

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Komparativní proteomová analýza nádorových buněčných linií

Diplomová práce

2023

Bc. Michaela Dvořáková

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2022/2023

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Michaela Dvořáková**
Osobní číslo: **C21446**
Studijní program: **N0914P360001 Bioanalytická laboratorní diagnostika ve zdravotnictví**
Téma práce: **Komparativní proteomová analýza nádorových buněčných linií**
Téma práce anglicky: **Comparative Proteomic Analysis of Human Cancer Cells**
Zadávací katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování

Teoretická část:

1. Základní informace o nádorovém onemocnění Mnohočetný myelom – patogeneze onemocnění, symptomy, laboratorní diagnostika, terapie – současný stav poznání.
2. Vyhleďte nové poznatky týkající se vlastností a struktury myelomových buněk jedinců trpících mnohočetným myelomem. Komentujte, zda lze nalézt souvislost mezi charakterem těchto buněk a prognózou onemocnění nebo účinností terapie.
3. Shromážděte recentní informace o vybraných nádorových buněčných liniích odvozených z plazmocytomů a dalších buněčných linií, které se dnes v laboratoři používají v rámci výzkumu, klinických studií nebo při vyhledávání nových léčiv.
4. Popište metody, které se dnes používají pro charakterizaci modelových buněčných linií, určení jejich identity a kvality. Zaměřte se na metody proteomické analýzy (MS, DIGE, 2D elektroforéza), imunofenotypizaci.
5. Zaměřte se zhodnocení vědeckých výsledků dosažených v posledních 5-10 letech.

Experimentální část:

1. Použití elektroforetických technik a Western Blott metody s imunochemickou detekcí pro analýzu proteinů buněčných lysátů, lidského séra.
2. Zavedení dvourozměrné elektroforetické techniky pro separaci buněčných proteinů s následnou imunodetekcí.
3. Imunoproteomické profilování sér odebraných v předem stanovených intervalech pacientům s diagnózou Mnohočetný myelom. Vyhodnocení výsledků.
4. Komparativní analýza vybraných buněčných linií s důrazem na přítomnost vybraných klinicky významných proteinů – α -Enoláza.

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

Seznam doporučené literatury:

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: **23. prosince 2022**
Termín odevzdání diplomové práce: **5. května 2023**

prof. Ing. Petr Němec, Ph.D. v.r.
děkan

L.S.

doc. RNDr. Tomáš Roušar, Ph.D. v.r.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2023

Prohlašuji:

Práci s názvem Komparativní proteomová analýza nádorových buněčných linií 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 1. 5. 2023

Bc. Michaela Dvořáková v. r.

PODĚKOVÁNÍ

Tímto bych ráda poděkovala především vedoucí mé diplomové práce, paní prof. RNDr. Zuzaně Bílkové, PhD., za odborné vedení, cenné rady a poskytnuté materiály, ochotu, trpělivost a čas, který mně a mé práci věnovala. Dále bych chtěla poděkovat paní Mgr. Marcele Slovákové, PhD., paní doc. RNDr. Lucii Korecké, PhD. a laborantkám, paní Janě Kňavové a paní Ivaně Fousové, za rady a pomoc v rámci laboratorní práce a obrovskou vstřícnost. Děkuji panu prof. MUDr. Romanu Hájkovi, CSc. a paní Mgr. Lucii Broskevičové z Fakultní nemocnice v Ostravě za poskytnutí vzorků sér pacientů s mnohočetným myelomem a paní Mgr. Lence Minichové, PhD. z Biomedicínského centra Slovenské akademie věd za poskytnutí nádorových buněčných linií. V neposlední řadě bych ráda poděkovala Bc. Tomáši Mikešovi za více než roční skvělou spolupráci na experimentech pro naše diplomové práce. Poděkování patří i mé rodině za podporu po celou dobu studia.

ANOTACE

Tato diplomová práce se zabývá zejména výskytem autoprotilátek u pacientů s onemocněním mnohočetný myelom a jejich rolí v protinádorové imunitě. Teoretická část se zaměřuje na onemocnění mnohočetný myelom, myelomové buňky, potenciální nádorové biomarkery, nádorové buněčné linie a metody používané pro charakterizaci modelových buněčných linií. Experimentální část se věnuje sérologické proteomové analýze, pomocí níž byla provedena komparativní proteomová analýza vybraných nádorových buněčných linií a imunoproteomické profilování vzorků sér pacientů s mnohočetným myelomem.

KLÍČOVÁ SLOVA

mnohočetný myelom, sérologická proteomová analýza, autoprotilátky, enoláza 1, karbonická anhydráza 1

TITLE

Comparative proteomic analysis of human cancer cells

ANNOTATION

This diploma thesis deals mainly with the occurrence of autoantibodies in patients with multiple myeloma and their role in antitumor immunity. The theoretical part focuses on the multiple myeloma, myeloma cells, potential tumor biomarkers, tumor cell lines and methods used for the characterization of model cell lines. In the experimental part we used serological proteome analysis to perform a comparative proteomic analysis of selected tumor cell lines and immunoproteomic profiling of sera samples from patients with multiple myeloma.

KEYWORDS

multiple myeloma, serological proteome analysis, autoantibodies, enolase 1, carbonic anhydrase 1

OBSAH

Seznam obrázků a tabulek	10
Seznam zkratk	13
Úvod.....	17
1 Teoretická část	18
1.1 Mnohočetný myelom	18
1.1.1 Patogeneze onemocnění.....	19
1.1.2 Symptomy	20
1.1.3 Laboratorní diagnostika	23
1.1.4 Diagnostická kritéria	26
1.1.5 Terapie onemocnění.....	28
1.2 Myelomové buňky	32
1.2.1 Vztah myelomových buněk s prognózou onemocnění a účinností terapie.....	35
1.3 Potenciální nádorové biomarkery	39
1.3.1 Enoláza 1.....	39
1.3.2 Karbonická anhydráza 1	41
1.4 Nádorové buněčné linie.....	44
1.4.1 RPMI-8226	44
1.4.2 HEL.....	45
1.4.3 ANBL-6	45
1.4.4 PC-3	45
1.5 Metody používané pro charakterizaci modelových buněčných linií.....	46
1.5.1 Imunohistochemie.....	46
1.5.2 Imunocytochemie.....	48
1.5.3 Imunofluorescence	49
1.5.4 Imunofenotypizace pomocí průtokové cytometrie	50
1.5.5 Reverzní transkriptázová kvantitativní polymerázová řetězová reakce	53

1.5.6	Karyotypizace	53
1.5.7	Sekvenování nové generace.....	55
1.5.8	Western blot.....	56
1.5.9	Dvourozměrná gelová elektroforéza.....	57
1.5.10	Dvourozměrná diferenční gelová elektroforéza	58
1.5.11	Hmotnostní spektrometrie.....	59
2	Cíle práce	60
3	Experimentální část.....	61
3.1	Seznam laboratorního vybavení	61
3.2	Seznam chemikálií	63
3.3	Seznam biologického materiálu	66
3.3.1	Nádorové buněčné linie	66
3.3.2	Vzorky patientských sér	66
3.4	Sérologická proteomová analýza (SERPA)	67
3.4.1	Příprava suché pelety buněk	67
3.4.2	Příprava buněčného lyzátu.....	67
3.4.3	Rehydratace gelových stripů.....	68
3.4.4	Izoelektrická fokuzace	70
3.4.5	Dvourozměrná gelová elektroforéza.....	70
3.4.6	Semi-dry Western blot	73
3.4.7	Barvení proteinů na nitrocelulózkové membráně	73
3.4.8	Barvení proteinů na gelu.....	74
3.4.9	Imunodetekce reaktivních proteinových spotů	75
4	Výsledky a diskuze	78
4.1	Porovnání dvou způsobů imunodetekce.....	78
4.2	Komparativní proteomová analýza vybraných nádorových buněčných linií.....	81
4.2.1	RPMI-8226	82

4.2.2	HEL.....	83
4.2.3	ANBL-6	84
4.2.4	PC-3	85
4.3	Imunoproteomické profilování vzorků sér pacientů s mnohočetným myelomem.....	88
4.3.1	Kontroly	89
4.3.2	Vzorky sér pacientů s mnohočetným myelomem.....	90
5	Závěr	115
6	Použitá literatura	117

SEZNAM OBRÁZKŮ A TABULEK

Seznam obrázků

Obrázek 1 – Schéma vývoje základních typů krevních buněk.....	18
Obrázek 2 – Vzájemná souvislost onemocnění patřících mezi tzv. monoklonální gamapatie.	20
Obrázek 3 – Frekvence postižení jednotlivých částí kostry u mnohočetného myelomu dle RTG nálezů.....	21
Obrázek 4 – Zmnožení myelomových buněk v kostní dřeni.....	24
Obrázek 5 – Elektroforéza sérových bílkovin, stanovení koncentrace M-Ig a imunofixace s IgG-kappa.....	25
Obrázek 6 – CAR-T buněčná terapie.....	30
Obrázek 7 – Vlnovitý průběh mnohočetného myelomu.....	31
Obrázek 8 – Rozdíl mezi fyziologickými plazmatickými buňkami a myelomovými buňkami.....	32
Obrázek 9 – Plazmatická buňka (bílá šipka, upraveno).....	33
Obrázek 10 – Myelomové buňky.....	34
Obrázek 11 – Mottovy buňky.....	34
Obrázek 12 – Telomery a telomeráza.....	38
Obrázek 13 – Porovnání metabolismu glukózy v normálních a nádorových buňkách.....	41
Obrázek 14 – Reakce katalyzovaná karbonickou anhydrázou.....	41
Obrázek 15 – Role karbonické anhydrázy v regulaci pH.....	43
Obrázek 16 – Princip imunohistochemie.....	47
Obrázek 17 – Příklady imunohistochemických nálezů u mnohočetného myelomu.....	48
Obrázek 18 – Porovnání imunocytochemického a imunohistochemického preparátu.....	48
Obrázek 19 – Princip přímé a nepřímé imunofluorescence.....	49
Obrázek 20 – Imunofluorescence u myelomových buněk.....	50
Obrázek 21 – Princip průtokové cytometrie.....	51
Obrázek 22 – Laboratorní výsledky potvrzující diagnózu mnohočetného myelomu.....	52
Obrázek 23 – Princip RT-qPCR.....	53
Obrázek 24 – Princip karyotypizace.....	54
Obrázek 25 – Karyotyp pacienta s doutnajícím myelomem (G-pruhování).....	54
Obrázek 26 – Princip sekvenování nové generace.....	55
Obrázek 27 – Uspořádání vrstev při přenosu z gelu na membránu – metoda Western blot.....	56

Obrázek 28 – Princip separace a imunodetekce proteinů	56
Obrázek 29 – Princip dvourozměrné gelové elektroforézy	57
Obrázek 30 – Princip dvourozměrné diferenční gelové elektroforézy	58
Obrázek 31 – Princip hmotnostní spektrometrie typu MALDI-TOF	59
Obrázek 32 – Porovnání dvou způsobů imunodetekce, pacient č. 3, M-20-034	79
Obrázek 33 – Porovnání dvou způsobů imunodetekce, pacient č. 4, M-21-025	79
Obrázek 34 – Porovnání dvou způsobů imunodetekce, pacient č. 9, M-18-136	79
Obrázek 35 – Komparativní proteomová analýza, nádorová buněčná linie RPMI-8226	82
Obrázek 36 – Komparativní proteomová analýza, nádorová buněčná linie HEL	83
Obrázek 37 – Komparativní proteomová analýza, nádorová buněčná linie ANBL-6	84
Obrázek 38 – Komparativní proteomová analýza, nádorová buněčná linie PC-3	85
Obrázek 39 – Schéma metody SERPA	88
Obrázek 40 – Kontrolní vzorky	89
Obrázek 41 – Kontrola úspěšnosti přenosu proteinů po Western blotu	90
Obrázek 42 – Pacient č. 1, výsledek SERPA a označení imunoreaktivních spotů	93
Obrázek 43 – Pacient č. 2, výsledek SERPA a označení imunoreaktivních spotů	95
Obrázek 44 – Pacient č. 3, výsledek SERPA a označení imunoreaktivních spotů	97
Obrázek 45 – Pacient č. 4, výsledek SERPA a označení imunoreaktivních spotů	99
Obrázek 46 – Pacient č. 5, výsledek SERPA a označení imunoreaktivních spotů	101
Obrázek 47 – Pacient č. 6, výsledek SERPA a označení imunoreaktivních spotů	103
Obrázek 48 – Pacient č. 7, výsledek SERPA a označení imunoreaktivních spotů	105
Obrázek 49 – Pacient č. 8, výsledek SERPA a označení imunoreaktivních spotů	107
Obrázek 50 – Pacient č. 9, výsledek SERPA a označení imunoreaktivních spotů	109
Obrázek 51 – Pacient č. 10, výsledek SERPA a označení imunoreaktivních spotů	111

Seznam tabulek

Tabulka 1 – Diagnostická kritéria mnohočetného myelomu dle Durieho a Salmona, 1975	26
Tabulka 2 – Stanovení klinického stadia mnohočetného myelomu dle Durieho a Salmona, 1975	27
Tabulka 3 – Diagnostická kritéria mnohočetného myelomu dle International Myeloma Working Group, 2003	27
Tabulka 4 – Revidovaná diagnostická kritéria mnohočetného myelomu dle International Myeloma Working Group, 2014.....	28
Tabulka 5 – Příprava směšného roztoku na rehydrataci	69
Tabulka 6 – Příprava roztoků na gely	71
Tabulka 7 – Příprava směšného roztoku na gely	72
Tabulka 8 – Nastavení promývací stanice FlexiWash.....	76
Tabulka 9 – Přehled vzorků sér pacienta č. 1	92
Tabulka 10 – Přehled vzorků sér pacienta č. 2	94
Tabulka 11 – Přehled vzorků sér pacienta č. 3	96
Tabulka 12 – Přehled vzorků sér pacienta č. 4	98
Tabulka 13 – Přehled vzorků sér pacienta č. 5	100
Tabulka 14 – Přehled vzorků sér pacienta č. 6	102
Tabulka 15 – Přehled vzorků sér pacienta č. 7	104
Tabulka 16 – Přehled vzorků sér pacienta č. 8	106
Tabulka 17 – Přehled vzorků sér pacienta č. 9	108
Tabulka 18 – Přehled vzorků sér pacienta č. 10	110
Tabulka 19 – Přehled výskytu imunoreaktivních spotů, 1. část	112
Tabulka 20 – Přehled výskytu imunoreaktivních spotů, 2. část	113

SEZNAM ZKRATEK

2D-DIGE	dvourozměrná diferenční gelová elektroforéza
B2M	beta-2-mikroglobulin
BCMA	antigen zrání B-lymfocytů (z angl. „B-cell Maturation Antigen“)
CA	karbonické anhydrázy (z angl. „Carbonic Anhydrases“)
CA1	karbonická anhydráza 1
CA125	nádorový antigen 125 (z angl. „Cancer Antigen 125“)
CAR-T terapie	terapie založená na chimérickém antigenním receptoru T-lymfocytů
CD	diferenční skupina (z angl. „Cluster of Differentiation“)
CRP	C-reaktivní protein
CRS	syndrom uvolnění cytokinů (z angl. „Cytokine Release Syndrome“)
CT	počítačová tomografie (z angl. „Computed Tomography“)
DBP	vitamin D vázající protein (z angl. „Vitamin D Binding Protein“)
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EGFR	receptor pro epidermální růstový faktor (z angl. „Epidermal Growth Factor Receptor“)
ELFO	elektroforéza
ENO1	enoláza 1

EpCAM	epiteliální buněčná adhezní molekula (z angl. „Epithelial Cell Adhesion Molecule“)
ESI	ionizace elektrosprejem (z angl. „Electrospray Ionization“)
FISH	fluorescenční in-situ hybridizace
FITC	fluorescein izothiokyanát
FSC	přímý rozptyl (z angl. „Forward Scatter“)
GLUT1	glukózový transportér 1
GLUT3	glukózový transportér 3
HER2	receptor 2 lidského epidermálního růstového faktoru (z angl. „Human Epidermal Growth Factor Receptor-2“)
HSP	protein teplotního šoku (z angl. „Heat Shock Protein“)
ICANS	syndrom neurotoxicity spojené s imunitními efektorovými buňkami (z angl. „Immune Effector Cell Associated Neurotoxicity Syndrome“)
IEF	izoelektrická fokuzace
IL-6	interleukin 6
LDH	laktátdehydrogenáza
MAF	transkripční faktory muskuloaponeurotického fibrosarkomu (z angl. „Musculoaponeurotic Fibrosarcoma“)
MALDI	matricí asistovaná laserová desorpce/ionizace (z angl. „Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation“)
MCT	monokarboxylátový transportér (z angl. „Monocarboxylate Transporter“)
MGUS	monoklonální gamapatie nejasného významu (z angl. „Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance“)

M-Ig	monoklonální imunoglobulin
MM	mnohočetný myelom
MOC-31	protilátka MOC-31 (epiteliální specifický antigen)
Mr	molekulová hmotnost
MR	magnetická rezonance
MRS	magnetická rezonanční spektroskopie
MS	hmotnostní spektrometrie (z angl. „Mass Spectrometry“)
nanoESI	ionizace nanoelektrosprejem
NF- κ B	jaderný faktor kappa B (z angl. „Nuclear Factor Kappa B“)
NRF2	jaderný transkripční faktor odvozený od erytroidů (z angl. „Nuclear Factor Erythroid 2-related Factor 2“)
p53	protein p53
PCR	polymerázová řetězová reakce (z angl. „Polymerase Chain Reaction“)
PET	pozitronová emisní tomografie
pI	izoelektrický bod
POMP	protein vyzrávání proteazomu (z angl. „Proteasome Maturation Protein“)
RNA	ribonukleová kyselina
RPL29	ribosomální protein 29 (z angl. „Ribosomal Protein 29“)
RTG	rentgen
RT-qPCR	reverzní transkriptázová kvantitativní polymerázová řetězová reakce (z angl. „Reverse Transcription Quantitative Real-time PCR“)

SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfát-polyakrylamidová gelová elektroforéza
SERPA	sérologická proteomová analýza (z angl. „Serological Proteome Analysis“)
SMM	doutnající mnohočetný myelom (z angl. „Smoldering Multiple Myeloma“)
SSC	boční rozptyl (z angl. „Side Scatter“)
TOF	analyzátor doby letu (z angl. „Time of Flight“)
TP53	tumor supresorový gen pro protein p53 (z angl. „Tumor Protein p53“)
Tx	transplantace (kmenových krvetvorných buněk)
TTx	tandemová transplantace (kmenových krvetvorných buněk)
US FDA	americký Úřad pro kontrolu potravin a léčiv (z angl. „United States Food and Drug Administration“)
WBC	bílé krvinky (z angl. „White Blood Cells“)

ÚVOD

Mnohočetný myelom je maligní nádorové onemocnění kostní dřeně, které je typické proliferací a akumulací klonálně změněných plazmatických buněk, tzv. myelomových buněk, jež produkují monoklonální imunoglobulin. Patří mezi nejčastější onemocnění krevetvorby, přičemž bývá diagnostikován převážně u starších osob. Podle Ústavu zdravotnických informací a statistiky se u nás s mnohočetným myelomem léčí přibližně 4000 pacientů a každý rok jich přibývá kolem 500. Projevuje se zejména dlouhotrvajícími bolestmi kostí, postižením ledvin, hyperkalcémií a anémií. Příčina propuknutí tohoto onemocnění není doposud známa a mnohočetný myelom je v současnosti dostupnými prostředky stále onemocněním nevyléčitelným. Velkou nadějí však přináší výzkum nových diagnostických i léčebných postupů, který jde značným tempem neustále kupředu a v posledních letech zaznamenává obrovský pokrok. Včasné stanovení diagnózy je pro pacienty s mnohočetným myelomem klíčové a je známo, že účinná léčba jim může pomoci prožít řadu let plnohodnotného života.

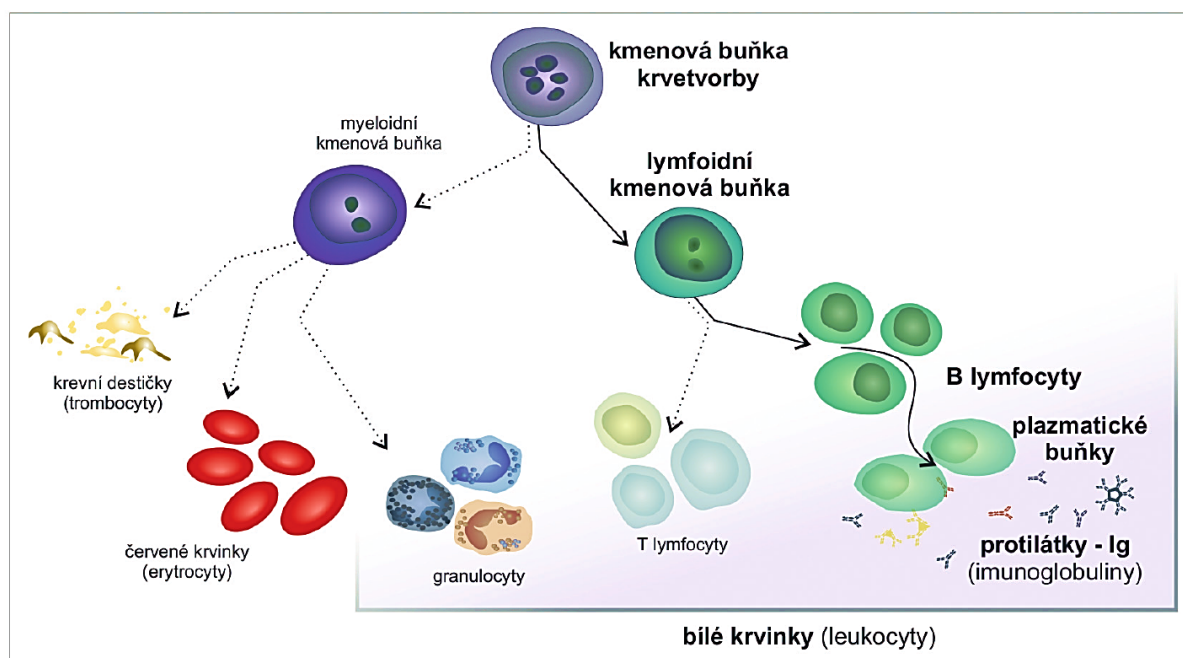
Onemocnění mnohočetný myelom je zrádné v tom, že mnohdy nastupuje plíživě, postupně nabírá na intenzitě a jeho průběh a zejména odpověď na léčbu je velmi individuální. Většina pacientů na ni zareaguje dobře a dostane se do období dlouhodobé remise, kdy částečně nebo úplně vymizí laboratorní známky a klinické příznaky nemoci, u některých pacientů ovšem odezva na léčbu tak příznivá není. Proč je tomu tak je stále předmětem bádání. Téměř u všech pacientů s mnohočetným myelomem však dříve či později nakonec dochází k relapsu onemocnění, tedy k opětovnému objevení příznaků a aktivity nemoci.

Průběh onemocnění i účinnost léčby jednoznačně významně ovlivňuje imunitní systém. Ten totiž udržuje nad děním v organismu imunitní dozor a může nádorový proces úspěšně potlačovat, například díky autoreaktivitě namířené proti nádorovým buňkám, které často exprimují specifické proteiny. A právě takové molekuly, které jsou specifické pro nádorové buňky, jsou objektem zájmu a v dnešní době předmětem intenzivního výzkumu, neboť mohou být potenciálními biomarkery pro diagnostiku a cílovými strukturami pro léčbu. Výskyt celé řady autoprotilátok je dáván do souvislosti s příznivou prognózou onemocnění, a tak se jejich studium a identifikace, stejně tak jako struktur, proti nimž jsou namířeny, zdá být správným výzkumným směrem. Mezi takové autoprotilátky patří i autoprotilátky namířené proti enzymům enoláza 1 a karbonická anhydráza 1, jež jsou v této diplomové práci zmiňovány.

1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Mnohočetný myelom

Mnohočetný myelom (neboli Kahlerova nemoc) je krevní nádorové onemocnění vznikající na základě maligní transformace plazmatických buněk [1]. Plazmatické buňky (též plazmocyty) jsou diferencované B-lymfocyty, jejichž úkolem je produkce protilátek nezbytných pro obranyschopnost organismu (viz Obrázek 1). V důsledku tohoto onemocnění však dochází ke klonální expanzi maligně transformovaných plazmatických buněk (myelomových buněk), které jednak infiltrují kostní dřeň, a zároveň produkují nepotřebný monoklonální imunoglobulin (M-protein, M-komponenta, paraprotein) namísto potřebných funkčních protilátek [2]. „Název onemocnění je odvozen podle názvosloví nádorů, které zavedl Virchow – složenina od názvu tkáně, ze které nádor vyrůstá: myelé (latinsky dřeň) a -om je přípona pro nádor a protože v době diagnózy je většinou postižení již na více místech skeletu, odtud název mnohočetný“ [3, s. 26].



Obrázek 1 – Schéma vývoje základních typů krevních buněk [4]

Jedná se o druhou nejčastější hematologickou malignitu (po ne-Hodgkinových lymfomech) – tvoří 10 % ze všech nádorových onemocnění krve a současně 1 % ze všech onkologických onemocnění [5; 6]. Incidence mnohočetného myelomu v České republice se v letech

2016–2018 pohybovala v počtu 5,3–6,1 případů/100 000 obyvatel. V Evropě se každý rok objeví více než 40 000 nových případů. Postihuje zejména populaci vyššího věku v rozmezí 60–84 let, přičemž se vyskytuje o něco častěji u mužů než u žen [7].

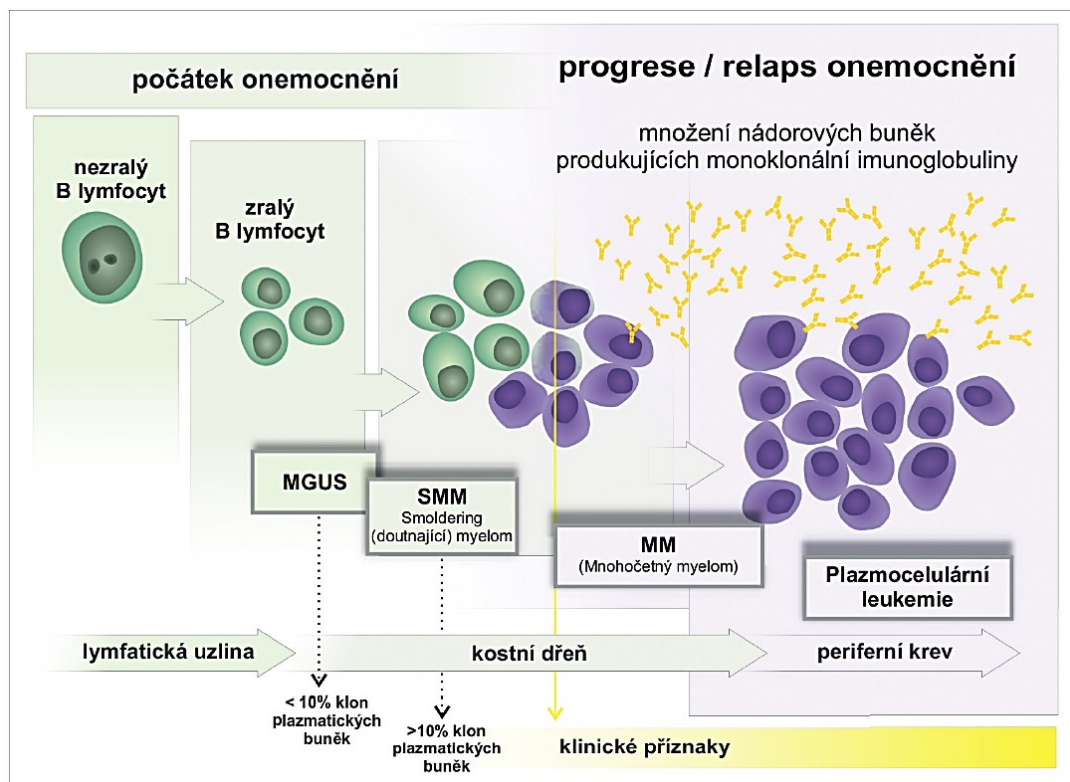
1.1.1 Patogeneze onemocnění

Konečným vývojovým stadiem B lymfocytární větve jsou plazmatické buňky secernující molekuly imunoglobulinů rozlišované do pěti tříd. Za fyziologických okolností plazmatické buňky vytvářejí jednotlivé třídy protilátek (IgA, IgD, IgE, IgG, IgM) podle momentální potřeby organismu, neboť každá z nich zastupuje v rámci imunitního systému svou funkci [8].

Mnohočetný myelom ovšem spadá do skupiny onemocnění nazývaných maligní monoklonální gamapatie. Za tohoto patologického stavu abnormální plazmatické buňky (myelomové buňky) produkují homogenní imunoglobuliny náležející vždy jen k jedné z imunoglobulinových tříd (nejčastěji IgG, dále IgA, vzácně IgD a IgE) [8]. Pokud vznikají pouze protilátky třídy IgM, jedná se o tzv. Waldenströmovu makroglobulinémii (monoklonální gamapatii typu IgM) [9]. V některých případech však nemusí docházet k distribuci kompletního imunoglobulinu, ale pouze jeho částí – lehkých (kappa či lambda), nebo mnohem vzácněji těžkých řetězců. Myelomové buňky jsou, na rozdíl od normálních plazmocytů, které průběžně prolifерují a poté i zanikají, prakticky nesmrtelné, následkem čehož se hromadí v kostní dřeni, brzdí tvorbu funkčních polyklonálních protilátek a zodpovídají za projevy spjaté s tímto onemocněním [4].

Zjednodušeně lze říct, že mnohočetný myelom vzniká, vymkne-li se vývoj plazmatických buněk kontrolním mechanismům. Ve skutečnosti je ale patogeneze mnohočetného myelomu velmi spletitý multifaktoriální proces sahající až k molekulární úrovni. Klíčovou roli hrají nejen chromozomální aberace (především translokace a hyperdiploidie), k nimž dochází v důsledku chyb nastávajících během vývoje B-lymfocytů, ale také mutace týkající se onkogenních drah a nádorových supresorů, mikroprostředí kostní dřene (stromální buňky kostní dřene, mezenchymální kmenové buňky, endoteliální buňky, buňky imunitního systému a řada solubilních faktorů) a epigenetické změny [10]. Vzhledem k tomu, že patogeneze mnohočetného myelomu je značně komplexní děj, nebyla doposud zcela objasněna a nadále zůstává předmětem výzkumů. Pochopení těchto mechanismů je totiž zcela zásadní zejména pro rozvoj nových terapeutických strategií [11].

Propuknutí mnohočetného myelomu předchází monoklonální gamapatie nejasného významu (MGUS, z angl. „Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance“) a doutnající myelom (SMM, z angl. „Smoldering Multiple Myeloma“) (viz Obrázek 2) [10]. MGUS se projevuje přítomností paraproteinu v krvi a případně i v moči, nicméně jeho výskyt nezpůsobuje žádné zdravotní obtíže. Doutnající myelom je již typický tím, že se v kostní dřeni nachází více než 10 % klonálních plazmatických buněk a/nebo koncentrace paraproteinu dosahuje hodnot vyšších než 30 g/l, přesto stále nebývají přítomny zdravotní obtíže. V plazmocelulární leukemii pak mnohočetný myelom přechází, jakmile maligní klon plazmatických buněk přestane být soustředěn pouze v kostní dřeni a začne se vyplavovat do periferní krve [4].



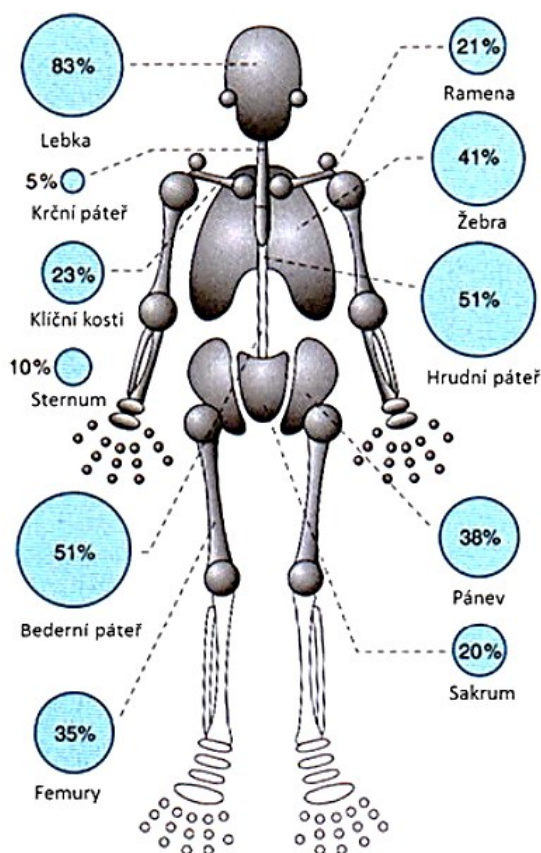
Obrázek 2 – Vzájemná souvislost onemocnění patřících mezi tzv. monoklonální gamapatie [4]

1.1.2 Symptomy

Klinické projevy doprovázející mnohočetný myelom jsou následkem infiltrace kostní dřene maligními plazmatickými buňkami, a protože jsou velice rozmanité, bývá mnohočetný myelom mnohdy přirovnáván k chameleonovi [12]. Pro označení nejčastějších symptomů se vžil

akronym CRAB, kdy C = hyperCalcemia (hyperkalcémie), R = Renal failure (renální postižení), A = Anemia (anémie) a B = Bone marrow (kostní postižení) [13].

Nejnápadnějším a zároveň nejčasnějším příznakem bývá bolest kostí obvykle v oblasti bederní a hrudní páteře, ale může být pocíťována i v dalších lokalitách kostry (viz Obrázek 3). Zpočátku se objevuje pouze po námaze, postupem času však její intenzita stoupá, přichází i v klidové fázi, až nakonec přetrvává též v průběhu noci [4]. Příčina těchto bolestí tkví v tom, že myelomové buňky interagují s mikroprostředím kostní dřeně a dávají podnět k aktivaci osteoklastů (buněk odbourávajících kostní hmotu) a naopak k potlačení aktivity osteoblastů (buněk syntetizujících kostní hmotu), což vyústí v odbourávání kostní tkáně a ve vznik osteolytických ložisek nebo rozvoj osteoporózy [11]. Osteolytická ložiska jsou dutiny nacházející se hlavně v oblasti páteře, v pánevních kostech, žebrech a lebce, které v místě svého výskytu kost oslabují, a mají tak na svědomí typické patologické fraktury [4]. Označení myelom tedy není náhodné, neboť pochází z řečtiny a znamená otvor v kosti [14]. Vytvářejí se tam, kde se myelomové buňky shlukují. Pokud jsou myelomové buňky v kostře difúzně rozptýleny, vede to k osteoporóze, kdy se kosti stávají křehkými a též hrozí kostní zlomeniny [4].



Obrázek 3 – Frekvence postižení jednotlivých částí kostry u mnohočetného myelomu dle RTG nálezů [15]

S odbouráváním kostní hmoty má přímou souvislost hyperkalcémie. Při tomto odbourávání se totiž vápník, základní stavební kámen kostí, uvolňuje a jeho hladina v krevním oběhu stoupá nad normu [16]. To s sebou nese mnohá úskalí v podobě polyurie vedoucí k dehydrataci, žíznivosti, zácpy, odporu k jídlu, zvracení, svalové slabosti a svalových křečích, srdeční arytmie, únavy, zmatenosti až poruchy vědomí [4; 12]. Hyperkalcémii navíc lze považovat za špatný prognostický marker – je spojována s vyšší mortalitou a kratší dobou přežití pacientů s mnohočetným myelomem [17].

Neméně závažnou komplikací je renální insuficience. Způsobovat ji mohou volné lehké řetězce imunoglobulinů, které jsou díky své malé velikosti schopny proniknout z krve přes glomerulární membránu do ledvinných kanálků, kde se kumulují a společně s Tamm-Horsfallovým proteinem tvoří válce, čímž tubuly blokuje [4]. Dalšími možnými příčinami poškození funkce ledvin jsou již zmiňovaná hyperkalcémie, hyperurikémie, časté bakteriální infekce, které jsou projevem oslabeného imunitního systému, nebo amyloidóza [18].

S mnohočetným myelomem se pojí také řada hematologických symptomů. Nekontrolovaná proliferace maligních plazmatických buněk v kostní dřeni má dopad na krvetvorbu. Projevuje se běžně nejprve poklesem erytrocytů, následuje ovšem pokles leukocytů a později i trombocytů. K anémii se tak s rozvojem nemoci přidává leukopenie a trombocytopenie, až se postupně vyvine pancytopenie, kdy se v krvi sníží množství všech krevních buněk [19]. Anémie způsobuje obtíže jako je bolest hlavy, únava, malátnost a dušnost, v důsledku leukopenie vzrůstá náchylnost k infekcím a trombocytopenie zapříčiňuje zvýšenou krvácivost manifestující se v podobě petechií, zvýšené tvorby hematomů, epistaxe a krvácení z dásní [4]. Závažnou komplikací jsou také trombocytopenie vedoucí k abnormální koagulaci. Lehké řetězce imunoglobulinů totiž mohou adherovat na povrch trombocytů, a tím ovlivňovat jejich agregaci. Pacienti s mnohočetným myelomem tak mají zvýšený sklon k tvorbě trombů a výskyt tromboembolických příhod je u nich vyšší než u zdravých jedinců, pro což svědčí i zvýšené koncentrace D-dimerů v krvi pacientů s mnohočetným myelomem [20]. Koagulační mechanismy jsou v jejich případě zásadně ovlivněny krevní hyperviskozitou, která je dána jednak přítomností nadměrného množství sérového paraproteinu, ale také jeho vlastnostmi (agregací a kryoprecipitací). Jde o tzv. hyperviskózní syndrom, jenž se, pro své fatální komplikace, řadí mezi akutní hematologické stavy. Následkem hyperviskozity krve dochází ke zpomalení krevního toku a následně k hypoperfuzi tkání, která je podnětem pro neurologické a psychické potíže, cévní mozkovou příhodu, srdeční a respirační selhávání i ischemickou akutní tubulární nekrózu [21]. Hyperviskozita je patrná též na očním pozadí, kde bývá

shledáván jako typický nález tzv. *fundus paraproteinemicus*. Jedná se o to, že cévy v této oblasti oka dilatují a objevuje se drobné krvácení, které bývá pozorováno při oftalmologickém vyšetření [22].

V neposlední řadě je pro mnohočetný myelom typická vysoká náchylnost k infekcím. Ty postihují hlavně dýchací cesty, a navíc bývají často recidivující. Děje se tak, protože myelomové buňky působí útlum fyziologických plazmatických buněk, čímž vážně tvorba funkčních protilátek, jichž je následkem toho značný nedostatek [4]. S nedostatečným množstvím a nefunkčností lymfocytů pak souvisí i insuficientní odpověď pacientů s mnohočetným myelomem na očkování – odpovídají na něj hůře nebo dokonce vůbec. Přesto je vakcinace zejména proti chřipce, pneumokokovým nákazám a onemocnění covid-19 těmto pacientům doporučována, a to ještě před zahájením onkologické léčby [23].

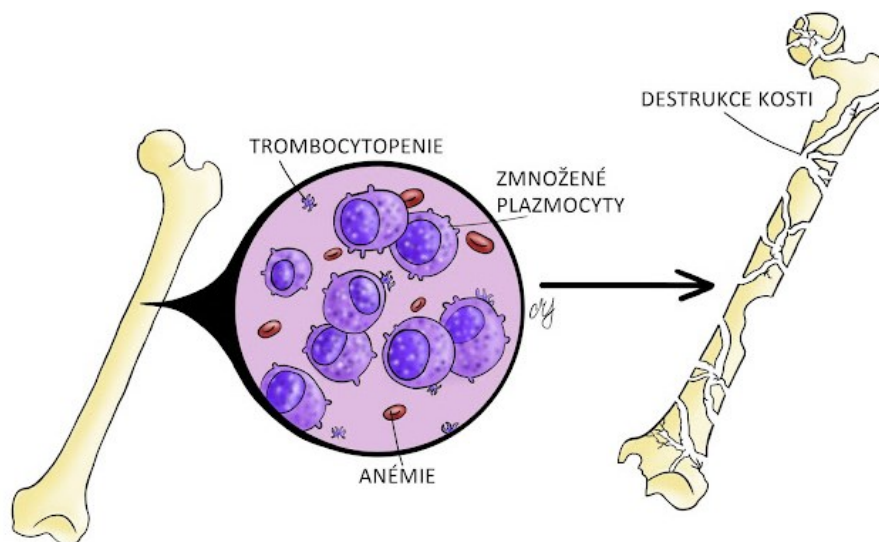
1.1.3 Laboratorní diagnostika

K diagnóze mnohočetného myelomu mohou lékaře nasměrovat již základní laboratorní vyšetření krve. Prvotními signály bývají zvýšená sedimentace erytrocytů, anémie, zvýšená hodnota celkové bílkoviny a zvýšené hodnoty kreatininu v séru. V případě, že vzejde podezření na toto onemocnění, je pro potvrzení či vyvrácení nezbytné provést další laboratorní vyšetření – stanovení monoklonálního imunoglobulinu v séru i v moči a vyšetření kostní dřeně. Pro finální stanovení diagnózy jsou nepostradatelné nejen laboratorní výsledky, ale také výsledky vyšetření pomocí zobrazovacích metod – rentgenu (RTG), počítačové tomografie (CT, z angl. „Computed Tomography“), magnetické rezonance (MR) a pozitronové emisní tomografie (PET). Laboratorní diagnostika je však nezbytná nejen pro stanovení diagnózy, ale i pro monitorování účinnosti terapeutických postupů [4].

Hematologická vyšetření

Nejběžnějším hematologickým vyšetřením je krevní obraz, v němž bývá zjištěna nejčastěji normochromní anémie a mnohdy i trombocytopenie a leukopenie (viz Obrázek 4), což poukazuje na možnou infiltraci kostní dřeně myelomovými buňkami (podrobněji rozepsáno v kapitole 1.2 Myelomové buňky). Dále se provádí sedimentace erytrocytů, která bývá velmi vysoká, protože výskyt paraproteinu způsobuje zvýšenou viskozitu plazmy, a erytrocyty tak sedimentují pomaleji [4]. Sedimentace erytrocytů je však v současnosti zejména v ordinacích praktických lékařů nahrazována vyšetřením CRP (C-reaktivního proteinu), jehož provedení je

rychlejší a jednodušší, což je v diagnostice mnohočetného myelomu velký problém. Zánětlivé markery včetně CRP jsou totiž leckdy v normě, přestože sedimentace je vysoká a možnosti, že by se mohlo jednat o mnohočetný myelom, není věnována pozornost [24]. Opomínáno by nemělo být ani základní koagulační vyšetření, které může odhalit hypokoagulaci i hyperkoagulaci, a to se eventuálně doplňuje o základní funkční vyšetření trombocytů (vyšetření jejich agregace) [25].



Obrázek 4 – Zmnožení myelomových buněk v kostní dřeni [26]

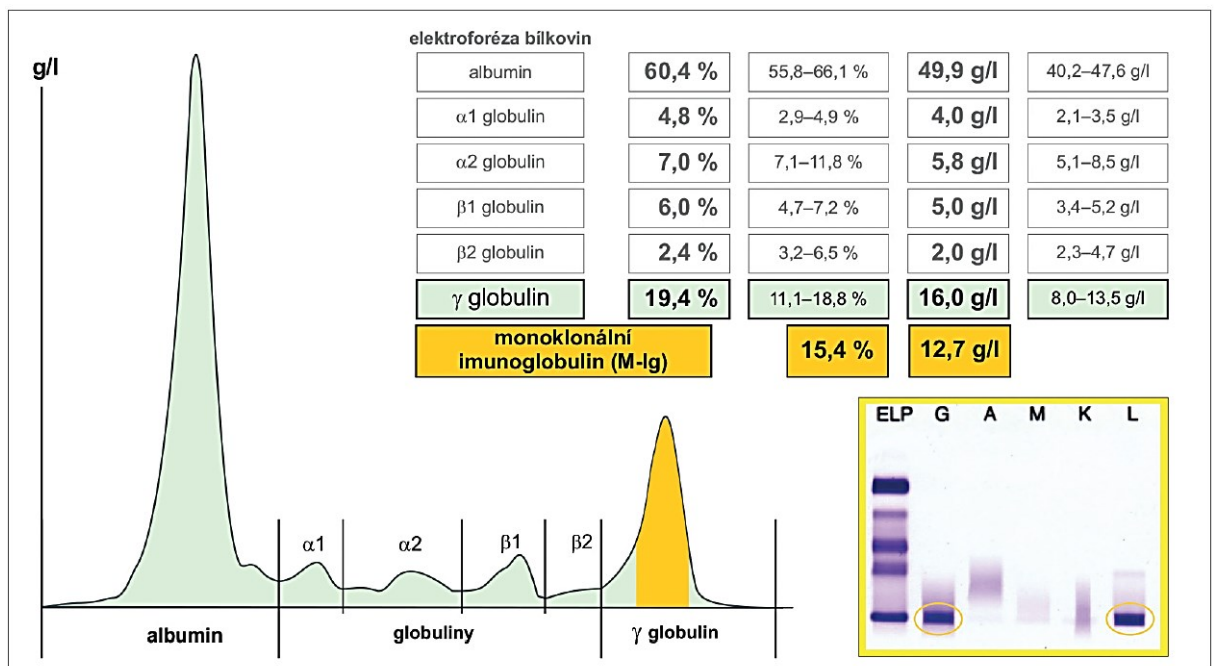
Základní biochemická vyšetření

V rámci základního biochemického vyšetření se stanovuje urea, kreatinin, kyselina močová, vápník, ionizovaný vápník, sodík, draslík, chloridy, fosfáty, bilirubin, jaterní enzymy, glykémie, LDH (laktátdehydrogenáza), CRP, sérová koncentrace celkové bílkoviny a albuminu, kvantitativní proteinurie ze sběru moči za 24 hodin a kreatininová clearance [25]. Kontroluje se tak především hyperkalcémie, která je pro mnohočetný myelom charakteristická, hladina albuminu, jež při nemoci klesá, a zhoršená funkce ledvin signalizující myelomovou ledvinu [4; 27].

Specializovaná vyšetření bílkovin

Specializované vyšetření bílkovin zahrnuje elektroforézu bílkovin séra a zahuštěné moči s následnou imunofixací (viz Obrázek 5). Elektroforézou s denzitometrickým vyhodnocením se nejprve určí množství monoklonálního imunoglobulinu (M-proteinu) a metodou

imunofixace poté jeho typ [25]. Aby bylo možné přesně zhodnotit množství monoklonálního imunoglobulinu v moči, musí pacient sbírat moč po dobu 24 hodin, přičemž jeho koncentrace se pak udává nejen v gramech na litr, ale i v gramech za 24 hodin, což je považováno za důležitější údaj [4]. Volné lehké řetězce detekované v moči nesou označení Bence-Jonesova bílkovina. Pokud v séru nacházíme pouze volné lehké řetězce imunoglobulinů nebo jsou v něm monoklonální imunoglobuliny přítomny v nízké koncentraci, využívá se též metoda stanovení volných lehkých řetězců v séru založená na imunoturbidimetrii [25].



Obrázek 5 – Elektroforéza sérových bílkovin, stanovení koncentrace M-Ig a imunofixace s IgG-kappa [4]

Vyšetření kostní dřeně

Pro potvrzení diagnózy mnohočetného myelomu je nepostradatelné vyšetření kostní dřeně, ve které se zjišťuje přítomnost monoklonálních plazmatických buněk. Těch by se v případě onemocnění mělo v kostní dřeni vyskytovat více než 10 % a (nebo) by měl být prokázán plazmocytom [25]. Kostní dřeň se odebírá buď punkcí z hrudní kosti, nebo z lopaty kosti kyčelní, nebo se provádí trepanobiopsie z lopaty kosti kyčelní. Výhoda trepanobiopsie spočívá v tom, že kromě odběru buněk kostní dřeně k cytologickému vyšetření umožňuje odebrat i váleček kostní dřeně, který lze využít k histologickému vyšetření [4].

Cytogenetická vyšetření

Svůj význam má u pacientů s mnohočetným myelomem i cytogenetické vyšetření. Provádí se karyotypizace a analýza FISH (fluorescenční in-situ hybridizace) [25]. Cytogenetické abnormality totiž mají vliv na různé aspekty od vývoje malignity a jejího klinického projevu až po odpověď na léčbu, a zvláště pak na prognózu onemocnění. Rozlišují se cytogenetické abnormality primární, u nichž se předpokládá, že hrají roli v počáteční patogenezi onemocnění a na základě nichž se monoklonální gamapatie nejasného významu a mnohočetný myelom rozdělují do několika různých podtypů, a sekundární, jež se mohou vyskytovat u kteréhokoli z těchto podtypů [28]. Obvyklými nálezy jsou trizomie lichých chromozomů s výjimkou chromozomů 1, 13 a 21; translokace: t(4;14), t(6;14), t(11;14), t(14;16), t(14;20); delece: del(1p), del(13p), del(17p); amplifikace: amp(1q) a mutace genu TP53, s nímž je spojeno poškození p53 [28; 29].

1.1.4 Diagnostická kritéria

Stanovení diagnózy mnohočetného myelomu se opírá o diagnostická kritéria dle Durieho a Salmona z roku 1975 (viz Tabulka 1), podle nichž se stanovuje i klinické stádium nemoci, a diagnostická kritéria dle International Myeloma Working Group z roku 2003 (viz Tabulka 2), která byla v roce 2014 aktualizována (viz Tabulka 3) především z důvodu pokroku v léčbě mnohočetného myelomu [25].

Tabulka 1 – Diagnostická kritéria mnohočetného myelomu dle Durieho a Salmona, 1975 [30]

Velká kritéria	Malá 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): <ul style="list-style-type: none">• 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) <ul style="list-style-type: none">• IgM < 0,5 g/l• IgA < 1,0 g/l• IgG < 6,0 g/l
Diagnóza mnohočetného myelomu je jasná, je-li přítomno jedno velké a jedno malé kritérium, anebo jsou-li přítomna kritéria a + b a dále kritérium c nebo d.	

Tabulka 2 – Stanovení klinického stadia mnohočetného myelomu dle Durieho a Salmona, 1975 [25]

I. stadium	Jsou splněny všechny níže uvedené podmínky: <ul style="list-style-type: none"> • koncentrace Hb > 100 g/l • koncentrace Ca < 3 mmol/l • normální kostní struktura anebo solitární kostní ložisko plazmocytomu • relativně nízká koncentrace M-Ig: <ul style="list-style-type: none"> a) M-IgG < 50 g/l b) M-IgA < 30 g/l c) exkrece lehkých řetězců v moči < 4 g/24 hodin. 	Masa nádorových buněk: < $0,6 \times 10^{12}/m^2$
II. stadium	Nejsou splněny podmínky I. ani III. stadia.	$0,6-1,2 \times 10^{12}/m^2$
III. stadium	Je splněna alespoň jedna z následujících podmínek: <ul style="list-style-type: none"> • koncentrace hemoglobinu < 85 g/l • zvýšená koncentrace Ca > 3 mmol/l • pokročilé postižení skeletu s mnohočetnými osteolytickými ložisky a/nebo zlomeninami • vysoké koncentrace M-Ig: <ul style="list-style-type: none"> a) M-IgG > 70 g/l b) M-IgA > 50 g/l c) vyloučení > 12 g lehkých řetězců v moči za 24 hodin. 	> $1,2 \times 10^{12}/m^2$
Subklasifikace: A – kreatinin < 177 μ mol/l (2 mg/ml) B – renální insuficience s retencí dusíkatých látek, kreatinin > 177 μ mol/l		

Tabulka 3 – Diagnostická kritéria mnohočetného myelomu dle International Myeloma Working Group, 2003 [30]

<p>Pro diagnózu mnohočetného myelomu je nutno splnit všechna tři kritéria:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Počet monoklonálních plazmatických buněk v kostní dřeni je > 10 % a (nebo) biopsie kostní dřene prokázala plazmocytom. 2. Je přítomen monoklonální imunoglobulin v krvi a (nebo) v moči. 3. Je přítomna nejméně jedna dysfunkce či poškození orgánu způsobené mnohočetným myelomem: <ul style="list-style-type: none"> • (C – <i>calcium</i>) zvýšená hladina kalcemie nad 2,8 mmol/l či nad horní limit • (R – <i>renal</i>) renální insuficience s kreatininem nad 176,8 mmol/l (2 mg/l) • (A – <i>anemia</i>) anémie, hemoglobin pod 100 g/l nebo 20 g/l pod dolní limit normy • (B – <i>bone</i>) osteolytické kostní destrukce nebo osteoporóza <p>Poznámka: Tato kritéria identifikují stadium IB, II a III A i B dle Durieho a Salmona. Stadium IA je těmito kritérii řazeno do doutnajícího či indolentního myelomu. Četné jiné typy orgánového poškození se výjimečně mohou objevit a představovat tak indikaci k léčbě. V případě, že je prokázána souvislost s mnohočetným myelomem (gamapatií), vedou také ke stanovení diagnózy mnohočetného myelomu.</p>
--

Tabulka 4 – Revidovaná diagnostická kritéria mnohočetného myelomu dle International Myeloma Working Group, 2014 [25]

<p>Počet klonálních plazmatických buněk v kostní dřeni $\geq 10\%$ nebo biopticky potvrzený kostní nebo extramedulární plazmocytom a přítomnost jedné nebo více následujících skutečností s myelomem souvisejících (MDE = „myeloma defining events“):</p> <ul style="list-style-type: none">○ známky poškození orgánů nebo tkání podmíněné proliferací plazmatických buněk, zejména:<ul style="list-style-type: none">• hyperkalcemie: koncentrace sérového Ca o > 25 mmol/l (1 mg/dl) vyšší než horní limit normálního rozmezí nebo $> 2,75$ mmol/l (11 mg/dl)• renální insuficience: snížení clearance kreatininu < 40 ml/min (= 0,67 ml/s) nebo koncentrace sérového kreatininu > 177 μmol/l (2 mg/dl)• anémie: koncentrace hemoglobinu o > 20 g/l nižší než dolní limit normálního rozmezí nebo < 100 g/l• kostní postižení: jedno nebo více osteolytických ložisek na RTG skeletu, CT nebo CT/PET²
<ul style="list-style-type: none">○ jedna nebo více z následujících známek maligního procesu:<ul style="list-style-type: none">• zmnožení klonálních plazmatických buněk v kostní dřeni $\geq 60\%$¹• poměr postižených/nepostiženým volným řetězcům v séru $\geq 10\%$³• > 1 ložisko při vyšetření pomocí MR⁴
<p>¹Klonalita by měla být stanovena pomocí průkazu κ/λ restrikce lehkých řetězců při vyšetření pomocí průtokové cytometrie, imunohistochemie nebo imunofluorescence, počet plazmatických buněk by měl být přednostně stanoven z biapie kostní dřene. V případě rozdílu v procentuálním zastoupení plazmatických buněk zjištěném v aspirátu a bioptickém vzorku by měla být použita vyšší hodnota.</p> <p>²Pokud je počet klonálních plazmatických buněk v kostní dřeni $< 10\%$, pak je nutná přítomnost více než jednoho ložiska k odlišení od solitárního plazmocytomu s minimálním postižením kostní dřene.</p> <p>³Při použití stanovení pomocí metody Freelite© (The Binding Site, Birmingham, UK).</p> <p>⁴Velikost ložiska musí být minimálně 5 mm.</p>

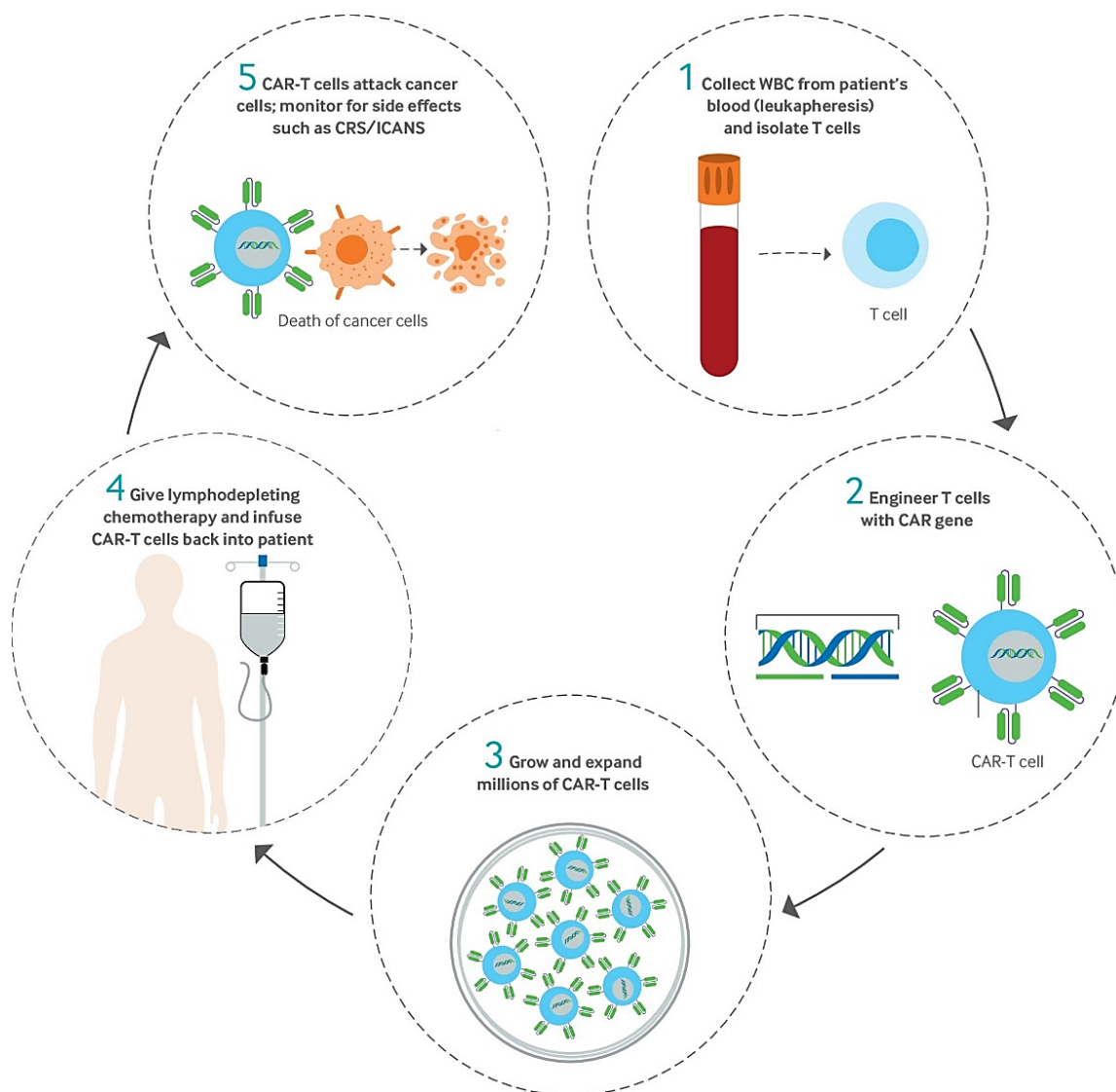
1.1.5 Terapie onemocnění

Mnohočetný myelom je sice onemocnění nevyléčitelné, nicméně díky rozsáhlé paletě léčiv a neustále se rozvíjejícím léčebným možnostem se daří jeho klinické projevy úspěšně potlačovat a významně tím zlepšovat prognózu pacientů, kteří i s takovou diagnózou mohou již v dnešní době prožít řadu let kvalitního života. Klíčová u mnohočetného myelomu je včasná a správná diagnostika, od níž se zahájení terapie odvíjí [4].

Terapie mnohočetného myelomu je založena na dvou paralelně probíhajících typech léčby – léčbě likvidující myelomové buňky a léčbě podpůrné. Cílem léčby je dosáhnout co největšího snížení počtu myelomových buněk, nejlépe až jejich úplné eliminace (tj. dosažení negativity minimální reziduální nemoci), které povede k odeznění klinických projevů onemocnění [4]. Mezi momentálně používaná terapeutika patří proteazomové inhibitory (bortezomib,

karfilzomib a ixazomib), imunomodulační látky (thalidomid, lenalidomid a pomalidomid), glukokortikoidy, monoklonální protilátky (daratumab, isatuximab, elotuzumab a belantamab mafodotin), cytostatika a bispecifické protilátky [3; 4]. Vzhledem k tomu, že jednotlivá léčiva mají odlišné mechanismy účinku, využívá se zpravidla kombinovaná léčba, neboť bylo prokázáno, že je tak dosaženo vyšší léčebné účinnosti. Léčba takovými preparáty s sebou samozřejmě nese mnohá úskalí v podobě nežádoucích účinků a pacienti jsou po celou dobu jejího trvání sledováni a kontrolováni na základě pravidelných odběrů periferní krve, občasných odběrů kostní dřeně a pomocí zobrazovacích vyšetření. Značná pozornost je dnes věnována novodobé léčebné metodě – CAR-T buněčné terapii (terapie založená na chimérickém antigenním receptoru T-lymfocytů, viz Obrázek 6). Neopomenutelná je též vysokodávkovaná chemoterapie následovaná transplantací kmenových krvetvorných buněk, která je obvykle autologní. Chemoterapie bývá někdy doplňována radioterapií, kdy se vlivem ozařování poškozuje genetická informace v myelomových buňkách, a ty jsou v důsledku toho zničeny [4].

CAR (chimérický antigenní receptor) -T buněčná terapie je forma imunoterapie, při níž se pacientovi pomocí leukaferézy odeberou jeho vlastní T-lymfocyty a jsou v laboratoři geneticky modifikovány tak, aby se na jejich povrchu vytvořil chimérický antigenní receptor, čímž získají schopnost vázat se na specifické antigeny na myelomových buňkách. Takto upravené T-lymfocyty jsou po absolvování chemoterapie vpraveny zpět do krevního oběhu pacienta, kde proliferují, rozpoznávají myelomové buňky a vysílají signály k dalším buňkám imunitního systému, což nakonec vyústí v imunitní reakci, jež vede k masivní likvidaci myelomových buněk [31]. CAR-T buňky jsou zacílené na antigen zrání B lymfocytů (BCMA, z angl. „B-cell Maturation Antigen“), což je povrchový protein, který je exprimován zejména zralými B-lymfocyty a jeho nadměrná exprese je spojována s myelomovými buňkami [32]. V současnosti existují dva produkty CAR technologie schválené US FDA (americký Úřad pro kontrolu potravin a léčiv, z angl. „United States Food and Drug Administration“). Jedná se o idecaptive vicleucel (ide-cel) a ciltacabtagene autoleucel (cilta-cel). Oba jsou schváleny pro léčbu relabujícího/refrakterního myelomu, pokud má pacient za sebou již čtyři nebo více linií terapie včetně vyzkoušení inhibitoru proteazomu, imunomodulačních léčiv a anti-CD38 řízené terapie. Cilta-cel má dva BCMA receptory, z nichž každý váže jiný BCMA epitop, zatímco ide-cel má pouze jednu vazebnou doménu [33].



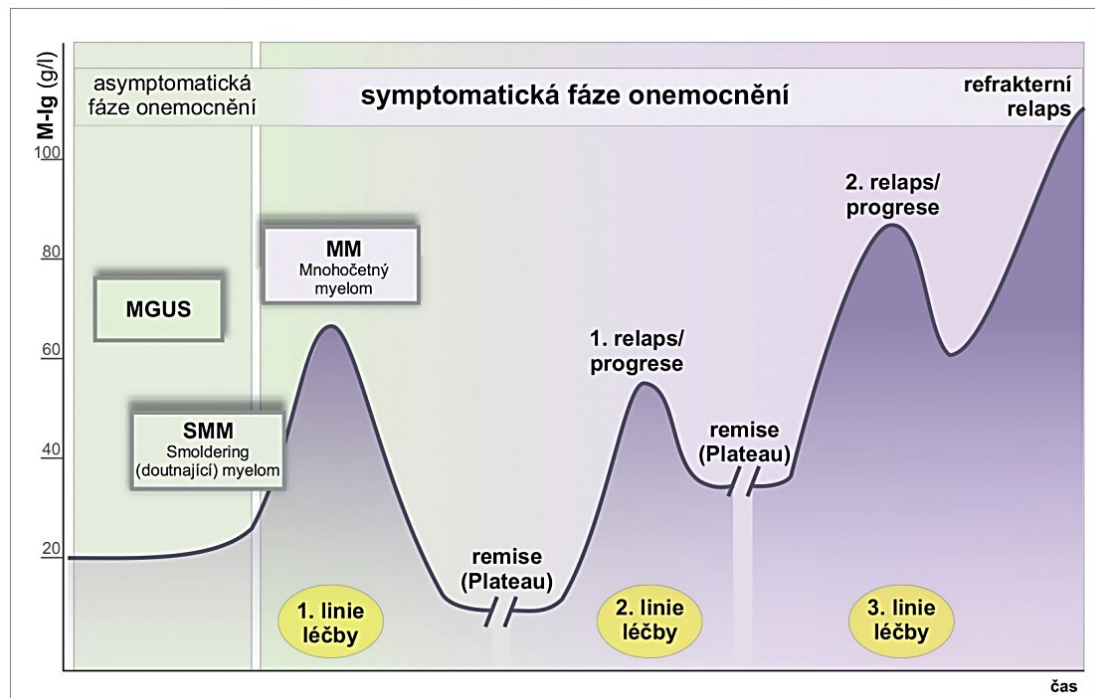
Obrázek 6 – CAR-T buněčná terapie [34]

(1) Pacientovi je odebrána krev (leukaferézou) a jsou izolovány T-lymfocyty. (2) T-lymfocyty jsou geneticky modifikovány tak, aby vznikly CAR-T-lymfocyty. (3) CAR-T-lymfocyty se namnoží. (4) Pacientovi je podávána lymfodepleční chemoterapie a následně infuze CAR-T-lymfocytů. (5) CAR-T-lymfocyty napadají nádorové buňky a likvidují je. Je ovšem potřeba sledovat možné nežádoucí účinky jako je CRS (z angl. „Cytokine Release Syndrome“, syndrom uvolnění cytokinů) a ICANS (z angl. „Immune Effector Cell Associated Neurotoxicity Syndrome“, syndrom neurotoxicity spojené s imunitními efektorovými buňkami).

Prvním krokem při autologní transplantaci je odběr kmenových krvetvorných buněk pacienta, po kterém následuje vysokodávkovaná chemoterapie. Ta ovšem vymytí nejen nádorové myelomové buňky, ale i zdravé krvetvorné buňky, čímž dochází k útlumu kostní dřeně a vyvstává riziko infekčních komplikací. Přesto je však autologní transplantace kmenových krvetvorných buněk velmi přínosnou metodou, jejíž výhodou oproti dlouhodobé kombinované

lčbě je to, že po jejím absolvování pacient podstupuje již pouze nenáročnou udržovací lčbu, která je zatížena jen minimem nežádoucích účinků [35].

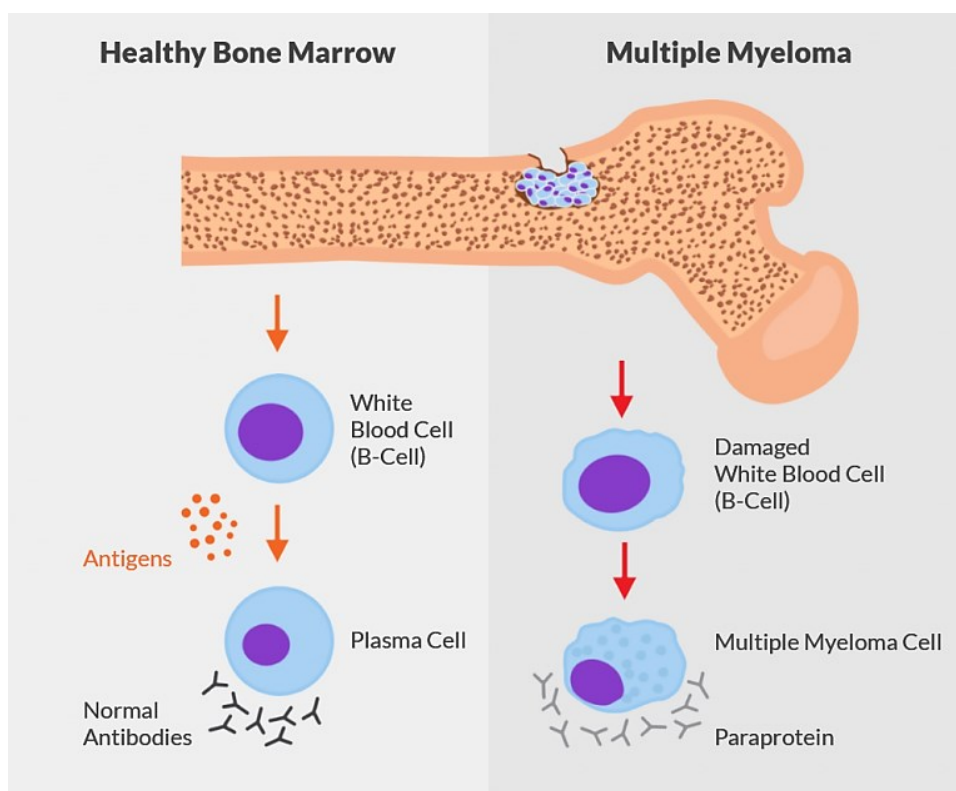
Jestliže pacienti odpovídají na lčbu a podaří se myelomové buňky zredukovat, dostávají se do období remise, tedy období přetrvávající odpovědi na lčbu. Potíž je v tom, že u většiny pacientů po nějaké době onemocnění propukne znovu. Se vzplanutím onemocnění se pojí dva termíny, a to progresse a relaps. Progrese je stav, kdy pacient nezareaguje na lčbu, a nemoc tak postupuje (progreduje). Relaps bývá označován jako znovuzplanutí, které nastane po dosažení kompletní odpovědi na lčbu (kompletní remise). Střídání remise a relapsu je pro mnohočetný myelom typické – jedná se o tzv. vlnovitý průběh mnohočetného myelomu (viz Obrázek 7) [4].



Obrázek 7 – Vlnovitý průběh mnohočetného myelomu [4]

1.2 Myelomové buňky

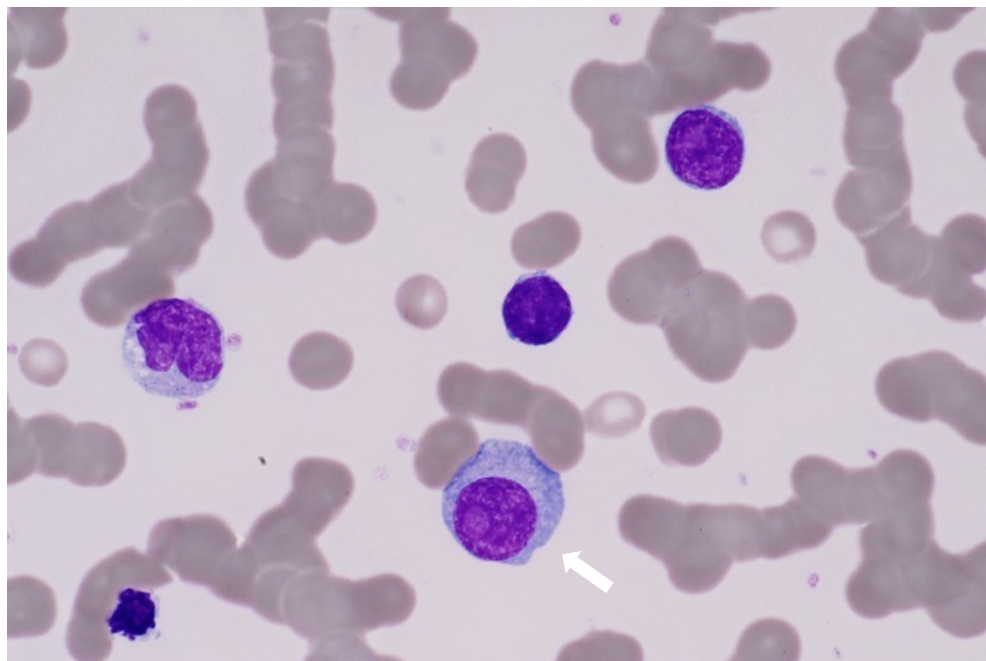
Plazmatické buňky, podílející se na imunitní obraně organismu produkcí protilátek, jsou konečným vývojovým stádiem B-lymfocytů. Za normálních okolností se vyskytují pouze v kostní dřeni, slezině a lymfatických uzlinách. Přítomnost zralých plazmatických buněk v periferní krvi svědčí pro plazmocytární leukemii, která je ovšem poměrně raritní. V periferní krvi je mnohem častější výskyt jim podobných „plazmocytoidních“ lymfocytů (reaktivních B-lymfocytů), jenž poukazuje na patologický stav v podobě probíhající chronické nebo akutní infekční choroby, jaterního onemocnění, revmatismu či dalších systémových onemocnění. Zmnožení plazmatických buněk v kostní dřeni pak nasvědčuje diagnóze mnohočetného myelomu (viz Obrázek 8) [36].



Obrázek 8 – Rozdíl mezi fyziologickými plazmatickými buňkami a myelomovými buňkami [37]

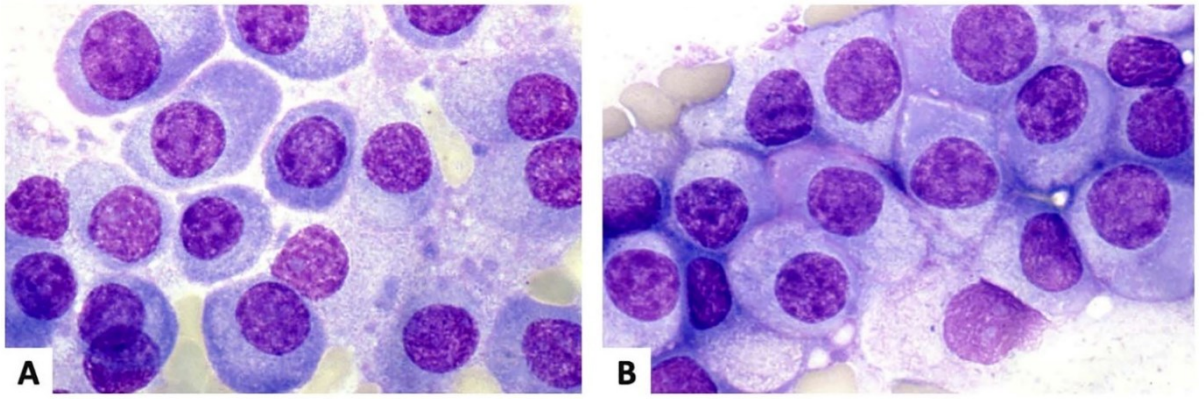
Fyziologické plazmatické buňky mají obvykle oválný tvar a v porovnání s lymfocyty jsou větší – jejich průměr bývá 14–20 μm (viz Obrázek 9). Mají nízký nukleocytoplazmatický poměr. Jádro je zpravidla uloženo excentricky, mívá paprskovitě uspořádaný hutný chromatin (připomíná kolo s loukotěmi) a kolem jádra (v oblasti Golgiho aparátu) bývá zřetelné perinukleární projasnění. Jadérka nebývají patrná. Cytoplazmatický lem je široký a objemný,

modrofialový až tmavomodrý (bazofilní až inkoustový) a někdy v něm bývá přítomna vakuolizace [36]. Pro plazmatické buňky je typická membránová exprese znaků CD19, CD38, CD79a a CD138, naopak znaky CD20 a CD45 plazmatické buňky neexprimují. Na základě toho je možné je odlišit od ostatních buněčných populací, čehož se hojně využívá při jejich detekci i izolaci [38]. Jednotlivé třídy imunoglobulinů produkují v zastoupení IgG > IgA > IgM > IgD a lehké řetězce kappa a lambda v poměru 2–3 : 1 [39].

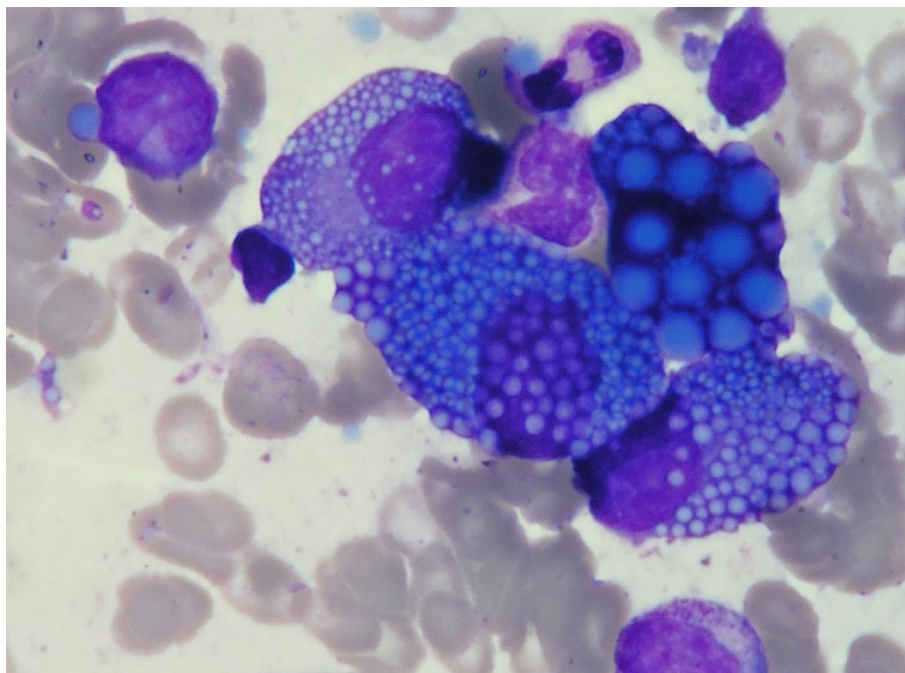


Obrázek 9 – Plazmatická buňka (bílá šipka, upraveno) [40]

Myelomové buňky je označení pro nádorově zvrhlé nekontrolovaně se množící plazmatické buňky produkující monoklonální imunoglobulin a vyskytující se při onemocnění mnohočetný myelom (viz Obrázek 10). Mohou vypadat jako fyziologické plazmatické buňky, avšak mnohdy jsou u nich spatřovány jisté abnormality – zejména neobvyklá velikost (příliš malé/nadměrně velké) a vícejadernost. Vzácněji se objevují Russelova tělíska (eozinofilní cytoplazmatické inkluze), Dutcherova tělíska (intranukleární vakuoly s nahromaděným monoklonálním imunoglobulinem) a Mottovy buňky (hroznovité buňky, jejichž cytoplazma je vyplněna inkluzemi vznikajícími v důsledku nadměrné akumulace imunoglobulinu; viz Obrázek 11) [36; 38].



Obrázek 10 – Myelomové buňky [41]



Obrázek 11 – Mottovy buňky [42]

1.2.1 Vztah myelomových buněk s prognózou onemocnění a účinností terapie

Je prokázáno, že charakter myelomových buněk ovlivňuje prognózu onemocnění i účinnost terapie, nicméně veškeré souvislosti doposud objasněny nejsou. Na proliferaci myelomových buněk, a tím i progresi onemocnění, prognózu a rezistenci k léčbě, má zcela určitě velký vliv imunitní systém a mikroprostředí kostní dřeně. Cílem výzkumů je nejen objasňovat interakce mezi myelomovými buňkami, imunitním systémem a mikroprostředím kostní dřeně, ale také vyhledávat antigeny na myelomových buňkách a zjišťovat jejich expresi, což by mohlo být při určování prognózy onemocnění i predikci účinnosti terapie velmi nápomocné [43].

Mikroprostředí kostní dřeně se skládá z buněčných a nebuněčných složek. Buněčnou složku tvoří různé hematopoetické i nehematopoetické buňky (stromální buňky, endoteliální buňky, osteoklasty a osteoblasty), zatímco nebuněčná složka zahrnuje extracelulární matrix a proteiny (cytokiny, chemokiny a růstové faktory) [44]. Je známo, že například interakce plazmocytoidních dendritických buněk s myelomovými buňkami podporují přežívání myelomových buněk a jejich rezistenci vůči léčbě. Stejně tak supresorové buňky odvozené z myeloidní linie (regulační T-lymfocyty, Th17 lymfocyty, makrofágy asociované s nádory, mezenchymální stromální buňky a osteoklasty) významně přispívají k úniku nádoru před imunitním dozorem a k imunokompromitovanému stavu [45]. Extracelulární matrix je při onemocnění mnohočetným myelomem remodelována tak, aby bylo zajištěno příznivé prostředí pro nádorový růst. V různých fázích onemocnění jsou exprimovány odlišné proteiny extracelulární matrix, a mohou tak představovat potenciální diagnostický i prognostický marker [44].

Ve spojitosti s myelomovými buňkami bývá zmiňována exprese znaků CD27, CD45 a CD56. CD27 se označuje jako antigen diference plasmatických buněk a jeho exprese má podle všeho vliv na progresi onemocnění – nízká exprese koreluje s kratším celkovým přežitím, a značí tak špatnou prognózu. Snížená exprese CD45 je též spojována s kratším přežitím. CD56 se označuje jako antigen kotvící plasmatické buňky ve stromálním prostředí, jedná se o běžně používaný marker pro identifikaci abnormálních plasmatických buněk a uvádí se, že jeho snížená exprese koreluje s přítomností cirkulujících nádorových plasmatických buněk [46].

Cirkulující nádorové buňky jsou nádorové buňky uvolňované z primárního nádoru do krevního oběhu a určují metastatický potenciál solidních nádorů [47]. Bylo ovšem zjištěno, že i při onemocnění mnohočetným myelomem maligní plasmatické buňky vycestovávají z kostní dřeně do krevního oběhu, a stávají se tak diagnostickými a prognostickými biomarkery [44].

Uvádí se, že přítomnost cirkulujících plazmatických buněk vypovídá o agresivním průběhu onemocnění, protože takové buňky mají díky své migrační schopnosti potenciál tvořit metastázy a vyvolávat relaps onemocnění [48]. Analýza cirkulujících plazmocytů v periferní krvi multiparametrickou průtokovou cytometrií by v blízké budoucnosti mohla být výhodnou náhradou za biopsii kostní dřeně, která je poměrně náročnou invazivní metodou [49]. Úskalím biopsie kostní dřeně je i to, že se vzorky obvykle odebírají z jednoho místa. Pro mnohočetný myelom je však mnohdy typický výskyt různých klonů myelomových buněk, které jsou rozprostřeny v odlišných lokalitách kostní dřeně, a některé se dokonce vůbec nevyskytují v kostní dřeni, nýbrž extramedulárně. Z toho plyne, že z jednoho odběru kostní dřeně se nepodaří zjistit informace o všech klonech myelomových buněk. Výzkumy ukázaly, že v periferní krvi se kromě cirkulujících nádorových buněk vyskytují také cirkulující molekuly nukleových kyselin. Informace o molekulárním profilu daného klonu myelomových buněk může být velmi nápomocná a uplatnit se zejména při nastavování léčby. Důvodů, proč je dnes tekuté biopsii věnována taková pozornost, je tedy hned několik – ve srovnání s běžnou biopsií je mnohem dostupnější, šetrnější, méně bolestivá, komplexnější a bylo by možné ji provádět častěji, což by usnadnilo monitorování průběhu onemocnění [50].

Přítomnost myelomových buněk produkujících lehké řetězce lambda je rizikovým faktorem zkracujícím celkovou dobu přežití, naopak myelomové plazmatické buňky produkující lehké řetězce kappa jsou spojovány s delší celkovou dobou přežití. Myelomové buňky produkující lehké řetězce lambda také negativně ovlivňují odpověď na léčbu imunomodulačními léky [45; 51]. Dále jsou v souvislosti s léčbou zkoumány některé CD znaky na myelomových buňkách, a to CD38, CD55, CD59 a CD64. Exprese CD38 koreluje s lepšími výsledky při léčbě daratumumabem, zatímco exprese CD55 a CD59 je dáována do souvislosti s progresí onemocnění a nedostatečnou odpovědí na léčbu. Vysoká exprese CD64 u pacientů s mnohočetným myelomem užívajících bortezomib, thalidomid a dexamethason je spojována s kratší dobou přežití [44].

S účinností léčby pravděpodobně souvisí také exprese mnohých proteinů, mezi něž patří např. haptoglobin, kininogen-1, transferin, sérový amyloid A, plazmatický kallikrein, integrin alfa-11, apolipoprotein A-1, sulfhydryloxidáza-1 a izoforma-1 multimerinu-1. Zvýšený výskyt proteinů spojených se sbalováním proteinů a s funkcí proteazomu, mezi něž se řadí např. protein teplotního šoku (HSP, z angl. „Heat Shock Protein“), a snížený výskyt prozánětlivých a proapoptotických proteinů má souvislost s refrakterní odpovědí na léčbu bortezomibem [44]. Bortezomib je totiž inhibítozem 26S proteazomu a také NF- κ B (jaderný faktor kappa B, z angl.

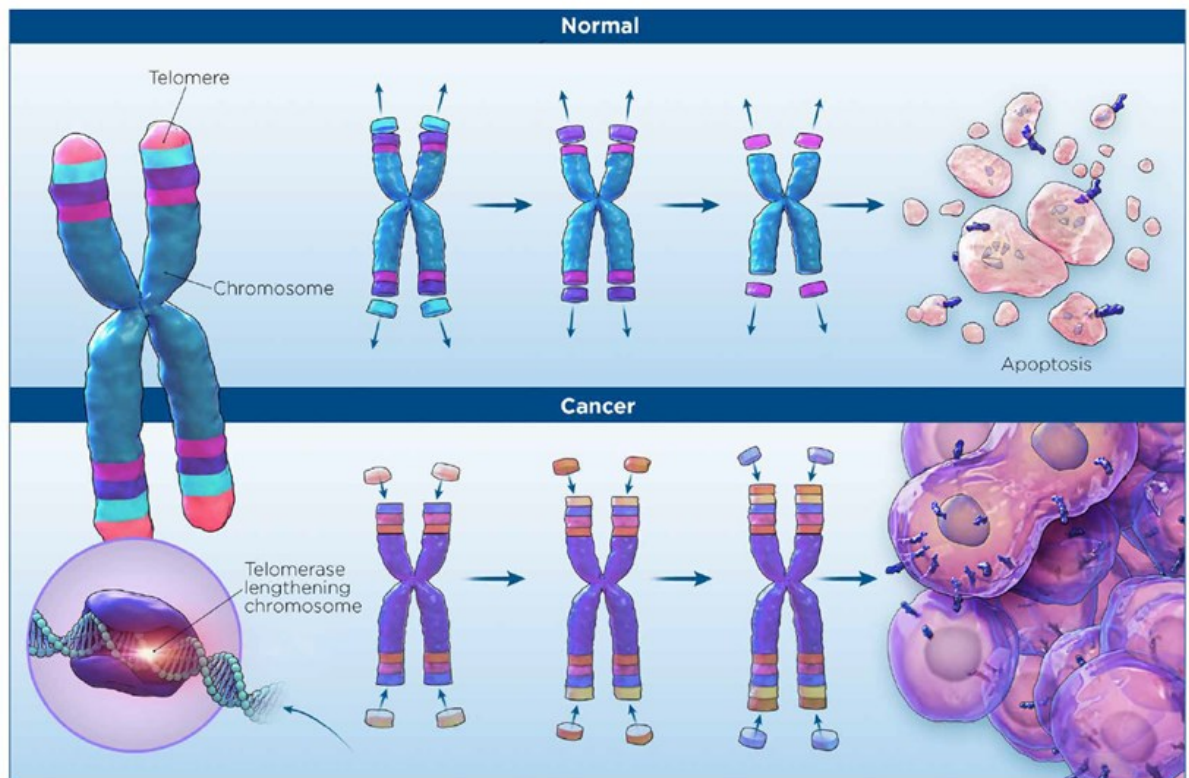
„Nuclear Factor Kappa B“), které hrají klíčovou roli v proliferaci a přežívání myelomových buněk [52].

Zmiňovány jsou také proteiny z rodiny MAF (transkripční faktory muskuloaponeurotického fibrosarkomu, z angl. „Musculoaponeurotic Fibrosarcoma“) – cMAF a MAFB. cMAF je onkogenní transkripční faktor ovlivňující myelomogenezi. Vysoká exprese MAFB je jedním z nejčastějších znaků onkogenního procesu v rámci progresu mnohočetného myelomu, a i ta uděluje rezistenci k proteazomovým inhibitorům včetně bortezomibu. Nízká exprese POMP (protein vyzrání proteazomu, z angl. „Proteasome Maturation Protein“) je spojena s delším celkovým přežitím. Naopak zvýšená exprese POMP je také jedním z mechanismů rezistence vůči proteazomovým inhibitorům. POMP je totiž nezbytný pro *de novo* biogenezi proteazomu. V souvislosti s proteazomovými inhibitory se výzkumy zabývají též NRF2 (jaderný transkripční faktor odvozený od erytroidů, z angl. „Nuclear Factor Erythroid 2-related Factor 2“), který je klíčovým regulátorem přežívání myelomových buněk u pacientů léčených proteazomovými inhibitory. Inhibice NRF2 v kombinaci s léčbou proteazomovými inhibitory významně zvyšuje apoptózu myelomových buněk [52]. Snížený výskyt dalších proteinů, např. amyloidu A a DBP (vitamin D vázající protein, z angl. „Vitamin D Binding Protein“), hraje roli v určování predikce odpovědi pacientů s mnohočetným myelomem na léčbu thalidomidem. Proteomické markery by se taktéž mohly stát užitečnými diagnostickými a prognostickými markery [44].

Za normálních okolností plazmatické buňky vyčkávají v kostní dřeni v klidovém stavu – jejich buněčný cyklus je zastaven ve fázi G0/G1, dokud nepříjde podnět k aktivaci. Při mnohočetném myelomu ovšem myelomové buňky získávají abnormální růstové a proliferační schopnosti. Pro myelomové buňky je také typická hyperaktivace opravných mechanismů DNA, která jim zajišťuje přežití a rezistenci vůči léčbě. Významnou roli u myelomových buněk hrají i telomery a aktivita telomerázy [44].

Telomery jsou nukleoproteinové struktury na koncích chromozomů klíčové pro zajištění chromozomální stability a integrity. Na koncích chromozomových ramen tvoří čepičky, a zabraňují tak degradaci genů a nesprávným opravám DNA v těchto koncových oblastech. Telomeráza je ribonukleoproteinový komplex a bývá nazývána jako enzym nesmrtelnosti (viz Obrázek 12). Má totiž výjimečnou schopnost – v buňkách, v nichž je aktivní, dokáže kompenzovat zkracování telomer. Běžně je aktivita telomerázy přísně regulována a fyziologicky je telomeráza aktivní pouze u vybraných typů buněk (během embryonálního

vývoje v zárodečných buňkách, v kmenových krvetvorných buňkách). Za normálních okolností se tedy u valné většiny buněk telomery zkracují při každém buněčném cyklu a na základě toho je počet buněčných dělení omezený. V myelomových buňkách ovšem bývá telomeráza aktivní, čímž jim dává neomezený dělicí potenciál a s tím související nesmrtelnost. Bylo zjištěno, že změny ve struktuře telomer jsou specifické pro různé fáze mnohočetného myelomu a korelují s agresivitou tohoto onemocnění [53].



Obrázek 12 – Telomery a telomeráza [54]

1.3 Potenciální nádorové biomarkery

Nádorové biomarkery jsou definovány jako látky laboratorně prokazatelné v tělních tekutinách, nejčastěji v séru a v moči, nebo v tkáních, jež jsou v organismu přítomny v důsledku nádorového procesu. Mnohé nádorové biomarkery jsou sice tvořeny jak nádorovými, tak fyziologickými buňkami, ovšem fyziologickými v porovnání s nádorovými ve značně omezené míře. Při nádorovém onemocnění jsou produkovány buď přímo nádorovými buňkami, nebo organismem jako odpověď na probíhající nádorové bujení [55]. Mohou jimi být proteiny (hlavně enzymy a imunoglobuliny), sacharidy, nukleové kyseliny, hormony a hormonální metabolity, onkofetální antigeny, fragmenty cytoplazmatických struktur uvolňované při zániku buňky a další. Jedním z nejstarších nádorových biomarkerů je M-protein vyskytující se při onemocnění mnohočetným myelomem [56]. Stanovení nádorových biomarkerů má význam zejména pro určování prognózy, monitorování průběhu onemocnění a pro predikci odpovědi na léčbu. V kombinaci s dalšími laboratorními parametry jsou užitečnými ukazateli i v rámci diagnostiky [57]. Ideální nádorový biomarker by měl splňovat několik kritérií, mezi něž patří vysoká orgánová specifita, vysoká specifita vzhledem k malignímu onemocnění, vysoká senzitivita a korelace mezi výší laboratorního parametru a velikostí nádoru (množstvím nádorových buněk) [56].

1.3.1 Enoláza 1

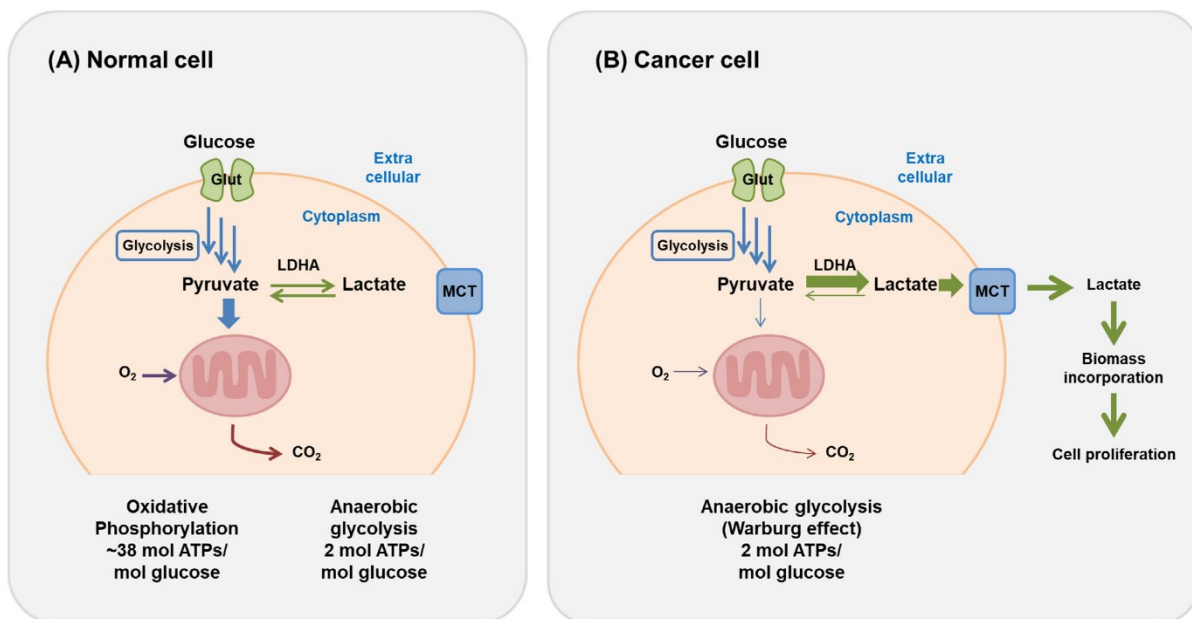
Enoláza 1 (ENO1) neboli α -enoláza, známá také jako 2-fosfo-D-glyceráthydroláza, je glykolytický enzym, který v glykolytické dráze katalyzuje přeměnu 2-fosfoglycerátu na fosfoenolpyruvát. Jedná se o jeden ze čtyř izoenzymů enolázy vyskytujících se u savců, přičemž ENO1 (α -enoláza) je nejrozšířenější a je považována za nejvýznamnější. Nejen, že je jedním z kritických enzymů v glykolytické dráze, ale zároveň se jedná o protein s prokazatelně onkogenními vlastnostmi, neboť podporuje proliferaci, migraci a invazi nádorových buněk, což vede k progresi různých nádorů [58]. Kromě glykolýzy působí také ve fibrinolytickém systému, kde na povrchu buněk plní funkci plazminogenového receptoru [59], dále se účastní oxidačního stresu, bakteriálních, plísňových a parazitických infekcí a jako autoantigen může vyvolat reakci imunitního systému [60].

Přítomnost ENO1 byla potvrzena u řady nádorových onemocnění (např. karcinomu plic [61], karcinomu pankreatu [62], kolorektálního karcinomu [63] a mnohočetného myelomu [64]), ale

i u mnohých autoimunitních onemocnění (např. systémového lupus erythematosus [65], revmatoidní artritidy [66], ulcerózní kolitidy, Crohnovy choroby [67], retinopatie [68] a Hashimotovy encefalopatie [69]). V posledních letech je tak ENO1 ohniskem výzkumů a zdá se, že by mohla být zásadním terapeutickým cílem [70].

ENO1 je všudypřítomně exprimována ve většině lidských tkání, ovšem nadměrně je exprimována u mnoha typů nádorových onemocnění. ENO2 (β -enoláza), také známá jako neuron-specifická enoláza, je převážně exprimována v neuronech a neuroendokrinních nádorech. ENO3 (γ -enoláza) se vyskytuje především ve svalových tkáních [60]. ENO4 přispívá k normálnímu sestavení vláknitého pouzdra v hlavní části bičíku spermie [71].

Jedním z charakteristických znaků nádorových buněk je metabolické přeprogramování, jehož nejznámějším příkladem je metabolismus glukózy (viz Obrázek 13). Jde o specifický jev vyskytující se u nádorových buněk (tzv. Warburgův efekt), kdy upřednostňují relativně energeticky deficitní anaerobní glykolýzu před energeticky výhodnější oxidační fosforylací (aerobní částí buněčného dýchání), a to i v normoxii, kdy je množství kyslíku v tkáních dostačující. Fyziologické buňky naopak ve většině případů využívají k zajištění svých energetických potřeb právě oxidační fosforylací. Toto metabolické přeprogramování hraje v expanzi nádoru důležitou roli [72]. Na buněčné membráně nádorových buněk jsou nadměrně exprimovány transportéry glukózy (GLUT1/GLUT3). Důvodem je, že produkce energie anaerobní glykolýzou je nízká, a aby bylo vyhověno energetickým požadavkům nádorových buněk, zákonitě výrazně narůstá spotřeba glukózy [73]. Meziprodukty vznikající v rámci glykolýzy podporují biosyntézu nukleotidů, aminokyselin a triglyceridů, a to všechno dovoluje nádorovým buňkám rychlou proliferaci. Konečným produktem metabolismu glukózy je kyselina mléčná, kterou nádorové buňky vylučují. Tím se tvoří kyselé mikroprostředí nádoru, které je nepříznivé pro okolní imunitní buňky [74]. Enzymy, které se podílejí na glykolýze v nádorových buňkách, jsou tak, zdá se, slibnými cíli, které mohou otevřít zcela nové terapeutické možnosti v léčbě nádorových onemocnění [75].

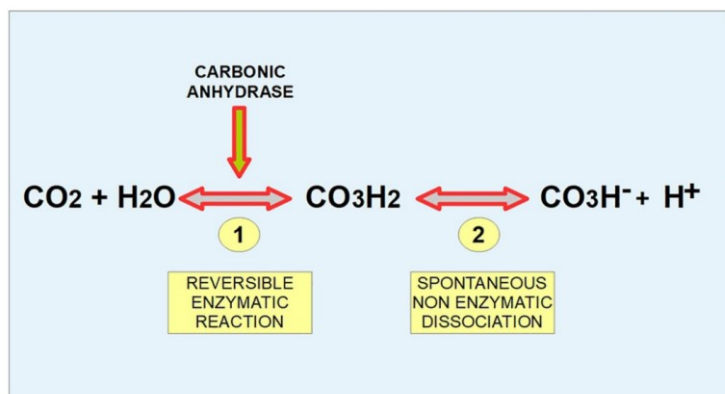


Obrázek 13 – Porovnání metabolismu glukózy v normálních a nádorových buňkách [76]

(A) Normální buňka: při aerobní glykolýze je výtěžek až 38 ATP, při anaerobní glykolýze je výtěžek 2 ATP. (B) Nádorová buňka: bez ohledu na přítomnost nebo nepřítomnost kyslíku využívá anaerobní glykolýzu, jejímž výtěžkem jsou 2 ATP, proto k získání energie ve srovnání s normální buňkou potřebuje více glukózy.

1.3.2 Karbonická anhydráza 1

Karbonické anhydrázy (CA) jsou velkou skupinou metaloenzymů, které katalyzují reverzibilní hydrataci oxidu uhličitého za vzniku hydrogenuhličitanového aniontu a protonu, což je reakce důležitá v mnoha fyziologických dějích, ale zároveň významná pro udržování pH v nádorových buňkách (viz Obrázek 14) [77].



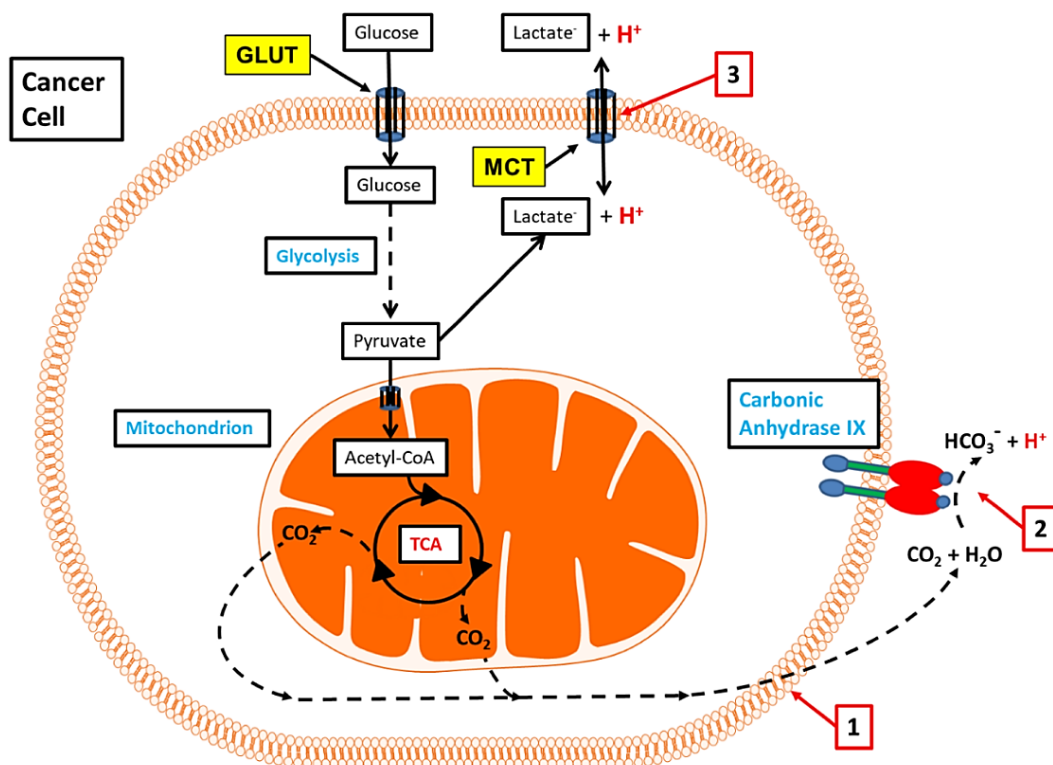
Obrázek 14 – Reakce katalyzovaná karbonickou anhydrázou [77]

Účastní se také různých biologických procesů, včetně dýchání, kalcifikace, udržování acidobazické rovnováhy, kostní resorpce a tvorby komorové vody, mozkomíšního moku, slin a žaludečních šťáv [78]. Je známých 16 izoform CA, přičemž CA1, CA2, CA3 a CA7 se vyskytují v cytozolu, CA4, CA9, CA12 a CA14 jsou situovány v buněčných membránách, CA5 je mitochondriální, CA6 je vylučována ve slinách a některé CA nevykazují enzymatickou aktivitu [77]. Karbonická anhydráza 1 (CA1) je exprimována v cytoplazmě a v jádře leukocytů, dále v kostní dřeni, slezině a v tlustém střevě [78].

Oxid uhličitý je hlavním oxidačním produktem buněčného metabolismu a hraje důležitou roli v udržování acidobazické rovnováhy buňky. Ve zdravých tkáních je pH striktně regulováno mezi hodnotami 7,35 a 7,45, aby byla zachována normální fyziologie a buněčný metabolismus. Je ovšem známo, že v nádorové tkáni dochází k dysregulaci acidobazických homeostatických mechanismů, důsledkem čehož je pH kyselé a pohybuje se mezi 6,3 a 7,0 [79].

Téměř před sto lety publikoval německý biochemik Otto Heinrich Warburg své klíčové pozorování, při němž nádorová tkáň metabolizovala glukózu na kyselinu mléčnou namísto oxidu uhličitého, a to i v přítomnosti kyslíku. Toto pozorování bylo nazváno Warburgův efekt a vedlo nejprve k mylnému předpokladu, že kyselina mléčná produkovaná nádorovými buňkami bude mít tendenci okyselovat jejich cytoplazmu, a snižovat tak jejich intracelulární pH. Mikroelektrodové studie na pevných nádorech navíc také podporovaly tvrzení, že jejich intracelulární i extracelulární pH je kyselé. Toto dogma bylo vyvráceno na počátku 80. let, kdy bylo pomocí magnetické rezonanční spektroskopie (MRS) prokázáno, že intracelulární pH solidních nádorů je obvykle mírně zásadité podobně jako u většiny fyziologických buněk. Následné studie MRS využívající extracelulární pH sondy stanovily závěr, že kyselé pH je typické pro extracelulární prostředí nádorů [79].

V posledních letech se acidické nádorové mikroprostředí stalo uznávaným nádorovým rysem, který má vliv na progresi nádorového onemocnění [80]. Bylo zjištěno, že klíčovou roli v kontrole nad pH v nádorové tkáni hraje právě enzym karbonická anhydráza, zejména izoforma CA9 (viz Obrázek 15) [81]. Pozornost je však věnována i izoformě CA1, jejíž exprese byla, podobně jako u ENO1, prokázána u mnoha nádorových i autoimunitních onemocnění (např. systémového lupus erythematosus, Sjögrenova syndromu, autoimunitní/idiopatické chronické pankreatitidy, onemocnění pojivové tkáně a dalších revmatických onemocnění). Z klinického hlediska se tak i karbonická anhydráza stává potenciálním terapeutickým cílem [82].



Obrázek 15 – Role karbonické anhydrázy v regulaci pH [79]

CA9 propojuje energetický metabolismus nádorové buňky s regulací pH. (1) CO₂ difunduje přes fosfolipidovou dvouvrstvu buněčné membrány do extracelulárního prostoru. (2) Na extracelulárním povrchu buněčné membrány katalyzuje CA9 hydrataci CO₂ za vzniku H⁺ a HCO₃⁻. (3) Laktát, konečný produkt metabolismu glykolýzy, opouští buňku přes MCT (monokarboxylátový transportér) rychlostí, která je ovlivněná pH gradientem.

1.4 Nádorové buněčné linie

Nádorové buněčné linie jsou *in vitro* modelové buněčné systémy, které jsou běžně používány pro studium biologie nádorů, hledání nádorových markerů a definování účinnosti léčiv [83; 84]. Přestože nádorové buňky jsou typické svým expanzivním růstem *in vivo*, kde unikají všem imunitním mechanismům, nasazení a stabilizace nádorových buněčných linií *in vitro* je složitým procesem. Obtížnost je dána zejména rozdíly mezi *in vivo* a *in vitro* prostředím (např. závislost na růstových faktorech, přísun kyslíku, interakce s nádorovou tkání a dalšími buňkami). Každá nádorová buněčná linie vychází z nádorových buněk pacienta, jemuž byly odebrány [83]. Nádorové buněčné linie umožňují zkoumání vlastností buňky, jejíž intenzivní proliferaci příslušné nádorové onemocnění vzniká, a provádět *in vitro* experimenty, které *in vivo* provést nelze. Výhodou je, že nádorové buněčné linie si zachovávají většinu vlastností původního nádoru, proto se stávají tak užitečnými modelovými systémy pro výzkum [85].

Mezi požadavky kladené na nově zaváděné nádorové buněčné linie patří podrobná charakterizace, znalost skutečného původu buněk, nesmrtelnost buněčné kultury, důkaz neoplasticity, vědecký význam a dostupnost. Buněčné linie jsou podrobně charakterizovány pomocí „omických“ technologií – genomiky, transkriptomiky a proteomiky a získaná data jsou publikována a zpřístupňována v online databázích, což umožňuje studovat a porovnávat změny na buněčné i molekulární úrovni včetně mutací, expresí genů a proteinů a variací počtu kopií. Díky tomu se významně usnadňuje proces výběru nejvhodnějších buněčných modelových systémů pro experimentální účely [86].

1.4.1 RPMI-8226

RPMI-8226 je lidská B-lymfocytární buněčná linie, která byla v roce 1966 izolována z periferní krve 61letého muže s mnohočetným myelomem [87]. Je uchovávána v médiu RPMI 1640, jehož název je odvozen z anglického Roswell Park Memorial Institute [88]. Toto médium je vynikajícím buněčným kultivačním médiem pro lymfocyty, a to jak pro normální, tak neoplastické. Jedná se o solný roztok s pufrům tvořeným převážně chloridem sodným a hydrogenfosforečnanem draselným. Obsahuje optimální množství minerálů, aminokyselin, vitamínů a glukózy pro prosperování savčích buněk [89]. Buněčná linie RPMI-8226 produkuje lehké imunoglobulinové řetězce lambda [87]. Podle Atlasu lidských proteinů (The Human Protein Atlas) exprimuje enzym enoláza 1 (ENO1), ale neexprimuje enzym karbohydryltransferáza 1 (GPIIb/IIIa) [90].

anhydráza (CA1) [90; 91]. Je vhodná pro výzkum poruch imunitního systému lymfocytárního původu [87].

1.4.2 HEL

Buněčná linie HEL je lidská erytroblastová buněčná linie izolovaná v roce 1980 od 30letého muže z Evropy s akutní erytroidní leukémií v relapsu (po léčbě Hodgkinova lymfomu) [92]. Tyto buňky jsou schopné spontánní i indukované syntézy globinu a byla u nich prokázána mutace JAK2V617F [93; 94]. Informace o expresi enzymů enoláza 1 (ENO1) a karbonická anhydráza 1 (CA1) není v Atlasu lidských proteinů (The Human Protein Atlas) k dispozici [90; 91]. Je to buněčná linie používaná v biomedicínském výzkumu [92].

1.4.3 ANBL-6

ANBL-6 je lidská myelomová buněčná linie, která byla izolována z periferní krve 67leté ženy s mnohočetným myelomem [95]. Tato buněčná linie je závislá na IL-6, který je důležitou součástí mikroprostředí kostní dřeně, kde podporuje růst nádoru [96]. Cytogenetické studie navíc potvrdily existenci dvou aneuploidních karyotypů v této buněčné linii a odhalily klonální vztah mezi těmito karyotypy [97]. Je považována za vysoce reprezentativní buněčný model mnohočetného myelomu [95]. Informace o expresi enzymů enoláza 1 (ENO1) a karbonická anhydráza 1 (CA1) není v Atlasu lidských proteinů (The Human Protein Atlas) k dispozici [90; 91].

1.4.4 PC-3

PC-3 je lidská buněčná linie, která byla izolována *post mortem* z metastáz v kostní dřeni 62letého muže s karcinomem prostaty (jednalo se o špatně diferencovaný adenokarcinom) po androgenní supresní terapii. V literatuře je popsáno, že tyto buňky rostou na měkkém agaru, nereagují na léčbu androgeny a vykazují nízkou aktivitu kyselé fosfatázy a testosteron-5- α -reduktázy [98]. Podle Atlasu lidských proteinů (The Human Protein Atlas) tato buněčná linie exprimuje enzym enoláza 1 (ENO1), ale neexprimuje enzym karbonická anhydráza (CA1) [90; 91]. Byla použita ke zkoumání antiproliferativních účinků *Ferulago*

Mughlea na nádorové buňky a účinků palmitoylkarnitinu na genovou expresi a prozánětlivé dráhy u karcinomu prostaty [99].

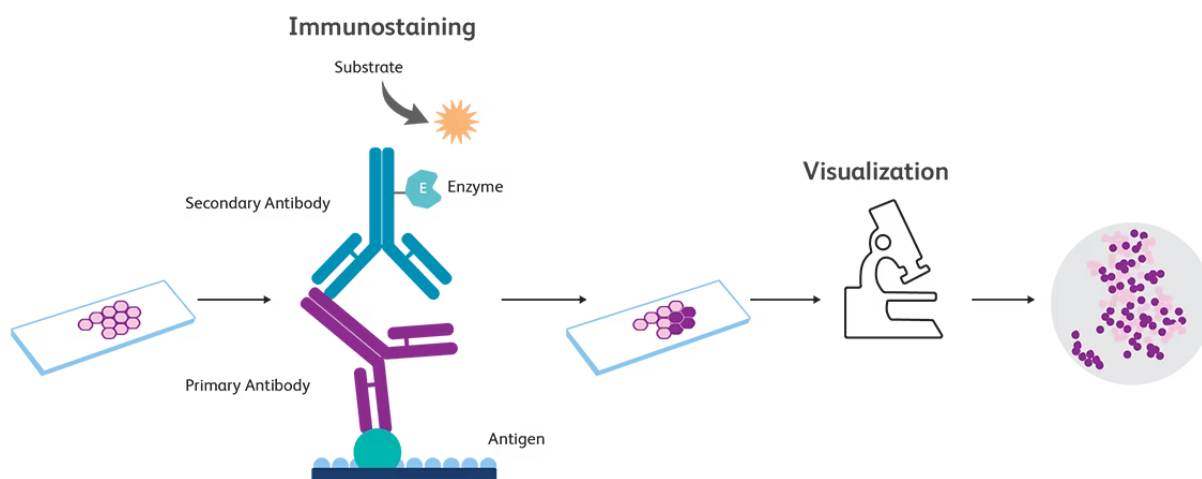
1.5 Metody používané pro charakterizaci modelových buněčných linií

Primární nádorové buněčné linie pocházejí z resekovaných tkání, které jsou pacientům odebírány nejčastěji při biopsiích a operačních zákrocích. Jsou předmětem intenzivního zkoumání, neboť mají značný význam pro rozvoj onkologie. Po odebrání nádorové tkáně je zapotřebí ji upravit tak, aby byla získána buněčná suspenze. To se provádí nejčastěji enzymatickým štěpením (kolagenázou, dispázou nebo Dnázou), chemickým štěpením (kyselinou ethylendiamintetraoctovou nebo kyselinou ethylenglykoltetraoctovou) či mechanickým rozrušením tkáně. Buňky získané ze vzorku tkáně jsou kultivovány ve formě monovrstvy či trojrozměrné buněčné kultury. Každá primární nádorová buněčná linie musí být dostatečně charakterizována – musí být znám její původ, čistota a významné rysy. Pro charakterizaci jsou používány metody jako je imunohistochemie, imunocytochemie a imunofluorescence, imunofenotypizace pomocí průtokové cytometrie, polymerázová řetězová reakce v reálném čase, karyotypizace, sekvenování nové generace, Western blot, dvourozměrná gelová elektroforéza, dvourozměrná diferenční gelová elektroforéza a hmotnostní spektrometrie [83].

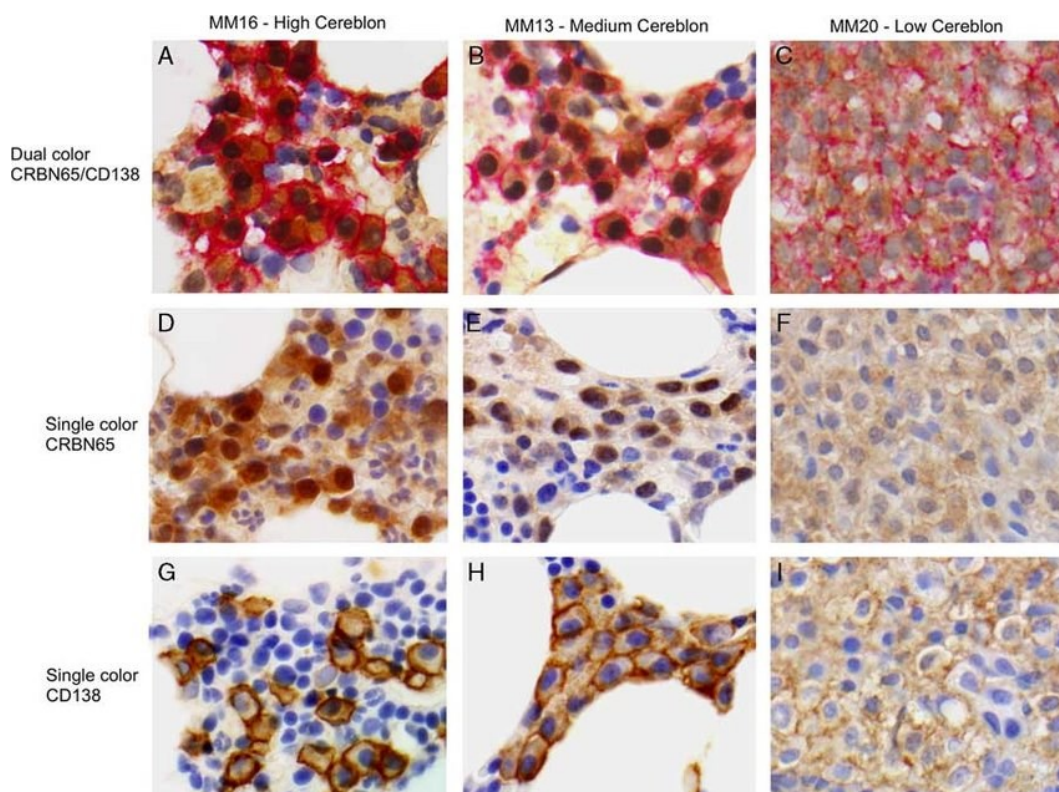
1.5.1 Imunohistochemie

Imunohistochemie je histologická laboratorní metoda, kterou se ve vyšetřovaném vzorku tkáně prokazuje přítomnost určitých antigenů pomocí specifických protilátek. Jakmile se protilátky navážou na antigen ve vzorku tkáně, je tato vazba vizualizována a lze preparát pozorovat pod mikroskopem. V patologii má tato metoda diagnostický i prognostický význam, a to zejména u onkologických onemocnění [100]. Značnou výhodou imunohistochemie je, že na rozdíl od jiných metod umožňuje kvalitativní i kvantitativní analýzu cílových antigenů *in situ* [101]. V rámci charakterizace buněčných linií je jednou z nejrozšířenějších metod pro hodnocení vlastností buněk jako je např. exprese hormonálních receptorů (estrogenových a progesteronových), receptoru epidermálního růstového faktoru (EGFR, z angl. „Epidermal Growth Factor Receptor“) u rakoviny prsu nebo charakteristických znaků epiteliálních buněk u rakoviny vaječníků (EpCAM, CA125 a MOC-31) [83].

Vzorek tkáně se nejprve fixuje ve formalinu. Cílem fixace je zachovat strukturu buněk ve formě co nejvíce podobné *in vivo* stavu. Následně je tkáň zalita parafínovým voskem, čímž vznikne parafínový bloček se vzorkem tkáně. Ten je poté rozřezán mikrotomem na tenké plátky, jež se umístí do teplé vodní lázně a pak jsou přenášeny na podložní sklíčka, na nichž je nanesené tkáňové lepidlo. Během fixace není vyloučen vznik různých křížových vazeb, proto je žádoucí tkáňové řezy před dalším zpracováváním ošetřit tak, aby se dosáhlo optimalizace prezentace antigenů. Jedná se o to, aby se co nejvíce odkryly cílové epitopy a byly maximálně přístupné primární protilátce. Toho se dosáhne deparafinací a rehydratací řezů následovanou použitím proteáz či mikrovlnného záření. Před přidáním primární protilátky je nezbytné blokovat nescifické vazby, což se provádí inkubací v pufru obsahujícím blokující činidlo. Dalším krokem je již aplikování specifické primární protilátky, která se váže na cílové epitopy. Nenavázaná protilátka je odstraněna opláchnutím sklíček v promývacím roztoku. Metoda detekce může být přímá, nepřímá, imunofluorescenční či imunoenzymová. Záleží na tom, jestli je s fluorescenční či enzymovou značkou konjugována primární protilátka (přímá detekce) nebo sekundární protilátka (nepřímá detekce). Po detekci se přistupuje k barvení pozadí, které usnadní orientaci v preparátu (viz Obrázek 17). Obarvený tkáňový řez na podložním sklíčku se přikryje krycím sklíčkem, které se upevní pryskyřicí. Tímto je vzorek připraven k analýze světelnou, fluorescenční, případně konfokální mikroskopií [102]. Princip imunohistochemie je graficky znázorněn na Obrázku 16.



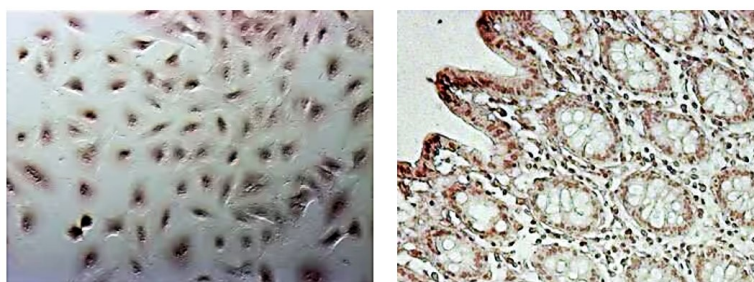
Obrázek 16 – Princip imunohistochemie [103]



Obrázek 17 – Příklady imunohistochemických nálezů u mnohočetného myelomu [104]

1.5.2 Imunocytochemie

Imunocytochemie je běžná laboratorní metoda, kterou se v buňkách prokazuje přítomnost určitých antigenů pomocí specifických protilátek. Je tedy založena na stejném principu jako imunohistochemie, přesto se však tyto dvě metody odlišují. Rozdíl mezi imunocytochemií a imunohistochemií je ten, že v rámci imunohistochemie jsou zpracovávány vzorky komplexních tkáňových řezů, zatímco imunocytochemie je aplikována na vzorky, z nichž byla odstraněna většina extracelulární matrix – jedná se o vzorky sestávající z buněk, které již byly izolovány z tkáně (viz Obrázek 18) [105].



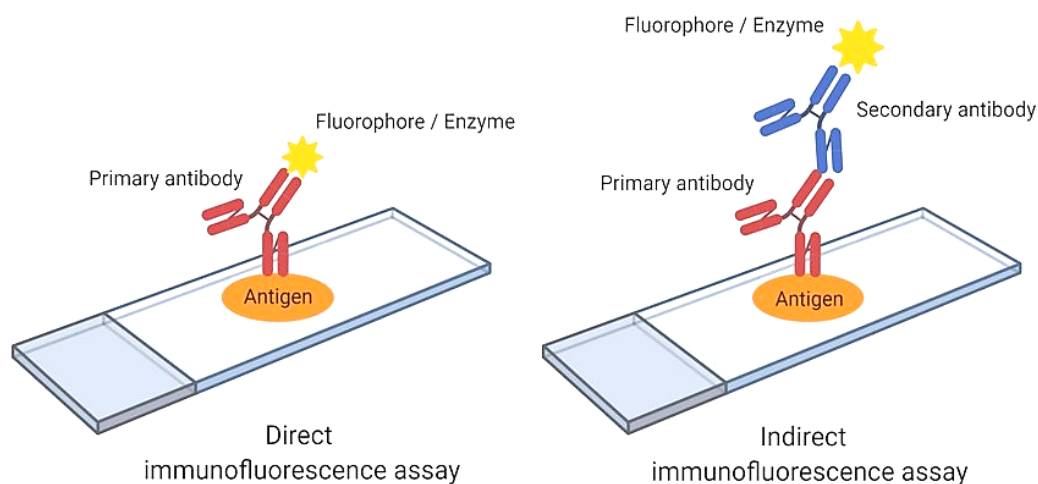
Obrázek 18 – Porovnání imunocytochemického a imunohistochemického preparátu [105]

Využívá se k určení homogenity a molekulárního profilu buněčných linií a k odhalení subcelulární lokalizace konkrétních antigenů jako jsou např. estrogenové a progesteronové receptory a HER2 (receptor 2 lidského epidermálního růstového faktoru, z angl. „Human Epidermal Growth Factor Receptor-2“) v buněčných liniích rakoviny prsu a také k detekci přítomnosti keratinů, např. keratinu 19, který je biomarkerem u mnoha nádorových onemocnění včetně rakoviny prsu [83].

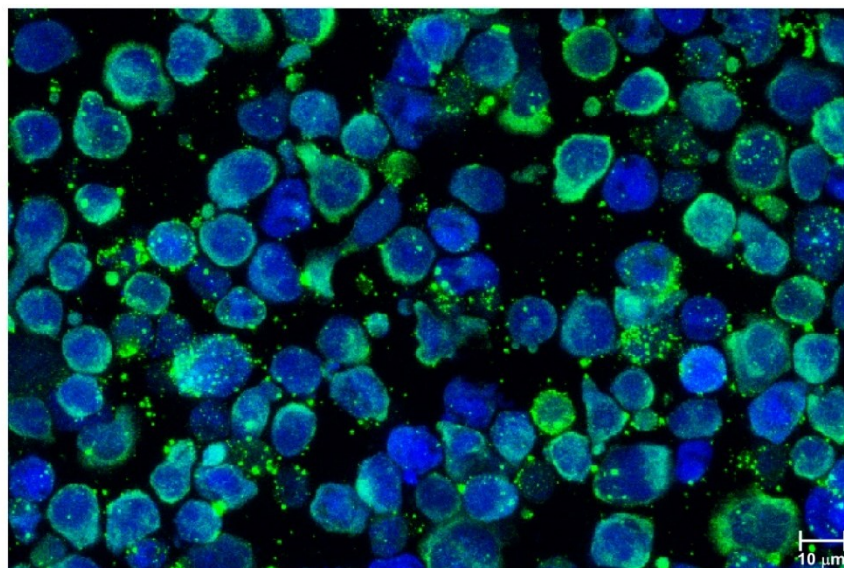
1.5.3 Imunofluorescence

Imunofluorescence je běžná laboratorní metoda, která slouží k detekci antigenů v buňkách i v tkáních (přímá imunofluorescence) a také cirkulujících protilátek v séru (nepřímá imunofluorescence). Při přímé fluorescenci se konjugát váže přímo na antigen, zatímco u nepřímé fluorescence se v prvním kroku protilátka naváže na antigen a ve druhém kroku se na tuto protilátku naváže konjugát (viz Obrázek 19). Konjugát je protilátka s navázaným fluorescenčním barvivem (fluorochromem), nejčastěji fluorescein izothiokyanátem (FITC), které emituje zelené světlo. Výsledek se odečítá pod fluorescenčním mikroskopem (viz Obrázek 20) [106].

Uplatňuje se zejména při diagnostice autoimunitních onemocnění k průkazu specifických autoprotilátek a v rámci buněčných linií se využívá k odhalování cytoskeletárních struktur jako jsou filamenta, cytokeratiny a vimentin a při detekci mykoplazmové kontaminace [83; 107].



Obrázek 19 – Princip přímé a nepřímé imunofluorescence [108]



Obrázek 20 – Imunofluorescence u myelomových buněk [109]

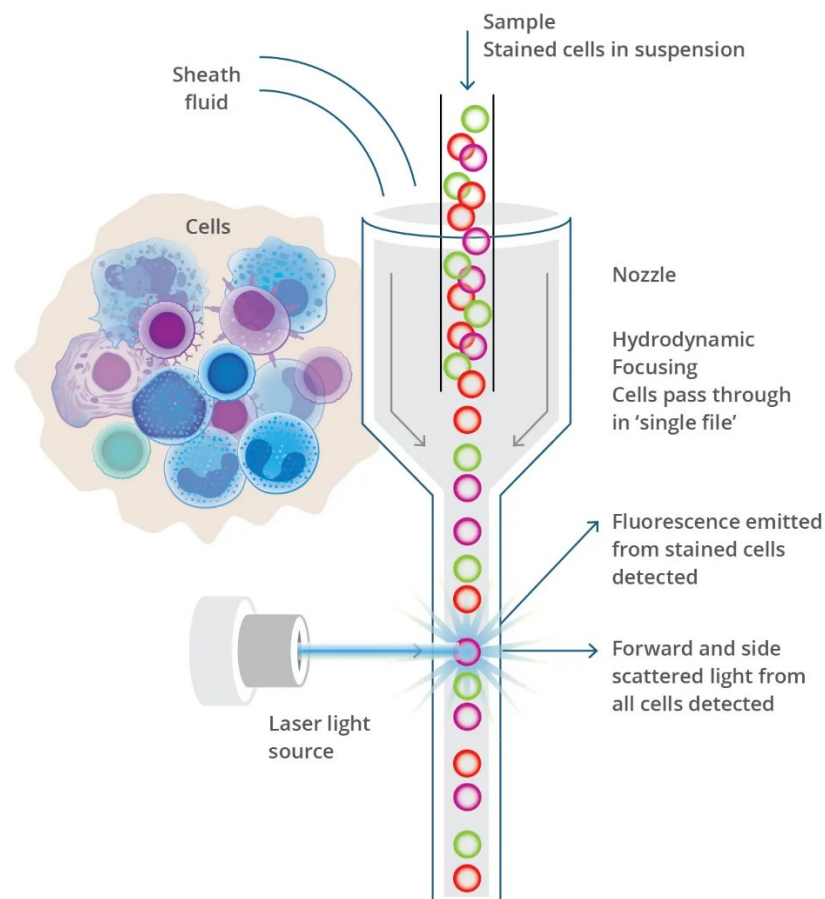
Modrá fluorescence: myelomové buňky; zelená fluorescence: BCMA antigen na myelomových buňkách.

1.5.4 Imunofenotypizace pomocí průtokové cytometrie

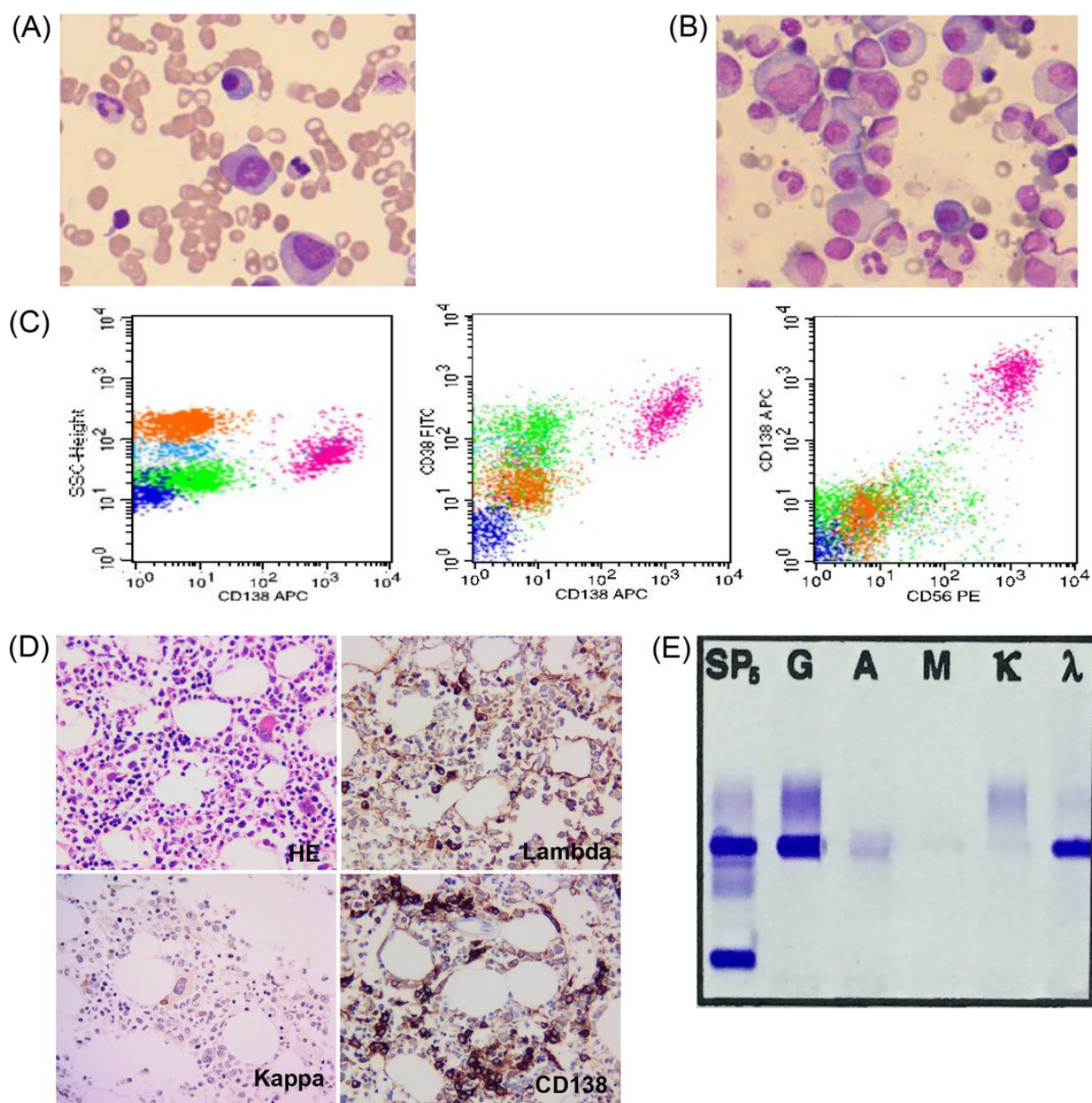
Průtoková cytometrie je metodou, která se v laboratořích používá především ke stanovení zastoupení různých buněčných subpopulací v buněčné suspenzi (periferní krve, aspirátu kostní dřeně, mozkomíšního moku atd.) na základě imunofenotypizace. Je založena na imunofluorescenčním průkazu povrchových, cytoplazmatických nebo jaderných antigenů pomocí monoklonálních protilátek, jež jsou typické pro určitou buněčnou subpopulaci [110]. Nachází uplatnění při diagnostice hematologických a autoimunitních onemocnění, při detekci minimálního reziduálního onemocnění, potransplantačních komplikací a v rámci problematiky buněčných linií napomáhá při jejich kategorizaci na základě přítomnosti či nepřítomnosti konkrétních markerů asociovaných s určitým typem buněk a definujících původ izolovaných buněk. Je velmi přínosná také pro hodnocení buněčné viability a apoptózy [83; 110].

Průtokový cytometr se skládá ze tří systémů – z fluidiky, optiky a elektroniky. Princip průtokové cytometrie je znázorněn na Obrázku 21. K buněčné suspenzi se přidávají fluorescenčně značené monoklonální protilátky cílené na povrchové nebo intracelulární znaky analyzovaných buněk. Principem průtokové cytometrie je hydrodynamická fokuzace, kdy je buněčná suspenze unášena proudem nosné kapaliny a usměrňována tak, aby měřícím bodem průtokové cely procházela v daný moment analýzy vždy právě jedna buňka. Při průchodu tímto bodem jsou buňky ozařovány laserovým paprskem, dochází k odrazu světla v přímém úhlu

(FSC, přímý rozptyl, z angl. „Forward Scatter“), k lomu světla pod úhlem 90° (SSC, boční rozptyl, z angl. „Side Scatter“) a pokud jsou na buňkách navázány fluorescenčně značené protilátky, tak po excitaci fluorochromu i k emisi světla o příslušné vlnové délce (viz Obrázek 21). Díky soustavě zrcadel a filtrů, jimiž průtokový cytometr disponuje, světlo dopadá na detektory. Naměřená data jsou následně počítačově zpracována, přičemž výstupem analýzy je grafické zobrazení naměřených dat v podobě jednoparametrových histogramů či dvouparametrových dot plotů (viz Obrázek 22). Jsou získávány informace o velikosti a granularitě buněk, členitosti buněčného jádra a imunofenotypu dané buněčné subpopulace [110].



Obrázek 21 – Princip průtokové cytometrie [111]



Obrázek 22 – Laboratorní výsledky potvrzující diagnózu mnohočetného myelomu [112]

(A), (B) myelomové buňky v nátěru kostní dřeně, barvení Wright-Giemsa, zvětšení 1000×

(C) detekce myelomových buněk CD138+, CD38+ a CD56+ pomocí průtokové cytometrie

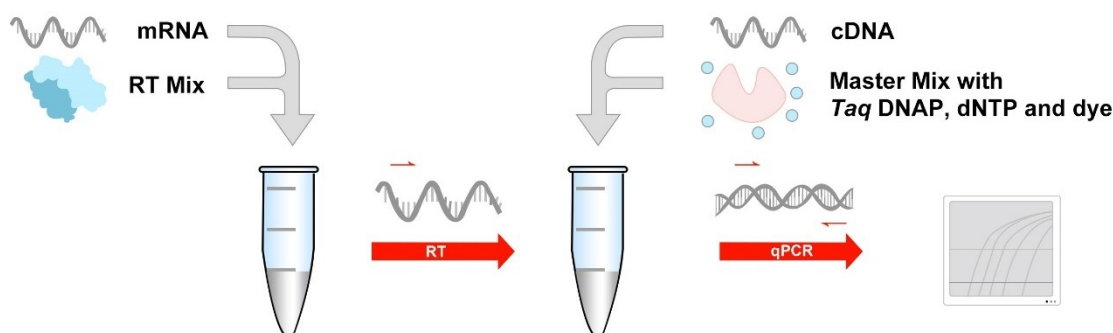
(D) myelomové buňky v biopsii kostní dřeně, barvení hematoxylin-eosin, lambda, kappa, CD138, zvětšení 400×

(E) M-protein (typ IgG lambda) pozorovaný pomocí metody imunofixace

1.5.5 Reverzní transkriptázová kvantitativní polymerázová řetězová reakce

Reverzní transkriptázová kvantitativní polymerázová řetězová reakce (RT-qPCR) je metoda založená na klasické PCR reakci, která ovšem sleduje amplifikaci DNA v reálném čase. Odehrává se totiž ve speciálním cycleru, který zaznamenává množství DNA kontinuálně v průběhu každého PCR cyklu. Templátem je izolovaná DNA, případně RNA, která však musí být podrobena reverzní transkripci, při níž je z mRNA přepsána do cDNA. Na rozdíl od klasické PCR obsahuje reakční směs pro real-time PCR reakci navíc fluorescenční reportérové molekuly, které produkují fluorescenční signál, a na základě toho je umožněno monitorovat množství templátu v reálném čase, neboť intenzita signálu roste se zvyšujícím se množstvím amplikonu [113]. Princip RT-qPCR je graficky znázorněn na Obrázku 23.

Při charakterizaci buněčných linií lze RT-qPCR použít pro zkoumání exprese markerů rakovinných buněk, jimiž jsou např. CD znaky CD24, CD44, CD133 a CD166. Tato metoda také umožňuje detekovat geny potřebné pro charakterizaci buněčné linie, např. B2M a RPL29 v případě buněčné linie karcinomu jazyka [83].

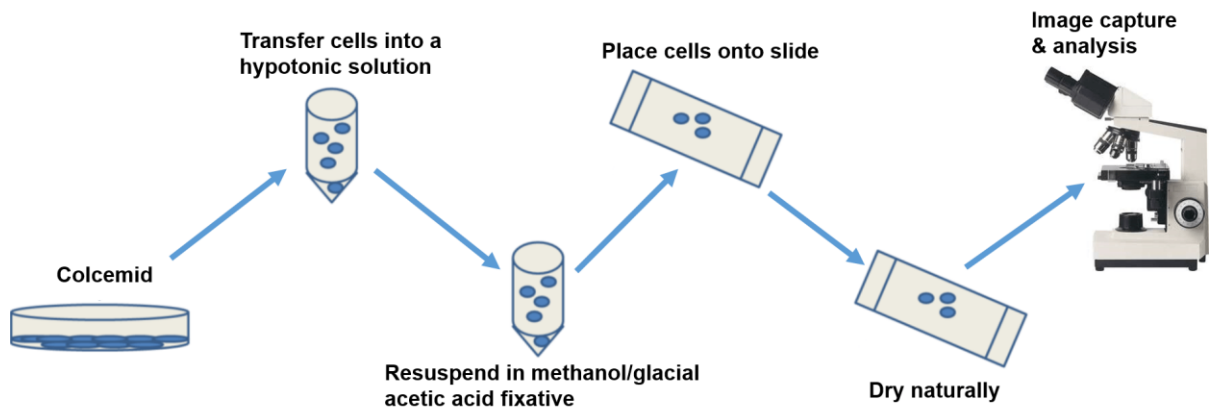


Obrázek 23 – Princip RT-qPCR [114]

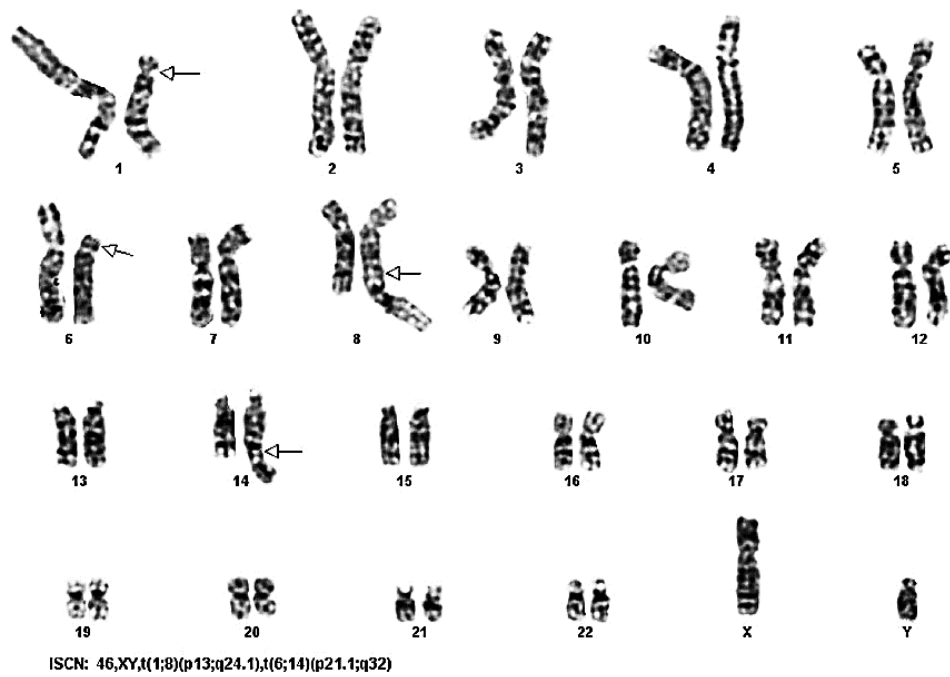
1.5.6 Karyotypizace

Karyotypizace je základní cytogenetická laboratorní metoda, která se zaměřuje na zkoumání chromozomového vybavení buňky (karyotypu) včetně numerických a strukturních aberací. Nejprve jsou buňky namnoženy a následně je jejich dělení zastaveno kolcemidem v metafázním stádiu. Poté jsou buňky převedeny do hypotonického roztoku, vzorek je fixován, nakapán na podložní sklo, vysušen, obarven a hodnocen v optickém mikroskopu (viz Obrázek 24) [115]. Karyotypizace nachází uplatnění nejen v rámci genetických vyšetření, kde je cílem vyloučit

právě numerické či strukturní chromozomální aberace (viz Obrázek 25), ale také při charakterizaci buněčných linií [83].



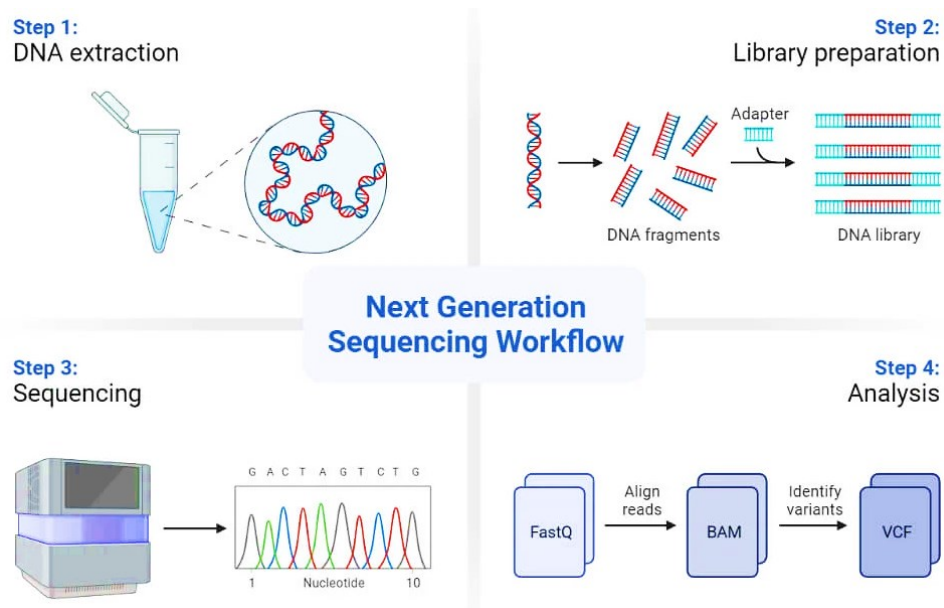
Obrázek 24 – Princip karyotypizace [116]



Obrázek 25 – Karyotyp pacienta s doutnajícím myelomem (G-pruhování) [117]

1.5.7 Sekvenování nové generace

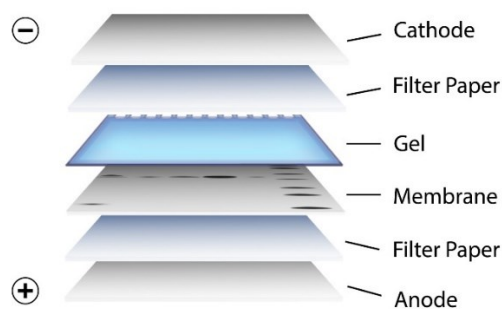
Sekvenování neboli čtení DNA, je určování pořadí nukleotidů v molekule deoxyribonukleové kyseliny. Sekvenování nové generace je pak označení pro metody, které umožňují rychlé sekvenování velkého množství vzorků najednou, a to díky paralelizaci. Tyto metody jsou totiž založeny na masivním paralelním sekvenování mnoha fragmentů DNA. Je potřeba připravit tzv. sekvenační knihovnu, což zahrnuje izolaci DNA ze vzorku nebo případně přepis RNA do cDNA, fragmentaci DNA, navázání adaptorů na koncové fragmenty DNA, amplifikaci a fixaci. V dalším kroku probíhá samotná sekvenace, kdy jsou k fragmentům DNA připojovány jednotlivé nukleotidy na základě komplementarity, přičemž dochází k vysílání odpovídajícího signálu, jenž je zachycen detektorem. Posledním krokem je bioinformatická analýza získaných sekvencí jednotlivých fragmentů [118]. Princip sekvenování nové generace je graficky znázorněn na Obrázku 26.



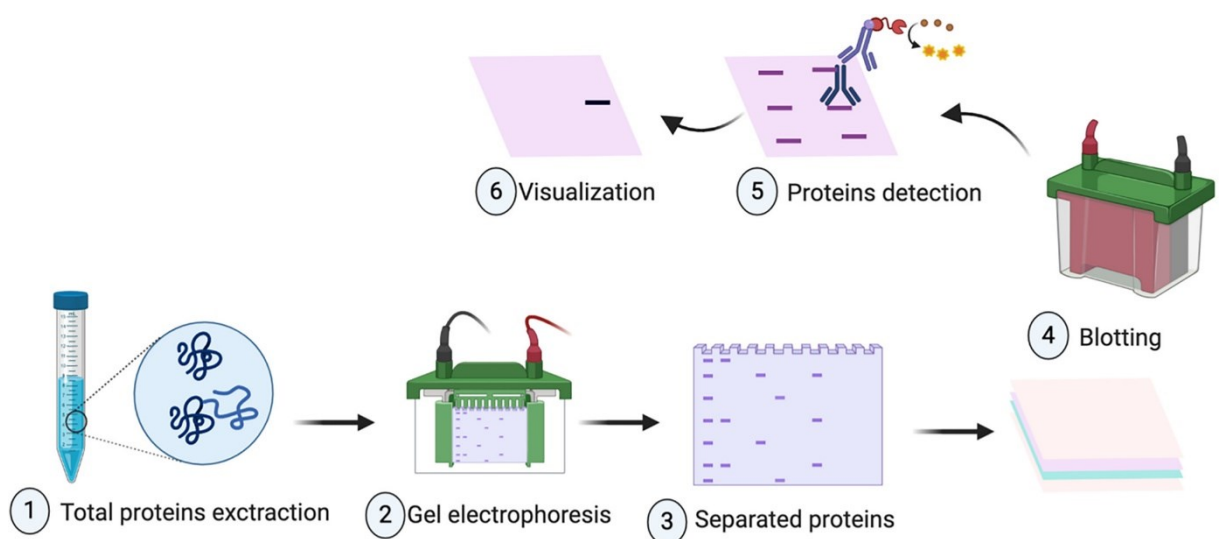
Obrázek 26 – Princip sekvenování nové generace [119]

1.5.8 Western blot

Western blot je metoda běžně používaná v rámci identifikace proteinů. Nejprve se směs proteinů separuje elektroforeticky a následně jsou proteiny přeneseny (přebloťovány) z gelu na nitrocelulózovou membránu, která bývá inkubována se specifickými protilátkami. Blotovací zařízení se skládá z anody (spodní díl) a katody (horní díl). Na anodu se jako první položí tlustý filtrační papír namočený v transferovém pufru, následně se na něj položí nitrocelulózová membrána, poté gel a poslední vrstvou je opět tlustý filtrační papír. Na tento vzniklý „sendvič“ se vloží katoda a zaklapne se víko blotovacího zařízení (viz Obrázek 27). Záporně nabitě proteiny jsou během blotování vlivem působení elektrického pole přitahovány ke kladné anodě, a přenesou se tak z gelu na membránu [120]. Princip separace a imunodetekce proteinů, jejíž součástí je právě Western blot, je graficky znázorněn na Obrázku 28.



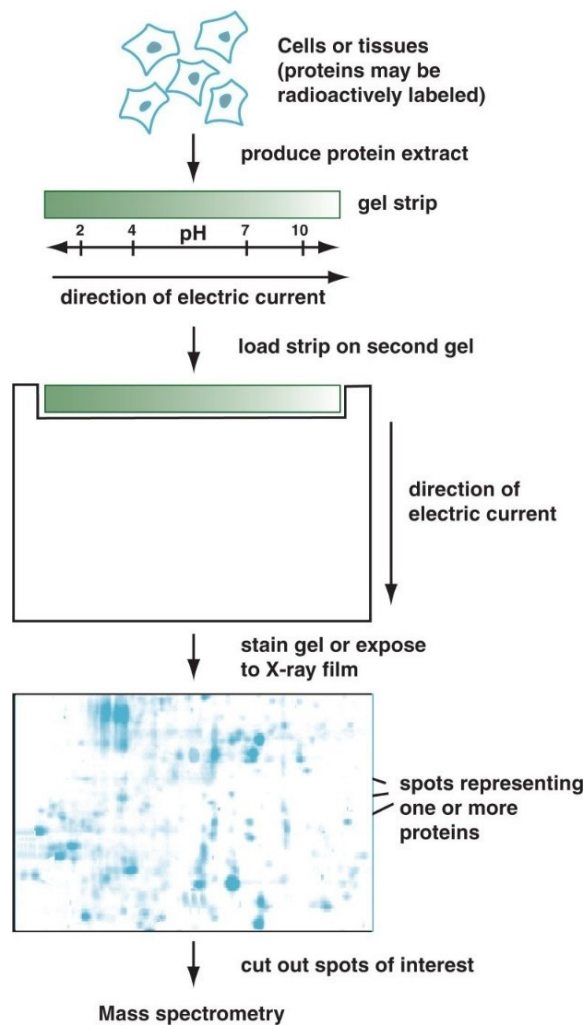
Obrázek 27 – Uspořádání vrstev při přenosu z gelu na membránu – metoda Western blot [121]



Obrázek 28 – Princip separace a imunodetekce proteinů [120]

1.5.9 Dvourozměrná gelová elektroforéza

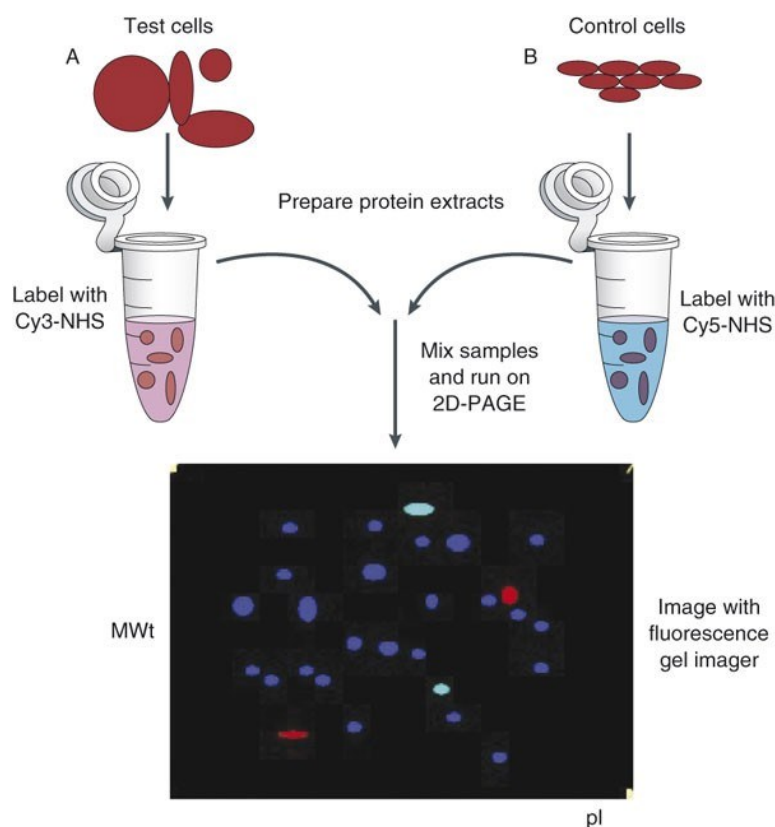
Dvourozměrná gelová elektroforéza je metoda, která slouží k separaci proteinů ve dvou rozměrech. Prvním rozměrem je izoelektrická fokuzace, kdy se proteiny rozdělí podle svých izoelektrických bodů (pI), což je hodnota pH, při níž jsou molekuly elektroneutrální. Separačním médiem je gel s gradientem pH. Nabité proteiny tak putují gradientem a v místě, které odpovídá jejich pI, se zastaví. Druhým rozměrem je elektroforetická separace v polyakrylamidovém gelu, při níž se proteiny rozdělí podle svých molekulových hmotností ve směru kolmém k prvnímu rozměru. Následně jsou proteiny detekovány barvením Coomassie Blue nebo stříbrem, fluorescenčně či autoradiograficky. Vybrané proteinové spoty je v závěru možné z gelu vyříznout a proteiny v nich obsažené identifikovat pomocí hmotnostní spektrometrie [122]. Princip dvourozměrné gelové elektroforézy je graficky znázorněn na Obrázku 29.



Obrázek 29 – Princip dvourozměrné gelové elektroforézy [123]

1.5.10 Dvourozměrná diferenční gelová elektroforéza

Dvourozměrná diferenční gelová elektroforéza (2D-DIGE) je moderní modifikace dvourozměrné gelové elektroforézy, při níž jsou proteinové vzorky před samotným elektroforetickým dělením označeny fluorescenčními barvivy. Díky tomu je možné nanášet na jeden strip s imobilizovaným pH gradientem různé vzorky značené odlišnými fluorescenčními barvivy a směsný vzorek, který vzniká smícháním všech vzorků, s nimiž se v daném experimentu pracuje, a slouží jako interní standard. U klasické dvourozměrné elektroforézy je hlavním problémem reprodukovatelnost dvourozměrných gelů. Tento problém je u dvourozměrné diferenční gelové elektroforézy značně eliminován, a to právě díky internímu standardu. Výhodou dvourozměrné diferenční gelové elektroforézy ve srovnání s klasickou dvourozměrnou gelovou elektroforézou je tedy možnost kvantitativního porovnávání dvou vzorků v jednom gelu současně a použití interního standardu, který minimalizuje problém s opakovatelností elektroforetické analýzy. Vybrané proteinové spoty je v závěru možné, stejně jako u klasické dvourozměrné gelové elektroforézy, z gelu vyříznout a proteiny v nich obsažené identifikovat pomocí hmotnostní spektrometrie [124]. Princip dvourozměrné diferenční gelové elektroforézy je graficky znázorněn na Obrázku 30.

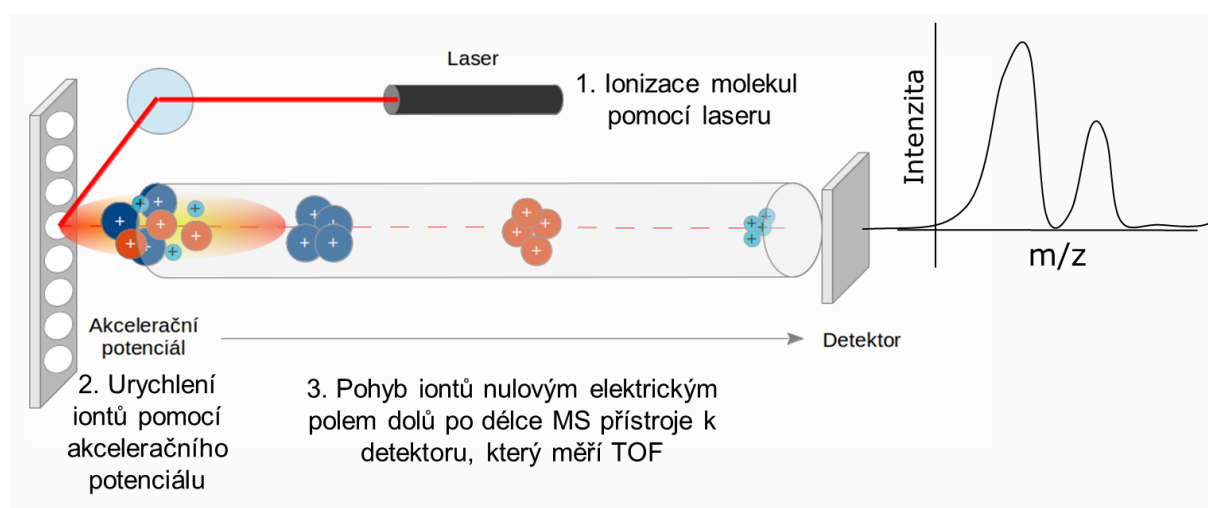


Obrázek 30 – Princip dvourozměrné diferenční gelové elektroforézy [125]

1.5.11 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie je analytická metoda, jejímž principem je ionizace molekul, rozlišení vzniklých iontů podle poměru hmotnosti a náboje (m/z) a zaznamenání relativních intenzit jednotlivých iontů. Hmotnostní spektrometr se skládá ze tří hlavních částí – z iontového zdroje, hmotnostního analyzátoru a detektoru. V iontovém zdroji se analyty vhodnými ionizačními technikami převádějí na ionty. Ionizace biologických makromolekulárních látek se provádí tzv. měkkými ionizačními technikami, jimiž jsou obvykle ionizace pomocí laseru za účasti matrice (MALDI, z angl. „Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation“), ionizace elektrosprejem (ESI, z angl. „Electrospray Ionization“) nebo ionizace nanosprejem (nanoESI). Měkké ionizační techniky totiž nezpůsobují fragmentaci látek. Ionty pak putují dále do hmotnostního analyzátoru, kde jsou separovány podle m/z . Separované ionty dopadají na detektor, který je posledním prvkem hmotnostního spektrometru, jenž zaznamenává počet iontů pro jednotlivé m/z hodnoty. Výsledkem měření je hmotnostní spektrum, což je graf závislosti intenzity iontů na jejich m/z [126]. Princip hmotnostní spektrometrie je graficky znázorněn na Obrázku 31.

V dnešní době je hmotnostní spektrometrie jedním z hlavních nástrojů biologického výzkumu a jednou z nejpoužívanějších metod v proteomice, neboť bývá detekční koncovkou proteomických postupů. Využívá se k identifikaci, kvantifikaci a charakterizaci proteinů, ke kontrole kvality rekombinantních proteinů, hledání biomarkerů pro daná onemocnění a také k charakterizaci posttranslačních modifikací [126].



Obrázek 31 – Princip hmotnostní spektrometrie typu MALDI-TOF [127]

2 CÍLE PRÁCE

Cílem této diplomové práce bylo provést:

- 1) porovnání dvou způsobů imunodetekce;
- 2) komparativní proteomovou analýzu vybraných nádorových buněčných linií;
- 3) imunoproteomické profilování vzorků lidských sér pacientů s diagnózou mnohočetný myelom, které jim byly odebrány v předem stanovených intervalech.

Pozornost byla cílena zejména na klinicky významné proteiny a potenciální nádorové biomarkery, konkrétně na enzymy enoláza (ENO1) a karbonická anhydráza (CA1).

Stěžejní metodou pro veškeré experimenty byla sérologická proteomová analýza (SERPA), která je kombinací elektroforetických technik, Western blotu a imunochemické detekce.

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Seznam laboratorního vybavení

- analytické váhy Scaltec SBC 32 (Scaltec Instruments, GmbH, Göttingen, Německo)
- aparatura pro blotovací přenos Trans-Blot® SD Semi-Dry (Bio-Rad, CA, USA)
- aparatura pro diskontinuální elektroforetickou separaci Mini-PROTEAN Tetra Cell (Bio-Rad, CA, USA)
- automatické pipety Eppendorf Research (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- Beckman Coulter Multisizer™ 4e Coulter Counter (Beckman Coulter, Indianapolis, USA)
- blotovací nitrocelulózní membrána (NC) Trans-Blot® Transfer Medium, porozita 0,2 µm (Bio-Rad, CA, USA)
- centrifugační zařízení MiniSpin Plus (Merck, Eppendorf, Darmstadt, Německo)
- destilační zařízení pro úpravu čistoty vody (zásobník s redestilovanou vodou) Halios 40 Type 1 (Neptec, Elbtal, Německo)
- gelové stripy s imobilizovaným gradientem pH Immobiline™ DryStrip pH 3–10 NL, 7 cm (GE Healthcare, Uppsala, Švédsko)
- krycí skla Mini-PROTEAN® Short Plates (Bio-Rad, Praha, ČR)
- laboratorní třepačky: multifunkční Orbital Shaker PSU-20i (BioSan SIA, Riga, Lotyšsko), Vortex mixer Wx (VELP Scientifica, Usmate, Italy), Mini-rotátor Bio RS-24 (BioSan SIA, Riga, Lotyšsko)
- magnetické míchadlo s ohřevem model MSH-300 (Biosan SIA., Riga, Lotyšsko)
- mikrozkuhavky (BioTech a.s., Praha, ČR a Eppendorf, Hamburg, Německo)
- pH metr model Orion 420 (Thermo Electron Corporation, Massachusetts, USA)
- promývací stanice FlexiWash FW400 (Cellagen Technology, Praha, ČR)
- předvážky KERN 440-33N (Kern & Sohn GmbH, Balingen, Německo)
- skla Mini-PROTEAN® Spacer Plates with 1,0 mm Integrated Spacers (Bio-Rad, Praha, ČR)
- svářečka folií Freshie 1762 a plastové fólie (Eta, Praha, ČR)
- špičky eppendorf GELoader (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- ultrasonikátor UP200H (Hielsches, Teltow, Německo)
- ultrazvukový procesor UP100H (Hielscher, Berlín, Německo)
- zařízení pro izoelektrickou fokuzaci PROTEAN® IEF Cell (Bio-Rad, CA, USA)

- zdroj napětí Power-Pac 200 (Bio-Rad, CA, USA)
- zkumavky centrifugační, typ Falcon, 15 ml a 50 ml (Verkon, Praha)
- zobrazovací systém G:BOX Chemi XX6 (CCD kamera s GeneSys a GeneTools softwary) (Syngene, USA)
- zobrazovací systém ChemiDoc™ XRS+ (CCD kamera s ImageLab softwarem), (Bio-Rad, CA, USA)

3.2 Seznam chemikálií

- 3-[(3-Cholamidopropyl)dimethyl-ammonio]-1-propansulfonat – CHAPS (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- agaróza (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- akrylamid (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- bromfenolová modř (Lachema, Neratovice, ČR)
- butanol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- citronan sodný (Penta, Chrudim, ČR)
- Coomassie Blue G-250 Stain (Bio-Rad, CA, USA)
- čisticí roztok Coulter CLENZ Cleaning Agent (Beckman Coulter, SA, Švédsko)
- destilovaná voda, redestilovaná voda
- DeStreak Reagent, hydroxyethyl disulfid (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Švédsko)
- dihydrogenfosforečnan draselný (Lach-Ner, Neratovice, ČR)
- dithiothreitol, DTT (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- dodecylsulfát sodný, SDS (Lachema, Neratovice, ČR)
- DPBS, Gibco (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)
- dusičnan stříbrný (Sigma-Aldrich, Chrudim, ČR)
- ethanol (Penta, Chrudim, ČR)
- fenylmethylsulfonyl fluorid, PMSF (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- glycerol (Penta, Chrudim, ČR)
- glycin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- hexakynoželezitan tridraselný (Penta, Chrudim ČR)
- hydrogenfosforečnan disodný dodekahydrát (Lach-Ner, Neratovice, ČR)
- hydroxid sodný (Penta, Chrudim, ČR)
- chlorid draselný (Penta, Chrudim, ČR)
- chlorid sodný (Lach-Ner, Neratovice, ČR)
- inaktivační médium (80% RPMI 1640, 20% FBS; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA; Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)
- jodacetamid, IAA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

- kultivační médium pro RPMI-8226 (90% RPMI 1640, 10% FBS, 2mM glutamin, penicilin 50 µl/ml, streptomycin 50 µl/ml; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA; Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)
- kultivační médium pro PC-3 (90% RPMI 1640, 10% FBS, penicilin 50 µl/ml, streptomycin 50 µl/ml; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA; Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)
- kyselina citronová bezvodá (Fluka, Buchs, Švýcarsko)
- kyselina octová 99% (Lach-Ner, Neratovice, ČR)
- methanol (Penta, Chrudim, ČR)
- minerální olej (Bio-Rad, CA, USA)
- močovina (Lach-Ner, Neratovice, ČR)
- N,N,N',N'-tetramethylethyldiamin, TEMED (Bio-Rad, CA, USA)
- N,N'-metylen-bis-akrylamid (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- peroxid vodíku (Penta, Chrudim, ČR)
- odtučněné sušené mléko (Aditiva CZ, Praha, ČR)
- peroxodisíran amonný, APS (Penta, Chrudim, ČR)
- protilátka anti-CA1 (původ králičí, TA326896, OriGene)
- protilátka anti-ENO1 (původ králičí, 80578-T52, Sino Biological)
- protilátka anti-human IgG (WM, HRP, původ kozí, A8667, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- protilátka anti-rabbit IgG (WM, HRP, původ kozí, A8275, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- síran železnatý heptahydrát (Lach-Ner, Neratovice, ČR)
- směs amfolytů Pharmalyte pH 3–10 pro IEF (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Švédsko)
- směs amfolytů Pharmalyte pH 8–10,5 pro IEF (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Švédsko)
- standard molekulových hmotností (10–250 kDa) Precision Plus Protein Dual Color Standards (Bio-Rad, CA, USA)
- substrát Clarity Western ECL (Enhanced Chemiluminescence, luminol, peroxid vodíku, Bio-Rad, CA, USA)
- thiomčovina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- thiosulfát sodný (Sigma, St. Luis, MO, USA)

- Tris(hydroxymethyl)aminomethan, TRIS (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Tween 20 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

3.3 Seznam biologického materiálu

3.3.1 Nádorové buněčné linie

- ANBL-6 (sbírka Biomedicínského centra Slovenské akademie věd)
- HEL (Leibniz Institute, DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH)
- PC-3 (sbírka Biomedicínského centra Slovenské akademie věd)
- RPMI-8226 (Leibniz Institute, DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH)

3.3.2 Vzorčky patientských sér

- sérum pacientky s mnohočetným myelomem s velmi silnou a specifickou imunoreaktivitou (Klinika hematologie a transfúziologie LF UK, SZU a UNB)
- séra dobrovolných dárců bez nádorového a autoimunitního onemocnění (Katedra biologických a biochemických věd Fakulty chemicko-technologické Univerzity Pardubice)
- séra pacientů s mnohočetným myelomem (Biobanka Kliniky hematonekologie Fakultní nemocnice v Ostravě)

3.4 Sérologická proteomová analýza (SERPA)

3.4.1 Příprava suché pelety buněk

Přístroje a pomůcky:

- analyzátor, centrifuga, pipety, zkumavky, kultivační lahvička

Reagencie a roztoky:

- inaktivační médium, kultivační médium, DPBS

Biologický materiál:

- nádorová buněčná linie

Pracovní postup:

Do připravené zkumavky se napipetují 3 ml inaktivačního média. Z tekutého dusíku se vyndají buňky, rozmrazí se ve vodní lázni a okamžitě se pipetou přenesou do zkumavky s inaktivačním médiem. Následuje odstředění při 1500 otáčkách/5 min, pak se odebere supernatant a vzniklá peleta se resuspenduje v 1 ml kultivačního média. Vše se přeneso do kultivační lahvičky, do které se napipetuje 9 ml kultivačního média. Kultivace probíhá 4 dny.

Po 4 dnech se do připravené zkumavky odebere veškeré médium a 3 ml DPBS se opláchne dno kultivační lahvičky, aby se z něj uvolnily přisedlé buňky, které se přidají se do připravené zkumavky. Opět se odstředí uje při 1500 otáčkách/5 min. Po odstředění se supernatant odstraní, k peletě se napipetuje 5 ml DPBS a resuspenduje se. Poté se odebere 100 μ l a buňky se spočítají na analyzátoru. Do kryozkumavky se přeneso 5 \times 10⁶ buněk (včetně DPBS). Obsah zkumavky se opět odstředí, DPBS se odpipetuje do odpadu a získá se peleta buněk. Ta se na závěr 3 \times ponoří do tekutého dusíku a uchovává se v -80 °C.

3.4.2 Příprava buněčného lyzátu

Přístroje a pomůcky:

- analytické váhy, vortex, sonikátor, minicentrifuga, pipety, zkumavky

Reagencie a roztoky:

- lyzační roztok (7M močovina, 2M thiomočovina, 4% CHAPS, 1% DTT, 0,2% Pharmalyte 3–10, 1mM PMSF)

Biologický materiál:

- suchá peleta buněk (5×10^6 buněk, uskladněno v kryozkumavce v $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$)

Pracovní postup:

Prvním krokem je příprava směsi, která následně slouží k přípravě kompletního lyzačního roztoku. 5 ml této směsi se skládá z 2,1 g močoviny, 0,76 g thiomočoviny a 0,2 g CHAPS. Po přípravě jsou udělány alikvoty a skladovány v $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Před přípravou buněčného lyzátu se alikvot rozmrazí a důkladně zvortexuje. Do zkumavky se naváží 0,004 g DTT, k němuž se napipetuje 400 μl rozmrazené směsi. Po rozpuštění DTT ve směsi se přidá 8 μl Pharmalyte 3–10 a 4 μl PMSF. Tímto je lyzační roztok kompletní a je již připraven k použití.

400 μl kompletního lyzačního roztoku se napipetuje do kryozkumavky se suchou peletou buněk. Pipetou se vše pečlivě promíchá a poté se veškerý obsah kryozkumavky přenesse do nové zkumavky. Následuje sonikace, jejímž cílem je rozrušení buněk pomocí ultrazvuku a uvolnění intracelulárního obsahu do roztoku. Před i po sonikaci se jehla sonikátoru omývá vodou a vzápětí ethanolem. Samotná sonikace probíhá za těchto podmínek: čas 17 s, amplituda 80 %, cyklus 1. Po sonikaci se zkumavka se vzorkem centrifuguje 10 min při 12 300 rpm. Získaný buněčný lyzát v podobě supernatantu se odpipetuje do nové zkumavky a původní zkumavka se zbylou peletou se zlikviduje. Buněčný lyzát je možné ihned použít k rehydrataci gelových stripů, případně uchovat v $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ pro pozdější použití.

3.4.3 Rehydratace gelových stripů**Přístroje a pomůcky:**

gelové stripy (Immobiline DryStrip, pH 3–10 NL, 7 cm), plastová kazetka, pinzety, stanice PROTEAN® IEF Cell

Reagencie a roztoky:

- rehydratační roztok (6M močovina, 2M thiomočovina, 4% CHAPS, 40mM Tris, 1,2% DeStreak, 1% bromfenolová modř)

- Pharmalyte 3–10
- Pharmalyte 8–10,5
- minerální olej

Biologický materiál:

- buněčný lyzát

Pracovní postup:

Na přípravu 5 ml rehydratačního roztoku, který se následně uchovává v alikvotech v $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, je potřeba 1,8 g močoviny, 0,76 g thiomočoviny, 0,2 g CHAPS, 0,024 g TRIS, 60 μl DeStreak a 10 μl bromfenolové modři. Do zkumavky se připraví směsný roztok dle Tabulky 5, jehož objem se odvíjí od počtu stripů.

Tabulka 5 – Příprava směsného roztoku na rehydrataci

Reagencie	Množství na 1 strip
Rehydratační roztok	80 μl
Buněčný lyzát	60 μl
Pharmalyte 3–10	1,3 μl
Pharmalyte 8–10,5	0,65 μl

Směsný roztok se napipetuje do jamek kazetky určené pro gelové stripy (120 μl směsného roztoku/1 jamka). Z gelových stripů se pomocí pinzety odstraní ochranná folie a stripy se vkládají gelovou stranou směrem dolů do jamek se směsným roztokem. Poté se gelové stripy převrství 1 ml minerálního oleje. Je potřeba zkontrolovat, zda se pod gelovými stripy nevyskytují vzduchové bubliny. V případě, že ano, je nezbytné je odstranit opatrným poklepáním pinzety na horní stranu stripu. Takto připravená kazetka s gelovými stripy se umístí do přístroje PROTEAN® IEF Cell, na němž se nastaví: Rehydratation → Passive ($20\text{ }^{\circ}\text{C}$, bez proudu) → START. Rehydratace gelových stripů probíhá 16–18 hodin, zahajuje se proto kolem 15. hodiny odpoledne, probíhá přes noc a následující den ráno se pokračuje v izoelektrické fokuzaci.

3.4.4 Izoelektrická fokuzace

Přístroje a pomůcky:

gelové stripy (Immobiline DryStrip, pH 3–10 NL, 7 cm), kazetka pro IEF, papírové proužky pro IEF, stanice PROTEAN® IEF Cell, pinzety

Reagencie a roztoky:

- destilovaná voda
- minerální olej

Pracovní postup:

Papírové proužky pro IEF se navlhčí v destilované vodě a položí se na drátky elektrod v kazetce pro IEF. Stripy po rehydrataci se opláchnou destilovanou vodou a opatrně se osuší filtračním papírem tak, aby gelová strana zůstala nedotčená. Poté se stripy vkládají gelem směrem dolů do kazetky pro IEF na elektrody s papírovými proužky. Na závěr se převrství minerálním olejem (1 ml/1 jamka) a provede se kontrola, že pod stripy nejsou vzduchové bubliny. Kazetka se uzavře víkem a umístí se do stanice PROTEAN® IEF Cell, kde se nastaví: Stored method → 3–10 rychle → Run → počet stripů → 75 μ A/gel → START.

Proces IEF probíhá cca 7,5–8 h, přičemž po 7,5 h je nutné hlídat celkové Vh a při hodnotách 9 000 až 10 000 Vh stanici vypnout a IEF ukončit. Známkou správně proběhlé IEF je žluté zbarvení konců stripů. Stripy se opláchnou destilovanou vodou, opatrně, ale důkladně se osuší filtračním papírem a vloží se (po 4 ks) do čisté bílé kazetky. Kazetka se stripy se popíše, zabalí do fólie a uchovává se v -20 °C.

3.4.5 Dvourozměrná gelová elektroforéza

Přístroje a pomůcky:

1 mm skla, 1 mm hřebínky pro 2D ELFO, stojánky na skla, aparatura pro přípravu gelů, parafilm, pipety, zkumavky, aparatura pro ELFO, gelové stripy po IEF, pinzety, nůžky, kovová špachtle

Reagencie a roztoky:

- destilovaná voda

- roztok A (30% směs akrylamidu a bisakrylamidu)
- roztok B (1,5M Tris-HCl pH = 8,8)
- roztok C (1,0M Tris-HCl pH = 6,8)
- roztok D (10% roztok dodecylsírany sodného)
- roztok E (10% roztok persírany amonného)
- TEMED
- ekvilibrační roztok (6M močovina, 30% glycerol, 0,07M SDS, 1,5M Tris-HCl pH = 8,8)
- 1% DTT (s ekvilibračním roztokem)
- 4% IAA (s ekvilibračním roztokem)
- 0,5% agaróza
- elektrodový pufr (0,025M Tris, 0,192M glycin, 0,1% SDS, pH = 8,3–8,6)
- standard molekulových hmotností Precision Plus Protein Dual Color Standards

Pracovní postup:

Prvním krokem je příprava roztoků, z nichž se připravují gely na elektroforézu (viz Tabulka 6). Roztoky A, B, C a D se uchovávají v lednici, roztok E zamražený v alikvotech v $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Před přípravou gelů je nutné všechny roztoky vytemperovat na laboratorní teplotu.

Tabulka 6 – Příprava roztoků na gely

Roztok A	11,68 g akrylamid, 0,32 g bisakrylamid, 12 ml dH ₂ O; 30 min na třepačce, nabobtná; doplnit dH ₂ O do 40 ml
Roztok B	7,26 g Tris; doplnit dH ₂ O do 40 ml, upravit pH pomocí 6M HCl na 8,8
Roztok C	4,84 g Tris; doplnit dH ₂ O do 40 ml, upravit pH pomocí 6M HCl na 6,8
Roztok D	1 g SDS; doplnit dH ₂ O do 10 ml
Roztok E	0,5 g APS; doplnit dH ₂ O do 5 ml

Po sestavení aparatury pro přípravu gelů se již připravují samotné gely podle Tabulky 7. Nejprve se připraví 12% dělicí gel, který se po nanesení mezi skla převrství butanolem a nechává se 30–40 min polymerovat. Poté se butanol odsaje filtračním papírem a mezi skla se až po horní okraj pipetuje zaostřovací gel, do něhož se vkládá hřebínek a nechává se polymerovat 15–20 min. Připravené gely se používají ihned, případně je možné je zabalit do mokrých papírových utěrek a fólie a uchovat v lednici do příště.

Tabulka 7 – Příprava směsného roztoku na gely

Reagencie	12% dělicí gel (množství na 2 gely)	Zaostřovací gel
Destilovaná voda	3,36 ml	2,1 ml
Roztok A	4 ml	0,5 ml
Roztok B	2,5 ml	–
Roztok C	–	0,375 ml
Roztok D	0,1 ml	0,03 ml
Roztok E	0,1 ml	0,03 ml
TEMED	0,004 ml	0,003 ml

Před samotnou ELFO je nezbytné provést ekvilibraci gelových stripů, k čemuž je potřeba připravit ekvilibrační roztok (18 g močoviny, 1 g SDS, 15 ml glycerolu, 1,67 ml roztoku B; doplnit dH₂O do 50 ml). Dále se do jedné zkumavky naváží 0,1 g DTT, do druhé 0,4 g IAA a obě zkumavky se doplní do 10 ml ekvilibračním roztokem. Je potřeba připravit také 2 l elektrodového pufru (3,03 g Tris-HCl, 10 g SDS, 144 g glycinu; doplnit dH₂O do 1 l). Stripy po IEF se nechají rozmrazit. Do čisté bílé kazetky se napipetuje 1,5 ml roztoku DTT/jamka/strip a následně se do jamek s roztokem DTT pinzetou vkládají stripy gelovou stranou směrem dolů. Inkubace probíhá 15 min na třepačce. Poté je do dalších jamek napipetováno 1,5 ml roztoku IAA/jamka/strip, stripy jsou opláchnuty dH₂O, osušeny filtračním papírem a vkládány do jamek s roztokem IAA. Inkubace probíhá 15 min na třepačce a destička se přikrývá alobalem. Zatímco probíhá inkubace, připravuje se elektroforetická vana, do níž se umístí gely, jamky se promyjí elektrodovým pufrem a vysuší se filtračním papírem. Je potřeba také rozehrát agarózu. Po inkubaci s IAA jsou stripy opět opláchnuty dH₂O a ponořeny do jamek s elektrodovým pufrem. Konce gelových stripů se zastříhnou nůžkami v místě, kde končí gel, a pinzetou se vkládají na gely připravené v elektroforetické vaně, přičemž jsou orientovány tak, že + konec stripu je vždy u jamky na marker a gelová strana stripu směřuje ke kratšímu sklu. Poté jsou gelové stripy převrstveny 250 µl rozehráté 0,5% agarózy. Ta během chvíle ztuhne a elektrodová vana se po rysku naplní elektrodovým pufrem. Do jamky na marker se napipetují 4 µl standardu molekulových hmotností. Elektroforetická vana se uzavře víkem a připojí se ke zdroji napětí, na němž se nastaví: 0,03 A/1 gel, 60 V, 5 min → RUN. Po 5 min se napětí nastaví na 180 V a čas na 50 min. Po uplynutí této doby se elektroforetická separace kontroluje a ukončuje se ve chvíli, kdy elektroforetické čelo téměř dosáhne konce gelu.

3.4.6 Semi-dry Western blot

Přístroje a pomůcky:

blotovací zařízení, nitrocelulózová membrána, gely po ELFO, tlustý filtrační papír, Petriho misky, pinzety, špachtle

Reagencie a roztoky:

- transferový pufr (25mM Tris, 192mM glycin, 20% methanol)
- destilovaná voda

Pracovní postup:

Je potřeba připravit 1 l transferového pufru (3,03 g Tris, 14,4 g glycin, 200 ml methanol; doplnit dH₂O do 1 l). Nitrocelulózová membrána se nastříhá podle šablony a tužkou se v rohu popíše. Následně se membrány a tlusté filtrační papíry zalijí transferovým pufrem. Jakmile se ukončí elektroforéza, skla se oddělí pomocí špachtle a gely se přenesou do Petriho misek s transferovým pufrem. Tlustý filtrační papír se přiloží na spodní elektrodu v blotovacím zařízení, na něj se pinzetou pokládají nitrocelulózové membrány a následně gely. Poslední vrstvou je opět tlustý filtrační papír. Vše se přiklopí horní elektrodou, blotovací zařízení se uzavře víkem a připojí se ke zdroji, na němž se nastaví: 0,3 A/1 gel, 12 V, 70 min. Po ukončení blotování se gely i membrány přendají do Petriho misek s destilovanou vodou, v níž se promývají 3 × 5 min. Následuje kontrola úspěšnosti přenosu proteinů z gelu na nitrocelulózovou membránu barvením.

3.4.7 Barvení proteinů na nitrocelulózové membráně

Přístroje a pomůcky:

nitrocelulózové membrány po Western blotu, Petriho misky, pinzety

Reagencie a roztoky:

- destilovaná voda
- barvicí roztok (0,2% AgNO₃, 0,8% FeSO₄, 2% citrát sodný)
- odbarvovací roztok (50mM thiosulfát sodný, 15mM hexakynoželezitan draselný)

Pracovní postup:

Je zapotřebí připravit barvicí roztok (0,17 g AgNO₃, 0,8 g FeSO₄, 2 g citrát sodný; doplnit do 100 ml destilovanou vodou) a odbarvovací roztok (1,24 g thiosulfát sodný, 0,494 g hexakynoželezitan draselný; doplnit do 100 ml destilovanou vodou). Membrány se s barvicím roztokem inkubují 6 min v Petriho miskách na třepačce, čímž dojde ke zviditelnění proteomové mapy. Poté se membrány se promývají destilovanou vodou tak dlouho, dokud voda není čistá. Membrány se vyfotí pomocí G:BOX stanice v programu GeneSys. Po focení se odbarvují odbarvovacím roztokem a následně se opět několikrát promývají destilovanou vodou. Následuje další krok celého procesu, a tím je imunodetekce.

3.4.8 Barvení proteinů na gelu**Přístroje a pomůcky:**

gely po Western blotu, Petriho misky, pinzety

Reagencie a roztoky:

- destilovaná voda
- fixační roztok (5% kyselina octová, 50% ethanol, 10% glutaraldehyd)
- Coomassie Blue

Pracovní postup:

Gely se nejprve převrství fixačním roztokem, v němž se ponechávají 15 min. Následně se inkubují 15 min s barvicím roztokem Coomassie Blue. Poté se membrány promývají destilovanou vodou tak dlouho, dokud voda není čistá. Gely se vyfotí pomocí G:BOX stanice v programu GeneSys. Po focení gely již nejsou v dalším postupu potřeba a mohou se zlikvidovat.

3.4.9 Imunodetekce reaktivních proteinových spotů

1) Automatizovaná imunodetekce na promývací stanici FlexiWash FW400

Přístroje a pomůcky:

- promývací stanice FlexiWash FW400, plastové misky, pinzety, nitrocelulózové membrány s proteomovou mapou

Reagencie a roztoky:

- PBS-T pufr (137mM NaCl, 2,7mM KCl, 1,47mM KH₂PO₄, 8,1mM Na₂HPO₄ × 12H₂O, 25% Tween 20)
- 5% odtučněné sušené mléko
- konjugát (anti-human IgG, anti-rabbit IgG; ředění 1 : 5000)
- chemiluminiscenční substrát Clarity Western ECL
- roztoky pro promývací stanici FlexiWash FW400: redestilovaná voda, PBS-T pufr, 20% ethanol, 8% peroxid vodíku, čistící roztok Coulter CLENZ Cleaning Agent

Biologický materiál:

- pacientské sérum (ředění 1 : 500; silně imunoreaktivní sérum ředění 1 : 1500)

Pracovní postup:

Je potřeba připravit 3 l PBS-T pufru (na 1 l: 8g NaCl, 0,2 g KCl, 0,2 g KH₂PO₄, 2,9 g Na₂HPO₄ × 12 H₂O, 5 ml 25% Tween 20; doplnit dH₂O do 1 l) a blokovací roztok (15 g odtučněného sušeného mléka rozpuštěného v 300 ml PBS-T pufru). Promývací stanice se promyje čistícím roztokem, následně několikrát redestilovanou vodou a na závěr PBS-T pufrem. Membrány se pinzetou přendají do plastových misek a 2× se promyjí PBS-T pufrem. Do kádinek se nalije promývací roztok (PBS-T pufr), blokovací roztok (mléko) a do zkumavek se nachystá sekundární protilátka (50 ml mléka s konjugátem v množství dle požadovaného ředění) a primární protilátka (12 ml mléka s pacientským sérem či s komerční protilátkou v množství dle požadovaného ředění). Do všech nádob se ponoří jednotlivé hadičky promývací stanice, zvolí se nastavený program a stanice se spustí. Proces imunodetekce tímto způsobem trvá téměř 18 hodin, stanice se proto spouští v odpoledních hodinách, aby se v práci mohlo pokračovat další den ráno.

Tabulka 8 – Nastavení promývací stanice FlexiWash

Reagencie	Objem pro jednotlivé hadičky (ml)	Inkubační čas (min)	Počet opakování
A (blokovací roztok)	10	60	1×
A (blokovací roztok)	1	1	1×
B (mléko s primární protilátkou)	10	480	1×
W (PBS-T pufr)	10	5	4×
C (mléko se sekundární protilátkou)	10	60	1×
W (PBS-T pufr)	10	50	9×

Následující den po ukončení práce na promývací stanici je nezbytné provést její údržbu, a to promytím redestilovanou vodou a na závěr ethanolem. S membránami se pokračuje chemiluminiscenční detekcí s ECL substrátem. Roztok ECL substrátu se připravuje tak, že se v poměru 1 : 1 smíchá luminol a peroxid vodíku (jsou potřeba 2 ml ECL substrátu/1 membrána). Zkumavka s připraveným roztokem ECL substrátu by měla být zabalená v alobalu a v laboratoři by se po dobu manipulace s ním mělo udržovat přítmí. Membrána se s ECL substrátem inkubuje 30 s, poté se fotí ve stanici G:BOX a spouští se program GeneSys, v němž se zvolí přednastavená chemiluminiscenční detekce. Vyhodnocení nafocených snímků se poté provádí v programu GeneTools.

2) Manuální imunodetekce

Přístroje a pomůcky:

- plastové misky, pinzety, nitrocelulózkové membrány s proteomovou mapou, svářečka fólií, fólie

Reagencie a roztoky:

- PBS-T pufr (137mM NaCl, 2,7mM KCl, 1,47mM KH₂PO₄, 8,1mM Na₂HPO₄ × 12 H₂O, 25% Tween 20)
- 5% odtučněné sušené mléko
- konjugát (anti-human IgG, anti-rabbit IgG; ředění 1 : 5000)
- komerční primární protilátky (anti-ENO1, anti-CA1; ředění 1 : 1000)
- chemiluminiscenční substrát Clarity Western ECL

Biologický materiál:

- pacientské sérum (ředění 1 : 500; silně imunoreaktivní sérum ředění 1 : 1500)

Pracovní postup:

Je potřeba připravit 3 l PBS-T pufru (na 1 l: 8g NaCl, 0,2 g KCl, 0,2 g KH₂PO₄, 2,9 g Na₂HPO₄ × 12 H₂O, 5 ml 25% Tween 20, dopnit dH₂O do 1 l) a blokovací roztok (15 g odtučněného sušeného mléka rozpuštěného v 300 ml PBS-T pufru). Membrány se pinzetou přendají do plastových misek a 2× se promyjí PBS-T pufrem. Následně se inkubují s mlékem 1 h na třepačce. Poté se promývají PBS-T pufrem 2 × 10 min. Připraví se roztok primární protilátky (1,5 ml mléka s pacientským sérem či s komerční protilátkou v množství dle požadovaného ředění) a roztok sekundární protilátky (40 ml mléka s konjugátem v množství dle požadovaného ředění). Fólie se nastříhá na obdélníky a po jedné straně se svaří. Do takto připravených fólií se pinzetou vkládají membrány a postupně se zatavují všechny strany. Před zatavením poslední strany se do fólie s membránou napipetuje roztok primární protilátky. Kompletně zatavené fólie s membránami se izolepou přilepí na rotátor a ten se vloží do lednice, kde probíhá inkubace membrán s primární protilátkou přes noc (16 hodin). Následující den ráno se fólie rozstříhají a membrány se pinzetou přendají do plastových misek, v nichž se 4 × 5 min promyjí PBS-T pufrem. Poté se inkubují 1 h se sekundární protilátkou (10 ml mléka s konjugátem/1 membrána) na třepačce za laboratorní teploty. Po uplynutí této hodinové inkubace se promývají 6 × 5 min PBS-T pufrem. Následující chemiluminiscenční detekce s ECL substrátem probíhá stejně jako u automatizované imunodetekce na promývací stanici FlexiWash (popsáno výše).

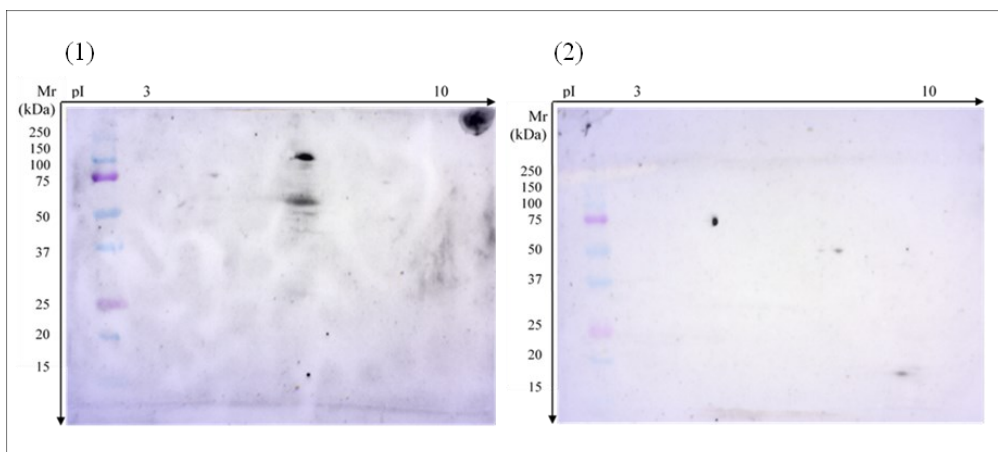
4 VÝSLEDKY A DISKUZE

Experimenty prováděné v rámci této diplomové práce byly rozděleny do tří částí, které zahrnují porovnání dvou způsobů imunodetekce, komparativní proteomovou analýzu vybraných nádorových buněčných linií a imunoproteomické profilování vzorků sér pacientů s mnohočetným myelomem.

4.1 Porovnání dvou způsobů imunodetekce

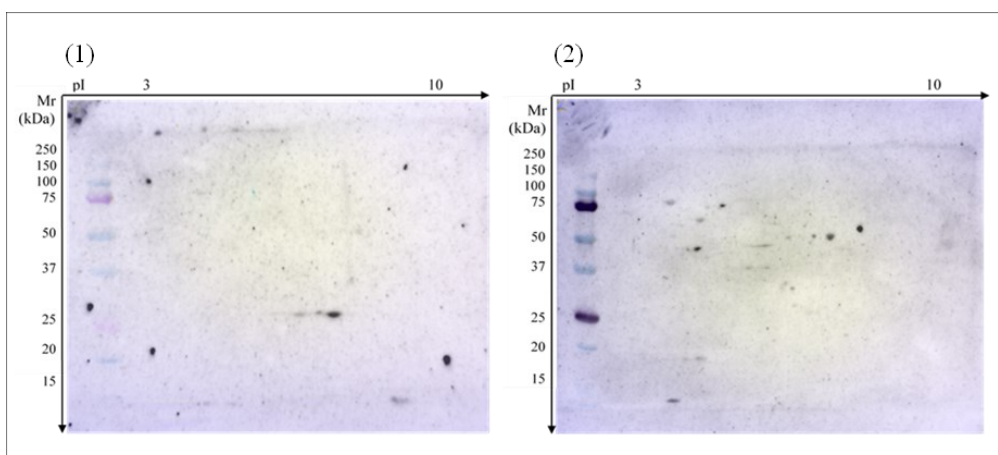
Ačkoliv byla převzata již zavedená metodika, bylo nutné vhodnost některých kroků ověřit a případně je optimalizovat. Imunodetekci je možné provést dvěma různými způsoby, a to buď automatizovaně na promývací stanici FlexiWash FW400, nebo manuálně. Oba postupy mají své výhody i nevýhody. Cílem této části bylo zhodnotit, který z těchto dvou způsobů bude pro následující analýzy vhodnější.

Na následujících obrázcích jsou výsledky sérologické proteomové analýzy (SERPA) v rámci níž byly proteomové mapy buněčné linie RPMI-8226 inkubovány se vzorky sér pacientů s mnohočetným myelomem (v ředění 1 : 500) a konjugátem anti-human IgG (v ředění 1 : 5000). Metoda SERPA včetně schématu a kompletní výsledky analýz těchto patientských sér jsou popsány v kapitole 4.3 Imunoproteomické profilování vzorků sér pacientů s mnohočetným myelomem. Imunodetekce byla provedena vždy oběma možnými způsoby, tedy jak automatizovaně, tak manuálně. Na nitrocelulózových membránách, u nichž byla imunodetekce provedena manuálně, byly pozorovány imunoreaktivní spoty v oblasti předpokládaného výskytu enolázy 1, zatímco na nitrocelulózových membránách, u nichž byla provedena automatizovaná imunodetekce, byly imunoreaktivní spoty v tomto místě pozorovány buď velmi slabě, nebo vůbec.



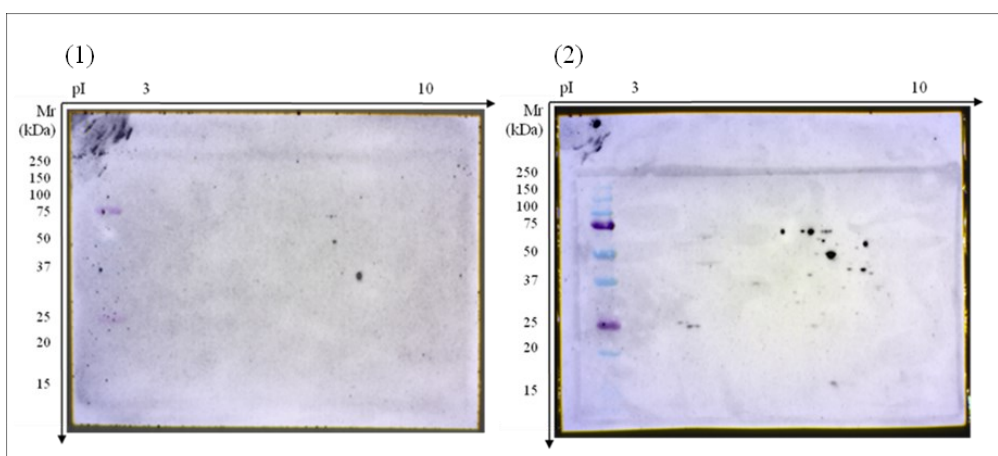
Obrázek 32 – Porovnání dvou způsobů imunodetekce, pacient č. 3, M-20-034

(1) automatizovaná imunodetekce na promývací stanici FlexiWash FW400; (2) manuální imunodetekce



Obrázek 33 – Porovnání dvou způsobů imunodetekce, pacient č. 4, M-21-025

(1) automatizovaná imunodetekce na promývací stanici FlexiWash FW400; (2) manuální imunodetekce



Obrázek 34 – Porovnání dvou způsobů imunodetekce, pacient č. 9, M-18-136

(1) automatizovaná imunodetekce na promývací stanici FlexiWash FW400; (2) manuální imunodetekce

Výhodou automatizované imunodetekce na promývací stanici FlexiWash F400 je menší časová a samozřejmě i pracovní náročnost, neboť odpadá opakované manuální promývání membrán a manipulaci s nimi. Díky tomu se dá považovat i za méně náchylnou k chybovosti. Nevýhodou je nutnost péče o promývací stanici, u níž je nezbytné vždy před i po použití provést důkladnou údržbu, neboť hrozí její znečištění biofilmem. Další nevýhodou je vyšší spotřeba reagensů (včetně biologického materiálu) v porovnání s manuální imunodetekcí, přičemž je zapotřebí kupovat speciální čistící roztok. Bylo také zjištěno, že odsávání promývací stanice není dokonalé, a to má za následek mísení, a tím i ředění reagensů z jednotlivých promývacích kroků, což rozhodně není žádoucí. Největší shledanou nevýhodou automatizované imunodetekce v porovnání s manuální imunodetekcí je nižší senzitivita, která je limitující zejména při analýze slabě imunoreaktivních sér (viz obrázky výše). Svou roli pravděpodobně sehrává to, že při automatizované imunodetekci probíhá inkubace membrány s primární protilátkou za laboratorní teploty, zatímco při manuální imunodetekci se membrána s primární protilátkou inkubuje v lednici při 4 °C. Právě tato nevýhoda automatizovaného postupu rozhodla o tom, že v rámci všech experimentů pro tuto diplomovou práci byla nakonec využívána manuální imunodetekce.

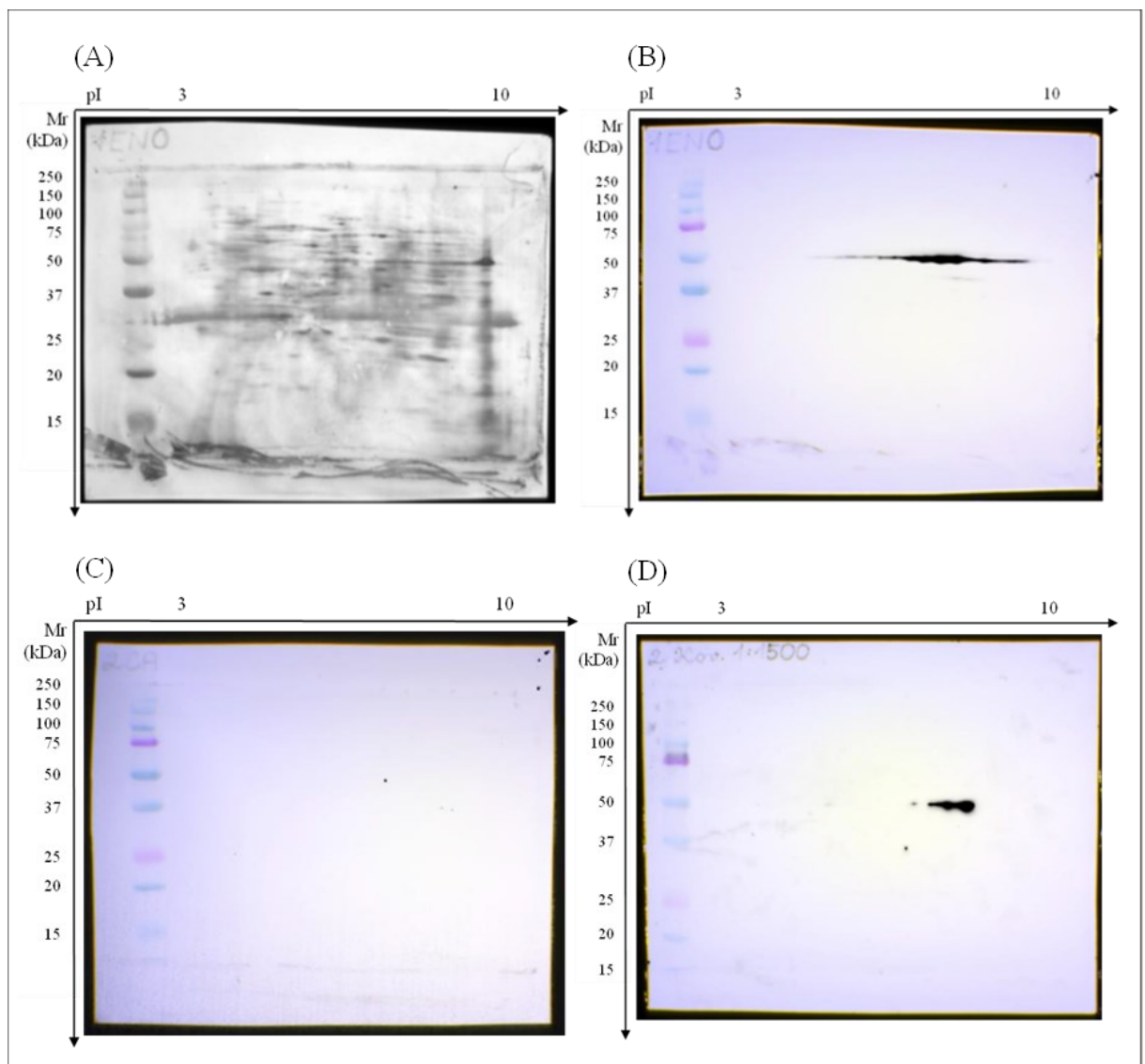
Největší výhodou manuální imunodetekce v porovnání s automatizovanou imunodetekcí je, jak již bylo zmíněno, vyšší senzitivita, která umožňuje analyzovat i slabě imunoreaktivní séra. Další značnou výhodou manuálního postupu je nižší spotřeba reagensů (včetně biologického materiálu). Manuální postup je ovšem časově náročnější a zahrnuje opakované manuální promývání membrán, jejich zatahování do fólií a upevňování k rotátoru. Nevýhodou je i to, že zatímco při automatizovaném postupu se následující den ráno rovnou pokračuje chemiluminiscenční detekcí, při manuálním postupu samotné chemiluminiscenční detekci předchází několik promývacích kroků včetně inkubace s konjugátem.

4.2 Komparativní proteomová analýza vybraných nádorových buněčných linií

Metodou SERPA, jejíž schéma je uvedeno v následující kapitole 4.3 Imunoproteomické profilování vzorků sér pacientů s mnohočetným myelomem, byly zhotoveny proteomové mapy čtyř nádorových buněčných linií: RPMI-8226, HEL, PC-3 a ANBL-6. Ze suché pelety buněk byl připraven buněčný lyzát, který byl použit pro rehydrataci gelových stripů. Následovala izoelektrická fokuzace těchto gelových stripů, kdy se proteiny z dané buněčné linie rozdělily v prvním rozměru podle svého izoelektrického bodu. Poté byla provedena elektroforetická separace, kdy proteiny z gelového stripu přestoupily do 12% akrylamidového gelu a rozdělily se ve druhém směru podle své molekulové hmotnosti. Pomocí Western blotu pak byly proteiny z gelu přeneseny na nitrocelulózovou membránu. Tím byla vytvořena proteomová mapa dané buněčné linie. Po Western blotu byla nitrocelulózová membrána obarvena stříbrem a gel Coomassie Blue, aby bylo možné zhodnotit úspěšnost přenosu. V poslední fázi byly v rámci imunodetekce nitrocelulózové membrány s proteomovými mapami inkubovány nejprve s komerčními protilátkami proti enzymům ENO1 a CA1 (v ředění 1 : 1000) a se sérem pacientky s mnohočetným myelomem (v ředění 1 : 1500), které vykazuje velmi silnou a specifickou imunoreaktivitu v porovnání s jinými testovanými patientskými séry. Následně probíhala inkubace s konjugátem (v ředění 1 : 5000) anti-rabbit IgG (při použití komerčních protilátek) nebo anti-human IgG (při použití patientského séra) a s roztokem ECL pro chemiluminiscenční detekci. Enoláza 1 by se na proteomové mapě měla vyskytovat v oblasti s molekulovou hmotností 47,169 kDa a izoelektrickým bodem 7,01 [128], karbonická anhydráza v oblasti s molekulovou hmotností 28,870 kDa a izoelektrickým bodem 6,59 [129]. Cílem této části diplomové práce bylo zjistit, které z vybraných nádorových buněčných linií jsou vhodné ke sledování výskytu autoproti látek proti enzymům enoláza 1 a karbonická anhydráza 1 v sérech pacientů s mnohočetným myelomem.

4.2.1 RPMI-8226

Buněčná linie RPMI-8226 je lidská B-lymfocytární buněčná linie. Imunodetekcí proteomových map s komerčními protilátkami anti-ENO1 a anti-CA1 bylo zjištěno, že buněčná linie RPMI-8226 exprimuje enzym enoláza 1, ale enzym karbonická anhydráza 1 nikoli. Po imunodetekci proteomové mapy této buněčné linie se sérum pacientky s mnohočetným myelomem byla taktéž pozorována reaktivita v oblasti předpokládaného výskytu ENO1.

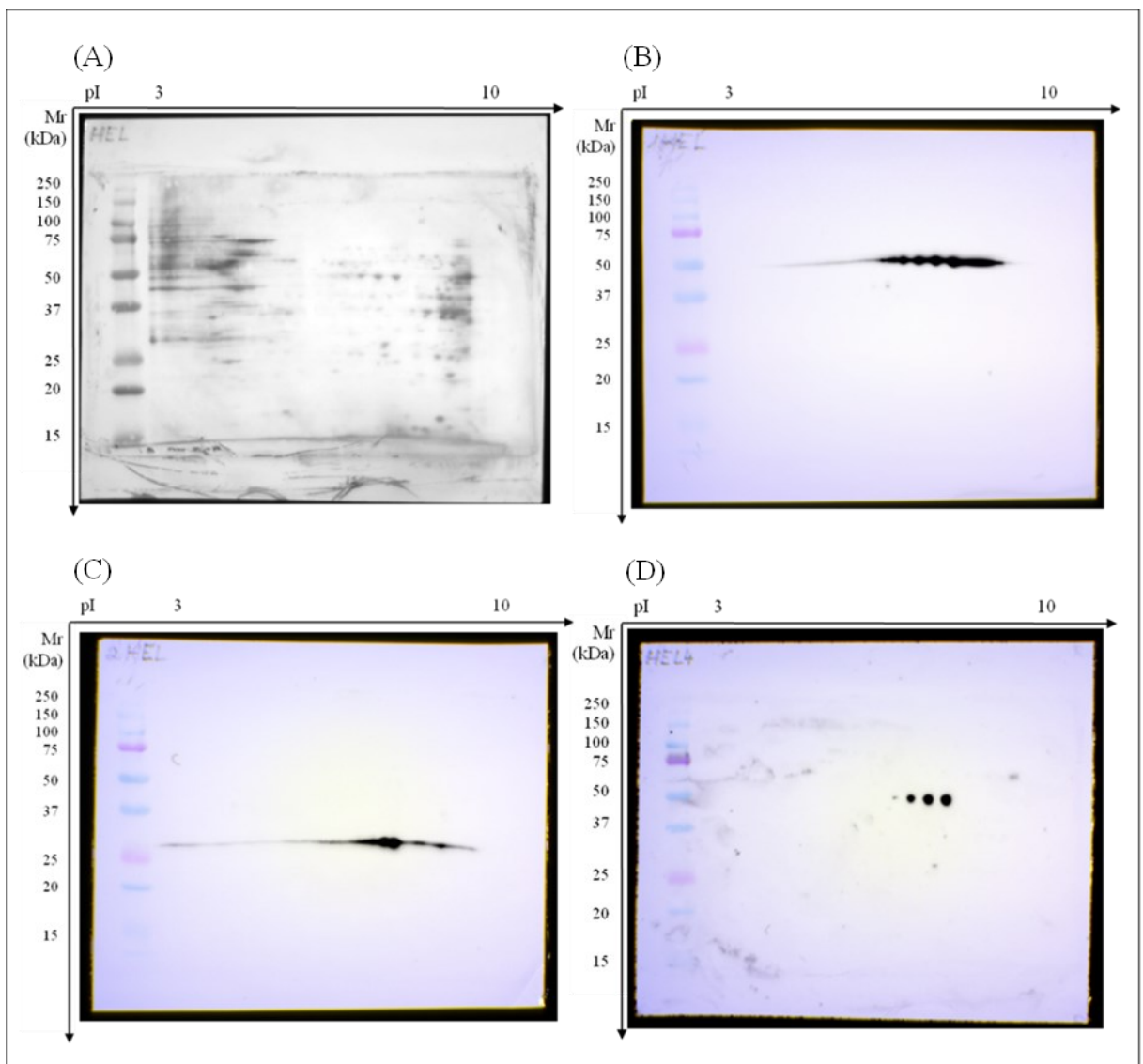


Obrázek 35 – Komparativní proteomová analýza, nádorová buněčná linie RPMI-8226

- (A) proteomová mapa nádorové buněčné linie RPMI-8226, barvení stříbrem
- (B) výsledek SERPA s komerční protilátkou anti-ENO1
- (C) výsledek SERPA s komerční protilátkou anti-CA1
- (D) výsledek SERPA se sérum pacientky s mnohočetným myelomem

4.2.2 HEL

Buněčná linie HEL je lidská erytroblastová buněčná linie. Imunodetekcí proteomových map s komerčními protilátkami anti-ENO1 a anti-CA1 bylo zjištěno, že buněčná linie HEL exprimuje enzym enoláza 1 i enzym karbonická anhydráza 1. Po imunodetekci proteomové mapy této buněčné linie se sérem pacientky s mnohočetným myelomem byla taktéž pozorována reaktivita v oblasti předpokládaného výskytu ENO1.

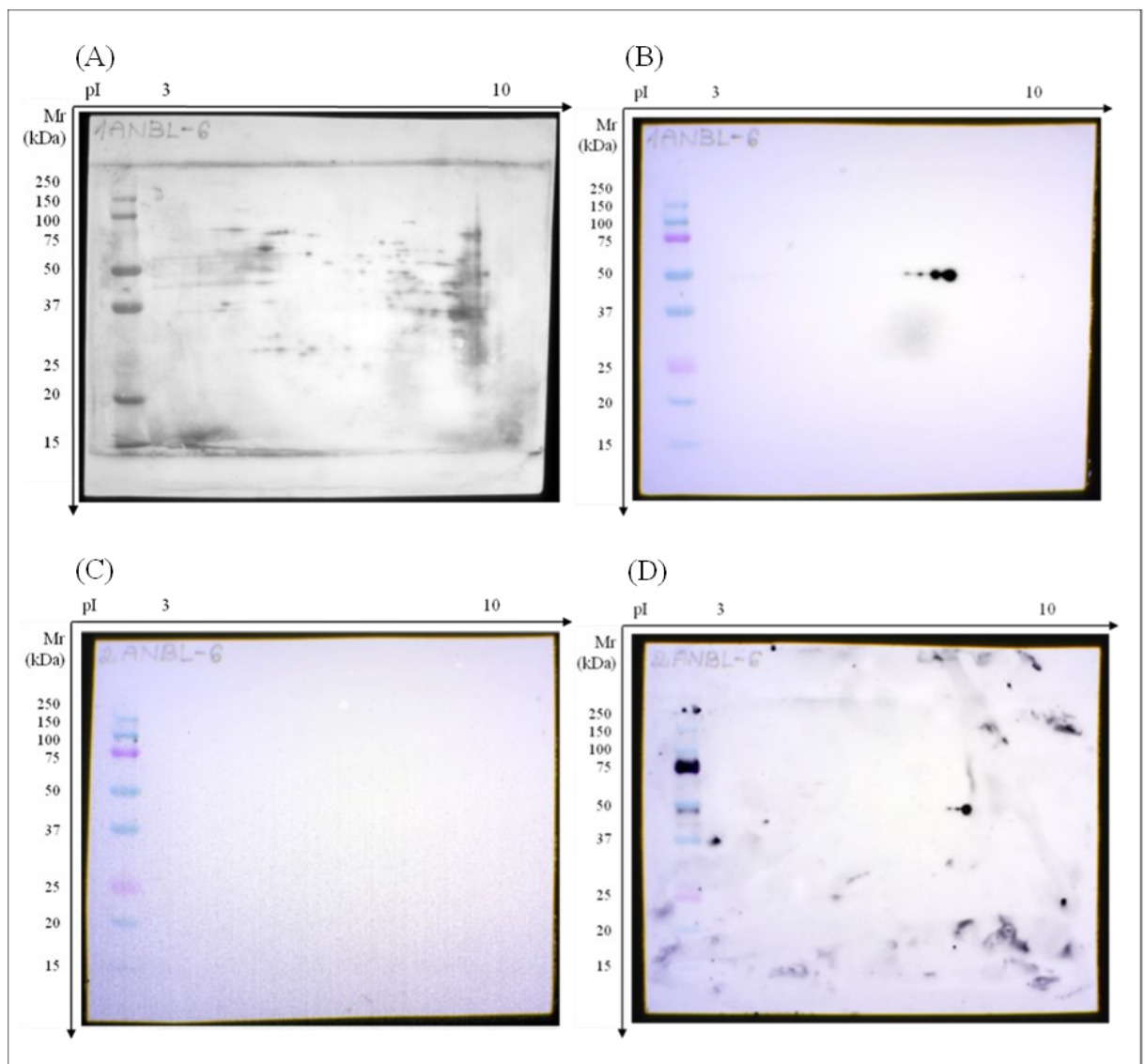


Obrázek 36 – Komparativní proteomová analýza, nádorová buněčná linie HEL

- (A) proteomová mapa nádorové buněčné linie HEL, barvení stříbrem
- (B) výsledek SERPA s komerční protilátkou anti-ENO1
- (C) výsledek SERPA s komerční protilátkou anti-CA1
- (D) výsledek SERPA se sérem pacientky s mnohočetným myelomem

4.2.3 ANBL-6

Buněčná linie ANBL-6 je lidská myelomová buněčná linie. Imunodetekcí proteomových map s komerčními protilátkami anti-ENO1 a anti-CA1 bylo zjištěno, že buněčná linie ANBL-6 exprimuje enzym enoláza 1, ale enzym karbonická anhydráza 1 nikoli. Po imunodetekci proteomové mapy této buněčné linie se sérem pacientky s mnohočetným myelomem byla taktéž pozorována reaktivita v oblasti předpokládaného výskytu ENO1.

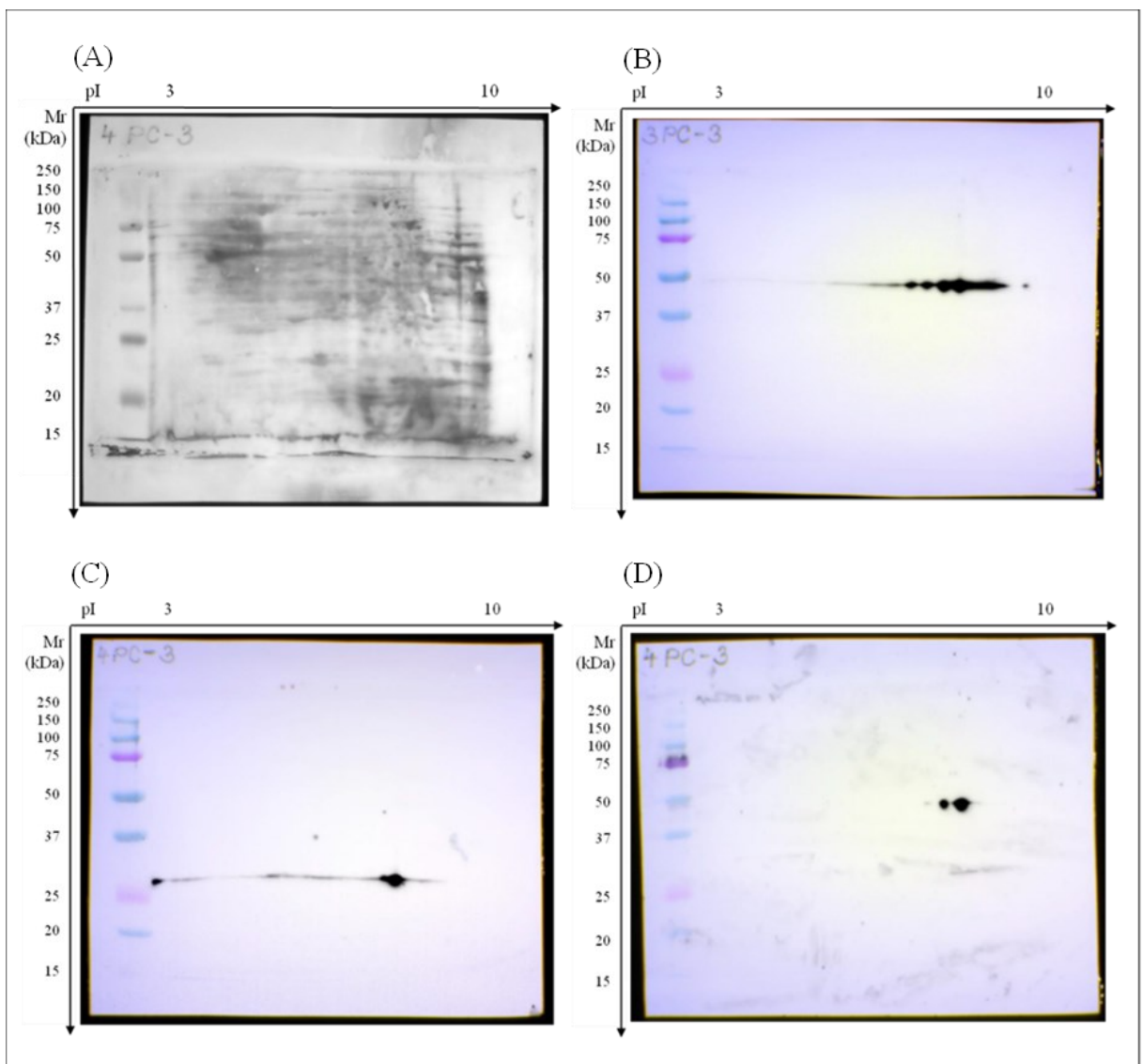


Obrázek 37 – Komparativní proteomová analýza, nádorová buněčná linie ANBL-6

- (A) proteomová mapa nádorové buněčné linie ANBL-6, barvení stříbrem
- (B) výsledek SERPA s komerční protilátkou anti-ENO1
- (C) výsledek SERPA s komerční protilátkou anti-CA1
- (D) výsledek SERPA se sérem pacientky s mnohočetným myelomem

4.2.4 PC-3

Buněčná linie PC-3 je lidská buněčná linie karcinomu prostaty. Imunodetekcí proteomových map s komerčními protilátkami anti-ENO1 a anti-CA1 bylo zjištěno, že buněčná linie PC-3 exprimuje enzym enoláza 1 i enzym karbonická anhydráza 1. Po imunodetekci proteomové mapy této buněčné linie se sérem pacientky s mnohočetným myelomem byla taktéž pozorována reaktivita v oblasti předpokládaného výskytu ENO1.



Obrázek 38 – Komparativní proteomová analýza, nádorová buněčná linie PC-3

- (A) proteomová mapa nádorové buněčné linie PC-3, barvení stříbrem
- (B) výsledek SERPA s komerční protilátkou anti-ENO1
- (C) výsledek SERPA s komerční protilátkou anti-CA1
- (D) výsledek SERPA se sérem pacientky s mnohočetným myelomem

Byly zhodnoceny celkem čtyři národové buněčné linie, které byly vybrány na základě dostupných informací z databází (např. Atlasu lidských proteinů, The Human Protein Atlas) a článků [96]. Hlavním výběrovým kritériem bylo to, zda vytipované buněčné linie exprimují primárně enolázu 1 a případně i karbonickou anhydrázu 1.

V nádorových buněčných liniích HEL a PC-3 byla pomocí specifických komerčních protilátek prokázána přítomnost obou cílových struktur, tedy jak enolázy 1, tak karbonické anhydrázy 1. Nález imunoreaktivního spotu na proteomové mapě nádorové buněčné linie PC-3 po imunodetekci s komerční anti-CA1 protilátkou byl poměrně překvapivý, neboť podle Atlasu lidských proteinů (The Human Protein Atlas) nádorová buněčná linie PC-3 karbonickou anhydrázu 1 neexprimuje [91]. V nádorových buněčných liniích RPMI-8226 a ANBL-6 byla prokázána pouze přítomnost enolázy 1, karbonická anhydráza 1 prokázána nebyla. Ve všech zkoumaných nádorových buněčných liniích byla po imunodetekci se sérem pacientky s mnohočetným myelomem, které vykazuje velmi silnou a specifickou imunoreaktivitu v porovnání s jinými testovanými patientskými séry a slouží jako pozitivní kontrola (viz kapitola 4.3.1 Kontroly), zaznamenána reaktivita v oblasti předpokládaného výskytu enolázy 1.

Na základě dat získaných z provedených analýz lze pro průkaz autoreaktivních proteinů v séru pacientů s mnohočetným myelomem metodou SERPA doporučit nádorovou buněčnou linii RPMI-8226. U té totiž byla prokázána výrazná reaktivita jak s komerční anti-ENO1 protilátkou, tak s pozitivní kontrolou. Reaktivita s komerční anti-CA1 protilátkou sice prokázána nebyla, přesto se však nádorová buněčná linie RPMI-8226 pro průkaz autoprottilátek v sérech pacientů s mnohočetným myelomem jeví, zejména s přihlédnutím k faktu, že se jedná o lidskou B-lymfocytární buněčnou linii a je modelovou myelomovou buněčnou linií, jako nejvhodnější. Proto byla nádorová buněčná linie RPMI-8226 zvolena pro experimenty v následující části této diplomové práce (viz kapitola 4.3 Imunoproteomické profilování vzorků sér pacientů s mnohočetným myelomem), neboť ta se zaměřuje právě na výskyt anti-ENO1 autoprottilátek.

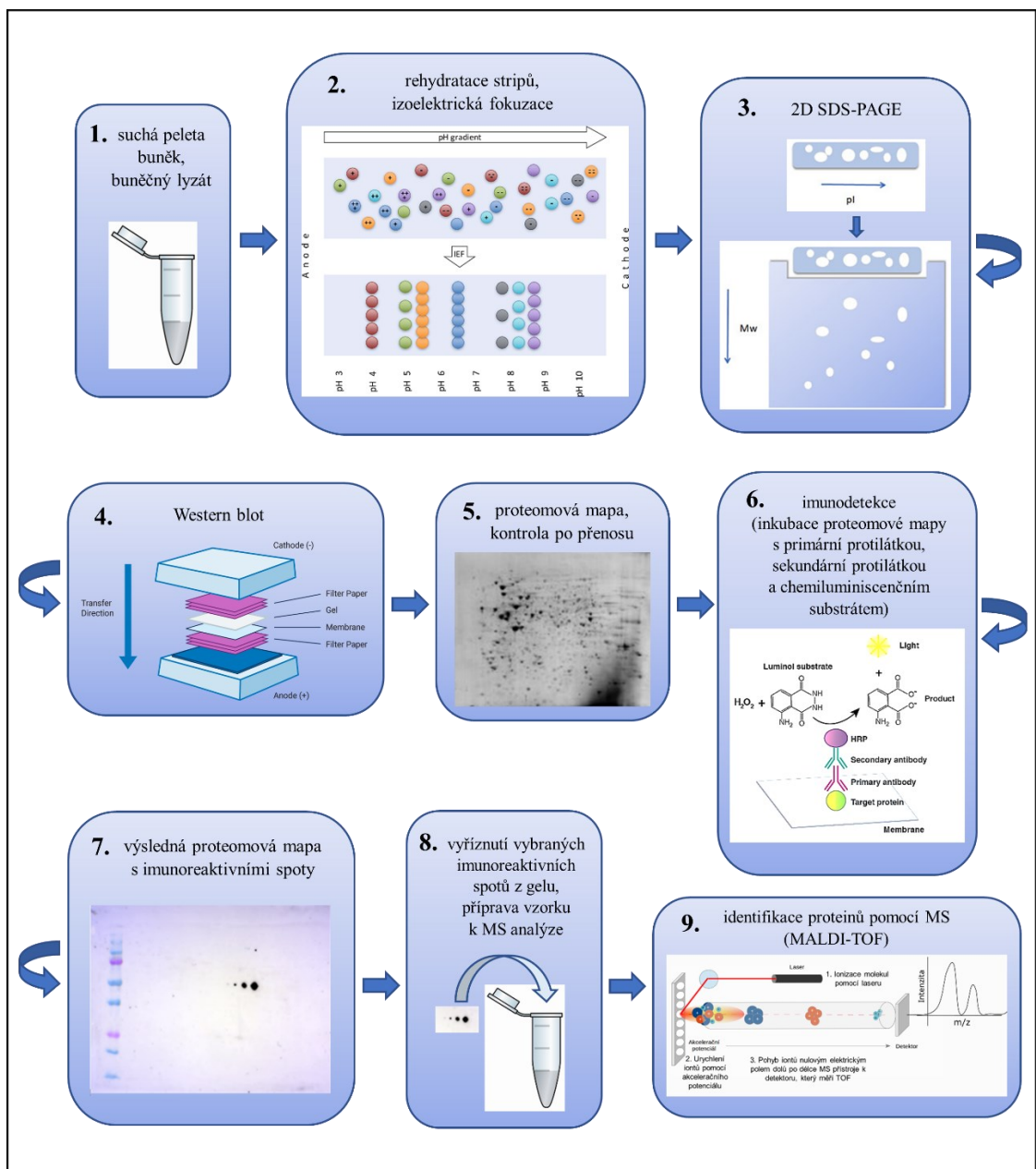
Pokud bychom chtěli prokazovat současně autoprottilátky proti enoláze 1 i karbonické anhydráze 1, bylo by vhodné zvolit nádorovou buněčnou linii HEL. Ta vykazuje jak expresi enolázy 1, tak karbonické anhydrázy 1. Jedná se ovšem o erytroblastovou buněčnou linii, a nekoreluje tak s myelomovými buňkami. Nám navíc primárně šlo o průkaz anti-ENO1 autoprottilátek, proto byla nádorová buněčná linie RPMI-8226 shledána jako vhodnější varianta.

Buněčná linie ANBL-6 je také jednou z doporučených linií pro výzkum mnohočetného myelomu. Bylo prokázáno, že exprimuje enolázu 1, ale nikoliv karbonickou anhydrázu 1. Komerční protilátky reagovaly velmi dobře, byly patrné i izoformy, ale reaktivita s pozitivní kontrolou byla v porovnání s ostatními buněčnými liniemi slabší.

Buněčná linie PC-3 byla pozitivní na enolázu 1 i na karbonickou anhydrázu 1. Jedná se ovšem o nádorovou buněčnou linii odvozenou z metastáz karcinomu prostaty, a tak z porovnávání stále vychází nejlépe nádorová buněčná linie RPMI-8226.

4.3 Imunoproteomické profilování vzorků sér pacientů s mnohočetným myelomem

Průkaz imunoreaktivních proteinů v séru pacientů s mnohočetným myelomem byl proveden osvědčenou metodou SERPA, která zahrnuje několik po sobě jdoucích dílčích kroků: přípravu suché pelety buněk a buněčného lyzátu, rehydrataci stripů a izoelektrickou fokuzaci, 2D SDS-PAGE, Western blot, barvení membrány stříbrem a gelu Coomassie Blue pro kontrolu úspěšnosti přenosu, imunodetekci a následně je možné pokračovat metodou In-gel digest a identifikací proteinů pomocí hmotnostní spektrometrie (viz Obrázek 39).

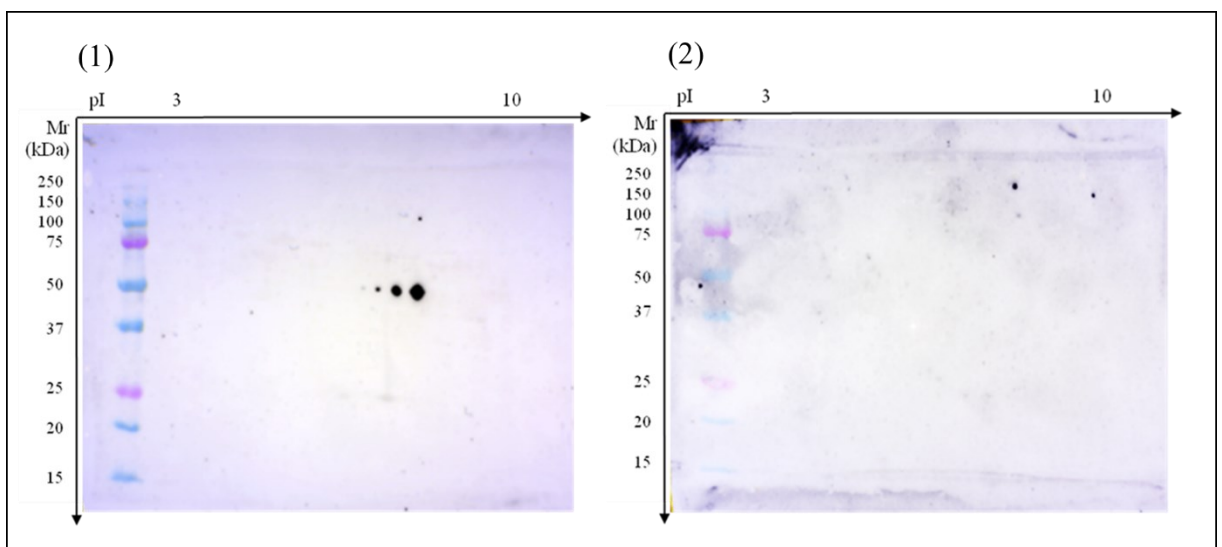


Obrázek 39 – Schéma metody SERPA [127; 130; 131; 132; 133; 134; 135]

4.3.1 Kontroly

Pozitivní kontrolou bylo sérum pacientky s mnohočetným myelomem, které vykazuje velmi silnou a specifickou imunoreaktivitu v porovnání s ostatními vyšetřovanými vzorky. Poskytla ho Klinika hematologie a transfúziologie LF UK, SZU a UNB (pan MUDr. Ján Lakota, CSc.). Jednalo se o 68letou ženu stredoevropského původu, které byl mnohočetný myelom diagnostikován v lednu 2002. Léčila se v Národním onkologickém ústavu v Bratislavě. Podstoupila standardní chemoterapii, na niž ovšem neodpovídala dobře, a tak se přistoupilo k autologní transplantaci kmenových krvetvorných buněk. Dva roky poté u ní byla pozorována částečná remise spolu s rozvinutou AA amyloidózou (sekundární amyloidózou), která bývá komplikací nádorových onemocnění vycházejících z krvetvorných buněk. V letech 2004–2005 byla pacientka z důvodu relapsu onemocnění léčena IFN α , avšak tato léčba byla kvůli intoleranci přerušena. Pacientka byla stabilizována s částečnou remisí a nadále pozorována.

Negativní kontrolou byla séra pěti dobrovolných dárců ve věkovém rozmezí 50–75 let, kteří v době odběru netrpěli žádným nádorovým ani autoimunitním onemocněním. Jejich vzorky sér byly vyšetřeny metodou imunofixace s negativním výsledkem. Dobrovolní dárce podepsali informovaný souhlas a byli poučeni o účelu odběru. Krevní vzorky byly odebrány odborným pracovníkem na Katedře biologických a biochemických věd Fakulty chemicko-technologické Univerzity Pardubice.



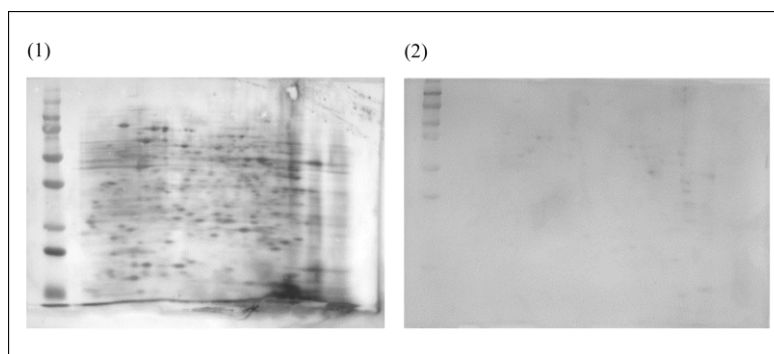
Obrázek 40 – Kontrolní vzorky

(1) pozitivní kontrola; (2) negativní kontrola

4.3.2 Vzorky sér pacientů s mnohočetným myelomem

Bylo analyzováno celkem 46 vzorků sér 10 pacientů s mnohočetným myelomem, jež poskytla Biobanka Kliniky hematologie Fakultní nemocnice v Ostravě (přednosta kliniky, pan prof. MUDr. Roman Hájek, CSc., a vedoucí výzkumné laboratoře s biobankou, paní Mgr. Lucie Broskevičová). Pacienti podepsali informovaný souhlas a byli poučeni o účelu odběru. Vzorky jim byly odebírány v pravidelných intervalech. První odběr byl proveden v době stanovení diagnózy a další odběry byly plánovány u každého pacienta individuálně podle průběhu onemocnění a typu terapie. V případě, že pacientovi byly transplantovány kmenové krvetvorné buňky, byl odběr proveden před i po transplantaci. Vzorky pacientů byly označeny kódem a bylo u nich uvedeno pouze pohlaví pacienta a datum odběru, žádné další informace o vzorcích poskytnuty nebyly. Pro vlastní analýzu patientských sér byla použita nádorová buněčná linie RPMI-8226, která je modelovou myelomovou buněčnou linií mnohdy využívanou právě pro výzkumné účely.

Byla připravena suchá peleta buněk (viz kapitola 3.4.1 Příprava suché pelety buněk) a poté buněčný lyzát nádorové buněčné linie RPMI-8226 (viz kapitola 3.4.2 Příprava buněčného lyzátu), který byl použit k přípravě stripů (viz kapitola 3.4.3 Rehydratace gelových stripů a kapitola 3.4.4 Izoelektrická fokuzace) potřebných pro dvoudimenzionální gelovou elektroforézu (viz kapitola 3.4.5 Dvourozměrná gelová elektroforéza). Následně byl technikou Western blot proveden přenos proteinů z gelu na nitrocelulózovou membránu (viz kapitola 3.4.6 Semi-dry Western blot). Po přenosu byla vždy vizuálně zkontrolována úspěšnost přenosu, a to obarvením nitrocelulózové mebrány stříbrem (viz kapitola 3.4.7 Barvení proteinů na nitrocelulózové membráně) a gelu Coomassie Blue (viz kapitola 3.4.8 Barvení proteinů na gelu).



Obrázek 41 – Kontrola úspěšnosti přenosu proteinů po Western blotu

- (1) nitrocelulózová membrána po Western blotu a obarvení stříbrem
- (2) gel po Western blotu a obarvení Coomassie Blue

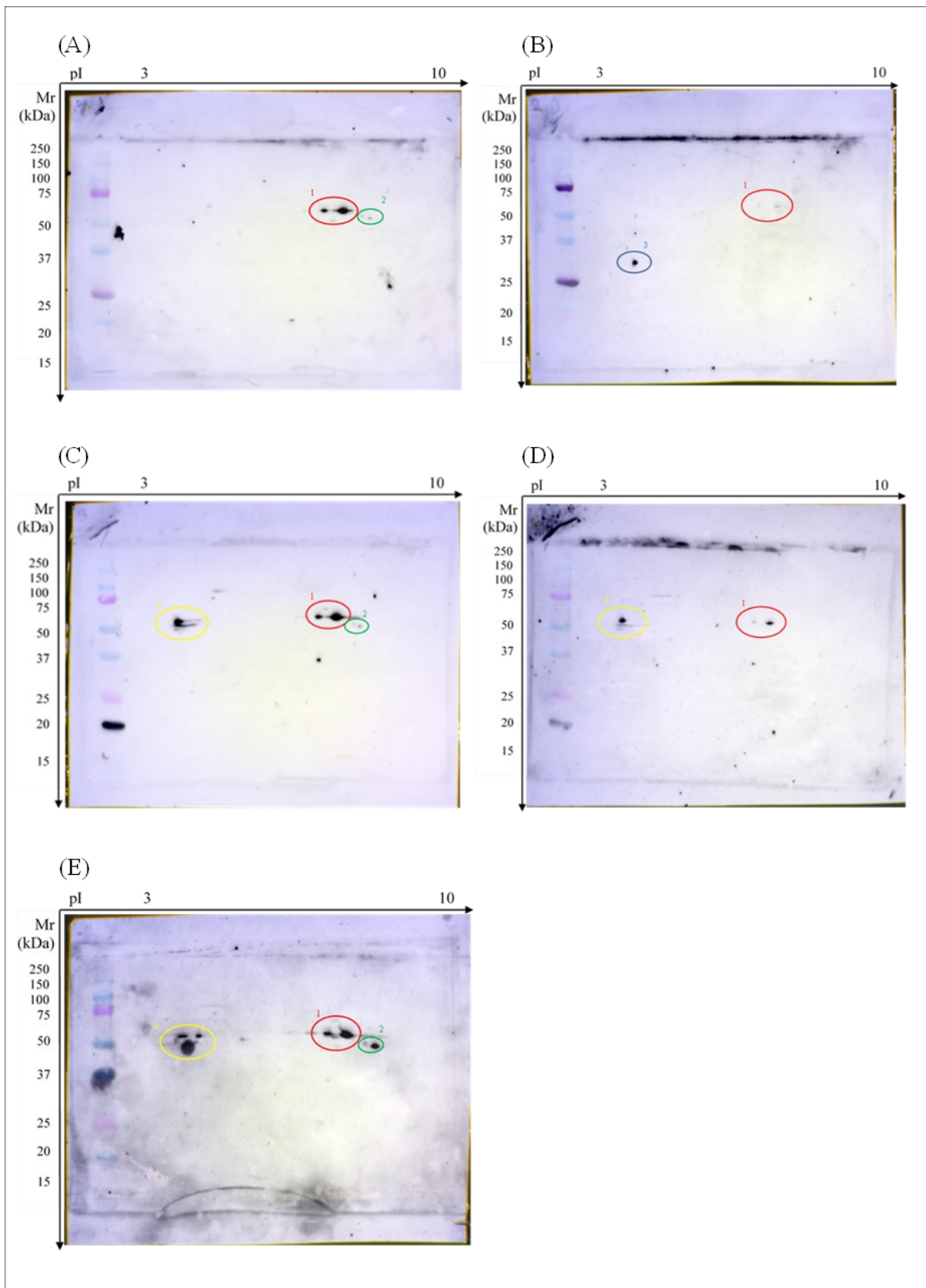
V případě, že přenos separovaných proteinů byl úspěšný, bylo přistoupeno k dalšímu kroku. Tím byla manuální imunodetekce (viz kapitola 3.4.9 Imunodetekce reaktivních proteinových spotů). Nejprve byla nitrocelulózová membrána s proteomovou mapou nádorové buněčné linie RPMI-8226 inkubována s patientským sérem (v ředění 1 : 500). Imunoreaktivní autoprotiilátky přítomné v patientském séru vytvořily během této inkubace s cílovým antigenem na nitrocelulózové membráně imunokomplex. Na ten poté nasedl konjugát anti-human IgG (v ředění 1 : 5000) a výsledný produkt byl vizualizován chemiluminiscenčním substrátem ECL. Vizualizace pomocí ECL byla zvolena záměrně, neboť je v porovnání s tradičními chromogeny senzitivnější. Tímto byly zviditelněny reaktivní proteinové spoty, které byly zaznamenány stanicí G:BOX Chemi XX6. Molekulové hmotnosti vybraných proteinových spotů na nafocených snímcích byly vyhodnoceny v programu GeneTools. Významné imunoreaktivní spoty byly zakroužkovány. Imunoreaktivní spot, který s největší pravděpodobností odpovídá enoláze 1, byl na všech proteomových mapách označen červeným kroužkem a číslem 1. Protein našeho zájmu, enoláza 1, by se měl vyskytovat v oblasti s molekulovou hmotností 47,169 kDa a izoelektrickým bodem 7,01 [128] a karbonická anhydráza 1 v oblasti s molekulovou hmotností 28,870 kDa a izoelektrickým bodem 6,59 [129]. Pro spolehlivou identifikaci proteinů by však bylo nutné provést metodu In-gel digest v kombinaci s MALDI-MS analýzou. Ta byla v předchozích letech již provedena u jiné série vzorků pacientů s mnohočetným myelomem Mgr. Rudolfem Kupčíkem, Ph.D. na pracovišti Centrum biomedicínského výzkumu ve Fakultní nemocnici v Hradci Králové a výskyt enolázy 1 v nich byl potvrzen.

Pacient č. 1

Tabulka 9 – Přehled vzorků sér pacienta č. 1

Pohlaví	Kód vzorku	Datum odběru	Přibližný interval odběru
Muž	M-20-001 (A)	2. 1. 2020	v době stanovení diagnózy MM
	M-20-091 (B)	30. 6. 2020	+ 5 M, před transplantací
	M-20-132 (C)	6. 10. 2020	+ 9 M, před tandemovou transplantací
	M-21-004 (D)	14. 1. 2021	+ 12 M, po tandemové transplantaci
	M-22-006 (E)	12. 1. 2022	+ 24 M, kontrola po 1 roce

Výsledky SERPA pacienta č. 1 jsou shrnuty na Obrázku 42. U pacienta č. 1 byl v době stanovení diagnózy mnohočetného myelomu (A) výskyt autoprotilátek (pravděpodobně anti-ENO1 IgG) masivní. Nasvědčuje tomu přítomnost imunoreaktivního spotu 1 v oblasti předpokládaného výskytu enzymu enoláza 1. V tomto odběru je patrný i imunoreaktivní spot 2. V době před transplantací (B) množství autoprotilátek (imunoreaktivní spot 1) významně pokleslo, imunoreaktivní spot 2 vymizel a objevil se imunoreaktivní spot 3. V dalším odběru provedeném před tandemovou transplantací (C) se autoprotilátky (imunoreaktivní spot 1) objevují znovu masivně, opětovně se objevuje i imunoreaktivní spot 2 a nově také 4. Po tandemové transplantaci (D) množství autoprotilátek (imunoreaktivní spot 1) pokleslo a znovu vzrostlo při posledním odběru (E). Stejně tak imunoreaktivní spot 4 po tandemové transplantaci (D) ztrácí na intenzitě, kterou v posledním odběru (E) nabírá. Imunoreaktivní spot 2 po tandemové transplantaci (D) mizí a v posledním odběru (E) se opět objevuje.



Obrázek 42 – Pacient č. 1, výsledek SERPA a označení imunoreaktivních spotů

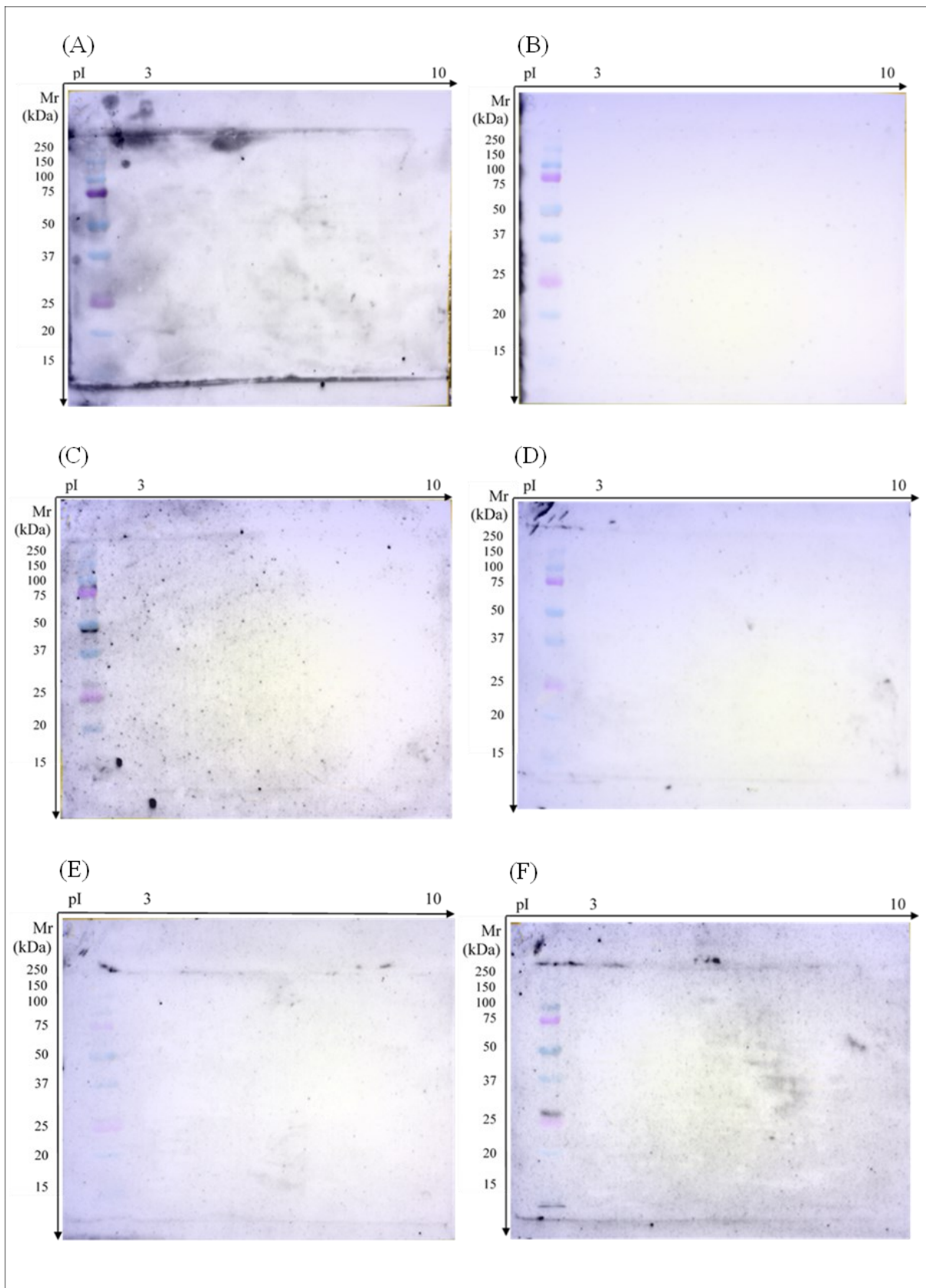
(A) M-20-001; (B) M-20-091; (C) M-20-132; (D) M-21-004; (E) M-22-006

Pacient č. 2

Tabulka 10 – Přehled vzorků sér pacienta č. 2

Pohlaví	Kód vzorku	Datum odběru	Přibližný interval odběru
Žena	M-20-002 (A)	2. 1. 2020	v době stanovení diagnózy MM
	M-20-087 (B)	23. 6. 2020	+ 5 M, před transplantací
	M-20-131 (C)	6. 10. 2020	+ 9 M, před tandemovou transplantací
	M-21-047 (D)	1. 4. 2021	+ 15 M, po tandemové transplantaci
	M-21-121 (E)	1. 9. 2021	+ 20 M, kontrola po půl roce
	M-22-022 (F)	2. 2. 2022	+ 25 M, kontrola po 1 roce

Výsledky SERPA pacienta č. 2 jsou shrnuty na Obrázku 43. U pacienta č. 2 v době stanovení diagnózy (A) ani v následujících odběrech (B), (C), (D), (E), (F) nebyly prokázány žádné autoprotilátky, pro což svědčí nepřítomnost imunoreaktivních spotů na 2D proteomových mapách.



Obrázek 43 – Pacient č. 2, výsledek SERPA a označení imunoreaktivních spotů

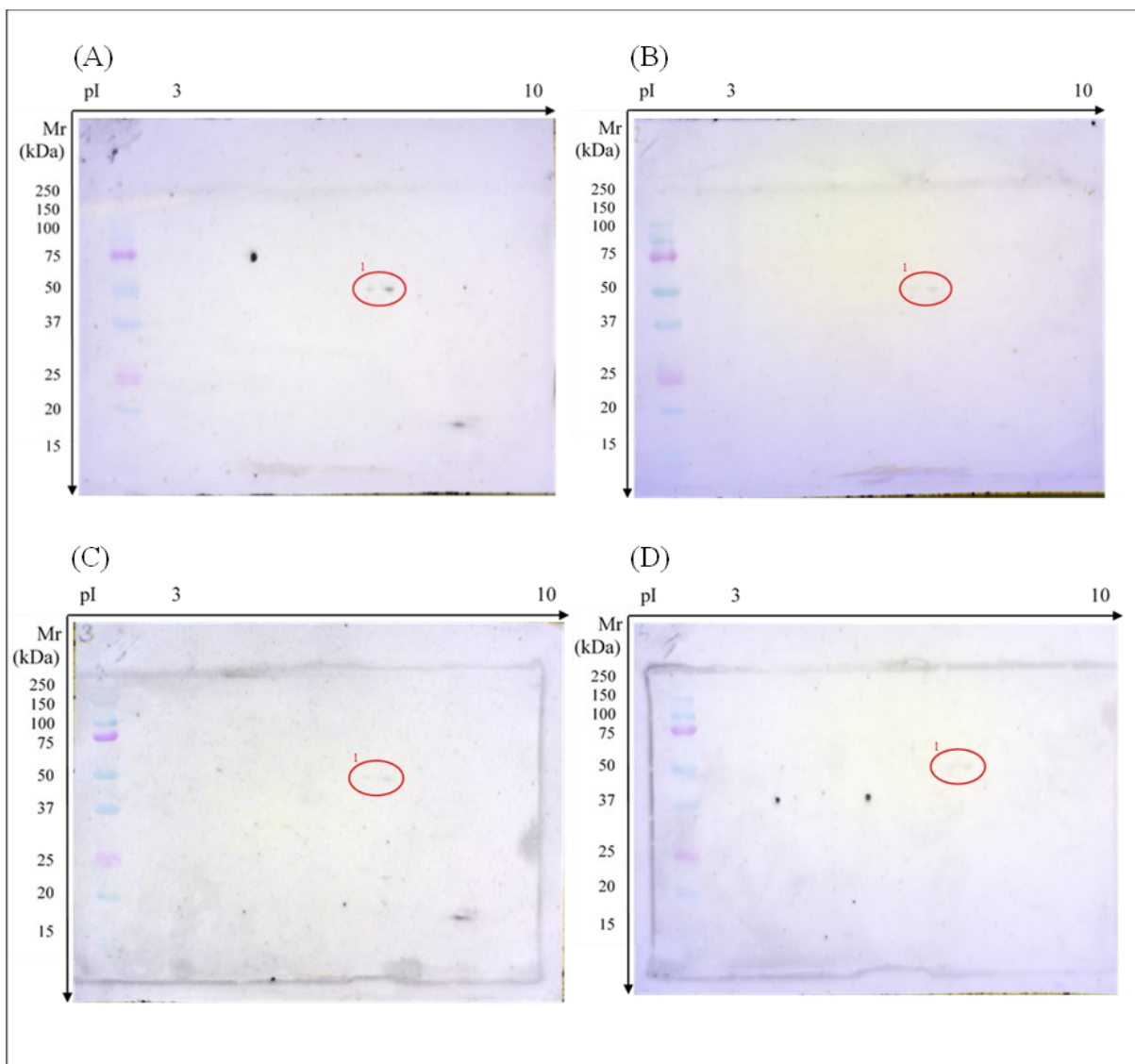
(A) M-20-002; (B) M-20-087; (C) M-20-131; (D) M-21-047; (E) M-21-121; (F) M-22-022

Pacient č. 3

Tabulka 11 – Přehled vzorků sér pacienta č. 3

Pohlaví	Kód vzorku	Datum odběru	Přibližný interval odběru
Žena	M-20-034 (A)	11. 3. 2020	v době stanovení diagnózy MM
	M-20-106 (B)	17. 8. 2020	+ 5 M, před transplantací
	M-20-156 (C)	18. 11. 2020	+ 9 M, před tandemovou transplantací
	M-21-077 (D)	25. 5. 2021	+ 15 M, po tandemové transplantaci

Výsledky SERPA pacienta č. 3 jsou shrnuty na Obrázku 44. U pacienta č. 3 byla v době stanovení diagnózy (A) prokázána pouze velmi mírná reaktivita (imunoreaktivní spot 1), což nasvědčuje tomu, že v séru bylo přítomno velmi malé množství autoprotilátek (pravděpodobně anti-ENO1 IgG). V následujících odběrech (B), (C), (D) imunoreaktivní spot 1 téměř vymizel (v séru nebyly přítomny autoprotilátky). Žádné další imunoreaktivní spoty nebyly prokázány.



Obrázek 44 – Pacient č. 3, výsledek SERPA a označení imunoreaktivních spotů

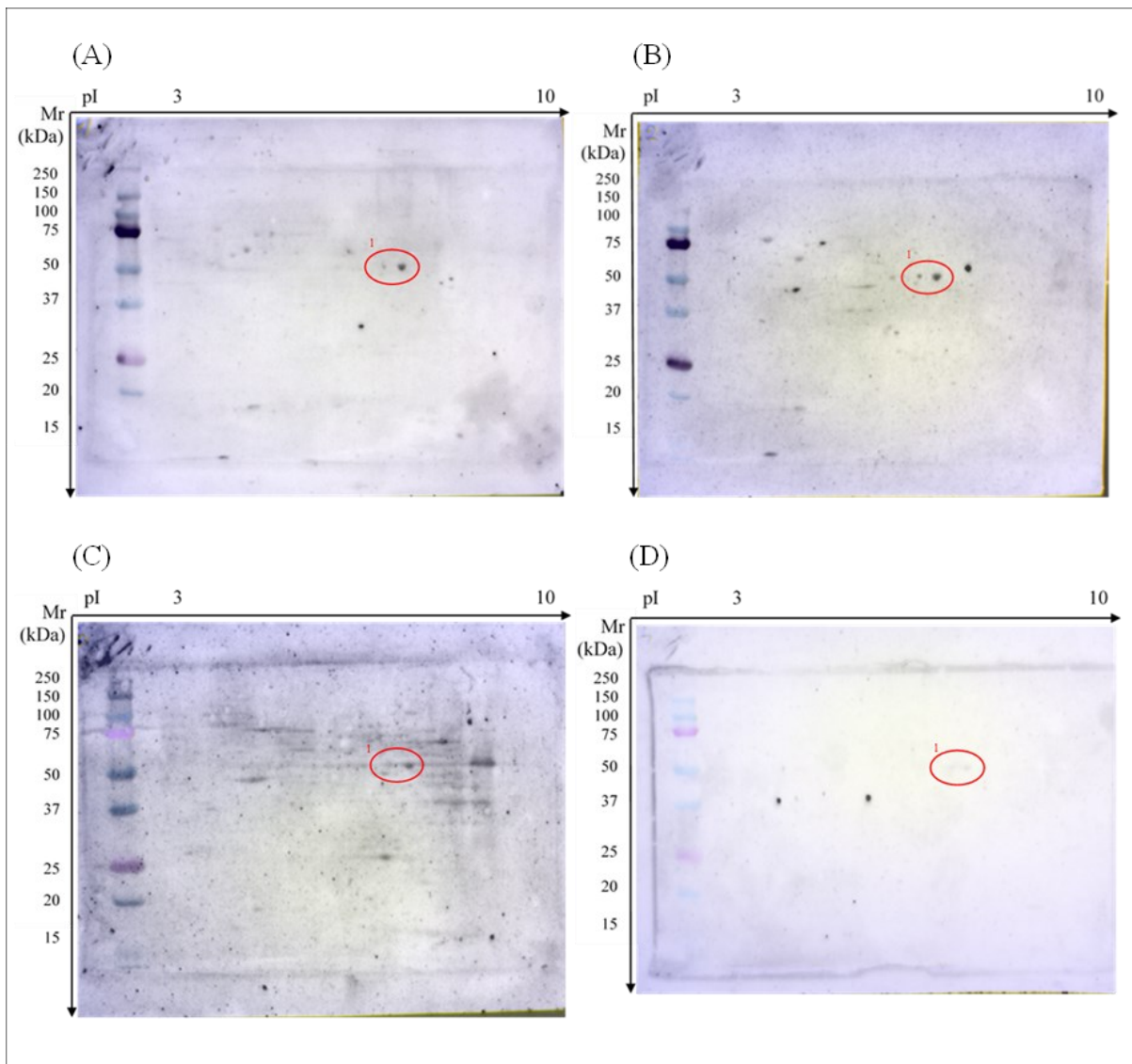
(A) M-20-034; (B) M-20-106; (C) M-20-156; (D) M-21-077

Pacient č. 4

Tabulka 12 – Přehled vzorků sér pacienta č. 4

Pohlaví	Kód vzorku	Datum odběru	Přibližný interval odběru
Muž	M-20-099 (A)	22. 7. 2020	v době stanovení diagnózy MM
	M-21-025 (B)	15. 2. 2021	+ 7 M, před transplantací
	M-21-109 (C)	10. 8. 2021	+ 13 M, po transplantaci a konsolidaci
	M-22-028 (D)	8. 2. 2022	+ 19 M, kontrola po půl roce

Výsledky SERPA pacienta č. 4 jsou shrnuty na Obrázku 45. U pacienta č. 4 je zřejmý náznak imunoreaktivity (imunoreaktivní spot 1) ve odběrech (A), (B) a (C) (pravděpodobně autoprotilátky anti-ENO1 IgG), ovšem intenzita spotů je poměrně nízká. V posledním odběru (D) se imunoreaktivní spot vytrácí.



Obrázek 45 – Pacient č. 4, výsledek SERPA a označení imunoreaktivních spotů

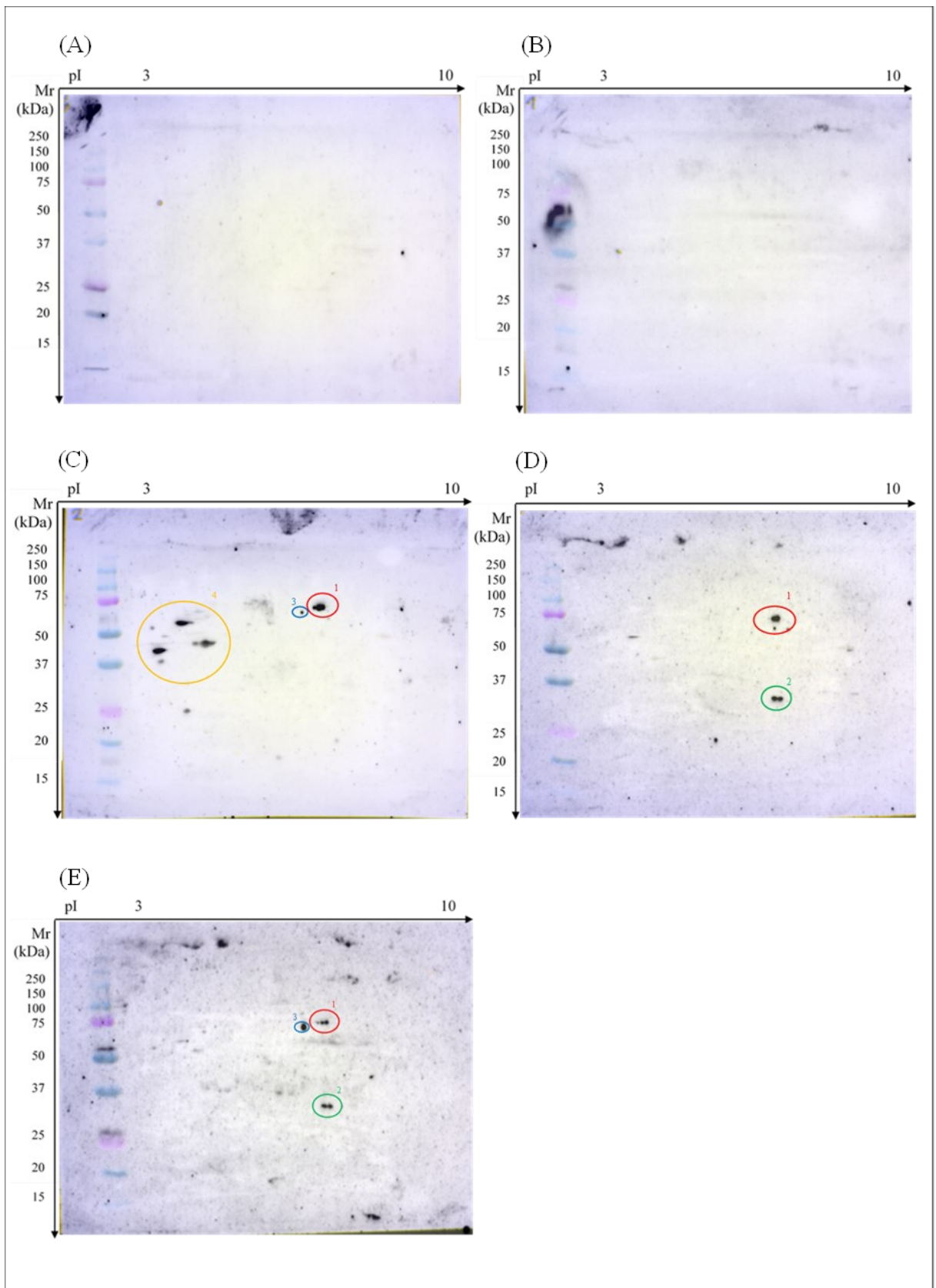
(A) M-20-099; (B) M-21-025; (C) M-21-109; (D) M-22-028

Pacient č. 5

Tabulka 13 – Přehled vzorků sér pacienta č. 5

Pohlaví	Kód vzorku	Datum odběru	Přibližný interval odběru
Muž	M-20-060 (A)	14. 5. 2020	v době stanovení diagnózy MM
	M-20-138 (B)	19. 10. 2020	+ 5 M, před transplantací
	M-21-056 (C)	15. 4. 2021	+ 11 M, po transplantaci
	M-21-130 (D)	15. 9. 2021	+ 16 M, kontrola po půl roce
	M-22-054 (E)	23. 3. 2022	+ 22 M, kontrola po 1 roce

Výsledky SERPA pacienta č. 5 jsou shrnuty na Obrázku 46. U pacienta č. 5 nebyly v době stanovení diagnózy (A) ani před transplantací kmenových krvetvorných buněk (B) prokázány žádné autoprotilátky. Po transplantaci (C) se autoprotilátky objevují, přičemž pozice spotu 1 odpovídá pI enolázy 1, ale Mr je vyšší. Přesto se však domníváme, že se jedná o enolázu 1. Objevují se i další imunoreaktivní spoty (3, 4). V kontrolním odběru půl roku po transplantaci (D) se kromě imunoreaktivního spotu 1 objevuje imunoreaktivní spot 2, jehož pozice odpovídá pI a Mr karbonické anhydrázy 1. Mohlo by se tak jednat o další ze sledovaných autoprotilátek. Imunoreaktivní spoty 3 a 4 mizí. V dalším kontrolním odběru (E) zůstává přítomen imunoreaktivní spot 1 a 2 a znovu se objevuje spot 3.



Obrázek 46 – Pacient č. 5, výsledek SERPA a označení imunoreaktivních spotů

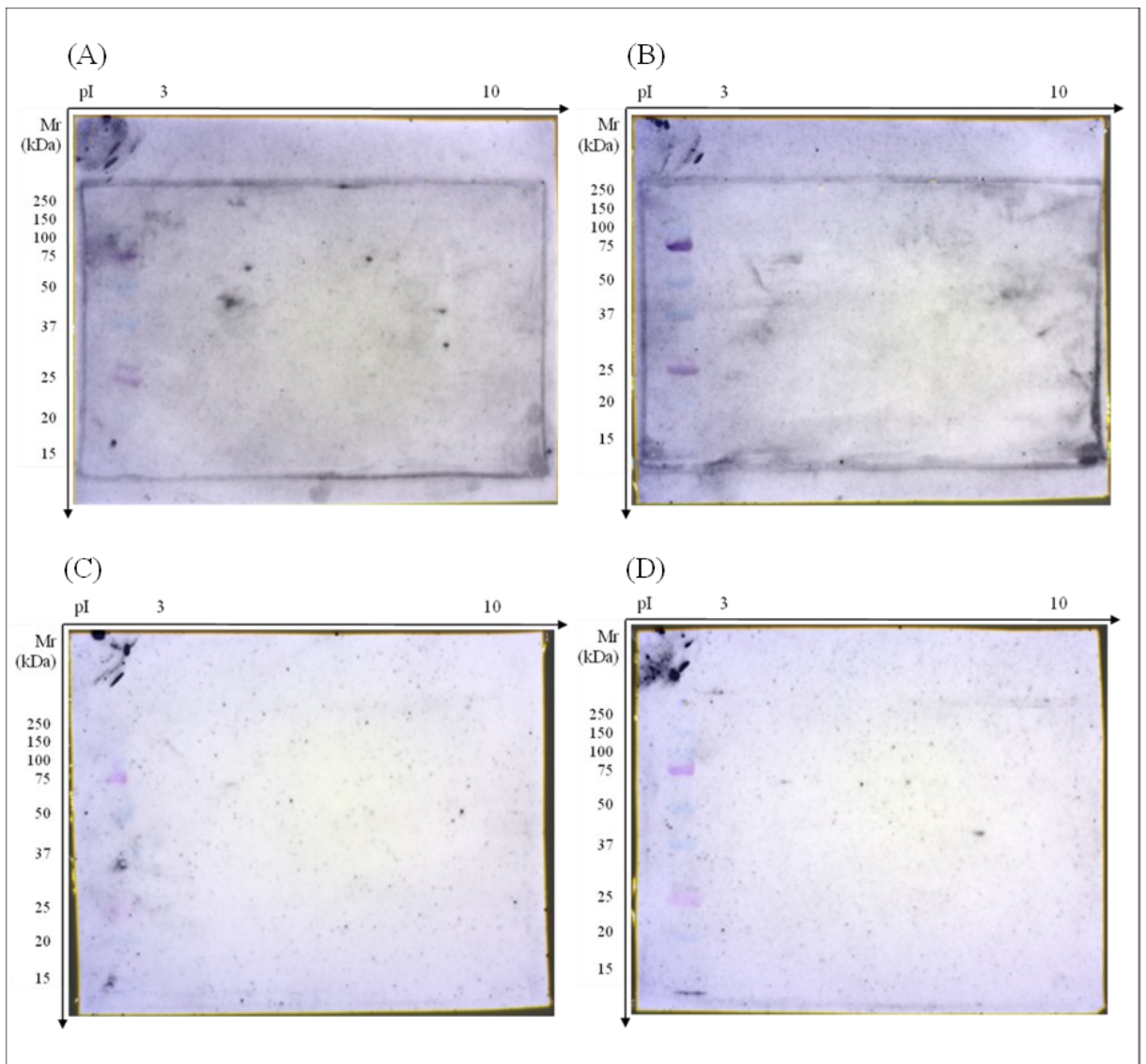
(A) M-20-060; (B) M-20-138; (C) M-21-056; (D) M-21-130; (E) M-22-054

Pacient č. 6

Tabulka 14 – Přehled vzorků sér pacienta č. 6

Pohlaví	Kód vzorku	Datum odběru	Přibližný interval odběru
Žena	M-20-120 (A)	17. 9. 2020	v době stanovení diagnózy MM
	M-21-037 (B)	1. 3. 2021	+ 6 M, před transplantací
	M-21-125 (C)	8. 9. 2021	+ 12 M, po transplantaci
	M-22-047 (D)	16. 3. 2022	+ 18 M, kontrola po půl roce

Výsledky SERPA pacienta č. 6 jsou shrnuty na Obrázku 47. U pacienta č. 6 se v oblastech předpokládaného výskytu hledaných enzymů nevyskytuje žádný výrazný imunoreaktivní spot, z čehož lze usoudit nepřítomnost autoprotilátek.



Obrázek 47 – Pacient č. 6, výsledek SERPA a označení imunoreaktivních spotů

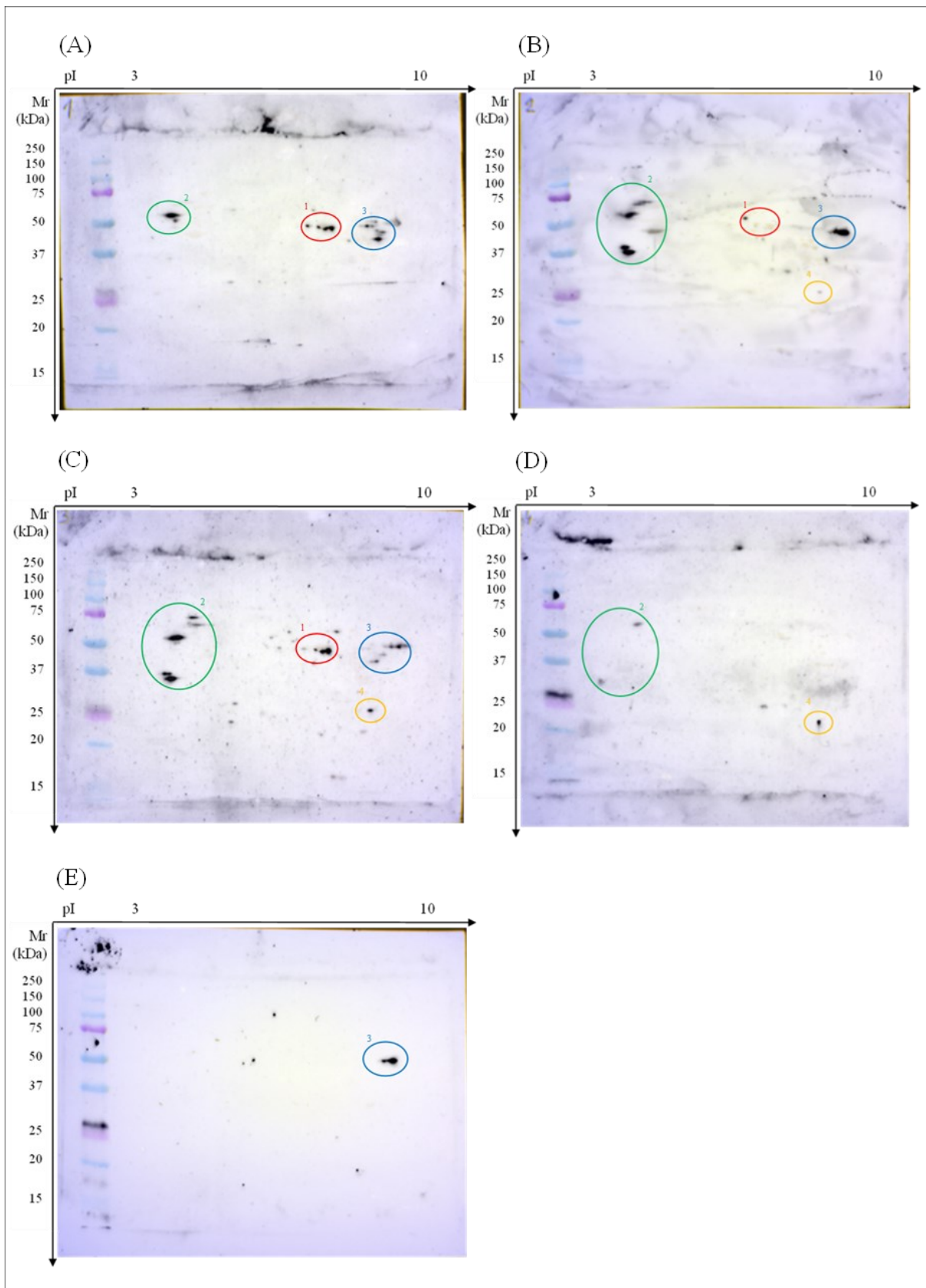
(A) M-20-120; (B) M-21-037; (C) M-21-125; (D) 22-047

Pacient č. 7

Tabulka 15 – Přehled vzorků sér pacienta č. 7

Pohlaví	Kód vzorku	Datum odběru	Přibližný interval odběru
Žena	M-20-019 (A)	30. 1. 2020	v době stanovení diagnózy MM
	M-20-103 (B)	28. 7. 2020	+ 6 M, před transplantací
	M-20-140 (C)	2. 11. 2020	+ 10 M, před tandemovou transplantací
	M-21-068 (D)	10. 5. 2021	+ 16 M, po tandemové transplantaci
	M-21-140 (E)	13. 10. 2021	+ 21 M, kontrola po půl roce

Výsledky SERPA pacienta č. 7 jsou shrnuty na Obrázku 48. U pacienta č. 7 se již v době stanovení diagnózy (A) objevují autoprotilátky (pravděpodobně anti-ENO1 IgG), čemuž napovídá výskyt imunoreaktivního spotu 1. Objevují se i další imunoreaktivní spoty 2 a 3. Před transplantací (B) se objevuje nový imunoreaktivní spot 4. Stejná situace se opakuje před tandemovou transplantací (C). Po tandemové transplantaci (D), (E) sledované autoprotilátky (imunoreaktivní spot 1) mizí a objevují se pouze imunoreaktivní spoty 2, 3 a 4.



Obrázek 48 – Pacient č. 7, výsledek SERPA a označení imunoreaktivních spotů

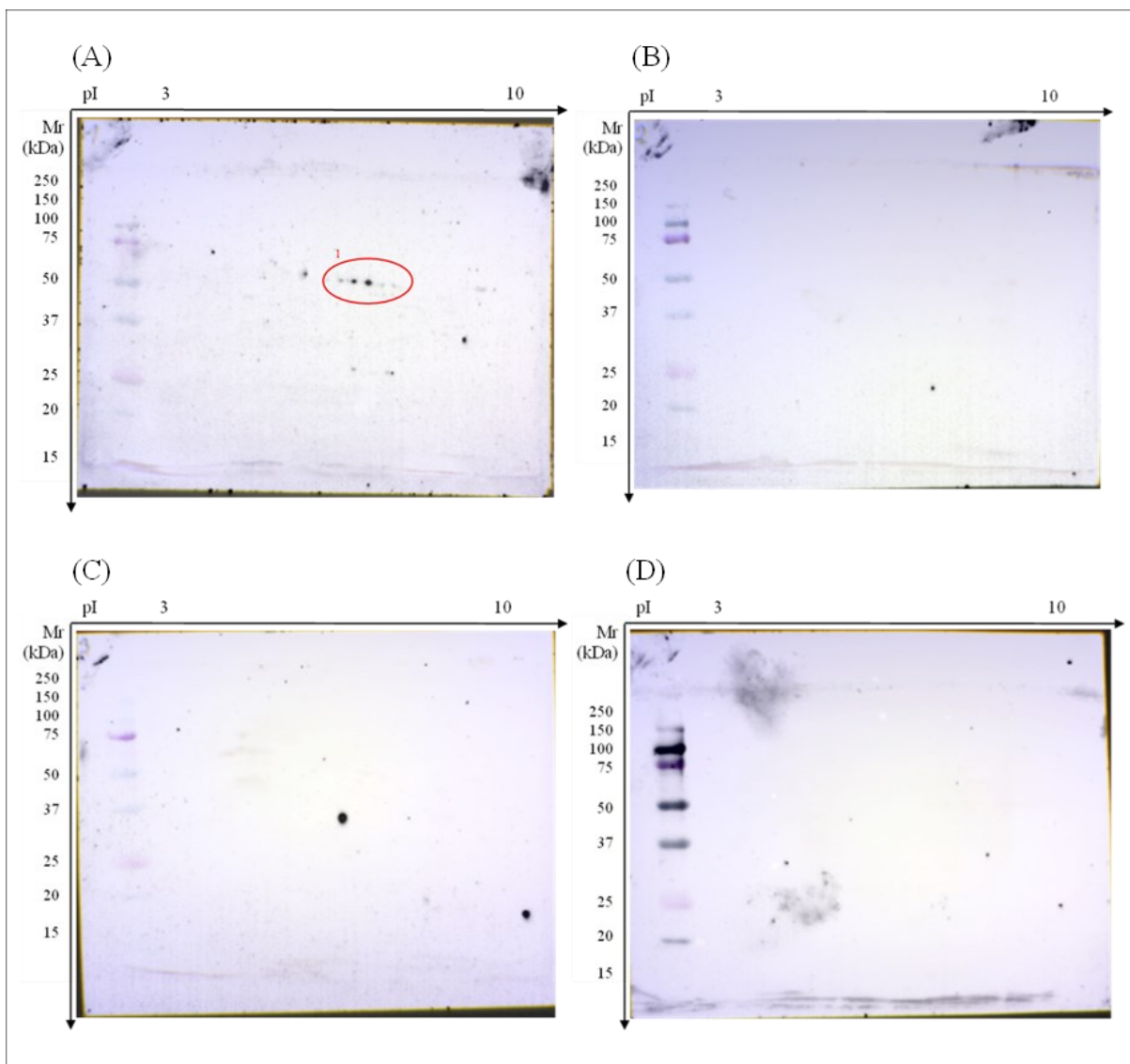
(A) M-20-019; (B) M-20-103; (C) M-20-140; (D) M-21-068; (E) M-21-140

Pacient č. 8

Tabulka 16 – Přehled vzorků sér pacienta č. 8

Pohlaví	Kód vzorku	Datum odběru	Přibližný interval odběru
Žena	M-17-075 (A)	6. 9. 2017	v době stanovení diagnózy MM
	M-18-034 (B)	20. 3. 2018	+ 6 M, před transplantací
	M-18-070 (C)	21. 6. 2018	+ 9 M, před tandemovou transplantací
	M-18-143 (D)	6. 11. 2018	+ 14 M, po tandemové transplantaci

Výsledky SERPA pacienta č. 8 jsou shrnuty na Obrázku 49. U pacienta č. 8 se autoprotilátky (pravděpodobně anti-ENO1 IgG) objevují pouze v době stanovení diagnózy (A), čemuž odpovídá výskyt imunoreaktivního spotu 1. V dalších odběrech (B), (C), (D) již nejsou přítomny žádné imunoreaktivní spoty.



Obrázek 49 – Pacient č. 8, výsledek SERPA a označení imunoreaktivních spotů

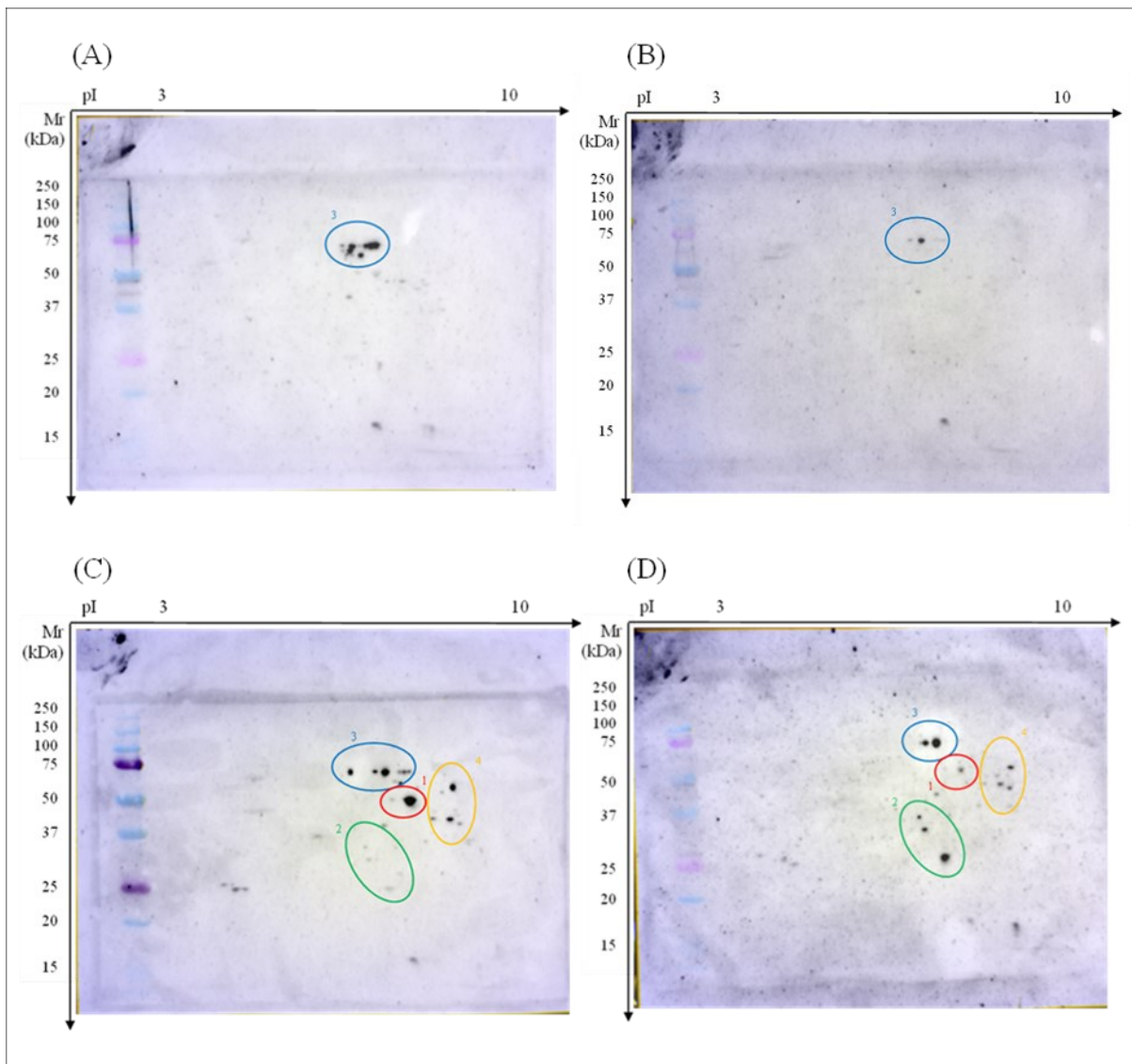
(A) M-17-075; (B) M-18-034; (C) M-18-070; (D) M-18-143

Pacient č. 9

Tabulka 17 – Přehled vzorků sér pacienta č. 9

Pohlaví	Kód vzorku	Datum odběru	Přibližný interval odběru
Muž	M-17-082 (A)	21. 9. 2017	v době stanovení diagnózy MM
	M-18-045 (B)	10. 4. 2018	+ 7 M, před transplantací
	M-18-136 (C)	17. 10. 2018	+ 13 M, po tandemové transplantaci
	M-19-029 (D)	20. 2. 2019	+ 17 M, po tandemové transplantaci

Výsledky SERPA pacienta č. 9 jsou shrnuty na Obrázku 50. U pacienta č. 9 se v době stanovení diagnózy (A) a před transplantací kmenových krvetvorných buněk (B) objevují imunoreaktivní spoty 3, které však molekulovou hmotností neodpovídají enoláze 1. V odběrech po tandemové transplantaci (C), (D) se ovšem objevuje imunoreaktivní spot 1 (pravděpodobně anti-ENO1 IgG). Kromě toho jsou v tomto období přítomny i další imunoreaktivní spoty (2, 3, 4).



Obrázek 50 – Pacient č. 9, výsledek SERPA a označení imunoreaktivních spotů

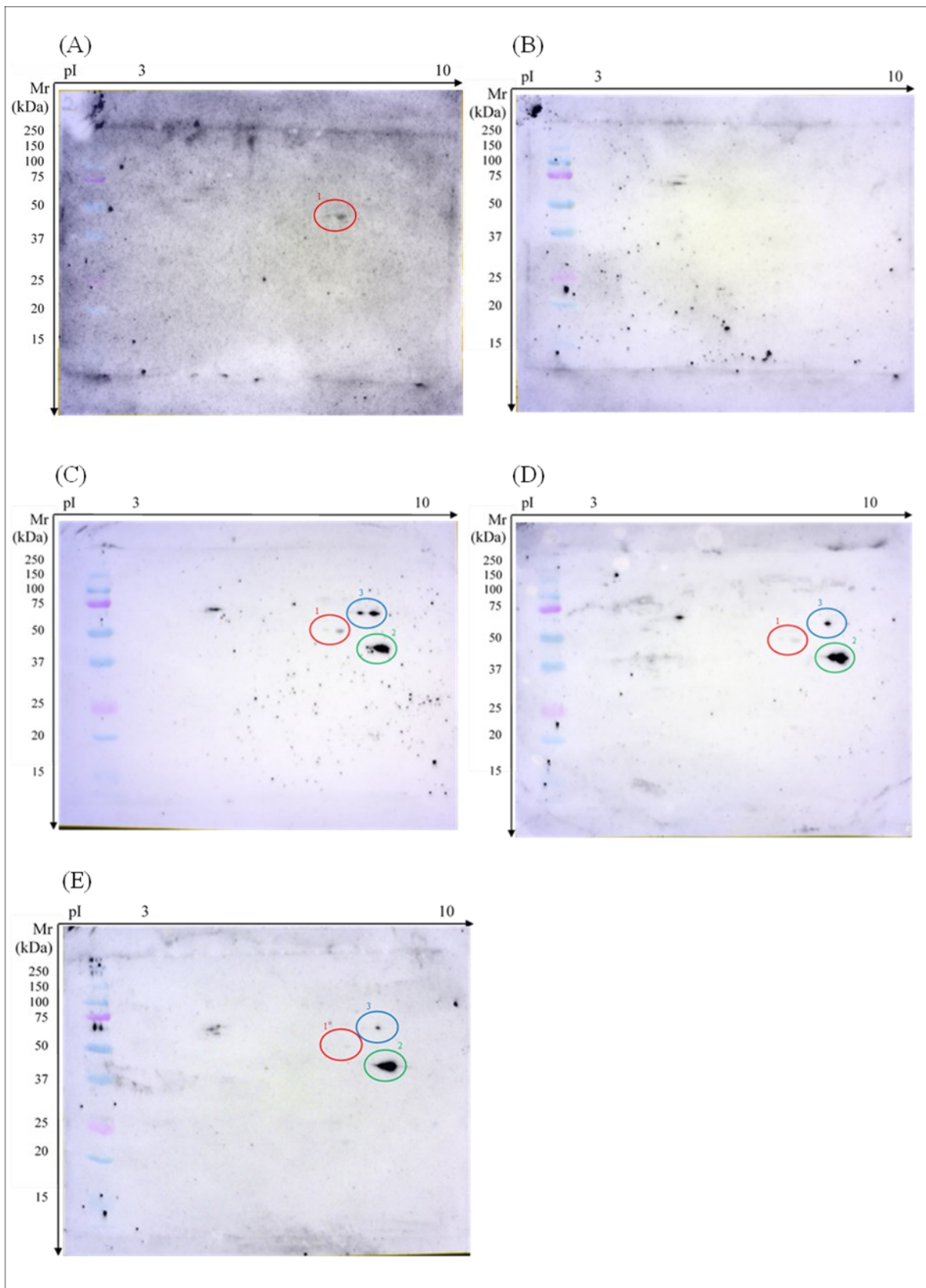
(A) M-17-082; (B) M-18-045; (C) M-18-136; (D) M-19-029

Pacient č. 10

Tabulka 18 – Přehled vzorků sér pacienta č. 10

Pohlaví	Kód vzorku	Datum odběru	Přibližný interval odběru
Muž	M-20-038 (A)	24. 3. 2020	v době stanovení diagnózy MM
	M-20-117 (B)	7. 9. 2020	+ 6 M, před transplantací
	M-21-064 (C)	28. 4. 2021	+ 13 M, po tandemové transplantaci
	M-21-132 (D)	22. 9. 2021	+ 18 M, kontrola po půl roce
	M-22-049 (E)	16. 3. 2022	+ 24 M, kontrola po 1 roce

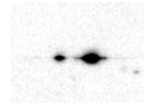

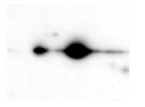

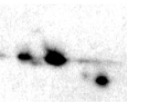

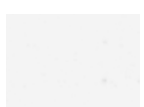




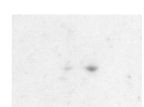
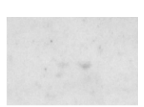


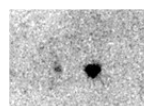
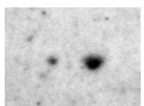
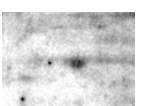
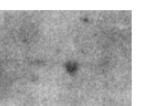



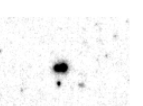

Výsledky SERPA pacienta č. 10 jsou shrnuty na Obrázku 51. U pacienta č. 10 se v době stanovení diagnózy (A) objevují autoprotilátky (pravděpodobně anti-ENO1 IgG), čemuž napovídá výskyt imunoreaktivního spotu 1. Jeho intenzita je ovšem slabá. Před transplantací (B) mizí, v následujících odběrech po tandemové transplantaci (C), (D) se objevuje opět velmi slabě a v posledním odběru (E) znovu mizí. Po tandemové transplantaci (C), (D), (E) se však objevují jiné intenzivní imunoreaktivní spoty (2, 3).



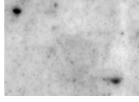



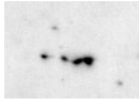
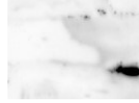
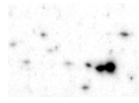
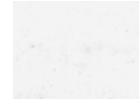
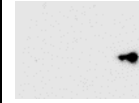
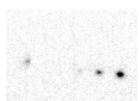
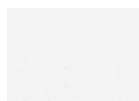
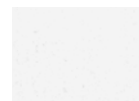
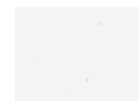

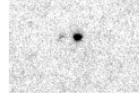
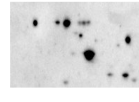

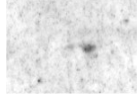

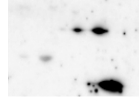

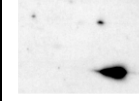
Obrázek 51 – Pacient č. 10, výsledek SERPA a označení imunoreaktivních spotů

(A) M-20-038; (B) M-20-117; (C) M-21-064; (D) M-21-132; (E) M-22-049

Tabulka 19 – Přehled výskytu imunoreaktivních spotů, 1. část

Pacient č. 1, muž	M-20-001 DG	M-20-091 + 5 M, před Tx	M-20-132 + 9 M, před TTx	M-21-004 + 12 M, po TTx	M-22-006 + 24 M	
						
Pacient č. 2, žena	M-20-002 DG	M-20-087 + 5 M, před Tx	M-20-131 + 9 M, před TTx	M-21-047 + 15 M, po TTx	M-21-121 + 20 M	M-22-022 + 25 M
						
Pacient č. 3, žena	M-20-034 DG	M-20-106 + 5 M, před Tx	M-20-156 + 9 M, před TTx	M-21-077 + 15 M, po TTx		
						
Pacient č. 4, muž	M-20-099 DG	M-21-025 + 7 M, před Tx	M-21-109 + 13 M, po Tx	M-22-028 + 19 M		
						
Pacient č. 5, muž	M-20-060 DG	M-20-138 + 5 M, před Tx	M-21-056 + 11 M, po Tx	M-21-130 + 16 M	M-22-054 + 22 M	
						

Tabulka 20 – Přehled výskytu imunoreaktivních spotů, 2. část

Pacient č. 6, žena	M-20-120 DG	M-21-037 + 6 M, před Tx	M-21-125 + 12 M, po Tx	M-22-047 + 18 M,		
						
Pacient č. 7, žena	M-20-019 DG	M-20-103 + 6 M, před Tx	M-20-140 + 10 M, před TTx	M-21-068 + 16 M, po TTx	M-21-140 + 21 M	
						
Pacient č. 8, žena	M-17-075 DG	M-18-034 + 6 M, před Tx	M-18-070 + 9 M, před TTx	M-18-143 + 14 M, po TTx		
						
Pacient č. 9, muž	M-17-082 DG	M-18-045 + 7 M, před Tx	M-18-136 + 13 M, po TTx	M-19-029 + 17 M, po TTx		
						
Pacient č. 10, muž	M-20-038 DG	M-20-117 + 6 M, před Tx	M-21-064 + 13 M, po TTx	M-21-132 + 18 M	M-22-049 + 24 M	
						

Metodou SERPA byly zanalyzovány vzorky sér 10 pacientů s mnohočetným myelomem, přičemž u každého z nich se jednalo o 4–6 vzorků, které jim byly odebírány v časových intervalech od data stanovení diagnózy po dobu nejvýše dvou let. K průkazu imunoreaktivních autoprotilátek byly použity proteomové mapy nádorové buněčné linie RPMI-8226, která prokazatelně exprimuje cílovou strukturu ENO1. U 8 pacientů byly alespoň jednou za dobu sledování prokázány autoreaktivní protilátky (alespoň na jedné z proteomových map byly pozorovány imunoreaktivní spoty v oblasti pravděpodobného výskytu enolázy 1 jakožto cílové molekuly). U 2 pacientů nebyly autoreaktivní protilátky prokázány v žádném z odebraných vzorků (imunoreaktivní spoty nebyly pozorovány ani na jedné mapě). Vzhledem k malému počtu sledovaných jedinců však není možné tyto výsledky hodnotit v klinickém kontextu.

5 ZÁVĚR

Mnohočetný myelom představuje velmi závažnou diagnózu, neboť je maligním onemocněním plazmatických buněk, které je do současnosti považováno za nevléčitelné. Klinický výzkum v oblasti mnohočetného myelomu ovšem v posledních letech zaznamenává celou řadu úspěchů, které se odráží jak v pokrocích na poli diagnostiky, tak v rychlém rozvoji nových terapeutických možností. Významně tím přispívá k včasnému stanovení diagnózy, které hraje, stejně jako u jiných onkologických onemocnění, klíčovou roli, a tím i k podstatně lepší prognóze pacientů. Značnou naději aktuálně přináší cílená biologická léčba, díky níž řada pacientů s mnohočetným myelomem může řadu let žít bez jakýchkoli příznaků a prožít kvalitní plnohodnotný život i s touto nepříznivou diagnózou. Avšak největší naděje je dnes vkládána do imunoterapie, která hledá způsoby, jak využít potenciál imunitního systému a stimulovat ho tak, aby nádorové buňky sám rozpoznal a následně zničil.

Tato diplomová práce byla zaměřena právě na průkaz zapojení imunitního systému do boje proti nádorovým buňkám, a to konkrétně na produkci autoprotilátěk při onemocnění mnohočetný myelom. Jednalo se primárně o autoprotilátky proti enzymu enoláza 1 a okrajově o autoprotilátky proti enzymu karbonická anhydráza 1. Oba tyto enzymy jsou pro buňky důležité, neboť se účastní mnoha procesů v nich probíhajících včetně metabolismu a regulace pH. Výsledky doposud publikovaných studií naznačují, že se autoprotilátky proti těmto enzymům mohou podílet na lepší léčebné odezvě, a umožňovat tak pacientům dlouhodobé setrvávání v období remise.

V rámci této diplomové práce bylo nejprve provedeno porovnání dvou způsobů imunodetekce, automatizovaného a manuálního. Na základě toho byl pro následující experimenty vybrán manuální způsob imunodetekce. Následovala komparativní proteomová analýza čtyř nádorových buněčných linií, a to RPMI-8226, HEL, ANBL-6 a PC-3. Nejvhodnější nádorovou buněčnou linií pro imunoproteomické profilování vzorků pacientů s mnohočetným myelomem byla zvolena nádorová buněčná linie RPMI-8226. Imunoproteomické profilování vzorků sér zahrnovalo analýzu celkem více než 50 vzorků sér pacientů s mnohočetným myelomem a zdravých dobrovolných dárců. U pacientů s mnohočetným myelomem byla metodou SERPA ověřována reaktivita autoprotilátěk v jejich séru v čase, a to od doby stanovení diagnózy po dobu nejvýše dvou let. Počet zanalyzovaných vzorků nebyl tak rozsáhlý, aby bylo možné výsledky statisticky zhodnotit a nelze ani vyvodit jednoznačný závěr. Vzhledem k tomu, že se však u 8 pacientů z 10 alespoň jednou za dobu sledování reaktivní autoprotilátky objevily

(přestože u některých pouze velmi slabě), zdá se, že pozornost je směřována správným směrem. U zdravých jedinců je totiž výskyt anti-ENO1 autoprotilátek pouze sporadický, což jasně poukazuje na to, že výskyt těchto autoprotilátek může mít nějaký význam, ať už diagnostický (jako biomarker) nebo terapeutický (ENO1 jako cílová struktura). Do budoucna bude nezbytné analyzovat více patientských vzorků a zejména sledovat pacienty dlouhodobě. Výsledky této diplomové práce tak alespoň částečně přispějí do komplexní mozaiky odhalování mechanismů imunitního systému v boji proti nádorovým buňkám. Stanovené cíle byly splněny.

Dosavadní publikovaná data nasvědčují tomu, že klíčové enzymy, které jsou součástí různých metabolických i signálních drah v buňce, by v budoucnu mohly být vhodným diagnostickým a terapeutickým cílem. A enzym enoláza 1 bude nejspíš jedním z nich. Aby však tato hypotéza mohla být potvrzena a aby bylo možné stanovit relevantní klinické závěry, bude nutné nadále pokračovat ve výzkumu.

6 POUŽITÁ LITERATURA

- [1] GOGOUA, R. D., D. G. GOGOUA a M. KABA. Kahler's Disease with a Rare Clinical form and Review of Literature. *Open Journal of Orthopedics* [online]. 2018, 08(02), 39–45 [cit. 2022-10-23]. ISSN 2164-3008. Dostupné z: doi:10.4236/ojo.2018.82005
- [2] KUMAR, Shaji K., Vincent RAJKUMAR, Robert A. KYLE, Mark VAN DUIN, Pieter SONNEVELD, María-Victoria MATEOS, Francesca GAY a Kenneth C. ANDERSON. Multiple myeloma. *Nature Reviews Disease Primers* [online]. 2017, 3(1) [cit. 2022-10-23]. ISSN 2056-676X. Dostupné z: doi:10.1038/nrdp.2017.46
- [3] NOVOSADOVÁ, Martina. Léčba mnohočetného myelomu včera, dnes a zítra – repertorium pro lékárníky. *Nemocniční lékárenství: Praktické lékárenství* [online]. 2016, 12(5), 2537 [cit. 2023-01-02]. Dostupné z: <https://www.solen.cz/pdfs/lek/2016/92/05.pdf>
- [4] MAISNAR, Vladimír, Tereza POPKOVÁ a Martin ŠTORK. *Mnohočetný myelom: Jak s ním žít? Informace pro nemocné a jejich blízké* [online]. Dvůr Králové nad Labem: ATD Miroslav Všetečka pro Klub pacientů mnohočetný myelom, 2022 [cit. 2022-11-19]. ISBN 978-80-86358-21-5. Dostupné z: <https://www.mnohocetnymyelom.cz/mm-jak-s-nim-zit/>
- [5] KAZANDJIAN, Dickran. Multiple myeloma epidemiology and survival: A unique malignancy. *Seminars in Oncology* [online]. 2016, 43(6), 676–681 [cit. 2022-10-23]. ISSN 00937754. Dostupné z: doi:10.1053/j.seminoncol.2016.11.004
- [6] RAJKUMAR, S. Vincent. Multiple myeloma: 2022 update on diagnosis, risk stratification, and management. *American Journal of Hematology* [online]. 2022, 97(8), 1086–1107 [cit. 2022-10-23]. ISSN 0361-8609. Dostupné z: doi:10.1002/ajh.26590
- [7] KREJČÍ, D., L. PEHALOVÁ, A. TALÁBOVÁ, K. POKOROVÁ, I. KATINOVÁ, J. MUŽÍK a L. DUŠEK. *Novotvary 2018 ČR: Současné epidemiologické trendy novotvarů v České republice* [online]. Ústav zdravotnických informací a statistiky, 2018, 286294 [cit. 2022-11-19]. Dostupné z: <https://www.uzis.cz/res/f/008352/novotvary2018.pdf>
- [8] MAISNAR, Vladimír a Miloš TICHÝ. *Monoklonální imunoglobuliny – výskyt, význam a možnosti jejich průkazu*. Praha: Nucleus HK, 2012. ISBN 978-80-87009-87-1.

- [9] OZA, A a S V RAJKUMAR. Waldenstrom macroglobulinemia: Prognosis and management. *Blood Cancer Journal* [online]. 2015, 5(3), 394–394 [cit. 2023-03-29]. ISSN 2044-5385. Dostupné z: doi:10.1038/bcj.2015.28
- [10] HEIDER, Michael, Katharina NICKEL, Marion HÖGNER a Florian BASSERMANN. Multiple Myeloma: Molecular Pathogenesis and Disease Evolution. *Oncology Research and Treatment* [online]. 2021, 44(12), 672–681 [cit. 2022-11-21]. ISSN 2296-5270. Dostupné z: doi:10.1159/000520312
- [11] TERPOS, Evangelos, Ioannis NTANASIS-STATHOPOULOS, Maria GAVRIATOPOULOU a Meletios A. DIMOPOULOS. Pathogenesis of bone disease in multiple myeloma: from bench to bedside. *Blood Cancer Journal* [online]. 2018, 8(1) [cit. 2022-11-21]. ISSN 2044-5385. Dostupné z: doi:10.1038/s41408-017-0037-4
- [12] STRAUB, Jan, Zdeněk ADAM, Evžen GREGORA et al. Mnohočetný myelom – časná diagnostika. *Medicína pro praxi* [online]. 2009, 64, 197–199 [cit. 2022-11-24]. Dostupné z: <https://www.medicinapropraxi.cz/pdfs/med/2009/04/06.pdf>
- [13] TALAMO, Giampaolo, Umar FAROOQ, Maurizio ZANGARI, Jason LIAO, Nathan G. DOLLOFF, Thomas P. LOUGHRAN a Elliot EPNER. Beyond the CRAB Symptoms: A Study of Presenting Clinical Manifestations of Multiple Myeloma. *Clinical Lymphoma Myeloma and Leukemia* [online]. 2010, 10(6), 464–468 [cit. 2022-11-26]. ISSN 21522650. Dostupné z: doi:10.3816/CLML.2010.n.080
- [14] ADAM, Zdeněk a Vladimír MAISNAR. *Mnohočetný myelom: Jak včas rozpoznat tuto nemoc a jak s ní žít. Informace pro nemocné a jejich blízké* [online]. 3., přeprac. a dopl. vyd. Brno: Masarykova univerzita pro Českou myelomovou skupinu, 2008 [cit. 2022-11-24]. ISBN 978-80-210-4680-1. Dostupné z: <https://www.myeloma.cz/index.php?pg=aktuality&aid=50>
- [15] ADAM, Zdeněk, Marta KREJČÍ a Jiří VORLÍČEK. *Hematologie: přehled maligních hematologických nemocí*. 2., dopl. a zcela přeprac. vyd. Praha: Grada, 2008. ISBN 978-80-247-2502-4.
- [16] OYAJOBI, Babatunde O. *Multiple myeloma/hypercalcemia* [online]. 2007, 9(1) [cit. 2022-11-29]. ISSN 14786354. Dostupné z: doi:10.1186/ar2168

- [17] KARIM, Kanar J., Abid M. HASSAN, Hisham A. GETTA et al. *Frequency and Prognostic Significance of Hypercalcemia Patients with Multiple Myeloma* [online]. *Med J Babylon*, 2020, (17), 327–331 [cit. 2022-11-29]. Dostupné z: doi:10.4103/MJBL.MJBL_54_20
- [18] KUNDU, Sumana, Surajkumar B JHA, Ana P RIVERA, Gabriela V FLORES MONAR, Hamza ISLAM, Sri Madhurima PUTTAGUNTA, Rabia ISLAM a Ibrahim SANGE. Multiple Myeloma and Renal Failure: Mechanisms, Diagnosis, and Management. *Cureus* [online]. 2022 [cit. 2022-11-29]. ISSN 2168-8184. Dostupné z: doi:10.7759/cureus.22585
- [19] SRIDEVI, Hanaganahalli B. Pancytopenia in Multiple Myeloma- An Enigma: Our Experience from Tertiary Care Hospital. *JOURNAL OF CLINICAL AND DIAGNOSTIC RESEARCH* [online]. 2015 [cit. 2022-11-30]. ISSN 2249782X. Dostupné z: doi:10.7860/JCDR/2015/12788.6718
- [20] PAN, Pengji, Junxia LIU a Fenglin LIU. Analysis of Coagulation Abnormality in Patients with Multiple Myeloma and Its Clinical Significance. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* [online]. 2022, 1–6 [cit. 2022-11-30]. ISSN 1741-4288. Dostupné z: doi:10.1155/2022/5120967
- [21] MACHÁLKOVÁ, K., J. RADOCHA a V. MAISNAR. Hyperviskózní syndrom u pacientů s mnohočetným myelomem. *Klinická biochemie a metabolismus* [online]. 2011, 19(40), 9395 [cit. 2022-11-30]. Dostupné z: <https://www.cskb.cz/res/file/KBM-pdf/2011/2011-2/KBM-2-11-93-Machalkova.pdf>
- [22] ADAM, Z., G. CHLUPOVÁ, J. TOMÁŠEK et al. Systémové a paraneoplastické projevy maligních onemocnění. *Vnitřní lékařství* [online]. 2007, 53(3), 253285 [cit. 2022-11-30]. Dostupné z: <https://www.casopisvnitrnilekarstvi.cz/pdfs/vnl/2007/03/09.pdf>
- [23] RUMLAROVÁ, Šárka, Lucie SIRÁKOVÁ, Petr ŠMAHEL, Josef CHMELARŤ a Roman CHLÍBEK. Očkování onkologických pacientů. *Onkologie* [online]. 16(2), 81–86 [cit. 2022-12-10]. Dostupné z: <https://www.solen.cz/pdfs/xon/2022/02/07.pdf>

- [24] Záchyt mnohočetného myelomu může zvýšit obyčejná sedimentace. In: *Medical Tribune* [online]. [cit. 2023-01-02]. Dostupné z: <https://www.tribune.cz/komentare/zachyt-mnohocetneho-myelomu-muze-zvysit-obycejna-sedimentace/>
- [25] *Transfuze a hematologie dnes: Diagnostika a léčba mnohočetného myelomu* [online]. Česká lékařská společnost J. E. Purkyně, 2018 [cit. 2023-01-02]. ISSN 1805-4587. Dostupné z: https://www.myeloma.cz/res/file/guidelines/TRANSFUZE_SUPPLEMENTUM_2018.pdf
- [26] MGUS, mnohočetný myelom. In: *Axon* [online]. [cit. 2023-02-08]. Dostupné z: <https://www.axon-med.cz/2021/04/mgus-mnohocetny-myelom.html>
- [27] 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* [online]. 2008, 54(9), 847–861 [cit. 2023-01-02]. Dostupné z: <https://casopisvnitrnilekarstvi.cz/pdfs/vnl/2008/09/08.pdf>
- [28] RAJAN, A M a S V RAJKUMAR. Interpretation of cytogenetic results in multiple myeloma for clinical practice. *Blood Cancer Journal* [online]. 2015, 5(10), 365–365 [cit. 2023-01-02]. ISSN 2044-5385. Dostupné z: doi:10.1038/bcj.2015.92
- [29] JURCZYSZYN, Artur, Grzegorz CHARLIŃSKI, Anna SUSKA a David H. VESOLE. The importance of cytogenetic and molecular aberrations in multiple myeloma. *Acta Haematologica Polonica* [online]. 2021, 52(4), 361–370 [cit. 2023-01-02]. ISSN 0001–5814. Dostupné z: doi:10.5603/AHP.2021.0069
- [30] ADAM, Zdeněk, Evžen GREGORA, Roman HÁJEK et al. *Diagnostika a léčba mnohočetného myelomu: Doporučení České myelové skupiny a Myelomové sekce České hematologické společnosti pro diagnostiku a léčbu mnohočetného myelomu* [online]. 2003 [cit. 2023-01-02]. Dostupné z: <https://www.myeloma.cz/index.php?pg=mnohocetny-myelom--guidelines>
- [31] TEOH, Phaik Ju a Wee Joo CHNG. CAR T-cell therapy in multiple myeloma: more room for improvement. *Blood Cancer Journal* [online]. 2021, 11(4) [cit. 2023-03-29]. ISSN 2044-5385. Dostupné z: doi:10.1038/s41408-021-00469-5

- [32] SHAH, Nina, Ajai CHARI, Emma SCOTT, Khalid MEZZI a Saad Z. USMANI. B-cell maturation antigen (BCMA) in multiple myeloma: rationale for targeting and current therapeutic approaches. *Leukemia* [online]. 2020, 34(4), 985–1005 [cit. 2023-03-29]. ISSN 0887-6924. Dostupné z: doi:10.1038/s41375-020-0734-z
- [33] RENDO, Matthew J, Jacinth J JOSEPH, Liem Minh PHAN a Christin B DESTEFANO. CAR T-Cell Therapy for Patients with Multiple Myeloma: Current Evidence and Challenges. *Blood and Lymphatic Cancer: Targets and Therapy* [online]. 2022, 12, 119–136 [cit. 2023-01-02]. ISSN 1179-9889. Dostupné z: doi:10.2147/BLCTT.S327016
- [34] MAAKARON, Joseph E, Marie HU a Najla EL JURDI. Chimeric antigen receptor T cell therapy for cancer: clinical applications and practical considerations. *BMJ* [online]. 378-2021-068956 [cit. 2023-03-29]. ISSN 1756-1833. Dostupné z: doi:10.1136/bmj-2021-068956
- [35] POUR, L., R. HÁJEK, Z. ADAM, M. KREJČÍ a J. VORLÍČEK. Význam autologní transplantace u mnohočetného myelomu. *Vnitřní lékařství* [online]. 2009, 55(9), 767–772 [cit. 2023-01-02]. Dostupné z: https://www.casopisvnitrnilekarstvi.cz/artkey/vnl-200909-0010_the-importance-of-autologous-transplantation-in-multiple-myeloma.php
- [36] HAFERLACH, Torsten. *Kapesní atlas hematologie: překlad 6., přepracovaného vydání*. Praha: Grada, 2014. ISBN 978-80-247-4787-3.
- [37] What is Myeloma? In: *Centre for Clinical Haematology* [online]. 2023 [cit. 2023-03-29]. Dostupné z: <https://cfch.com.sg/myeloma/>
- [38] NAEIM, Faramarz, P. Nagesh RAO a Wayne W. GRODY. Plasma Cell Myeloma and Related Disorders. In: *Hematopathology: Morphology, Immunophenotype, Cytogenetics and Molecular Approaches* [online]. Academic Press, 2008, s. 373–396 [cit. 2023-02-09]. ISBN 978-0-12-370607-2. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/book/9780123706072/hematopathology#book-info>
- [39] MOONIM, MT a A PORWIT. Normal bone marrow histology. *Blood and Bone Marrow Pathology* [online]. Elsevier, 2011, 45–62 [cit. 2023-02-09]. ISBN 9780702031472. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-7020-3147-2.00003-1

- [40] Komentář k vyhodnocení cyklu DIF3/22 – Hodnocení nátěru periferní krve: Obrazová příloha. In: *SEKK* [online]. [cit. 2023-03-29]. Dostupné z: http://sekk.cz/eqa/2022/DIF322_Photo.htm
- [41] INVERNIZZI, Rosangela. Images from the Haematologica Atlas of Hematologic Cytology: Plasma cell myeloma. *Haematologica* [online]. 2021, 106(4), 925–925 [cit. 2023-02-09]. ISSN 1592-8721. Dostupné z: doi:10.3324/haematol.2021.278331
- [42] Plasma cell myeloma. In: *Atlas of haematological cytology: with flowcytometry, cytogenetic and molecular biology findings* [online]. Masaryk University, Faculty of Medicine Institute of Biostatistics and Analyses [cit. 2023-02-09]. Dostupné z: <https://www.leukemia-cell.org/atlas/>
- [43] ZHAOYUN, Liu a Fu RONG. Predictive Role of Immune Profiling for Survival of Multiple Myeloma Patients. *Frontiers in Immunology* [online]. 2021, 12 [cit. 2023-02-11]. ISSN 1664-3224. Dostupné z: doi:10.3389/fimmu.2021.663748
- [44] SOLIMAN, Amro M., Srijit DAS a Seong Lin TEOH. Next-Generation Biomarkers in Multiple Myeloma: Understanding the Molecular Basis for Potential Use in Diagnosis and Prognosis. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2021, 22(14) [cit. 2023-02-11]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms22147470
- [45] ANNAMARIA GULLA a KENNETH C. ANDERSON. Multiple myeloma: the (r)evolution of current therapy and a glance into future. *Haematologica* [online]. 2020, 105(10), 2358–2367 [cit. 2023-02-11]. ISSN 1592-8721. Dostupné z: doi:10.3324/haematol.2020.247015
- [46] MEDDOUR, Yanis, Momahed CHERIF RAHALI, Salah EDDINE BELAKEHAL, Nacera BENFENATKI, Fatma ZOHRA ARDJOUNE, Samia CHAIB a Reda DJIDJIK. Plasma Cell Immunophenotyping Improve Prognostic Stratification of Multiple Myeloma Patients. *International Journal of Cancer Management* [online]. 2018, 11(1) [cit. 2023-02-11]. ISSN 2538-4422. Dostupné z: doi:10.5812/ijcm.5350
- [47] DENG, Zicheng, Shengming WU, Yilong WANG a Donglu SHI. Circulating tumor cell isolation for cancer diagnosis and prognosis. *EBioMedicine* [online]. 2022, 83 [cit. 2023-03-19]. ISSN 23523964. Dostupné z: doi:10.1016/j.ebiom.2022.104237

- [48] LI, Jia, Ningning WANG, Nahom TESFALUUL, Xiaojuan GAO, Shuai LIU, Baohong YUE a Masaru KATOH. Prognostic value of circulating plasma cells in patients with multiple myeloma: A meta-analysis. *PLOS ONE* [online]. 2017, 12(7) [cit. 2023-02-11]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0181447
- [49] BEZDĚKOVÁ, Renata, Miroslav PENKA, Roman HÁJEK a Lucie ŘÍHOVÁ. Circulating Plasma Cells in Monoclonal Gammopathies. *Klinická Onkologie* [online]. 2017, 30(2), 229–234 [cit. 2023-02-11]. ISSN 0862495X. Dostupné z: doi:10.14735/amko20172S29
- [50] KUBACZKOVÁ, Veronika, Lenka SEDLAŘÍKOVÁ, Božena BOLLOVÁ, Viera SANDECKÁ, Martin ŠTORK, Luděk POUR a Sabina ŠEVČÍKOVÁ. Liquid Biopsies – the Clinics and the Molecules. *Klinická onkologie* [online]. 2017, 30(2), 213–220 [cit. 2023-03-21]. ISSN 0862495X. Dostupné z: doi:10.14735/amko20172S13
- [51] SZCZEPANIAK, Andrzej, Maciej KAŻMIERCZAK, Mieczysław KOMARNICKI, Anna PRZYBYŁOWICZ-CHALECKA, Violetta FILAS, Michał MICHALAK a Lidia GIL. The prognostic significance of bone marrow histological evaluation in patients with multiple myeloma. *Acta Haematologica Polonica* [online]. 2021, 52(5), 493–503 [cit. 2023-02-11]. ISSN 2300-7117. Dostupné z: doi:10.5603/AHP.2021.0088
- [52] ROBAK, Paweł, Janusz SZEMRAJ, Damian MIKULSKI et al. Prognostic Value of Resistance Proteins in Plasma Cells from Multiple Myeloma Patients Treated with Bortezomib-Based Regimens. *Journal of Clinical Medicine* [online]. 2021, 10(21) [cit. 2023-02-12]. ISSN 2077-0383. Dostupné z: doi:10.3390/jcm10215028
- [53] GIACCHERINI, Matteo, Angelica MACAUDA, Enrico ORCIUOLO et al. Genetically determined telomere length and multiple myeloma risk and outcome. *Blood Cancer Journal* [online]. 2021, 11(4) [cit. 2023-03-29]. ISSN 2044-5385. Dostupné z: doi:10.1038/s41408-021-00462-y
- [54] *Cancer cell culture basics handbook* [online]. Thermo Fisher Scientific, 2020 [cit. 2023-03-07]. Dostupné z: <https://www.researchgate.net/institution/Thermo-Fisher-Scientific/post/Download-the-Gibco-Cell-Culture-Basics-Handbook-5f3fd15d631840447615bcc6>

- [55] HENRY, N. Lynn a Daniel F. HAYES. Cancer biomarkers. *Molecular Oncology* [online]. 2012, 6(2), 140–146 [cit. 2023-03-29]. ISSN 15747891. Dostupné z: doi:10.1016/j.molonc.2012.01.010
- [56] RAMANATHAN, Lakshmi V., Martin FLEISHER a Michael J. DUFFY. *Cancer Biomarkers: A volume in Clinical Aspects and Laboratory Determination* [online]. Elsevier, 2022 [cit. 2023-03-29]. ISBN 978-0-12-824302-2. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/book/9780128243022/cancer-biomarkers#book-info>
- [57] KOUDELÁKOVÁ, Vladimíra, Magdalena KNEBLOVÁ a Marián HAJDÚCH. Personalizovaná medicína a biomarkery v onkologii. *Klinická farmakologie a farmacie* [online]. 26(4), 181–185 [cit. 2023-03-30]. Dostupné z: <https://www.klinickafarmakologie.cz/pdfs/far/2012/04/06.pdf>
- [58] HUANG, Chen Kai, Ying SUN, Lei LV a Yong PING. ENO1 and Cancer. *Molecular Therapy – Oncolytics* [online]. 2022, 24, 288–298 [cit. 2023-03-30]. ISSN 23727705. Dostupné z: doi:10.1016/j.omto.2021.12.026
- [59] LOPEZ-ALEMANY, Roser, Monica SUELVES, Angels DIAZ-RAMOS, Berta VIDAL a Pura MUNOZ-CANOVES. Alpha-enolase plasminogen receptor in myogenesis. *Frontiers in Bioscience* [online]. 2005, 10(1–3) [cit. 2023-03-30]. ISSN 10939946. Dostupné z: doi:10.2741/1503
- [60] JI, Hong, Jianfa WANG, Jingru GUO et al. Progress in the biological function of alpha-enolase. *Animal Nutrition* [online]. 2016, 2(1), 12–17 [cit. 2023-03-30]. ISSN 24056545. Dostupné z: doi:10.1016/j.aninu.2016.02.005
- [61] LI, Hsin-Jung, Feng-Yi KE, Chia-Ching LIN et al. ENO1 Promotes Lung Cancer Metastasis via HGFR and WNT Signaling–Driven Epithelial-to-Mesenchymal Transition. *Cancer Research* [online]. 2021, 81(15), 4094–4109 [cit. 2023-03-30]. ISSN 0008-5472. Dostupné z: doi:10.1158/0008-5472.CAN-20-3543
- [62] PRINCIPE, Moitza a Paola CAPPELLO. Blockade of Surface Alpha-Enolase (ENO1) as a Novel Immunotherapeutic Approach in Pancreatic Cancer. *Chemotherapy* [online]. 2016, 05(02) [cit. 2023-03-30]. ISSN 21677700. Dostupné z: doi:10.4172/2167-7700.1000188

- [63] CHENG, Zhengwu, Xinyu SHAO, Menglin XU, Chunli ZHOU a Junfeng WANG. ENO1 Acts as a Prognostic Biomarker Candidate and Promotes Tumor Growth and Migration Ability Through the Regulation of Rab1A in Colorectal Cancer. *Cancer Management and Research* [online]. 2019, 11, 9969–9978 [cit. 2023-03-30]. ISSN 1179–1322. Dostupné z: doi:10.2147/CMAR.S226429
- [64] RAY, Arghya, Yan SONG, Ting DU, Dharminder CHAUHAN a Kenneth C. ANDERSON. Preclinical validation of Alpha-Enolase (ENO1) as a novel immunometabolic target in multiple myeloma. *Oncogene* [online]. 2020, 39(13), 2786–2796 [cit. 2023-03-30]. ISSN 0950-9232. Dostupné z: doi:10.1038/s41388-020-1172-0
- [65] LI, M, J LI, J WANG, Y LI a P YANG. Serum level of anti- α -enolase antibody in untreated systemic lupus erythematosus patients correlates with 24-hour urine protein and D-dimer. *Lupus* [online]. 2018, 27(1), 139–142 [cit. 2023-03-30]. ISSN 0961-2033. Dostupné z: doi:10.1177/0961203317721752
- [66] BAE, Seyeon, Hyemin KIM, Naeun LEE et al. α -Enolase Expressed on the Surfaces of Monocytes and Macrophages Induces Robust Synovial Inflammation in Rheumatoid Arthritis. *The Journal of Immunology* [online]. 2012, 189(1), 365–372 [cit. 2023-03-30]. ISSN 0022-1767. Dostupné z: doi:10.4049/jimmunol.1102073
- [67] VERMEULEN, Nathalie, Ingrid ARIJS, Sofie JOOSSENS et al. Anti- α -enolase Antibodies in Patients with Inflammatory Bowel Disease. *Clinical Chemistry* [online]. 2008, 54(3), 534–541 [cit. 2023-03-30]. ISSN 0009-9147. Dostupné z: doi:10.1373/clinchem.2007.098368
- [68] REN, Gaoying a Grazyna ADAMUS. Cellular targets of anti- α -enolase autoantibodies of patients with autoimmune retinopathy. *Journal of Autoimmunity* [online]. 2004, 23(2), 161–167 [cit. 2023-03-30]. ISSN 08968411. Dostupné z: doi:10.1016/j.jaut.2004.06.003
- [69] FUJII, A., M. YONEDA, T. ITO et al. Autoantibodies against the amino terminal of α -enolase are a useful diagnostic marker of Hashimoto's encephalopathy. *Journal of Neuroimmunology* [online]. 2005, 162(1-2), 130–136 [cit. 2023-03-30]. ISSN 01655728. Dostupné z: doi:10.1016/j.jneuroim.2005.02.004

- [70] QIAO, Gan, Anguo WU, Xiaoliang CHEN, Ye TIAN a Xiukun LIN. Enolase 1, a Moonlighting Protein, as a Potential Target for Cancer Treatment. *International Journal of Biological Sciences* [online]. 2021, 17(14), 3981–3992 [cit. 2023-03-30]. ISSN 1449-2288. Dostupné z: doi:10.7150/ijbs.63556
- [71] NAKAMURA, Noriko, Qunsheng DAI, Jason WILLIAMS, Eugenia H. GOULDING, William D. WILLIS, Paula R. BROWN a Edward M. EDDY. Disruption of a Spermatogenic Cell-Specific Mouse Enolase 4 (Eno4) Gene Causes Sperm Structural Defects and Male Infertility¹. *Biology of Reproduction* [online]. 2013, 88(4) [cit. 2023-03-30]. ISSN 0006-3363. Dostupné z: doi:10.1095/biolreprod.112.107128
- [72] VAUPEL, Peter, Heinz SCHMIDBERGER a Arnulf MAYER. The Warburg effect: essential part of metabolic reprogramming and central contributor to cancer progression. *International Journal of Radiation Biology* [online]. 2019, 95(7), 912–919 [cit. 2023-03-30]. ISSN 0955-3002. Dostupné z: doi:10.1080/09553002.2019.1589653
- [73] ANCEY, Pierre-Benoit, Caroline CONTAT a Etienne MEYLAN. Glucose transporters in cancer – from tumor cells to the tumor microenvironment. *The FEBS Journal* [online]. 2018, 285(16), 2926-2943 [cit. 2023-03-30]. ISSN 1742-464X. Dostupné z: doi:10.1111/febs.14577
- [74] SCHILIRO, Chelsea a Bonnie L. FIRESTEIN. Mechanisms of Metabolic Reprogramming in Cancer Cells Supporting Enhanced Growth and Proliferation. *Cells* [online]. 2021, 10(5) [cit. 2023-03-30]. ISSN 2073-4409. Dostupné z: doi:10.3390/cells10051056
- [75] ZHANG, Yi, Qiong LI, Zhao HUANG, Bowen LI, Edouard C. NICE, Canhua HUANG, Liuya WEI a Bingwen ZOU. Targeting Glucose Metabolism Enzymes in Cancer Treatment: Current and Emerging Strategies. *Cancers* [online]. 2022, 14(19) [cit. 2023-03-30]. ISSN 2072-6694. Dostupné z: doi:10.3390/cancers14194568
- [76] KIM, So-Hee a Kwang-Hyun BAEK. Regulation of Cancer Metabolism by Deubiquitinating Enzymes: The Warburg Effect. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2021, 22(12) [cit. 2023-03-30]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms22126173

- [77] KOLTAI, Tomas, Stephan J. RESHKIN a Salvador HARGUINDEY. Carbonic anhydrases. *An Innovative Approach to Understanding and Treating Cancer: Targeting pH* [online]. Elsevier, 2020, 157-176 [cit. 2023-03-31]. ISBN 9780128190593. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-819059-3.00007-1
- [78] Carbonic anhydrase 1: Summary. In: *The Human Protein Atlas* [online]. [cit. 2023-03-31]. Dostupné z: <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000133742-CA1>
- [79] LEE, Shen-Han a John R. GRIFFITHS. How and Why Are Cancers Acidic? Carbonic Anhydrase IX and the Homeostatic Control of Tumour Extracellular pH. *Cancers* [online]. 2020, 12(6) [cit. 2023-03-31]. ISSN 2072-6694. Dostupné z: doi:10.3390/cancers12061616
- [80] MBOGE, Mam, Brian MAHON, Robert MCKENNA a Susan FROST. Carbonic Anhydrases: Role in pH Control and Cancer. *Metabolites* [online]. 2018, 8(1) [cit. 2023-03-31]. ISSN 2218-1989. Dostupné z: doi:10.3390/metabo8010019
- [81] BENEJ, Martin, Silvia PASTOREKOVA a Jaromir PASTOREK. Carbonic Anhydrase IX: Regulation and Role in Cancer. *Carbonic Anhydrase: Mechanism, Regulation, Links to Disease, and Industrial Applications* [online]. Dordrecht: Springer Netherlands, 2014, 199–219 [cit. 2023-03-31]. Subcellular Biochemistry. ISBN 978-94-007-7358-5. Dostupné z: doi:10.1007/978-94-007-7359-2_11
- [82] MINICHOVÁ, Lenka, Ludovít ŠKULTÉTY a Ján LAKOTA. Autoimmune phenomena and spontaneous tumour regression. The role of carbonic anhydrase I. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* [online]. 2021, 25(11), 5339–5340 [cit. 2023-03-31]. ISSN 1582-1838. Dostupné z: doi:10.1111/jcmm.16525
- [83] RICHTER, Magdalena, Oliwia PIWOCKA, Marika MUSIELAK, Igor PIOTROWSKI, Wiktoria M. SUCHORSKA a Tomasz TRZECIAK. From Donor to the Lab: A Fascinating Journey of Primary Cell Lines. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* [online]. 2021, 9 [cit. 2023-03-22]. ISSN 2296-634X. Dostupné z: doi:10.3389/fcell.2021.711381
- [84] IORIO, Francesco, Theo A. KNIJNENBURG, Daniel J. VIS et al. A Landscape of Pharmacogenomic Interactions in Cancer. *Cell* [online]. 2016, 166(3), 740–754 [cit. 2023-03-22]. ISSN 00928674. Dostupné z: doi:10.1016/j.cell.2016.06.017

- [85] MIRABELLI, COPPOLA a SALVATORE. Cancer Cell Lines Are Useful Model Systems for Medical Research. *Cancers* [online]. 2019, 11(8) [cit. 2023-03-22]. ISSN 2072-6694. Dostupné z: doi:10.3390/cancers11081098
- [86] GILLET, J.-P., S. VARMA a M. M. GOTTESMAN. The Clinical Relevance of Cancer Cell Lines. *JNCI Journal of the National Cancer Institute* [online]. 2013, 105(7), 452–458 [cit. 2023-03-22]. ISSN 0027-8874. Dostupné z: doi:10.1093/jnci/djt007
- [87] RPMI-8226. In: *DSMZ Leibniz Institut: DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH* [online]. [cit. 2023-03-22]. Dostupné z: <https://www.dsmz.de/collection/catalogue/details/culture/ACC-402>
- [88] RANI, Usha, Meeta SINGH, Armaan SAITH, Shayama L. JAIN, Anurag AGGARWAL a Sunita AGGARWAL. Evaluation of Use of RPMI Medium to Preserve Cell Morphology for Pleural/Peritoneal Fluid Cytology. *Journal of Cytology* [online]. 26–29 [cit. 2023-03-22]. Dostupné z: doi:10.4103/joc.joc_130_21
- [89] Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 Medium. In: *Thermo Fisher Scientific* [online]. [cit. 2023-03-22]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/cz/en/home/life-science/cell-culture/mammalian-cell-culture/cell-culture-media/rpmi.html>
- [90] Enolase 1: Cell line. In: *The Human Protein Atlas* [online]. [cit. 2023-03-31]. Dostupné z: <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000074800-ENO1/cell+line>
- [91] Carbonic anhydrase 1: Cell line. In: *The Human Protein Atlas* [online]. [cit. 2023-03-31]. Dostupné z: <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000133742-CA1/cell+line>
- [92] HEL. In: *DSMZ Leibniz Institut: DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH* [online]. [cit. 2023-03-22]. Dostupné z: <https://www.dsmz.de/collection/catalogue/details/culture/ACC-11>
- [93] MARTIN, Paul a Thalia PAPAYANNOPOULOU. HEL Cells: A New Human Erythroleukemia Cell Line with Spontaneous and Induced Globin Expression. *Science* [online]. 1982, 216(4551), 1233–1235 [cit. 2023-03-22]. ISSN 0036-8075. Dostupné z: doi:10.1126/science.6177045

- [94] NAUROY, P, F DELHOMMEAU a F BAKLOUTI. JAK2V617F mRNA metabolism in myeloproliferative neoplasm cell lines. *Blood Cancer Journal* [online]. 2014, 4(6), 222 [cit. 2023-03-22]. ISSN 2044-5385. Dostupné z: doi:10.1038/bcj.2014.43
- [95] ANBL-6 Plasma Cell Myeloma Cell Line. In: *Merck* [online]. [cit. 2023-03-22]. Dostupné z: <https://www.merckmillipore.com>
- [96] SARIN, Vishesh, Katharine YU, Ian D. FERGUSON, Olivia GUGLIEMINI, Matthew A. NIX, Byron HANN, Marina SIROTA a Arun P. WIITA. Evaluating the efficacy of multiple myeloma cell lines as models for patient tumors via transcriptomic correlation analysis. *Leukemia* [online]. 2020, 34(10), 2754–2765 [cit. 2023-03-22]. ISSN 0887-6924. Dostupné z: doi:10.1038/s41375-020-0785-1
- [97] JELINEK, Diane F., Gregory J. AHMANN, Philip R. GREIPP, Syed M. JALAL, Jennifer J. WESTENDORF, Jerry A. KATZMANN, Robert A. KYLE a John A. LUST. Coexistence of Aneuploid Subclones within a Myeloma Cell Line That Exhibits Clonal Immunoglobulin Gene Rearrangement: Clinical Implications. *Cancer Research* [online]. 53, 5320–5327 [cit. 2023-03-22].
- [98] PC-3. In: *DSMZ Leibniz Institut: DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH* [online]. [cit. 2023-03-22]. Dostupné z: <https://www.dsmz.de/collection/catalogue/details/culture/ACC-465>
- [99] FILIZ, Bakar, Karakaya SONGÜL, Delimustafaoğlu BOSTANLıK, Fatma GÜL a Kılıç Ceyda SIBEL. Anticancer Effect of *Ferulago Mughlea* Peşmen (Apiaceae) on Cancer Cell Proliferation. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research* [online]. 2016, 15(3) [cit. 2023-03-22]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5149037/>
- [100] DURAIYAN, Jeyapradha, Rajeshwar GOVINDARAJAN, Karunakaran KALIYAPPAN a Murugesan PALANISAMY. Applications of immunohistochemistry. *Journal of Pharmacy And Bioallied Sciences* [online]. 2012, 4(6) [cit. 2023-03-31]. ISSN 0975-7406. Dostupné z: doi:10.4103/0975-7406.100281

- [101] SCHILDHAUS, Hans-Ulrich. Significance of Immunohistochemistry and In Situ Hybridization Techniques for Predictive Biomarker Studies. *Predictive Biomarkers in Oncology* [online]. Cham: Springer International Publishing, 2019, 45–62 [cit. 2023-03-31]. ISBN 978-3-319-95227-7. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-319-95228-4_4
- [102] MAGAKI, Shino, Seyed A. HOJAT, Bowen WEI, Alexandra SO a William H. YONG. An Introduction to the Performance of Immunohistochemistry. *Biobanking* [online]. New York, NY: Springer New York, 2019, 289–298 [cit. 2023-03-31]. Methods in Molecular Biology. ISBN 978-1-4939-8933-1. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-4939-8935-5_25
- [103] Immunohistochemistry. In: *BD Biosciences* [online]. [cit. 2023-03-31]. Dostupné z: <https://www.bdbiosciences.com/en-us/learn/applications/immunohistochemistry>
- [104] REN, Yan, Maria WANG, Suzana COUTO et al. *A Dual Color Immunohistochemistry Assay for Measurement of Cereblon in Multiple Myeloma Patient Samples* [online]. 2016, 24(10), 695–702 [cit. 2023-03-31]. ISSN 1541-2016. Dostupné z: doi:10.1097/PAI.0000000000000246
- [105] Immunohistochemistry (IHC) vs. Immunocytochemistry (ICC). In: *ThermoFisher Scientific* [online]. [cit. 2023-03-31]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/cz/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/immunohistochemistry-immunocytochemistry.html>
- [106] IM, Kyuseok, Sergey MARENINOV, M. Fernando Palma DIAZ a William H. YONG. An Introduction to Performing Immunofluorescence Staining. *Biobanking* [online]. New York, NY: Springer New York, 2019, 299–311 [cit. 2023-03-31]. Methods in Molecular Biology. ISBN 978-1-4939-8933-1. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-4939-8935-5_26
- [107] GHANADAN, Alireza, Amene SAGHAZADEH, Issa JAHANZAD a Nima REZAEI. Clinical aspects of indirect immunofluorescence for autoimmune diseases. *Expert Review of Clinical Immunology* [online]. 2015, 11(5), 597–616 [cit. 2023-03-31]. ISSN 1744-666X. Dostupné z: doi:10.1586/1744666X.2015.1027152

- [108] LAGER, Malin. *Molecular and serological tools for clinical diagnostics of Lyme borreliosis: Can the laboratory analysis be improved?* [online]. Linköping: Linköping University Medical Dissertations, 2020 [cit. 2023-03-31]. ISBN 978-91-7929-833-3. ISSN 0345-0082. Dostupné z: <http://liu.diva-portal.org/smash/record.jsf?pid=diva2%3A1477572&dswid=-7149>
- [109] CASTELLA, Maria, Carlos FERNÁNDEZ DE LARREA a Beatriz MARTÍN-ANTONIO. Immunotherapy: A Novel Era of Promising Treatments for Multiple Myeloma. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2018, 19(11) [cit. 2023-03-31]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: [doi:10.3390/ijms19113613](https://doi.org/10.3390/ijms19113613)
- [110] MCKINNON, Katherine M. Flow Cytometry: An Overview. *Current Protocols in Immunology* [online]. 2018, 120(1) [cit. 2023-03-31]. ISSN 1934-3671. Dostupné z: [doi:10.1002/cpim.40](https://doi.org/10.1002/cpim.40)
- [111] Principles of flow cytometry. In: *Streck* [online]. [cit. 2023-03-31]. Dostupné z: <https://www.streck.com/blog/principles-of-flow-cytometry/>
- [112] ZHANG, Congming a Yanan ZHANG. Bone marrow particle enrichment analysis for the laboratory diagnosis of multiple myeloma: A case study. *Journal of Clinical Laboratory Analysis* [online]. 2020, 34(9) [cit. 2023-03-31]. ISSN 0887-8013. Dostupné z: [doi:10.1002/jcla.23372](https://doi.org/10.1002/jcla.23372)
- [113] Basic Principles of RT-qPCR. In: *Thermo Fisher Scientific* [online]. [cit. 2023-03-31]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/cz/en/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology.html>
- [114] BlazeTaq™ SYBR Green qPCR Mix 2.0. In: *GeneCopia* [online]. [cit. 2023-03-31]. Dostupné z: <https://www.genecopia.com/product/qpcr-products/blazetaq-sybr-green-qpcr-mix/>
- [115] HOWE, Bradley, Ayesha UMRIGAR a Fern TSIEN. Chromosome Preparation From Cultured Cells. *Journal of Visualized Experiments* [online]. 2014, (83) [cit. 2023-04-01]. ISSN 1940-087X. Dostupné z: [doi:10.3791/50203](https://doi.org/10.3791/50203)
- [116] Karyotype Analysis. In: *Creative Bioarray* [online]. [cit. 2023-04-01]. Dostupné z: <https://www.creative-bioarray.com/support/karyotype-analysis.htm>

- [117] MAILANKODY, Sham, Esther MENA, Constance M. YUAN, Arun BALAKUMARAN, W. Michael KUEHL a Ola LANDGREN. *Molecular and biologic markers of progression in monoclonal gammopathy of undetermined significance to multiple myeloma* [online]. 2010, 51(12), 2159–2170 [cit. 2023-04-01]. ISSN 1042-8194. Dostupné z: doi:10.3109/10428194.2010.525725
- [118] SLABÝ, Ondřej. Technologie sekvenování nové generace: celogenomové, celoexomové a cílené – hotspot – sekvenování. *ProLékaře.cz* [online]. [cit. 2023-04-01]. Dostupné z: <https://www.prolekare.cz/tema/precizni-medicina/detail/technologie-sekvenovani-nove-generace-celogenomove-celoexomove-a-cilene-hotspot-sekvenovani-105628>
- [119] ARYAL, Sagar. Next-Generation Sequencing (NGS) – Definition, Types. In: *Microbe Notes* [online]. [cit. 2023-04-01]. Dostupné z: <https://microbenotes.com/next-generation-sequencing-ngs/>
- [120] MEFTAHI, Gholam Hossein, Zahra BAHARI, Ali ZAREI MAHMOUDABADI, Maryam IMAN a Zohreh JANGRAVI. Applications of western blot technique: From bench to bedside. *Biochemistry and Molecular Biology Education* [online]. 2021, 49(4), 509–517 [cit. 2023-04-01]. ISSN 1470-8175. Dostupné z: doi:10.1002/bmb.21516
- [121] Western Blotting. In: *BioLegend* [online]. [cit. 2023-04-01]. Dostupné z: <https://www.biolegend.com/en-us/western-blot>
- [122] MAGDELDIN, Sameh, Shymaa ENANY, Yutaka YOSHIDA et al. Basics and recent advances of two dimensional- polyacrylamide gel electrophoresis. *Clinical Proteomics* [online]. 2014, 11(1) [cit. 2023-04-01]. ISSN 1542-6416. Dostupné z: doi:10.1186/1559-0275-11-16
- [123] HILLER-STURMHÖFEL, Susanne, Josip SOBIN a Roy Dayne MAYFIELD. Proteomic Approaches for Studying Alcoholism and Alcohol-Induced Organ Damage. *Alcohol research & health: the journal of the National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism* [online]. 31(1), 36–48 [cit. 2023-04-01]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3860448/>

- [124] VÍTÁMVÁS, Pavel, Klára KOSOVÁ, Zbyněk ŠKODÁČEK a Ilja Tom PRÁŠIL. Metoda dvourozměrné diferenční gelové elektroforézy (2-D DIGE) a její využití v proteomice. *Chemické listy* [online]. 104, 671–676 [cit. 2023-04-01]. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2010_07_671-676.pdf
- [125] VISWANATHAN, Surya, Mustafa ÜNLÜ a Jonathan S MINDEN. Two-dimensional difference gel electrophoresis. *Nature Protocols* [online]. 2006, 1(3), 1351–1358 [cit. 2023-04-01]. ISSN 1754-2189. Dostupné z: doi:10.1038/nprot.2006.234
- [126] DVOŘÁKOVÁ, P., L. HERNYCHOVÁ a B. VOJTĚŠEK. Analýza proteinů pomocí hmotnostní spektrometrie. *Klinická onkologie* [online]. 27, 104–109 [cit. 2023-04-01]. Dostupné z: <https://www.linkos.cz/casopis-klinicka-onkologie/2014-06-15-supplement-um-1/analiza-proteinu-pomoci-hmotnostni-spektrometrie/>
- [127] Analýza dat hmotnostní spektrometrie: Time-of-flight spektrometrie. In: *Matematická biologie* [online]. [cit. 2023-04-01]. Dostupné z: <https://portal.matematickabiologie.cz/index.php?pg=analiza-genomickyh-a-proteomickyh-dat--analiza-genomickyh-a-proteomickyh-dat--analiza-dat-hmotnostni-spektrometrie--time-of-flight-spektrometrie>
- [128] Alpha-enolase: Protein information. In: *PhosphoSitePlus* [online]. [cit. 2023-04-20]. Dostupné z: <https://www.phosphosite.org/proteinAction?id=2610&showAllSites=true>
- [129] Carbonic anhydrase 1: Protein information. In: *PhosphoSitePlus* [online]. [cit. 2023-04-20]. Dostupné z: <https://www.phosphosite.org/proteinAction.action?id=21855&showAllSites=true>
- [130] Eppendorfova zkumavka. In: *IMGBIN* [online]. [cit. 2023-04-25]. Dostupné z: <https://imgbin.com/png/ApEm2Ldu/epje-test-tubes-laboratory-centrifuge-png>
- [131] TEUNISSEN, Charlotte E. a Henrik ZETTERBERG. *Cerebrospinal Fluid Biomarkers: Springer Protocols* [online]. New York: Humana Press, 2021 [cit. 2023-04-25]. ISBN 978-1-0716-1319-1. Dostupné z: <https://link.springer.com/book/10.1007/978-1-0716-1319-1>

- [132] LEE, Pey Yee, Neda SARAYGORD-AFSHARI a Teck Yew LOW. The evolution of two-dimensional gel electrophoresis – from proteomics to emerging alternative applications. *Journal of Chromatography A* [online]. 2020, 1615 [cit. 2023-04-25]. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/j.chroma.2019.460763
- [133] Choosing the Right Western Blot Transfer Method: Semi-dry Transfer. In: *LI-COR* [online]. [cit. 2023-04-25]. Dostupné z: <https://www.licor.com/bio/blog/choosing-the-right-western-blot-transfer-method>
- [134] NARYZHNY, Stanislav, Victor ZGODA, Artur KOPYLOV, Elena PETRENKO a Alexander ARCHAKOV. A semi-virtual two dimensional gel electrophoresis: IF–ESI LC-MS/MS. *MethodsX* [online]. 2017, 4, 260–264 [cit. 2023-04-25]. ISSN 22150161. Dostupné z: doi:10.1016/j.mex.2017.08.004
- [135] STEWART, Rachel. Western Blotting. In: *Antibodies.com* [online]. [cit. 2023-04-25]. Dostupné z: <https://www.antibodies.com/es/western-blotting>