

UNIVERZITA PARDUBICE  
FAKULTA CHEMICKO-TECHONOLOGICKÁ

DIPLOMOVÁ PRÁCE

2018

Jana Machková

Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko-technologická

Analýza imunoproteomu v séru pacientů s hematologickým onemocněním

Jana Machková

Diplomová práce

2018

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Jana Machková**  
Osobní číslo: **C16479**  
Studijní program: **N3912 Speciální chemicko-biologické obory**  
Studijní obor: **Analýza biologických materiálů**  
Název tématu: **Analýza imunoproteomu v séru pacientů  
s hematologickým onemocněním**  
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

### Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

#### Teoretická část

- 1) Mnohočetný myelom - patogeneze onemocnění, symptomy, laboratorní diagnostika, terapie - současný stav poznání
- 2) Vývoj a výzkum na poli patogeneze choroby MM, diagnostiky MM, terapie MM - průběžné sledování relevantních odborných zdrojů
- 3) Úvod do proteomiky - definice proteomu, metody analýzy složení proteomu, základní schéma a stručný přehled; imunoproteom - definice, v současnosti popsané metody analýzy.
- 4) Příklady vybraných studií (analýzy imunoproteomu) s popisem metodiky a vyhodnocení výsledků, jejich interpretace v klinickém kontextu
- 5) Autoprotilátky, jejich možné zapojení do etiopatogeneze mnohočetného myelomu - průběžné sledování relevantních odborných zdrojů

#### Experimentální část

- 1) Použití elektroforetických technik a Western Blot metody pro analýzu proteinů
- 2) Zavedení a optimalizace barvicích technik pro detekci proteinů přenesených na membránu
- 3) Zavedení dvourozměrné elektroforetické techniky pro separaci buněčných proteinů s následnou imunodetekcí
- 4) Zavedení metod pro analýzu imunoproteomu a průkaz specifických (auto)protilátek u pacientů s mnohočetným myelomem v remisi

Rozsah grafických prací: **dle potřeby**

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

**Podle pokynů vedoucího diplomové práce.**

Vedoucí diplomové práce: **prof. RNDr. Zuzana Bílková, Ph.D.**  
Katedra biologických a biochemických věd

Konzultant diplomové práce: **Mgr. Eliška Kročová**  
Katedra biologických a biochemických věd

Ostatní konzultanti: **Mgr. Michaela Černá**  
Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání diplomové práce: **18. prosince 2017**

Termín odevzdání diplomové práce: **11. května 2018**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.  
děkan

L.S.



prof. Ing. Alexander Čegan, CSc.  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2018

Prohlašuji:

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

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, 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. 9/2012, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice

V Pardubicích dne 10. 5. 2018

Jana Machková

#### Poděkování:

Ráda bych poděkovala vedoucí diplomové práce paní prof. RNDr. Zuzaně Bílkové, Ph.D. za odborný dohled, paní Mgr. Elišce Kročové za vedení při zpracování práce a panu Mgr. Rudolfovi Kupčíkovi za pomoc při analýze vzorků a zpracování výsledků. V neposlední řadě bych ráda poděkovala své rodině za trpělivost a podporu.

## **ANOTACE**

Práce se zabývá detekcí reaktivních proteinů v séru pacientů s mnohočetným myelomem v remisi. Stručně představuje základní charakteristiku nemoci a jeho možnou terapii. Experimentální část se věnuje zavedení 2D-elektroforézy pro separaci buněčných proteinů, následovanou imunodetekcí a identifikaci proteinů hmotnostní spektrometrií.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

Mnohočetný myelom, proteiny, (auto)protilátky, 2D-elektroforéza, SERPA

## **TITLE**

Serum immunoproteome analysis of patients with hematological diseases

## **ANNOTATION**

The thesis deals with detection of reactive proteins in sera of patients with multiple myeloma in remission. It briefly describes the basic characteristics of the disease and its possible therapy. The experimental part deals with the introduction of 2D electrophoresis for the separation of cellular proteins. This part is added with immunodetection and identification of proteins by mass spectrometry.

## **KEYWORDS**

Multiple myeloma, proteins, (auto)antibodies, 2D-electrophoresis, SERPA

# Obsah

Úvod.....	15
1 Teoretická část .....	16
1.1 Mnohočetný myelom .....	16
1.1.1 Patogeneze mnohočetného myelomu.....	18
1.1.2 Klinické příznaky mnohočetného myelomu .....	22
1.1.3 Diagnostika mnohočetného myelomu .....	24
1.1.4 Terapie mnohočetného myelomu.....	28
1.1.5 Autoprotilátky spojované s rozvojem mnohočetného myelomu .....	36
1.2 Vybrané metody analýzy proteinů .....	37
1.2.1 Elektromigrační techniky.....	38
1.2.2 Metody kapalinové chromatografie pro analýzu proteinů .....	41
1.2.3 Hmotnostní spektrometrie.....	42
1.3 Analýza imunoproteomu .....	44
1.3.1 Metody studia imunoproteomu .....	44
1.3.2 Využití imunoproteomické analýzy proteinů v klinické praxi .....	46
Cíle diplomové práce .....	50
2 Experimentální část.....	51
2.1 Přístroje a pomůcky: .....	51
2.2 Seznam chemikálií a reagensů.....	52
2.3 Vzorokly a buněčné linie.....	54
2.4 Příprava buněčného lyzátu .....	55
2.5 Metody stanovení koncentrace proteinů .....	56
2.5.1 Bicinchoninová metoda pro stanovení koncentrace proteinů.....	56
2.5.2 Stanovení koncentrace proteinů dle Bradfordové.....	56
2.6 Polyakrylamidová gelová elektroforetická separace v prostředí SDS .....	57
2.7 Dvourozměrná elektroforetická separace.....	58
2.8 Vizualizace proteinů pomocí UV záření .....	60
2.9 Vizualizace proteinů na gelu po elektroforetické separaci .....	60
2.9.1 Barvení gelů Coomassie Brilliant Blue .....	61
2.9.2 Barvení gelů dusičnanem stříbrným .....	61
2.10 Semi-dry Western blot s následnou imunodetekcí .....	62
2.10.1 Opakovaná imunodetekce na membráně .....	63



2.11	Vizualizace proteinů na membráně po Western blotu.....	64
2.11.1	Barvení koloidním zlatem.....	64
2.11.2	Barvení Ponceau S .....	64
2.11.3	Barvení koloidním stříbrem .....	64
2.11.4	Barvení Coomassie Brilliant Blue .....	65
2.11.5	Barvení amidočerní.....	65
2.12	Štěpení proteinů v gelu .....	65
2.13	Odsolení vzorků pomocí mikrokolonek a přímé nanesení vzorku na MALDI destičku.....	66
2.14	MS analýza (provedena pracovníkem katedry).....	67
3	Výsledky a diskuze .....	68
3.1	Optimalizace barvení a výběr membrán .....	68
3.1.1	Vizualizace proteinů pomocí UV záření.....	68
3.1.2	Coomassie Brilliant Blue .....	69
3.1.3	Koloidní zlato .....	70
3.1.4	Ponceau S.....	71
3.1.5	Amidočerní .....	72
3.1.6	Koloidní stříbro.....	73
3.2	Výběr protokolu pro izoelektrickou fokusaci .....	74
3.3	Analýza patientských sér metodou serologické proteomové analýzy.....	74
3.3.1	Buněčná linie A549 .....	75
3.3.2	Identifikace skvrn A549 na MS .....	77
3.3.3	Buněčná linie RPMI.....	79
3.3.4	Identifikace RPMI skvrn na MS .....	82
	Závěr .....	86
4	Seznam literatury .....	87

## Seznam ilustrací:

Obrázek 1: Buňky mnohočetného myelomu .....	16
Obrázek 2: Léčba mnohočetného myelomu .....	17
Obrázek 3: Přítomnost paraproteinu při elektroforéze bílkovin .....	18
Obrázek 4: Vývoj mnohočetného myelomu a souvisejících onemocnění .....	19
Obrázek 5: Mikroprostředí kostní dřeně u MM.....	22
Obrázek 6: Imunofixace séra .....	27
Obrázek 7: Mechanismy buněčné smrti.....	35
Obrázek 8: Schéma hmotnostního spektrometru LTQ Orbitrap XL .....	44
Obrázek 9: UV vizualizace – NC a PVDF membrány .....	69
Obrázek 10: Barvení Coomassie Brilliant Blue – NC a PVDF membrány .....	70
Obrázek 11: Barvení koloidním zlatem – NC a PVDF membrány .....	71
Obrázek 12: Barvení Ponceau S – NC a PVDF membrány.....	72
Obrázek 13: Barvení amidočerní – NC a PVDF membrány .....	72
Obrázek 14: Barvení koloidním stříbrem – NC a PVDF membrány.....	73
Obrázek 15: A549 - gel (Coomassie Brilliant Blue) a NC membrána (koloidní stříbro).....	75
Obrázek 16: Imunodetekce (A549) - patientská séra č. 1 a č. 2.....	75
Obrázek 17: Imunodetekce (A549) - patientská séra č. 3 a č. 4.....	76
Obrázek 18: Imunodetekce (A549) - patientská séra č. 5 a č. 6.....	76
Obrázek 19: Imunodetekce (A549) - patientská séra č. 7 a č. 8.....	76
Obrázek 20: Imunodetekce (A549) - patientské sérum č. 9 a negativní kontrola.....	77
Obrázek 21: A549 - vybrané skvrny pro MS identifikaci .....	77
Obrázek 22: RPMI - gel (Coomassie Brilliant Blue) a NC membrána (koloidním stříbro).....	79
Obrázek 23: Imunodetekce (RPMI) - patientská séra č. 1 a č. 2.....	80
Obrázek 24: Imunodetekce (RPMI) - patientská séra č. 3 a č. 4.....	80
Obrázek 25: Imunodetekce (RPMI) - patientská séra č. 5 a č. 6.....	80
Obrázek 26: Imunodetekce (RPMI) - patientská séra č. 7 a č. 8.....	81
Obrázek 27: Imunodetekce (RPMI) - patientské sérum č. 9 a negativní kontrola.....	81
Obrázek 28: RPMI – vybrané skvrny pro MS identifikaci.....	82

## Seznam tabulek:

Tabulka 1: Doutnající mnohočetný myelom – riziko progresu. ....	20
Tabulka 2: Diagnostická kritéria definující mnohočetný myelom dle IMWG.....	25
Tabulka 3: Další z biomarkerů malignity dle IMWG.....	25
Tabulka 4: Diagnostická kritéria definující doutnající mnohočetný myelom dle IMWG.....	26
Tabulka 5: Revidovaný mezinárodní stupňový systém (RISS) pro MM.....	28
Tabulka 6: Kalibrační řada - ředění .....	56
Tabulka 7: Příprava polyakrylamidového gelu.....	58
Tabulka 8: Nastavení IEF .....	60
Tabulka 9: Příprava TGX Stain Free gelů .....	60
Tabulka 10: MS identifikace proteinů (databáze Swiss-Prot) – A549 .....	78
Tabulka 11: Identifikované proteiny v buněčném lyzátu A549 a četnost jejich výskytu.....	79
Tabulka 12: MS identifikace proteinů (databáze Swiss-Prot) – RPMI .....	83
Tabulka 13: Identifikované proteiny v buněčném lyzátu RPMI a četnost jejich výskytu.....	84

## **Seznam použitých zkratk:**

2D-DIGE – dvourozměrná diferenční gelová elektroforéza (z angl. difference gel electrophoresis)

2D-LC – dvourozměrná kapalinová chromatografie (z angl. two-dimensional liquid chromatography)

2D-PAGE – dvourozměrná gelová elektroforéza v polyakrylamidovém gelu (z angl. two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis)

ADCC – buněčná cytotoxicita závislá na protilátkách (z angl. antibody dependent cellular cytotoxicity)

ADCP – makrofágy zprostředkovaná fagocytóza (z angl. antibody dependent cellular phagocytosis)

CD – znaky na povrchu buněk (z angl. clusters of designation)

CDC – cytotoxicita závislá na komplementu (z angl. complement dependent cytotoxicity)

CMG – Česká myelomová skupina (z angl. Czech myeloma group)

CT – počítačová tomografie (z angl. computed tomography)

ČR – Česká republika

DNA – deoxyribonukleová kyselina (z angl. deoxyribonucleic acid)

DTT – dithiothreitol

FLC – volné lehké řetězce (z angl. free light chains)

FWHM – šířka v polovině maxima výšky (z angl. full width at half maximum)

HAMA – lidské protilátky cílené proti myším Ig (z angl. human anti-mouse antibodies)

HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie (z angl. high-performance liquid chromatography)

IAA – jodacetamid

IEF – izoelektrické zaostřování (z angl. isoelectric focusing)

Ig – imunoglobulin (z angl. immunoglobulin)

IL – interleukin

IMWG – Mezinárodní myelomová skupina (z angl. International Myeloma Working Group)

IPG – imobilizované pH gradienty (z angl. immobilized pH gradient)

IT – iontová past (z angl. ion trap)

mAb – monoklonální protilátka

MALDI – ionizace laserem za účasti matrice (z angl. matrix assisted laser desorption/ionization)

MDEs – biomarkery malignity (z angl. myeloma defining events)

MGUS – monoklonální gamapatie nejasného významu (z angl. monoclonal gammopathy of undetermined significance)

MHC – hlavní histokompatibilní komplex (z angl. major histocompatibility complex)

M-Ig – paraprotein, monoklonální protilátka

MIP-1 $\alpha$  – makrofágový zánětlivý protein-1 $\alpha$

MM – mnohočetný myelom

MMRF – Nadace pro výzkum mnohočetného myelomu (z angl. Multiple Myeloma Research Foundation)

Mr – relativní molekulová hmotnost

MRD – minimální reziduální choroba (z angl. minimal residual disease)

MRI – magnetická rezonance (z angl. magnetic resonance imaging)

MS – hmotnostní spektrometrie (z angl. mass spectrometry)

mtHSP60 – mitochondriální protein 60 tepelného šoku (z angl. mitochondrial heat shock protein 60)

mtHSP70 – mitochondriální protein 70 tepelného šoku (z angl. mitochondrial heat shock protein 70)

NC – nitrocelulózová membrána

NK – negativní kontrola

NOR – Národní onkologický registr

NSE – neuron-specifická enoláza (z angl. neuron-specific enolase)

PAGE – elektroforéza v polyakrylamidovém gelu (z angl. polyacrylamide gel electrophoresis)

PCL – plazmocelulární leukémie

PD-1 – receptor pro programovanou buněčnou smrt (z angl. programmed cell death 1)

PET – pozitronová emisní tomografie (z angl. positron emission tomography)

PGAM1 – fosfoglycerát mutáza 1 (z angl. phosphoglycerate mutase 1)

pI – izoelektrický bod (z angl. isoelectric point)

ppm – výraz pro jednu miliontinu celku (z angl. parts per million)

PVDF – polyvinylidendifluoridová membrána

Q – kvadrupól (z angl. quadrupole)

RANK – receptorový aktivátor nukleárního faktoru kappaB (z angl. receptor activator of nuclear factor kappaB)

RISS – revidovaný mezinárodní stupňový systém (z angl. Revised International Staging System)

RNA – ribonukleová kyselina (z angl. ribonucleic acid)

RRMM – relabovaný a refrakterní mnohočetný myelom

RS – roztroušená skleróza

RTG – rentgen

SDS – dodecylsulfát sodný (z angl. sodium dodecyl sulfate)

SDS-PAGE – polyakrylamidová gelová elektroforéza v přítomnosti dodecylsulfátu sodného (z angl. sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis)

SEREX – serologická analýza nádorových antigenů za využití cDNA knihovny (z angl. serological analysis of expression cDNA libraries)

SERPA – sérologická proteomová analýza (z angl. Serological Proteome Analysis)

SLAMF – rodina signalizačních aktivačních molekul lymfocytů (z angl. signaling lymphocyte activation molecules family)

SMM – doutnající mnohočetný myelom (z angl. smoldering multiple myeloma)

TAA – antigeny asociované s nádory (z angl. tumor-associated antigens)

TEMED – N,N,N',N'-tetramethyldiamin

TFA – trifluoroctová kyselina (z angl. Trifluoroacetic acid)

TNF- $\alpha$  – faktor nádorové nekrózy  $\alpha$  (z angl. tumor necrosis factor  $\alpha$ )

TOF – analyzátor doby letu (z angl. time of flight)

VDT/ATKD – vysokodávkovaná chemoterapie s podporou autologní transplantace kmenových buněk

## Úvod

Mnohočetný myelom (MM) je maligní nádorové onemocnění, pro které je charakteristická přítomnost monoklonálního imunoglobulinu v krvi. Myelomové buňky, které tento imunoglobulin produkují, se vyvíjejí v kostní dřeni z plazmatických buněk [1]. Protože se tyto buňky mohou objevit na více místech v těle, je myelom nazýván mnohočetný. Ačkoliv od prvního popisu MM uběhlo již více jak 150 let a je předmětem mnoha studií, nepodařilo se zatím příčinu jeho vzniku prokázat. Obtížná je i samotná diagnostika MM, protože příznaky v počátku rozvoje onemocnění nejsou specifické. Cílem mnoha studií je identifikace jednoznačného a spolehlivého biomarkeru, či skupiny biomarkerů, které by umožnily včasnou diagnostiku tohoto onemocnění [2].

Tato práce se zabývá MM, jeho diagnostikou, terapií a je zaměřena na metody analýzy proteinů. V proteomice jsou využívány především elektromigrační a chromatografické metody. Kombinací s hmotnostní spektrometrií je umožněna identifikace a strukturní analýza studovaných proteinů. Použitím několika metod vznikla serologická proteomová analýza (SERPA), která je využívána pro analýzu imunoproteomu. SERPA je tvořena následnou kombinací dvourozměrné gelové elektroforézy, Western blotu s imunodetekcí a hmotnostní spektrometrií. Výsledkem metody SERPA je identifikace autoprottilátkových cílů, tj. nádorových antigenů.

Experimentální část práce je věnována převážně elektroforetickým technikám a metodě Western blot pro analýzu proteinů. Dvoudimenzionální elektroforézou jsou separovány buněčné proteiny a po jejich transferu na membránu jsou testovány různé protokoly barvení. U sér pacientů s MM v remisi je prováděna imunodetekce proteinů a průkaz specifických autoprottilátek.

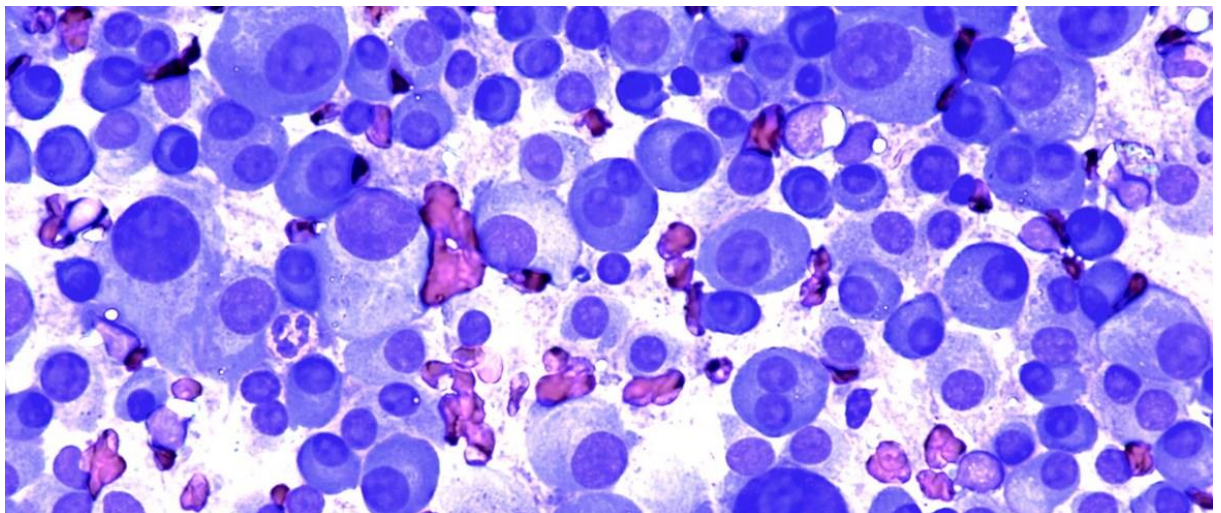
Analýzou imunoproteomu mohou být nalezeny nádorově specifické autoprottilátky produkované imunitním systémem proti nádorovým antigenům. Průkaz těchto autoprottilátek by mohl být využit k diagnostice onemocnění, účinnosti jeho léčby či by mohlo dojít i k využití autoprottilátek v terapii [3].

# 1 Teoretická část

## 1.1 Mnohočetný myelom

Mnohočetný myelom je jedno z nejčastějších nádorových onemocnění krve, které způsobuje maligně transformovaná plazmatická buňka. První zdokumentovaný případ MM popsal lékař Samuel Solly v roce 1844 [4]. Dnes představuje MM asi 1,3 % všech vyskytujících se malignit a přibližně 12 % hematologických malignit [5]. Charakteristickým znakem tohoto onemocnění je tvorba monoklonálního imunoglobulinu tzv. paraproteinu, a proto je toto onemocnění řazeno do skupiny monoklonálních gamapatií [6].

Nejvýraznějším rysem MM je hromadění transformovaných plazmatických buněk v kostní dřeni. Tyto buňky se označují jako myelomové (Obr. 1). Na rozdíl od zdravých buněk mají mnohem vyšší životnost a nekontrolovatelně se množí. Velký nárůst myelomových plazmocytů způsobí ovlivnění krvetvorby [7].

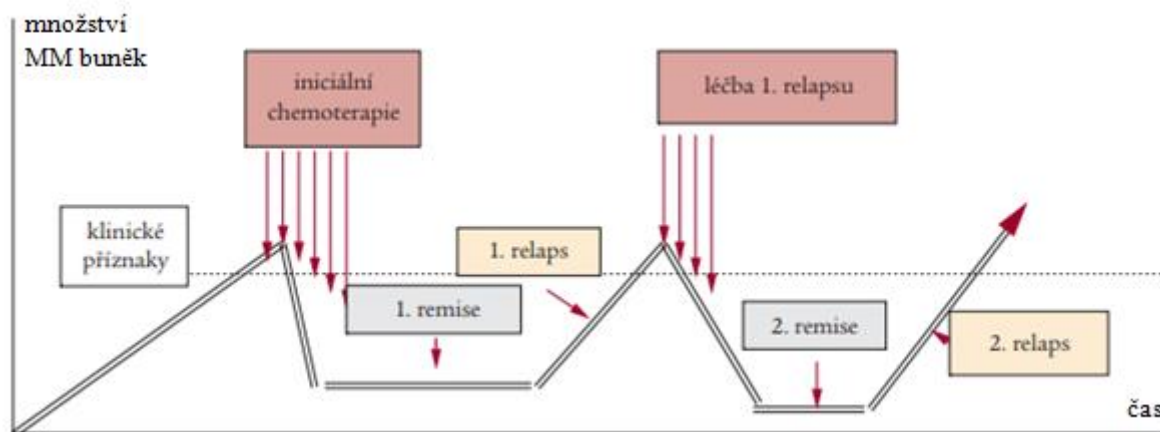


**Obrázek 1:** Buňky mnohočetného myelomu, převzato a upraveno z: [1]

Tvorbu monoklonálního imunoglobulinu doprovázejí i změny v produkci cytokinů, které způsobují mnoho dalších příznaků nemoci. Patří mezi ně teploty, hubnutí, noční pocení, zásadní je však indukce ložiskové či difúzní osteolýzy. Bolesti kostí, zejména v oblasti bederní páteře, způsobené osteolýzou jsou pro MM charakteristické. Oslabení struktury kostí vede mnohdy k samovolným zlomeninám. U pacientů se také častěji objevují infekce způsobené imunosupresí či anémií, trombocytopenie nebo leukopenie. Jedná se o chorobu, kterou nelze snadno diagnostikovat. Zpočátku bývá zaměňována s jinými chorobami kvůli svým velmi variabilním příznakům. Časná diagnostika tohoto onemocnění je předpokladem pro zábranu ireverzibilních změn v těle a pro úspěšnou terapii [2].



Cílem léčby MM je zbavení organismu nádorových buněk, nastolení homeostázy a obnovení funkce imunitního systému. Jedná se však o těžko léčitelné onemocnění. Pro MM je typická opakující se aktivita, tzv. relaps onemocnění, který po různě dlouhém bezpříznakovém období tzv. remisi znovu vyžaduje léčbu (Obr. 2). Relaps je definovaný vzestupem hladiny paraproteinu nad 5 g/l, která je opakovaně potvrzená kontrolními vyšetřeními. Mezi další signály patří nárůst myelomových buněk  $\geq 5\%$  v kostní dřeni a vznik či rozšíření osteolytických ložisek [8]. I když léčba jde neustále kupředu, většina pacientů s MM relabuje. Stav, kdy u pacienta v klinické remisi stále přetrvává malé množství myelomových buněk, jejichž nárůst vyvolá opět MM, je pojmenován jako minimální reziduální choroba (MRD). MM, který nereaguje na léčbu, je označován jako refrakterní. V případě, že pacient nereaguje na první léčbu po diagnostice, je zařazen do kategorie pacientů s primárním refrakterním myelomem. Pokud během léčby pacienta není dosaženo výrazné odezvy či dokonce dojde k progresi onemocnění, je označován jako relabující refrakterní myelom [9].



**Obrázek 2:** Léčba mnohočetného myelomu, převzato a upraveno z: [10]

Dle statistických studií Národního onkologického registru (NOR) se v České republice (ČR) MM objevuje u 4,8 případů na 100 000 obyvatel. I když v ČR počet nově diagnostikovaných pacientů stoupá, patří mezi země se středním výskytem [11]. V registru monoklonálních gamapatií bylo k 5. červnu 2017 v ČR evidováno 4 856 případů mnohočetného myelomu a 2 772 případů monoklonální gamapatie nejasného významu (MGUS) [12].

K identifikaci MM dochází především u starších pacientů – u mužů je průměrný věk 68 let, u žen 70 let. Jen 1 % pacientů je v době diagnózy méně než 40 let, 18,6 % všech pacientů

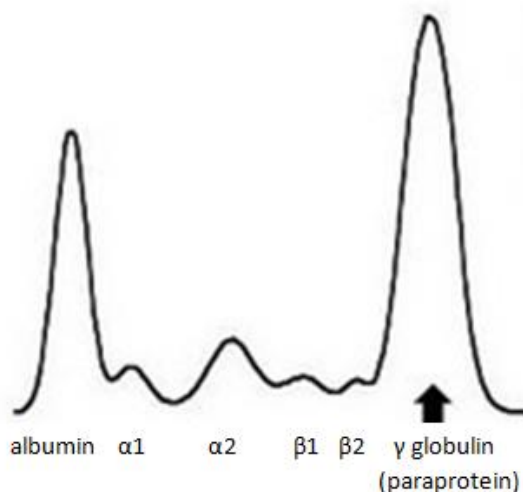
je mladších 60 let [13]. O něco častěji toto onemocnění postihuje muže než ženy a je dvakrát častější u afroameričanů než u bělochů [14].

### 1.1.1 Patogeneze mnohočetného myelomu

Patogeneze MM zatím stále není upřesněna, je však předmětem zkoumání. Dochází k pokrokům v pochopení změn DNA, které mohou způsobit transformaci plazmatických buněk. Během posledních desetiletí se znalosti o patogenезi MM výrazně zlepšily.

Patofyziologie MM je velmi komplexní. Působí zde nejen faktory zasahující myelomovou buňku, ale také faktory mikroprostředí, které buňka aktivně ovlivňuje [15]. Myelomová buňka vzniká maligní změnou fyziologického plazmocytu. Tato patologická buňka se následně nekontrolovatelně množí. Na myelomovou buňku ani na buňky z ní odvozené nepůsobí regulační mechanismy lidského těla, stále jsou však schopné tvořit monoklonální imunoglobulin (M-Ig). Tento paraprotein se vyskytuje jako komplexní molekula, ale má i podobu volných lehkých či vzácně těžkých řetězců [16].

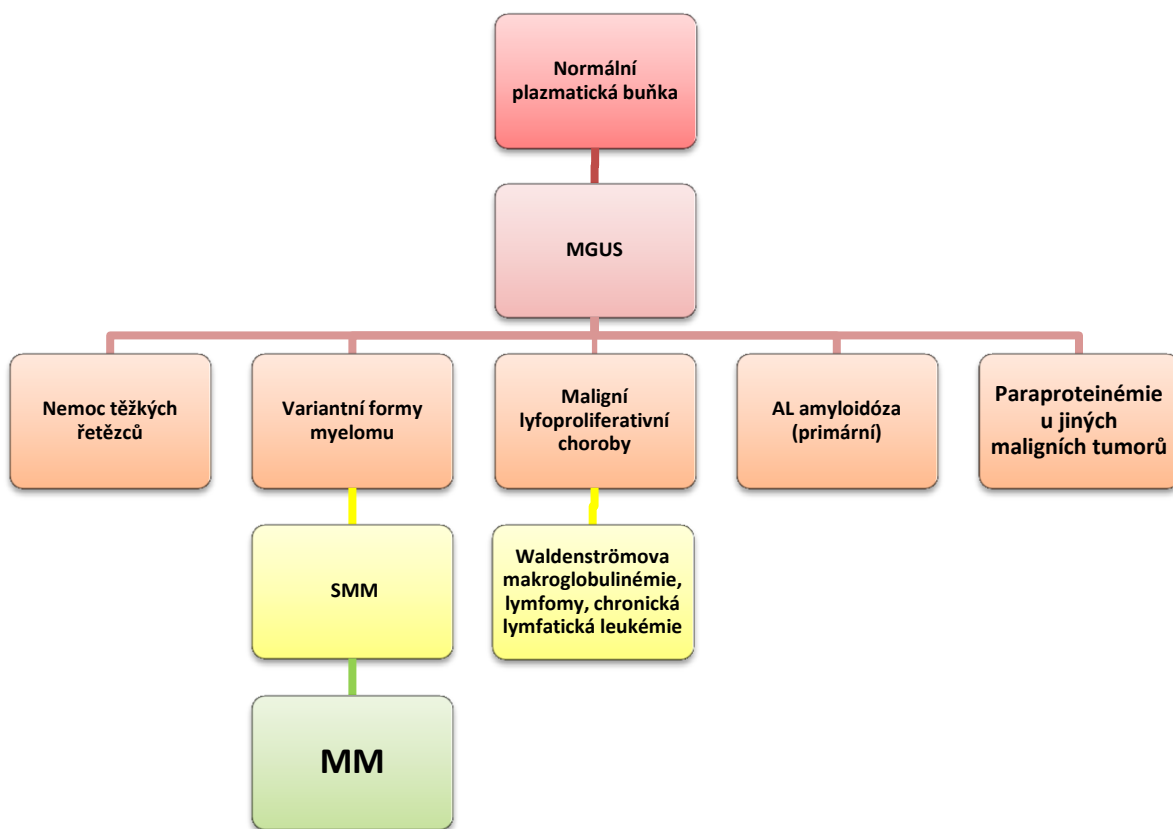
Téměř u všech pacientů předchází MM prekancerózní stav, který je označován jako monoklonální gamapatie nejasného významu. V krvi lze již v této fázi prokázat přítomnost paraproteinu (Obr. 3), nedochází však k poškozování orgánů [14].



**Obrázek 3:** Přítomnost paraproteinu při elektroforéze bílkovin, převzato a upraveno z: [15]

MGUS je diagnostikován u více než 3 % populace ve věku nad 50 let. K vývoji v maligní formu onemocnění dochází ročně asi u 1 % těchto nemocných [17]. Nejčastěji pacient přechází do fáze označované jako MM (dříve symptomatický), kaskáda dějů však může směřovat i k vývoji primární amyloidózy (AL amyloidózy), Waldenströmovy

makroglobulinémie, nemoci těžkých řetězců, lymfomu nebo plazmocelulární leukémie [18]. Vývoj MM a dalších příbuzných onemocnění je zobrazen na obrázku 4.



**Obrázek 4:** Vývoj mnohočetného myelomu a souvisejících onemocnění; MGUS – monoklonální gamapatie nejasného významu, SMM – doutňající myelom MM – mnohočetný myelom, převzato a upraveno z [15, 19]

Mnohočetný myelom má několik variant, mezi které patří doutňající MM (SMM), indolentní myelom, nesekreční myelom, solitární plazmocytom, extramedulární plazmocytom, osteosklerotický myelom a plazmocelulární leukémie [20].

Doutňající MM je pokročilé stádium monoklonální gamapatie nejasného významu. Jedná se o předmaligní formu myelomu, která nezpůsobuje žádné příznaky nemoci a po několik let zůstává stabilní. U pacientů se však již v kostní dřeni tvoří myelomové buňky, které tvoří  $\geq 10\%$  všech krevních buněk, nebo je v krvi zaznamenáno  $\geq 30$  g/l paraproteinu. SMM nevyžaduje léčbu, je však důležité aktivitu nemoci sledovat [21]. Riziko progresu u pacientů s SMM je větší než v případě MGUS. K vývoji SMM v MM dojde během několika let po diagnostice u většiny pacientů (Tab. 1). S časem riziko neklesá, ale stále přetrvává [18]. Velmi podobný, často zařazující se do kategorie SMM, je indolentní myelom. Rozdíl mezi nimi tvoří jen přítomnost několika drobných osteotických ložisek či lehké anémie. Rozlišení

mezi nimi nemá z hlediska léčby zásadní význam, protože indolentní myelom také zvolna progreduje v MM [22].

**Tabulka 1:** Doutnající mnohočetný myelom – riziko progresu, převzato a upraveno z [23].

Druh SMM	Myelomové buňky	Paraprotein v krvi	Progrese v MM
Nízce rizikový	<10 %	≥30 g/l	asi 19 let
Středně rizikový	≥10 %	<30 g/l	asi 9 let
Vysoce rizikový	≥10 %	≥30 g/l	asi 2,5 roku

V případě, že v jednom místě kosti dojde k akumulaci abnormálních plazmatických buněk, tedy tvorbě jednotného nádoru, vzniká kostní solitární plazmocytom. Jedná se o nádor tvořený myelomovými buňkami lokalizovanými pouze v jednom místě těla. Rentgenovými snímky je v místě plazmocytomu odhalena jednotná osteolytická léze, avšak žádné další znaky MM se neprojevují. Toto onemocnění doprovází jen značná bolest v místě nádoru. Přibližně u 1/3 pacientů s osamělým plazmocytomem se postupně vyvinou i jiné plazmocytomy či MM [22].

Extramedulární plazmocytomy vznikají mimo kostní dřev v měkkých tkáních. Nejčastěji se objevují v oblastech horních cest dýchacích, mohou se však objevit i v jiných oblastech, například v gastrointestinálním traktu, prsu či mozku. Diagnóza tohoto plazmocytomu se provádí po biopsii tkáně [22, 24].

Myelom s lehkým řetězcem je diagnostikován pacientům, u kterých myelomové buňky nevytváří úplný imunoglobulin, ale jen část lehkého řetězce. Lehké řetězce jsou menší, a proto dochází k jejich odfiltrování z krve. Skrze ledviny se dostávají až do moči, kde mohou být prokazovány. V důsledku zvýšené zátěže dochází k poškozování ledvin. Tento druh MM se vyskytuje přibližně u 15 – 20 % pacientů [22].

Méně častou variantou MM je nesekreční myelom. Myelomové buňky jsou v krvi přítomny, avšak nevytváří detekovatelné množství monoklonálního imunoglobulinu ani lehkých řetězců. Dochází však k poškození tkání a ovlivňování kostní resorpce, na rentgenových snímcích jsou patrné osteolytická ložiska [22, 25].

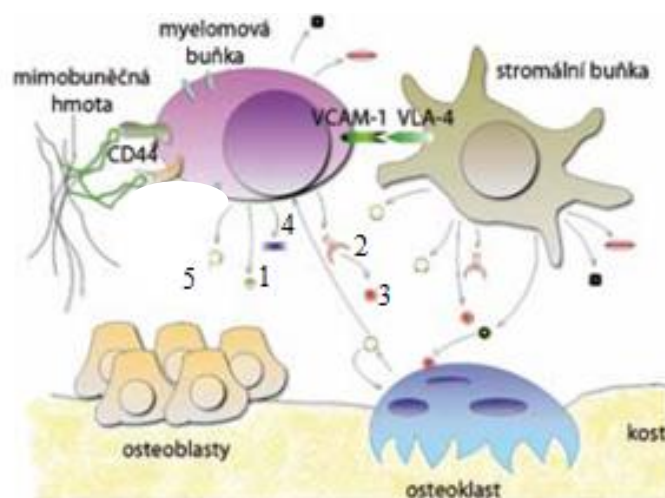
Osteosklerotický myelom je výjimečnou formou, která se vyskytuje např. v rámci POEMS syndromu – polyneuropatie (P), organomegalie (O), endokrinopatie (E),

monoklonální gamapatie (M), kožní změny (S – „skin“). Na rentgenových snímcích jsou viditelné osteosklerotické léze [23, 25].

Plazmocelulární leukémie (PCL) je vzácným krevním onemocněním, při kterém v krvi cirkuluje velké množství nádorových plazmatických buněk. V případě, že počet maligních plazmocytů v periferní krvi přesáhne 20 % a jejich absolutní počet je více než  $2 \times 10^9/l$ , je PCL diagnostikována. Existují dvě formy této nemoci. Primární PCL, která se vyskytuje častěji, vzniká „*de novo*“, je agresivní a má rychle se vyvíjející leukemickou fázi. Sekundární PCL může vzniknout v pozdějších stádiích z MM, zpravidla se jedná o konečnou fázi pro pacienty s refrakterním myelomem [21]. Atypickou formou MM trpí přibližně 20 – 30% pacientů. Jejich diagnostika bývá obtížnější, protože klinické příznaky ani laboratorní nálezy zpočátku MM vůbec nepřipomínají (Adam et al. 2000).

K zásadním změnám plazmocytů dochází na úrovni chromozomů. Klíčové jsou především chromozomální aberace. U pacientů s MM se jejich spektrum velmi podobá nálezům u pacientů s MGUS. Vyšší riziko progresu z doutnajícího MM mají pacienti s translokací t(4;14), delecí (17p) a ziskem 1q [26].

Studie ukázaly, že řada regulačních faktorů osteoblastické a osteoklastické aktivity interferuje s patogenezí MM. Byly identifikovány klíčové mediátory osteoklastické kostní resorpce, mezi ně patří receptorový aktivátor nukleárního faktoru kappaB (RANK), makrofágový zánětlivý protein-1 $\alpha$ , faktor-1 $\alpha$  sekretovaný stromálními buňkami, transformující růstový faktor, Dickkopf protein 1 a sekretovaný protein z rodiny Frizzled. U pacientů s MM je mnoho těchto faktorů neregulovaných, a proto se předpokládá jejich podíl na onemocnění. Tyto faktory představují potenciální terapeutické cíle pro léčbu MM [27]. Na obrázku 5 jsou zobrazeny interakce v mikroprostředí kostní dřeně v místě osteolytického ložiska.



**Obrázek 5:** Mikroprostředí kostní dřeně u MM, převzato a upraveno z: [28]

1. makrofágový zánětlivý protein-1 $\alpha$ , 2. receptorový aktivátor nukleárního faktoru kappaB, 3. ligand receptorového aktivátoru nukleárního faktoru kappaB, 4. transformující růstový faktor  $\beta$ , 5. interleukin-6

Dickkopf protein 1, transformující růstový faktor  $\beta$  a sekretovaný protein z rodiny Frizzled se podílejí především na inhibici aktivity a tvorby osteoblastů. Proteiny ze skupiny Dickkopf blokují hlavní signální dráhu osteoblastů za pomoci sekretovaných proteinů z rodiny Frizzled. Transformující růstový faktor  $\beta$  je aktivní při zvýšené kostní resorpci a inhibuje osteoblasty [29]. Makrofágový zánětlivý protein-1 $\alpha$  (MIP-1 $\alpha$ ), RANK, IL-3, faktor-1 $\alpha$  sekretovaný stromálními buňkami zvyšují kostní resorpci. RANK má významný vliv na kostní remodelaci, jeho účinek je značně posílen v případě současné produkce MIP-1 $\alpha$ . IL-3 také přispívá k stimulaci osteoklastické resorpce [30].

### 1.1.2 Klinické příznaky mnohočetného myelomu

Mnohočetný myelom je svými příznaky a projevy přirovnávám k chameleonu, protože jsou velmi variabilní a zpočátku nenápadné. Pacienti bývají diagnostikováni většinou na základě několika zdánlivě nesouvisejících problémů. Mezi nejčastější patří bolesti kostí, patologické zlomeniny, slabost či nevolnost, krvácení, anémie, časté infekce - převážně pneumokokové, neuropatie či selhávání ledvin. Každý z těchto projevů je důvodem pro diagnostické vyšetření, aby došlo k potvrzení či vyvrácení, zda se jedná o potíže způsobené maligním onemocněním [7, 31].

#### Destrukce skeletu

Zhoršující se bolesti kostí, nejčastěji v zádech a dlouhých kostech, bývají prvními signály a projevy MM. Zpočátku je však velmi těžké rozeznat, zda jsou bolesti způsobené

nemaligními příčinami, MM či mají zcela jiný základ. Interakcí maligních plazmatických buněk s buňkami kostní dřene dochází k ovlivňování lokalizace růstu myelomových buněk a také k poškozování či ovlivňování osteoklastů a osteoblastů. V oblastech, které jsou blízko maligním plazmatickým buňkám, vzrůstá aktivita osteoklastů, a tím i kostní resorpce. Naopak aktivita osteoblastů se výrazně snižuje či úplně mizí, a proto dochází k inhibici kostní tvorby [32]. Osteoporóza či osteolýza je prokázána v 80 % případech stanovení diagnózy, buď pomocí rentgenového snímku či při vyšetření kostní hustoty. Zvýšená kostní resorpce a zeslabení kosti jsou nejvýraznější v oblasti páteře, žeber, pánevní kosti a lebky. Velmi často se u pacientů s MM vyskytují samovolné zlomeniny. V případě rovnoměrného rozptýlení myelomových buněk dochází k postupnému řidnutí kostí, které je způsobeno difuzním odbouráváním [2]

### **Hyperkalcémie**

Se zvýšenou kostní resorpcí kostní tkáně souvisí také zvýšená hladina vápníku v krvi, označovaná jako hyperkalcémie. Jedná se o častou metabolickou komplikaci, která se vyskytuje u třetiny pacientů. Hyperkalcémie se vyskytuje v širokém koncentračním rozmezí od mírné až po těžkou, život ohrožující. Vyšší množství vápníku v krvi způsobuje poškozování organismu, dochází k závažnému odvodňování organismu, což může zapříčinit až selhání ledvin [33]. Důsledkem je i zpomalení transportu střevního obsahu trávicím traktem, objevuje se nechutenství, abdominální bolesti či zácpa. Pokud je vysoká koncentrace vápníku v krvi dlouhodobá, mohou se tímto vlivem objevit poruchy mozkové činnosti a dojít k poškození mozku. Typickými projevy jsou zmatenost, nesoustředěnost, pocit ospalosti nebo poruchy vědomí [2].

### **Zhoršená funkce ledvin**

K poškození funkce ledvin dochází, pokud plazmatické buňky začnou tvořit lehké řetězce v nadměrném množství. Na rozdíl od kompletní molekuly imunoglobulinu jsou schopné projít glomerulární membránou až do ledvin a ledvinových kanálků. V malých koncentracích jsou vstřebávány v proximálních tubulech, zpracovány a poté vráceny zpět do oběhu ve formě aminokyselin [16]. Velké koncentrace však není organismus schopen zpracovat, a tak se lehké řetězce dostávají do moči. K vážnějším dějům dochází v ledvinových kanálcích, kde se vysrážejí a tvoří hyalinní válce, které poškozují ledviny. Vliv na vytvoření válců má také malý průtok ledvinami, proto je nutné zvýšit příjem tekutin.

Poškození ledvin má vliv na mnohé další procesy, patří k nim například neschopnost zpracování většího množství solí, tekutin nebo tělních metabolitů [34].

### **Změny v krevním obraze**

Počáteční fáze MM je úzce svázaná s klesajícími počty erytrocytů. Postupným nárůstem myelomových plazmatických buněk v kostní dřeni dochází ke stále většímu narušování krvetvorby. Anémie se vyskytuje asi u 60 % nově diagnostikovaných pacientů. V průběhu nemoci dochází i ke snižování stavu leukocytů a trombocytů. Nízké krevní hladiny se projevují nejprve u B-lymfocytu, později klesají i T-lymfocyty. Malý počet B-lymfocytů zásadně ovlivňuje imunitní systém, kdy nedochází k produkci dostatečného množství funkčních imunoglobulinů. Vzhledem k dysfunkci protiinfekční imunity se u pacientů s MM rozvíjejí infekce snáze, častěji a jsou mnohem závažnější. Trombocytopenie se může projevovat krvácením do kůže a sliznic. Porucha tvorby krevních destiček může způsobit závažnou komplikaci při operaci či úrazu [33, 35]

### **Zvýšená viskozita séra**

Vlivem patologické koncentrace paraproteinu v krvi (nejčastěji u IgM, méně u IgG a IgA) se u pacientů objevuje tzv. hyperviskózní syndrom. Zvýšená viskozita séra má za následek zhoršený průtok krve některými oblastmi, což nejvíce postihuje sítnici oka či nervovou tkáň. Jako doprovodné příznaky se objevují bolesti hlavy, únava, zmatek, poruchy vidění a závratě [31, 34].

### **Poškození nervového systému**

U některých pacientů dochází i k narušení funkce nervového systému. Nejčastěji je způsobena vertebrálními lézemi, které mohou pronikat do páteřního kanálu a způsobit utlačování míchy. Poškození periferních nervů se projevuje pocitem brnění či pálení v končetinách a občas dochází i k poruchám citlivosti [2].

### **1.1.3 Diagnostika mnohočetného myelomu**

Variabilní diagnostické přístupy a metody jsou základem včasné identifikace MM, která je zásadní pro úspěšnou léčbu pacienta. Myelom je relativně vzácné onemocnění, a proto velmi často dochází k diagnostice až v pozdních fázích, kdy však již v organismu proběhly ireverzibilní změny [25].



Mnohočetný myelom se od roku 2007, díky programu CRAB, který iniciovala i Česká myelomová skupina (CMG), stává známějším onemocněním. Program CRAB je pojmenován dle nejzákladnějších projevů MM, kterými jsou hyperkalcémie (C), renální nedostatečnost (R), anémie (A), postižení kostí (B) [36]. Diagnostická kritéria jsou neustále upravována a doplňována, protože léčebné postupy se stále zdokonalují (Tab. 2 – 4). Nově bylo mezi dosavadní kritéria zařazeno stanovení průkazu či rozsahu kostního postižení nejen rentgenem (RTG), ale i pomocí moderních metod, mezi které patří počítačová tomografie (CT), její kombinace s pozitronovou emisní tomografií (PET/CT) a magnetická rezonance (MRI). Současně byly stanoveny tři faktory, které svým výskytem signalizují vyšší riziko progresu nemaligní formy v MM. Přítomnost alespoň jednoho z diagnostických markerů je považována za podnět pro provedení dalších vyšetření za účelem dokončení diferenciální diagnostiky [37].

**Tabulka 2:** Diagnostická kritéria definující mnohočetný myelom dle IMWG, 2016:

Musí být splněna alespoň jedna z událostí u obou kritérií:

<b>První kritérium:</b>	<b>Druhé kritérium:</b>
bioptický průkaz plazmocytomu	<b>hyperkalcémie:</b> koncentrace kalcia > 0,25 mmol/l či vyšší než horní hranice normy
	<b>renální nedostatečnost:</b> „clearance“ kreatininu <40 ml/min nebo koncentrace sérového kreatininu >177 µmol/l (> 2 mg/dl)
počet <b>monoklonálních plazmatických buněk</b> v kostní dřeni ≥ 10 %	<b>anémie:</b> koncentrace hemoglobinu > 20 g/l pod dolní limit fyziologického rozmezí nebo hodnota hemoglobinu <100 g/l
	<b>kostní onemocnění:</b> jedna nebo více osteolytických lézí na kostní radiografii, CT nebo PET/CT

**Tabulka 3:** Další z biomarkerů malignity dle IMWG, 2016:

<b>Biomarkery malignity (MDEs):</b>	klonální plazmatické buňky v kostní dřeni ≥ 60 %
	celkový index FLC ≥100, předpoklad absolutní hladiny FLC ≥100 mg/l
	ohnisková léze > 1 o velikosti nejméně 5 mm

**Tabulka 4:** Diagnostická kritéria definující doutnající mnohočetný myelom dle IMWG, 2016

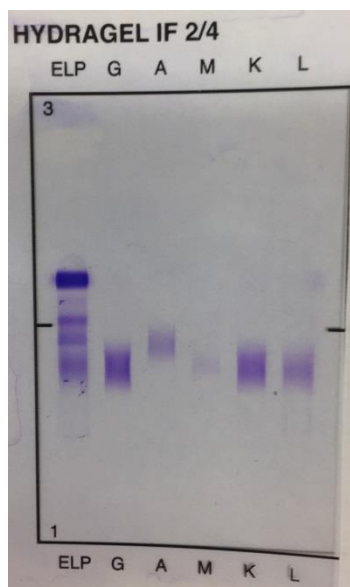
<b>Diagnostická kritéria</b> <b>SMM:</b>	M-Ig v séru $\geq 30\text{g/l}$ nebo v moči $\geq 500\text{ mg/24 hodin}$
	klonální plazmatické buňky v kostní dřeni $\geq 10\%$
	absence příznaků definující MM či amyloidózu

Jsou-li u pacienta zaznamenány příznaky, které by mohly signalizovat MM, je prováděna skupina různých diagnostických testů a vyšetření mezi které patří:

- kompletní krevní obraz s přezkoumáním diferenciální i periferní krve,
- základní biochemické vyšetření včetně vápníku a kreatininu,
- elektroforéza a imunofixace sérových proteinů,
- nefelometrická kvantifikace imunoglobulinů,
- rutinní analýza moči (24 hodinový odběr moči pro proteinurii, elektroforézu a imunofixaci),
- kvantifikace hladiny M-Ig v moči a albuminurie,
- testování kostní dřene (fluorescenční in situ hybridizace),
- zobrazovací metody pro vyšetření skeletu (CT, PET/CT, MRI).

Toto onemocnění je těžké diagnostikovat jen na základě laboratorního testu, a proto je výsledkem posouzení mnoha diagnostických vyšetření a faktorů, včetně fyzického stavu, historie pacienta a klinických příznaků. Velmi důležité je provedení všech vhodných testů, protože výsledky pomohou lékaři posoudit onemocnění, jeho rozsah, prognózu a lépe stanovit možnosti léčby [33].

Monoklonální imunoglobulin je považován za měřitelný, pokud je jeho koncentrace v séru  $\geq 1\text{ g/dl}$  nebo je  $\geq 200\text{ mg/den}$  v moči. K monitorování jeho úrovně je používána elektroforetická separace proteinů. Vyhodnocení odpovědi na léčbu je takto monitorováno každý měsíc a mimo terapii kontrolováno každé 3 – 4 měsíce. V případě neměřitelného M-Ig se využívá testování volných lehkých řetězců (FLC) a poměr  $\kappa$  FLC a  $\lambda$  FLC. U nesekrečního myelomu je diagnostika stanovena v případě průkazu FLC v krvi  $\geq 100\text{ mg/l}$  a poměr  $\kappa/\lambda$  je patologický, tedy  $\geq 100$  [38]. U těchto 20 % pacientů není možné elektroforézou přítomnost paraproteinu prokázat, proto jsou prováděny imunofixace, které díky desetkrát citlivějšímu průkazu, FLC o nízké koncentraci zachytí (Obr. 6) [39].



**Obrázek 6:** Imunofixace séra

ELP – celkový protein testovaného séra, G – imunoglobulin třídy G,  
 A – imunoglobulin třídy A, M – imunoglobulin třídy M, K – lehký řetězec  
 kappa, L – lehký řetězec lambda

### **Prognóza mnohočetného myelomu**

Průměrná délka života neléčených pacientů je 14 měsíců. Do konce dvacátého století se díky používání standardní chemoterapie dařilo prodlužovat život pacientů s MM asi o 30 měsíců. Zařazením vysokodávkované chemoterapie v kombinaci s transplantací vlastních krvetvorných buněk, se u 80 % pacientů medián přežití posunul o dalších 20 měsíců [40]. Dnes je průměrná doba přežití s MM asi 6 – 7 let. Jednotlivé případy mohou být velmi rozdílné, doba přežití může kolísat v rámci několika týdnů až ke kompletní remisi popřípadě tzv. plató fázi onemocnění. Prognóza pro pacienty proto není jednotná, MM je na molekulární úrovni velmi variabilní, záleží i na molekulovém subtypu MM. Vliv cytogenetických abnormalit se také liší na fázi onemocnění. Za účelem vytvoření jednotného prognostického indexu byl vytvořen systém RISS (revidovaný mezinárodní stupňový systém), který kombinuje klinické parametry, biologii onemocnění a zároveň splňuje kritéria jednoduchosti a dostupnosti (Tab. 5) [41, 42].

**Tabulka 5:** Revidovaný mezinárodní stupňový systém (RISS) pro MM, převzato a upraveno z: [41, 42]

<u>Klinické stádium RISS:</u>	
Stupeň I	<ul style="list-style-type: none"> <li>- sérový albumin <math>\geq 35</math> g/l</li> <li>- sérový <math>\beta</math>-2-mikroglobulin <math>&lt;3,5</math> mg/l</li> <li>- žádná vysoce riziková cytogenetika</li> <li>- normální hladina laktátdehydrogenázy v séru</li> </ul>
Stupeň II	<ul style="list-style-type: none"> <li>- nemožnost zařazení ke stupni I nebo III</li> </ul>
Stupeň III	<ul style="list-style-type: none"> <li>- sérový <math>\beta</math>-2-mikroglobulin <math>&gt; 5,5</math> mg/l</li> <li>- vysoce riziková cytogenetika [t (4; 14), t (14; 16) nebo del (17p)] či zvýšená hladina laktátdehydrogenázy v séru</li> </ul>

#### 1.1.4 Terapie mnohočetného myelomu

I když je MM řazen k nevyлéčitelným onemocněním, díky výzkumu dochází ke zvyšování počtu léčebných možností. Terapie je zacílena na co nejdelší kompletní remisi, která je co nejméně doprovázena příznaky MM. V současné době se léčba MM stala velmi dynamicky se rozvíjejícím odvětvím onkohematologie [23]. S rostoucími znalostmi o samotném onemocnění, které jsou založeny na výzkumu molekulární biologie, genové exprese i proteomiky, je možné cílit léčbu nejen na myelomové buňky, ale i na okolní mikroprostředí kostní dřeně [43].

Pro MM neexistuje žádný standardní léčebný postup. Ke každému pacientovi je nutné přistupovat individuálně, je zde mnoho faktorů určujících léčbu:

- věk a obecné zdraví,
- výsledky laboratorních a cytogenetických (genomických) testů,
- příznaky a komplikace onemocnění,
- léčba pacienta před diagnostikou MM,
- životní styl pacienta, osobní preference.

Léčba MM prošla několika zásadními milníky. Od padesátých let, kdy se využívala především kombinace kortikoidů s alkylačními látkami, se mnohé změnilo. V devadesátých letech byla zavedena léčba vysokodávkovanou chemoterapií s podporou autologní transplantace kmenových buněk (VDT/ATKB) [44]. Léčebná terapie se skládá ze dvou částí. První zahrnuje kontrolu MM či eliminaci myelomových buněk. Ke druhé, která je označovaná

jako podpůrná léčba, patří zmírňování příznaků a reakce na komplikace onemocnění a vedlejší účinky léčby [2]. Dnes jsou nejčastěji používány bortezomib a imunomodulační látky (thalidomid a lenalidomid) [44].

V současné době existuje 5 tříd léků pro léčbu MM (jsou uvedeny komerčními názvy s účinnou látkou v závorce):

- imonomodulační léky
  - Revlimid (lenalidomid), Pomalyst (pomalidomid), Thalomid (thalidomid)
- inhibitory proteasomu
  - Ninlaro (ixazomib), Velcade (bortezomib), Kyprolis (carfilzomib)
- chemoterapie
  - Alkeran (melfalan), Doxil (lipozomální doxorubicin), cyklofosfamid
- inhibitor histon deacetylázy (HDAC inhibitor)
  - Farydka (panobinostat), Zolinza (vorinostat)
- steroidy
  - Dexasone (dexamethason) a prednison

Mezi další možnosti patří:

- využití monoklonálních protilátek
- (autologní) transplantace kmenových buněk [33]

Po diagnóze MM je první fází léčby indukční terapie, jejímž cílem je snížení počtu myelomových buněk a tím i paraproteinu. Obvykle je podávána několik měsíců osobám s aktivním MM a je kombinací 2 – 3 typů léků z cytostatik, léků cílené léčby a steroidů. Dle věku a zdravotního stavu pacientů na indukční terapii může navazovat transplantace kmenových buněk. V roce 2009 představitelé České myelomové skupiny zavedli koncept rozdělení léčebných režimů pro pacienty dle věkových skupin. Jedná se o program „junior“ a „senior“, věkovou hranicí je 65. rok [40]. V posledních letech se v případě pacientova dobrého zdravotního stavu hranice posunuje až na 70 let [45].

Kandidáti na transplantaci kmenových buněk jsou pacienti mladší 70 let v dobrém zdravotním stavu. Indukční terapie se skládá většinou z kombinace několika léků, například VRD režim (bortezomib – lenalidomid – dexamethason), režim CyBorD (cyklofosfamid – bortezomib – dexamethason), thalidomid – dexamethason nebo liposomální doxorubicin – vinkristin – dexamethason. Na indukční terapii navazuje vysokodávkovaná chemoterapie

s transplantací kmenových buněk [23]. V případě následující autologní transplantace by neměl být při indukční léčbě použit melfalan. Tento přípravek může snižovat počet kmenových buněk, a tak by bylo velmi obtížné vycytat pacientovi jeho vlastní hematopoetické kmenové buňky pro pozdější transplantaci. Autologní transplantační postup je velmi rychlý a efektivní, dochází při něm ke značné až úplné redukci počtu myelomových buněk [2].

Pacienti, kteří jsou starší než 70 let, či mladší avšak nemohou podstoupit vysokodávkovanou chemoterapii s kombinací autologní transplantace z jiných důvodů (většinou špatný klinický stav), jsou v režimu tzv. konvenční terapie. Zde jsou využívány méně intenzivní režimy, které tolik nezatěžují organismus. Těmto pacientům je nasazována kombinační léčba převážně za použití bortezomibu nebo thalidomidu, je však používáno nižší dávkování než u mladších pacientů [46].

Imunomodulační léčba významně pomáhá v boji s MM. V řadě klinických studií byla prokázána účinnost thalidomidu, lenalidomidu a pomalisomidu na léčbu MM. Thalidomid má velice široké spektrum účinků, ke kterým patří například schopnost potlačit nadměrnou produkci TNF- $\alpha$ , stimulace proliferace a aktivity T-lymfocytů a také cytotoxicity NK buněk, naopak proliferaci myelomových buněk inhibuje a podporuje jejich apoptózu [47]. V terapii MM je thalidomid využíván jako součást vícelékových režimů, nejčastěji s dexamethasonem při léčbě nově diagnostikovaných pacientů a žen v a po menopauze. Vzhledem k jeho teratogenitě může být předepisován jen registrovanými lékaři [48].

Strukturně i funkčně podobný thalidomidu je lenalidomid, avšak jeho imunomodulační účinek je podstatně vyšší. Na rozdíl od thalidomidu navíc inhibuje sekreci protizánětlivých cytokinů a snižuje adhezi myelomových buněk. Jeho hlavní předností je, že není teratogenní, jeho podání provází méně nežádoucích účinků a nevede k periferní neuropatii. Nevítaným nežádoucím efektem je však myelosupresivní účinek. V terapii bývá úspěšně kombinován s dexamethasonem [47, 49]. V roce 2013 byl schválen pro léčbu relabujícího a refrakterního MM (RRMM) pomalidomid. Jedná se o účinnější lék, který je strukturně podobný lenalidomu a thalidomidu. Je určen však jen pacientům, kteří již podstoupili nejméně dvě terapie s přípravky lenalidomid a bortezomid [23].

Druhou skupinou velmi využívaných léčiv jsou inhibitory proteazomu. Proteazom je proteinový komplex malého válcového tvaru, který se vyskytuje ve všech buňkách. Jeho

úlohou je degradace proteinů, které jsou poškozené, nesprávně uspořádané či již nejsou třeba. Značné množství zbytečných a neúčinných bílkovin je tvořeno myelomovými plazmocytami. Princip léčby proteomovými inhibitory spočívá v blokaci proteazomu, čímž je způsobeno postupně hromadění odpadních proteinů v buňce. Celý proces je ukončen apoptózou myelomové buňky [50]. Jako první byl k léčbě v roce 2003 schválen bortezomib, může být použit samostatně či v kombinaci s jinými léky. V roce 2016 byly do praxe uvedeny i carfilzomib a ixazomib, které se využívají pro pacienty s RRMM. Bývají podávány v kombinaci s lenalidomidem a dexamethasonem [23].

V léčbě MM je chemoterapie využívána z mnoha různých důvodů. Cílem její aplikace může být likvidace myelomových buněk či jejich snížení jako součást indukční terapie před transplantací kmenových buněk. Bývá využita i v rámci udržovací terapie nebo v léčbě RRMM. Mezi nejběžnější používané cytostatika patří melfalan, cyklofosfamid a lipozomální doxorubicin. Tyto léky bývají součástí kombinované léčby, která zahrnuje další cytostatické léky nebo přípravky pro cílenou či po podpůrnou léčbu [23]. Myelomová terapie se často provádí ve 4 – 6 cyklech, kde jeden cyklus trvá přibližně měsíc [51].

Další skupinou léčiv jsou inhibitory histondeacetyláz. Histondeacetylázy ovlivňují prostorové uspořádání DNA a jsou zásadní pro mnoho buněčných procesů – proliferace, diferenciace či buněčné přežití. Inhibice jejich funkce v myelomových buňkách způsobí zpomalení či zastavení růstu, diferenciace nebo apoptózu [52]. Prvním schváleným lékem pro terapii byl vorinostat. Stejně jako první, je i druhý přípravek panobiostat, schválený až v roce 2015, předepisován především v kombinaci s bortezomibem. Používají se však i kombinace s lenalidomidem a dexamethasonem [23].

Důležitou roli a široké využití v léčbě MM mají i steroidy. Mají protizánětlivé účinky a pomáhají snižovat nežádoucí účinky, které doprovázejí chemoterapii i jiné formy léčby. Nejčastěji se, jako součást kombinované léčby, využívají dexamethason, prednison a methylprednisolon [53].

Aktuálním a atraktivním tématem v terapii MM jsou v současné době monoklonální protilátky. Jedná se o laboratorně připravené protilátky, které blokují daný cíl na povrchu myelomových buněk. Dnes jsou pro léčbu MM schváleny dvě monoklonální protilátky elotuzumab a daratumumab. Více o těchto protilátkách v další části kapitoly.

Pro léčbu MM je také velmi významná podpůrná terapie. Zaměřuje se především na průvodní projevy nemoci a snaží se zlepšit kvalitu života pacientů s MM. U anemických a leukopenických pacientů jsou využívány růstové faktory – erythropoetin či kolonie stimulující faktor. Je doporučena vakcinace proti *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* a očkování proti chřipce. Součástí léčby je i terapie bisfosfonáty. Jedná se o léky, které pomáhají zpomalovat rozvoj kostních onemocnění, snižují bolesti kostí a redukují zlomeniny, obecně se používají při léčbě osteoporózy [23, 40].

### **Monoklonální protilátky využívané v klinické praxi pro terapii mnohočetného myelomu**

Postup přípravy monoklonálních protilátek (mAb) byl publikován poprvé v roce 1975. Autorům se podařilo spojit biologické vlastnosti dvou buněčných linií v jedné hybridní. Použili B-lymfocyt, který je schopen tvořit protilátky (Ab) a myelomovou buňku, která je nesmrtelná. Vznikla buněčná linie, kterou neomezuje počet dělení a současně produkuje mAb se shodnou antigenní specifitou [54]. Díky široké variabilitě možného využití jsou úspěšně využívány například v onkologii nebo k útlumu nežádoucích zánětlivých reakcí. Po řadě výzkumů usilujících o snížení imunogenicity monoklonálních protilátek produkovaných hybridomovou technologií u myši, které v lidském těle indukovaly imunitní odpověď a tvorbu protilátek zvaných HAMA (human anti-mouse antibodies), dnes existuje několik typů mAb užívaných v terapii. Úpravou genetického inženýrství vznikly tzv. chimérické a humanizované protilátky, u kterých jen menší část tvoří původní zvířecí protilátka, větší část je lidského původu [55].

Výzkum na poli monoklonálních protilátek se ukázal být zásadním průlomem v přístupu k léčbě hematologických nádorových onemocnění. Již od roku 1997 jsou mAb aktivně využívány v léčbě. Spektrum léčebných preparátů je stále větší. Vznikají nové léky, které se zcela odlišují mechanismem účinku, ale i varianty již používaných léků. Použití mAb je nyní považováno za standardní součástí léčby, pro MM byl však nález vhodné mAb po dlouhou dobu neúspěšný. V současnosti jsou mAb nadějnými kandidáty pro léčbu MM, proto je na ně zaměřena značná část výzkumů [56].

Pokroky ve studii, která se zabývá interakcí mezi imunitním systémem pacienta a maligními buňkami, umožňují navrhovat klinicky účinnější léčebné postupy i v léčbě MM. Monoklonální protilátky jsou aktivním terapeutickým nástrojem pro humorální imunoterapii MM s nejslibnějšími preklinickými výsledky [57].



Klinická účinnost většiny terapeutických protilátek je založena na jejich schopnosti posílit a aktivovat cytotoxické efektorové mechanismy vrozeného imunitního systému. Většina monoklonálních protilátek patří k izotypu imunoglobulinu G (IgG). IgG je hlavním imunoglobulinem v séru, nejvíce ovlivňuje humorální imunitní odpověď, má zásadní roli při opsonizaci, aktivaci komplementu a při cytotoxicitě závislé na protilátkách. Pro léčbu MM monoklonálními protilátkami byla identifikována řada cílů. Jejich seznam je velmi rozsáhlý a poukazuje na rozsáhlou výzkumnou činnost v této oblasti. Patří mezi ně například komponenty mikroprostředí kostní dřeně nebo molekuly na povrchu MM buněk. Zkoumanými povrchovými znaky jsou CD20, CD40, SLAMF-7, CD38, PD-1, IL-6 a mnoho dalších [58].

Léčba mAb může zahrnovat rozsáhlou řadu mechanismů, mezi které patří buněčná cytotoxicita závislá na protilátkách (ADCC) či cytotoxicita závislá na komplementu (CDC) [59], makrofágy zprostředkovaná fagocytóza (ADCP) [60], interference s interakcemi receptor-ligand nebo konjugace mAb s radioizotopy či toxiny [61]. Potenciálními cíli mohou být signalizační molekuly, receptory na buněčném povrchu či proteiny, které se tam vyskytují, růstové faktory plazmatických buněk nebo mediátory pro adhezi. Nejideálnější by měl být cíl terapie MM na bázi mAb vyjádřen na většině myelomových buněk [62].

Terapie MM prostřednictvím monoklonálních protilátek se dramaticky vyvíjí. Mezi první testované mAb patřily anti-CD20 a anti-CD38. Jejich efekt, jak se později ukázalo, byl však pouze minimální. Dalšími zkoumanými povrchovými znaky byly CD40, CD56, CD74 či CD317. Vykazovaly slibnější výsledky, ale neprokázal se jejich zásadnější význam pro léčbu MM. První schválenou monoklonální protilátkou pro léčbu MM se stal nakonec elotuzumab (anti-SLAMF-7) a později ho následoval daratumumab (anti-CD38) [58].

## **CD20**

CD20 byl identifikován jako aktivní cíl kvůli své expresi u více než 90% B-buněčných lymfomů. CD20 byl využit, protože je exprimován jen na B-lymfocytech. Kmenové buňky ani buňky jiných linií tento znak neexprimují. Rituximab je první protilátkou zavedenou do hematologické praxe, pro řadu B-lymfoproliferací byla významným přínosem. Na mnoho pacientů, trpících MM, však nemá jeho působení výrazný vliv. Jen asi u 20 % pacientů je znak CD20 na povrchu myelomových buněk exprimován. Léčebný význam, i když ne velký, má tak jen u pacientů s translokací t(11;14), kteří vykazují expresi CD20 poměrně vysokou [63].

## **CD40**

CD40 je transmembránový protein patřící do superrodiny TNF- $\alpha$ . Ve vysokých hladinách je exprimován na povrchu myelomových buněk. Vazba CD40 na jeho přirozený ligand určuje jeho funkční aktivaci, která vyvolává nejrůznější biologické procesy, včetně proliferace a migrace buněk [64]. Monoklonální protilátky SGN-40 vyvinuté proti CD40 vykazují mírnou cytotoxickou aktivitu proti myelomovým buňkám, když jsou použity jako samostatný léčebný prostředek. Mechanismus účinku se stejně jako u ADCC opírá o inhibici interakce a aktivace CD40 s odpovídajícím ligandem [65]. Ačkoliv se studie zdály v prvních fázích velmi nadějně, při porovnání s existujícími léčbami, měly mAb nedostatečnou účinnost. Bylo však pozorováno, že úmrtí myelomových buněk je výrazně navýšeno v případě kombinace SGN-40 s lenalidomidem. V kombinaci s lenalidomidem a dexametazonem současně, byla pozorována celková odpověď u 39 % pacientů s RRMM [66].

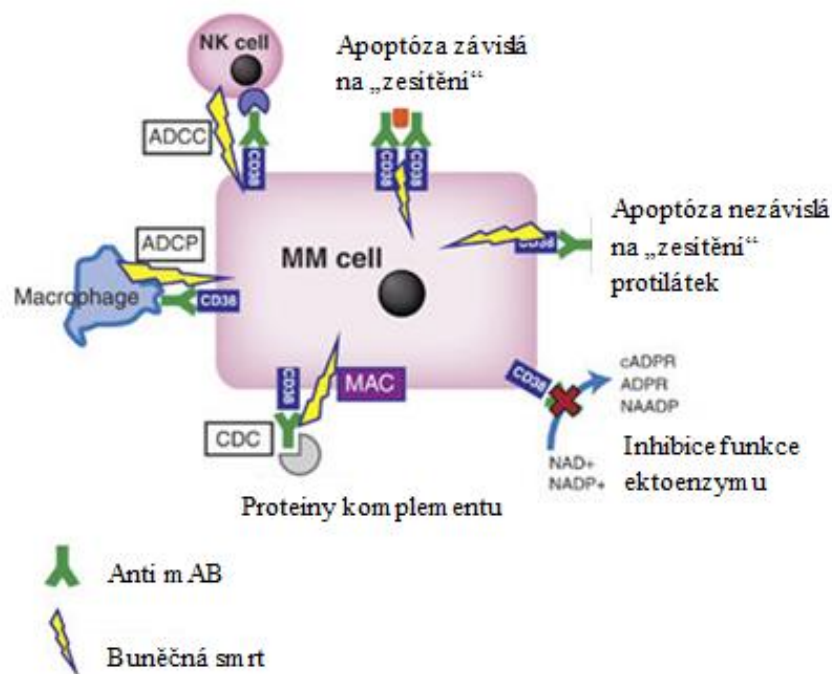
## **SLAMF-7**

Glykoprotein SLAMF-7 (signalizační aktivační molekula lymfocytů – člen rodiny 7), také označovaný CS1, člen podskupiny CD2, se vyskytuje na povrchu NK buněk, lymfocytů B i T, dendritických buněk a monocytů. Na myelomových plazmocytech je vysoce exprimován [67]. Podílí se na podpoře adheze myelomových buněk a růstu nádoru. Stal se nadějným kandidátem pro terapii MM monoklonálními protilátkami a následně byl anti-SLAMF7 první schválenou monoklonální protilátkou pro léčbu MM. Tato humanizovaná IgG1 kappa molekula byla pojmenovaná elotuzumab (obchodním názvem Empliciti) působí především prostřednictvím NK zprostředkované ADCC. Elotuzumab váže SLAMF-7, který je exprimovaný jak na myelomových, tak i na NK buňkách, ale ovlivňuje tyto buňky odlišně [68]. V případě NK buněk se elotuzumab naváže na SLAMF-7 receptory a stimuluje je tak, aby cíleně likvidovaly myelomové plazmocyty. Druhým účinkem této mAb je navázání na samotné myelomové buňky a jejich označení pro likvidaci prostřednictvím NK buněk. V kombinaci s přípravky lenalidomid a dexametazon, vykazuje elotuzumab velice slibné výsledky v relapsu nebo refrakterním stavu a díky tomu byl schválen pro léčbu [67, 69].

## **CD38**

Lidský transmembránový glykoprotein CD38 hraje důležitou roli v buněčné adhezi a signalizaci. Slouží také jako ektoenzym, který reguluje cytoplazmatickou koncentraci kalcia [70]. CD38 je poměrně vysoce exprimován (>80 % případů) na povrchu myelomových buněk, a proto je atraktivním cílem pro terapii mAb. Na základě svých výsledků byl,

v roce 2015 americkým úřadem pro kontrolu potravin a léčiv, daratumumab schválen pro léčbu MM v monoterapii. Daratumumab (HuMax-CD38) je lidská IgG1 kappa molekula, vytvořená imunizací transgenních myší, které mají lidské imunoglobulinové geny. Mechanismus účinku je založen především na ADCC, ADCP a CDC, k dalším patří i indukce apoptózy v buňkách, které jsou označeny protilátkami (Obr. 7). Klinická studie prokázala, že kombinace HuMax-CD38 s dexamethasonem a lenalidomidem má velmi příznivé účinky na léčebnou odpověď u pacientů s RRMM [71]. V současné době existuje několik dalších monoklonálních protilátek, které jsou zatím ve vývoji, patří mezi ně isatuximab (SAR650984), MOR202 a Ab79 [72].



**Obrázek 7:** Mechanismy buněčné smrti, převzato a upraveno z: [63]

buněčná cytotoxicita závislá na protilátkách (ADCC), cytotoxicita závislá na komplementu (CDC), makrofágy zprostředkovaná fagocytóza (ADCP), MAC – komplementový komplex proteinů (membrane attack complex), MM cell – myelomový plazmocyt

## PD-1

PD-1 je receptor, který se exprimuje na povrchu B a T-lymfocytů. Řadí se mezi tzv. kontrolní body imunitního systému. Tento imunoreceptor reguluje aktivaci T-lymfocytů, imunitní odpovědi a hraje důležitou roli v imunitní toleranci. Nádorové buňky mohou signalizace přes tento receptor využít k úniku před imunitním systémem, což vede k toleranci nádoru. Plně humánní protilátka IgG4, nivolumab, selektivně blokuje interakci mezi PD-1

a odpovídajícím ligandem. Díky blokaci je znovu umožněna imunitní reakce proti nádoru [73]. Použití mAb nivolumab proti PD-1/PD-L1 bylo testováno u pacientů s RRMM, ale bylo dosaženo jen stabilizace nemoci. Kombinace nivolumabu s dalšími léčebnými prostředky je zkoumána studií, která je ve fázi III [33].

## **RANK**

Transmembránový receptor RANK je receptor na povrchu prekurzorů osteoklastů. Je aktivátorem signální dráhy jaderného faktoru kappa B a má zásadní vliv na remodelaci kostí. Vazba RANK a jeho ligandu RANKL vede k procesům, díky nimž se z prekurzorů stanou zralé osteoklasty. U myelomových plazmocytů je RANKL nadměrně exprimován a podílí se na vývoji destrukce kostí [74]. Aktivaci RANK může zabránit humanizovaná mAb denosumab. Díky své vysoké specifické afinitě se váže na RANKL, a tím ho inhibuje. Mnoho z pacientů s MM trpí poškozením ledvin, které omezilo jejich možnosti léčby. Denosumab prošel klinickým hodnocením fáze III a mohl by být zásadním lékařským přípravkem, který by zabránil kostním komplikacím u pacientů s MM, aniž by zatěžoval ledviny [75].

### **1.1.5 Autoprotilátky spojované s rozvojem mnohočetného myelomu**

Autoprotilátka je protein produkovaný B-lymfocyty, který je směřován proti vlastním tkáním či orgánům. K produkci dochází v případě reakce imunitního systému na disbalanci v organismu. Tato reakce může nastat vlivem mutace, degradace nebo nadměrné exprese proteinů či jejich uvolňování z poškozené (tj. nádorové) tkáně. Následkem patologického stavu v organismu může být vývoj autoimunitního onemocnění. Mnohočetný myelom i jeho předmaligntní fáze MGUS bývají často s autoimunitním chováním organismu spojovány [76].

Alexej Shimanovsky a jeho skupina provedli v roce 2016 systematický průzkum vědecké literatury týkající se autoimunitních stavů u pacientů s MM a MGUS. Jejich analýza naznačuje souvislost autoimunitních onemocnění a MM i MGUS. U některých pacientů s MM byly současně diagnostikovány různé varianty anémií, revmatologické autoimunitní onemocnění, autoimunitní neurologické poruchy a další [77]. Se zvýšeným rizikem MM jsou spojeny především revmatoidní artritida - relativní riziko 1,32 [78], polymyozitida a dermatomyozitida - relativní riziko 2,29 [79] systémový lupus erythematoses - 11 % pacientů [80] a Sjögrenův syndrom, který je dalším ze skupiny onemocnění se zvýšeným rizikem následného vzniku MM. Avšak i následkem léčby MM mohou vznikat autoimunitní onemocnění, patří mezi ně neutropenie - u 35 % pacientů vyvolaná lenalidomem a perniciozní anémie - 13,6 % pacientů s IgA MM [81].

## 1.2 Vybrané metody analýzy proteinů

Termín proteomika byl vytvořen v roce 1997 analogií ke dvojici genom – genomika [82]. Od té doby se tento obor exponenciálně rozvíjí [83]. Proteomika je vědní disciplína na pomezí mnoha oborů, mezi které patří fyziologie, genetika, biochemie i buněčná biologie. Zabývá se systematickou identifikací a kvantifikací proteinů biologického systému, kterým mohou být například buňky, tkáně, orgány, biologické tekutiny či samotný organismus, v určitém časovém okamžiku [84].

Kompletní soubor proteinů, přítomných v daném čase v buňce či tkáni, je označován jako proteom. Na rozdíl od genomu, který je stabilní, proteom je rozsáhlý, velmi dynamický a aktivně se mění při reakci na různé faktory, včetně vnitřních i vnějších podmínek. Identifikace veškerých přítomných proteinů, jejich struktura, modifikace, funkce, míra exprese a vzájemná interakce jsou předmětem studia proteomiky [85].

Existuje několik identifikačních postupů, podle kterých se proteomika dělí do několika odvětví. „Klasickým“ postupem identifikace proteinů je tzv. *bottom-up proteomika*. Při tomto procesu je bílkovina izolována ze směsi a následně rozštěpena enzymy na směs peptidů, které jsou analyzovány a charakterizovány hmotnostní spektrometrií. Dalším postupem je *top-down proteomika*, kdy dochází také nejprve k vyizolování bílkoviny ze směsi a poté je izolovaný protein identifikován a strukturně analyzován pomocí MS. Pro obecný postup identifikace proteinů slouží *shotgun proteomika*, na rozdíl od klasického postupu je nejprve enzymaticky štěpena směs peptidů, která je poté separována HPLC s detekcí MS. Mezi další patří proteomika *diferenciační (srovnávací)*, *analytická*, *funkční*, *strukturní*, *high-coverage* a *high-throughput* [86].

Základními metodami, které proteomika využívá, jsou: elektroforéza, chromatografie a hmotnostní spektrometrie (MS). Před vlastní analýzou je velmi důležitá preanalytická fáze tj. vhodný odběr a příprava vzorku. Pro biologický a biomedicínský výzkum se proteomika na bázi MS stává čím dál tím více nepostradatelnou technologií, její aplikace je využívána i v mnoha dalších odvětvích (potravinářství, průmysl, zemědělství a další) [86].

### Příprava vzorků

Klíčovým bodem celé proteomiky je příprava vzorků. Vzorek bývá velmi komplexní, a proto je nutné provést procesy, které uvolní látky z biologické matrice, odstraní endogenní rušivé látky a zvýší selektivitu a citlivost [87].

Účinnost solubilizace záleží na zvolené metodě pro desintegraci buněk. Pro úplnou analýzu všech intracelulárních proteinů musí být buňky rozrušeny. Aby se předešlo proteolýze, měla by desintegrace buněk probíhat při nízkých teplotách s přidavkem inhibitoru proteáz (např. fenylmetylsulfonyl fluorid). Pro rozrušení buněk lze použít například osmotickou lýzu, ultrazvuk (20-50 kHz) či French-press (140-210 MPa). Tímto postupem získáme proteiny a proteinové komplexy. V buněčném lyzátu je však spolu s proteiny přítomno mnoho interferujících látek, které je třeba odstranit. Jedná se o soli, nukleové kyseliny a lipidy, od kterých lze proteiny oddělit použitím metod, mezi které patří dialýza, gelová permeační chromatografie, ultrafiltrace či precipitace proteinů [88].

### **1.2.1 Elektromigrační techniky**

Elektromigrační metody jsou založeny na pohybu částic ve stejnosměrném elektrickém poli. Pohyb molekul je vázán především na samotnou molekulu a její prostředí. Jak se bude pohybovat, ovlivňuje především přítomnost a velikost náboje, dále pak velikost a tvar molekuly, druh nosiče a také použitý elektrolyt. Peptidy a bílkoviny mají amfoterní vlastnosti, a proto jejich velikost náboje záleží na pH prostředí, ve kterém se vyskytují. K oddělení a identifikaci makromolekul, jako jsou proteiny, DNA či RNA, slouží široká skupina elektroforetických technik v gelu. Separace molekul je založena na principu migrace nabitých molekul v gelové matici po aplikaci elektrického napětí [89]. Elektromigrační techniky jsou hlavním nástrojem pro mnohé oblasti včetně biochemie, molekulární biologie a proteomiky. Jednorozměrná a dvourozměrná gelová elektroforéza a diferenciální gelová elektroforéza jsou nejpoužívanějšími elektromigračními metodami k separaci proteinů, k imunodetekci slouží Western blot. Gelová elektroforéza není jen analytickou metodou, ale je využívána i k purifikaci vzorků, například před provedením proteomové analýzy hmotnostní spektrometrií [87].

#### **Jednorozměrná elektroforetická separace v polyakrylamidovém gelu**

Během elektroforetické separace se proteiny dělí na základě jejich elektroforetické pohyblivosti. Rychlost migrace v gelovém prostředí je úměrná poměru mezi nábojem bílkoviny a její hmotností. Nejčastěji jsou pro elektroforézu používány polyakrylamidové gely (PAGE). Existují dvě varianty podmínek, za kterých elektroforetická separace v polyakrylamidovém gelu probíhá – nedenaturační (proteiny jsou v nativním stavu) a denaturační (přítomnost detergentů). Dalším možným dělením gelové elektroforézy je kontinuální či diskontinuální provedení [87].

Nejpoužívanější metodou separace, která využívá diskontinuální uspořádání, je proteinová polyakrylamidová gelová elektroforéza v přítomnosti dodecylsulfátu sodného (SDS-PAGE), která byla popsána již v roce 1970. Pro přípravu vzorků proteinů, které jsou separovány SDS-PAGE, je používán Laemmliho vzorkovací pufr. Ke vzorku je možné přidat  $\beta$ -merkaptoetanol, který redukuje disulfidické vazby proteinů, čímž přispívá k jejich denaturaci [90]. Pro dosažení co nejoptimálnějšího rozlišení při této elektroforetické separaci je používán tzv. Laemmliho systému pufrů, který využívá dva pufrы o různém pH [91]. Pro tzv. zaostřovací neboli koncentrující gel je použit pufr o pH 6,8, pro druhý (dělicí gel) pufr o pH 8,8 [90].

Proteiny separované na polyakrylamidovém gelu mohou být vizualizovány různými způsoby barvení. Nejčastěji používanými barvivy jsou Coomassie Brilliant Blue, dusičnan stříbrný nebo amidočern, alternativou je radioaktivní značení cílových molekul či fluorescenční barvení [87]. Existuje i varianta vizualizace bez barvení, v tomto případě se ještě před nalitím gelu přidá do roztoku polyakrylamidu 2, 2, 2-trichloretanol.

### **Dvourozměrná gelová elektroforetická separace v polyakrylamidovém gelu**

Dvourozměrná gelová elektroforetická separace v polyakrylamidovém gelu (2D-PAGE) byla představena Patrickem O'Farrellem v roce 1975. Metodou zvanou izoelektrické zaostřování (IEF) dochází v prvním rozměru k separaci komplexní proteinové směsi dle izoelektrického bodu molekuly v proměnlivém prostředí pH. Dělení proteinů v druhém rozměru probíhá na základě molekulové hmotnosti pomocí SDS-PAGE [92].

Existuje několik uspořádání IEF – gelová a kapilární. Izoelektrická fokusace v kapilárním uspořádání je tvořena kapilárou, která je naplněná pufrem s pH gradientem. Vzorek je dávkován na konec kapiláry s nízkým pH, na který je připojena anoda. Kapilární IEF je považována za separační techniku s vysokým rozlišením [93]. Gelové imobilizované pH gradienty (IPG) zásadně přispěly k rozšíření a zlepšení reprodukovatelnosti 2D elektroforézy. IPG gely s úzkým gradientem jsou velmi užitečné pro oddělení těsně uspořádaných proteinových skvrn, které jsou předmětem zájmu [94].

Nezbytné pro dobře separované proteiny během IEF je příprava vzorků. Jde převážně o správné použití chaotropních činidel, povrchově aktivních látek, amfolytů, činidel pro redukci a alkylaci cysteinových vazeb a odstranění všech solí a vodivých neproteinových částic [95]. Pro udržení rozpustnosti proteinů během IEF je využívána močovina

o koncentraci 7-9 M, spolu s 2 M thiomočovinu a sufraktanty [96]. Při izoelektrickém zaostřování dochází rozdělení proteinů dle jejich izoelektrického bodu (pI). Molekuly jsou nabitě kladně či záporně, a proto médiem putují k opačně nabitě elektrodě. V místě pH, které odpovídá pI proteinů, kde je jejich celkový náboj nulový, se zaostřují (fokusují) a dále již nepokračují v migraci gelem [92]. Nutnou součástí přípravy vzorku před separací v druhém rozměru je redukce disulfidických můstků (dithiothreitem) a zábrana jejich opětovnému vytvoření alkylací výsledného thiolu (jodacetamidem). Separace v druhém rozměru, která je kolmá na první, je prováděna SDS-PAGE [97].

### **Dvourozměrná diferenční gelová elektroforetická separace**

Ke konci 20. století vznikla modifikací 2D-PAGE dvourozměrná diferenční gelová elektroforéza (2D-DIGE). Tato metoda využívá fluorescenčních barviv CyDyes ke značení proteinů ve vzorku. Zásadní výhodou 2D-DIGE je možnost označit dva (maximálně tři) vzorky různými barvami a oddělit je na stejném gelu. Tento postup umožňuje jednodušeji a přesněji porovnávat a kvantifikovat jednotlivé body [98]. Barviva jsou svoji citlivostí na úrovni barvení stříbrem. Velmi užitečná je tato technika především pro srovnávání vzorků zdravých a nemocných pacientů [97].

### **Western blot s navazující imunodetekcí**

V roce 1979 byla Towbinem a jeho kolektivem představena metoda pro analýzu proteinů pojmenovaná Western blot (elektroblot). Jedná se o analytickou metodu, která zprostředkovává přenos molekul z mobilní fáze do pevné fáze, na kterou jsou navázány. Jako imunoblot označujeme transfer, na který v dalším kroku navazuje značení protilátkami [99].

Vzhledem ke své rychlosti a kvalitě je nejčastěji používanou metodou elektroblotování. Proteiny jsou postupně přenášeny elektrickým proudem, který prochází gelem. Existují dva druhy přenosu proteinů z gelu na membránu – první nese označení wet (z angl. mokrý) a druhý semi-dry (z angl. polosuchý). Oba byly vyvinuty k elektroforetickému blotování proteinů a nukleových kyselin. Účinnost přenosu elektroblotování závisí na typu gelu, membrány, složení transferového pufru, velikosti proteinů, přenosové teplotě i počtu gelů a objemu pufru [100]. Při wet transferu připomíná celkový výsledek procedury svým skládáním sendvič. Gel, membrána, filtrační papíry a další komponenty jsou postupně navrstveny na sebe a vloženy do nádoby s transferovým pufrem a platinovými elektrodami. Vzhledem k velkému odporu je během transferu nutné aparaturu chladit. Při semi-dry přenosu



je sendvič s gelem a membránou umístěn vodorovně mezi uhlíkové (příp. grafitové) deskové elektrody. Při tomto postupu nedochází k výraznému zahřívání jako u wet transferu díky menšímu odporu, což je zásadní výhodou. K provedení je také třeba menší množství transferového pufru, protože je použit jen pro smočení gelů, membrán a filtračních papírů [101].

Tato metoda je dnes rutinní laboratorní technikou, která je zásadní při analýze peptidů a proteinů. Použitím Western blotu lze identifikovat specifické proteiny z komplexní směsi proteinů extrahovaných z buněk. Prvním krokem je SDS-PAGE, druhým přenos na pevný nosič, čímž jsou nejčastěji nitrocelulósová (NC) nebo polyvinylidendifluoridová (PVDF) membrána a posledním označení cílového proteinu pro vizualizaci [102].

### **1.2.2 Metody kapalinové chromatografie pro analýzu proteinů**

Kapalinová chromatografie je separační metoda, při níž dochází k rozdělení složek vzorku mezi dvě vzájemně nemísitelné fáze – mobilní a stacionární. Mobilní fáze je kapalina, která protéká kolonou. Stacionární fáze tvoří náplň kolony, dle typu adsorbentu je kapalinová chromatografie dělena na několik typů: rozdělovací, adsorpční, iontově výměnná, gelově permeační či afinitní. Vzorek je dávkován do mobilní fáze, kterou je unášen do kolony se stacionární fází, dle afinity ke každé z fází je více či méně zadržován a dle toho eluován [103].

Často používanou metodou pro analýzu proteinů je i dvourozměrná kapalinová chromatografie (2D-LC). Separované proteiny jsou během stanovení již v roztoku, což je největší výhodou 2D-LC. Poté lze již snáze stanovit molekulové hmotnosti proteinů a zjistit, zda a případně jaké, mají posttranslační modifikace [104].

V proteomice jsou nejvíce zastoupeny iontově výměnná a vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC). Při iontově výměnné kapalinové chromatografii je stacionární fáze tvořena měničem iontů (ionex), jehož funkci plní například polystyren, celulóza či dextran. Tato fáze má na svém povrchu skupiny, které jsou schopné disociovat v roztoku, aktivní povrch ionexu následně interaguje s dalšími ionty v roztoku [105].

Zvláště pro shotgun proteomiku je využívána vysokoúčinná kapalinová chromatografie. Shotgun proteomika je postup identifikace proteinů, kdy jsou proteiny ze vzorku rozštěpeny na peptidy. Vzhledem k tomu, že enzymatickým štěpením vznikají stovky tisíc peptidů, je vzorek před MS analýzou, za účelem snížení jeho složitosti, separován vhodnou

vysokorozlišovací metodou [86]. Jednotlivé frakce, vzniklé separací HPLC na reverzní fázi, obsahující peptidy jsou postupně zavedeny do hmotnostního spektrometru. Zde dojde k jejich fragmentaci a sekvenaci za účelem identifikace. Spojením HPLC s tandemovým uspořádáním MS je získána vyšší citlivost a specifčnost analýzy, lze tak analyzovat velmi komplexní směsi peptidů a je umožněna i relativní kvantifikace [106].

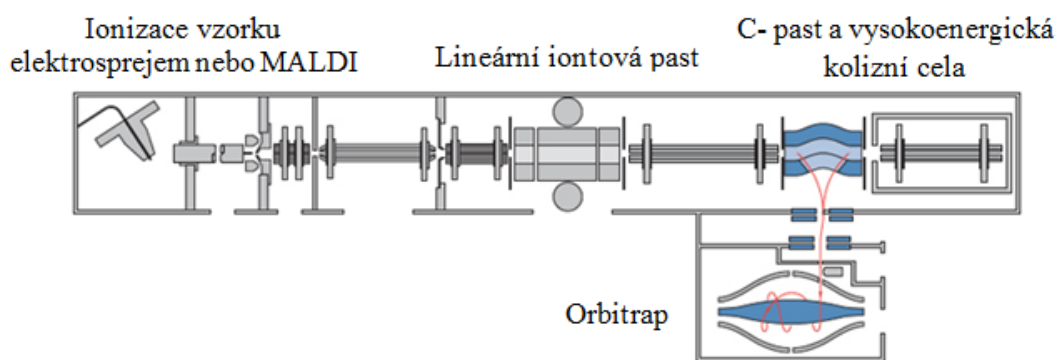
### 1.2.3 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie (MS) je metoda analytické chemie, která slouží k převedení molekul na ionty a jejich rozlišení dle poměru  $m/z$ , který představuje vztah hmotnosti a náboje analytu. Výsledkem analýzy je záznam relativních intenzit jednotlivých iontů. Základními částmi hmotnostního spektrometru jsou iontový zdroj, který přeměňuje molekuly analyzovaného vzorku na ionty plynné fáze, hmotnostní analyzátor, který ionizované analyty odděluje dle  $m/z$  poměru a detektor, který pro každou  $m/z$  hodnotu zaznamenává počet prošlých iontů [107].

Iontový zdroj slouží k převedení neutrálních molekul analytu do ionizovaného stavu. Existuje mnoho typů ionizačních technik, které se dle množství energie, která na molekulu při ionizaci působí, mohou dělit na „tvrdé“ a „měkké“, dle možnosti práce za atmosférického či sníženého tlaku či dle toho, zda probíhají v plynné fázi či desorpce. V proteomice se nejvíce využívá ionizace za požití elektrospreje a technika ionizace laserem za účasti matrice (MALDI). Elektrosprej je často využíván pro spojení s HPLC/MS. Proces ionizace je založen na zmlžení roztoku vzorku za vzniku elektricky nabitých kapiček, ze kterých se ionty postupně uvolňují. Jedná se o měkkou ionizační techniku, která je vhodná pro středně polární až iontové látky, mezi které patří peptidy, proteiny, sacharidy, nukleové kyseliny a také organometalické a anorganické sloučeniny [107]. Pro molekuly s vysokou molekulovou hmotností (proteiny, oligonukleotidy, lipidy, polymery) je vhodnou ionizační technikou ionizace laserem za účasti matrice. Jedná se o měkkou ionizační techniku, kterou lze analyzovat nepolární i polární látky. Ionty putující do hmotnostního analyzátoru vznikají díky přenosu energie, kterou vytvoří krátký laserový puls. Energie pulsu je absorbována matricí a jejím prostřednictvím přenesena na molekuly vzorku, čímž se předejde jejich nežádoucímu štěpení. S ostatními technikami je spojena off-line uspořádáním, kdy je třeba směs vzorku a matrice nanést na terčík MALDI desky. Pro jednotlivé druhy vzorků je třeba zvolit vhodnou matrici. Výhodou této metody je možnost archivace či opětovné přeměření vzorku [108].

Velmi důležitou součástí hmotnostního spektrometru je analyzátor. Je umístěn za iontovým zdrojem, pracuje za vakua a souží k dělení iontů v plynné fázi dle poměru jejich hmotnosti a náboje. Pro proteomické analýzy se nejčastěji využívá kvadrupólový analyzátor (Q), iontová past (IT), analyzátor doby letu (TOF) a orbitrap. Jednotlivé analyzátory se liší svými vlastnostmi a schopnostmi, jejich kombinací (např. QQQ, Q-TOF, TOF-TOF) je možno dosáhnout kvalitnějších výsledků [109, 110]. Kvadrupól patří mezi skenující analyzátory, které postupně mění skenovanou veličinu a propouští ionty jen o určité m/z. V hybridních hmotnostních spektrometrech často slouží jako filtr (k výběru požadovaného iontu) či jako kolizní cela. Iontová past se skládá z prstencové elektrody a dvou kruhových elektrod, které prstenec uzavírají. Do pasti jsou přivedeny ionty, které se tam po vložení napětí zadrží a pohybují se po určité trajektorii. Postupnou změnou poměru napětí mezi elektrodami jsou ionty dle svého m/z vypuzovány výstupním otvorem na detektor. Hlavní výhodou je možnost několikasupňové analýzy ( $MS^n$ ). Existuje i varianta IT tzv. lineární iontová past, která také umožňuje uchovávání iontů. Vzhledově je velmi podobná kvadrupólu, který má na koncích umístěné elektrody [111]. Průletový analyzátor rozděluje ionty na základě doby letu. Ionty jsou urychleny silným elektrickým polem, tzn., získají stejnou kinetickou energii. Dle času průletu jsou detekovány a je určena jejich odpovídající m/z. Tento analyzátor bývá často ve spojení s MALDI. Nejnovějším typem analyzátoru je orbitrap. Je složen z vnější a středové vřetenové elektrody, na které je vloženo napětí. Okolo vnitřní středové elektrody ionty rotují a je zaznamenána jejich frekvence. Data získaná z orbitrapu je nutné na hmotnostní spektrum převést Fourierovou transformací signálu [112]. Na obrázku 8 jsou schematicky zobrazeny analyzátory a další součásti hmotnostního spektrometru LTQ Orbitrap XL, který je využíván pro analýzu proteinů v této práci.

MS se stala nepostradatelným nástrojem ve výzkumu proteomiky. Důležitou je především kvůli své schopnosti zachytit proteomovou komplexnost. Pro každý vzorek je však nutné zvážit, jaká technika je pro jeho analýzu nejvhodnější, jaký typ přístroje, fragmentační metodu či strategii zvolit [113].



**Obrázek 8:** Schéma hmotnostního spektrometru LTQ Orbitrap XL;  
převzato a upraveno z: [100]

### 1.3 Analýza imunoproteomu

Vývoj imunoterapie významně podpořil objev antigenů asociovaných s nádory (TAA). Imunitní systém na tyto antigeny reaguje antigenně specifickými mechanismy a tvoří autoprotilátky. Oblast proteomiky, zabývající se těmito proteiny, je pojmenovaná jako imunoproteomika [114]. Na rozdíl od proteomu, který zahrnuje soubor proteinů, které se v daném čase nachází v buňce či organismu, jsou termínem imunoproteom označovány jen protilátky cílené proti TAA. Tyto autoprotilátky se stávají potenciálně vhodnými diagnostickými markery, mohou být ukazateli úspěšnosti léčby případně být i její součástí. Dle jejich výskytu mohou být rozděleny do dvou skupin na autoprotilátky spojené se specifickými nádory a na ty, které jsou společné pro široké spektrum nádorů [115]. Aby mohly být autoprotilátky použity jako diagnostický, prognostický či teranostický biomarker, musí být spolehlivě identifikovány a charakterizovány. K tomu lze využít obsáhlý soubor proteomických technologií, které imunoproteomika zahrnuje [116].

#### 1.3.1 Metody studia imunoproteomu

Technický pokrok ve výzkumu biomarkerů umožnil zdokonalit i přístupy v analýze proteinů. Byly vyvinuty či inovovány nejrůznější metody a techniky, které umožňují sekvenovat lidský genom a separovat proteiny s vysokým rozlišením. Hmotnostní spektrometry spolu s výkonnými počítači a specializovaným softwarem umožňují charakterizaci, identifikaci a strukturní analýzu proteinů [117]. Kombinace těchto i dalších technik umožňuje například porovnávat přítomnost a hladiny protilátek u zdravých

a nemocných pacientů, a tím i případně dříve zaznamenat změny, odehrávající se v organismu [118].

Mezi nejznámější techniky na bázi hmotnostní spektrometrie pro analýzu imunoproteomu patří serologická proteomová analýza. Metody využívající nukleové kyseliny jsou označovány jako serologická analýza nádorových antigenů za využití cDNA knihovny (SEREX) a fágové zobrazování. Dále jsou využívány technologie na bázi čipů či afinitní chromatografie. „Screeningové“ techniky na bázi nukleových kyselin a proteinových čipech nabízejí vysokou citlivost a eliminují zkreslení vlivem abundančních proteinů. Jejich nevýhodou je však nevhodnost pro průkaz posttranslačních modifikací. Naopak techniky založené na hmotnostní spektrometrii jsou schopné posttranslační modifikace detekovat, ale použití těchto metod často vyžaduje cílené vyhledávání a větší množství patientského vzorku. Metody na bázi MS jsou však nezastupitelné ve fázi identifikace antigenů [3].

### **Sérologická proteomová analýza**

Metodou používanou pro profilaci autoreaktivity patientského séra a pro identifikaci antigenů asociovaných s nádorovými onemocněními je sérologická proteomová analýza [119], dříve byla označovaná PROTEOMEX. Tato metoda kombinuje dvourozměrnou elektroforetickou separaci a hmotnostní spektrometrii s cílem identifikovat nádorové antigeny [3].

Prvním krokem metody SERPA je převedení vzorku 2D-elektroforézou na proteinovou mapu. Western blotem je získána membrána s ukotvenými proteiny, která se poté inkubuje s patientským sérem či se směsí kontrolních sér pacientů [120]. Následnou imunodetekcí vzniknou proteinové skvrny, které se objeví díky reakci enzym-substrát. Tyto skvrny jsou porovnávány s proteinovou mapou na 2D gelu. Srovnáním lze identifikovat skvrny na gelu, ty jsou poté vyříznuty a zpracovávány pro analýzu na MS. Příprava před provedením MS, zahrnuje odbarvení, enzymatické naštěpení proteinů, odsolení vzorků na kolonce a poté eluci na MALDI desku [121]. Nedávno již byla představena i modifikovaná SERPA, která využívá jako základ dvourozměrnou diferenční gelovou elektroforetickou separaci [3].

### **Serologická analýza nádorových antigenů za využití cDNA knihovny**

Serologická analýza nádorových antigenů za využití cDNA knihovny je technika určená k izolaci antigenů asociovaných s nádory. Je založená na „imuno-screeningu“ autoprotiáték v sérech pacientů oproti knihovně vytvořené pomocí RNA, která pochází z pacientova nádoru

[122]. Cílem metody SEREX je identifikovat nádorové antigeny, které vyvolaly humorálně i buněčně zprostředkovanou imunitní odpověď u pacientů s nádorovým onemocněním [3].

### **Fágové zobrazení**

Serologická analýza antigenů asociovaných s nádory pomocí fágového zobrazení se využívá pro „screening“ autoprotilátek u pacientů. Obdobně jako u metody SEREX, se i při fágové zobrazení používá cDNA knihovna, která se vytváří z nádorových buněčných linií [123]. Fágy s povrchově exprimovanými peptidy, které reagovaly při inkubaci s IgG pocházejících ze sér pacientů, jsou vyizolovány. Jejich cDNA je sekvenována a identifikována, což napomůže k určení reaktivního peptidu – tj. antigenu asociovaného s nádory [124].

### **Proteinové čipy**

Další variantou pro průkaz a charakterizaci profilů autoprotilátek jsou proteinové čipy. Využívají se k „screeningu“ sér pacientů s autoimunitními či nádorovými onemocněními. Výhodou této metody je profilování autoprotilátek v průběhu progresu onemocnění. Kandidátní antigeny musí být dále charakterizovány pomocí technologií založených na MS [3].

### **Afinitní profilování proteinů**

Metoda afinitního profilování (MAPPING) byla vyvinuta za účelem identifikace antigenů, které se vyskytují u pacientů s nádorovými onemocněními a jsou rozpoznávány autoprotilátkami. Je také využívána pro průkaz proteinů a identifikaci autoprotilátek. Tato metoda kombinuje 2D imunoafinitní chromatografii, enzymatické štěpení izolovaných antigenů, separaci výsledných peptidů a identifikaci MS/MS [125].

## **1.3.2 Využití imunoproteomické analýzy proteinů v klinické praxi**

Imunoproteomický přístup lze využít i k identifikaci autoprotilátek u pacientů s nejrůznějšími typy nádorových onemocnění. Bylo zjištěno, že se autoprotilátky ve skutečnosti objevují ještě před projevem klinických příznaků při progresi nemoci [126].

Autoprotilátky jsou využívány například v diagnostice nádoru tlustého střeva, žaludku, prsu [127], plic [128], vaječníků [129], prostaty [130] a karcinomu hlavy a krku [131]. U dalších onemocnění, mezi která patří například karcinomu pankreatu či jater [105], jsou sérové autoprotilátky pro diagnostiku teprve stanovovány nebo hledány specifitější.

Skupina, kterou vedl Takeo Sakurai, publikovala v roce 2011 studii, která se zabývala identifikací protilátek v sérech pacientů s roztroušenou sklerózou (RS) imunoproteomickými přístupy. Cílem studie bylo získat protilátky, které by mohly být využity jako biologické markery pro toto onemocnění.[132]. V předchozích studiích bylo identifikováno několik protilátek proti proteinům, mezi které patří myelinový oligodendrocytový glykoprotein, myelinový bazický protein, proteolipidový protein, Nogo-A a protein 60 tepelného šoku. Avšak nebyly identifikovány žádné autoprottilátky, které by umožnily odlišení mezi pacienty s RS a negativními kontrolami [133]. V nové studii byly proteomicky analyzovány protilátky specifické pro pacienty s roztroušenou sklerózou. Analyzováno bylo 25 vzorků od pacientů s roztroušenou sklerózou, a dalších 87 vzorků od různě nemocných pacientů (s Parkinsonovou chorobou, mírnou kognitivní poruchou a infekční meningoencefalitidou), zařazeny byly i negativní kontroly. Vzorky byly separovány 2D-gelovou elektroforézou, kterou následoval Western blot a poté byla provedena imunodetekce. Veškerá cílová místa, která reagovala s protilátkami v séru z negativní kontroly, byla odečtena od těch, která vznikla reakcí s patientskými séry. Skvrny, které zbyly po odečtení, byly následně analyzovány hmotnostní spektrometrií. Proteiny byly identifikovány pomocí softwaru MASCOT (Matrix Science) s databází NCBI. 2D imunoblotováním po odečtení bylo identifikováno 35 skvrn, které reagovaly s protilátkami v séru pacientů. Nejčastěji se vyskytovala skvrna s molekulovou hmotností 67 kDa a pI 5,8, která byla identifikována jako mitochondriální protein 70 tepelného šoku (mtHSP70). Za účelem vyhodnocení specifity protilátky anti-mtHSP70, byla hodnocena prevalence této protilátky v sérech pacientů. Pozitivní výsledek byl detekován u 68 % (17 z 25) pacientů s RS, u ostatních onemocnění byla pod 30 %. MtHsp70 byl imunoproteomicky identifikován jako cílový antigen pro pacienty s RS. Z předchozí studie je známá také vysoká prevalence protilátek proti fosfoglycerát mutáze 1 (PGAM1). Výsledkem této studie je návrh kombinovaného testu, který by stanovoval jak mtHsp70, tak i PGAM1, test by byl více specifický, než při použití jen jedné protilátky a mohl by být užitečnou diagnostickou metodou [132].

Rakovina vaječnicků je velmi problémové onemocnění, protože až do pokročilé fáze bývá asymptotické. Včasná diagnostika v počáteční fázi by zásadně snížila úmrtnost u tohoto onemocnění. Rakovinou vaječnicků se zabývala skupina M. Chatterjee, která použila ke stanovování autoprottilátek fágové zobrazení [129]. O rok později skupina pod vedením P. Ramily provedla, s cílem identifikovat nové biomarkery, komplexní „screening“ profilu autoprottilátek ovariálního karcinomu a také „screening“ peptidů spojených s hlavním

histokompatibilním komplexem (MHC) prezentovaných na povrchu nádorových buněk. Analyzováno bylo dvacet vzorků získaných od pacientek s diagnostikovaným primárním ovariálním karcinomem a dvacet kontrolních vzorků. Profily autoprotilátek byly identifikovány pomocí nativních nádorových proteinů, které byly imunoprecipitovány autoprotilátkami ze séra pacientů a kontrolními vzorky. Imunoafinitně čištěné vzorky byly nejprve frakcionovány gelově permeační chromatografií, následně separovány HPLC na reverzní fázi a analyzovány pomocí MS. Poté byla data porovnávána s databázemi. K charakterizaci repertoáru antigenů indukující T-lymfocyty při rakovině vaječníků byly stanovovány epitopy MHC třídy I. Byly získané z povrchů rakovinových buněk vaječníků a analyzovány hmotnostní spektrometrií. Analýza byla zaměřena na antigeny, které se zapojují do humorální i buněčné imunity. Bylo zjištěno, že tyto antigeny se podílejí na mnohých procesech, jako jsou replikace/transkripce (11 %), buněčná signalizace a růst (40 %), kinázy (8 %), apoptóza (3 %), regulace buněčného cyklu (9 %) a buněčná adheze (20 %). Skutečnost, že jsou antigeny součástí různých cest, podporuje myšlenku multiantigenových imunoterapeutických vakcín, které by vyvolaly imunitní odpověď proti mnoha různým aspektům funkce nádorových buněk [134].

Dalším onemocněním, u kterého byly a jsou zkoumány přítomné protilátky, je rakovina žaludku. Již dvě skupiny v roce 2005 a 2007 zkoumaly autoprotilátky anti-p53 [135, 136]. Tuto problematiku řeší i skupina Yanga Liana, která zaměřila svůj výzkum na identifikaci sérových markerů pro diagnostiku. Pro analýzu byla použita technologie na základě proteinových čipů. Pro diagnózu se již řada biomarkerů používá, nemají však dostatečnou senzitivitu a specifitu a proto byla analýza zaměřena na autoprotilátky. Soubor vzorků obsahoval 1 401 sér, 537 patientských, 550 negativních kontrol a 314 vzorků od pacientů, kteří trpí jinými onemocněními žaludku. Jednotlivé vzorky byly v dubletu analyzovány na proteinových čipech. Byly stanoveny čtyři proteiny: protein COP podjednotka 2 (COPS2), protein CTSF, ekto 5'-nukleotidáza (NT5E), telomerický faktor vazebného opakování (TERF1), které byly významněji vázány autoprotilátkami pacientů než negativními kontrolami. Na 300 vzorcích od pacientů s rakovinou žaludku byla v dalších fázích testována schopnost stanovených biomarkerů předpovědět stav pacienta v závislosti na autoprotilátkách. Nízké sérové hladiny protilátek proti COPS2, CTSF, NT5E, TERF1 byly spjaty s nepříznivým stavem. Pacienti s vysokou hladinou autoprotilátek měli výrazně lepší prognostickou diagnózu. Tyto nově stanovené proteiny mají potenciál být biomarkery



rakoviny žaludku, protože vykazují vyšší citlivost a specifitu než markery dosud běžně používané [137].

U pacientů s MM bylo již analyzováno několik potenciálních diagnostických markerů. Jedním z TAA, který byl zkoumán je neuron-specifická enoláza (NSE), kterou zkoumala skupina H. Yanga. Do studie bylo zařazeno 52 sér od pacientů s MM a 67 kontrolních sér. Bylo prokázáno, že po několika cyklech chemoterapie spolu s vymizením plazmatických buněk z kostní dřeně, byla snížena i hladina NSE v séru a vrátila se k fyziologickým hodnotám. V této studii mělo 34 z 52 pacientů vyšetřených na MM zvýšené hladiny NSE při počáteční detekci. Po chemiterapii vykazovaly hladiny u všech pacientů klesající tendenci [137]. Mezi další identifikované TAA cíle patří adiporfilin a HSP90s [138]. Luetkens a jeho skupina stanovili a ověřili primární autoprotilátky SSX-2 a NY-ESO-1, které působí proti intracelulárním MM-specifickým nádorovým antigenům. Jedná se o funkční autoprotilátky, ale objevují se vzácně [139].

## **Cíle diplomové práce**

Hlavním cílem této diplomové práce bylo zavést elektroforetické techniky pro analýzu proteinů a optimalizovat barvicí techniky použité k vizualizaci separovaných proteinů. Mezi další kroky patří imunodetekce a identifikace proteinů.

Seznam cílů diplomové práce:

- použití elektroforetických technik a Western blot metody pro analýzu proteinů,
- zavedení a optimalizace barvicích technik pro detekci proteinů přenesených na membránu,
- zavedení dvourozměrné elektroforetické techniky pro separaci buněčných proteinů s následnou imunodetekcí,
- zavedení metod pro analýzu imunoproteomu a průkaz specifických (auto)protilátek u pacientů s mnohočetným myelomem v remisi.

## 2 Experimentální část

### 2.1 Přístroje a pomůcky:

- analytické váhy Scaltec SBC 32 (Scaltec Instruments, GmbH, Göttingen, Německo)
- aparatura pro diskontinuální elektroforetickou separaci Mini-PROTEAN Tetra Cell (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)
- aparatura pro semi-dry (polosuchý) blotovací přenos Trans-Blot® SD Semi-Dry (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)
- automatické pipety Eppendorf Research (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- blotovací membrána Immun-Blot® PVDF membrane, porozita 0,2 µm (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)
- blotovací membrána Trans-Blot® Transfer Medium, Pure nitrocelullose membrane, porozita 0,2 µm (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)
- fotografovací stanice ChemiDoc™ XRS+ System obsahující CCD kameru s Image Lab™ softwarem (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)
- gelové proužky s imobilizovaným gradientem pH Immobiline™ DryStrip pH 3-10 NL, 7 cm (GE Healthcare, Uppsala, Švédsko)
- hmotnostní spektrometr LTQ Orbitrap XL (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)
- magnetické míchadlo s ohřevem model MSH-300 (Biosan SIA., Riga, Lotyšsko)
- mikrozkušavky (BioTech a.s., Praha, ČR a Eppendorf, Hamburg, Německo)
- pH metr model Orion 420 (Thermo Electron Corporation, Massachusetts, USA)
- předvážky KERN 440-33N (Kern & Sohn GmbH, Balingen, Německo)
- stanice pro produkci redestilované vody TKA Smart2Pure (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)
- spektrofotometr LabSystems Multiskan RC (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)
- svářečka folií Freshie 1762 (Eta, Praha, ČR)
- špičky eppendorf GELoader (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- topné hnízdo Block heater Grant Bio BTD (Grant Instruments Ltd., Cambridgeshire, UK)
- třepačky:
  - o Mini-Rocker MR-1 (BioSan SIA, Riga, Lotyšsko)
  - o Multi-functional Orbital Shaker PSU-20i (BioSan SIA, Riga, Lotyšsko)
  - o PMS-1000i Microplate Shaker (Grant Instruments Ltd., Cambridgeshire, UK)

- Vortex mixer - Wx (VELP Scientifica, Usmate, Italy)
- Thermo-Shaker TS-100C (BioSan SIA, Riga, Lotyšsko)
- Mini-rotátor Bio RS-24 (BioSan SIA, Riga, Lotyšsko)
- koncentrátor plus 5305 (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- ultrasonikátor UP200H (Hielsches, Teltow, Německo)
- zařízení pro isoelektrickou fokusaci PROTEAN® IEF Cell (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)
- zdroj napětí – Power-pac 200 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)

## 2.2 Seznam chemikálií a reagensů

- 3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonát (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) - v textu uváděn pod zkratkou CHAPS
- 4x Laemmli vzorkový pufr (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)
- Acetonitril (Honeywell Fluka, New Jersey, USA)
- Agaróza (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Akrylamid (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Amidočern (Lachema, Neratovice, ČR)
- Amoniak vodný roztok 26% (Lach:ner, Neratovice, ČR)
- Bio-Safe Coomassie G-250 Stain (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)
- Bradfordovo činidlo (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Bromfenolová modř (Lachema, Neratovice, ČR)
- Butanol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Citrát sodný (Penta, Chrudim, ČR)
- Červená krevní sůl (Penta, Chrudim, ČR)
- DeStreak Reagent (GE Healthcare, Uppsala, Švédsko)
- Dihydrogenfosforečnan draselný (Lach:ner, Neratovice, ČR)
- Dithiothreitol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) - v textu uváděn pod zkratkou DTT
- Dodecylsulfát sodný (Lachema, Neratovice, ČR) - v textu uváděn pod zkratkou SDS
- Dusičnan stříbrný (Penta, Chrudim, ČR)
- EDTA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Etanol (Lachema, Neratovice, ČR)
- Fenylmethylsulfonyl fluorid (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) - v textu uváděn pod zkratkou PMSF
- Formaldehyd 36 - 38% vodný roztok (Penta, Chrudim, ČR)

- Glutaraldehyd 50% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Glycerol (Penta, Chrudim, ČR)
- Glycin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Hovězí sérový albumin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) - v textu uváděn pod zkratkou BSA
- Hydrogenfosforečnan disodný dodekahydrát (Penta, Chrudim, ČR)
- Hydrogenuhličitan amonný (Lachema, Neratovice, ČR)
- Hydroxid sodný (Penta, Chrudim, ČR)
- Chlorid draselný (Penta, Chrudim, ČR)
- Chlorid sodný (Lach:ner, Neratovice, ČR)
- Jodacetamid (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) - v textu uváděn pod zkratkou IAA
- Koloidní zlato (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)
- Konjugát - anti-human IgG (whole molecule) – Peroxidase, antibody produced in goat – A8667 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Kyselina citronová bezvodá (Fluka, Buchs, Švýcarsko)
- Kyselina mravenčí (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Kyselina octová 99% (Lach:ner, Neratovice, ČR)
- Metanol (Lach:ner, Neratovice, ČR)
- Micro BCA™ Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)
- Minerální olej (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)
- Močovina (Lach:ner, Neratovice, ČR)
- Standard molekulových hmotností (10 – 250 kDa) Precision Plus Protein Unstained Standards (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)
- Standard molekulových hmotností (10 – 250 kDa) Precision Plus Protein Dual Color Standards (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)
- N,N'-metylen-bis-akrylamid (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Odtučněné sušené mléko (Aditiva CZ, Praha, ČR)
- Persíran amonný (Lachema, Neratovice, ČR)
- Ponceau S (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Síran železnatý (Lachema, Neratovice, ČR)
- Směs amfolytů Pharmalyte™ pH 3 – 10 pro IEF (GE Healthcare, Uppsala, Švédsko)
- Směs amfolytů Pharmalyte™ pH 8 – 10,5 pro IEF (GE Healthcare, Uppsala, Švédsko)
- Substrát pro imunodetekci Clarity Western ECL Substrate (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)

- TEMED (N,N,N',N'-tetramethylethyldiamin) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- TGX Stain-Free™ FastCast™ Acrylamide Solutions (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)
- Thiomočovina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Thiosulfát sodný (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, US)
- Trifluoroctová kyselina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Tris(hydroxymethyl)aminometan (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) - v textu uváděn pod zkratkou Tris
- Triton X-100 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Modifikovaný trypsin pro sekvenování (Promega, Madison, WI, USA)
- Tween 20 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- $\alpha$ -kyano-4-hydroxyskořicová kyselina (Honeywell Fluka, New Jersey, USA)
- $\beta$ -merkaptóetanol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

### 2.3 Vzorky a buněčné linie

#### Použité lidské nádorové buněčné linie:

##### Adherentní:

- SKBR3           pocházející z epiteliálních buněk adenokarcinomu prsu
- A549           pocházející z epiteliálních buněk karcinomu plic

##### Suspenzní:

- Raji           pocházející z B-lymfocytů izolovaných u pacienta s Burkittovým lymfomem
- HEL 92.1.7   pocházející z erytroblastů izolovaných od pacienta s erytroleukémií
- RPMI           pocházející z B-lymfocytů izolovaných od pacienta s mnohočetným myelomem

#### Použitá séra:

Použili jsme 9 sér od pacientů s MM s paraproteinem třídy IgG. Věkový medián pacientů je 66 let, všichni jsou ve fázi dlouhodobé kompletní remise a již se u nich paraprotein v séru nevyskytuje.

Séra pro negativní kontrolu byla získána od 8 dárců, kteří nemají žádné nádorové ani autoimunitní onemocnění. Medián dárců je 66,5 let. Séra byla použita jako směsný vzorek, ve kterém jsou séra zastoupena stejným objemem.

## 2.4 Příprava buněčného lyzátu

### Roztoky:

- Lyzační pufr (RIPA) pro 1D elektroforetickou separaci:
  - 50 mM Tris-HCl pH 7,4
  - 1% Triton X-100
  - 0,1% SDS
  - 150 mM NaCl
  - 2 mM EDTA
- Lyzační pufr pro 2D elektroforetickou separaci:
  - 7 M močovina
  - 2 M thiomočovina
  - 4% CHAPS
  - 1 % DTT
  - 0,2 % Pharmalyte (3-10)
  - 1 mM PMSF

### Příprava buněčného lyzátu pro 1D elektroforetickou separaci:

K peletě, která obsahuje  $5 \times 10^6$  buněk a byla vyjmuta z mrazáku s teplotou  $-80^{\circ}\text{C}$ , je přidáno 400 $\mu\text{l}$  lyzačního pufru RIPA a poté roztok PMSF, tak aby jeho výsledná koncentrace byla 1 mM. Vše je promícháno a přeneseno do mikrozkuhavky. Po opětovném promíchání jsou buňky v lyzačním pufru asi 30 s sonikovány, a tak dojde k jejich rozrušení. Následně jsou rozrušené buňky centrifugovány 10 minut při otáčkách 10 000 g. Poté je roztok s proteiny odpipetován od pelety do nové mikrozkuhavky. Během jednotlivých kroků je mikrozkuhavka s buňkami uložena v boxu s ledem.

### Příprava buněčného lyzátu pro 2D elektroforetickou separaci:

Čerstvě připravený buněčný lyzační pufr pro 2D elektroforézu (400  $\mu\text{l}$ ) je přidán k peletě vybrané buněčné linie ( $5 \times 10^6$  buněk), která byla zmrazena na  $-80^{\circ}\text{C}$ . Následující postup promíchání a sonikace je obdobný jako pro přípravu buněčného lyzátu na 1D elektroforézu.

## 2.5 Metody stanovení koncentrace proteinů

### 2.5.1 Bicinchoninová metoda pro stanovení koncentrace proteinů

#### Roztoky:

- Standard (zásobní roztok): 7,5 mM BSA
- Kalibrační řada (Tab. 6)
- Pracovní roztok: Micro BCA™ Protein Assay Kit
  - o reagentie MA : MB : MC (25 : 24 : 1)

#### Postup:

Do mikrotitrační destičky jsou nejprve v dubletu napipetovány jednotlivé body kalibrační řady (150 µl/ jamku) dle tabulky 6. Poté je do jamek, kde budou slepé vzorky (blanky), napipetováno 149 µl nebo 148 µl ddH<sub>2</sub>O. Do těchto jamek jsou následně přidány 1 či 2 µl vzorku, ke slepým vzorkům 1 či 2 µl lyzačního pufru, tak aby výsledný objem v jamce byl 150 µl. K takto napipetovaným vzorkům, slepým vzorkům a kalibrační řadě je přidáno 150 µl pracovního roztoku/jamku a dobře promícháno. Mikrotitrační destička je následně 2 hodiny inkubována při 37°C a poté proměřena na spektrometru při 562 nm.

**Tabulka 6:** Kalibrační řada - ředění

č.	Výsledná koncentrace (µg/ml)	Objem zásobního roztoku (µl)	Objem ddH <sub>2</sub> O (µl)
1.	0	0	500
2.	1	1	499
3.	2	2	498
4.	5	5	495
5.	10	10	490
6.	20	20	480
7.	40	40	460
8.	60	60	440
9.	80	80	420
10.	100	100	400

### 2.5.2 Stanovení koncentrace proteinů dle Bradfordové

#### Roztoky:

- Standard (zásobní roztok): 7,5 mM BSA
- Kalibrační řada (Tab. 6)
- Bradfordovo činidlo



### Postup:

Obdobně jako u Bicinchoninové metody, je do mikrotitrační destičky v dubletu napipetováno 150 µl/jamka od každého ředění kalibrační řady. Stejným způsobem jsou nadávkovány vzorky i slepé vzorky. K 150 µl v každé jamce je přidáno 150 µl Bradfordova činidla. Následně jsou napipetované směsi 10 minut inkubovány při laboratorní teplotě a poté proměřeny na spektrometru při 595 nm.

## **2.6 Polyakrylamidová gelová elektroforetická separace v prostředí SDS**

### Roztoky:

- Roztok A: 30% směs akrylamidu a N,N'-metylenbisakrylamidu
- Roztok B: 1,5 M Tris-HCl pufr, pH 8,8
- Roztok C: 1 M Tris-HCl pufr, pH 6,8
- Roztok D: 10% roztok SDS (dodecylsulfát sodný)
- Roztok E: 10% roztok persíranu amonného
- TEMED
- Elektrodový pufr: 0,025 M Tris, 0,192 M glycin, 0,1% SDS
- Laemliho vzorkový pufr s merkaptoetanolom (poměr 9:1)

### Postup:

Příslušná skla pro vytvoření gelů o tloušťce 0,75 mm či 1 mm je nutné nejprve očistit lihem. Poté je třeba sestavit aparaturu tak, aby skla v držáku byla správně vložena a zajištěna ve stojanu, ve kterém probíhá nalévání a polymerace gelů.

Směs pro dělicí gel (Tab. 7) vznikne smícháním vody a roztoků A, B, D, jako poslední jsou do směsi přidány roztok E (persíran amonný) a TEMED, protože po jejich aplikaci je zahájena polymerace. Tato směs pro dělicí gel se po promíchání opatrně nanáší mezi skla. Polymerující dělicí gel je třeba převrstvit vodou či butanolem protože vzdušný kyslík polymeraci inhibuje. Gely se nechají tuhnout asi 20 minut. Po uplynutí potřebného časového intervalu jsou voda či butanol odsáty filtračními papíry a je možné aplikovat druhou vrstvu gelu. Směs zaostřovacího gelu je připravena z vody a roztoků A, C, D, TEMED a jako poslední je přidán roztok E. Po zamíchání směsi a její aplikaci mezi skla až po okraj je rychle vložena vhodná šablona. Polymerace trvá asi 20 minut. Po ztuhnutí zaostřovacího gelu jsou skla s gelem opatrně vyjmuta ze stojanu i držáku, upevněna do stojanu s elektrodami a přenesena do elektrodové vany. Zde je gel zalit elektrodovým pufrem, a po vyjmutí šablony jsou jamky opatrně pufrem promyty. V této fázi je gel připravený na aplikaci vzorků. Kvůli

redukci disulfidických můstků je nejprve Laemmliho vzorkový pufr smíchán s  $\beta$ -mercaptoetanolem tak, aby konečná koncentrace přidávaného  $\beta$ -mercaptoetanolu byla 355 mM (poměr 1 : 9). Poté je pufr přidán ke vzorkům, tak aby byl výsledný poměr vzorku a pufru 3:1. Takto připravené vzorky jsou promíchány a vloženy do termobloku, který je nastaven na 100°C, kde se 3 minuty povaří k dokončení denaturace proteinů.

Na gel je následně aplikováno 10 či 15  $\mu$ l vhodně naředěného vzorku (obsahuje 10 a 15  $\mu$ g celkového proteinu) smíchaného se vzorkovým pufrům a 4  $\mu$ l standardu molekulových hmotností. Po nadávkování je vana uzavřena víkem a připojena ke zdroji, kde je nastaveno konstantní napětí 180 V a proud 30 mA/na gel. Přibližná doba separace proteinovou elektroforézou je asi 50 minut.

**Tabulka 7:** Příprava polyakrylamidového gelu

	<b>12% dělicí gel</b>	<b>5% zaostřovací gel</b>
<b>destilovaná voda</b>	1,68 ml	1,4 ml
<b>roztok A</b>	2,0 ml	0,330 ml
<b>roztok B</b>	1,25 ml	x
<b>roztok C</b>	x	0,250 ml
<b>roztok D</b>	0,05 ml	0,02 ml
<b>roztok E</b>	0,05 ml	0,02 ml
<b>TEMED</b>	0,002 ml	0,002 ml

## 2.7 Dvourozměrná elektroforetická separace

### Roztoky:

- RTS-D rehydratační roztok:
  - o 6 M močovina
  - o 2 M thiomčovina
  - o 4% CHAPS
  - o 40 mM Tris
  - o 1,2% DeStreak
  - o 10  $\mu$ l zásobního roztoku 1% bromfenolové modře
- Ekvilibrační roztok:
  - o 6M močovina
  - o 30% glycerol
  - o 0,07M SDS
  - o 3,34% 1,5 M Tris, pH 8,8
- 0,5% agaróza v elektrodovém pufru s bromfenolovou modří

### Pomůcky:

- filtrační papírky Protean IEF systém-Electrode wicks (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)

### Postup:

**1. den:** Sedmicentimetrové stripy s pH rozmezím od 3 do 10 je třeba nejprve rehydratovat. Na dno plastové nádoby je naneseo 140  $\mu$ l směsi, která vznikla smícháním buněčného lyzátu a rehydratačního roztoku 3 : 4 a také přidavkem dvou roztoků Pharmalytů o pH 3-10 (1,3  $\mu$ l) a pH 8-10,5 (0,65  $\mu$ l). Na nadávkovaný roztok je opatrně položen gelem dolů strip tak, aby pod ním nezůstaly bublinky. Následně je převrstven minerálním olejem. Stripy jsou nechány hydratovat asi 18 hodin při teplotě 20°C.

**2. den:** Po noční hydrataci je strip opláchnut, osušen a přes namočené filtrační papírky položen na elektrody ve správné pólové orientaci. Poté je převrstven minerálním olejem vložen do přístroje, ve kterém probíhá isoelektrická fokusace při nastavení dle tabulky 8. Doba separace je asi 8 hodin, během jednotlivých kroků by hodnota proudu na jednotlivých stripech neměla přesáhnout 90  $\mu$ A, ideální je asi 50  $\mu$ A. K ukončení IEF může dojít, až hodnota volthodin na přístroji dosáhne rozmezí 9 000 – 10 000 Vh. Poté je strip opláchnut, osušen a pro uchování zamrazen.

**3. den:** Po vyndání z mrazáku je IPG strip ekvilibrován nejprve 15 minut v 1% DTT v ekvilibračním roztoku na třepačce, poté je opláchnut a osušen. Dalších 15 minut je strip ekvilibrován na třepačce ve tmě v 4% IAA (s ekvilibračním roztokem). Mezitím jsou připravena skla s 1 mm tloušťkou pro gel. Je připraven 12% dělicí gel (Tab. 6), který je převrstven butanolem. Po proběhnuté polymeraci je butanol odsát filtračním papírem a převrstven 5% zaostřovacím gelem, do něhož je zasunuta šablona pro 2D-elektroforézu. Po ztuhnutí jsou skla s gelem vložena do stojanu, přenesena do elektroforetické vany a zalita elektrodovým pufrem. Šablona je opatrně vyjmuta a gel propláchnut. Následně je pipetou odsát elektrodový pufr z prostoru mezi gely až pod krycí skla. IPG stripy jsou opláchnuty, osušeny a zasunuty mezi skla gelem ke kratší straně. Kovovými kopisty je strip zasunut až ke gelu, tak aby mezi stripem a gelem nezůstala žádná bublinka a (+) konec stripu byl v levém rohu, hned vedle jamky pro standard molekulových hmotností. Filtračními papíry je opatrně odsát pufr nad stripem a poté je prostor zalit 0,5% agarózou s bromfenolovou modří. Jako poslední je nadávkován standard molekulových hmotností. Poté je již elektroforetická vana uzavřena a připojena ke zdroji napětí. Prvních 5-10 minut probíhá separace při napětí 60 V. Poté je hodnota napětí zvýšena na 180 V, proud je nastaven 30 mA na gel. Separace proteinů

probíhá přibližně hodinu. Po proběhnutí elektroforetické separace jsou skla s gely vyjmuty z aparatury a je možné je barvit či přebíjet na membránu.

**Tabulka 8:** Nastavení IEF

Krok	Celkové napětí	Čas/ doba
č. 1	150 V	2 h
č. 2	300 V	1 h
č. 3	900 V	1 h
č. 4	2 100 V	1h 20 min
č. 5	3 500 V	1 h
č. 6	3500 V	1 h
č. 7	3 500 V	4 500 Vh

## 2.8 Vizualizace proteinů pomocí UV záření

Akrylamidový gel TGX Stain Free je oproti klasickému gelu pro SDS-PAGE připraven rychleji. Jednodušší příprava je možná díky komerčním roztokům, které se pouze smíchají dle tabulky 9 a nalijí mezi skla. Po proběhnutí elektroforézy je třeba gely vložit do stanice a dle manuálu výrobce UV zářením aktivovat reakci tryptofanů v proteinu s trihalokompozitami. Poté lze proteiny vyfotografovat. I v případě následného transferu je možný UV průkaz proteinů pomocí stanice.

**Tabulka 9:** Příprava TGX Stain Free gelů

	Dělicí gel/ 1 gel	Zaostřovací gel/ 1 gel
R roztok A1	2 ml	-
R roztok B1	2 ml	-
Stacker A2	-	1 ml
Stacker B2	-	1 ml
TEMED	2 $\mu$ l	2 $\mu$ l
10% persíran amonný	20 $\mu$ l	10 $\mu$ l

## 2.9 Vizualizace proteinů na gelu po elektroforetické separaci

Po proběhnutí gelové elektroforézy je třeba proteiny vizualizovat. Lze použít různé metody barvení gelů – barviva, kovové ionty či fluorescenčními barvivy. Metoda je volena dle druhu vazby, citlivosti průkazu proteinů či dle následujícího použití, například kompatibility s hmotnostní spektrometrií.

## 2.9.1 Barvení gelů Coomassie Brilliant Blue

### Roztoky:

- Fixační roztok: 5% kyselina octová + 50% etanol
- roztok Bio-Safe Coomassie G- 250

### Postup:

Po proběhnutí elektroforetické separace je gel vyjmut z aparatury a přenesen do nádoby, kde je nejprve 30 minut fixován roztokem 5% kyseliny octové a 50% etanolu. Poté je dvakrát po 15 minutách promýván v destilované vodě. Na tento krok navazuje již samotné barvení roztokem Bio-Safe Coomassie G- 250. Inkubace probíhá v asi 30 ml roztoku, množství se však odvíjí od velikosti nádoby, barvení probíhá minimálně 30 minut. Dle vizuálního hodnocení následuje několikrát opakované odbarvování destilovanou vodou.

## 2.9.2 Barvení gelů dusičnanem stříbrným

### Roztoky:

- Fixační roztok: 5% kyselina octová + 50% etanol
- 10% roztok glutaraldehydu
- Vyvolávací roztok: 0,05% kyselina citronová + 0,05% formaldehyd
- Ustalovací roztok: 5% kyselina octová
- Roztok amoniakálního stříbra: 20% vodný roztok dusičnanu stříbrného je postupně přikapáván ke směsi destilované vody (21 ml), vodného roztoku amoniaku (1,4 ml) a 9 M hydroxidu sodného (239  $\mu$ l) až do doby vzniku světle béžově-hnědého zákalu. Poté je roztok doplněn na 100 ml destilovanou vodou. Toto množství vystačí pro barvení 3-4 gelů. Roztok je připravován těsně před použitím.

### Postup:

Po dokončené elektroforetické separaci je gel vložen do nádoby a propláchnut destilovanou vodou. Následně je přidán fixační roztok a přenesen na třepačku, kde je gel hodinu fixován. Variantou tohoto zkráceného kroku je fixace přes noc při 4°C. Po hodině (či noci) je gel 30 minut na třepačce rehydratován v destilované vodě, poté probíhá 30minutová inkubace s 10% glutaraldehydem. Na tento krok navazuje 10 minutové promývání destilovanou vodou, které se 6x opakuje. Po této fázi je aplikován roztok amoniakálního stříbra, inkubace trvá 14 minut. Následuje rychlé opláchnutí destilovanou vodou a aplikace vyvolávacího roztoku, kdy za mírného třepání dochází k postupné vizualizaci proteinů na

gelu. Když barvení dosáhne požadované intenzity, je vyvolávání ukončeno slitím roztoku a přidáním ustalovacího roztoku, ve kterém je při 4°C gel možné i skladovat.

## 2.10 Semi-dry Western blot s následnou imunodetekcí

### Roztoky a reagensie:

- PBS-T, pH 7,4
  - o 137 mM NaCl
  - o 2,7 mM KCl
  - o 1,47 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>
  - o 8,1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12H<sub>2</sub>O
  - o 0,1% Tween
- Blokovací roztok: 5% sušené odtučněné mléko v PBS-T
- Ředící roztok pro primární protilátku a konjugát: blokovací roztok
- Transferový roztok (Towbin):
  - o 25 mM Tris
  - o 192 mM glycin
  - o 20% metanol
- Primární protilátka: patientské sérum či NK (ředění 1 : 500)
- Konjugát: anti-human IgG (ředění 1 : 5 000)
- Substrát: Clarity Western ECL Substrate

### Postup:

Protokol semi-dry western blotu přímo navazuje na proteinovou elektroforézu 1D či 2D. Vzhledem k návaznosti je vhodné již při elektroforetické separaci provést dvě drobné změny. První je změna standardu molekulových hmotností, po pozdější snazší manipulaci je používán barevný standard molekulových hmotností Dual Color. Druhou změnou je prodloužení času, po který elektroforetická separace probíhá, a to tak, aby barvivo, které je přidáno do vzorkového pufru a tvoří vedoucí linii, opustilo gel. Tímto krokem se předejde rušení při pozdějším barvení a imunodetekci.

**1. den:** Po proběhnutí elektroforetické separace je gel vyjmut z aparatury, opláchnut destilovanou vodou a vložen do transferového roztoku. Do transferového roztoku jsou také namočeny tlusté filtrační papíry a také membrány (NC/PVDF), ustřižené pro správnou velikost dle šablony. V případě PVDF, je membrána nejprve ponořena do metanolu, aby byla lépe smáčitelná v transferovém pufru.

Víko aparatury pro semi-dry WB je třeba odklopit a odstranit vrchní elektrodu - katodu. Na spodní elektrodu – anodu, je nejprve vložen mokrý silný filtrační papír, který je uhlazen pomocí válečku, tím dojde k vytlačení případných vzduchových bublin. Následně je filtrační papír překryt membránou a na ni je přenesen gel, který je také uhlazen válečkem. Vše je zakryto druhým silným filtračním papírem smočeným v transferovém roztoku a opět uhlazeno. Veškeré potřebné komponenty jsou postupně vrstveny, tak aby žádná nepřesahovala přes okraj prvního filtračního papíru. Poté jsou vráceny zpět vrchní elektroda a kryt aparatury. Po připojení ke zdroji napětí probíhá transfer po dobu jedné hodiny při napětí 12V a 0,3 A/ na gel. Během transferu je připraven blokovací roztok (cca 50 ml/membránu), do kterého je membrána po dokončení transferu přesunuta a je v něm hodinu promíchávána na třepačce. Po okapání membrány je membrána inkubována s primární protilátkou (ředěná blokovacím roztokem) do druhého dne na rotátoru při 4°C.

**2. den:** Po noční inkubaci je membrána 4x po 5 minutách promývána PBS-T pufrem a následně hodinu inkubována s konjugátem na rotátoru. Poté je 6x po 5 minutách promývána po roztokem PBS-T. Během promytí je připravena čtvercová nádoba s parafilmem, na který je následně membrána po lehkém osušení přenesena. Poté je membrána převrstvena 3 ml substrátu (smíchaného 1:1) a 5 minut inkubována. Po osušení je membrána vložena do fotografovací stanice a jsou pořízeny snímky.

### **2.10.1 Opakovaná imunodetekce na membráně**

Aby bylo možné membránu použít pro imunodetekci opakovaně, je třeba z ní odstranit navázané protilátky.

#### Roztoky:

- 100mM glycin-HCl pufr, pH 2,6
- PBS-T, pufr pH 7,4

#### Postup:

Membrána je 30 minut na třepačce inkubována v glycinovém pufru, aby došlo k odstranění navázaných protilátek. Následně je 2 x 10 minut promývána v PBS-T pufru. Poté je hodinu blokována v 5% roztoku odtučněného mléka a poté další hodinu inkubována s primární protilátkou při laboratorní teplotě. Po tomto kroku protokol navazuje na 2. pracovní den protokolu imunodetekce u Western blotu (3.10.)

## **2.11 Vizualizace proteinů na membráně po Western blotu**

### **2.11.1 Barvení koloidním zlatem**

#### Roztok:

- Barvicí roztok koloidního zlata (komerční)
- TBS-T, pH = 7,5
  - o 20 mM Tris
  - o 500 mM NaCl
  - o 0,3% Tween

#### Postup:

Po proběhnutí Western blotu je membrána 3x po 10 minutách promyta v TBS-T pufru. Následuje promývání v redestilované vodě po dobu 3x 10 minut. Po hodinové inkubaci v roztoku koloidního zlata je membrána 3x 2 minuty promývána redestilovanou vodou.

### **2.11.2 Barvení Ponceau S**

#### Roztok:

- Barvicí roztok Ponceau S:
  - o 0,1% Ponceau S
  - o 5% kyselina octová

#### Postup:

Membrána je po transferu 3x 20 minut promývána redestilovanou vodou. Následuje 30minutová inkubace s roztokem Ponceau S, poté je dle vizuálního hodnocení několik minut odbarvována redestilovanou vodou.

### **2.11.3 Barvení koloidním stříbrem**

#### Roztok:

- Barvicí roztok koloidního stříbra:
  - o 40% citrát sodný
  - o 20% síran železnatý
  - o 20% dusičnan stříbrný
- Odbarvovací roztok:
  - o 50 mM thiosulfát sodný
  - o 15 mM hexakyanoželezitan draselný

Nejprve je membrána promyta destilovanou vodou 3x po 5 minutách. Poté je vložena do roztoku koloidního stříbra a inkubována asi 10 minut. Po oplachu destilovanou vodou je



vyfocena. Následně je membrána promíchávána v odbarvovacím roztoku, až je barva zcela vymytá. Následně je membrána důkladně promyta (3x 5 minutí) destilovanou vodou.

#### **2.11.4 Barvení Coomassie Brilliant Blue**

##### Roztoky:

- roztok Bio-Safe Coomassie G- 250
- Odbarvovací roztok
  - o pro PVDF membránu: 16,7% kyselina octová + 50 % metanol
  - o pro NC membránu: 5% kyselina octová + 50% etanol

##### Postup:

Po imunodetekci je membrána promyta 3x 5 minut destilovanou vodou. Inkubace s Coomassie Brilliant Blue probíhá následujících 25 minut, po kterých je membrána 40 minut odbarvována.

#### **2.11.5 Barvení amidočerní**

##### Roztoky:

- 0,1% roztok amidočerně
- Odbarvovací roztok: 16,7% kyselina octová + 50% metanol

##### Postup:

Membránu je po dokončené imunodetekci nutné 3x po 5 minutích promýt destilovanou vodou. Poté je 5-10 minut inkubována s 0,1% vodným roztokem amidočerní a nakonec je 5 – 7 minut odbarvována, aby došlo k odmytí barvy z pozadí.

#### **2.12 Štěpení proteinů v gelu**

##### Roztoky:

- 100 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$
- 10 mM DTT v 100 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$
- 55 mM IAA v 100 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$
- 100% acetonitril
- 0,1% kyselina trifluoroctová
- odbarvovací roztok: 50% acetonitril + 50 mM 100 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$
- extrakční roztok: 60% acetonitril + 2% kyselina mravenčí
- roztok trypsinu: 10 ng/ $\mu\text{l}$  trypsinu v 10 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  s obsahem 10% acetonitrilu

### Postup:

**1. den:** Z obarveného 2D gelu je skalpelem vyříznuta skvrna, tedy část gelu vybrána pro analýzu, která obsahuje zkoumaný protein. Poté je gel přenesen do mikrozkuřavky a v případě většího kusu rozdrcen na menší části. K takto připravenému gelu je přidáno 100  $\mu$ l odbarvovacího roztoku a asi 30 minut je s roztokem inkubován. Pokud po inkubaci nedojde k odbarvení gelu, postup se opakuje. Následně je do mikrozkuřavky přidáno 500  $\mu$ l 100% acetonitrilu a gel je inkubován tak dlouho, doku není zcela bílý. Zbylý roztok je odsán a místo něj je ke vzorku přidán 10 mM DTT 40  $\mu$ l. Mikrozkuřavka je přenesena do vyhříváné třepačky, kde probíhá 30 minut inkubace při 60°C. Poté je opět přidáno 500  $\mu$ l 100% acetonitrilu a gel je v roztoku inkubován, dokud nezbělá. Roztok je odsát a nahrazen 55 mM IAA 40  $\mu$ l. Následuje 30minutová inkubace v temnu ve třepačce při laboratorní teplotě. Dalším krokem je přidání 100% acetonitrilu (500  $\mu$ l), se kterým je gel inkubován, dokud není zcela bílý, poté je roztok odsát. Takto připravený gel je následně 30 minut v lednici či na ledu inkubován s 20  $\mu$ l roztoku trypsinu, aby se do gelu trypsin nasál. V případě, že by po uplynutí doby inkubace nebyl gel zcela ponořen v roztoku, je krok opakován. Poté, co je přidáno 5  $\mu$ l 100 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ , jsou mikrozkuřavky uloženy ve vyhříváné třepačce při 37°C přes noc.

**2. den:** Po nočním naštěpení je odebrán roztok s proteiny do nových mikrozkuřavek. Poté jsou k němu přidány 3  $\mu$ l 5% trifluoroctové kyseliny (TFA), aby došlo k okyselení vzorku, následně již může být zpracován pro analýzu pomocí MS.

Gel v původní mikrozkuřavce je 15 minut při 37°C inkubován s 50  $\mu$ l extrakčního roztoku ve vyhříváné třepačce. Extrahované peptidy z gelu se vysuší na koncentrátoru a poté jsou okyseleny přířavkem 15  $\mu$ l 0,1% TFA. V této fázi již mohou být vzorky připravovány k MS analýze.

## **2.13 Odsolení vzorků pomocí mikrokolonek a přímé nanesení vzorku na MALDI destičku**

### Roztoky:

- 0,1% kyselina trifluoroctová
- 80% acetonitril v 0,1% TFA
- 100% acetonitril
- roztok matrice: kyselina skořicová 3mg/ml v 60% acetonitrilu/0,1% TFA
- zásobní roztok POROS Oligo R3 fáze

### Postup:

Nejprve je třeba vyrobit kolonku. Konec GELoader špičky je opatrně stlačen tak, aby byl plochý a nedocházelo k uvolňování fáze. Do takto připravené špičky je napipetováno 12  $\mu$ l zásobního roztoku POROS Oligo R3 fáze, která je následně protlačena skrz připravený GELoader. Pokud je špička správně stlačená, fáze se zachytí a usadí se po délce asi 1,5 cm nad koncem špičky. V případě krátkého úseku fáze, musí být přidána další.

Takto připravená kolonka je promyta 10  $\mu$ l 80% acetonitrilu/0,1% TFA tak, že je roztok napipetován do GELoaderu a protlačen skrz. Následně je kolonka promyta 15  $\mu$ l 0,1% TFA, asi posledních 5  $\mu$ l je ponecháno nad fází, aby nevysychala. Poté je již dávkováno 25  $\mu$ l okyseleného vzorku a opatrně protlačeno skrz. Vzorek, který se v kolonce nenavázal, je odmyt 15  $\mu$ l 0,1% TFA. Eluce navázaného vzorku prostřednictvím 1,5  $\mu$ l roztoku matrice probíhá přímo na MALDI destičku, na kterou je protlačena skrz fází. Po pozvolném zaschnutí roztoku na destičce je vzorek připraven k MALDI-MS analýze.

### **2.14 MS analýza (provedena pracovníkem katedry)**

Analýza vzorků připravených podle postupu uvedeného v kapitole 2.13 byla provedena na hmotnostním spektrometru LTQ Orbitrap XL s MALDI ionizací. Měření probíhalo v pozitivním módu při rozlišení 60000 (FWHM pro  $m/z$  400). Získaná data byla následně exportována pomocí softwaru Thermo Xcalibur (v2.1.0; Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) a píky extrahovány v softwaru mMass (v5.5.0). Takto získána data porovnána metodou peptidového mapování s využitím nástroje MS-Fit (ProteinProspector v5.22.0) proti databázi Swiss-Prot (z data 2017/11/01) pro organismus Homo sapiens. Databázové vyhledávání v MS-Fit bylo provedeno s užitím trypsinu jako proteolytického enzymu s jedním možným vynechaným štěpením, peptidová hmotnostní tolerance byla nastavena na  $\pm 10$  ppm. Jako povolená fixní modifikace byla nastavena karbamidomethylace cysteinu. Jako variabilní, acetylace na N-konci proteinu, kyselina glutamová na pyroglutamovou na N-konci peptidu a oxidace methioninu. Výsledky byly následně manuálně verifikovány.

## **3 Výsledky a diskuze**

### **3.1 Optimalizace barvení a výběr membrán**

Pro práci při blotování proteinů byly používány dva druhy membrán – nitrocelulózová a polyvinylidendifluoridová membrána. Kvůli své vysoké afinitě k proteinům a kompatibilitě s řadou metod je nitrocelulózová často používanou membránou. Proteiny se na ni váží prostřednictvím hydrofóbních vazeb. PVDF membrána během transferu velmi dobře váže proteiny díky hydrofóbním a dipólovým interakcím, současně má i o něco vyšší vazebnou kapacitu než NC. PVDF také snižuje nespecifické vazby bílkovin. Obě membrány jsou vhodné pro chemiluminiscenční a kolorimetrické průkazy.

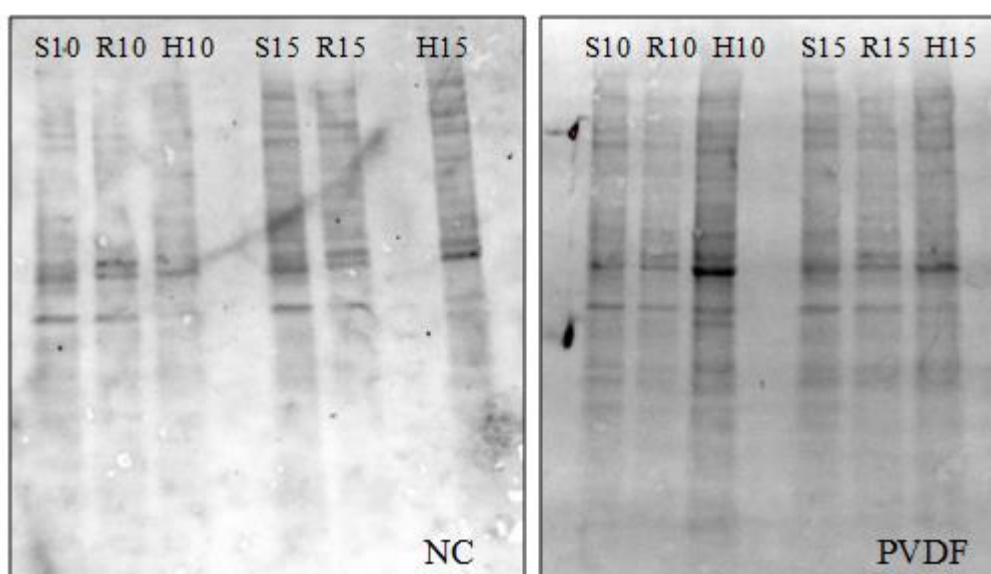
Množství celkového proteinu ve vzorcích nanášených na gel a následně přebloťovaných na membránu bylo vždy 10 a 15  $\mu\text{g}$ . Na obou typech membrán byly vyzkoušeny různé způsoby vizualizace proteinů s důrazem na imunodetekci, které byla dle protokolu pro barvení provedena před či po imunodetekci proteinů. Membrány se zachycenými proteiny, které byly separované jednorozměrnou elektroforézou, byly barveny různými technikami. Cílem optimalizace bylo vybrat nejvhodnější metodu barvení pro vizualizaci proteinů a membránu, na které bude probíhat.

Testovány byly tyto barvicí techniky: průkaz proteinů pomocí UV záření na TGX Stain free gelech, barvení Coomassie Brilliant Blue, koloidním zlatem, Ponceau S, anidočerní a koloidním stříbrem.

#### **3.1.1 Vizualizace proteinů pomocí UV záření**

První použitou zobrazovací technikou pro optimalizaci byla UV detekce na gelech TGX Stain free. Na tyto gely byly aplikovány proteinové vzorky třech buněčných linií: SKBR3, Raji a HEL 92.1.7. Gely a později i membrány byly aktivovány v 1 a 5 minutovém nastavení, po kterém probíhal průkaz proteinů. UV detekce na TGX Stain free gelech je jednoduchá a rychlá metoda vizualizace, hlavně díky přítomnosti 2, 2, 2-trichloretanolu v roztocích pro přípravu gelu. Jedná se o metodu bez barvení, jejíž princip založen na reakci tryptofanů v proteinu s trihalokompozitami v důsledku působení ultrafialového záření. Touto reakcí vzniknou fluorescenční produkty, které emitují ve viditelném spektru a tak lze proteiny pozorovat na transluminátoru [140].

Je však nutné použít vzorky podobných koncentrací, protože přítomnost vzorků o velmi rozdílné koncentraci výrazně ruší pozdější detekci. Ze stejného důvodu je třeba použít standard molekulových hmotností Unstained Standards místo standardu Dual Color Standards, který bývá aplikován na gel, který je určen pro následný blot proteinů na membránu. Proteiny na gelech byly velmi dobře viditelné. I po následném transferu na oba typy membrán bylo možné proteiny detekovat, ale hůře se fotily (Obr. 9). Vzhledem k problémům s vizualizací proteinů po imunodetekci bylo od této metody ustoupeno. Výsledky detekce jednotlivých použitých buněčných vzorků se výrazně nelišily. Byly proto zanechány jen dva zástupci - jeden pro suspenzní (HEL 92.1.7.) a druhý pro adhezní buňky (SKBR3).



**Obrázek 9:** UV vizualizace – NC a PVDF membrány;

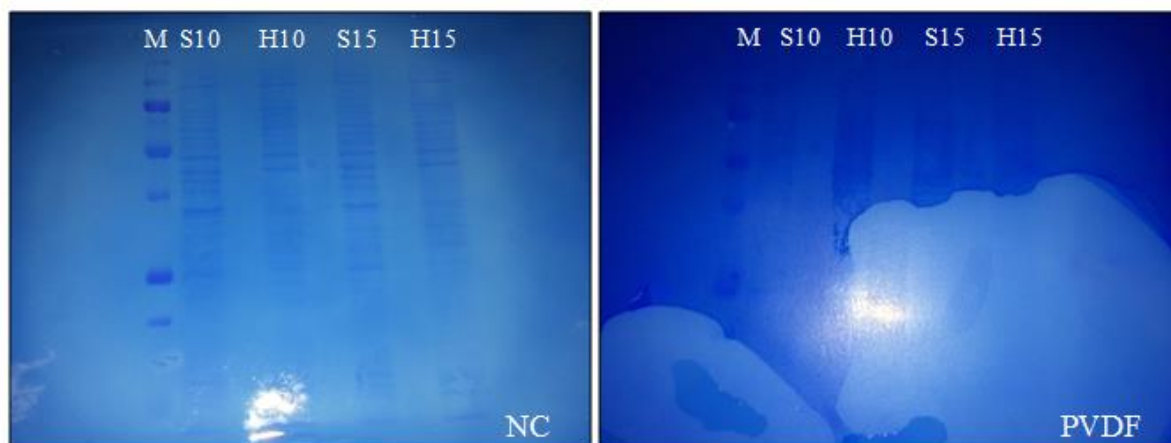
10  $\mu$ g a 15  $\mu$ g: S10 a S15 = buňky SKBR3, R10 a R15 = buňky RAJI,

H10 a H15 = buňky HEL 92.1.7

### 3.1.2 Coomassie Brilliant Blue

Barvení gelů Coomassie Brilliant Blue je jednoduchá a rychlá technika, která umožňuje detekci až 0,2 – 0,6  $\mu$ g proteinů a má výborné výsledky. Coomassie barvivo se váže na proteiny stechiometricky přes své sulfonové skupiny. Probíhá mezi nimi interakce na základě Van der Waalsových a iontových sil, proto se toto barvivo váže na velké množství proteinů [87]. Jeho aplikace na membrány není však nejvhodnější způsob. Po aplikaci barviva na NC i PVDF membránu došlo k výraznému zbarvení pozadí, které nelze odmyt (obr. 10). Proteiny na NC membráně bylo částečně možné detekovat, avšak na PVDF membráně velmi splynuly s pozadím. Imunodetekce po tomto barvení není možná. Proto byl testován druhý protokol

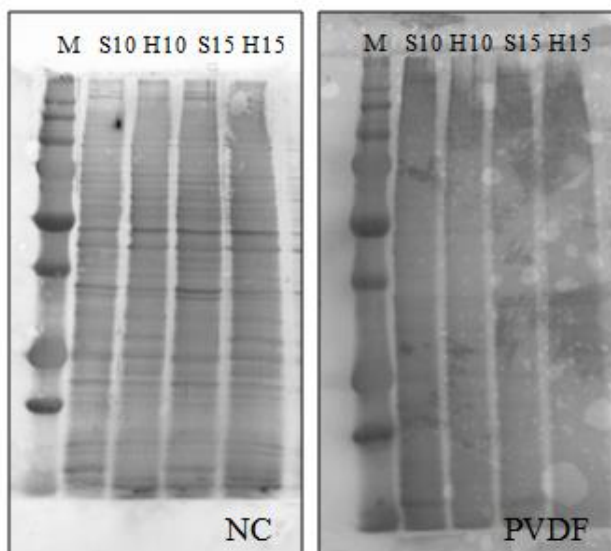
s obráceným postupem, kdy imunodetekce probíhla před barvením. Proteiny na membránách barveny po imunodetekci byly relativně viditelné, ale kvůli silnému pozadí nedosahovaly požadované citlivosti.



**Obrázek 10:** Barvení Coomassie Brilliant Blue – NC a PVDF membrány;  
M – standard molekulových hmotností (10 – 250 kDa), 10  $\mu$ g a 15  $\mu$ g: S10 a S15 = buňky SKBR3, H10 a H15 = buňky HEL 92.1.7

### 3.1.3 Koloidní zlato

Další použitou technikou pro vizualizaci proteinů bylo barvení koloidním zlatem. Dle pokynů výrobce bylo nejprve provedeno barvení a až poté imunodetekce. Proteiny po barvení byly na NC membráně velmi dobře obarvené a viditelné. PVDF membrána se barvila hůře a proužky proteinů nebylo možné snadno rozeznat (obr. 11). Imunodetekce proběhla u obou typů membrán spolehlivě. Toto barvení je velmi citlivé, koloidním zlatem lze detekovat méně než 3 ng proteinu, je však trvalé a membránu nelze odbarvit [141]. U 2D gelů byl testován i obrácený způsob, kdy imunodetekce barvení předcházela.



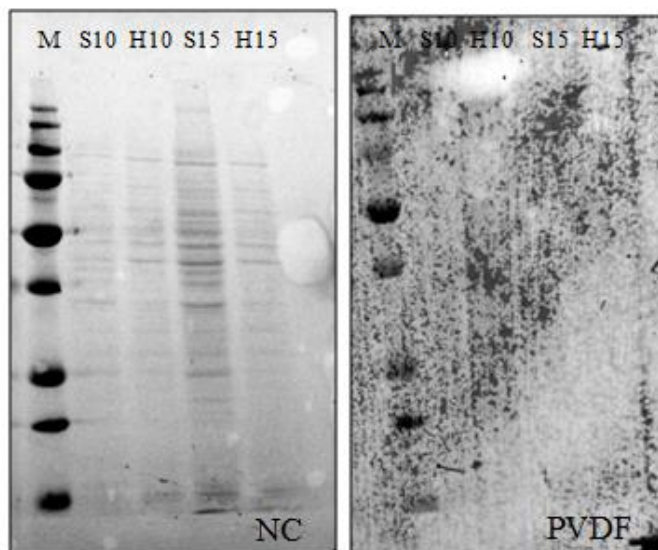
**Obrázek 11:** Barvení koloidním zlatem – NC a PVDF membrány

M – standard molekulových hmotností (10 – 250 kDa), 10  $\mu$ g a 15  $\mu$ g:

S10 a S15 = buňky SKBR3, H10 a H15 = buňky HEL 92.1.7

### 3.1.4 Ponceau S

Roztok Ponceau S pro barvení membrán před imunodetekcí dobře barvil proteinové vzorky s vyšší koncentrací (15  $\mu$ g celkového proteinu ve vzorku) na NC membráně, vzorky s nižší koncentrací byly obarvené slaběji. Z důvodů špatného barvení membrány nebylo možné proteiny, na PVDF membráně barvené Ponceau S, detekovat (obr. 12). Ponceau S je málo citlivé barvivo, které je vhodné pro detekci proteinů s koncentrací nad 1  $\mu$ g. Výhodou tohoto barvení je snadné odmytí barvy vodou [142]. Následná imunodetekce byla naopak od barvení relativně dobře viditelná na obou membránách, jen menší koncentrace byly slabší.



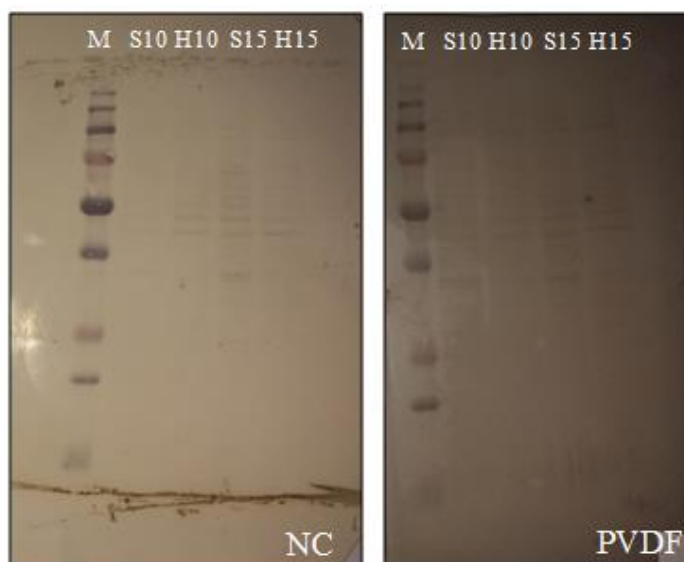
**Obrázek 12:** Barvení Ponceau S – NC a PVDF membrány

M – standard molekulových hmotností (10 – 250 kDa), 10  $\mu$ g a 15  $\mu$ g:

S10 a S15 = buňky SKBR3, H10 a H15 = buňky HEL 92.1.7

### 3.1.5 Amidočerní

Barvení proteinů amidočerní dle protokolů vypadalo velmi nadějně. Jedná se o doporučenou metodu pro rychlé barvení proteinů po blotu [142]. Po imunodetekci byly membrány barveny 0,1 % vodným roztokem amidočerní. Bohužel i po prodloužení časového intervalu barvení, byly proteiny na obou membránách obarveny jen velice slabě (Obr. 13).



**Obrázek 13:** Barvení amidočerní – NC a PVDF membrány

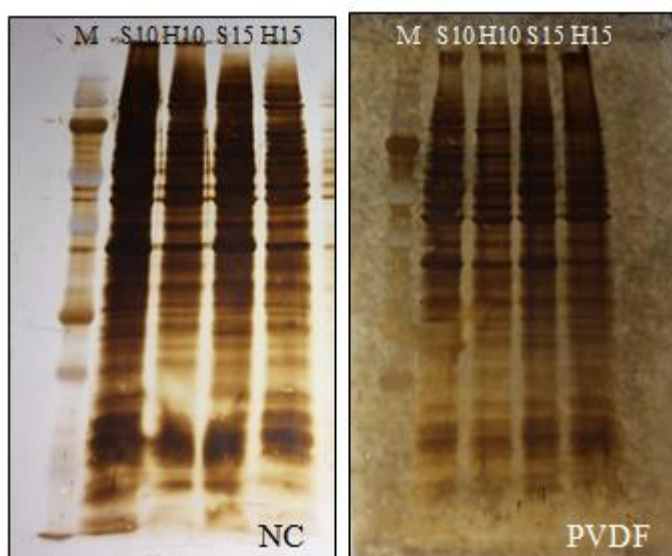
M – standard molekulových hmotností (10 – 250 kDa), 10  $\mu$ g a 15  $\mu$ g:

S10 a S15 = buňky SKBR3, H10 a H15 = buňky HEL 92.1.7



### 3.1.6 Koloidní stříbro

Poslední metodou, která byla testována, bylo barevní koloidním stříbrem [143]. Desetiminutové barvení velmi rychle a citlivě obarvilo proteiny na NC i PVDF membráně. Nejprve byla provedena varianta barvení po imunodetekci. V tomto případě však barvení nebylo zcela ideální. NC membrána byla relativně dobře obarvená, avšak PVDF membrána měla velmi silné pozadí a obarvené proteiny se „slévaly“ (Obr. 14). Proto byla testována varianta barvení před imunodetekcí, která se ukázala být nejlepším řešením. Proteiny se velmi dobře obarvily a odbarvovací roztok dokázal z NC membrány barvení opět smýt. PVDF membrány nebylo odbarvení až tak úspěšné jako u NC.



**Obrázek 14:** Barvení koloidním stříbrem – NC a PVDF membrány

M – standard molekulových hmotností (10 – 250 kDa), 10  $\mu$ g a 15  $\mu$ g:

S10 a S15 = buňky SKBR3, H10 a H15 = buňky HEL 92.1.7

Z barvicích technik bylo nakonec vybráno koloidní stříbro, nejen kvůli své velmi citlivé detekci, ale hlavně možnosti barvení před imunodetekcí. Barvení hned po transferu zaručilo dosažení největší možné citlivosti barvení. Koloidní stříbro je možné zcela odbarvit tak, že membrána je čistě bílá, a tak barvení neovlivňuje imunodetekci. Pro tvorbu 2D gelů byla vybrána nitrocelulósová membrána, která s vybranou barvicí technikou byla více kompatibilní. Koloidní zlato i stříbro použité pro barvení po imunodetekci také splňovaly požadovaná kritéria, avšak detekce proteinů byla v porovnání s koloidním stříbrem před imunodetekcí méně citlivá.

### **3.2 Výběr protokolu pro izoelektrickou fokusaci**

K optimalizaci časového rozložení celého pracovního postupu 2D elektroforetické separace byly pro provedení izoelektrické fokusace porovnávány dva protokoly. První sedmikrokový protokol (asi osmihodinový), je v laboratoři imunochemie KBBV rutinně používán. Druhým nastavením je čtyřkrokový protokol (tři hodinový), který je doporučen od výrobců IPG stripů a je znatelně rychlejší. Stripy s buněčným lyzátem linie A549 byly separovány oběma druhy nastavení, poté bylo provedeno dělení v druhém rozměru, SDS-PAGE, a výsledné gely byly nabarveny Coomassie Brilliant Blue. Při porovnávání gelů bylo patrné, že skvrny separované sedmikrokovým postupem jsou lépe oddělené a zaostřené. Čtyřkrokový postup je rychlejší, ale kvalita výsledných skvrn je horší.

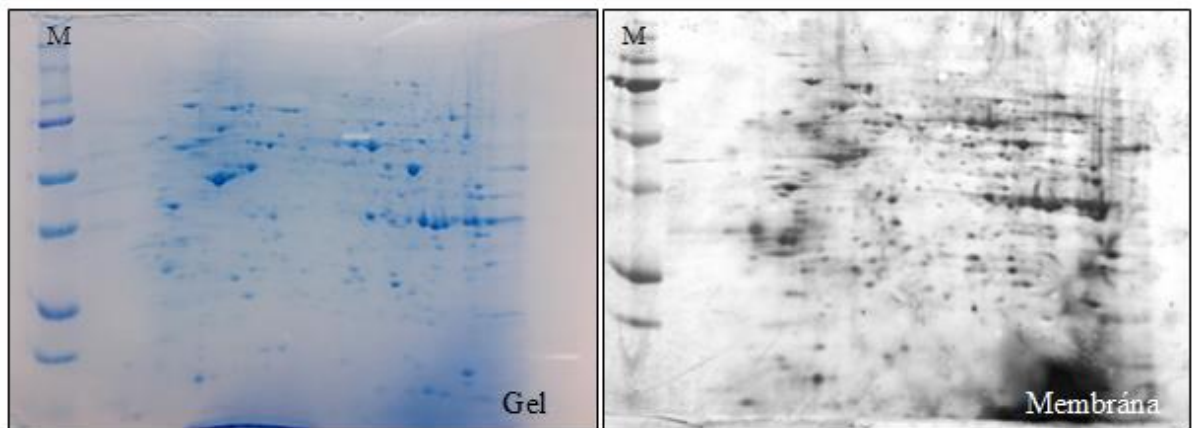
### **3.3 Analýza patientských sér metodou serologické proteomové analýzy**

Pro serologickou proteomovou analýzu s cílem identifikovat reaktivní proteiny v sérech pacientů s MM byly zvoleny dva zástupci buněčných linií A549 odvozená od karcinomu plic a buněčná linie RPMI odvozená od MM. Dvourozměrnou elektroforézou byly buněčné lyzáty separovány za vzniku proteinových map na gelu. Po transferu na membránu byly proteiny barveny koloidním stříbrem, poté odbarveny a byla prováděna imunodetekce pro každý patientský vzorek a negativní kontrolu (NK). Proteinové imunokomplexy byly následně z membrány odvázány při inkubaci s glycin-HCl pufrém a proběhla druhá imunodetekce s jiným patientským sérem. Všechna patientská séra i negativní kontrola byly analyzovány opakovaně a minimálně jednou byly jako první použity na membránu při opakované imunodetekci.

Fotografie membrán po barvení a po imunodetekci, byly pořízeny na fotografovací stanici ChemiDoc™ XRS a analyzovány pomocí programu Adobe photoshop CC 2015. Tento program umožňuje překrytí obou fotografií. Překryv umožní spojení reaktivních proteinů, které se objevily na membráně po imunodetekci a skvrn na obarvené membráně. Na základě porovnání fotografií všech membrán, bylo vybráno 16 proteinových skvrn buněčné linie A549 a 12 RPMI. Tyto skvrny byly vyhledány na obarveném 2D gelu a následně vyřezány a zpracovány pro identifikaci na hmotnostním spektrometru.

### 3.3.1 Buněčná linie A549

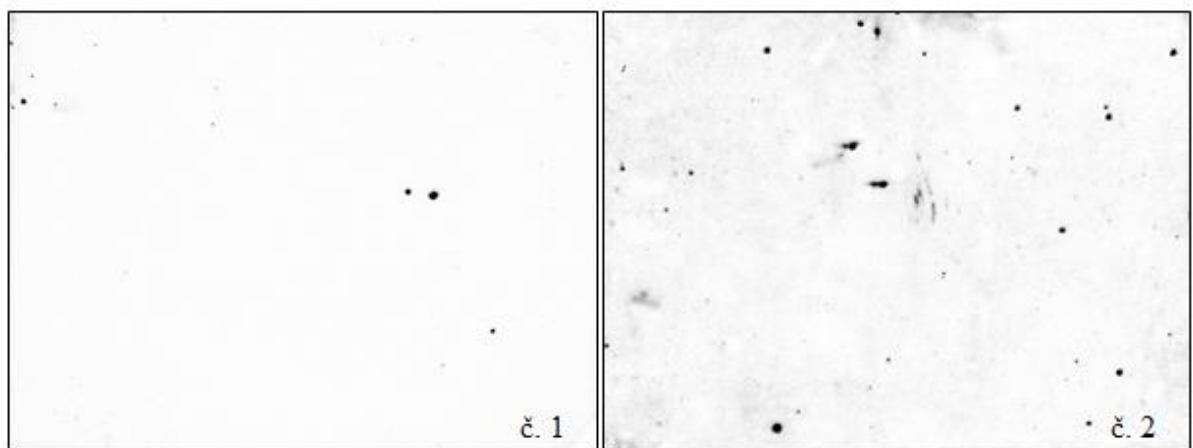
Zobrazení reprezentativní mapy separace proteinů z buněčného lyzáátu linie A549 na gelu barveném Coomassie Brilliant Blue a NC membráně barvené koloidním stříbrem, obrázek č. 15.



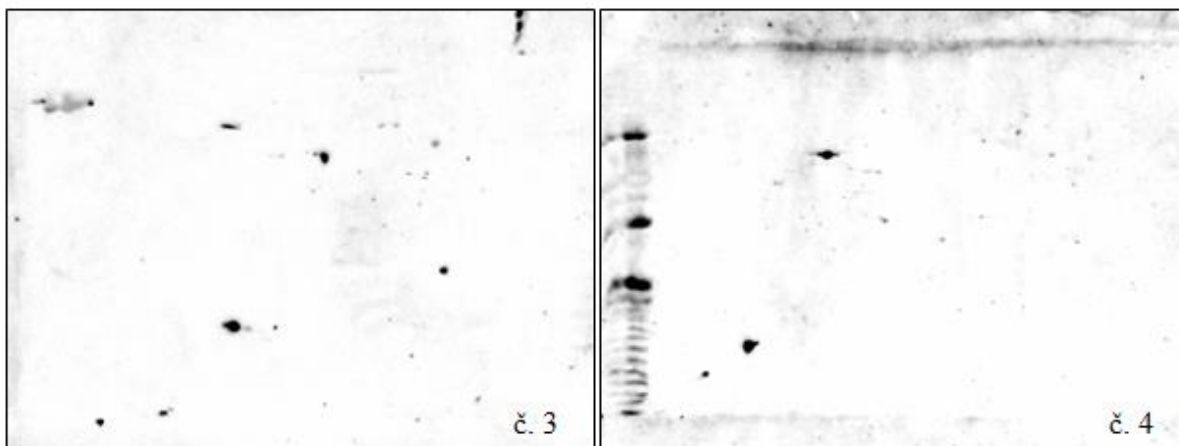
**Obrázek 15:** A549 - gel (Coomassie Brilliant Blue) a NC membrána (koloidní stříbro);  
M – standard molekulových hmotností (10 – 250 kDa)

#### Imunodetekce:

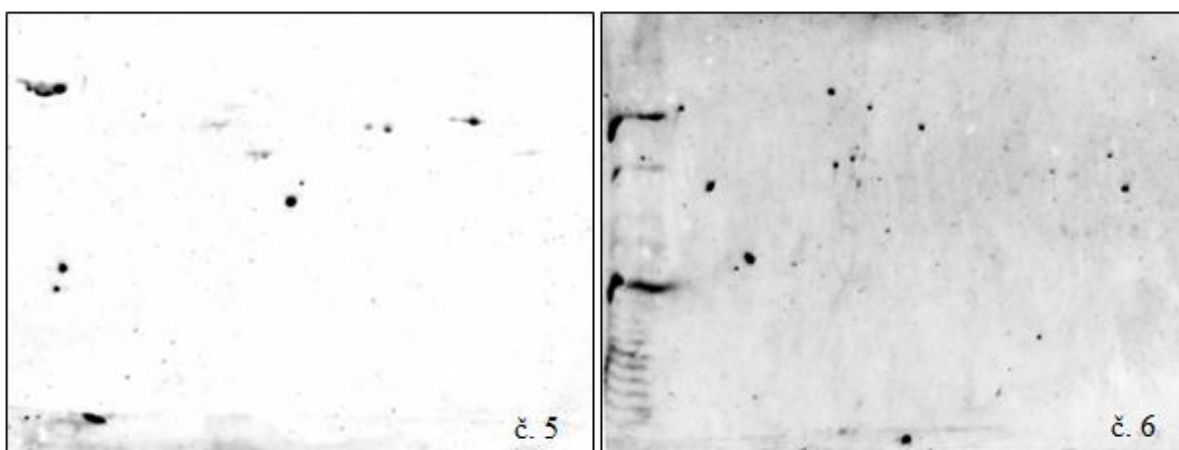
Na následujících obrázcích jsou zobrazeny imunodetekce patientských sér (č. 1 – 9) a negativní kontroly na NC membráně (Obr. 16 – 20).



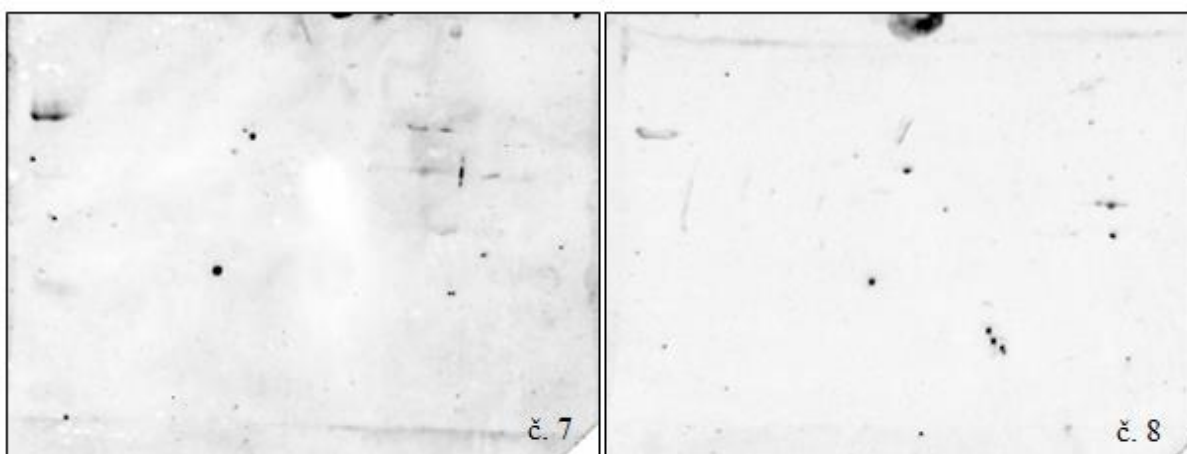
**Obrázek 16:** Imunodetekce (A549) - patientská séra č. 1 a č. 2



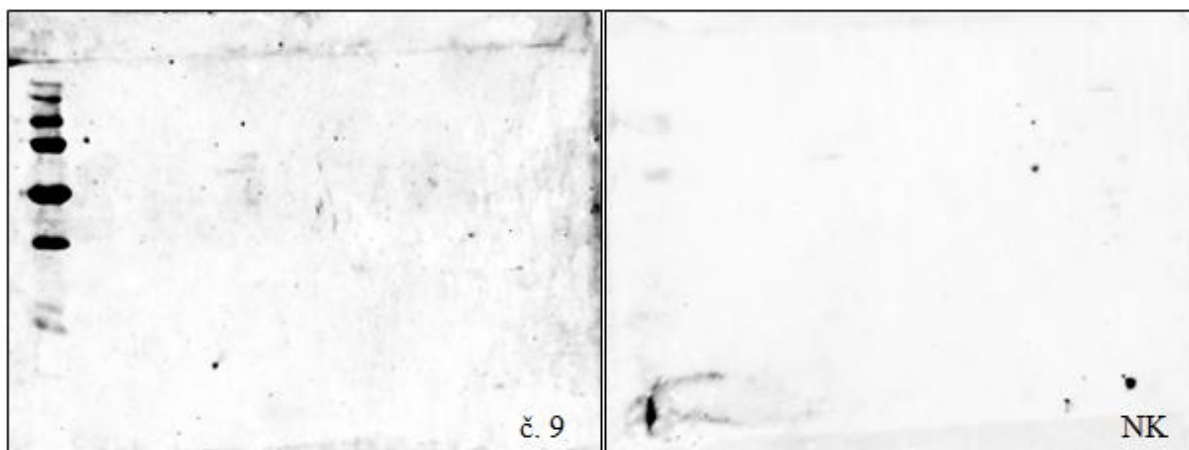
**Obrázek 17:** Imunodetekce (A549) - pacientská séra č. 3 a č. 4



**Obrázek 18:** Imunodetekce (A549) - pacientská séra č. 5 a č. 6



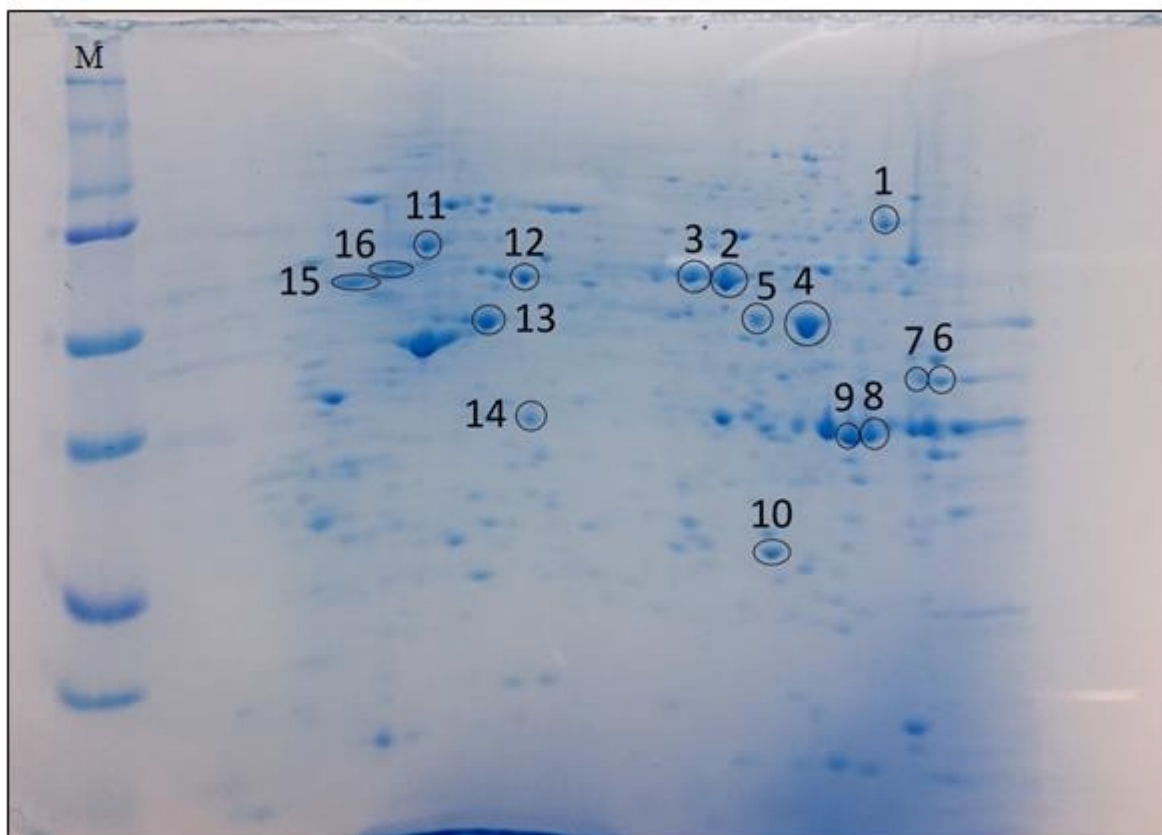
**Obrázek 19:** Imunodetekce (A549) - pacientská séra č. 7 a č. 8



**Obrázek 20:** Imunodetekce (A549) - pacientské sérum č. 9 a negativní kontrola

### 3.3.2 Identifikace skvrn A549 na MS

Imuno-identifikací na základě „softwarového“ porovnání byly vybrány skvrny k vyříznutí a následné analýze pomocí MS (Obr. 21). Data získaná hmotnostním spektrometrem LTQ Orbitrap XL byla porovnána metodou peptidového mapování proti databázi Swiss-Prot. Z 16 proteinových skvrn bylo identifikováno 13 (Tab. 10).



**Obrázek 21:** A549 - vybrané skvrny pro MS identifikaci;  
M – standard molekulových hmotností (10 – 250 kDa)

**Tabulka 10:** MS identifikace proteinů (databáze Swiss-Prot) – A549

VZ č.	MOWSE Score	Pokrytí sekvence (%)	MW proteinu (Da)/pI	IČ v databázi	Druh	Název proteinu
<b>1</b>	2,9E+06	23,8	67878/7.6	P29401	Homo sapiens	<b>Transketolase</b>
<b>2</b>	3,6E+15	72,7	54862/6.3	P00352	Homo sapiens	<b>Retinal dehydrogenase 1</b>
	1,8E+06	21,4	59257/6.4	P11413	Homo sapiens	<b>Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase</b>
<b>3</b>	1,9E+13	57,5	54862/6.3	P00352	Homo sapiens	<b>Retinal dehydrogenase 1</b>
<b>4</b>	8,4E+18	67,5	47169/7.0	P06733	Homo sapiens	<b>Alpha-enolase</b>
<b>5</b>	7,2E+13	50,9	47169/7.0	P06733	Homo sapiens	<b>Alpha-enolase</b>
<b>6</b>	1,0E+11	48,1	39420/8.3	P04075	Homo sapiens	<b>Fructose-bisphosphate aldolase A</b>
<b>7</b>	6,8E+11	50,3	39420/8.3	P04075	Homo sapiens	<b>Fructose-bisphosphate aldolase A</b>
<b>8</b>	5,3E+13	66,5	36020/7.7	O60218	Homo sapiens	<b>Aldo-keto reductase family 1 member B10</b>
<b>9</b>	2,6E+16	70,2	38604/7.6	P07355	Homo sapiens	<b>Annexin A2</b>
	3,8E+07	39,9	36020/7.7	O60218	Homo sapiens	<b>Aldo-keto reductase family 1 member B10</b>
<b>10</b>	1,8E+11	61,2	30791/5.6	P60174	Homo sapiens	<b>Triosephosphate isomerase</b>
<b>11</b>	1,1E+16	44,5	61055/5.7	P10809	Homo sapiens	<b>60 kDa heat shock protein, mitochondrial</b>
<b>12</b>	-	-	-	-	-	<b>nezdařilo se identifikovat</b>
<b>13</b>	-	-	-	-	-	<b>nezdařilo se identifikovat</b>
<b>14</b>	3,7E+15	59,3	36639/5.7	P07195	Homo sapiens	<b>L-lactate dehydrogenase B chain</b>
<b>15</b>	1,6E+20	74,3	49671/4.8	P07437	Homo sapiens	<b>Tubulin beta chain</b>
<b>16</b>	-	-	-	-	-	<b>nezdařilo se identifikovat</b>

V následujícím seznamu je uveden výskyt proteinových skvrn u jednotlivých patientských sér a negativní kontroly. Zvýrazněny jsou významné skvrny. V tabulce 11 jsou uvedeny identifikované proteiny a zvýrazněn výskyt opakujících se skvrn alespoň třikrát.

Výskyt skvrn: (tučné = významné)

- Sérum č. 1: **4, 5**
- Sérum č. 2: slabé skvrny (2, 8, 11, 13)
- Sérum č. 3: 2, 3, **4, 10, 11**, 13, **15**
- Sérum č. 4: **1, 2, 7, 15**
- Sérum č. 5: **2, 3, 10, 14, 15**
- Sérum č. 6: **6, 7**

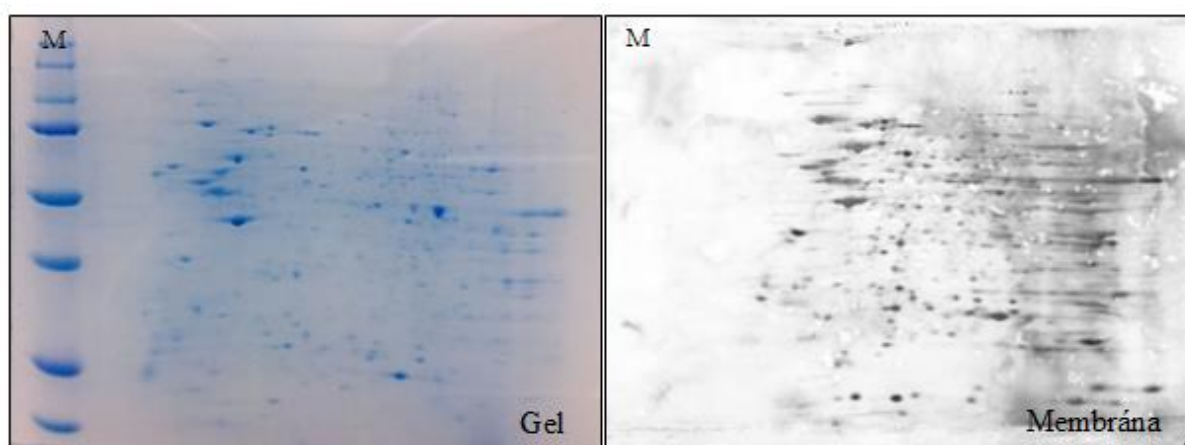
Sérum č. 7: slabé skvrny  
 Sérum č. 8: **6, 10, 12**  
 Sérum č. 9: **4, 8, 9**  
 Sérum NK: **16**

**Tabulka 11:** Identifikované proteiny v buněčném lyzátu A549 a četnost jejich výskytu

A549 – proteiny (Swiss-Prot)	Počet pacientů s výskytem skvrny
Transketolase	1
Retinal dehydrogenase 1	4
Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	
Alpha-enolase	3
Fructose-bisphosphate aldolase A	3
60 kDa heat shock protein, mitochondrial	2
Aldo-keto reductase family 1 member B10	2
Annexin A2	1
Triosephosphate isomerase	3
L-lactate dehydrogenase B chain	1
Tubulin beta chain	3

### 3.3.3 Buněčná linie RPMI

Reprezentativní mapa separace buněčného lyzátu linie RPMI na gelu barveném Coomassie Brilliant Blue a NC membráně barvené koloidním stříbrem (Obr. 22).



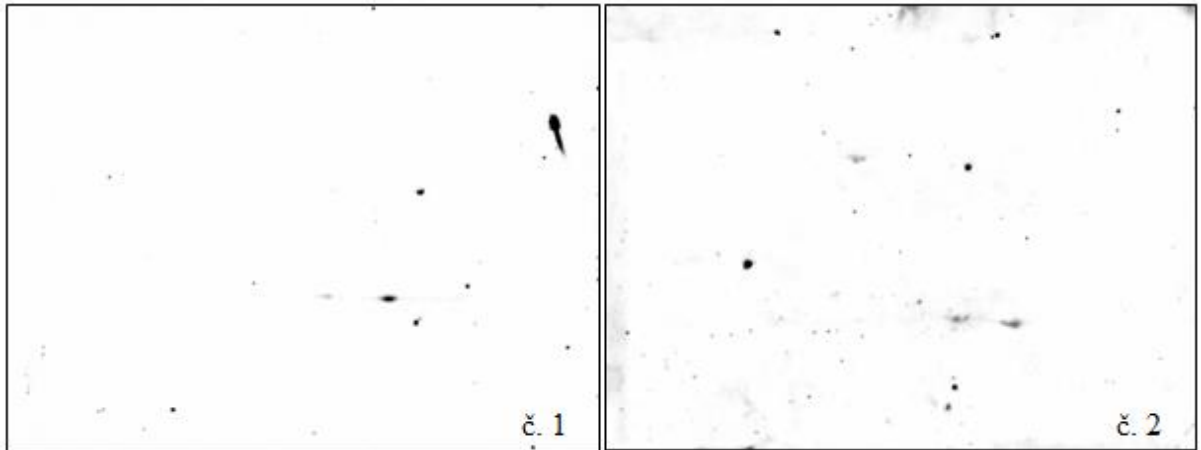
**Obrázek 22:** RPMI - gel (Coomassie Brilliant Blue) a NC membrána (koloidním stříbrem);

M – standard molekulových hmotností (10 – 250 kDa)

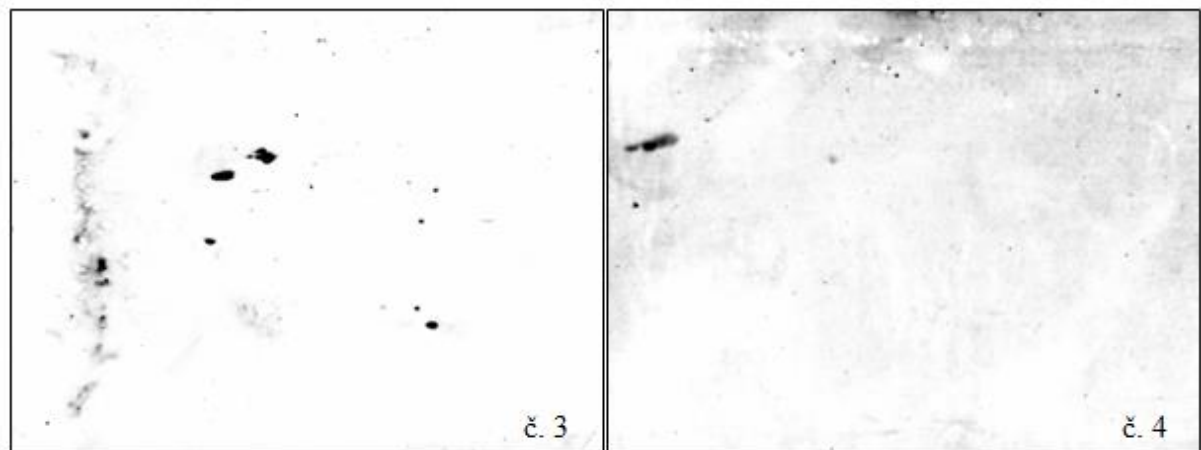


### **Imunodetekce:**

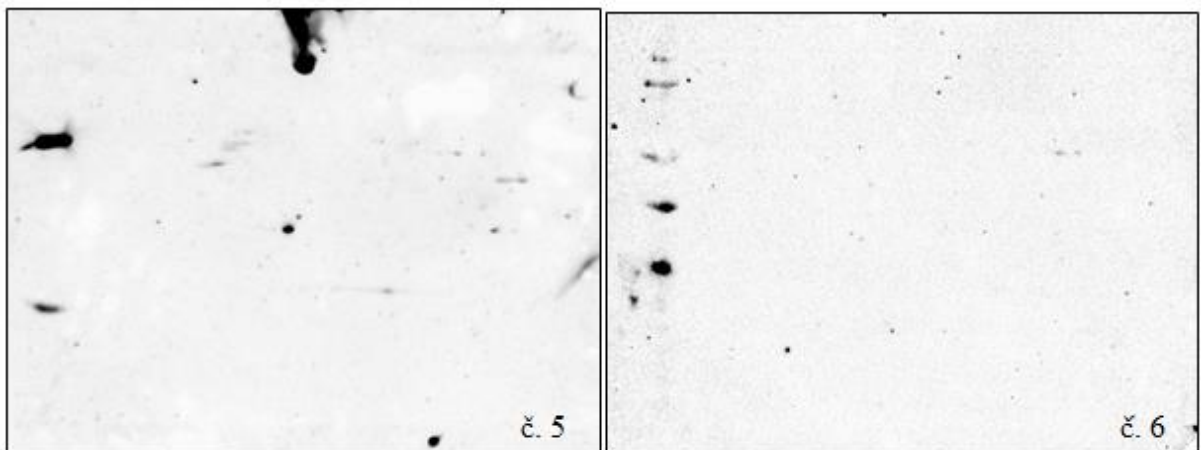
Na obrázcích 23 – 27 jsou NC membrány, na kterých proběhla imunodetekce s patientskými séry č 1 – 9 a negativní kontrolou.



**Obrázek 23:** Imunodetekce (RPMI) - patientská séra č. 1 a č. 2

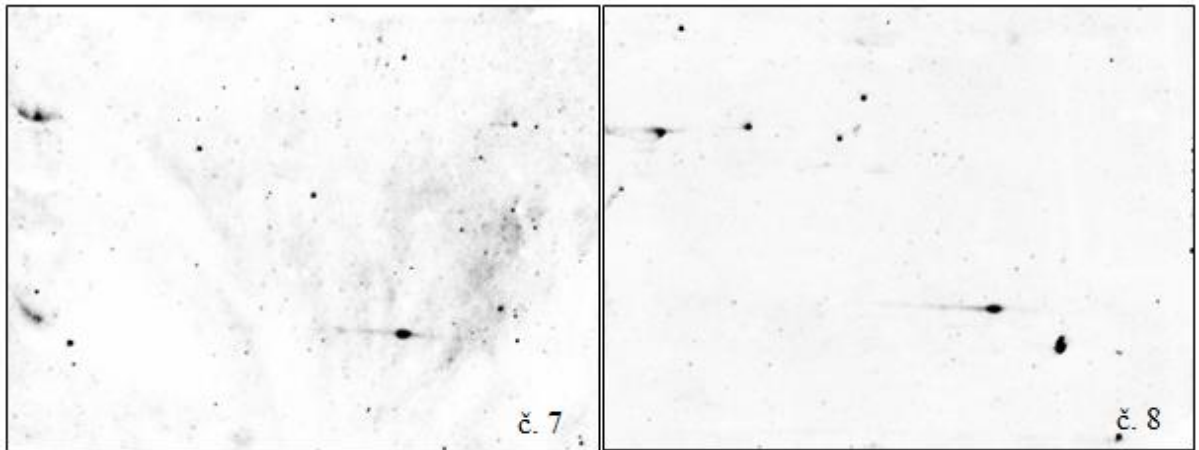


**Obrázek 24:** Imunodetekce (RPMI) - patientská séra č. 3 a č. 4

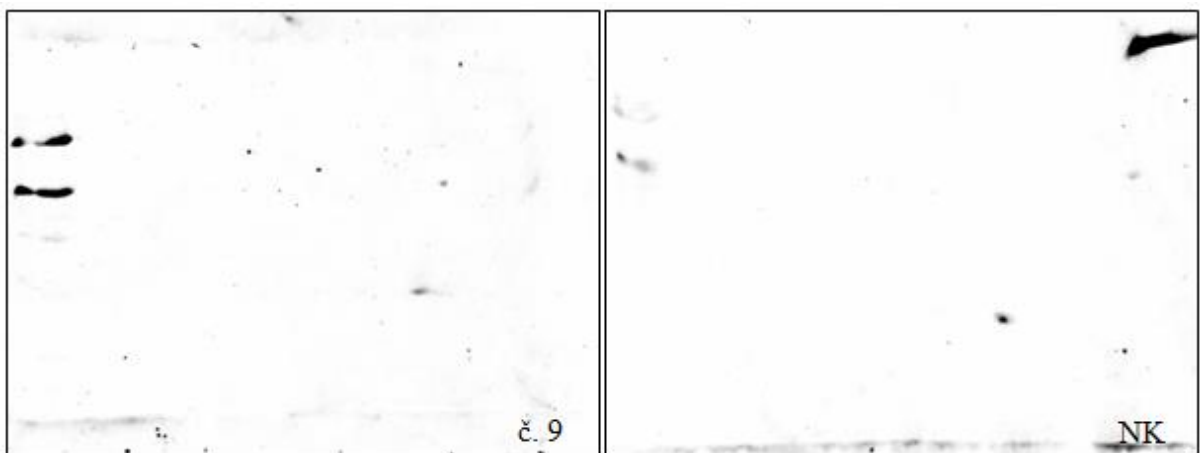


**Obrázek 25:** Imunodetekce (RPMI) - patientská séra č. 5 a č. 6





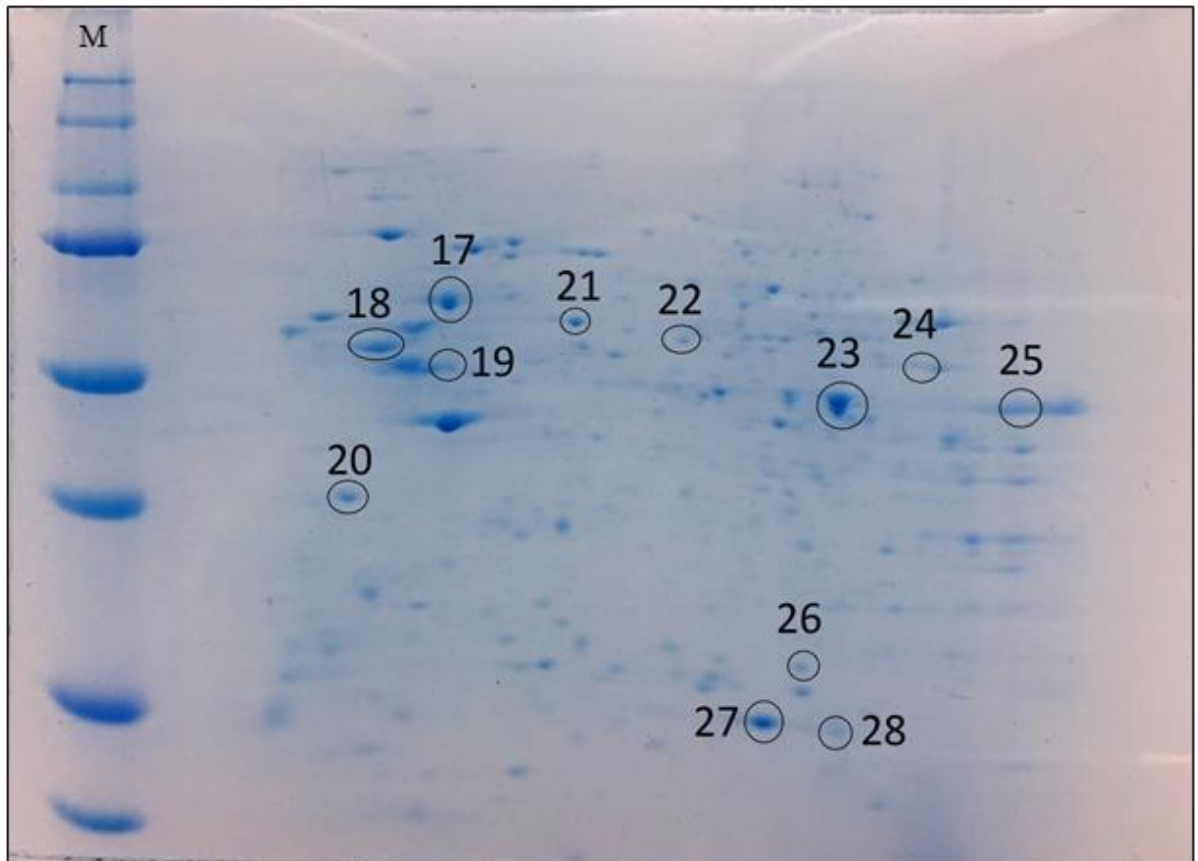
**Obrázek 26:** Imunodetekce (RPMI) - pacientská séra č. 7 a č. 8



**Obrázek 27:** Imunodetekce (RPMI) - pacientské sérum č. 9 a negativní kontrola

### 3.3.4 Identifikace RPMI skvrn na MS

Na základě „softwarového“ porovnání došlo k imuno-identifikování proteinových skvrn, které byly vyříznuty a poté analyzovány pomocí MS (Obr. 28). Pomocí dat z hmotnostního spektrometru LTQ Orbitrap XL se porovnáním proti databázi Swiss-Prot podařilo identifikovat 10 z 12 skvrn (Tab. 12).



**Obrázek 28:** RPMI – vybrané skvrny pro MS identifikaci;

M – standard molekulových hmotností (10 – 250 kDa)

**Tabulka 12:** MS identifikace proteinů (databáze Swiss-Prot) – RPMI

V Z č.	MOWS E Score	Pokrytí sekvence (%)	MW proteinu (Da)/pI	IČ v databázi	Druh	Název proteinu
17	3,5E+12	38,2	61055/5.7	P10809	Homo sapiens	<b>60 kDa heat shock protein, mitochondrial</b>
18	9,4E+08	32,2	49671/4.8	P07437	Homo sapiens	<b>Tubulin beta chain</b>
19	8,9E+05	23,1	47629/5.6	Q8NBS9	Homo sapiens	<b>Thioredoxin domain- containing protein 5</b>
20	-	-	-	-	-	<b>nezdařilo se identifikovat</b>
21	2,2E+15	58,5	57489/6.0	P78371	Homo sapiens	<b>T-complex protein 1 subunit beta</b>
	1,0E+13	39,6	56783/6.0	P30101	Homo sapiens	<b>Protein disulfide- isomerase A3</b>
22	-	-	-	-	-	<b>nezdařilo se identifikovat</b>
23	2,1E+18	71	47169/7.0	P06733	Homo sapiens	<b>Alpha-enolase</b>
24	5,7E+12	3,8E+01	55993/8.8	P34897	Homo sapiens	<b>Serine hydroxymethyltransferase , mitochondrial</b>
	1,3E+08	2,7E+01	59751/9.2	P25705	Homo sapiens	<b>ATP synthase subunit alpha, mitochondrial</b>
25	1,3E+08	35,3	50141/9.1	P68104	Homo sapiens	<b>Elongation factor 1-alpha 1</b>
26	1,4E+09	55,1	28804/6.7	P18669	Homo sapiens	<b>Phosphoglycerate mutase 1</b>
27	-	-	-	-	-	<b>nezdařilo se identifikovat</b>
28	1,3E+08	60,6	24423/7.0	P62826	Homo sapiens	<b>GTP-binding nuclear protein Ran</b>

Výskyt proteinových skvrn u jednotlivých pacientů je uveden v následujícím seznamu. Významné skvrny jsou zvýrazněné. Výčet identifikovaných proteinů a četnost jejich výskytu v patientských sérech a negativní kontrole je uveden v tabulce 13.

Výskyt skvrn: (tučné = významné)

Sérum č. 1:	<b>23</b>
Sérum č. 2:	slabé skvrny (17, 22, 25, 27, 28)
Sérum č. 3:	<b>17, 18, 19, 20, 23, 25, 26, 28</b>
Sérum č. 4:	<b>17</b>
Sérum č. 5:	<b>17, 25, 27</b>
Sérum č. 6:	24
Sérum č. 7:	27
Sérum č. 8:	<b>18, 27</b>

Sérum č. 9: 17, 21, **23, 27**  
 Sérum NK: 27

**Tabulka 13:** Identifikované proteiny v buněčném lyzátu RPMI a četnost jejich výskytu

<b>RPMI – proteiny (Swiss-Prot)</b>	<b>Počet pacientů s výskytem skvrny</b>
60 kDa heat shock protein, mitochondrial	5
Tubulin beta chain	2
Thioredoxin domain-containing protein 5	1
T-complex protein 1 subunit beta	1
Alpha-enolase	3
Serine hydroxymethyltransferase, mitochondrial	1
Elongation factor 1-alpha 1	3
Phosphoglycerate mutase 1	1
GTP-binding nuclear protein Ran	2
č. 27	6

Z 28 proteinových skvrn bylo identifikováno 23 proteinů. V některých vzorcích byla prokázána přítomnost dvou proteinů. Což mohlo být způsobeno nesprávným vyříznutím proteinu z gelu či nedokonalou separací vzhledem k blízkým izoelektrickým bodům a podobné molekulové hmotnosti.

#### **Význam a funkce identifikovaných proteinů:**

Retinální dehydrogenáza 1, také označovaná jako aldehyd dehydrogenasa 1 člen rodiny A1 (ALDH1A1) je protein, který má oxidoredukční funkci a podílí se na metabolismu retinové kyseliny [144]. ALDH1A1 byl zkoumán jako potenciální biomarker při diagnostice rakoviny prsu. Výsledky studie naznačují, že hladiny exprese ALDH1A1 mRNA v nádorové tkáni mohou být nezávislým markerem prognózy u pacientů s Triple negativním karcinom prsu [145]. Zvýšená aktivita ALDH1A1 byla zaznamenána i u buněk MM. Exprese tohoto proteinu vedla se zvýšené tumorogenicitě a rezistenci vůči doxorubicinu a bortezomibu *in vitro* a *in vivo* [146].

Alfa-enoláza (ENO1) je multifunkční enzym, který je využívám jako diagnostický marker pro mnoho nádorových onemocnění - nemalobuněčný karcinom plic [147], rakovinu prsu, [148] slinivky břišní, jater [149] a dalších. Eno1 byla stanovena i v séru pacientů s MM.

Analýza genové exprese ENO1 je jedním z 5 kroků, který je využit pro prognózu výskytu MM v patentu „Gep5 model for multiple myeloma“ [150].

Fruktóza bisfosfát aldoláza A (ALDOA) je důležitým enzymem při glykolýze a glukoneogenezi. Bylo zjištěno, že jeho vysoká exprese souvisí se stavem nádoru a výskytem metastáz u karcinomu plic. Nadměrná exprese ALDOA byla pozorována i u dalších rakovin plic [151], renálních buněk a jaterního karcinomu [152].

Triázafosfát isomeráza (TPI1) je protein zapojený do glukoneogeneze. Bylo zjištěno, že je vysoce exprimována u mnoha nádorových onemocnění. Jedná se především o rakovinu jater a žaludku, ale její zvýšené hladiny byly prokázány i u adenokarcinomu plic [153], močového měchýře [154] a prsu [155].

Beta-tubulin je hlavní složkou mikrotubulů. Pro protinádorovou léčbu je tubulin významným zkoumaným cílem. Je prognostickým markerem rakoviny ledvin a jater [156].

Mitochondriální protein 60 tepelného šoku (HSP60) se podílí na postraslačních úpravách proteinů importovaných do mitochondrií. Bylo prokázáno, jeho zapojení do řady autoimunitních a nádorových onemocnění [157]. Vliv HSP60 je u MM i dalších karcinomů stále zkoumaný [158, 159].

Elongační faktor 1 alfa 1 (EF1A1) je protein, který podporuje vazbu aminoacyl-tRNA na A-místo ribozomů během proteosyntézy. Nadměrná exprese EF1A1 specificky inhibuje apoptózu indukovanou chemoterapií, p53 a p73 což vede k chemorezistenci. Vysoké hladiny EF1A1 byly zjištěny u rakoviny ledvin, jater a mozku [160]. Vliv EF1A1 na MM je ve výzkumu.

Proteinová skvrna č. 27 byla prokázána u 6 zkoumaných sér. Identifikace této skvrny se nezdařila, to však nemá na tuto práci vliv, protože se vyskytuje i u negativní kontroly.

Imuno-identifikované reaktivní proteiny, které se vyskytovaly u třech či více pacientů se dle studií vyskytují i u dalších nádorových onemocnění a pro některé jsou potenciálními diagnostickými markery.

## Závěr

Imunoproteom lze analyzovat různými metodami. V této práci byla využita metoda SERPA, pro identifikaci imunoreaktivních proteinů v séru pacientů s MM v remisi.

Hlavním cílem této práce bylo zavedení metod pro separaci, poté imunodetekci proteinů a optimalizaci jejich vizualizace. Následně byly tyto metody využity pro analýzu imunoproteomu a průkaz specifických autoprotilátek. Proteiny z buněk RPMI a A549 byly separovány dvourozměrnou elektroforézou, aby došlo k vytvoření proteinových map. Tyto mapy byly následně přeneseny na NC membrány, které byly vybrány jako vhodnější díky možnosti je zcela odbarvit.

Optimalizací barvicích technik bylo vybráno koloidní stříbro. Barvení proteinů probíhalo přímo po transferu, aby bylo dosaženo co největší citlivosti. Následovala inkubace membrán s patientskými séry a poté průkaz proteinů na membráně pomocí sekundárních protilátek, které byly značeny enzymy. Přidáním substrátu byla umožněna vizualizace imunoreaktivních proteinů na membráně. Relativní intenzita signálu by měla odpovídat množství antigenu na membráně, avšak absolutní intenzita je velmi závislá na afinitě protilátky k antigenu [118]. Proto některé proteinové skvrny byly po imunodetekci hůře identifikovatelné. Porovnáním obarvené proteinové mapy a membrány s imunoreaktivními proteiny byly vybrány proteinové skvrny na gelu, vyříznuty a identifikovány pomocí MS. Podařilo se identifikovat 23 imunoreaktivních proteinů. U 8 z nich byla četnost výskytu v sérech pacientů 3 a více. U všech těchto proteinů byla ve studiích zaznamenána a prokázána jejich nádorová aktivita. Souvislost s MM byla pozorována u proteinů ALDH1A [161] a ENO1 [162], vliv HSP60 a FE1A1 na MM je stále zkoumán [159]. Proteinová skvrna ALDH1A byla imunodetkována na buňkách A549 ve 4 patientských sérech. ENO1 se objevila u 3 sér po imunodetekci na NC membráně s A549 a 3 proteinové spoty s ENO1 byly identifikovány u buněk RPMI. Protein FE1A1 byl imunodetkován také u 3 patientských sér (RPMI buňky). HSP60 byl identifikován u 2 pacientů na A549 buňkách a v 5 případech na RPMI buňkách.

Antigeny asociované s nádory, proti kterým jsou zaměřeny protilátky, jejíž výskyt souvisí s dlouhodobou remisí pacientů, by mohly sloužit jako biomarkery MM. Mohly by být využity při prvotní diagnostice MM, určení fáze onemocnění nebo by mohl pomoci sledovat účinnost použité terapie.

## 4 Seznam literatury

- [1] MASLAK, Peter. Multiple myeloma. *Blood*. 2005, **105**(7), 2629. ISSN 0006-4971, 1528-0020.
- [2] ADAM, Zdeněk, Vladimír MAISNAR a ČESKÁ MYELOMOVÁ SKUPINA. *Mnohočetný myelom: jak včas rozpoznat tuto nemoc a jak s ní žít: informace pro nemocné a jejich blízké*. Brno: Masarykova univerzita pro Českou myelomovou skupinu, 2008. ISBN 978-80-210-4680-1.
- [3] GANESAN, Vinitha, Dana P. ASCHERMAN a Jonathan S. MINDEN. Immunoproteomics technologies in the discovery of autoantigens in autoimmune diseases. *Biomolecular Concepts* [online]. 2016, **7**(2), 133–143. ISSN 1868-5021. Dostupné z: doi:10.1515/bmc-2016-0007
- [4] SOLLY, Samuel. Remarks on the pathology of mollities ossium; with cases. *Medico-chirurgical transactions*. 1844, **27**, 435-498.8. ISSN 0959-5287.
- [5] HURET, Jean-Loup, Mohammad AHMAD, Mélanie ARSABAN, Alain BERNHEIM, Jérémy CIGNA, François DESANGLES, Jean-Christophe GUIGNARD, Marie-Christine JACQUEMOT-PERBAL, Maureen LABARUSSIAS, Vanessa LEBERRE, Anne MALO, Catherine MOREL-PAIR, Hossein MOSSAFA, Jean-Claude POTIER, Guillaume TEXIER, Franck VIGUIÉ, Sylvie YAU CHUN WAN-SENON, Alain ZASADZINSKI a Philippe DESSEN. Atlas of genetics and cytogenetics in oncology and haematology in 2013. *Nucleic Acids Research* [online]. 2013, **41**(Database issue), D920-924. ISSN 1362-4962. Dostupné z: doi:10.1093/nar/gks1082
- [6] RAJKUMAR. Multiple myeloma: 2016 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *American Journal of Hematology* [online]. 2016, **91**(7), 719–734. ISSN 0361-8609. Dostupné z: doi:10.1002/ajh.24402
- [7] ADAM, Zdeněk, Jiří VORLÍČEK a Jiří VANÍČEK. *Diagnostické a léčebné postupy u maligních chorob: druhé, aktualizované a doplněné vydání*. B.m.: Grada Publishing a.s., 2004. ISBN 978-80-247-7762-7.
- [8] NOOKA, Ajay K., Efstathios KASTRITIS, Meletios A. DIMOPOULOS a Sagar LONIAL. Treatment options for relapsed and refractory multiple myeloma. *Blood* [online]. 2015, **125**(20), 3085–3099. ISSN 0006-4971, 1528-0020. Dostupné z: doi:10.1182/blood-2014-11-568923
- [9] RAJKUMAR, S. Vincent, Jean-Luc HAROUSSEAU, Brian DURIE, Kenneth C. ANDERSON, Meletios DIMOPOULOS, Robert KYLE, Joan BLADE, Paul RICHARDSON, Robert ORLOWSKI, David SIEGEL, Sundar JAGANNATH, Thierry FACON, Hervé AVET-LOISEAU, Sagar LONIAL, Antonio PALUMBO, Jeffrey ZONDER, Heinz LUDWIG, David VESOLE, Orhan SEZER, Nikhil C. MUNSHI a Jesus San MIGUEL. Consensus recommendations for the uniform reporting of clinical trials: report of the International Myeloma Workshop Consensus Panel 1. *Blood* [online]. 2011, blood-2010-10-299487. ISSN 0006-4971, 1528-0020. Dostupné z: doi:10.1182/blood-2010-10-299487
- [10] ADAM, Z., J. BEDNAŘÍK, J. NEUBAUER, R. CHALOUPKA, Z. FOJTÍK, J. VANÍČEK, L. POUR a A DALŠÍ. Doporučení pro časné rozpoznání postižení skeletu maligním procesem a pro časnou diagnostiku mnohočetného myelomu. *Vnitřní lékařství*. 2006, **52**(2), 11–31.
- [11] MAISNAR, Vladimír. Česká Myelomová Skupina na poli mnohočetného myelomu. In: [online]. Lázně Bělohrad. 10. září 2016 [vid. 2018-04-21]. Dostupné z: <http://www.myeloma.cz/res/file/2016/pacient/2-cmg-a-mm--2016-maisnar.pdf>
- [12] ČESKÁ MYELOMOVÁ SKUPINA. Patient enrolment - RMG Registry. *Regist monoklonálních gmapatií* [online]. 2017 [vid. 2018-04-30]. Dostupné z: <https://rmg.healthregistry.org/index.php?pg=patients>

- [13] MALÚŠKOVÁ, D. Epidemiology of Multiple Myeloma in the Czech Republic. *Klinická Onkologie* [online]. 2017, **30**(Suppl 2), 2S35-2S42. ISSN 0862495X, 18025307. Dostupné z: doi:10.14735/amko20172S35
- [14] LANDGREN, Ola a Robert A. KYLE. Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) consistently precedes multiple myeloma: a prospective study. *Blood* [online]. 2009, **113**(22), 5412–5417. ISSN 0006-4971, 1528-0020. Dostupné z: doi:10.1182/blood-2008-12-194241
- [15] ČEŠKA, Richard, Vladimír TESAŘ, Petr DÍTĚ a Tomáš ŠTULC. *Interna*. Praha: Triton, 2010. ISBN 978-80-7387-423-0.
- [16] ADAM, Zdeněk, Marta KREJČÍ a Jiří VORLÍČEK. *Hematologie: přehled maligních hematologických nemocí*. Praha: Grada, 2008. ISBN 978-80-247-2502-4.
- [17] ONDŘICHOVÁ, Tereza. MEDICAL TRIBUNE CZ > Léčba mnohočetného myelomu je v ČR na špičkové úrovni. *Medical tribune* [online]. 2016, (4) [vid. 2018-03-27]. Dostupné z: <https://www.tribune.cz/clanek/38793-lecba-mnohocetneho-myelomu-je-v-cr-na-spickove-urovni>
- [18] KATZMANN, Jerry A. a Angela DISPENZIERI. Elimination of the need for urine studies in the screening algorithm for monoclonal gammopathies by using serum immunofixation and free light chain assays. *Mayo Clinic Proceedings* [online]. 2006, **81**(12), 1575–1578. ISSN 0025-6196. Dostupné z: doi:10.4065/81.12.1575
- [19] GHOBRIAL, Irene M. a Ola LANDGREN. How I treat smoldering multiple myeloma. *Blood* [online]. 2014, **124**(23), 3380–3388. ISSN 0006-4971, 1528-0020. Dostupné z: doi:10.1182/blood-2014-08-551549
- [20] KYLE, Robert A., Terry M. THERNEAU, S. Vincent RAJKUMAR, Janice R. OFFORD, Dirk R. LARSON, Matthew F. PLEVAK a L. Joseph III MELTON. A Long-Term Study of Prognosis in Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance. *The New England Journal of Medicine* [online]. 2002, **346**(8), 564–569. Dostupné z: doi:10.1056/NEJMoa01133202
- [21] THE UAMS MYELOMA INSTITUTE. Plasma Cell Leukemia | UAMS Myeloma Institute. *The UAMS Myeloma Institute* [online]. 2015 [vid. 2018-04-24]. Dostupné z: <https://myeloma.uams.edu/myeloma-related-diseases/plasma-cell-leukemia/>
- [22] CANADIAN CANCER SOCIETY. Types of multiple myeloma - Canadian Cancer Society. *www.cancer.ca* [online]. 2017 [vid. 2018-04-23]. Dostupné z: <http://www.cancer.ca/en/cancer-information/cancer-type/multiple-myeloma/multiple-myeloma/types-of-multiple-myeloma/?region=on>
- [23] CANADIAN CANCER SOCIETY. Multiple myeloma. *www.cancer.ca* [online]. 2017 [vid. 2018-04-25]. Dostupné z: <http://www.cancer.ca/en/cancer-information/cancer-type/multiple-myeloma/multiple-myeloma/?region=on>
- [24] MICHALAKI, V. J., J. HALL, J. M. HENK, C. M. NUTTING a K. J. HARRINGTON. Definitive radiotherapy for extramedullary plasmacytomas of the head and neck. *The British Journal of Radiology* [online]. 2003, **76**(910), 738–741. ISSN 0007-1285. Dostupné z: doi:10.1259/bjr/54563070
- [25] ADAM, Zdeněk, Jan STRAUB, Ludek POUR, Marta KREJŠÍ, Jan NEUBAUER a Jiří VANÍČEK. Časnou diagnózou mnohočetného myelomu k lepší kvalitě života nemocných. *Česká geriatrická revue*. 2007, **5**(4), 180–201.
- [26] NEBEN, Kai, Anna JAUCH, Thomas HIELSCHER, Jens HILLEGASS, Nicola LEHNERS, Anja SECKINGER, Martin GRANZOW, Marc S. RAAB, Anthony D. HO, Hartmut GOLDSCHMIDT a Dirk HOSE. Progression in Smoldering Myeloma Is Independently Determined by the Chromosomal Abnormalities del(17p), t(4;14), Gain 1q, Hyperdiploidy, and



- Tumor Load. *Journal of Clinical Oncology* [online]. 2013, **31**(34), 4325–4332. ISSN 0732-183X. Dostupné z: doi:10.1200/JCO.2012.48.4923
- [27] EDWARDS, Claire M., Junling ZHUANG a Gregory R. MUNDY. The Pathogenesis of the Bone Disease of Multiple Myeloma. *Bone* [online]. 2008, **42**(6), 1007–1013. ISSN 8756-3282. Dostupné z: doi:10.1016/j.bone.2008.01.027
- [28] FIŠEROVÁ, Barbora, Lenka KUBICZOVÁ, Sabina ŠEVČÍKOVÁ a Roman HÁJEK. Význam mikroprostředí kostní dřeně v patogenezi mnohočetného myelomu. *Klinická onkologie*. 2012, **25**(4), 234–240.
- [29] TAKEUCHI, Kyoko, Masahiro ABE, Masahiro HIASA, Asuka ODA, Hiroe AMOU, Shinsuke KIDO, Takeshi HARADA, Osamu TANAKA, Hirokazu MIKI, Shingen NAKAMURA, Ayako NAKANO, Kumiko KAGAWA, Kenichiro YATA, Shuji OZAKI a Toshio MATSUMOTO. Tgf-Beta inhibition restores terminal osteoblast differentiation to suppress myeloma growth. *PloS One* [online]. 2010, **5**(3), e9870. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0009870
- [30] SEZER, Orhan, Ulrike HEIDER, Ivana ZAVRSKI, Christian Alexander KÜHNE a Lorenz Christian HOFBAUER. RANK ligand and osteoprotegerin in myeloma bone disease. *Blood* [online]. 2003, **101**(6), 2094–2098. ISSN 0006-4971. Dostupné z: doi:10.1182/blood-2002-09-2684
- [31] ŠPIČKA, Ivan. *Mnohočetný myelom a další monoklonální gamapatie* [online]. B.m.: Galén, 2005 [vid. 2018-03-27]. ISBN 80-7262-330-3. Dostupné z: <http://www.galen.cz/idistrib/vydav/?module=katalog&page%5Bbook%5D=1531>
- [32] EDWARDS, Claire M. a Gregory R. MUNDY. Eph Receptors and Ephrin Signaling Pathways: A Role in Bone Homeostasis. *International Journal of Medical Sciences*. 2008, **5**(5), 263–272. ISSN 1449-1907.
- [33] MMRF. Multiple Myeloma. *Multiple Myeloma Research Foundation* [online]. 2015. Dostupné z: <https://www.themmr.org/multiple-myeloma/what-is-multiple-myeloma/>
- [34] AMERICAN CANCER SOCIETY. Tests to Find Multiple Myeloma. *American Cancer Society* [online]. 2017. Dostupné z: <https://www.cancer.org/cancer/multiple-myeloma/detection-diagnosis-staging/testing.html>
- [35] ŠÁLEK, MUDr Tomáš. LABORATORNÍ DIAGNOSTIKA MNOHOČETNÉHO MYELOMU. *Interní medicína pro praxi*. 2008, **10**(9), 407–409.
- [36] HÁJEK, R., M. KREJČÍ, L. POUR a Z. ADAM. Multiple myeloma. *Klinická Onkologie: Časopis České a Slovenské Onkologické Společnosti*. 2011, **24**, 10–13. ISSN 0862-495X.
- [37] IMWG. International Myeloma Working Group consensus criteria for response and minimal residual disease assessment in multiple myeloma. *International Myeloma Working Group* [online]. 2016 [vid. 2018-03-25]. Dostupné z: <http://imwg.myeloma.org/international-myeloma-working-group-consensus-criteria-for-response-and-minimal-residual-disease-assessment-in-multiple-myeloma/>
- [38] DISPENZIERI, A., R. KYLE, G. MERLINI, J. S. MIGUEL, H. LUDWIG, R. HAJEK, A. PALUMBO, S. JAGANNATH, J. BLADE, S. LONIAL, M. DIMOPOULOS, R. COMENZO, H. EINSELE, B. BARLOGIE, K. ANDERSON, M. GERTZ, J. L. HAROUSSEAU, M. ATTAL, P. TOSI, P. SONNEVELD, M. BOCCADORO, G. MORGAN, P. RICHARDSON, O. SEZER, M. V. MATEOS, M. CAVO, D. JOSHUA, I. TURESSON, W. CHEN, K. SHIMIZU, R. POWLES, S. V. RAJKUMAR a B. G. M. DURIE. International Myeloma Working Group guidelines for serum-free light chain analysis in multiple myeloma and related disorders. *Leukemia* [online]. 2009, **23**(2), 215–224. ISSN 1476-5551. Dostupné z: doi:10.1038/leu.2008.307

- [39] ŠUMNÁ, Elena, Ludmila NOVÁČKOVÁ, Arnošt MARTÍNEK CSC a Vlastimil ŠČUDLA CSC. Význam hodnocení sérových hladin volných lehkých řetězců imunoglobulinů u monoklonálních gamapatií. *Interní medicína pro praxi*. 2007, **8**(11), 502–504. ISSN 12127299, 18035256.
- [40] MASOPUST, Jiří a Edgar FABER. Diagnostika a léčba mnohočetného myelomu. *Transfúze a hematologie dnes*. 2012, **18**(1), 89.
- [41] MOREAU, P., J. SAN MIGUEL, P. SONNEVELD, M. V. MATEOS, E. ZAMAGNI, H. AVET-LOISEAU, R. HAJEK, M. A. DIMOPOULOS, H. LUDWIG, H. EINSELE, S. ZWEEGMAN, T. FACON, M. CAVO, E. TERPOS, H. GOLDSCHMIDT, M. ATTAL a C. BUSKE. Multiple myeloma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology* [online]. 2017, **28**(suppl\_4), iv52–iv61. ISSN 0923-7534. Dostupné z: doi:10.1093/annonc/mdx096
- [42] PALUMBO, Antonio, Hervé AVET-LOISEAU, Stefania OLIVA, Henk M. LOKHORST, Hartmut GOLDSCHMIDT, Laura ROSINOL, Paul RICHARDSON, Simona CALTAGIRONE, Juan José LAHUERTA, Thierry FACON, Sara BRINGHEN, Francesca GAY, Michel ATTAL, Roberto PASSERA, Andrew SPENCER, Massimo OFFIDANI, Shaji KUMAR, Pellegrino MUSTO, Sagar LONIAL, Maria T. PETRUCCI, Robert Z. ORLOWSKI, Elena ZAMAGNI, Gareth MORGAN, Meletios A. DIMOPOULOS, Brian G.M. DURIE, Kenneth C. ANDERSON, Pieter SONNEVELD, Jésus SAN MIGUEL, Michele CAVO, S. Vincent RAJKUMAR a Philippe MOREAU. Revised International Staging System for Multiple Myeloma: A Report From International Myeloma Working Group. *Journal of Clinical Oncology* [online]. 2015, **33**(26), 2863–2869. ISSN 0732-183X. Dostupné z: doi:10.1200/JCO.2015.61.2267
- [43] HIDESHIMA, Teru a Kenneth C. ANDERSON. Molecular mechanisms of novel therapeutic approaches for multiple myeloma. *Nature Reviews Cancer* [online]. 2002, **2**(12), 927–937. ISSN 1474-1768. Dostupné z: doi:10.1038/nrc952
- [44] KABELÉČOVÁ, Lenka. Nový vývoj v indukční a udržovací léčbě mnohočetného myelomu. *Terapie* [online]. 2017 [vid. 2018-04-25]. Dostupné z: <http://terapie.digital//review2/kongresova-review/novy-vyvoj-v-indukcni-a-udrzovaci-lecbe-mnohocetneho-myelomu.html>
- [45] ONDŘICHOVÁ, Lucie. MEDICAL TRIBUNE CZ > To, co se děje kolem myelomu, je úžasné. *Medical Tribune* [online]. 2016, (08) [vid. 2018-04-26]. Dostupné z: <https://www.tribune.cz/clanek/39202-to-co-se-deje-kolem-myelomu-je-uzasne>
- [46] TUCHMAN, Sascha A., Gary R. SHAPIRO, William B. ERSHLER, Ashraf BADROS, Harvey J. COHEN, Angela DISPENZIERI, Irene Q. FLORES, Bindu KANAPURU, Donald JURIVICH, Dan L. LONGO, Ali NOURBAKSH, Antonio PALUMBO, Jeremy WALSTON a Jerome W. YATES. Multiple Myeloma in the Very Old: An IASIA Conference Report. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute* [online]. 2014, **106**(5) [vid. 2018-04-26]. ISSN 0027-8874. Dostupné z: doi:10.1093/jnci/dju067
- [47] BLADÉ, Joan, Ma Teresa CIBEIRA a Laura ROSIÑOL. Novel drugs for the treatment of multiple myeloma. *Haematologica* [online]. 2010, **95**(5), 702–704. ISSN 0390-6078. Dostupné z: doi:10.3324/haematol.2009.021550
- [48] DHAVAL, Shah. Multiple Myeloma Medication. *Medscape* [online]. 2018 [vid. 2018-04-24]. Dostupné z: <https://emedicine.medscape.com/article/204369-medication#showall>
- [49] PALUMBO, Antonio, Meletios DIMOPOULOS, Jesus SAN MIGUEL, Jean-Luc HAROUSSEAU, Michel ATTAL, Mohamad HUSSEIN, Stefan KNOP, Heinz LUDWIG, Marie VON LILIENFELD-TOAL a Pieter SONNEVELD. Lenalidomide in combination with dexamethasone for the treatment of relapsed or refractory multiple myeloma. *Blood Reviews* [online]. 2009, **23**(2), 87–93. ISSN 1532-1681. Dostupné z: doi:10.1016/j.blre.2008.07.003

- [50] OMEL, Jim. Myeloma 101: How Proteasome Inhibitors Work. *The Myeloma Crowd* [online]. 2006 [vid. 2018-04-25]. Dostupné z: <https://www.myelomacrowd.org/myeloma-101-proteasome-inhibitors-work/>
- [51] MMRF. Multiple Myeloma Drugs. *Multiple Myeloma Research Foundation* [online]. 2014 [vid. 2018-03-31]. Dostupné z: <https://www.themmr.org/multiple-myeloma/multiple-myeloma-treatment-options/myeloma-drugs/>
- [52] MUTHNÁ, D., M. ŘEZÁČOVÁ, A. STOKLASOVÁ a J. VÁVROVÁ. Histondeacetylázy a jejich inhibitory. *Postgraduální medicína*. 2009, (11), 254–258.
- [53] ČESKÁ MYELOMOVÁ SKUPINA. *Dexametazon a jiné steroidy. Základní informace pro nemocné* [online]. 2008. Dostupné z: <http://www.myeloma.cz/res/file/archiv/2008-brozura-Dexametazon.pdf>
- [54] KÖHLER, G. a C. MILSTEIN. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*. 1975, **256**(5517), 495–497. ISSN 0028-0836.
- [55] CWIERTKA, Karel, Radek TROJANEC, Kateřina ŠPAČKOVÁ a Marián HAJDÚCH. Terapeutické monoklonální protilátky v onkologii. *Klinická farmakologie a farmacie*. 2004, (18), 165–170.
- [56] SCOTT, Andrew M., Jedd D. WOLCHOK a Lloyd J. OLD. Antibody therapy of cancer. *Nature Reviews Cancer*. 2012, **12**, 278.
- [57] DANYLESKO, Ivetta, Katia BEIDER, Avichai SHIMONI a Arnon NAGLER. Monoclonal Antibody-Based Immunotherapy for Multiple Myeloma. *Immunotherapy*. 2012, (4(9)), 919–938.
- [58] TAI, Yu-Tzu a Kenneth C. ANDERSON. Antibody-Based Therapies in Multiple Myeloma. *Bone Marrow Research* [online]. 2011 [vid. 2018-03-29]. Dostupné z: doi:10.1155/2011/924058
- [59] CIKES, Matko. Relationship Between Growth Rate, Cell Volume, Cell Cycle Kinetics, and Antigenic Properties of Cultured Murine Lymphoma Cells. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute* [online]. 1970, **45**(5), 979–988. ISSN 0027-8874. Dostupné z: doi:10.1093/jnci/45.5.979
- [60] WATANABE, M., P. K. WALLACE, T. KELER, Y. M. DEO, C. AKEWANLOP a D. F. HAYES. Antibody dependent cellular phagocytosis (ADCP) and antibody dependent cellular cytotoxicity (ADCC) of breast cancer cells mediated by bispecific antibody, MDX-210. *Breast Cancer Research and Treatment*. 1999, **53**(3), 199–207. ISSN 0167-6806.
- [61] WEINER, Louis M., Rishi SURANA a Shangzi WANG. Antibodies and cancer therapy: versatile platforms for cancer immunotherapy. *Nature reviews. Immunology* [online]. 2010, **10**(5), 317–327. ISSN 1474-1733. Dostupné z: doi:10.1038/nri2744
- [62] BERNARDO, Andrea Di, Paolo MACOR, Carla GUARNOTTA, Giovanni FRANCO, Ada Maria FLORENA, Francesco TEDESCO a Claudio TRIPODO. Humoral immunotherapy of multiple myeloma: perspectives and perplexities. *Expert Opinion on Biological Therapy* [online]. 2010, **10**(6), 863–873. ISSN 1471-2598. Dostupné z: doi:10.1517/14712591003774063
- [63] LONIAL, S., B. DURIE, A. PALUMBO a J. SAN-MIGUEL. Monoclonal antibodies in the treatment of multiple myeloma: current status and future perspectives. *Leukemia* [online]. 2016, **30**(3), 526–535. ISSN 1476-5551. Dostupné z: doi:10.1038/leu.2015.223
- [64] PELLAT-DECEUNYNCK, C., R. BATAILLE, N. ROBILLARD, J. L. HAROUSSEAU, M. J. RAPP, N. JUGE-MORINEAU, J. WIJDENES a M. AMIOT. Expression of CD28 and CD40 in human myeloma cells: a comparative study with normal plasma cells. *Blood*. 1994, **84**(8), 2597–2603. ISSN 0006-4971.
- [65] LAW, Che-Leung, Kristine A. GORDON, John COLLIER, Kerry KLUSSMAN, Julie A. MCEARCHERN, Charles G. CERVENY, Bruce J. MIXAN, Wyne P. LEE, Zhonghau

- LIN, Patricia VALDEZ, Alan F. WAHL a Iqbal S. GREWAL. Preclinical antilymphoma activity of a humanized anti-CD40 monoclonal antibody, SGN-40. *Cancer Research* [online]. 2005, **65**(18), 8331–8338. ISSN 0008-5472. Dostupné z: doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-0095
- [66] AGURA, Edward, Ruben NIESVIZKY, Jeffrey MATOUS, Nikhil MUNSHI, Mohamad HUSSEIN, Ramakrishnan V. PARAMESWARAN, Stefano TARANTOLO, Nancy C. WHITING, Jonathan G. DRACHMAN a Jeffrey A. ZONDER. Dacetuzumab (SGN-40), Lenalidomide, and Weekly Dexamethasone in Relapsed or Refractory Multiple Myeloma: Multiple Responses Observed in a Phase 1b Study. *Blood*. 2009, **114**(22), 2870–2870. ISSN 0006-4971, 1528-0020.
- [67] KUMARESAN, Pappanaicken R, Wayne C LAI, Samuel S CHUANG, Michael BENNETT a Porunelloor A MATHEW. CS1, a novel member of the CD2 family, is homophilic and regulates NK cell function. *Molecular Immunology* [online]. 2002, **39**, 1–8. ISSN 0161-5890. Dostupné z: doi:10.1016/S0161-5890(02)00094-9
- [68] VEILLETTE, André, Mario-Ernesto CRUZ-MUNOZ a Ming-Chao ZHONG. SLAM family receptors and SAP-related adaptors: matters arising. *Trends in Immunology* [online]. 2006, **27**(5), 228–234. ISSN 1471-4906, 1471-4981. Dostupné z: doi:10.1016/j.it.2006.03.003
- [69] COLLINS, Shauna M., Courtney E. BAKAN, Gina D. SWARTZEL, Craig C. HOFMEISTER, Yvonne A. EFEBERA, Hakju KWON, Gary C. STARLING, David CIARLARIELLO, Shakthi BHASKAR, Edward L. BRIERCHECK, Tiffany HUGHES, Jianhua YU, Audie RICE a Don M. BENSON. Elotuzumab directly enhances NK cell cytotoxicity against myeloma via CS1 ligation: evidence for augmented NK cell function complementing ADCC. *Cancer immunology, immunotherapy: CII* [online]. 2013, **62**(12), 1841–1849. ISSN 0340-7004. Dostupné z: doi:10.1007/s00262-013-1493-8
- [70] DEAGLIO, Silvia, Mercedes ZUBIAUR, Armando GREGORINI, Flavia BOTTAREL, Clara M. AUSIELLO, Umberto DIANZANI, Jaime SANCHO a Fabio MALAVASI. Human CD38 and CD16 are functionally dependent and physically associated in natural killer cells. *Blood* [online]. 2002, **99**(7), 2490–2498. ISSN 0006-4971, 1528-0020. Dostupné z: doi:10.1182/blood.V99.7.2490
- [71] WEBER, Donna M., Christine CHEN, Ruben NIESVIZKY, Michael WANG, Andrew BELCH, Edward A. STADTMAUER, David SIEGEL, Ivan BORRELLO, S. Vincent RAJKUMAR, Asher Alban CHANAN-KHAN, Sagar LONIAL, Zhinuan YU, John PATIN, Marta OLESNYCKYJ, Jerome B. ZELDIS a Robert D. KNIGHT. Lenalidomide plus Dexamethasone for Relapsed Multiple Myeloma in North America. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa070596> [online]. 2009 [vid. 2018-03-29]. Dostupné z: doi:10.1056/NEJMoa070596
- [72] VAN DE DONK, Niels W. C. J., Paul G. RICHARDSON a Fabio MALAVASI. CD38 antibodies in multiple myeloma: back to the future. *Blood* [online]. 2018, **131**(1), 13–29. ISSN 1528-0020. Dostupné z: doi:10.1182/blood-2017-06-740944
- [73] KUBALA, Eugen. *OPDIVO® (NIVOLUMAB)* [online]. 2016 [vid. 2018-04-03]. Dostupné z: <http://noveleky.cz/index.php/onkologie/44-opdivo-nivolumab#>
- [74] BOYLE, William J., W. Scott SIMONET a David L. LACEY. Osteoclast differentiation and activation. *Nature* [online]. 2003, **423**(6937), 337–342. ISSN 0028-0836. Dostupné z: doi:10.1038/nature01658
- [75] DEZZANI, Luca. Amgen Announces Positive Top-Line Results From XGEVA® (Denosumab) Phase 3 Trial for Patients with Multiple Myeloma. *IgeaHub* [online]. 2016 [vid. 2018-04-03]. Dostupné z: <https://igeahub.com/2016/10/25/amgen-announces-positive-top-line-results-from-xgeva-denosumab-phase-3-trial-for-patients-with-multiple-myeloma/>
- [76] BROWN, Linda Morris, Gloria GRIDLEY, David CHECK a Ola LANDGREN. Risk of multiple myeloma and monoclonal gammopathy of undetermined significance among white and

- black male United States veterans with prior autoimmune, infectious, inflammatory, and allergic disorders. *Blood* [online]. 2008, **111**(7), 3388–3394. ISSN 0006-4971. Dostupné z: doi:10.1182/blood-2007-10-121285
- [77] SHIMANOVSKY, Alexei, Argote J. ALVAREZ, Shruti MURALI a Constantin A. DASANU. Autoimmune manifestations in patients with multiple myeloma and monoclonal gammopathy of undetermined significance. *BBA Clinical* [online]. 2016, **6**, 12–18. ISSN 2214-6474. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbacli.2016.05.004
- [78] SHEN, Kaini, Gufeng XU, Qing WU, Daobin ZHOU a Jian LI. Risk of Multiple Myeloma in Rheumatoid Arthritis: A Meta-Analysis of Case-Control and Cohort Studies. *PLoS ONE* [online]. 2014, **9**(3) [vid. 2018-04-26]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0091461
- [79] ZAMPIERI, S., M. VALENTE, N. ADAMI, D. BIRAL, A. GHIRARDELLO, M. E. RAMPUDDA, M. VECCHIATO, G. SARZO, S. CORBIANCO, H. KERN, U. CARRARO, F. BASSETTO, S. MERIGLIANO a A. DORIA. Polymyositis, dermatomyositis and malignancy: a further intriguing link. *Autoimmunity Reviews* [online]. 2010, **9**(6), 449–453. ISSN 1873-0183. Dostupné z: doi:10.1016/j.autrev.2009.12.005
- [80] BERNATSKY, S., J. F. BOIVIN, L. JOSEPH, R. RAJAN, A. ZOMA, S. MANZI, E. GINZLER, M. UROWITZ, D. GLADMAN, P. R. FORTIN, M. PETRI, S. EDWORTHY, S. BARR, C. GORDON, S. C. BAE, J. SIBLEY, D. ISENBERG, A. RAHMAN, C. ARANOW, M. A. DOOLEY, K. STEINSSON, O. NIVED, G. STURFELT, G. ALARCÓN, J. L. SENÉCAL, M. ZUMMER, J. HANLY, S. ENSWORTH, J. POPE, H. EL-GABALAWY, T. MCCARTHY, Y. ST PIERRE, R. RAMSEY-GOLDMAN a A. CLARKE. An international cohort study of cancer in systemic lupus erythematosus. *Arthritis and Rheumatism* [online]. 2005, **52**(5), 1481–1490. ISSN 0004-3591. Dostupné z: doi:10.1002/art.21029
- [81] BAZ, Rachid, Carlos ALEMANY, Ralph GREEN a Mohamad A. HUSSEIN. Prevalence of vitamin B12 deficiency in patients with plasma cell dyscrasias: a retrospective review. *Cancer* [online]. 2004, **101**(4), 790–795. ISSN 0008-543X. Dostupné z: doi:10.1002/cncr.20441
- [82] JAMES, Peter. Protein identification in the post-genome era: the rapid rise of proteomics. *Quarterly Reviews of Biophysics*. 1997, **30**(4), 279–331. ISSN 1469-8994, 0033-5835.
- [83] TAPAN, Sarah R. a Misra AMBIKANANDAN. 8 - Proteomics. In: *Challenges in Delivery of Therapeutic Genomics and Proteomics* [online]. London: Elsevier, 2011 [vid. 2018-04-07], s. 387–427. ISBN 978-0-12-384964-9. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-384964-9.00008-6
- [84] SCOBIOALA, Sergiu, Rainer KLOCKE, Günter MICHEL a Sigrid NIKOL. Proteomics: State of the Art and Its Relevance for Gene Therapy. In: *Cardiovascular Research* [online]. B.m.: Springer, Boston, MA, 2006 [vid. 2018-04-07], s. 45–64. ISBN 978-0-387-23328-4. Dostupné z: doi:10.1007/0-387-23329-6\_2
- [85] GRAVES, Paul R. a Timothy A. J. HAYSTEAD. Molecular Biologist's Guide to Proteomics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* [online]. 2002, **66**(1), 39–63. ISSN 1092-2172, 1098-5557. Dostupné z: doi:10.1128/MMBR.66.1.39-63.2002
- [86] CHMELÍK, Josef. Proteomický průvodce. *Chemické listy: =Chemical papers (Prague)*. 2005, **99**(12), 883–885.
- [87] GARCÍA-DESCALZO, Laura, Eva GARCÍA-LÓPEZ, Alberto ALCÁZAR, Fernando BAQUERO a Cristina CID. Gel Electrophoresis of Proteins. *Gel Electrophoresis of Proteins*. 2012, 13.
- [88] BOUCHAL, Pavel a Igor KUČERA. Dvourozěrná elektroforéza v proteomice: Principy a aplikace. *Chemické listy*. 2003, **97**, 29–36.
- [89] HAMES, B. D. *Gel electrophoresis of proteins: a practical approach* [online]. Oxford; New York: Oxford University Press, 1998 [vid. 2018-05-03]. ISBN 978-0-19-156563-2. Dostupné z: doi:10.1093/acprof:oso/9780191565632.001.0001

- z: <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&scope=site&db=nlebk&db=nlabk&AN=98465>
- [90] LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* [online]. 1970, **227**(5259), 680–685. ISSN 1476-4687. Dostupné z: [doi:10.1038/227680a0](https://doi.org/10.1038/227680a0)
- [91] WALKER, John M., ed. *The Protein Protocols Handbook* [online]. 3. vyd. B.m.: Humana Press, 2009 [vid. 2018-04-01]. Springer Protocols Handbooks. ISBN 978-1-58829-880-5. Dostupné z: [//www.springer.com/us/book/9781588298805](http://www.springer.com/us/book/9781588298805)
- [92] O'FARRELL, Patrick H. High Resolution Two-Dimensional Electrophoresis of Proteins. *The Journal of biological chemistry*. 1975, **250**(10), 4007–4021. ISSN 0021-9258.
- [93] WEHR, T., M. ZHU a R. RODRIGUEZ-DIAZ. Capillary isoelectric focusing. *Methods in Enzymology*. 1996, **270**, 358–374. ISSN 0076-6879.
- [94] GIANAZZA, E., I. MILLER, I. EBERINI a S. CASTIGLIONI. Low-tech electrophoresis, small but beautiful, and effective: electrophoretic titration curves of proteins. *Electrophoresis* [online]. 1999, **20**(7), 1325–1338. ISSN 0173-0835. Dostupné z: [doi:10.1002/\(SICI\)1522-2683\(19990601\)20:7<1325::AID-ELPS1325>3.0.CO;2-X](https://doi.org/10.1002/(SICI)1522-2683(19990601)20:7<1325::AID-ELPS1325>3.0.CO;2-X)
- [95] GÖRG, Angelika, Walter WEISS a Michael J. DUNN. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *PROTEOMICS* [online]. 2004, **4**(12), 3665–3685. ISSN 1615-9861. Dostupné z: [doi:10.1002/pmic.200401031](https://doi.org/10.1002/pmic.200401031)
- [96] RABILLOUD, T. Use of thiourea to increase the solubility of membrane proteins in two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis* [online]. 1998, **19**(5), 758–760. ISSN 0173-0835. Dostupné z: [doi:10.1002/elps.1150190526](https://doi.org/10.1002/elps.1150190526)
- [97] CHANDRAMOULI, Kondethimmanahalli a Pei-Yuan QIAN. Proteomics: Challenges, Techniques and Possibilities to Overcome Biological Sample Complexity. *Human Genomics and Proteomics : HGP* [online]. 2009, **2009** [vid. 2018-04-02]. ISSN 1757-4242. Dostupné z: [doi:10.4061/2009/239204](https://doi.org/10.4061/2009/239204)
- [98] VÍTÁMVÁS, Pavel, Klára KOSOVÁ, Zbyněk ŠKODÁČEK a Ilja Tom PRÁŠIL. Metoda dvourozměrné diferenční gelové elektroforézy (2D-DIGE) a její využití v proteomice. *Chemické listy*. 2010, (104), 671–676.
- [99] JENSEN, Ellen C. The Basics of Western Blotting. *The Anatomical Record: Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology* [online]. 2012, **295**(3), 369–371. ISSN 1932-8494. Dostupné z: [doi:10.1002/ar.22424](https://doi.org/10.1002/ar.22424)
- [100] THERMO FISHER SCIENTIFIC. *Termo Fisher Scientific web* [online]. 2013. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com>
- [101] KURIEN, Biji T. a R. Hal SCOFIELD. Western Blotting: An Introduction. In: *Western Blotting: Methods and Protocols* [online]. 2015 [vid. 2018-04-27], s. 17–30. ISBN 978-1-4939-2694-7. Dostupné z: [https://www.researchgate.net/publication/277779719\\_Western\\_Blotting\\_An\\_Introduction](https://www.researchgate.net/publication/277779719_Western_Blotting_An_Introduction)
- [102] MAHMOOD, Tahrin a Ping-Chang YANG. Western Blot: Technique, Theory, and Trouble Shooting. *North American Journal of Medical Sciences* [online]. 2012, **4**(9), 429–434. ISSN 2250-1541. Dostupné z: [doi:10.4103/1947-2714.100998](https://doi.org/10.4103/1947-2714.100998)
- [103] SNYDER, Lloyd R., Joseph J. KIRKLAND a John W. DOLAN. *Introduction to Modern Liquid Chromatography*. B.m.: John Wiley & Sons, 2011. ISBN 978-1-118-21039-0.
- [104] NÄGELE, Edgar, Martin VOLLMER, Patric HÖRTH a Cornelia VAD. 2D-LC/MS techniques for the identification of proteins in highly complex mixture. *Expert Review of Proteomics*. 2004, **1**(1), 37–46.

- [105] ZHANG, Xiang, Aiqin FANG, Catherine P. RILEY, Mu WANG, Fred E. REGNIER a Charles BUCK. Multi-dimensional Liquid Chromatography in Proteomics. *Analytica chimica acta* [online]. 2010, **664**(2), 101–113. ISSN 0003-2670. Dostupné z: doi:10.1016/j.aca.2010.02.001
- [106] PENNINGTON, S. R. a Michael J. DUNN. *Proteomics: From Protein Sequence to Function*. B.m.: Garland Science, 2001. ISBN 978-1-85996-296-1.
- [107] HO, CS, CWK LAM, MHM CHAN, RCK CHEUNG, LK LAW, LCW LIT, KF NG, MWM SUEN a HL TAI. Electrospray Ionisation Mass Spectrometry: Principles and Clinical Applications. *The Clinical Biochemist Reviews*. 2003, **24**(1), 3–12. ISSN 0159-8090.
- [108] SINGHAL, Neelja, Manish KUMAR, Pawan K. KANAUIA a Jugsharan S. VIRDI. MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. *Frontiers in Microbiology* [online]. 2015, **6** [vid. 2018-04-28]. ISSN 1664-302X. Dostupné z: doi:10.3389/fmicb.2015.00791
- [109] KETTERLINUS, Ralf, Sen-Yung HSIEH, Shih-Hua TENG, Helen LEE a Wolfgang PUSCH. Fishing for biomarkers: analyzing mass spectrometry data with the new ClinProTools software. *BioTechniques*. 2005, 37–40. ISSN 0736-6205.
- [110] VIDOVA, Veronika a Zdenek SPACIL. A review on mass spectrometry-based quantitative proteomics: Targeted and data independent acquisition. *Analytica Chimica Acta* [online]. 2017, **964**, 7–23. ISSN 0003-2670. Dostupné z: doi:10.1016/j.aca.2017.01.059
- [111] SAVARYN, John P., Timothy K. TOBY a Neil L. KELLEHER. A Researcher's Guide to Mass Spectrometry-Based Proteomics. *Proteomics* [online]. 2016, **16**(18), 2435–2443. ISSN 1615-9853. Dostupné z: doi:10.1002/pmic.201600113
- [112] DI GIROLAMO, Francesco, Isabella LANTE, Maurizio MURACA a Lorenza PUTIGNANI. The Role of Mass Spectrometry in the “Omics” Era. *Current Organic Chemistry* [online]. 2013, **17**(23), 2891–2905. ISSN 1385-2728. Dostupné z: doi:10.2174/1385272817888131118162725
- [113] HAN, Xuemei, Aaron ASLANIAN a John R. YATES. Mass Spectrometry for Proteomics. *Current opinion in chemical biology* [online]. 2008, **12**(5), 483–490. ISSN 1367-5931. Dostupné z: doi:10.1016/j.cbpa.2008.07.024
- [114] JUNGBLUT, P. R. Proteome analysis of bacterial pathogens. *Microbes and Infection*. 2001, **3**(10), 831–840. ISSN 1286-4579.
- [115] CONRAD, Karsten a Jan-Heiner KÜPPER. Chapter 33 - Tumor-Associated Autoantibodies. In: Yehuda SHOENFELD, Pier Luigi MERONI a M. Eric GERSHWIN, ed. *Autoantibodies* [online]. 3. vyd. San Diego: Elsevier, 2014 [vid. 2018-04-28], s. 275–287. ISBN 978-0-444-56378-1. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-444-56378-1.00033-2
- [116] ANDERSON, Karen S. a Joshua LABAER. The Sentinel Within: Exploiting the Immune System for Cancer Biomarkers†. *Journal of Proteome Research* [online]. 2005, **4**(4), 1123–1133. ISSN 1535-3893. Dostupné z: doi:10.1021/pr0500814
- [117] RIECKMANN, Jan C., Roger GEIGER, Daniel HORNBURG, Tobias WOLF, Ksenya KVELER, David JARROSSAY, Federica SALLUSTO, Shai S. SHEN-ORR, Antonio LANZAVECCHIA, Matthias MANN a Felix MEISSNER. Social network architecture of human immune cells unveiled by quantitative proteomics. *Nature Immunology* [online]. 2017, **18**(5), 583–593. ISSN 1529-2916. Dostupné z: doi:10.1038/ni.3693
- [118] TJALSMA, Harold, Renée M. J. SCHAEPS a Dorine W. SWINKELS. Immunoproteomics: From biomarker discovery to diagnostic applications. *Proteomics. Clinical Applications* [online]. 2008, **2**(2), 167–180. ISSN 1862-8346. Dostupné z: doi:10.1002/prca.200780012
- [119] KLADE, C. S., T. VOSS, E. KRYSSTEK, H. AHORN, K. ZATLOUKAL, K. PUMMER a G. R. ADOLF. Identification of tumor antigens in renal cell carcinoma by serological proteome analysis. *Proteomics* [online]. 2001, **1**(7), 890–898. ISSN 1615-9853. Dostupné z: doi:10.1002/1615-9861(200107)1:7<890::AID-PROT890>3.0.CO;2-Z

- [120] DUNCAN, Mark W., Ruedi AEBERSOLD a Richard M. CAPRIOLI. The pros and cons of peptide-centric proteomics. *Nature Biotechnology* [online]. 2010, **28**(7), 659–664. ISSN 1546-1696. Dostupné z: doi:10.1038/nbt0710-659
- [121] COTTRELL, Tricia R., John C. HALL, Antony ROSEN a Livia CASCIOLA-ROSEN. Identification of Novel Autoantigens by a Triangulation Approach. *Journal of immunological methods* [online]. 2012, **385**(1–2), 35–44. ISSN 0022-1759. Dostupné z: doi:10.1016/j.jim.2012.07.024
- [122] LE NAOUR, François, Franck BRICHORY, Laura BERETTA a Samir M. HANASH. Identification of Tumor-Associated Antigens Using Proteomics. *Technology in Cancer Research & Treatment* [online]. 2002, **1**(4), 257–262. ISSN 1533-0346, 1533-0338. Dostupné z: doi:10.1177/153303460200100406
- [123] LARMAN, H. Benjamin, Uri LASERSON, Luis QUEROL, Katrijn VERHAEGHEN, Nicole L. SOLIMINI, George Jing XU, Paul L. KLARENBECK, George M. CHURCH, David A. HAFLE, Robert M. PLENGE, Peter A. NIGROVIC, Philip L. DE JAGER, Ilse WEETS, Geert A. MARTENS, Kevin C. O'CONNOR a Stephen J. ELLEDGE. PhIP-Seq characterization of autoantibodies from patients with multiple sclerosis, type 1 diabetes and rheumatoid arthritis. *Journal of autoimmunity* [online]. 2013, **43**, 1–9. ISSN 0896-8411. Dostupné z: doi:10.1016/j.jaut.2013.01.013
- [124] SUNDELL, Gustav N. a Ylva IVARSSON. Interaction Analysis through Proteomic Phage Display. *BioMed Research International* [online]. 2014, [vid. 2018-04-29]. ISSN 2314-6133. Dostupné z: doi:10.1155/2014/176172
- [125] CARON, Michel, Geneviève CHOQUET-KASTYLEVSKY a Raymonde JOUBERT-CARON. Cancer Immunomics Using Autoantibody Signatures for Biomarker Discovery. *Molecular & Cellular Proteomics* [online]. 2007, **6**(7), 1115–1122. ISSN 1535-9476, 1535-9484. Dostupné z: doi:10.1074/mcp.R600016-MCP200
- [126] BRACCI, Paige M., Mi ZHOU, Scott YOUNG a Joseph WIEMELS. Serum autoantibodies to pancreatic cancer antigens as biomarkers of pancreatic cancer in a San Francisco Bay Area case–control study. *Cancer* [online]. 2012, **118**(21), 5384–5394. ISSN 1097-0142. Dostupné z: doi:10.1002/ncr.27538
- [127] DISIS, Mary L., Emanuel CALENOFF, Graham MCLAUGHLIN, Ann E. MURPHY, Wei CHEN, Bernd GRONER, Margit JESCHKE, Nick LYDON, Elaine MCGLYNN, Robert B. LIVINGSTON, Roger MOE a Martin A. CHEEVER. Existent T-Cell and Antibody Immunity to HER-2/neu Protein in Patients with Breast Cancer. *Cancer Research*. 1994, **54**(1), 16–20. ISSN 0008-5472, 1538-7445.
- [128] DIESINGER, Isabel, Christine BAUER, Nicole BRASS, Hans-Joachim SCHAEFERS, Nicole COMTESSE, Gerhard SYBRECHT a Eckart MEESE. Toward a more complete recognition of immunoreactive antigens in squamous cell lung carcinoma. *International Journal of Cancer* [online]. 2002, **102**(4), 372–378. ISSN 0020-7136. Dostupné z: doi:10.1002/ijc.10714
- [129] CHATTERJEE, Madhumita, Saroj MOHAPATRA, Alexei IONAN, Gagandeep BAWA, Rouba ALI-FEHMI, Xiaoju WANG, James NOWAK, Bin YE, Fatimah A. NAHHAS, Karen LU, Steven S. WITKIN, David FISHMAN, Adnan MUNKARAH, Robert MORRIS, Nancy K. LEVIN, Natalie N. SHIRLEY, Gerard TROMP, Judith ABRAMS, Sorin DRAGHICI a Michael A. TAINSKY. Diagnostic markers of ovarian cancer by high-throughput antigen cloning and detection on arrays. *Cancer Research* [online]. 2006, **66**(2), 1181–1190. ISSN 0008-5472. Dostupné z: doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-2962
- [130] WANG, Xiaoju, Jianjun YU, Arun SREEKUMAR, Sooryanarayana VARAMBALLY, Ronglai SHEN, Donald GIACHERIO, Rohit MEHRA, James E. MONTIE, Kenneth J. PIENTA, Martin G. SANDA, Philip W. KANTOFF, Mark A. RUBIN, John T. WEI, Debashis GHOSH a Arul



- M. CHINNAIYAN. Autoantibody Signatures in Prostate Cancer. *New England Journal of Medicine* [online]. 2005, **353**(12), 1224–1235. ISSN 0028-4793. Dostupné z: doi:10.1056/NEJMoa051931
- [131] SMITH, Elaine M., Linda M. RUBENSTEIN, Justine M. RITCHIE, John H. LEE, Thomas H. HAUGEN, Eva HAMSIKOVA a Lubomir P. TUREK. Does Pretreatment Seropositivity to Human Papillomavirus Have Prognostic Significance for Head and Neck Cancers? *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers* [online]. 2008, **17**(8), 2087–2096. ISSN 1055-9965, 1538-7755. Dostupné z: doi:10.1158/1055-9965.EPI-08-0054
- [132] SAKURAI, Takeo, Akio KIMURA, Megumi YAMADA, Akihiro KOUMURA, Yuichi HAYASHI, Yuji TANAKA, Isao HOZUMI a Takashi INUZUKA. Identification of antibodies as biological markers in serum from multiple sclerosis patients by immunoproteomic approach. *Journal of Neuroimmunology* [online]. 2011, **233**(1), 175–180. ISSN 0165-5728. Dostupné z: doi:10.1016/j.jneuroim.2010.11.003
- [133] REINDL, Markus, Michael KHALIL a Thomas BERGER. Antibodies as biological markers for pathophysiological processes in MS. *Journal of Neuroimmunology* [online]. 2006, **180**(1–2), 50–62. ISSN 0165-5728. Dostupné z: doi:10.1016/j.jneuroim.2006.06.028
- [134] RAMILA, Philip, Sidhartha MURTHY, Jonathan KRAKOVER, Gomathinayagam SINNATHAMBY, Jennifer ZERFASS, Lorraine KELLER a Mohan PHILIP. Shared Immunoproteome for ovarian cancer diagnostics and immunotherapy: Potential theranostic approach to cancer. *Journal of proteome research* [online]. 2007, **6**(7), 2509–2517. ISSN 1535-3893. Dostupné z: doi:10.1021/pr0606777
- [135] SHIMIZU, Keiji, Yuji UEDA a Hisakazu YAMAGISHI. Titration of serum p53 antibodies in patients with gastric cancer: a single-institute study of 40 patients. *Gastric Cancer* [online]. 2005, **8**(4), 214–219. ISSN 1436-3291, 1436-3305. Dostupné z: doi:10.1007/s10120-005-0337-4
- [136] QIU, Lin-Lin, Pan-Yu HUA, Li-Li YE, Yong-Cai WANG, Tian QIU, Hui-Zheng BAO a Li WANG. The detection of serum anti-p53 antibodies from patients with gastric carcinoma in China. *Cancer Detection and Prevention* [online]. 2007, **31**(1), 45–49. ISSN 0361-090X, 1525-1500. Dostupné z: doi:10.1016/j.cdp.2006.12.005
- [137] YANG, Lina, Jingfang WANG, Jianfang LI, Hainan ZHANG, Shujuan GUO, Min YAN, Zhenggang ZHU, Bin LAN, Youcheng DING, Ming XU, Wei LI, Xiaonian GU, Chong QI, Heng ZHU, Zhifeng SHAO, Bingya LIU a Sheng-Ce TAO. Identification of Serum Biomarkers for Gastric Cancer Diagnosis Using a Human Proteome Microarray. *Molecular & Cellular Proteomics: MCP* [online]. 2016, **15**(2), 614–623. ISSN 1535-9476. Dostupné z: doi:10.1074/mcp.M115.051250
- [138] ALTENBERG, B. a K. O. GREULICH. Genes of glycolysis are ubiquitously overexpressed in 24 cancer classes. *Genomics* [online]. 2004, **84**(6), 1014–1020. ISSN 0888-7543. Dostupné z: doi:10.1016/j.ygeno.2004.08.010
- [139] LUETKENS, Tim, Sebastian KOBOLD, Yanran CAO, Marina RISTIC, Georgia SCHILLING, Sinje TAMS, Britta Marlen BARTELS, Julia TEMPLIN, Katrin BARTELS, York HILDEBRANDT, Sara YOUSEF, Andreas MARX, Friedrich HAAG, Carsten BOKEMEYER, Nicolaus KRÖGER a Djordje ATANACKOVIC. Functional autoantibodies against SSX-2 and NY-ESO-1 in multiple myeloma patients after allogeneic stem cell transplantation. *Cancer immunology, immunotherapy: CII* [online]. 2014, **63**(11), 1151–1162. ISSN 1432-0851. Dostupné z: doi:10.1007/s00262-014-1588-x
- [140] LADNER, Carol L., Jing YANG, Raymond J. TURNER a Robert A. EDWARDS. Visible fluorescent detection of proteins in polyacrylamide gels without staining. *Analytical*

- Biochemistry* [online]. 2004, **326**(1), 13–20. ISSN 0003-2697. Dostupné z: doi:10.1016/j.ab.2003.10.047
- [141] MOEREMANS, M., G. DANEELS a J. DE MEY. Sensitive colloidal metal (gold or silver) staining of protein blots on nitrocellulose membranes. *Analytical Biochemistry*. 1985, **145**(2), 315–321. ISSN 0003-2697.
- [142] D'SOUZA, Anil a R. Hal SCOFIELD. Protein Stains to Detect Antigen on Membranes. In: *Protein Blotting and Detection* [online]. B.m.: Humana Press, Totowa, NJ, 2009 [vid. 2018-05-07], *Methods in Molecular Biology*, s. 433–440. ISBN 978-1-934115-73-2. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-59745-542-8\_43
- [143] VETTERMANN, Christian, Hans-Martin JÄCK a Dirk MIELENZ. A colloidal silver staining--destaining method for precise assignment of immunoreactive spots in two-dimensional protein patterns. *Analytical Biochemistry*. 2002, **308**(2), 381–387. ISSN 0003-2697.
- [144] MORGAN, Cynthia A. a Thomas D. HURLEY. Development of a high-throughput in vitro assay to identify selective inhibitors for human ALDH1A1. *Chemico-Biological Interactions* [online]. 2015, **234**, 29–37. ISSN 1872-7786. Dostupné z: doi:10.1016/j.cbi.2014.10.028
- [145] LIU, Yan, Michelle BAGLIA, Ying ZHENG, William BLOT, Ping-Ping BAO, Hui CAI, Sarah NECHUTA, Wei ZHENG, Qiuyin CAI a Xiao Ou SHU. ALDH1A1 mRNA expression in association with prognosis of triple-negative breast cancer. *Oncotarget*. 2015, **6**(38), 41360–41369. ISSN 1949-2553.
- [146] YANG, Ye, Wen ZHOU, Jiliang XIA, Zhimin GU, Erik WENDLANDT, Xin ZHAN, Siegfried JANZ, Guido TRICOT a Fenghuang ZHAN. NEK2 mediates ALDH1A1-dependent drug resistance in multiple myeloma. *Oncotarget* [online]. 2014, **5**(23), 11986–11997. ISSN 1949-2553. Dostupné z: doi:10.18632/oncotarget.2388
- [147] GHOSH, Asish K., Robert STEELE, Jan RYERSE a Ratna B. RAY. Tumor-Suppressive Effects of MBP-1 in Non-Small Cell Lung Cancer Cells. *Cancer Research* [online]. 2006, **66**(24), 11907–11912. ISSN 0008-5472, 1538-7445. Dostupné z: doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-2754
- [148] TU, Shih-Hsin, Chih-Chiang CHANG, Ching-Shyang CHEN, Ka-Wai TAM, Ying-Jan WANG, Chia-Hwa LEE, Hsiao-Wei LIN, Tzu-Chun CHENG, Ching-Shui HUANG, Jan-Show CHU, Neng-Yao SHIH, Li-Ching CHEN, Sy-Jye LEU, Yuan-Soon HO a Chih-Hsiung WU. Increased expression of enolase  $\alpha$  in human breast cancer confers tamoxifen resistance in human breast cancer cells. *Breast Cancer Research and Treatment* [online]. 2010, **121**(3), 539–553. ISSN 0167-6806, 1573-7217. Dostupné z: doi:10.1007/s10549-009-0492-0
- [149] TAKIKITA, Mikiko, Sean ALTEKRUSE, Charles F. LYNCH, Mark T. GOODMAN, Brenda Y. HERNANDEZ, Mark GREEN, Wendy COZEN, Myles COCKBURN, Maria Sibug SABER, Marie TOPOR, Chris ZERUTO, Behnoush ABEDI-ARDEKANI, Marsha E. REICHMAN a Stephen M. HEWITT. Associations between Selected Biomarkers and Prognosis in a Population-Based Pancreatic Cancer Tissue Microarray. *Cancer Research* [online]. 2009, **69**(7), 2950–2955. ISSN 0008-5472, 1538-7445. Dostupné z: doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-3879
- [150] BARLOGIE, Bart, Pingping QU, Christoph HEUCK a Joshua EPSTEIN. *GEP5 model for multiple myeloma - patent* [online]. B.m.: United States Patent. 2014. Dostupné z: <https://patentimages.storage.googleapis.com/bd/01/bf/9f7381d028c9ce/US9822419.pdf>
- [151] RHO, Jung-Hyun, Michael H. A. ROEHL a Julia Y. WANG. Glycoproteomic analysis of human lung adenocarcinomas using glycoarrays and tandem mass spectrometry: differential expression and glycosylation patterns of vimentin and fetuin A isoforms. *The Protein Journal* [online]. 2009, **28**(3–4), 148–160. ISSN 1875-8355. Dostupné z: doi:10.1007/s10930-009-9177-0

- [152] PFLEIDERER, G., M. THÖNER a E. D. WACHSMUTH. Histological examination of the aldolase monomer composition of cells from human kidney and hypernephroid carcinoma. *Beitrage Zur Pathologie*. 1975, **156**(3), 266–279. ISSN 0005-8165.
- [153] CHEN, Guoan, Tarek G. GHARIB, Chiang-Ching HUANG, Dafydd G. THOMAS, Kerby A. SHEDDEN, Jeremy M. G. TAYLOR, Sharon L. R. KARDIA, David E. MISEK, Thomas J. GIORDANO, Mark D. IANNETTONI, Mark B. ORRINGER, Samir M. HANASH a David G. BEER. Proteomic analysis of lung adenocarcinoma: identification of a highly expressed set of proteins in tumors. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*. 2002, **8**(7), 2298–2305. ISSN 1078-0432.
- [154] MONTGOMERIE, J. Z., R. W. GRACY, H. J. HOLSHUH, A. J. KEYSER, C. J. BENNETT a D. G. SCHICK. The 28K protein in urinary bladder, squamous metaplasia and urine is triosephosphate isomerase. *Clinical Biochemistry*. 1997, **30**(8), 613–618. ISSN 0009-9120.
- [155] TAMESA, Michiko Sato, Yasuhiro KURAMITSU, Masanori FUJIMOTO, Noriko MAEDA, Yukiko NAGASHIMA, Toshiyuki TANAKA, Shigeru YAMAMOTO, Masaaki OKA a Kazuyuki NAKAMURA. Detection of autoantibodies against cyclophilin A and triosephosphate isomerase in sera from breast cancer patients by proteomic analysis. *Electrophoresis* [online]. 2009, **30**(12), 2168–2181. ISSN 1522-2683. Dostupné z: doi:10.1002/elps.200800675
- [156] MIKSTACKA, Renata, Tomasz STEFAŃSKI a Jakub RÓŻAŃSKI. Tubulin-interactive stilbene derivatives as anticancer agents. *Cellular & Molecular Biology Letters* [online]. 2013, **18**(3), 368–397. ISSN 1689-1392. Dostupné z: doi:10.2478/s11658-013-0094-z
- [157] CAPPELLO, Francesco, Everly Conway DE MACARIO, Giovanni ZUMMO a Alberto J. L. MACARIO. Immunohistochemistry of human Hsp60 in health and disease: from autoimmunity to cancer. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* [online]. 2011, **787**, 245–254. ISSN 1940-6029. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-61779-295-3\_18
- [158] ZHANG, Lei, Jacqueline H.L. FOK a Faith E. DAVIES. Heat shock proteins in multiple myeloma. *Oncotarget*. 2014, **5**(5), 1132–1148. ISSN 1949-2553.
- [159] ZHOU, Chao, Hongwei SUN, Chen ZHENG, Jing GAO, Qingzi FU, Nianqi HU, Xiaoli SHAO, Yingying ZHOU, Jingting XIONG, Ke NIE, Huaibin ZHOU, Lijun SHEN, Hezhi FANG a Jianxin LYU. Oncogenic HSP60 regulates mitochondrial oxidative phosphorylation to support Erk1/2 activation during pancreatic cancer cell growth. *Cell Death & Disease* [online]. 2018, **9**(2), 161. ISSN 2041-4889. Dostupné z: doi:10.1038/s41419-017-0196-z
- [160] BLANCH, Alvaro, Fiona ROBINSON, Ian R. WATSON, Lynn S. CHENG a Meredith S. IRWIN. Eukaryotic Translation Elongation Factor 1-Alpha 1 Inhibits p53 and p73 Dependent Apoptosis and Chemotherapy Sensitivity. *PLOS ONE* [online]. 2013, **8**(6), e66436. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0066436
- [161] GAO, Minjie, Yuanyuan KONG, Guang YANG, Lu GAO, Jumei SHI, Minjie GAO, Yuanyuan KONG, Guang YANG, Lu GAO a Jumei SHI. Multiple myeloma cancer stem cells. *Oncotarget* [online]. 2016, **7**(23), 35466–35477. ISSN 1949-2553. Dostupné z: doi:10.18632/oncotarget.8154
- [162] YANG, Haiping, Ruihua MI, Qian WANG, Xudong WEI, Qingsong YIN, Lin CHEN, Xinghu ZHU a Yongping SONG. Expression of Neuron-Specific Enolase in Multiple Myeloma and Implications for Clinical Diagnosis and Treatment. *PLoS ONE* [online]. 2014, **9**(5) [vid. 2018-05-06]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0094304