostupné z: <https://mpl.loesungsfabrik.de/en/english-blog/method-validation/limit-of-detection-quantification>
- [147] Zhang, S. Predicting detection limits of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and bioanalytical techniques in general. *Analyst*, 2014, 139(2), 439. doi:10.1039/C3AN01835K
- [148] An Explanation of Sensitivity and the LLD, LLOQ, and ULOQ of a Multiplex ELISA. *Quansysbio.com*. [Online] [Citace: 30.3. 2022.] Dostupné z: <https://www.quansysbio.com/support/an-explanation-of-sensitivity-and-the-lld-lloq-and-ulog-of-a-multiplex-elisa/>
- [149] Ambrožová, J. Preciznost a bias metod měření dle EP15-A3. *Klin. Biochem. Metab.*, 24 (45), 2016, No. 4, p. 183–190.
- [150] Calculating Inter- and Intra-Assay Coefficients of Variability. *Salimetrics.com*. [Online] [Citace: 23.4. 2022.] Dostupné z: <https://salimetrics.com/calculating-inter-and-intra-assay-coefficients-of-variability/>

- [151] Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 1979. 76 (9): 4350–54. doi:10.1073/pnas.76.9.4350
- [152] Mahmood, T; Yang, P. Western Blot: Technique, Theory, and Trouble Shooting. *N Am J Med Sci*. 2012. 4 (9): 429–434. doi:10.4103/1947-2714.100998
- [153] Kurien, B. T., Scofield, R. H. Western blotting. *Methods*, 2006, 38(4), 283-293.
- [154] Western Blotting Immunodetection Techniques. Bio-rad. [Online] [Citace: 10.3. 2022.] Dostupné z: <https://www.bio-rad.com/en-cz/applications-technologies/western-blotting-immunodetection-techniques?ID=PQEEPOBWLN4A>
- [155] Kurien, B.T., and Scofield, R.H. Western blotting. *Methods*. 2006. 38. 283–293.
- [156] Eaton SL et al. Total protein analysis as a reliable loading control for quantitative fluorescent Western blotting. *PLoS One*. 2013 Aug 30;8(8):e72457.
- [157] Deric, M. Principles of Dot Blots. *Blog.benchsci*. [Online] 31.10.2017 [Citace: 10.3. 2022.] Dostupné z: <https://blog.benchsci.com/dot-blot-principles>
- [158] Rupprecht, K, Nair, K., et al. Development of a dot-blot assay for screening monoclonal antibodies to low-molecular-mass drugs. *Analytical Biochemistry*: 2010. 160–164. doi:10.1016/j.ab.2010.08.003
- [159] Zhu, W. et al. Detection of N6-methyladenosine modification residues (Review). *International Journal of Molecular Medicine*. 2019. 43: 2267–2278. doi:10.3892/ijmm.2019.4169
- [160] Štern, P. Současné možnosti turbidimetrie a nefelometrie. *Klin. Biochem. Metab.*, 14 (35), 2006, No. 3, p. 146–151
- [161] Sharma, K. A new method for the detection for enolase activity on polyacrylamide gels. *Analytical Biochemistry*, 1979, 98, 226-230
- [162] Capello, M. Proteomic Profiling of the Tumor Microenvironment. *Methods in molecular biology*. 2022. 2435, 157-1167 10.1007/978-1-0716-2014-4\_11
- [163] Liška, M. Vyšetřovací metody v alergologii. *Zdravi.euro.cz* [Online] [Citace: 28.4. 2022.] Dostupné z: <https://zdravi.euro.cz/clanek/postgradualni-medicina/vysetrovaci-metody-v-alergologii-463461>

## 7 PŘÍLOHY

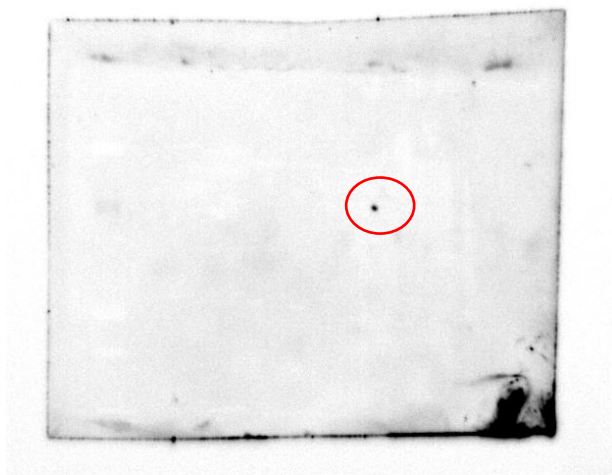
Příloha A *Fotografie NC membrán, ze kterých byly vyříznuty skvrny ENO1*

*ředění 1:1000*



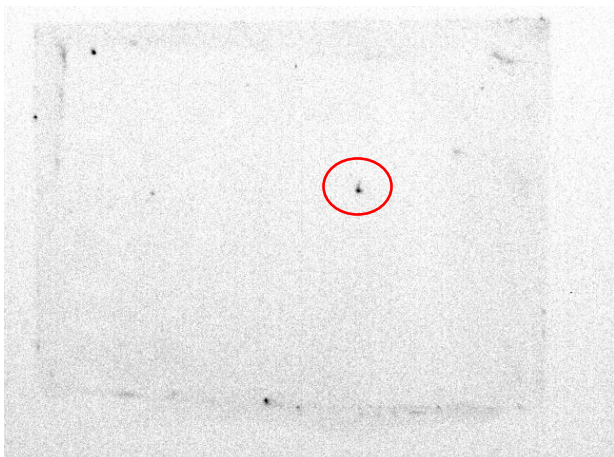
**Obrázek 29:** Výsledek metody SERPA, ředění séra 1:1000, červeným kroužkem je označena ENO1

*ředění 1:1500*



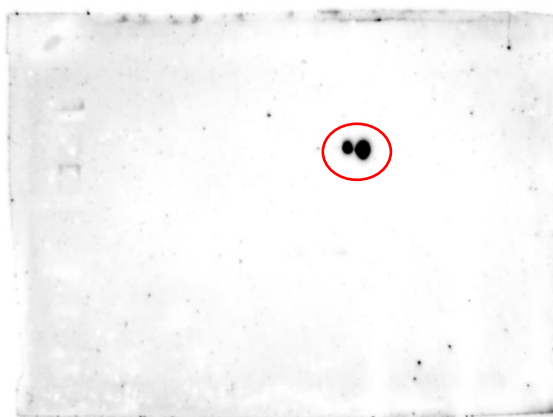
**Obrázek 30:** Výsledek metody SERPA, ředění séra 1:1500, červeným kroužkem je označena ENO1

*ředění 1:2000*



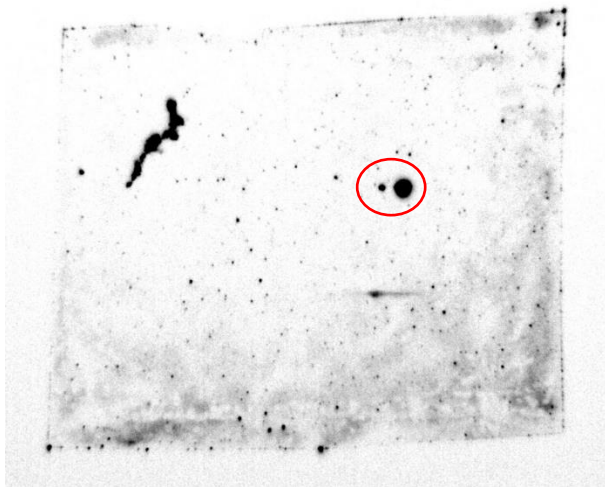
**Obrázek 31:** Výsledek metody SERPA, ředění séra 1:2000, červeným kroužkem je označena ENO1

*ředění 1:500*



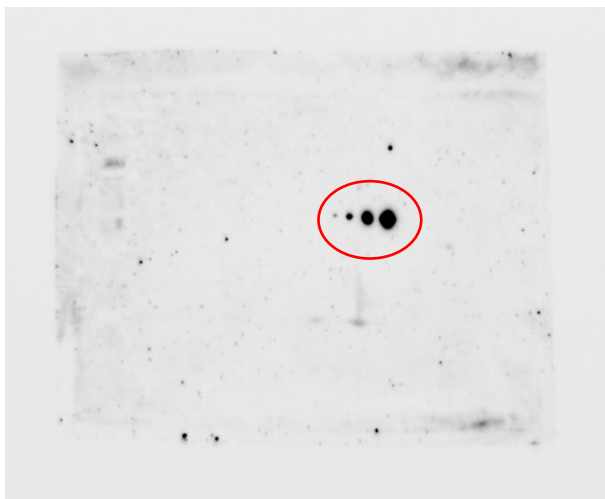
**Obrázek 32:** Výsledek metody SERPA, ředění séra 1:500, červeným kroužkem jsou označeny 2 izoformy ENO1

*ředění 1:1000*



**Obrázek 33:** Výsledek metody SERPA, ředění séra 1:1000, červeným kroužkem jsou označeny 2 izoformy ENO1

*ředění 1:1500*



**Obrázek 34:** Výsledek metody SERPA, ředění séra 1:1500, červeným kroužkem jsou označeny 4 izoformy ENO1