

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická

Vývoj metody pro průkaz a kvantifikaci specifických anti-ENOL  
protilátek v lidském séru

Bc. Matěj Karabec

Diplomová práce

2021

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Akademický rok: 2020/2021

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Matěj Karabec**  
Osobní číslo: **C19586**  
Studijní program: **N0512A130006 Analýza biologických materiálů**  
Studijní obor: **Analýza biologických materiálů**  
Téma práce: **Vývoj metody pro průkaz a kvantifikaci specifických anti-ENOL protilátek v lidském séru**  
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

### Zásady pro vypracování

Teoretická část bude obsahovat:

- 1) Protinádorová imunita – popis složek IS, které se na vyhledávání nádorových buněk a na vlastní protinádorové imunitě podílejí.
- 2) Autoprotilátky u nádorových onemocnění se zaměřením na difúzní nádory, jejich možné zapojení do protinádorové imunity, se zaměřením na difúzní hematologické nádory.
- 3) Mnohočetný myelom – patogeneze onemocnění, symptomy, laboratorní diagnostika, terapie – současný stav poznání, vývoj a výzkum na poli diagnostiky MM a metod vhodných pro monitorování účinnosti terapie MM.
- 4) Enoláza – význam a funkce enzymu, vztah enzymu k nádorovému bujení.

Experimentální část bude obsahovat dílčí kroky:

- 1) Použití elektrofor. technik a Western Blot metody pro analýzu proteinů v lidských sérech.
- 2) Zavedení metody pro analýzu imunoproteomu a průkaz specifických (auto)protilátek u pacientů s mnohočetným myelomem v remisi.

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

Seznam doporučené literatury:

K textu použít relevantní internetové zdroje, průběžně sledovat novinky v oboru.  
Recentní literatura dostupná v databázi WoS, MEDLINE, Sciencedirect; odborné knihy.  
Další dle pokynů vedoucí diplomové práce.

Vedoucí diplomové práce: **prof. RNDr. Zuzana Bílková, Ph.D.**  
Katedra biologických a biochemických věd  
Konzultant diplomové práce: **Mgr. Barbora Jankovičová, Ph.D.**  
Katedra biologických a biochemických věd  
Datum zadání diplomové práce: **18. prosince 2020**  
Termín odevzdání diplomové práce: **7. května 2021**

L.S.

---

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

---

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

V Pardubicích dne 26. února 2021

Prohlašuji:

Práci s názvem Vývoj metody pro průkaz a kvantifikaci specifických anti-ENOL protilátek v lidském séru jsem vypracoval samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využil, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byl jsem seznámen 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 24. 7. 2021

Matěj Karabec v. r.

Poděkování:

Rád bych tímto poděkoval vedoucí diplomové práce paní prof. RNDr. Zuzaně Bílkové, Ph.D. za její odborný dohled, cenné rady a paní Mgr. Barboře Jankovičové Ph.D. za vedení při laboratorní činnosti.

## **ANOTACE**

Práce se zabývá detekcí anti-ENOL protilátek v séru pacientů s mnohočetným myelomem v remisi. Jsou zde popsány základní charakteristiky nemoci, diagnostika a terapie onemocnění. Část práce je také věnovaná autoprotilátkám, protinádorové imunitě a také enoláze a jejímu dělení. Experimentální část je zaměřena na optimalizaci promývací stanice FW400, 2D-elektroforézu patientských sér a jejich následnou imunoreaktivitu.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

Mnohočetný myelom, anti-ENOL, enoláza, (auto)protilátky, imunoreaktivita, 2D-elektroforéza

## **TITLE**

Development of analytical method for specific anti-Enol IgG quantification in human serum

## **ANNOTATION**

The thesis deals with detection of anti-ENOL antibodies in the serum of patients with multiple myeloma in remission. The basic characteristics of the disease, diagnosis and therapy of the disease are described here. Part of the work is devoted to autoantibodies, anti-tumor immunity as well as enolase and important division. The experimental part is focused on the optimization of the FW400 washing station, 2D-electrophoresis of patient sera and their subsequent immunoreactivity.

## **KEYWORDS**

Multiple myeloma, anti-ENOL, enolase, (auto)antibodies, immunodetection, 2D-electrophoresis

## OBSAH

Úvod.....	14
1 Teoretická část .....	15
1.1 Protinádorová imunita .....	15
1.1.1 Makrofágy .....	17
1.1.2 Dendritické buňky .....	18
1.1.3 T lymfocyty .....	20
1.1.4 Myeloidní supresorové buňky .....	20
1.1.5 Neutrofilý .....	21
1.1.6 NK buňky .....	22
1.1.7 B lymfocyty.....	22
1.2 Autoprotilátky .....	23
1.2.1 Podněty pro tvorbu autoprotilátek.....	23
1.2.2 Autoprotilátky jako časný biomarker nádorových onemocnění .....	24
1.2.3 Přirozené autoprotilátky .....	26
1.3 Mnohočetný myelom.....	28
1.3.1 Symptomy onemocnění mnohočetného myelomu .....	30
1.3.2 Diagnostika onemocnění mnohočetný myelom.....	31
1.3.3 Terapie.....	33
1.4 Enoláza .....	37
1.4.1 $\alpha$ – enoláza .....	38
1.4.2 $\gamma$ -enoláza .....	41
2 Cíle diplomové práce .....	44
3 Experimentální část.....	45
3.1 Přístroje a pomůcky .....	45
3.2 Seznam chemikálií a reagensů .....	46
3.3 Vzorky a buněčné linie .....	49

3.4	Příprava buněčného lyzátu .....	49
3.5	Rehydratace gelových proužků .....	50
3.6	Izoelektrická fokuzace – IEF.....	50
3.7	Polyakrylamidová gelová elektroforetická separace v prostředí SDS .....	51
3.8	Vizualizace proteinů na gelu po elektroforetické separaci.....	53
3.8.1	Barvení gelů dusičnanem stříbrným.....	53
3.9	Western blot s následnou imunodetekcí.....	54
3.10	Vizualizace proteinů na membráně po Western blotu.....	56
3.10.1	Barvení koloidním stříbrem .....	56
4	Výsledky a diskuze .....	57
4.1	Implementace promývací stanice FlexiWash 400 do metody SERPA .....	57
4.1.1	Optimalizace pracovního postupu.....	57
4.2	Analýza patientských sér metodou serologické proteomové analýzy .....	62
4.2.1	Vyhodnocení imunoreaktivity patientských sér s proteiny RPMI buněk.....	63
	Závěr .....	78
5	Použitá literatura .....	79



## Seznam obrázků:

Obrázek č. 1: Interakce složek IS s nádorovou buňkou .....	16
Obrázek č. 2: Makrofágy: Adaptabilní buňky, které mohou podporovat nebo zvrátit progresi rakoviny .....	17
Obrázek č. 3: Funkce neutrofilů u rakoviny.....	21
Obrázek č. 4: Buňky mnohočetného myelomu .....	28
Obrázek č. 5: Klinický management pacientů s nově diagnostikovaným mnohočetným myelomem.....	32
Obrázek č. 6: Množství buněk MM v závislosti na léčbě .....	34
Obrázek č. 7: Schematický přehled představuje interakci $\alpha$ -enoláza / plazminogen na povrchu buněk.....	39
Obrázek č. 8: Výsledek imunoblotové analýzy kontrolního pozitivního séra s proteiny RPMI buněčného lyzátu – membrána ošetřená dle programu č. 1 nebo 2; M – molekulový marker.....	59
Obrázek č. 9: Výsledek imunoblotové analýzy kontrolního pozitivního séra s proteiny RPMI buněčného lyzátu – membrána ošetřena dle programu č. 3; M – molekulový marker .....	59
Obrázek č. 10: Výsledek imunoblotové analýzy kontrolního pozitivního séra s proteiny RPMI buněčného lyzátu – membrána ošetřená dle programu č. 1 nebo 2; M – molekulový marker .....	60
Obrázek č. 11: Výsledek imunoblotové analýzy kontrolního pozitivního séra s proteiny RPMI buněčného lyzátu – membrána ošetřena dle programu č. 3; M – molekulový marker.....	60
Obrázek č. 12: Výsledky imunoblotové analýzy patientského séra (1-13-128) s proteiny RPMI buněčného lyzátu - výřezy výsledků reaktivity patientských sér odebraných v různých obdobích onemocnění na NC membránách.....	64
Obrázek č. 13: Výsledky imunoblotové analýzy patientského séra DG a DG+3 s proteiny RPMI buněčného lyzátu; (červeným kroužkem jsou ohraničeny imunoreaktivní skvrny (spoty) po vazbě anti-ENOL1 protilátek; modře ohraničené skvrny (lze i spoty) poukazují na nové cílové struktury (antigeny), proti nimž sérum pacienta vykazuje reaktivitu.....	64
Obrázek č. 14: Výsledky imunoblotové analýzy patientského séra DG+6 a DG+9 s proteiny RPMI buněčného lyzátu; (červeným kroužkem jsou	

- ohraničeny imunoreaktivní skvrny (spoty) po vazbě anti-ENOL1 protilátek; modře ohraničené skvrny (lze i spoty) poukazují na nové cílové struktury (antigeny), proti nimž sérum pacienta vykazuje reaktivitu. ....65
- Obrázek č. 15: Výsledky imunoblotové analýzy patientského séra CR a CR+3 s proteiny RPMI buněčného lyzátu; (červeným kroužkem jsou ohraničeny imunoreaktivní skvrny (spoty) po vazbě anti-ENOL1 protilátek. ....65
- Obrázek č. 16: Výsledky imunoblotové analýzy patientského séra CR+6 s proteiny RPMI buněčného lyzátu; (červeným kroužkem jsou ohraničeny imunoreaktivní skvrny (spoty) po vazbě anti-ENOL1 protilátek; modře ohraničené skvrny (lze i spoty) poukazují na nové cílové struktury (antigeny), proti nimž sérum pacienta vykazuje reaktivitu. ....66
- Obrázek č. 17: Výsledky imunoblotové analýzy patientského séra (1-13-130) s proteiny RPMI buněčného lyzátu - výřezy výsledků reaktivity patientských sér odebraných v různých obdobích onemocnění na NC membránách. ....68
- Obrázek č. 18: Výsledky imunoblotové analýzy patientského séra DG a DG+3 s proteiny RPMI buněčného lyzátu; modře ohraničené skvrny (lze i spoty) poukazují na nové cílové struktury (antigeny), proti nimž sérum pacienta vykazuje reaktivitu. ....68
- Obrázek č. 19: Výsledky imunoblotové analýzy patientského séra DG+6 a DG+9 s proteiny RPMI buněčného lyzátu. ....69
- Obrázek č. 20: Výsledky imunoblotové analýzy patientského séra DG+12 a DG+15 s proteiny RPMI buněčného lyzátu; modře ohraničené skvrny (lze i spoty) poukazují na nové cílové struktury (antigeny), proti nimž sérum pacienta vykazuje reaktivitu. ....69
- Obrázek č. 21: Výsledky imunoblotové analýzy patientského séra CR s proteiny RPMI buněčného lyzátu; modře ohraničené skvrny (lze i spoty) poukazují na nové cílové struktury (antigeny), proti nimž sérum pacienta vykazuje reaktivitu. ....70
- Obrázek č. 22: Výsledky imunoblotové analýzy patientského séra MM-15-41 s proteiny RPMI buněčného lyzátu - výřezy výsledků reaktivity patientských sér odebraných v různých obdobích onemocnění na NC membránách. ....71
- Obrázek č. 23: Výsledky imunoblotové analýzy patientského séra DG a DG+3 s proteiny RPMI buněčného lyzátu; (červeným kroužkem jsou ohraničeny

imunoreaktivní skvrny (spoty) po vazbě anti-ENOL1 protilátek; modře ohraničené skvrny (lze i spoty) poukazují na nové cílové struktury (antigeny), proti nimž sérum pacienta vykazuje reaktivitu.....	71
Obrázek č. 24: Výsledky imunoblotové analýzy patientského séra DG+6 a CR s proteiny RPMI buněčného lyzátu; (červeným kroužkem jsou ohraničeny imunoreaktivní skvrny (spoty) po vazbě anti-ENOL1 protilátek; modře ohraničené skvrny (lze i spoty) poukazují na nové cílové struktury (antigeny), proti nimž sérum pacienta vykazuje reaktivitu.....	72
Obrázek č. 25: Výsledky imunoblotové analýzy patientského séra CR+3 a CR+6 s proteiny RPMI buněčného lyzátu; (červeným kroužkem jsou ohraničeny imunoreaktivní skvrny (spoty) po vazbě anti-ENOL1 protilátek; modře ohraničené skvrny (lze i spoty) poukazují na nové cílové struktury (antigeny), proti nimž sérum pacienta vykazuje reaktivitu.....	72
Obrázek č. 26: Výsledky imunoblotové analýzy patientského negativního séra (C201009107368) s proteiny RPMI buněčného lyzátu.....	74
Obrázek č. 27: Výsledky imunoblotové analýzy patientského negativního séra (C201009107368) s proteiny RPMI buněčného lyzátu v různých časových intervalech.....	75
Obrázek č. 28: Kontrolní barvení NC membrány koloidním stříbrem; M - (molekulový marker), přítomné spoty odpovídají jednotlivým proteinům.....	76
Obrázek č. 29: Kontrolní barvení gelů AgNO <sub>3</sub> .....	77
<b>Seznam tabulek:</b>	
Tabulka č. 1: Nastavení IEF.....	51
Tabulka č. 2: Postup přípravy 12% a 5% polyakrylamidových gelů.....	52
Tabulka č. 3: Nastavený program na promývací stanici FW 400.....	55
Tabulka č. 4: Program č. 1 – nastavený program na promývací stanici FW4100.....	58
Tabulka č. 5: Program č. 2 – nastavený program na promývací stanici FW400.....	58
Tabulka č. 6: Program č. 3 – nastavený progra na promývací stanici FW400.....	58
Tabulka č. 7: Program č. 2 – nastavený program na promývací stanici FW400.....	60
Tabulka č. 8: Seznam testovaných patientských sér; DG – období diagnózy onemocnění; CR – kompletní remise.....	63

## **SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK:**

Ab – protilátka (z angl. Antibody)

Abs – protilátky (z angl. Antibodies)

BATF3 – Basic Leucine Zipper ATF-like transkripční faktor 3

cDC – konvenční dendritická buňka (z angl. Conventional Dendritic Cell)

CR – kompletní remise (z angl. Complete Remission)

CTL – cytotoxický T lymfocyt (z angl. Cytotoxic T Lymphocyte)

CytoF – cytometrie doby letu (z angl. Time of Fly Cytometry)

DC – dendritická buňka (z angl. Dendritic Cell)

DG – diagnóza (Diagnosis)

HRP – křenová peroxidáza (z angl. Horseradish Peroxidase)

IC – imunokomplex (z angl. Immunocomplex)

ICOS-L – indukovatelný kostimulační ligand (z angl. Inducible Co-stimulatory Molecule Ligand)

IDO – indolamin 2,3-dioxygenáza

IFN- $\gamma$  – interferon- $\gamma$

IgA – imunoglobulin A

IgG – imunoglobulin G

IgM – imunoglobulin M

IL – interleukin

Inf-DC – zánětlivé dendritické buňky (z angl. Inflammatory Dendritic Cell)

INF-I – interferon I

IS – imunitní systém (z angl. Immune System)

LPS – lipopolysacharid

MDSC – myeloidně supresorové buňky (z angl. Myeloid-Derived Suppressor Cells)

MHC – hlavní histokompatibilní komplex (z angl. Major Histocompatibility Complex)

MM – mnohočetný myelom (z angl. Multiple Myeloma)

moDC – monocytární dendritické buňky (z angl. Monocyte-Dendritic Cell)

NC – nitrocelulózoová (z angl. Nitrocellulose)

NK – buňky přirození zabíječi (z angl. Natural Killer)

NKT – buňky přirození zabíječi T buněk (z angl. Natural Killer T cells)

OX40-L – ligand OX40

pDC – plazmacytoidní dendritická buňka (z angl. Plasmacytoid Dendritic Cell)

PD-L1 – ligand buněčné smrti (z angl. Programmed Death-Ligand 1)

PDZ – PDZ vazebná doména (z angl. PDZ domain binding motif)

RNI – reaktivní dusíkaté meziprodukty (z angl. Reactive Nitrogen Intermediates)

ROI – reaktivní kyslíkové meziprodukty (z angl. Reactive Oxygen Intermediates)

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

SLP – specifický léčebný program

SPEP – elektroforéza sérových bílkovin (z angl. Serum Protein Electrophoresis)

TAA – antigeny asociované s nádory (z angl. Tumor-associated antigen)

TAM – makrofágy asociované s nádory (z angl. Tumor-associated macrophages)

TAN – neutrofilů asociované s nádory (z angl. tumor associated neutrophils)

Tc – cytotoxické T lymfocyty (z angl. cytotoxic T cell)

TCR – receptor T buněk (z angl. T Cell Receptor)

TGF – transformující růstový faktor (z angl. Transforming Growth Factor)

Th – pomocné T lymfocyty (z angl. T helper cell)

TNF – tumor nekrotizující faktor (z angl. Tumor Necrosis Factor)

UPEP – elektroforéza močových proteinů (z angl. Urine Protein Electrophoresis)

VAD – vincristin, adriamycin, dexametazon

ZEB2 – Zinc finger E box

## ÚVOD

Mnohočetný myelom (MM) je onemocnění patřící do skupiny běžných hematologických malignit. Jedná se o velmi častou diagnózu v hematologické onkologii, kdy příčinou MM je klonální proliferace plazmatických buněk, nazývány jako myelomové buňky, vyskytující se v kostní dřeni. Tyto buňky produkují monoklonální protilátky (paraprotein) spolu s cytokinovými změnami, jenž vedou až k poruchám krvetvorby (anémie) a k poruchám imunitního systému (IS) zejména na úrovni humorální imunity a poruchy koagulace. Zároveň dochází k odbourávání kostní hmoty spolu s těžkou osteoporózou a osteolytickými lézemi. Pro úspěšnou léčbu je nejdůležitější včasná diagnóza, kterou je mnohdy obtížné stanovit. Mnohočetný myelom se totiž vyznačuje tzv. chováním chameleona, a to může vést k pozdní diagnostice [1, 2].

Tato práce je zaměřena na MM a jeho symptomy, terapii a diagnostiku. V proteomice, což je vědecká disciplína zabývající se studií proteinů a jejich vlastností, se využívají elektromigrační a chromatografické metody. V případě potřeby identifikace jednotlivých proteinů je tato metoda spojována s hmotnostní spektrometrií, která kromě identifikace dokáže určit i strukturu proteinu. Pracovní postup této práce se řídí dle serologické proteomové analýzy (SERPA), která slouží k analýze imunoproteomu. Tato metoda se skládá z 2D-elektroforézy, Wester blotu, imunodetekce a hmotnostní spektrometrie. Výsledkem SERPA metody je identifikace autoprotilátek v séru pacienta.

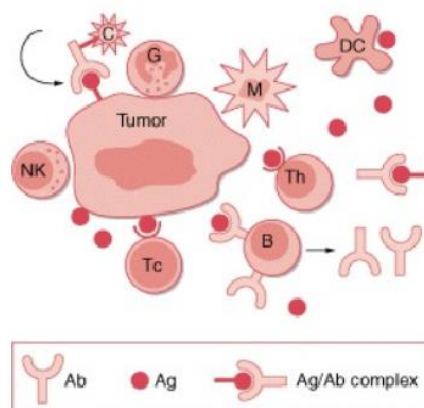
V experimentální části se práce zabývá analýzou patientských sér s MM v remisi. Náplní práce je mimo jiné implementovat novou promývací stanici FW400, která má usnadnit a urychlit pracovní postup metody SERPA. V rámci této části je práce věnována elektroforetickým metodám a metodám Western blot. Po provedení 2D-elektroforézy jsou proteiny přeneseny metodou Western blot na nitrocelulózovou membránu (NC) membránu, která je následně barvena koloidním stříbrem. U zbylých membrán je provedena imunodetekce pomocí promývací stanice FW400 za použití patientských sér. Výsledkem je průkaz specifických anti-ENOL autoprotilátek.

# 1 TEORETICKÁ ČÁST

## 1.1 Protinádorová imunita

Lidský imunitní systém mimo jiné také kontroluje růst nádorových buněk, a to převážně v brzkých stádiích karcinogeneze. Reakce imunitního systému na nádorovou buňku je komplexní a účastní se jí jak specifické, tak nespecifické imunitní mechanismy. Jednu z nejdůležitějších rolí zde mají dendritické buňky, které vyvolávají protinádorovou reakci, a to pouze v případě, pokud jsou dostatečně aktivovány. Pomocí dendritických buněk je provázána také imunoterapie pacientů, u kterých bylo již nádorové onemocnění prokázáno. V souvislosti s protinádorovou imunitou bylo provedeno mnoho studií, které ukázaly, že na regulaci progresu rakoviny se podílejí téměř všechny typy buněk imunitního systému, a to: T buňky, B buňky, NK (natural killer) buňky, NK-T (natural killer T cell) buňky, bazofily, neutrofilny, myeloidní supresorové buňky a více zmíněné dendritické buňky [3, 4].

Přestože většina hematopoetických buněk a některé tkáňové buňky mohou za určitých okolností eliminovat nádorové buňky, termín „protinádorové efektorové buňky“ se obecně používá k popisu lymfocytů specializovaných a vybavených pro eliminaci nádorových buněk. Tradičně byly rozpoznány dvě odlišné kategorie lidských protinádorových efektorových buněk: nádorově specifické a nádorově nespecifické. První kategorie zahrnuje klonálně expandované T lymfocyty exprimující jedinečný receptor T buněk (TCR) a rozpoznávající nádorové epitopy v kontextu molekul hlavního histokompatibilního komplexu (MHC). Tyto T lymfocyty spolu s B lymfocyty produkujícími nádorově specifické protilátky (Ab) a dendritické buňky (DC) zpracovávající a prezentující nádorové epitopy jsou odpovědné za adaptivní imunitu proti nádorům. Druhá kategorie efektorových buněk zahrnuje NK buňky, NK-T buňky a makrofágy. Tyto buňky nejsou v interakcích s nádorovými cíli omezeny molekulami MHC a zprostředkovávají vrozenou imunitu. Každý typ efektorových buněk, ať už specifických nebo nespecifických, obsahuje podmnožiny buněk v různých fázích diferenciaci a aktivace. To znamená, že každý typ efektoru, který je potenciálně schopen cílit na nádorové buňky, obsahuje heterogenní směs buněk s odlišnými funkčními schopnostmi v závislosti na jejich stupni diferenciaci, zrání nebo aktivace. Zůstává nejasné, který z těchto různých efektorů hraje hlavní roli při eliminaci nádorových cílů *in vivo*, ačkoli rozsáhlé důkazy *ex vivo* podporují jejich schopnosti eliminovat lidské nádorové buňky čerstvě získané z lidských nádorů nebo kultivované jako buněčné linie [5].



**Obrázek č. 1:** Interakce složek IS s nádorovou buňkou, převzato a upraveno z: [5]

Smrt nádorových buněk. Imunitní buňky, o nichž se předpokládá, že přímo nebo nepřímo přispívají k zániku nádorových buněk *in vivo*, zahrnují podskupiny cytotoxických (Tc) a pomocných (Th) T lymfocytů, aktivovaných NK buněk, makrofágů, granulocytů, DC a B lymfocytů, které se mohou diferencovat na plazmatické buňky produkující protilátky. Nádorově specifické protilátky (Abs) se mohou vázat na povrch nádorových buněk a zprostředkovat lýzi závislou na komplementu nebo vyvolat inhibici růstu. Imunokomplex Ag-Ab mohou být absorbovány DC, zpracovány a prezentovány jako peptidy spojené s molekulami MHC s Tc a Th lymfocyty. Tyto komplexní interakce imunitních buněk *in vivo* zahrnují specifické odpovědi na nádorové antigeny a nespecifické (vrozené) reakce, které by společně měly vést k odumření nádorových buněk [5].

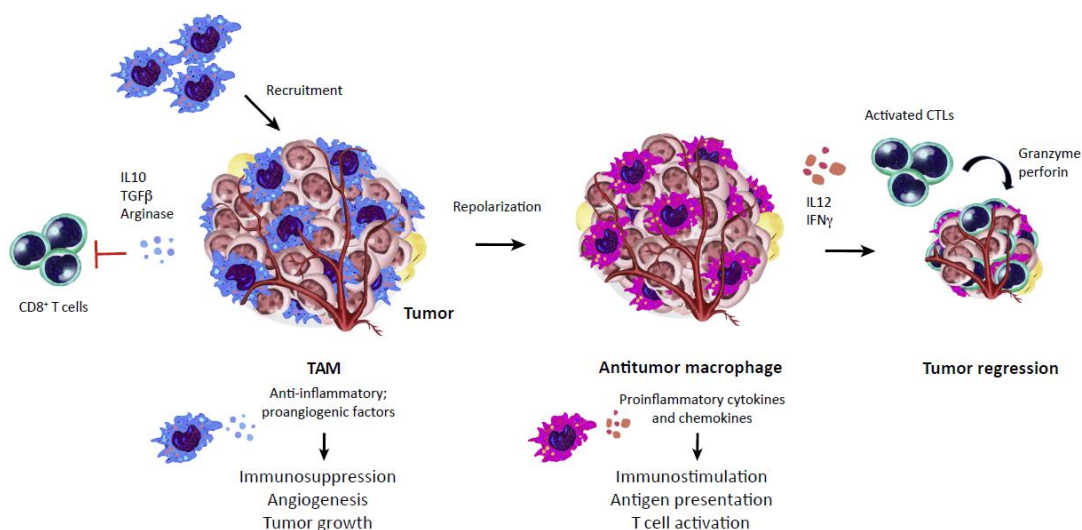
Vynikající specifická rozpoznávání antigenu imunitní odpovědí ramenem T lymfocytů poskytuje důležitý základ pro imunoterapii rakoviny. Schopnost rozlišovat nádorové buňky od normálních tkání je zásadní pro umožnění účinné destrukce nádoru při minimalizaci toxicity. Izolace T-buněk specifických pro nádor od pacientů s rakovinou skutečně podnítila hledání antigenů souvisejících s nádorem. Molekulární identifikace několika takových antigenů, zejména v lidském melanomu, umožnila uskutečnění strategií vakcín, které se konkrétně zaměřují na definované nádorové antigeny [6].



### 1.1.1 Makrofágy

Makrofágy jsou významné buňky imunitního systému. Jedná se o všestranné vrozené imunitní buňky, které přispívají k různým situacím, včetně obrany hostitele, homeostázy a patologie. I když vykazují fenotypovou a funkční rozmanitost, počáteční studie s definovanými stimuly *in vitro* ukázaly dva hlavní makrofágové aktivační nebo polarizační fenotypy. Například zánětlivé stimuly, jako je interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) + lipopolysacharid (LPS), indukují makrofágy na fenotyp M1 charakterizovaný produkcí zánětlivých cytokinů (např. Interleukin-12 (IL-12), tumor nekrotizující faktor (TNF), IL-6, IL-1, reaktivní dusíkaté a kyslíkové meziprodukty (RNI, ROI) a mikrobicidní funkce. Naproti tomu protizánětlivé stimuly, jako jsou IL-4, IL-13, IL-10 a glukokortikoidy nebo imunokomplexy (IC) + LPS, indukují makrofágy na fenotyp M2 charakterizovaný sníženou produkcí zánětlivých cytokinů, zvýšenou produkcí anti-zánětlivé cytokiny (např. IL-10) a faktory, které zprostředkovávají imunosupresi a remodelaci tkání. V situacích *in vivo* jsou však takové jasné fenotypy často rozmazané [6, 7].

V poslední době makrofágy byly klasifikovány na makrofágy rezidentní ve tkáni a zánětlivé makrofágy odvozené od monocytů. Makrofágy rezidentní v tkáni existují téměř ve všech tkáních a hrají zásadní roli v imunologickém dozoru a údržba homeostázy. Tyto jsou produkovány hematogenními prekurzorovými buňkami v pupečnickém vezikulu. Údajně periferní monocyty produkující chemokiny migrují do zanícené tkáně postkapilárními žilkami a dále jsou diferencovány na zánětlivé makrofágy. Tento typ makrofágů nejen aktivuje zánětlivou reakci, ale také podporuje reparaci a remodelaci tkání [7].



**Obrázek č. 2:** Makrofágy: Adaptabilní buňky, které mohou podporovat nebo zvrátit progresi rakoviny, převzato a upraveno z: [8]

Makrofágy se hromadí v nádorech proliferací z prekursorů rezidentů tkáně nebo přenosem z prekursorů odvozených z kostní dřeně. Jakmile jsou v nádorech, mohou tyto buňky přijmout fenotyp podporující nádor, který indukuje imunosupresi, angiogenezi, růst nádoru a metastázy. Strategie pro zlepšení léčby rakoviny jsou testovány a mohou zahrnovat (i) blokování náboru makrofágů asociovaných s nádory (TAM); (ii) indukce repolarizace TAM na imunostimulační fenotyp (relevantní cytokiny); a (iii) mechanismus zvýšení odpovědi na určitý stimul prezentace antigenu, který může stimulovat aktivaci cytotoxických T lymfocytů (CTL). Aktivované CTL pak mohou lyzovat maligní buňky a napomáhají tak potlačit nádorový růst [8].

### **1.1.2 Dendritické buňky**

DC jsou heterogenní populace antigen prezentujících buněk, které infiltrují nádory. Zatímco DC hrají zásadní roli při aktivaci a udržování lokální imunity, jejich funkce jsou často sníženy nebo potlačeny faktory, které se vyskytují v mikroprostředí nádoru. Kromě toho jsou DC populace s imunosupresivními aktivitami také přijímány do nádorů, což omezuje infiltraci T lymfocytů a podporuje růst nádorů. Protinádorové terapie mohou ovlivnit funkci DC spojeného s nádorem, anebo změnit jejich fenotyp. Proto by návrh účinných protinádorových terapií pro klinický překlad měl zvážit, jak nejlépe posílit funkci DC spojenou s nádorem k podpoře protinádorové imunity. Rodina DC zahrnuje několik DC podmnožin se specifickými imunitními funkcemi, které jsou vysoce konzervované mezi myši a lidmi. Během rakoviny jsou různé podtypy DC lokalizovány anebo přijímány do nádorů. Každý podtyp má svou charakteristickou roli a to, buď vyvolání zvýšené nádorové imunity nebo podpory tumorigenezi [9]. DC lze dělit do těchto skupin: plazmacytoidní DC, konvenční DC a zánětlivé DC.

#### **Plazmacytoidní DC**

Plazmacytoidní DC (pDC) jsou uznávány jako hlavní producenti interferonů typu I (IFN-I) a působí tak, že organizují imunitu proti virovým a bakteriálním infekcím způsobeným patogeny. U aterosklerózy se pDC podílejí na aktivaci vaskulárního zánětu a ateroskleróze produkcí IFN-I a chemokinů, které přitahují zánětlivé buňky do zanícených míst. V podmínkách rakoviny může pDC odvozený IFN-I podporovat protinádorovou imunitu prostřednictvím své přímé aktivity jak na nádorové, tak na imunitní buňky. pDC

také vylučuje řadu dalších zánětlivých cytokinů a chemokinů a můžou působit jako buňky prezentující antigen, avšak s nižší účinností než běžné DC (cDC). Prezentace antigenu pDC se do značné míry považuje za vyvolání tolerance indukce anergie nebo delece T lymfocytů. To je způsobeno schopností pDC vylučovat tolerogenní faktory, jako je IL-10, TGF- $\beta$  a indolamin 2,3 dioxygenáza (IDO). pDC také přispívají k prozánětlivé aktivaci efektorových T lymfocytů, cytotoxických T lymfocytů a běžných DC. Dále může pDC zapojit inhibiční receptory na T buňkách expresí několika jejich ligandů, včetně indukovatelného kostimulačního ligandu T-buněk (ICOS-L), ligandu OX40 (OX40-L) a programovaného ligandu buněčné smrti 1 (PD-L1) [9, 10].

### **Konvenční DC**

Konvenční DC (cDC) lze rozdělit do dvou populací u myši i lidí: cDC1 a cDC2. Myši cDC1 zahrnují většinu lymfoidních CD8<sup>+</sup> DC a tkáňových a migračních CD103<sup>+</sup> DC. Lidské cDC1 jsou definovány jako CD141<sup>+</sup> DC [11]. Myši i lidská cDC1 specificky exprimují povrchové markery Clec9A a XCR1 a pro svůj vývoj vyžadují transkripční faktory Basic Leucine Zipper ATF-like transkripční faktor 3 (BATF3), IRF8 a ID2. cDC2 jsou klasifikovány jako CD11b<sup>+</sup> DC u myši a CD1c<sup>+</sup> DC u lidí a jsou vývojově závislé na transkripčních faktorech IRF4 a Zinc finger E box vázající homeobox 2 (ZEB2). Je zajímavé, že nová lidská DC podmnožina exprimující Axl a Siglec6 byla nedávno identifikována sekvenováním jednobuněčné RNA a cytometrií podle doby letu (CyTOF). Ačkoli se Axl<sup>+</sup> DC klastr blíží pDC, diferencují se na buňky podobné cDC při kultivaci se stromálními buňkami a DC hematopoetiny, což naznačuje, že mohou být prekurzory cDC. Funkční analýzy také zdůrazňují úzký vztah mezi Axl<sup>+</sup> DC a cDC [9, 12].

### **Zánětlivé DC (Inf-DC)**

Zánětlivé DC (inf-DC), také označované jako DC odvozené od monocytů (mo-DC), chybí ve tkáních v ustáleném stavu a odlišují se od monocytů během zánětu, infekce a rakoviny. Jejich fenotyp u myši je charakterizován expresí několika makrofágových markerů, jako jsou F4/80, Ly6C, CD64 a Fc $\epsilon$ R1. Jejich lidské homology byly identifikovány v několika tkáních a lymfatických orgánech pacientů se zánětlivými onemocněními, ale také ve tkáních od zdravých dárců. Na základě jejich genového podpisu jsou lidské inf-DC považovány za *in vivo* ekvivalenty *in vitro* odvozeného moDC, které byly široce používány ve výzkumu DC a v klinických podmínkách pro očkování. Myši inf-DC může křížově prezentovat antigeny na CD8<sup>+</sup> T buňkách a je schopen vyvolat Th1 a

Th2 reakce v závislosti na zánětlivých podmínkách. Lidské inf-DC mají křížovou prezentaci a jsou potencionálními induktory Th17 v kokulturách s alogenními CD4<sup>+</sup> T buňkami [9, 13].

### 1.1.3 T lymfocyty

T lymfocyty jsou klíčovými hráči v imunitní odpovědi hostitele na rakovinu. Na jedné straně aktivované CD8<sup>+</sup> T lymfocyty mají přímý a silný cytotoxický účinek na nádorové buňky. Na druhou stranu se aktivované CD4<sup>+</sup> T lymfocyty diferencují na efektorové podtypy, které buď podporují nebo potlačují růst rakoviny. Například buňky CD4<sup>+</sup> Th1 prostřednictvím sekrece IFN- $\gamma$  mohou aktivovat makrofágy a NK buňky k vyvolání protinádorové odpovědi, zatímco buňky CD4<sup>+</sup> Th2 a buňky Treg mohou podporovat imunosupresi vyvolanou nádorem. V závislosti na kontextu mohou buňky Th17 buď podporovat nebo inhibovat progresi nádoru. Chápání důležitosti CD4<sup>+</sup> T lymfocytů při reaktivaci imunitních odpovědí se v uplynulém desetiletí dramaticky zvýšilo. Tato rodina lymfocytů se skládá z různých podskupin od buněk IFN- $\gamma$  produkujících Th1 až po T-regulační buňky TGF- $\beta$ , které mají v modulaci imunitních reakce na patogeny, nádorové buňky a vlastní antigeny [4, 14].

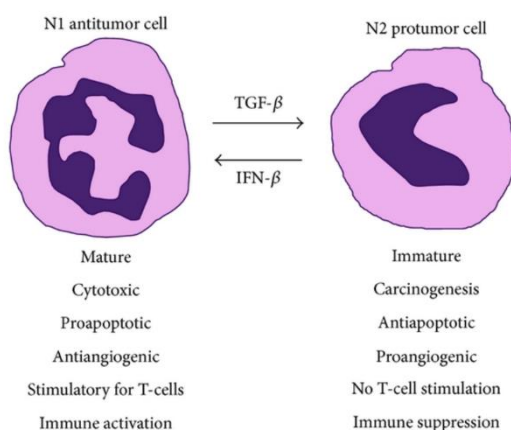
### 1.1.4 Myeloidní supresorové buňky

Myeloidní supresorové buňky (MDSC) jsou heterogenní nezralé myeloidní buňky, které jsou silnými inhibitory funkce imunitních buněk a které se hromadí za zánětlivých podmínek, zejména u rakoviny. Tyto buňky jsou funkčně definovány svou silnou imunosupresivní aktivitou na T buňky. Předpokládá se, že MDSC podporují růst rakoviny jednak zlepšením angiogeneze nádoru a metastáz, ale také inhibicí protinádorových imunitních odpovědí. MDSC se u nositelů nádorů značně rozšiřují a původně byly u myši nesoucích nádor charakterizovány fenotypem CD11b<sup>+</sup> Gr1<sup>+</sup>. Přítomnost nedostatečných anebo vadných protinádorových adaptivních a vrozených imunitních odpovědí, shodná s akumulací MDSC v lymfatických orgánech a parenchymu nádoru, podporuje představu kauzálního vztahu. Silná schopnost MDSC inhibovat několik složek a fází imunitní odpovědi zdůrazňuje pravděpodobnost, že cílení na inhibiční funkce MDSC může maximalizovat terapeutický potenciál protinádorové imunoterapie. Aby bylo možné řídit racionální vývoj imunoterapeutických strategií, které zahrnují inhibici aktivity MDSC a enzymatické funkce, je nutné důkladné pochopení role MDSC v protinádorových imunitních reakcích. MDSC se klasifikují na monocytární MDSC a granulocytární MDSC, které mohou indukovat potlačení antigenu aktivovaných CD8<sup>+</sup> T lymfocytů [4, 15].

### 1.1.5 Neutrofilý

Neutrofilý byly dlouho považovány za krátkodobé, nespecifické bílé buňky, které tvoří hnis a také náhodou zabíjejí napadající mikroby. Ve skutečnosti byly neutrofilý často zanedbávány (a do značné míry se o nich neuvažovalo) jako o imunitních buňkách. Tento historický pohled na neutrofilý se za posledních několik desetiletí značně změnil a nyní víme, že kromě toho, že hrají převládající roli při odstraňování bakterií a plísní, mají také hlavní roli při formování reakce hostitele na infekci a homeostázu imunitního systému. Změna pohledu na roli neutrofilů v imunitním systému byla z velké části způsobena studiem těchto buněk *in vitro*. Neutrofilý jsou nejhojnější leukocyty v krvi a jsou považovány za první linii obrany během zánětů a infekcí [16].

Kromě toho se zde také nacházejí neutrofilý infiltrující mnoho typů nádorů a je nám také známo, že nádory uvolňují chemokiny, které přijímají neutrofilý. Tyto neutrofilý se začnou vyskytovat až za patologických stavů, v tomto případě při nádorovém bujení. Neutrofilý asociované s nádory (TAN) mohou mít jak pro-, tak protinádorové účinky. Avšak v dnešní době s rostoucími klinickými důkazy víme, že TAN korelují spíše se špatnou prognózou. Mikroprostředí nádoru řídí nábor neutrofilů a TAN zase napomáhají progresi nádoru. V nepřítomnosti TGF- $\beta$  odvozeného z nádoru podporovaly TAN reakce CD8 + T lymfocytů a protinádorovou aktivitu, zatímco v přítomnosti TGF- $\beta$  vykazovaly aktivitu podporující nádor. TAN mimo jiné produkují několik faktorů, jako je argináza 1, ROI, katepsiny, MMP a pro-angiogenní cytokiny, které podporují růst nádorů, angiogenezi a metastázy [4, 17].



**Obrázek č. 3:** Funkce neutrofilů u rakoviny [18]

Funkce neutrofilů u rakoviny je diktována podněty prostředí. Neutrofilů lze rozdělit na N1 protinádorové a N2 pronádorové buňky.  $TGF\beta$  je silným činitelem přechodu z fenotypu N1 na N2, zatímco  $IFN-\beta$  je silným činitelem přechodu v opačném směru. Toto je příkladem představy, že funkce neutrofilů u rakoviny je určena chemokinovým prostředím v mikroprostředí [18].

### 1.1.6 NK buňky

Jedná se o lymfocyty vrozeného imunitního systému, které monitorují buněčné povrchy autologních buněk aberantně exprimují molekuly MHC třídy I a markery buněčného stresu. Od svého prvního popisu před více než 50 lety se NK buňky podílejí na imunitní obraně proti nádorům. NK buňky produkují  $IFN-\gamma$  a cytotoxických molekul, jako je granzym, hrají nedílnou roli při aktivaci protinádorové odpovědi T lymfocytů a zabíjení nádorových buněk. Studie ukázaly, že v primárních myších NK buňkách využívají hlavně oxidativní fosforylaci za klidových podmínek a při krátkodobé aktivaci. Při prodloužené kultivaci s vysokou dávkou IL-15 však NK buňky vykazovaly zvýšený glykolytický metabolismus. To bylo prokázáno v souladu s dalšími studiemi, která potvrdila, že NK buňky po aktivaci vykazují zvýšenou glykolýzu. Ukázalo se, že glykolýza reguluje expresi granzymu B a  $IFN-\gamma$  aktivovanými NK buňkami. V mikroprostředí nádoru by hypoxie a IL-15 podporovaly glykolýzu v NK buňkách a podporovaly jejich protinádorovou aktivitu [4, 19].

Přesvědčivé důkazy o prospěšné úloze NK buněk při kontrole lidských malignit pocházejí z klinických studií pacientů s leukémií, kteří dostávali aloreaktivní NK buňky v průběhu transplantace alogenních hematopoetických kmenových buněk. Zde bylo zaznamenáno pozoruhodné zvýšení přežití a ochrany před relapsem u myeloidní leukémie u pacientů postrádajících ligandy HLA třídy I pro receptory podobné Ig jako dárcovské inhibiční buňky [19].

### 1.1.7 B lymfocyty

B lymfocyty prostřednictvím produkce protilátek a imunitních komplexů mohou modulovat funkci myeloidních buněk tak, aby podporovaly progresi nádoru. Je však známo, že lymfocyty infiltrující nádor jsou rozhodující pro řízení progresu nádoru. I když role T lymfocytů byla rozsáhle studována, funkce B lymfocytů v této souvislosti je stále nejasná [4, 20].

## 1.2 Autoprotilátky

Protilátky, které reagují s vlastními molekulami, se mohou vyskytovat jak u zdravých, tak i nemocných jedinců a jsou označovány jako přirozené autoprotilátky nebo s patologií spjaté autoprotilátky. Přirozené autoprotilátky jsou hlavně třídy IgM a vykazují mírnou afinitu k vlastním antigenům. Poskytují první linii obrany proti infekcím, díky své široké polyspecifitě zajišťují likvidaci vlastních buněk, přestárých, poškozených, infikovaných a přispívají k homeostáze imunitního systému. Naproti tomu vysoce afinitní somaticky mutované autoprotilátky IgG odrážejí patologický proces, při kterém jsou narušeny homeostatické dráhy související se zbavováním se odumřelých buněk, signalizací antigen-receptor nebo buněčnými efektorovými funkcemi. U některých autoimunitních poruch mohou být autoprotilátky přítomny před nástupem onemocnění. Mohou také vykazovat specifitu a sloužit jako biomarkery poskytující příležitost pro diagnostiku a terapeutický zásah. U orgánově specifických autoimunitních onemocnění, jako je například myasthenia gravis nebo pemfigus vulgaris, se autoprotilátky přímo vážou na cílové orgány a poškozují je. U systémových autoimunitních onemocnění reagují autoprotilátky s volnými molekulami, jako jsou fosfolipidy nebo také s buněčnými povrchovými a nukleoproteinovými antigeny, přičemž vytvářejí patogenní komplexy antigen – protilátka (imunokomplex). Tyto autoprotilátky poškozují tkáň a orgány prostřednictvím zapojení FcγR aktivace komplementu, jakož i internalizace a aktivace Toll podobných receptorů. Aktivace intracelulárních Toll-podobných receptorů v plazmacytoidních dendritických buňkách vede k produkci interferonu typu I, zatímco zapojení intracelulárních Toll-podobných receptorů na buňky prezentující antigen stimuluje aktivaci buněk a produkci dalších zánětlivých cytokinů. Imunitní komplexy tedy mohou udržovat smyčku pozitivní zpětné vazby zesilující zánětlivé reakce [21].

### 1.2.1 Podněty pro tvorbu autoprotilátek

Přítomnost autoprotilátek vysoce specifických pro cílové struktury u orgánově specifických autoimunitních onemocnění, jako je tyreoiditida, diabetes mellitus 1. typu a primární biliární cirhóza, silně naznačuje, že autoprotilátky jsou stimulovány zánětem v cílovém orgánu, i když zkřížená reaktivita s mikrobiálními antigeny nelze vyloučit. Vlastní posttranslačně modifikované antigeny vyvolávají syntézu autoprotilátek, které jsou vysoce specifické a objevují se ve vysokých titrech. Jejich výskyt lze použít k určení prognózy průběhu onemocnění. U systémových autoimunitních onemocnění, jako je systémový lupus, je původ autoprotilátek méně jasný, protože protilátky nejsou specifické pro

buněčný typ a ovlivňují více cílových struktur, orgánů. Jak bylo diskutováno později, genetické modely naznačují, že autoprotilátky proti intracelulárním antigenům mohou být stimulovány nadměrnou antigenní aktivitou. Mohou vznikat v závislosti na uvolněných antigenech z umírajících buněk, stejně jako zesílenými odpověďmi spojenými s vnitřními abnormalitami v B nebo T lymfocytech [21].

### **1.2.2 Autoprotilátky jako časný biomarker nádorových onemocnění**

Rakovinové buňky mohou vyvolat imunologickou odpověď vedoucí k produkci autoprotilátek asociovanými s nádory (TA). Tyto sérové imunobiomarkery byly detekovány u mnoha druhů rakoviny v rané fázi před rozvojem klinických příznaků. Jejich měření je minimálně invazivní a nákladově efektivní oproti pozdní diagnostice onemocnění. TA autoprotilátky jsou přítomny u významného počtu jedinců a mohly by doplnit současné způsoby screeningu, aby napomohly včasné diagnostice u vysoce rizikových populací a pomohly při klinické léčbě pacientů [22].

Od jejich objevu byly identifikovány stovky TA autoprotilátek. I když ne všechny TA antigeny vyvolávají imunitní odpověď u všech jedinců, a ne všechny imunitní odpovědi mohou být specifické pro nádorové onemocnění. Zdá se, že měření TA autoprotilátek má smysl využívat jako alternativní metoda pro detekci rakoviny za předpokladu, že hladiny jsou vyšší u jedinců s nádory, než u zdravých jedinců a osob s benigními typy nádoru [23, 24].

Autoprotilátky se v současné době projevují jako silní kandidáti na klinicky užitečné biomarkery při identifikaci rakovinných onemocnění. Produkují se brzy a to již při vývoji či růstu nádoru. Někdy jsou měřitelné až 5 let před rozvojem klinických příznaků [25, 26]. Protilátky přetrvávají v oběhu obvykle až 30 dnů a jsou mnohem stabilnější mimo tělo než jiné biomarkery. TA autoprotilátky jsou zaznamenatelné v archivním materiálu a pro detekci nevyžadují nákladné nebo složité technologie. Pro jejich kvantifikaci již existují kvantifikační platformy, které jsou dnes běžně klinicky používány [27].

Autoantigeny jsou dobře známé biomarkery pro klinickou diagnostiku některých autoimunitních poruch. TA antigeny jsou v současnosti nejčastěji měřeny biomarkery během léčby onkologických pacientů. Často však mají malou vypovídající hodnotu u časných onemocnění, protože sérové hladiny rostou s velikostí nádoru, což omezuje jejich klinické použití na sledování léčby a recidivy nemoci [22, 28].



## ***In vivo* produkce TA autoprotilátek**

### B lymfocyty

Všechny nezralé B buňky, které se během zrání v kostní dřeni vážou na vlastní antigeny, podstoupí negativní selekci, včetně klonální delecce, a jsou odstraněny z buněčného souboru. Výsledkem je imunologická tolerance k sobě samému, kde by zralé B lymfocyty měly vázat pouze antigeny jiné než vlastní. T lymfocyty procházejí podobným selekčním procesem, který tento proces dále upevňuje, protože aktivace B lymfocytů závisí na kostimulačních signálech z aktivovaných T lymfocytů. Protilátky v séru nemají tendenci procházet plazmatickými membránami, a proto jsou převážně vystaveny povrchovým extracelulárním proteinům. To má za následek toleranci B lymfocytů převážně k extracelulárním proteinům, přičemž tolerance k intracelulárním proteinům je méně pravděpodobná [22].

Imunitní odpověď u rakoviny je pravděpodobně iniciována změnami v nádoru, které mají za následek zvýšenou schopnost vyvolat humorální nebo buněčnou imunitní odpověď vlastních antigenů nebo ztrátu imunitní intolerance. Nyní je nevyvratitelné, že do tohoto procesu jsou zapojeny B lymfocyty a TA autoprotilátky. B lymfocyty infiltruující nádory byly nalezené až u 25 % nádorů. Existují také důkazy, že snížení odpovědi na stimulaci u regulačních T lymfocytů může vést k opačnému ději, a to ke zvýšení odpovědi na určitý stimul u B lymfocytů a TA autoprotilátek s příznivými výsledky pro některé druhy rakoviny [29, 30].

### TA autoprotilátky

Autoprotilátky proti TA byly popsány u většiny lidských malignit jak v časném, tak v pozdním stadiu onemocnění a mohou mít diagnostický i prognostický význam. Mechanismy jejich sekrece nebyly jasně stanoveny, avšak k jejich produkci pravděpodobně dochází v důsledku zvýšená schopnost vyvolat humorální nebo buněčnou imunitu odpovídajícího antigenu. K tomu dochází prostřednictvím mechanismů, jako jsou mutace, které mají za následek například generování nových nebo změněných epitopů, abnormálně vysoké hladiny exprese (vedoucí ke ztrátě intolerance) nebo expozice antigenům obvykle exprimovaným v imunitně privilegovaných místech (např. Fetální proteiny). Tyto mechanismy by mohly umožnit detekci extracelulárního a intracelulárního proteinu hostitele pomocí B lymfocytů a protilátek. Proběhlé studie dokázaly, že většina TA autoantigenů je nadexprimovaných nebo mají pozměněné proteiny (42 %

cytoplazmatických, 26,1 % odvozených od nukleových kyselin, 21,4 % vázaných na membránu a 10,3 % extracelulárních) [31]. Specifičnost TA autoprotiilátek pro intracelulární molekuly spíše, než pro jejich obvyklejší terč na buněčném povrchu není zcela objasněna. Existují však důkazy, že prozánětlivé prostředí, jako je rakovina, může zvýšit vaskulární propustnost pro autoprotiilátky a cytoplazmatické proteiny [32, 33].

TA autoprotiilátkové epitopy mohou být vysoce zachované. Bylo také identifikováno mnoho postupně diskontinuálních epitopů B lymfocytů, což naznačuje, že epitopy jsou často závislé na konformaci [34, 35]. To by mohlo být charakteristické pro epitopy umístěné na funkčních místech antigenu, a tak by TA autoprotiilátky inhibovaly funkci antigenu při vazbě na antigen, jak je pozorováno ve studiích *in vitro*. Je zajímavé, že TA autoprotiilátky se často mohou vázat na nezměněnou i modifikovanou formu proteinu, který vyvolal jejich produkci pravděpodobně v důsledku šíření epitopu. V sérech pacientů jsou detekovány hlavně TA autoprotiilátky třídy IgG, což naznačuje silnou sekundární imunitní odpověď. Existují také důkazy, že izotypy mohou během progresu rakoviny přecházet ze zánětlivých na protizánětlivé efektorové funkce [36, 37].

Role TA autoprotiilátek je do značné míry nedefinovaná, ale je pravděpodobné, že přispějí k imunitní odpovědi na nádorové onemocnění několika způsoby, včetně typických funkcí efektoru protiilátky. Jedinci s autoimunitními poruchami mohou mít vyšší riziko vzniku rakoviny a mnoho TA autoantigenů je onkogenních se souvisejícími titry TA autoprotiilátek. Tato zjištění dále potvrzují hypotézu, že TA autoprotiilátky jsou imunologické biomarkery buněčných mechanismů spojených s tumorigenezí [27, 38].

### 1.2.3 Přírozené autoprotiilátky

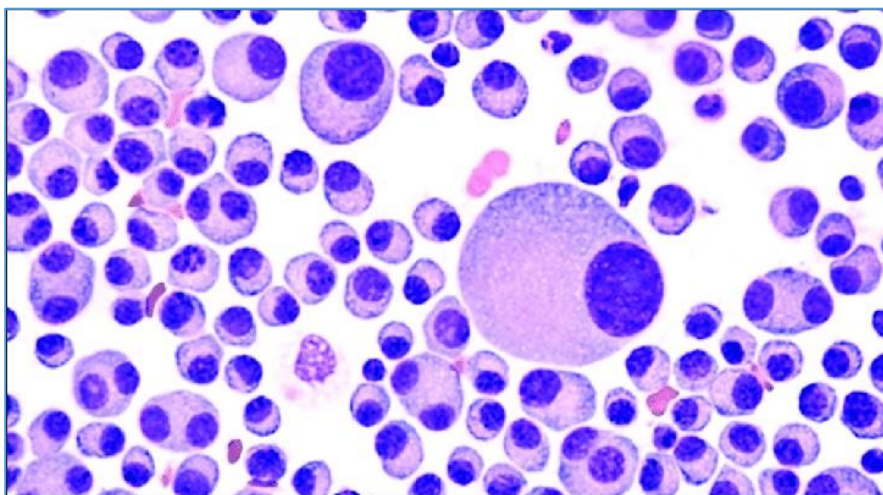
Protilátky, které se vážou na různé exogenní antigeny, například na bakterie, viry a houby, stejně jako na vlastní antigeny (např. Nukleové kyseliny, fosfolipidy, erythrocyty, sérové proteiny, buněčné složky, inzulin nebo tyroglobulin) tvoří významný podíl imunoglobulinů u zdravých jedinců. Jelikož vznikají nezávisle na přirozené či záměrné imunizaci, jsou označovány jako přirozené protiilátky nebo autoprotiilátky. Vzhledem ke své široké reaktivitě na širokou škálu mikrobiálních složek mají přirozené protiilátky hlavní roli v primární linii obrany proti infekcím. Jelikož také rozpoznávají různé vlastní antigeny, hrají roli ve vývoji B-lymfocytů a homeostáze imunitního systému [39, 40].

Nejpřirozenější autoprotilátky jsou IgM a polyreaktivní, to znamená, že se vážou na několik nepříbuzných antigenů, obvykle se střední vnitřní afinitou, i když existují také přirozené mono-reaktivní protilátky. Navzdory nízké až střední vnitřní afinitě jejich vazebná místa pro antigeny mají díky své valenci přirozené IgM protilátky vysokou celkovou vazebnou aviditu, což je vlastnost, díky níž jsou tyto protilátky velmi účinné při vazbě antigenů s opakující se strukturou na povrchu buněk, tkání, bakterií a virů. Přirozené autoprotilátky jsou produkovány hlavně (CD5 +) B-1 buňkami, převládajícími lymfocyty v repertoáru neonatálních B lymfocytech a B lymfocytů v marginální zóně. Lymfocyty B-1 jsou vysoce účinné při prezentaci antigenu a mohou hrát důležitou roli při produkci patogenních autoprotilátek u několika autoimunitních onemocnění, včetně revmatoidní artritidy, Sjögrenova syndromu, primárního antifosfolipidového syndromu a systémového lupusu [41, 42].

### 1.3 Mnohočetný myelom

Mnohočetný myelom byl znám již od starověku. První dobře zdokumentovaný případ ohlásil v roce 1844 lékař Samuel Solly. Nejznámějším případem je případ Thomase Alexandera McBeana, vysoce váženého obchodníka z Londýna z roku 1850. Pan McBean vylučoval velké množství bílkovin, které popsal Henry Bence Jones v polovině 19. století. Jones byl známý lékař a hodně přispěl k vývoji medicíny. Jedním z nejznámějších případů mnohočetného myelomu byl případ doktora Loose, který zaznamenal Otto Kahler. Bylo podrobně popsáno rozpoznání plazmatických buněk a následně jejich produktu, a to monoklonálního proteinu. MM je hned po non-Hodgkinských lymfomech druhou nejčastější hematologickou malignitou. Toto onemocnění je tvořeno asi 1 % všech malignit a 10 až 15 % hematologických malignit [43, 44].

Jelikož je toto onemocnění mnohdy obtížné diagnostikovat, Česká myelomová skupina v roce 2007 vytvořila projekt s názvem CRAB. Tento název byl inspirován základními projevy MM a to C (hyperkalcémie), R (Renální postižení), A (Anemie), B (Bone – kostní postižení). Buňky mnohočetného myelomu se liší od zdravých plazmatických buněk, z důvodu zachování jejich potenciálu pro návrat do nižšího proliferačního stavu [1, 2].



**Obrázek č 4:** Buňky mnohočetného myelomu [45]

MM je onemocnění, které dělíme do jednotlivých stádiích, a to dle Durieho a Salmona. Podle zařazení pacienta do jednoho z 3 stádií se zahájí léčba.

1. Stadium – jsou zde splněny níže uvedené parametry.
  - a. Koncentrace hemoglobinu menší než 100 g / l.
  - b. Koncentrace Ca do 3 mmol / l.
  - c. Normální kostní struktura anebo solitární kostní ložisko plazmocytomu.
  - d. Relativně nízká koncentrace M-Ig:
    - M – IgG menší než 50 g/l.
    - M – IgG menší než 30 g/l.
    - Exkrece lehkých řetězců v moči do 4 g / 24 hodin.
2. Stadium – nejsou splněny podmínky prvního ani třetího stadia.
3. Stadium – je splněna alespoň jedna z následujících podmínek.
  - a. Koncentrace hemoglobinu je menší než 85 g / l.
  - b. Zvýšená koncentrace Ca nad 3 mmol / l.
  - c. Více než 3 osteolytická ložiska.
  - d. Vysoká koncentrace M – Ig:
    - M – IgG menší než 70 g / l.
    - M – IgA menší než 50 g / l.
    - Vyloučení více než 12 g lehkých řetězců moče za 24 hodin.

V další řadě se také řídíme dle mezinárodního prognostického indexu pro mnohočetný myelom, kdy máme také 3 klinická stadia.

1. Klinické stadium –  $\beta 2$  – mikroglobulin  $< 3,5$  a albumin  $> 35$  g / l nebo = 35 g / l.
2. Klinické stadium –  $\beta 2$  – mikroglobulin  $< 3,5$  a albumin  $< 35$  g / l nebo = 35 g / l. nebo beta2-mikroglobulin 3,5 – 5,5 a albumin  $> 35$  g / l nebo = 35 g / l.
3. Klinické stadium –  $\beta 2$  – mikroglobulin  $> 5,5$  [46].

### **Progenitory myelomu a kmenové buňky**

Terapie např. s využitím transplantace kmenových buněk se zdá být nedostatečnou, proto probíhá výzkum s cílem určit způsob, jak vymýtit podskupinu nádorových buněk, která doplňuje nádor, a to i po léčbě vysokými dávkami melfalanu. S použitím modelů sériových transplantací a klonogenních *in vitro* testů, bylo naznačeno, že myelomová kmenová buňka je součástí podskupiny CD38<sup>-</sup>, CD19<sup>+</sup>, CD27<sup>+</sup> prekurzorů B lymfocytů, které nevyjadřují klasické markery mnohočetného myelomu CD38 nebo CD138. Zatím

tato vyšetřování nevedla k jasnému určení struktury kmene mnohočetného myelomu a progenitorových buněk sítě, potřebné k efektivnější léčbě [47, 2].

### **1.3.1 Symptomy onemocnění mnohočetného myelomu**

Nejčastější symptomatické klinické projevy mnohočetného myelomu jsou anémie, časté infekce, lytické nebo osteopenické onemocnění kostí nebo selhání ledvin. Pacienti s mnohočetným myelomem můžou být také diagnostikovány asymptomaticky, a to při náhodném vyšetření. Obecně se onemocnění diagnostikuje v dřívější fázi než v minulosti [48]. Typická je bolest zad zejména u starších pacientů, nebo se může objevit nejasné anémii typická pro MM. Standardní vyšetření zahrnuje stanovení celkových bílkovin v séru a moči. Dále se provádí další laboratorní metody, jakými jsou proteinová elektroforéza (SPEP a UPEP), imunofixace sloužící k detekci imunoglobulinových volných lehkých řetězců v séru a následně se stanovují i další parametry: kompletní krevní obraz, sérový kreatinin a elektrolyty včetně vápníku, laktátdehydrogenázy a  $\beta$ 2 mikroglobulinu. U pacienta s podezřením na toto onemocnění se odebírá vzorek kostní dřeně, a to aspirací nebo biopsií. Pokud je monoklonální protein detekován a plazmatický počet je vyšší nebo roven 10 %, jedná se diagnózu vznikajícího MM. Stejná diagnóza platí pro pacienty s počtem plazmatických buněk menší než 10 %, ale zároveň s výskytem monoklonálních bílkovin vyšší nebo rovno hodnotě 3 g/100 ml [49]. U pacientů bez sekrečního mnohočetného myelomu, je diagnostikováno na základě přítomnosti více než 30 % plazmatických buněk kostní dřeně nebo detekce plazmacytomu při biopsii. Jedinečná léze plazmatických buněk v kosti nebo na povrchu kosti s méně než 10 % plazmatických buněk, infiltrace kostní dřeně a nízký počet monoklonálních bílkovina je definováno jako solitérní plazmocyto. Jedná se o poruchu výrazně odlišnou od systémového mnohočetného myelomu jak z hlediska prognózy, tak léčby. U pacientů s diagnózou mnohočetného myelomu je odlišný vývoj poškození orgánů. Podle toho se řídí indikace léčby. Mnohočetný myelom bez poškození konečných orgánů je označován jako doutnající mnohočetný myelom. Více pacientů s myelomem by měli mít kompletní radiografický skelet [2,50].

Pro rok 2020 v České republice je incidence tohoto onemocnění 2,65/100000 obyvatel a nejčastěji jsou postiženi lidé ve věku 75 – 79 let. V tomto věkovém rozmezí je incidence 15,57/100000 obyvatel. U lidí ve věkovém rozmezí 20 – 40 let se tato nemoc vyskytuje velmi zřídka [51].

Příznaky MM lze shrnout do 5 kategorií. Jakmile je jeden z těchto bodů prokázán jako pozitivní, je třeba pokračovat v diagnostickém procesu s cílem potvrdit či vyvrátit maligní původ potíží. Pokud by došlo k potvrzení podezření na MM, pacient je odeslán na hematologické pracoviště [52].

#### 1. Příznaky destrukce kostí

- V tomto případě se pacienti často setkávají s dlouho trvajícím bolestí páteře, či jiných částí skeletu, jako například bolesti žeber a kyčlí. Důkazem, že se jedná o maligní onemocnění, je rostoucí intenzita bolesti na daných místech. Dalším typickým projevem je klidová a noční bolest páteře či jiných částí skeletu.

#### 2. Projevy oslabené imunity či funkce kostní dřeně

- Nejběžnějším ukazatelem je opakovaná nebo dlouhodobá infekce, anemie, typicky normochromní s výskytem leukopenie a trombocytopenie.

#### 3. Zhoršení funkce ledvin

- Často specifický vzestup kreatininu nebo proteinurie vedoucí až v nefrotický syndrom s oboustrannými otoky nohou.

#### 4. Dlouhodobá vysoká hodnota sedimentace erytrocytů

- S tímto je i často spojená zvýšená koncentrace celkové bílkoviny v plazmě.

#### 5. Hyperkalcemie

- Spolu s hyperkalcemií jsou zde typické klinické příznaky, a to polyurie vedoucí k dehydrataci, nevolnost či hlubší porucha vědomí [1].

Z těchto bodů se nadále lékař rozhoduje na následujícím souboru základních vyšetření, kam patří rentgenové vyšetření skeletu v bolestivé lokalizaci, vyšetření sedimentace erytrocytů (vysoká sedimentace), krevní obraz, základní biochemické vyšetření krve i moči, kvantitativní vyšetření imunoglobulinů IgM, IgG, IgA v séru a elektroforéza bílkovin séra zaznamenávající monoklonální imunoglobulin. Pokud jsou veškeré laboratorní vyšetření v normě, snižuje to pravděpodobnost výskytu onemocnění, avšak se stále může jednat o vzácný typ nesekrečního myelomu, kdy dochází k tomu, že nediferencované plazmocyty ztrácí schopnost vytvářet a produkovat imunoglobulin [1, 53].

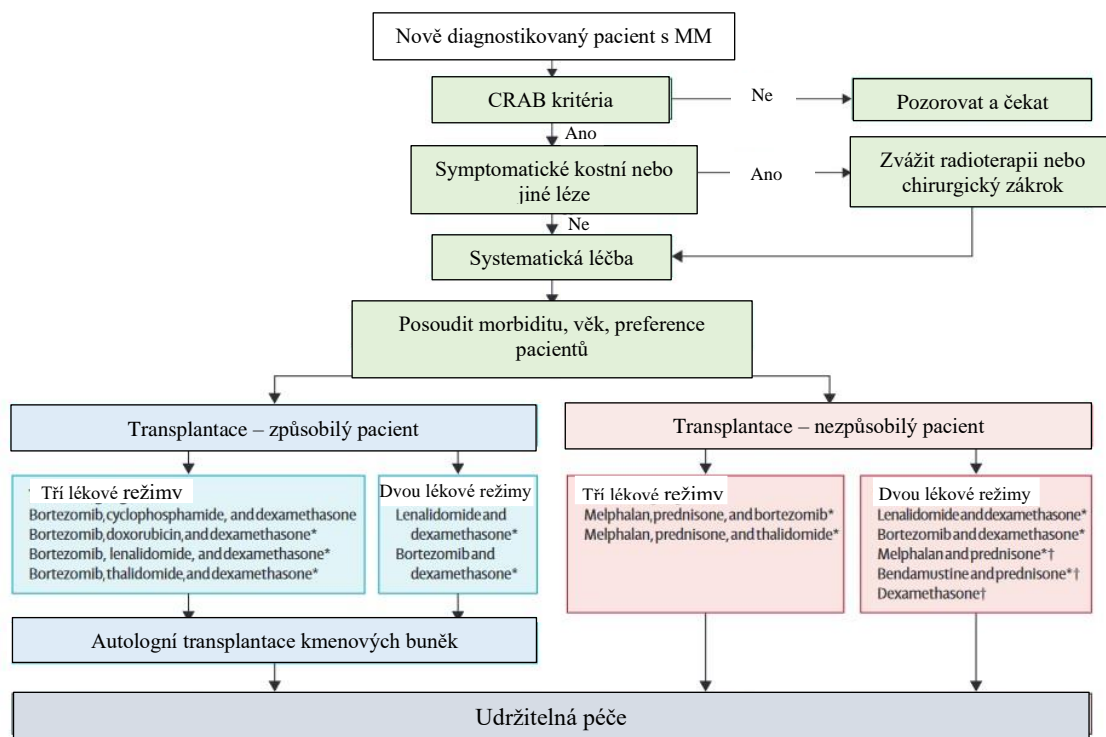
### 1.3.2 Diagnostika onemocnění mnohočetný myelom

Lékaři využívají mnoha testů, aby došlo k co nejpřesnější diagnóze tohoto onemocnění, avšak je také důležité, aby před vykonáním testů zvážil faktory, jakými jsou: příznaky a symptomy, věk, celkový zdravotní stav a výsledky dřívějších lékařských testů. Další věc, kterou je zde třeba zjistit, zda se myelom nerozšířil z původního místa do

dalších orgánů. Pokud k této situaci dojde, nazýváme ji metastáze. Pro toto zjištění se nejčastěji používají zobrazovací metody. Podle výsledků jednotlivých testů je pak lékař schopen určit co nejlepší možnou léčbu pro daného pacienta [54].

U toho onemocnění platí, že čím dříve je stanovena diagnóza, tím jsou vyšší šance na vyléčení. Pacienty obecně dělíme do 2 skupin, a to asymptomatické a symptomatické. Asymptomatické znamená, že osoba nemá příznaky, či projevy nemoci. Tyto osoby jsou obvykle pečlivě sledovány bez specifické léčby, i když se někdy nabízí léčba, která zastaví růst nebo šíření nemoci. Symptomatické, což znamená, že osoba má specifické příznaky a známky nemoci. U těchto pacientů se začíná ihned s léčbou [54].

U pacientů, kteří dlouhodobě trpí například bolestí kostí zad nebo únavou, dojde k širšímu záběru vyšetření. Jelikož se jedná převážně o pacienty pokročilejšího věku, je třeba se informovat, zda netrpí nedostatkem vitamínu D, hyperparatyreózou, revmatickou polymyalgií nebo kostní metastázou. Pro potvrzení či vyvrácení MM se používají laboratorní diagnostické metody, mezi které nečastější patří: kompletní krevní obraz, test na rychlost sedimentace erytrocytů, elektroforéza proteinů v séru či moči, a nakonec i stanovení hladiny vitamínu D. Často doporučovanou laboratorní metodou je také imunofixace proteinu v séru a moči [55, 56].



**Obrázek č. 5:** Klinický management pacientů s nově diagnostikovaným mnohočetným myelomem, převzato a upraveno z: [2]



### 1.3.3 Terapie

Léčbu mnohočetného myelomu lze dělit do několika kategorií a to:

1. Specifický léčebný program (SLP)
2. Chemoterapie
3. Transplantace
4. Bisfosfonáty
5. Radioterapie
6. Léčba infekcí
7. Imunoterapie
8. Ortopedické léčba
9. Thalidomid (Myrin)
10. Bortezomib (Velcade)
11. Lenalidomid (Revlimid)

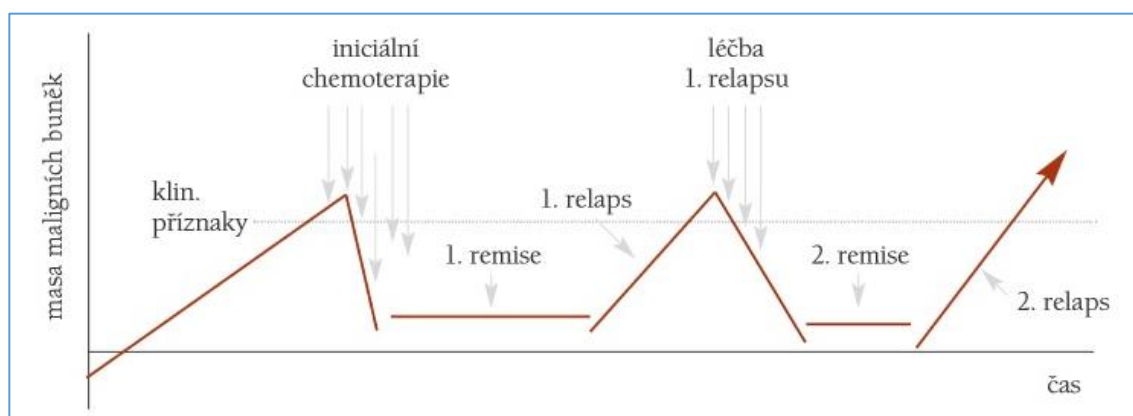
#### Chemoterapie

MM je onemocnění nízkého stupně malignity, tudíž je v současné době našimi známými prostředky nevléčitelný. Samotné zahájení chemoterapie u pacientů není indikováno v počáteční fázi. Jsou to pacienti, u kterých se doposud neprojeví symptomy typické pro toto onemocnění. Období, kdy se neprojevují žádné příznaky, mohou trvat i několik let, a následně může docházet až ke spontánní remisi. Pokud by se u pacienta indikovala léčba chemoterapeutiky v asymptomatické fázi, mohlo by dojít k situaci, kdy vzniká sekundární myeloblastický syndrom. Z tohoto důvodu se indikace chemoterapeutik provádí tehdy, když je nepochybně dokázána progresse onemocnění a onemocnění se dále projevuje specifickými symptomy [57, 58].

Donedávna se při léčbě starších nemocných osob s MM používala kombinace dvou léčiv, a to melfalanu v kombinaci s prednisonem. Tato kombinace byla považována za zlatý standard léčby. Více účinná léčba je se zařazením thalidomidu nebo bortezomibu a s vysokou pravděpodobností i revilimidu. Melfalan je nevhodný pro pacienty, u kterých se zvažuje vysokodávková chemoterapie spolu s autologní transplantací krvetvorných buněk [57, 59].

Pokud se toxicky poškodí kmenové buňky, může dojít ke zhoršení jejich samotného sběru. Jelikož je melfalan myelotoxický, existuje zde náhrada v podobě cyklofosfamidu. Tato látka je méně myelotoxická a tudíž se může indikovat před sběrem kmenových buněk.

Při monoterapii glukokortikoidů je účinné použití především pro vstupní stavy pancytopenií, kde je jiná léčba kontraindikovaná. Při monoterapii lze použít také dexamethazon, ale tato látka není schopna udržet pacienta v dlouhodobé remisi. Agresivní kombinovaný režim kortikoidů s vysokou dávkou cytostatik jako VAD (vincristin, adriamycin a dexametazon), hyperCVAD, CED, a podobné látky si v posledních 20 letech drželi důležité postavení, jako léčba před vykonáním autologní transplantace [60]. Teprve až nástup nových léků, které byly mnohem více účinnější, uzavřely období těchto kombinací léčiv a otevřely zásadní otázky týkající se nežádoucích účinků a tolerance léčby. Do této kategorie jsou řazeny vysokodávkové kortikoidy s novými léky jako jsou bortezomibem, lenalidomidem a thalidomidem [57].



**Obrázek č. 6:** Množství buněk MM v závislosti na léčbě [61]

### Transplantace kostní dřeně

Od 90. let lze považovat léčebné protokoly za standardní léčbu, a to pro pacienty mladší 65 let a v celkovém dobrém stavu. Tyto protokoly obsahují 3–5 cyklů indukční chemoterapie, kdy jsou zakončeny vysokodávkovou chemoterapií spolu s autologní transplantací kostní dřeně nebo také kmenových buněk periferní krve [62].

Před samotnou autologní transplantací se za optimální indukční chemoterapii považuje chemoterapie VAD. Důvodem je nízké poškozování hematopoetické buňky. To dále umožní jejich sběr v dostatečném množství pro několik autologních transplantací [62, 60].

## **Alogenní transplantace**

Autologní a alogenní transplantace mají podobný léčebný protokol obsahující indukční chemoterapii následně zakončenou transplantací, v tomto případě alogenní transplantací kostní dřeně. Problémem je vysoká mortalita. U pacientů alogenně transplantovaných je medián přežití menší nežli u pacientů autologně transplantovaných. Důležitým poznatkem je, že délka remise u pacienta, který přežije první rok po alogenní transplantaci je daleko delší než u autologní transplantace. Alogenní transplantace je považována za vhodnou pouze pro pacienty, u nichž dochází k časnému relapsu choroby, u nově diagnostikovaných pacientů nikoli [62, 63].

## **Léčba bisfosfonáty**

Jedná se o látky, které ve velké míře zlepšují kvalitu života. Používá se pro podpůrnou léčbu a je velmi důležité jej trvale podávat. Bylo prokázáno na tkáňových kulturách, že dokáže brzdit proliferaci myelomových buněk [64]. Hlavním účelem použití bisfosfanátů je utlumit nadměrnou činnost osteoklastů. Touto léčbou lze často pacientům ulevit od bolesti kostí. I když je toto léčivo v celku bezpečné, můžou se u některých pacientů vyskytovat chřipkové stavy a u prvního použití může docházet ke zhoršení bolestí kostí. Jako další může bisfosfonát způsobovat ledvinové potíže, a to v případě příliš rychlého podání. Z tohoto důvodu je při podání důležité pozorovat činnost ledvin [65].

Někteří lékaři volí léčbu bisfosfonáty u pacientů nacházející se v počátečních stádiích, a to i když nemají k dispozici žádnou studii, která by prokazatelně podpořila správnost jeho použití. Nicméně laboratorní testy prokázaly, že bisfosfonáty mimo jiné dokážou myelomovou buňku zničit. Lze se, ale také setkat s nežádoucími účinky, a to například s osteonekrózou. Projevy nastávají v oblasti čelisti, kde dochází ke vzniku bolesti, ztráty zubů a odštěpování kostí. Mezi projevy osteonekrózy čelisti patří slinění, pocit znecitlivění a bolestivost. Doposud není známo jakým způsobem by bylo možné tomuto nežádoucímu účinku zamezit [65].

Jsou zde i alternativy tohoto léku, ale jsou ekonomicky náročnější. Patří sem například zolendronat, u kterého je potřeba sledovat kreatinin, z důvodu negativního vlivu na ledviny. V zahraničí se také používá ibandronat [64, 65].

## **Radioterapie**

Radioterapie je důležitou součástí celkové léčby MM, kdy hlavním cílem je potlačit myelomové buňky a tím zmírnit bolesti kostí. Jedná se o pravidelnou součást léčby pacientů s MM. V případě, že je na rentgenovém snímku odhaleno patrné větší osteolytické ložisko v nosném skeletu, preventivně se ozáří, a to i v případě, kdy ještě není bolestivé. Důvodem je zabránění progresi ložiska a tím patologické fraktury. Ta by mohla omezit hybnost pacienta. V případě, že dojde k odhalení ložiska mimo nosný skelet, provádí se ozáření v případě bolestivosti nebo ohrožení celistvosti kosti [66].

## **Léčba infekcí vzniklých u pacientů s mnohočetným myelomem**

Jakákoliv nemoc, která postihne pacienta, způsobí oslabení jeho obranyschopnosti proti infekcím a následně se léčebné postupy rapidně komplikují. Z tohoto důvodu patří infekční komplikace k těm nejzávažnějším problémům. Infekční komplikace jsou také zodpovědné za nejčastější příčinu smrti [67].

Lékař by měl být obeznámen, jak správně z pohledu diagnostiky a léčby postupovat při podezření či potvrzení infekční komplikace u svého pacienta. U osob bez oslabené imunity se tyto postupy liší [67].

Chemoterapeutika jsou doprovázena podporou autologního štěpu krvetvorné tkáně. Dnes je to považováno za optimální léčebný postup, a to u vhodných pacientů postihující MM. Je prokázán vysoký počet případů (30-50%), kdy po provedení autologní transplantace dojde k dosažení kompletní léčebné odpovědi. Tato léčebná metoda vede k prodloužení doby do relapsu onemocnění a také k celkovému přežití oproti jiným léčebným metodám. I když tato metoda má úspěch, nedokáže zabránit relapsu po 20 letech stagnace [67, 68].

Primární vliv na relaps onemocnění mají přežívající nádorové buňky, tzv zbytkové nádorové onemocnění. Z tohoto vyplývá, že prodloužit život pacienta by bylo možné tehdy, pokud by se přišlo na mechanismus, jak udržet stabilní počet nádorových buněk, či eradikovat zbytkovou chorobu [67, 68].

## 1.4 Enoláza

Enoláza je cytozolický metaloenzym odpovědný za přeměnu 2-fosfoglycerátu na fosfoenolpyruvát, jedná se o druhý až poslední krok glykolýzy. U savců je enoláza kódována třemi homologními geny. Tyto genové produkty mají nejen odlišné biochemické a imunologické vlastnosti, ale také vykazují odlišnou tkáňovou distribuci. Kromě své glykolytické funkce hraje  $\alpha$ -enoláza v patofyziologických podmínkách řadu rolí, včetně onkogeneze, progresu nádoru, ischemie a bakteriální infekce. Hladinám exprese  $\alpha$ -enolázy byla přiřazena diagnostika a prognostická hodnota u řady nádorů. Kromě toho je neuronově specifická  $\alpha$ -enoláza uvolňována do mozkomíšního moku i do systémového oběhu, a to při traumatickém poranění mozku a ischemických příhodách. To znamená, že měření enzymatické aktivity enolázy je relevantní pro různé oblasti vyšetření, včetně onkometabolismu [69].

Enoláza, známá také jako fosfopyruvát-hydratáza, je klíčovým glykolytickým enzymem v cytoplazmě prokaryotických a eukaryotických buněk. Je to metaloenzym, který vyžaduje iont kovu, jako je  $Mg^{2+}$  a katalyzuje dehydrataci 2-fosfoglycerátu (2-PG) na fosfoenolpyruvát (PEP) v katabolické glykolytické cestě. Může také katalyzovat reverzní reakci v procesu glukoneogeneze, v závislosti na prostředí koncentrace substrátů [69, 97].

U savců je enoláza kódována třemi homologními geny: ENOL1 který je všudypřítomně exprimován. ENOL2, který je exprimován výhradně v nervových tkáních, a ENOL3, který je exprimován ve svalových tkáních. Enzym se tedy vyskytuje ve třech izoformách:  $\alpha$  – enoláza kódovaná ENOL1, která se nachází téměř ve všech tkáních,  $\beta$  – enoláza kódovaná ENOL3, která se nachází převážně ve svalových tkáních a  $\gamma$  – enoláza kódovaná ENOL2, která se nachází pouze v neuronech a neuroendokrinních tkáních. Tři izoformy se kromě různých distribucí v tkáni vyznačují odlišnými biochemickými a imunologickými vlastnostmi. Funkční enzym je dimer složený ze dvou homologních a heterologních izoform, kdy pouze pět typů ( $\alpha\alpha$ ,  $\alpha\beta$ ,  $\beta\beta$ ,  $\alpha\gamma$  a  $\gamma\gamma$ ) enolázového izoenzymu lze nalézt díky selektivní lokalizaci pásových  $\gamma$ -enoláz. Je zajímavé, že proporce dimerních forem ( $\alpha\alpha$ ,  $\beta\beta$  a  $\alpha\beta$ ) enolázy v srdci a kosterním svalu krysy se během embryonálního vývoje mění. Z počátku je u plodu v obou tkáních typ  $\alpha\alpha$  převládající, ale s postupným vývojem plodu se typ  $\alpha\alpha$  nahradí typy  $\alpha\beta$  a  $\beta\beta$  v dospělém srdci a typem  $\beta\beta$  v dospělém pruhovaném svalstvu [70, 71].

### 1.4.1 $\alpha$ – enoláza

$\alpha$ -enoláza je klíčový glykolytický enzym v cytoplazmě prokaryotických a eukaryotických buněk a je považován za multifunkční protein.  $\alpha$ -enoláza je exprimována na povrchu několika buněčných typů, kde působí jako receptor plazminogenu a koncentruje proteolytickou aktivitu plazminu na buněčný povrch. Kromě funkcí glykolytického enzymu a plazminogenového receptoru se zdá, že  $\alpha$ -enoláza má i jiné buněčné funkce a subcelulární lokalizace, které se liší od její hlavní funkce v glykolýze. Kromě toho diferenciální exprese  $\alpha$ -enolázy souvisí s několika patologiemi, jako jsou například nádorová onemocnění, Alzheimerova choroba a revmatoidní artritida.  $\alpha$ -enolázu byla identifikována jako plazminogenový receptor v několika typech buněk. Zejména byla zjištěna její role v myogenezi, jako příklad procesu extracelulární remodelace. Ukázalo se, že  $\alpha$ -enoláza je exprimována na povrchu buněk diferenciačních myocytů a že inhibitory vazby  $\alpha$ -enoláza / plazminogen blokuje myogenní fúzi *in vitro* a regeneraci kosterního svalstva u myši. Díky těmto poznatkům by  $\alpha$ -enoláza mohla být považována za marker patologického stresu u vysokého počtu nemocí [72].

Úloha  $\alpha$ -enolázy jako plazminogenového receptoru na rakovinných buňkách byla rozsáhle zdokumentována. Bylo zjištěno, že působí jako klíčový protein, podporuje buněčný metabolismus v anaerobních podmínkách a podporuje invazi nádoru aktivací plazminogenu a degradací ECM (z angl. Extracellular Matrix) [73].

V proběhlé analýze genové sítě pro specifická onemocnění identifikovala dezmin, interleukin 8 a  $\alpha$ -enolázu jako centrální prvky pro tumorogenezi rakoviny tlustého střeva. Pokles exprese  $\alpha$ -enolázy v různých liniích nádorových buněk způsobil dramatické zvýšení jejich citlivosti na léky cílené na mikrotubuly (např. taxany a vinkristin), pravděpodobně kvůli interakcím  $\alpha$ -enoláza-tubulin, což naznačuje roli  $\alpha$ -enolázy při modulaci sítě mikrotubulů [98, 99]. Snížení odpovědi na stimulaci v důsledku poklesu nebo až chybění složek vede k invazivitě buněčných linií folikulárního karcinomu štítné žlázy způsobující zeslabení genu pro  $\alpha$ -enolázu. Nadměrná exprese  $\alpha$ -enolázy byla spojena s rakovinnými buňkami hlavy a krku a toto zvýšení bylo spojeno nejen s progresí rakoviny, ale také se špatnými klinickými výsledky. Exogenní exprese  $\alpha$ -enolázy dále podporovala buněčnou proliferaci, migraci, invazi a tumorogenezi [100, 101].

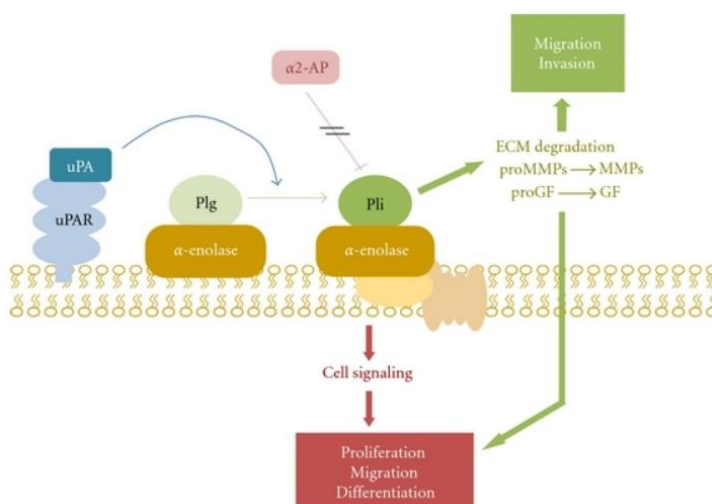
Během tvorby a expanze nádoru musí nádorové buňky zvyšovat metabolismus glukózy. Hypoxie je společným rysem solidních nádorů. V souladu s tím byla nalezena

nadměrná exprese glykolytických genů u mnoha lidských nádorů. V nádorových buňkách je u  $\alpha$ -enolázy zvýšena regulace, podporuje anaerobní proliferaci (Warburgův efekt) a je exprimována na buněčném povrchu, kde podporuje invazi rakoviny [73, 74]. Zdá se tedy, že  $\alpha$ -enoláza hraje velkou roli v progresi rakovinných buněk. Dále bylo prokázáno, že  $\alpha$ -enoláza je upregulovaná, což znamená, že je zvýšená její odpověď na určitý stimul, a to v duktálním adenokarcinomu pankreatu, kde je vystavena řadě posttranslačních modifikací, jmenovitě acetylaci, metylaci a fosforylaci. Exprese  $\alpha$ -enolázy a posttranslační modifikace mohou mít diagnostickou a prognostickou hodnotu u rakoviny [75, 76].

### $\alpha$ -enoláza jako receptor plazminogenu

$\alpha$ -enoláza byla identifikována také jako plazminogenný receptor na povrchu několika různých buněčných typů, včetně buněk karcinomu, monocytoidních buněk, leukocytárních buněčných linií, potkaních neuronálních buněk, a u patogenních streptokoků [77, 78, 79].

Interakce plazminogenu s  $\alpha$ -enolázou na buněčném povrchu zvyšuje jeho aktivaci PAs (plasminogen activators), koncentruje aktivitu proteázy pericelulárně a chrání plazmin před inhibicí  $\alpha$ 2-antiplazminem. Abychom prozkoumali roli  $\alpha$ -enolázy v pericelulární generaci aktivity plazminu, byla vytvořena monoklonální protilátka, MAb11G1, která specificky blokovala vazbu plazminogenu na purifikovanou  $\alpha$ -enolázu. MAb11G1 umožnil prokázat, že pro aktivaci pericelulárního plazminogenu a tvorbu plazminu je nutné obsazení  $\alpha$ -enolázy plazminogenem na leukocytoidních buňkách a na neutrofilech v periferní krvi [80, 81].



**Obrázek č. 7:** Schematický přehled představuje interakci  $\alpha$ -enoláza / plazminogen na povrchu buněk [72]

$\alpha$ -enoláza zvyšuje aktivaci plazminogenu na povrchu buněk, koncentruje proteolytickou aktivitu plazminu na pericelulární oblast a chrání plazmin před jeho inhibítorem  $\alpha$ 2-antiplazminem. Po aktivaci může plazmin degradovat většinu složek extracelulární matrice přímo nebo nepřímo aktivací metaloproteáz. Je také schopen aktivovat prohormony růstových faktorů. Zkratky: Plg, plazminogen; Pli, plazmin,  $\alpha$ 2-AP,  $\alpha$ 2-antiplazmin; uPA, aktivátor plazminogenu urokinázového typu, uPAR, aktivátor plazminogenu urokinázového typu; ECM, extracelulární matrice; MMP, metaloproteázy; GF, rostoucí faktory [72].

### **$\alpha$ -enoláza patří mezi antigeny asociované s nádory**

TAA jsou vlastní proteiny, které mohou vyvolat více specifických imunitních odpovědí v autologním hostiteli. K aktivaci imunitního systému proti TAA dochází v rané fázi tumorigeneze, jak dokládá detekce vysokých titrů autoprotilátek u pacientů s rakovinou v rané fázi, a koreluje s progresí maligní transformace. Není zcela jasné, jak jsou TAA schopny vyvolat humorální odpovědi, zejména proto, že mnohé z dosud objevených jsou intracelulární proteiny, ale předpokládá se, že jsou pozměněny způsobem, který činí proteiny imunogenními. Bylo navrženo několik hypotéz: tyto vlastní proteiny mohou být nadměrně exprimovány, mutovány, nesprávně složeny, aberantně degradovány nebo lokalizovány tak, že u pacientů s rakovinou jsou vyvolávány autoreaktivní imunitní odpovědi. Navíc TAA, které prošly posttranslačními modifikacemi (PTM), (např. glykozylace, fosforylace, acetylace, oxidace a proteolytické štěpení), mohou být imunitním systémem vnímány jako cizí. Imunitní reakce proti takovým imunogenním epitopům TAA indukuje produkci autoprotilátek jako sérologických biomarkerů pro rakovinu. Jak jeho nadměrná exprese v nádorech, tak schopnost vyvolat humorální a / nebo buněčnou imunitní odpověď u pacientů s rakovinou klasifikují  $\alpha$ -enoláza jako skutečnou TAA [82, 83].

### **$\alpha$ -enoláza a její vztah k nádorovému bujení**

Několik TAA indukuje produkci IgG autoprotilátek u pacientů s rakovinou prostřednictvím integrované imunitní odpovědi vyvolané CD4 + T buňkami, CD8 + T buňkami a B buňkami. TAA uvolněné sekrecí, vylučováním nebo lýzí nádorových buněk jsou zachyceny buňkami prezentujícími antigen, zpracovány a prezentovány buď molekulami hlavního histokompatibilního komplexu (MHC) třídy I nebo MHC třídy II pro aktivaci a aktivaci T lymfocytů CD8 + a CD4 +. Také dochází k příjmu antigenu B



buňkami a je poháněn membránovým Ig, což vede k prezentaci antigenu MHC třídy II CD4 + T buňkám. Aktivované CD4 + T buňky prostřednictvím sekrece vhodných cytokinů spouštějí B buňky k produkci IgG proti stejným TAA a CD8 + T buňky se diferencují na TAA specifické cytotoxické T lymfocyty. Údržba a přežití cytotoxických T lymfocytů specifických pro TAA *in vivo* závisí také na cytokinech uvolňovaných CD4 + T buňkami. Tato koordinovaná imunitní odpověď naznačuje, že IgG proti TAA nejsou jen diagnostickým nástrojem, ale také umožňují výběr TAA pro imunoterapii rakoviny [84, 85].

U mnoha pacientů s rakovinou, včetně pankreatu, leukémie, melanomu, hlavy a krku, prsu a plic, bylo prokázáno, že  $\alpha$ -enoláza indukuje produkci autoprotiláttek. U pacientů s rakovinou pankreatu jsou autoprotilátky proti  $\alpha$ -enoláze namířeny proti dvěma izoformám fosforylovaným v Serine 419, u kterých je zvýšena jejich odpověď na určitý stimul. Fosforylace proteinů zvyšuje afinitu peptidů k MHC molekulám, které lze rozpoznat T lymfocyty [86].

#### 1.4.2 $\gamma$ -enoláza

$\gamma$ -enoláza, známá také jako neuron-specifická enoláza (NSE), je enzym glykolytické dráhy, který je exprimován převážně v neuronech a buňkách neuroendokrinního systému. Jako marker nádoru se používá v diagnostice a prognóze nádorového onemocnění, avšak mechanismy, které jej zavádějí do maligní progresy, zůstávají neznámé. Jelikož je cytoplazmatický enzym  $\gamma$ -enoláza zapojen do zvýšené aerobní glykolýzy, hlavního zdroje energie v rakovinných buňkách, podporuje buněčnou proliferaci. Avšak odlišná buněčná lokalizace za patofyziologických podmínek ukazuje na další buněčné interakce [87].

$\gamma$ -enoláza je 433 aminokyselinový dlouhý dimerní protein, který zahrnuje dva izoenzymy enolázy,  $\gamma\gamma$  a  $\alpha\gamma$ , a je také označován jako neuron-specifická enoláza (NSE). Molekulová hmotnost podjednotky je přibližně 39 kDa, zatímco nativní formy je 78 kDa, což se může u kombinace podjednotek lišit.  $\gamma$ -enoláza se nachází převážně v neuronálních buňkách a neuroendokrinních buňkách, zejména v liniích absorpce a dekarboxylace aminového prekurzoru. Je to například ve střevech, plicích, štítné žláze, hypofýze a slinivce břišní. Menší množství je také přítomno v buňkách a tkáních. V buňkách to jsou erytrocyty a trombocyty a v tkáních je přítomna u prsní tkáně a prostaty.  $\gamma\gamma$  izoforma se nachází převážně u zralých neuronů a je také používána jako marker zrajících a

diferencujících neuronů, zatímco izoenzym  $\alpha\gamma$  se nacházejí ve vyšších množstvích v jiných buňkách nežli u buněk nervové soustavy [88,89].

### **$\gamma$ -enoláza a její vliv na nádory**

Je obecně známo, že glykolýza je drasticky zvýšena v nádorových buňkách a je charakteristickým znakem progresu rakoviny. U nádorů, které převyšují její výživu, jsou buňky vystaveny prostředí se špatným přísunem kyslíku a živin, což vede k prevalenci aerobní glykolýzy přes mitochondriální oxidativní fosforylaci. Tento metabolický přechod označovaný také jako Warburgův efekt umožňuje nádorovým buňkám produkovat energii k přežití a případně k proliferaci bez ohledu na přítomnost kyslíku. Samotná glykolýza je však energeticky méně účinná než oxidační fosforylace. Proto musí být reakce glykolytické dráhy drasticky urychleny, aby byly uspokojeny vyšší metabolické potřeby proliferujících nádorových buněk, což je zřejmé z čistého zvýšení spotřeby glukózy a vyšší exprese glykolytických enzymů [90,91].

$\gamma$ -enoláza je typicky nadměrně exprimována v nádorech neurogenního a neuroendokrinního původu a byla použita jako marker pro detekci neuroendokrinní diferenciace nádorových buněk. Tato enoláza je považována za nejdůležitější nádorový marker pro špatně diferencované neuroendokrinní nádory. Důvodem je, že pokud má být nádorové onemocnění klasifikované jako neuroendokrinní, musí exprimovat alespoň dva neuroendokrinní markery, z nichž jeden je  $\gamma$ -enoláza. Imunohistochemie  $\gamma$ -enolázy je pravidelně používaná pro diferenciální diagnostiku malobuněčného karcinomu plic (SCLC) od jiných histologických podtypů karcinomu plic. Zvýšená exprese  $\gamma$ -enolázy byla pozorována také u jiných nádorových onemocnění, včetně karcinomu prsu [92,93].

$\gamma$ -enoláza je nadměrně exprimována v nádorech a jejím hlavním příspěvkem k progresi nádoru je bezpochyby účast na urychlené glykolýze rakovinných buněk. Například maligní transformace astrocytárních, prsních a uroteliálních buněk vedla k výskytu  $\gamma$ -enolázy v původních buňkách neobsahující  $\gamma$ -enolázou, což silně naznačuje, že transformované buňky mohou získat schopnost exprimovat  $\gamma$ -enolázu, aby se přizpůsobily zvýšeným metabolickým potřebám neoplastického stavu [94].

Ukázalo se, že  $\gamma$ -enoláza působí jako neurotrofní faktor v neuronálních buňkách. Tato funkce se projevuje prostřednictvím dalšího aktivního místa, které není součástí katalytického aparátu podílejícího se na glykolýze, ale je lokalizováno na C-konci molekuly. Například bylo prokázáno, že peptid o délce 30 aminokyselin, napodobující C-

koncovou část  $\gamma$ -enolázy, podporuje přežití, diferenciaci a regeneraci neuronů aktivací signálních transdukčních drah, které jsou normálně spouštěny aktivací receptoru Trk (z angl. tropomyosin receptor kinase), fosfatidylinositol 3-kinázy (PI3K) a mitogenem aktivované proteinové kinázy (MAPK). Dále bylo prokázáno, že C-koncový peptid  $\gamma$ -enolázy zhoršuje apoptózu a interaguje s neurotrofinovým receptorem p75 (p75NTR) a potlačuje aktivaci jeho následných efektorů v apoptické signalizaci. Neurotrofický účinek  $\gamma$ -enolázy je regulován katepsinem X a cystein karboxymonopeptidázou, který je často exprimován v neuronálních a gliových buňkách. Bylo prokázáno, že katepsin X postupně štěpí poslední dvě aminokyseliny (433L a 432V) na C-terminálním konci  $\gamma$ -enolázy a narušuje doménu PDZ (proteinová strukturní doména), kterým se  $\gamma$ -enoláza váže na proteinovou část  $\gamma$ -1-syntrofin. Ten zprostředkovává translokaci  $\gamma$ -enolázy a její asociaci s plazmatickou membránou, což je předpokladem pro neurotrofickou aktivitu. Proto pouze C-terminálně naštěpená  $\gamma$ -enoláza způsobuje samotné přežití nádoru [95, 96].

## **2 CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE**

Cílem této diplomové práce je implementace promývací stanice FlexiWash 400 do pracovního postupu metody SERPA a analýza sér pacientů s MM v remisi za účelem průkazu přítomnosti specifických anti-ENOL protilátek.

Seznam cílů diplomové práce:

- Implementace promývací stanice FlexiWash 400 za účelem vylepšení pracovního postupu metody SERPA.
- Analýza sér 3 pacientů s MM v remisi za účelem průkazu přítomnosti specifických anti-ENOL protilátek a jiných cílových struktur proti nimž patientské sérum vykazuje reaktivitu.

## 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 3.1 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 blotovací přenos Trans-Blot® SD Semi-Dry (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)
- automatické pipety Eppendorf Research (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- blotovací membrána Trans-Blot® Transfer Medium, 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)
- magnetické míchadlo s ohřevem model MSH-300 (Biosan SIA., Riga, Lotyšsko)
- mikrozkmavky (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)
- svářečka folií Freshie 1762 (Eta, Praha, ČR)
- špičky eppendorf GELoader (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- třepačky:
  - o Multi-functional Orbital Shaker PSU-20i (BioSan SIA, Riga, Lotyšsko)
  - o Vortex mixer - Wx (VELP Scientifica, Usmate, Italy)
  - o Mini-rotátor Bio RS-24 (BioSan SIA, Riga, Lotyšsko)
- ultrasonikátor UP200H (Hielsches, Teltow, Německo)
- zařízení pro izoelektrickou fokuzaci PROTEAN® IEF Cell (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) zdroj napětí – Power-pac 200 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)
- promývací stanice FlexiWash FW400 (Cellagen Technology, Praha, ČR)
- ultrazvukový procesor UP100H (Hielscher, Berlín, Německo)
- laboratorní úpravna vody Halios 40 Type 1 + 2 ultrapure + pure water (Neptec, Elbtal, Německo)
- odstředivka MiniSpin Plus (Merck, Eppendorf, Darmstadt, Německo)
- skla s výřezem Mini-PROTEAN® podložní sklo s 1.0 mm mezerou (Bio-rad, Praha 4, Česká republika)
- krycí skla Mini-PROTEAN® Short Plates (Bio-rad, Praha 4, Česká republika)
- skleněná jehla Hamilton (Hamilton, Nevada, USA)

### 3.2 Seznam chemikálií a reagensů

- 3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonát (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) - v textu uváděn pod zkratkou CHAPS
- agaróza (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- akrylamid (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- amoniak vodný roztok 26% (Lach:ner, Neratovice, ČR)
- bromfenolová modř (Lachema, Neratovice, ČR)
- butanol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- citrát sodný (Penta, Chrudim, ČR)
- červená krevní sůl (Penta, Chrudim, ČR)
- destilovaná voda
- 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)
- 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)
- flutaraldehyd 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)
- 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
- konjugát - anti-human IgG (whole molecule) – peroxidáza, sekundární koží protilátky – A8667 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- kyselina citronová bezvodá (Fluka, Buchs, Švýcarsko)
- 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)
- modifikovaný trypsin pro sekvenování (Promega, Madison, WI, USA)
- N,N'-metylen-bis-akrylamid (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- odtučněné sušené mléko (Aditiva CZ, Praha, ČR)
- persíran amonný (Lachema, Neratovice, ČR)
- 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)
- 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)
- substrát pro imunodetekci Clarity Western ECL Substrate (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)
- TEMED (N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- thiomčovina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Tris(hydroxymethyl)aminometan (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) - v textu uváděn pod zkratkou Tris

- Tween 20 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- $\beta$ -merkaptoetanol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)



### 3.3 Vzorky a buněčné linie

#### Použitá lidská nádorová buněčná linie:

##### Suspensní

- RPMI 8226 – pocházející z B-lymfocytů izolovaných od pacientů s mnohočetným myelomem

#### Použitá séra:

20 sér od pacientů s MM s paraproteiny třídy IgG.

Séra pro negativní kontrolu byla získána od dobrovolných dárců, kteří poskytli tzv. informovaný souhlas a v době odběru neměli žádné nádorové ani autoimunitní onemocnění.

### 3.4 Příprava buněčného lyzátu

- Lyzační pufr pro 2D-elektroforetickou separaci:
  - o 7 M močovina
  - o 2 M thiomočovina
  - o 4% CHAPS
  - o 1 % DTT
  - o 0,2 % Pharmalyte (3-10)
  - o 1 mM PMSF

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

Čerstvě připravený buněčný lyzační pufr pro 2D-elektroforézu (400  $\mu$ l) je přidán k peletě RPMI buněčné linie ( $5 \times 10^6$  buněk), která byla zmrazena na  $-80^{\circ}\text{C}$ . Následuje postup promíchání, přenesení buněčného lyzátu do nové mikrozkušavky a zahájíme sonikaci (30 s, Amplituda 80%, cyklus 1). Pomocí sonikace dojde k rozrušení buněk. Po provedené sonikace následuje centrifugace buněk po dobu 10 min a 12 300 rpm (11 900 x G). Poté je roztok s proteiny odpipetován od pelety do nové mikrozkušavky.

### 3.5 Rehydratace gelových proužků

- RTS-D rehydratační roztok:
  - o 6 M močovina
  - o 2 M thiomočovina
  - o 4% CHAPS
  - o 40 mM Tris
  - o 1,2% DeStreak
  - o 10  $\mu$ l zásobního roztoku 1% bromfenolové modře

#### Pomůcky:

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

#### Postup:

Gelové proužky délky 7 cm s pH rozmezím od 3 do 10 je před použitím nutné rehydratovat. Na dno plastové nádoby je nanášeno 120  $\mu$ l směsi, která vznikla smícháním buněčného lyzátu (60  $\mu$ l) a rehydratačního roztoku (80  $\mu$ l) a přidáním dvou roztoků Pharmalyte 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 proužek tak, aby pod ním nezůstaly bublinky. Následně je převrstven minerálním olejem. Gelové proužky jsou asi 18 hodin hydratovány při teplotě 20°C.

### 3.6 Izoelektrická fokuzace – IEF

#### Postup:

Po noční hydrataci je gelový proužek opláchnut (destilovanou vodou), osušen a na namočené filtrační papírky položen na elektrody ve správné pólové orientaci. Poté je převrstven minerálním olejem a vložen do přístroje (PROTEAN® IEF systém), ve kterém probíhá izoelektrická fokuzace při nastavení dle tabulky 8. Doba separace je přibližně 8 hodin, během jednotlivých kroků by hodnota proudu neměla přesáhnout 90  $\mu$ A, ideální je asi 50  $\mu$ A. Z tohoto důvodu bylo nastavováno 75  $\mu$ A / proužek. K ukončení IEF může dojít, až hodnota (Vh) na přístroji dosáhne rozmezí 9 000 – 10 000 Vh. Poté je proužek opláchnut destilovanou vodou, osušen a pro uchování zamrazen (-20°C).

**Tabulka č. 1:** Nastavení IEF

<b>krok</b>	<b>celkové napětí</b>	<b>čas / doba</b>
Č. 1	150 V	2 h
Č. 2	300 V	1 h
Č. 3	900 V	1 h
Č. 4	2 100 V	1 h 20 min
Č. 5	3 500 V	1 h
Č. 6	3 500 V	1 h
Č. 7	3 500 V	4 500 Vh

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

- 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

#### Postup:

Po rozmrazení je gelový proužek ekvilibrován nejprve 15 minut v 1,5 ml 1% DTT v ekvilibračním roztoku (0,1 g DTT / 10 ml ekv. roztoku) na třepačce, poté je opláchnut a osušen. Dalších 15 minut je proužek ekvilibrován na třepačce ve tmě také v 1,5 ml 4% IAA s ekvilibračním roztokem (0,4 g IAA / 10 ml ekv. roztoku). Mezitím jsou připravena skla s 1 mm tloušťkou pro gel. Je připraven 12% dělicí gel (Tabulka č. 2), který je převrstven butanolem. Po polymeraci gelu je butanol odsát filtračním papírem a převrstven 5% zaostřovacím roztokem, do něhož je zasunuta šablona pro 2D-elektroforézu. Po ztuhnutí jsou skla s gelem vložena do stojanu, přenesena do elektroforetické vany a doplněno elektrodovým pufrům. Šablona je opatrně vyjmuta z gelu a jamka pro proužek opatrně propláchnuta. Následně je za pomoci filtračního papíru odsát elektrodový pufr z jamky. IPG gelové proužky jsou opláchnuty destilovanou vodou, osušeny, zkráceny (na velikost jamky) a zasunuty mezi skla gelem ke kratší straně. Kovovými kopisty je gelový proužek zasunut až ke gelu, tak aby mezi proužkem a gelem nezůstala žádná bublinka a (+) konec proužku byl v levém rohu, hned vedle jamky pro standard molekulových hmotností. Filtračními papíry je opatrně odsát pufr nad gelovým proužkem a poté je prostor zalit 0,5%

agarózou s bromfenolovou modří. Po ztuhnutí agarózy je vana doplněna elektrodo­vým pufrem až po okraj a jako poslední je nadávkován standard molekulových hmotností (6 µl Dual Color) Hamiltonovou mikrostříkačkou. Poté je 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 / gel. Separace proteinů probíhá přibližně hodinu a je potřeba, aby barvivo, které je obsaženo v molekulovém markeru opustilo gel. Po proběhnutí elektroforetické separace jsou skla s gely vyjmuta z aparatury a je možné je barvit či blotovat na membránu.

**Tabulka č. 2: Postup přípravy 12% a 5% polyakrylamidových gelů**

	<b>12% dělicí gel</b>	<b>5% zaostřovací gel</b>
<b>destilovaná voda</b>	6,72 ml	4,2 ml
<b>A – 30% AA a bisAA</b>	8 ml	1 ml
<b>B – 1,5 M Tris, pH 8,8</b>	5 ml	X
<b>C – 1 M Tris pH 6,8</b>	X	0,75 ml
<b>D – 10% SDS</b>	0,2 ml	0,06 ml
<b>E – 10% APS</b>	0,2 ml	0,06 ml
<b>TEMED</b>	0,008 ml	0,006 ml

## 3.8 Vizualizace proteinů na gelu po elektroforetické separaci

### 3.8.1 Barvení gelů dusičnanem stříbrným

#### Barvicí roztok:

- 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:
  - o 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 µl) 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 separace je gel propláchnut destilovanou vodou. Následně je gel 30 min fixován ve fixačním roztoku na třepačce. Lze fixovat i přes noc při teplotě 4° C. Poté je gel 30 minut na třepačce rehydratován v destilované vodě a 30 minut inkubován s roztokem 10% glutaraldehydu. Na tento krok navazuje 10 min promývání destilovanou vodou, které se 6x opakuje. Po této fázi je ke gelu přidán roztok amoniakálního stříbra, inkubace trvá 6 – 10 minut. Následuje opláchnutí gelu destilovanou vodou a aplikace vyvolávacího roztoku, kdy za mírného třepání dochází k postupné vizualizaci proteinů na gelu. Když barvení dosáhne požadované intenzity, je ukončeno a je přidán ustalovací roztok, ve kterém je při 4° C gel možné i skladovat.

Tento postup byl aplikován na gely po proběhlém Western blotu. Důvodem bylo zjistit, zda došlo ke kvantitativnímu přenesení proteinů z gelu na nitrocelulózovou (NC) membránu.

### 3.9 Western blot s následnou imunodetekcí

#### Roztoky a reagentie:

- PBS-T, pH 7,4 (1 l)
  - o 137 mM NaCl (8 g)
  - o 2,7 mM KCl (0,2 g)
  - o 1,47 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,2 g)
  - o 8,1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12H<sub>2</sub>O (2,9 g)
  - o 0,1 % Tween (4 ml)
- Blokovací roztok: 5% sušené odtučněné mléko v PBS-T (5 g / 100 ml PBS-T)
- Ředící roztok pro primární protilátku a konjugát: blokovací roztok
- Transferový roztok (Towbin, 1 l):
  - o 25 mM Tris (3,03 g)
  - o 192 mM glycin (14,4 glycin)
  - o 20% metanol (200 ml)
  - o Destilovaná voda (800 ml)
- Primární protilátka: patientské sérum (ředění 1 : 500)
- Konjugát: anti-human IgG (ředění 1 : 5 000)
- Substrát: Clarity Western ECL Substrate

#### Postup:

Postup pro vypracování Western blotu přímo navazuje na proteinovou 2D-elektroforézu. Po proběhnutí elektroforetické separace je gel vyjmut z aparatury, opláchnut destilovanou vodou a vložen do transferového roztoku (Towbin). Do transferového roztoku jsou také namočené tlusté filtrační papíry a také membrány NC, ustřižené pro správnou velikost dle šablony. Víko aparatury pro semi-dry WB je třeba odklopit a odstranit vrchní elektrodu (katodu). Na spodní elektrodu (anodu), je nejprve vložen mokrá tlustý filtrační papír, který je uhlazen pomocí válečku (dojde k vytlačení případných vzduchových bublin). Následně je na filtrační papír nanášena NC membrána a na ni přenesen gel. Vše je zakryto druhým silným filtračním papírem namočeným předtím v transferovém roztoku a opět uhlazeno válečkem. 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 elektrického napětí probíhá transfer po dobu 60-75 min při napětí 12V a 0,3 A/ na gel. Během transferu je připraven blokovací roztok (cca 10 ml/membránu). Ten je následně pomocí nálevky a filtračního papíru

přefiltrován. Důvodem je zamezení přítomnosti nerozpuštěných částic, které by mohly způsobit zanešení a posléze ucpání hadiček promývací stanice FW 400. Po dokončení filtrace dojde k přípravě roztoků obsahujících primární protilátku. Jedná se o směs skládající se ze séra obsahující primární protilátku a blokovacího roztoku v poměru 1:500. Další roztok, který je nezbytný pro zjištění imunoreaktivity séra je směs konjugátu (anti-human IgG) a blokovacího roztoku v poměru 1:5000.

Po dokončení transferu jsou NC membrány vyjmuty a přeneseny v transférovém roztoku do promývací stanice FW 400. Zde jsou membrány položeny do plastových misek, ve kterých podle předem nastaveného programu (Tabulka č. 3) dojde k těmto krokům: blokace membrány pomocí blokovacího roztoku, inkubace s primární protilátkou, promytí pomocí roztoku PBS-T a následná inkubace s konjugátem. Metoda byla vždy spuštěna tak, aby celý nastavený program probíhal přes noc. Následující den byly membrány vyjmuty a bylo k nim přidáno 10 ml substrátu (poměr 1:1). Inkubace membrán probíhala 5 minut. Po proběhlé inkubaci byly membrány jemně osušeny a vyfotografovány ve stanici CDC kamerou. Pořízené snímky byly dále vyhodnocovány pomocí softwaru ImageLab.

**Tabulka č. 3:** Nastavený program na promývací stanici FW 400

	<b>Objem (ml)</b>	<b>Čas (min)</b>	<b>Opakování</b>
<b>A (blokovací roztok)</b>	10	60	1x
<b>A (blokovací roztok)</b>	1	1	1x
<b>B (1° ab – pac. sérum)</b>	10	480	1x
<b>W (promývací roztok PBS – T)</b>	10	5	4x
<b>C (2° ab – anti-human IgG)</b>	10	60	1x
<b>W (promývací roztok PBS – T)</b>	10	50	6x
<b>Celkový čas</b>		651	

## 3.10 Vizualizace proteinů na membráně po Western blotu

### 3.10.1 Barvení koloidním stříbrem

#### Roztok:

- Barvicí roztok koloidního stříbra (100 ml):
  - o 40% citrát sodný
  - o 20% síran železnatý
  - o 20% dusičnan stříbrný
- Odbarvovací roztok (100 ml):
  - o 50 mM thiosulfát sodný
  - o 15 mM hexakynoželezitan draselný

#### Postup:

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 NC membrána vyfocena CDC kamerou. Poté je možné membránu odbarvit v odbarvovacím roztoku, až je barva zcela vymytá. Následně je membrána důkladně promyta (3x 5 minutí) destilovanou vodou.



## **4 VÝSLEDKY A DISKUZE**

### **4.1 Implementace promývací stanice FlexiWash 400 do metody SERPA**

Promývací stanice FW400 je určena pro plně automatizované promývání a inkubaci membrán pro techniku Western blot. Poté co dojde k přenesení proteinů na NC membránu, je membrána vložena do promývací stanice, kde proběhnou všechny nastavené kroky – blokování, inkubace s primární i sekundární protilátkou a promývací cykly. Práce uživatele je pouze připravit potřebné pracovní roztoky, nastavit pracovní program a spustit promývací stanici. FW400 umožňuje spustit hned čtyři zcela nezávislé programy.

Tato stanice může být použita nejen pro WB membrány ale i pro barvení a odbarvování proteinových nebo DNA gelů.

V této části jsem se v první řadě bylo za úkol zjistit, zda v obou případech, tj. práce manuální + práce s automatickou promývačkou, jsou výsledné záznamy shodné. Dále bylo nutné zjistit, jaké objemy roztoků jsou nutné pro jeden cyklus promývání.

#### **4.1.1 Optimalizace pracovního postupu**

Aby bylo možné říci jaké je ideální nastavení promývací stanice pro samotnou analýzu, byly vytvořeny 3 programy lišící se v době inkubace s primární protilátkou (pozitivní patientské sérum). První program byl nastaven na hodinovou inkubaci, která probíhá dle původně zavedeného pracovního protokolu. Druhý program byl nastaven na 8 hodinovou inkubaci a třetí program na 14 hodinovou inkubaci. Bylo také nutné zjistit, zda inkubace za pokojové teploty nebude mít vliv na reaktivitu protilátek s cílovými antigeny.

**Tabulka č. 4:** Program č. 1 – nastavený program na promývací stanici FW4100

	<b>objem (ml)</b>	<b>čas (min)</b>	<b>opakování</b>
<b>A (blokovací roztok)</b>	10	60	1x
<b>A (blokovací roztok)</b>	1	1	1x
<b>B (1° ab – pac. sérum)</b>	10	60	1x
<b>W (promývací roztok PBS – T)</b>	10	5	4x
<b>C (2° ab – anti-human IgG)</b>	10	60	1x
<b>W (promývací roztok PBS – T)</b>	10	5	6x
<b>Celkový čas</b>		231	

**Tabulka č. 5:** Program č. 2 – nastavený program na promývací stanici FW400

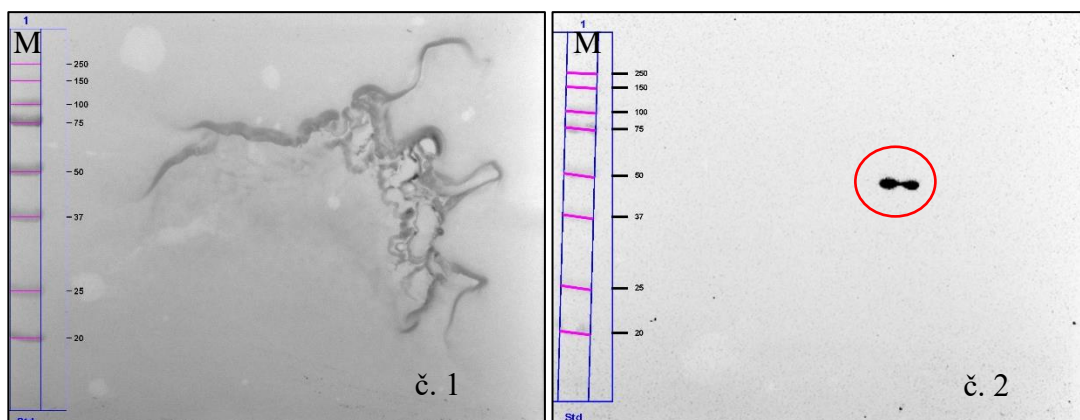
	<b>objem (ml)</b>	<b>čas (min)</b>	<b>opakování</b>
<b>A (blokovací roztok)</b>	10	60	1x
<b>A (blokovací roztok)</b>	1	1	1x
<b>B (1° ab – pac. sérum)</b>	10	480	1x
<b>W (promývací roztok PBS – T)</b>	10	5	4x
<b>C (2° ab – anti-human IgG)</b>	10	60	1x
<b>W (promývací roztok PBS – T)</b>	10	5	6x
<b>Celkový čas</b>		651	

**Tabulka č. 6:** Program č. 3 – nastavený progra na promývací stanici FW400

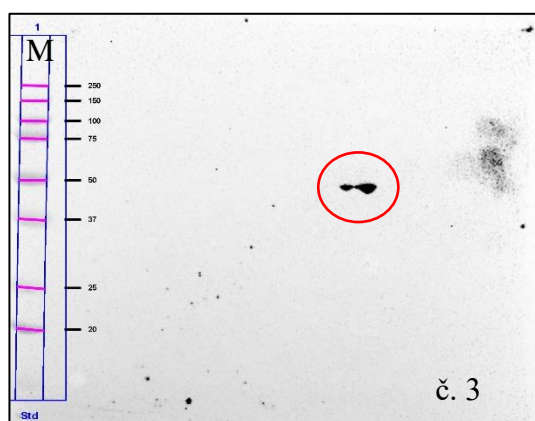
	<b>objem (ml)</b>	<b>čas (min)</b>	<b>opakování</b>
<b>A (blokovací roztok)</b>	10	60	1x
<b>A (blokovací roztok)</b>	1	1	1x
<b>B (1° ab – pac. sérum)</b>	10	840	1x
<b>W (promývací roztok PBS – T)</b>	10	5	4x
<b>C (2° ab – anti-human IgG)</b>	10	60	1x
<b>W (promývací roztok PBS – T)</b>	10	50	6x
<b>Celkový čas</b>		1011	

Po proběhlém experimentu bylo možné vyhodnotit, že u membrán ošetřené dle programu číslo 2 a 3, po následné průkazu imunoreaktivitu séra, je možné zaznamenat anti-ENOL1 protilátky a tím potvrdit, že i inkubace za pokojové teploty nijak zásadně imunoreaktivitu neovlivňuje. U membrány ošetřené dle programu číslo 1 nebylo možné zaznamenat protilátky anti-ENOL1, a to z důvodu neúmyslného vypaření promývacího

roztoku PBS-T, které vedlo k poškození samotné membrány (viz Obrázek č. 8). Z tohoto důvodu bylo nutné zopakovat celý postup znovu a upravit pracovní postupy tak, aby nedošlo ke stejné chybě jako u programu číslo 1.



**Obrázek č. 8:** Výsledek imunoblotové analýzy kontrolního pozitivního séra s proteiny RPMI buněčného lyzátu – membrána ošetřena dle programu č. 1 nebo 2; M – molekulový marker

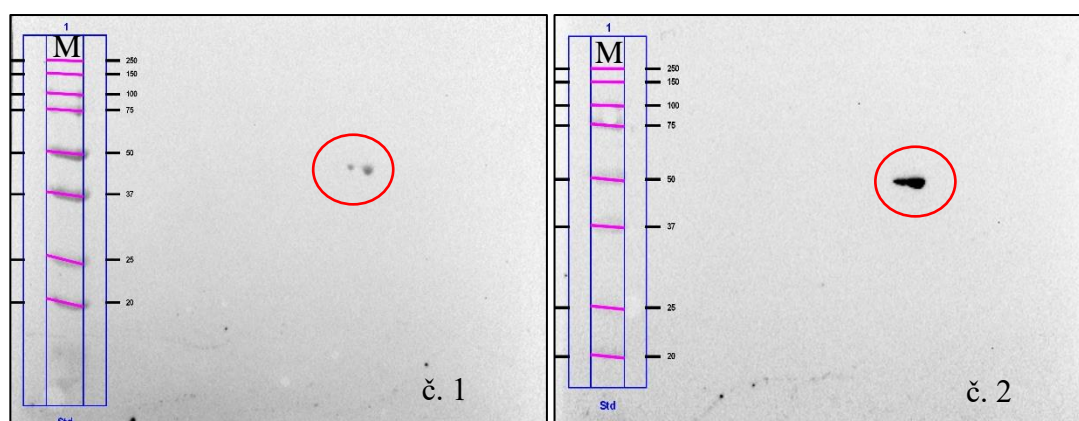


**Obrázek č. 9:** Výsledek imunoblotové analýzy kontrolního pozitivního séra s proteiny RPMI buněčného lyzátu – membrána ošetřena dle programu č. 3; M – molekulový marker

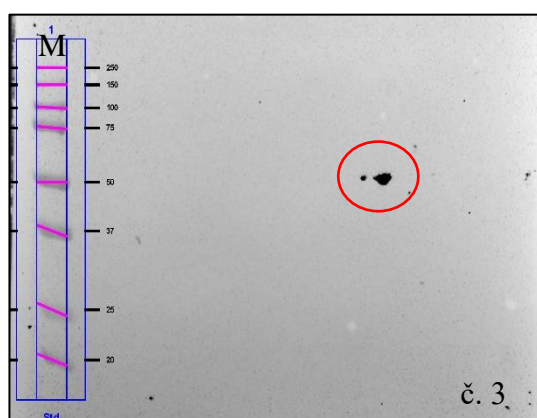
Při opakovaném experimentu bylo možné zaznamenat protilátky anti-ENOL1 opakovaně u membrán programu č. 2 a 3 a nově také u programu č. 1. Byl také upraven promývací čas, který následuje po inkubaci se sekundární protilátkou. Důvodem bylo zamezení poškození membrány vlivem vysušení.

**Tabulka č. 7:** Program č. 2 – nastavený program na promývací stanici FW400

	objem (ml)	čas (min)	opakování
<b>A (blokovací roztok)</b>	10	60	1x
<b>A (blokovací roztok)</b>	1	1	1x
<b>B (1° ab – pac. sérum)</b>	10	480	1x
<b>W (promývací roztok PBS – T)</b>	10	5	4x
<b>C (2° ab – anti-human IgG)</b>	10	60	1x
<b>W (promývací roztok PBS – T)</b>	10	50	6x
<b>Celkový čas</b>		921	



**Obrázek č. 10:** Výsledek imunoblotové analýzy kontrolního pozitivního séra s proteiny RPMI buněčného lyzátu – membrána ošetřena dle programu č. 1 nebo 2; M – molekulový marker



**Obrázek č. 11:** Výsledek imunoblotové analýzy kontrolního pozitivního séra s proteiny RPMI buněčného lyzátu – membrána ošetřena dle programu č. 3; M – molekulový marker

Jak je možné na obrázcích opakované analýzy vidět, všechny nastavené programy poskytují reakční podmínky pro vazbu autoreaktivních protilátek. Je důležité si ale povšimnout, že u membrány programu č. 1 byla intenzita skvrny odpovídající místu imunokomplexu nižší, proto byl pro analýzu patientských sér vybrán pracovní program č. 2. Jedním z důvodů je také časové rozložení samotné práce. Promývací program č. 2 probíhá 15,5 hodiny, což znamená, že probíhá přes noc. Implementace této promývací stanice lze hodnotit za úspěšnou a je možné jí použít v rámci protokolu pracovního postupu SERPA. Díky této stanici je možné zkrátit dobu potřebnou k analýze patientského séra z původních 4 dnů na 2 dny a v neposlední řadě je také možné analyzovat až 4 patientská séra současně.

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

Cílem této analýzy bylo zaznamenat přítomnost anti-ENOL1, případně další autoreaktivních protilátek v sérech pacientů s MM. Pro toto stanovení byla vybrána RPMI buněčná linie pocházející z myelomových buněk jedince s MM (komerční nádorová linie). Po provedení rehydratace a IEF gelových proužků byla uskutečněna 2D-elektroforéza za vzniku proteinových map na předem vytvořeném gelu. Následoval přenos proteinů z gelu na membránu, která byla posléze barvena pomocí koloidního stříbra. Kontrolně obarvena byla pouze jedna membrána, kdy u ostatních byla prokazována imunoreaktivita séra pomocí blotové techniky. Tato technika probíhala pro každý patientský vzorek i negativní kontrolu, vždy na nové membráně. Patientská séra byla měřena pouze jednou, a to včetně negativní kontroly.

Za pomocí substrátu ECL, který funguje na principu chemiluminiscence, byl na NC membráně zachycen signál. Chemiluminiscence vzniká po reakci mezi HRP nacházející se na konjugátu a ECL substrátu. Snímky membrán byly po obarvení a průkazu imunoreaktivit séra pomocí blotové techniky, vytvořeny skenovací stanicí ChemiDoc<sup>TM</sup>XRS a programem ImageLab. V tomto programu bylo možné prokládat mezi sebou jednotlivé snímky, což bylo klíčové při samotném vyhodnocování výsledků.

#### 4.2.1 Vyhodnocení imunoreaktivity patientských sér s proteiny RPMI buněk

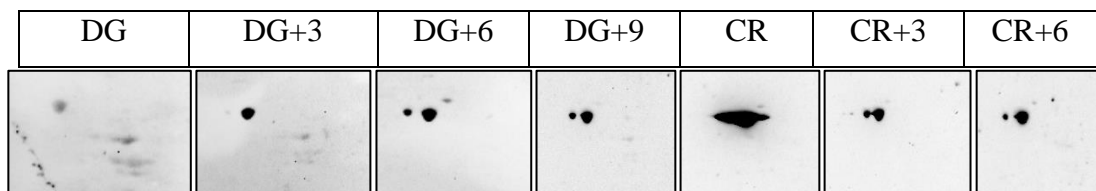
V této části práce byla proměřena séra tří pacientů s MM a jedno kontrolní negativní sérum. Jedná se o pacienty MM s označením 1-13-128, 1-13-130, MM-15-41 a negativního patientské sérum C201009107368. Hledaná enoláza má molekulovou hmotnost 46,9 kDa a izoelektrický bod 7,58 – 7,73.

**Tabulka č. 8:** Seznam testovaných patientských sér; DG – období diagnózy onemocnění; CR – kompletní remise

pacient	období odběru	pacient	období odběru	pacient	období odběru
1-13-128	DG	1-13-130	DG	MM-15-41	DG
	DG+3		DG+3		DG+3
	DG+6		DG+6		DG+6
	DG+9		DG+9		CR
	CR		DG+12		CR+3
	CR+3		DG+15		CR+6
	CR+6		CR		

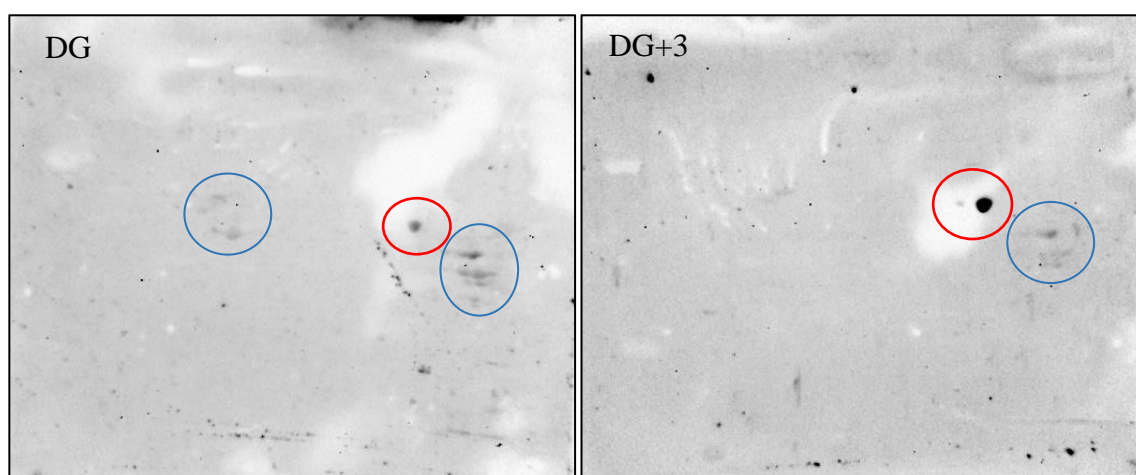
## Imunoreaktivita sér pacienta 1-13-128 s proteiny buněčné linie RPMI

Na následujících obrázcích jsou zobrazeny výřezy záznamů výsledných NC membrán po imunoreaktivitě séra. Tento výřez je zaměřen na prostor, kde má s největší pravděpodobností docházet k detekci auto-ENOL1 protilátek. Následující snímky odpovídají době expozice 300s.



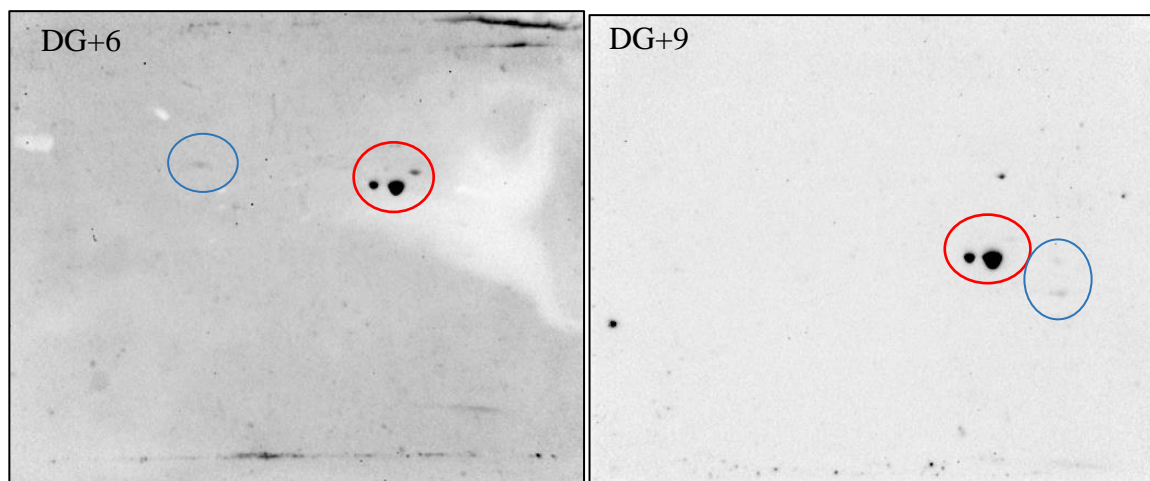
**Obrázek č. 12:** Výsledky imunoblotové analýzy patientského séra (1-13-128) s proteiny RPMI buněčného lyzátu - výřezy výsledků reaktivity patientských sér odebraných v různých obdobích onemocnění na NC membránách.

Na následujících obrázcích jsou zobrazeny celé snímky NC membrán po proběhlé imunoreaktivitě séra. Snímky odpovídají době expozice 300s.

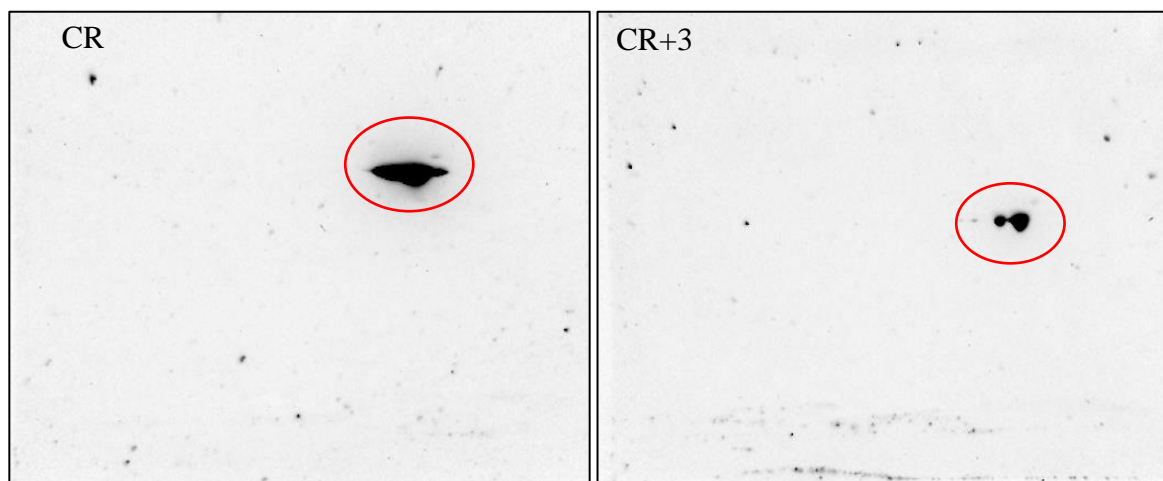


**Obrázek č. 13:** Výsledky imunoblotové analýzy patientského séra DG a DG+3 s proteiny RPMI buněčného lyzátu; (červeným kroužkem jsou ohraničeny imunoreaktivní skvrny (spoty) po vazbě anti-ENOL1 protilátek; modře ohraničené skvrny (lze i spoty) poukazují na nové cílové struktury (antigeny), proti nimž sérum pacienta vykazuje reaktivitu.

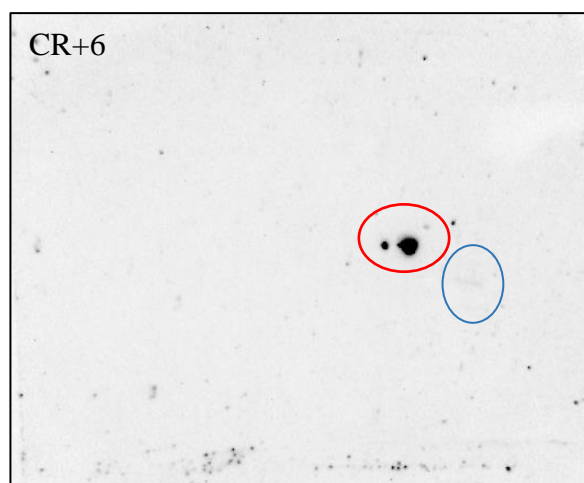




**Obrázek č. 14:** Výsledky imunoblotové analýzy patientského séra DG+6 a DG+9 s proteiny RPMI buněčného lyzátu; (červeným kroužkem jsou ohraničeny imunoreaktivní skvrny (spoty) po vazbě anti-ENOL1 protilátek; modře ohraničené skvrny (lze i spoty) poukazují na nové cílové struktury (antigeny), proti nimž sérum pacienta vykazuje reaktivitu.



**Obrázek č. 15:** Výsledky imunoblotové analýzy patientského séra CR a CR+3 s proteiny RPMI buněčného lyzátu; (červeným kroužkem jsou ohraničeny imunoreaktivní skvrny (spoty) po vazbě anti-ENOL1 protilátek.



**Obrázek č. 16:** Výsledky imunoblotové analýzy pacientského séra CR+6 s proteiny RPMI buněčného lyzátu; (červeným kroužkem jsou ohraničeny imunoreaktivní skvrny (spoty) po vazbě anti-ENOL1 protilátek; modře ohraničené skvrny (lze i spoty) poukazují na nové cílové struktury (antigeny), proti nimž sérum pacienta vykazuje reaktivitu.

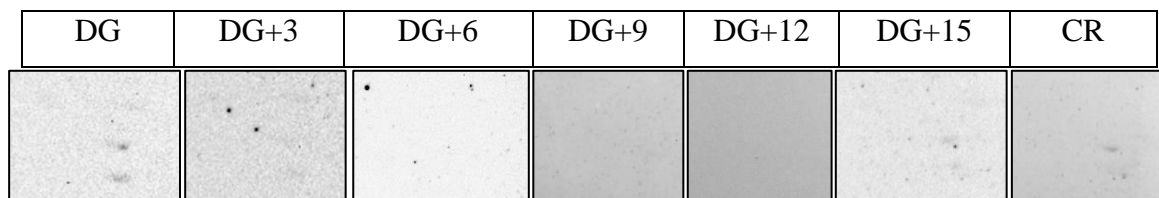
U pacienta 1-13-128 byla provedena detekce 7 sér, a to z období DG, DG+3, DG+6, DG+9, CR, CR+3 a CR+6. Sada snímků byla vytvořena v horizontu 300s po 20 snímcích, kdy první snímek byl vytvořen při 2. s. Je možné si povšimnout, že sérum tohoto pacienta vykazuje výraznou reaktivitu s proteinem ENOL-1 (ohraničeno červeným kroužkem). Naopak si lze povšimnout i dalších spotů v jiné pozici (ohraničeno modře), u nichž nebyla doposud určena identita cílových struktur. V následující etapě výzkumu bude proveden výřez gelu daného spotu a po štěpení trypsinem v gelu bude následovat MS analýza. Jedině tak bude možné přesně identifikovat další cílovou strukturu, se kterou sérum pacienta vykazuje reaktivitu. U tohoto pacienta se intenzita spotu odpovídající anti-ENOL1 zvyšovala v rámci měřených intervalů. U séra z období DG vidíme nepatrný nález anti-ENOL1 autoproti látky a také reaktivitu jiných proteinů, která postupně v čase slábla na intenzitě. U autoproti látek anti-ENOL1 tomu bylo naopak. S každým dalším odebraným sérem v dalším období onemocnění se dá z výsledků imunoblotové analýzy usuzovat, že hladiny anti-ENOL1 měly vzestupný trend. Nejvyšší intenzita byla nalezena u séra v období CR (kompletní remise). Kvantifikace množství těchto autoreaktivních úproti látek nemůže být provedena touto technikou. V dalším období výzkumu bude vyvinuta metoda ELISA pro průkaz těchto anti-ENOL1 protilátek a bude přesně určeno jejich množství pro každé sledované období. Jedině tak bude možné přesně zhodnotit, jak probíhala dynamika tvorby těchto protilátek a zda lze jejich výskytu přisuzovat nějaký klinický význam.

V další fázi výzkumu by bylo zajímavé se v první řadě zaměřit na kvantitu anti-ENOL1 v jednotlivých sérech, a tím potvrdit, že se hladiny protilátek mění v čase s v určité

souvislosti se jeho zdravotním stavem a průběhem onemocnění, také jak pacient odpovídal na terapii. Ve druhé řadě by bylo vhodné se zaměřit na identifikaci dalších cílových proteinů, které byly detekovány současně s protilátkou anti-ENOL1. K určení neznámých proteinů zachycených na NC membráně by bylo nutné vyříznout daný spot z gelu, kde se s největší pravděpodobností protein nachází a dále by byla provedena analýza pomocí MS-MALDI.

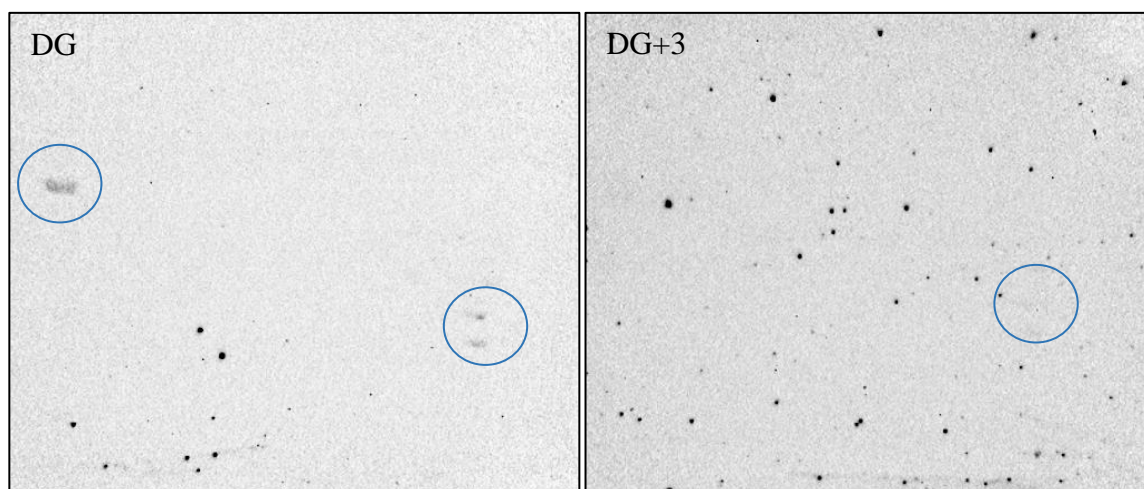
## Imunoreaktivita sér pacienta 1-13-130 s proteiny buněčné linie RPMI

Na následujících obrázcích jsou zobrazeny výřezy výsledků po imunoreaktivitě patientských sér na NC membráně. Tento výřez je zaměřen na prostor, kde má s největší pravděpodobností docházet k detekci anti-ENOL1 protilátek. Snímky odpovídají době expozice 300s.

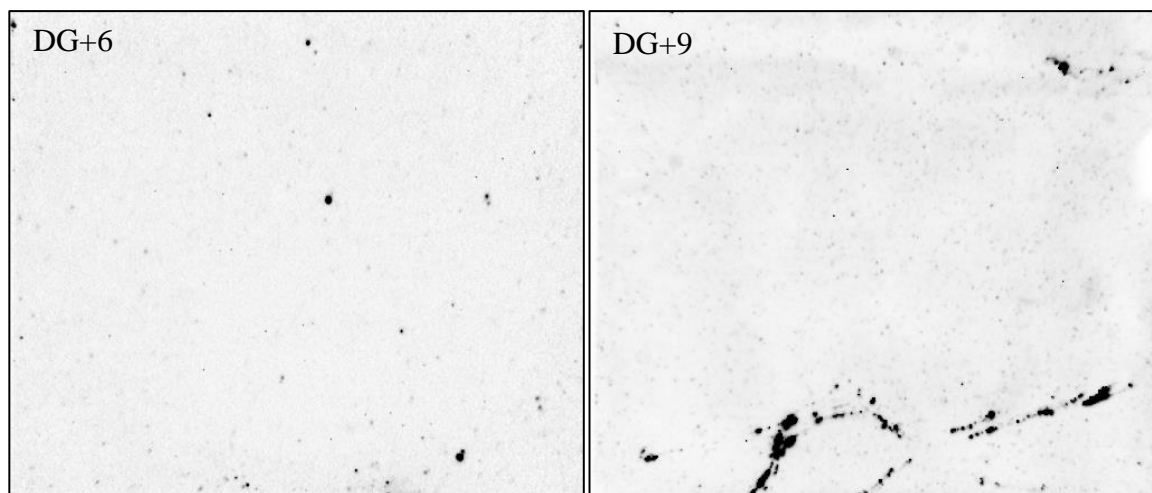


**Obrázek č. 17:** Výsledky imunoblotové analýzy patientského séra (1-13-130) s proteiny RPMI buněčného lyzátu - výřezy výsledků reaktivity patientských sér odebraných v různých obdobích onemocnění na NC membránách.

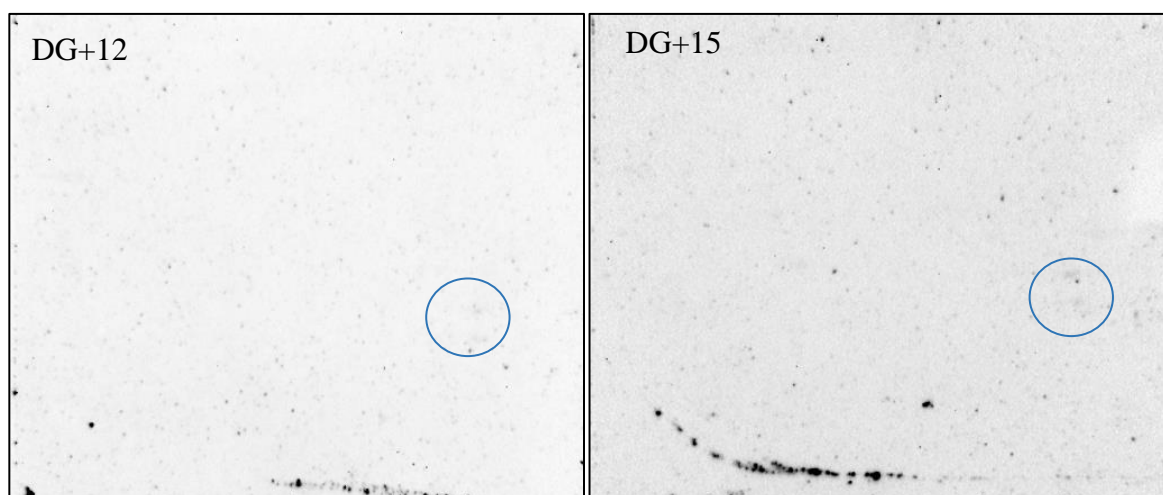
Na následujících obrázcích jsou zobrazeny celé snímky NC membrán po proběhlé imunoreaktivitě sér. Snímky odpovídají době expozice 300s.



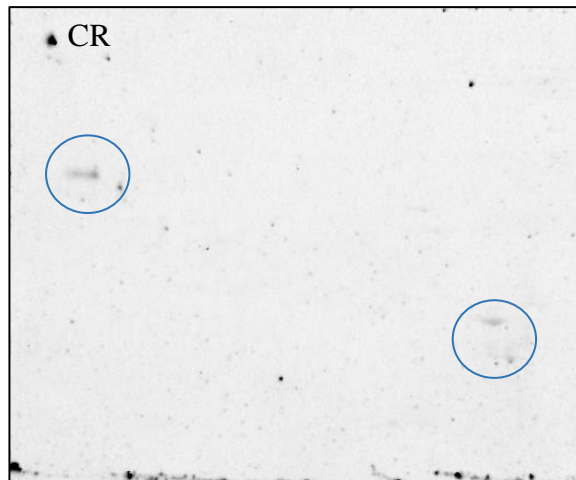
**Obrázek č. 18:** Výsledky imunoblotové analýzy patientského séra DG a DG+3 s proteiny RPMI buněčného lyzátu; modře ohraničené skvrny (lze i spoty) poukazují na nové cílové struktury (antigeny), proti nimž sérum pacienta vykazuje reaktivitu.



**Obrázek č. 19:** Výsledky imunoblotové analýzy patientského séra DG+6 a DG+9 s proteiny RPMI buněčného lyzátu.



**Obrázek č. 20:** Výsledky imunoblotové analýzy patientského séra DG+12 a DG+15 s proteiny RPMI buněčného lyzátu; modře ohraničené skvrny (lze i spoty) poukazují na nové cílové struktury (antigeny), proti nimž sérum pacienta vykazuje reaktivitu.



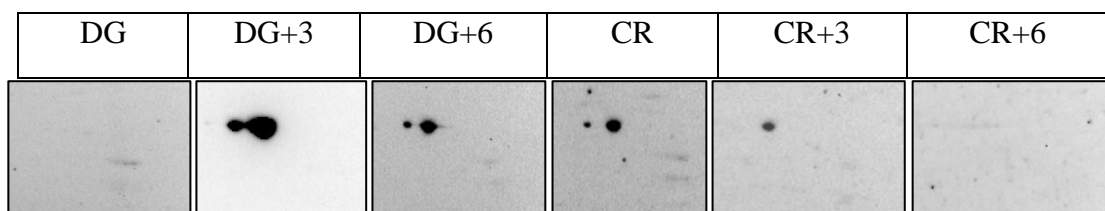
**Obrázek č. 21:** Výsledky imunoblotové analýzy pacientského séra CR s proteiny RPMI buněčného lyzátu; modře ohraničené skvrny (lze i spoty) poukazují na nové cílové struktury (antigeny), proti nimž sérum pacienta vykazuje reaktivitu.

U pacienta 1-13-130 bylo detekováno rovněž sedm snímků, ale liší se obdobím odběru. Byla detekována séra z období DG, DG+3, DG+6, DG+9, DG+12, DG+15 a CR. Tento pacient nevykazoval přítomnost anti-ENOL1 protilátek. Co však bylo pozorováno je velké množství různých artefaktů, a to nejvíce na NC membráně odpovídající DG+3 séru. Tyto artefakty nebyly blíže určeny, mohlo se také jednat o nespecifickou vaznost mezi protilátkami a konjugátem. Dále je možné pozorovat reaktivitu séra s jinými proteiny, než jak tomu bylo například u pacienta 1-13-128. V tomto případě však nelze blíže ověřit korelaci výskytu protilátky s množstvím jiných proteinů. Bylo by vhodné analyzovat neznámé proteiny pomocí MS-MALDI.



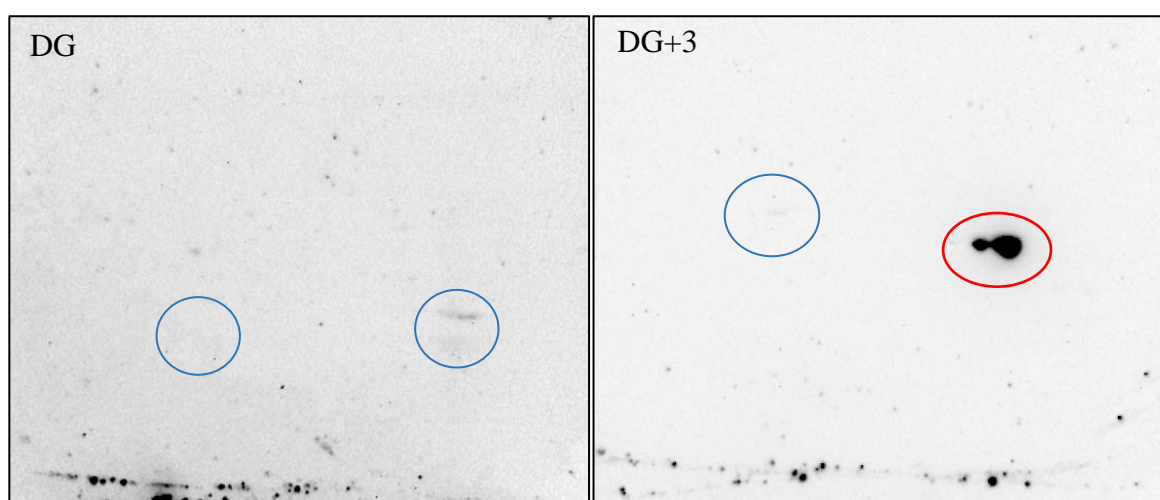
## Imunoreaktivita sér pacienta M-15-41 s proteiny buněčné linie RPMI

Na následujících obrázcích jsou zobrazeny výřezy výsledků po imunoreaktivitě patientských sér na NC membráně. Tento výřez je zaměřen na prostor, kde má s největší pravděpodobností docházet k detekci anti-ENOL1 protilátek. Snímky odpovídají době expozice 300s.

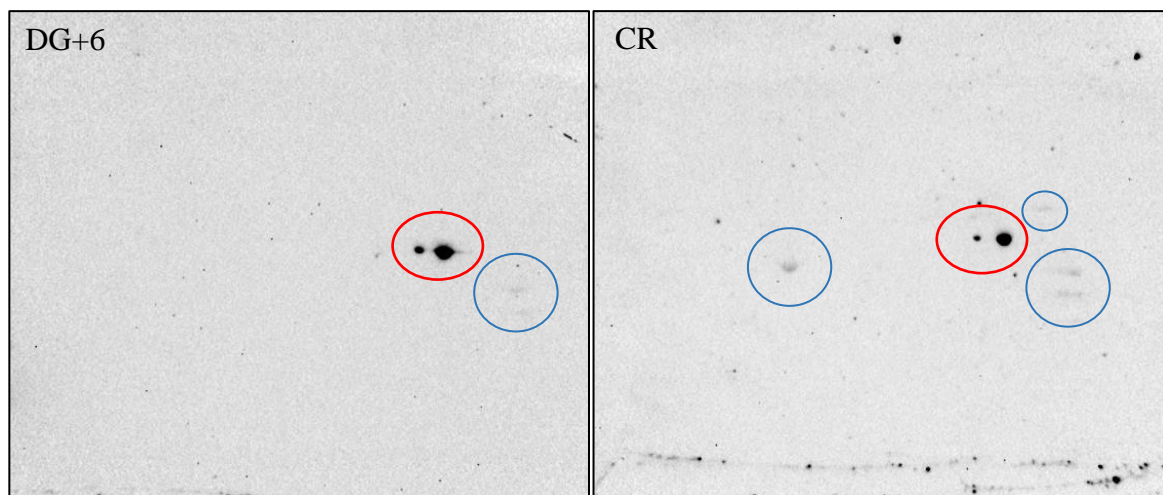


**Obrázek č. 22:** Výsledky imunoblotové analýzy patientského séra MM-15-41 s proteiny RPMI buněčného lyzátu - výřezy výsledků reaktivity patientských sér odebraných v různých obdobích onemocnění na NC membránách.

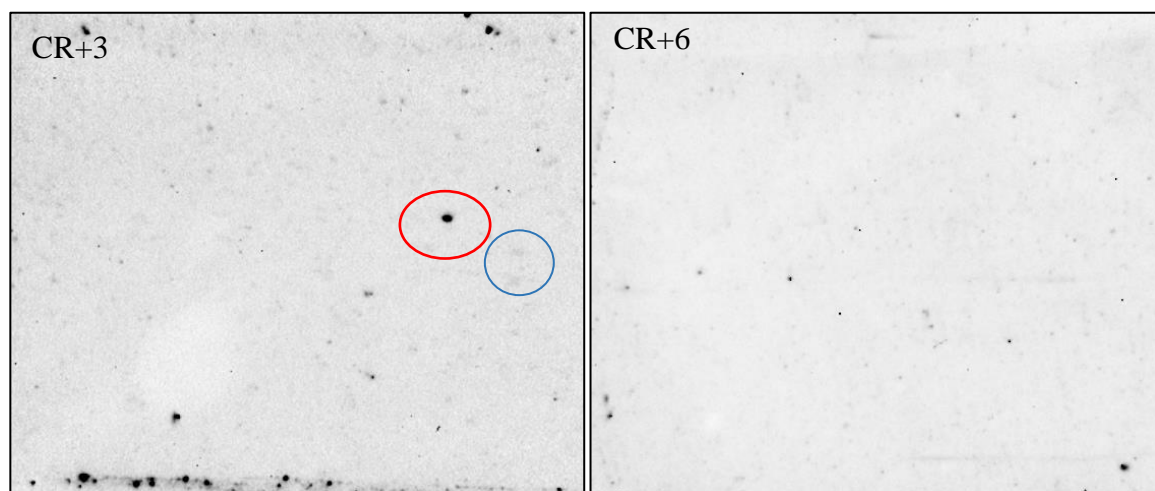
Následující obrázky poskytují snímky NC membrán po proběhlé imunoreaktivitě sér. Snímky odpovídají době expozice 300s.



**Obrázek č. 23:** Výsledky imunoblotové analýzy patientského séra DG a DG+3 s proteiny RPMI buněčného lyzátu; (červeným kroužkem jsou ohraničeny imunoreaktivní skvrny (spoty) po vazbě anti-ENOL1 protilátek; modře ohraničené skvrny (lze i spoty) poukazují na nové cílové struktury (antigeny), proti nimž sérum pacienta vykazuje reaktivitu.



**Obrázek č. 24:** Výsledky imunoblotové analýzy patientského séra DG+6 a CR s proteiny RPMI buněčného lyzátu; (červeným kroužkem jsou ohraničeny imunoreaktivní skvrny (spoty) po vazbě anti-ENOL1 protilátek; modře ohraničené skvrny (lze i spoty) poukazují na nové cílové struktury (antigeny), proti nimž sérum pacienta vykazuje reaktivitu.



**Obrázek č. 25:** Výsledky imunoblotové analýzy patientského séra CR+3 a CR+6 s proteiny RPMI buněčného lyzátu; (červeným kroužkem jsou ohraničeny imunoreaktivní skvrny (spoty) po vazbě anti-ENOL1 protilátek; modře ohraničené skvrny (lze i spoty) poukazují na nové cílové struktury (antigeny), proti nimž sérum pacienta vykazuje reaktivitu.

U posledního pacienta MM-15.41 bylo detekováno 6 sér, a to z období DG, DG+3, DG+6, CR, CR+3, CR+6. Opět se jedná o úplně odlišný obraz detekovaných výsledků. V séru bylo obsaženo určité množství anti-ENOL1 protilátek. Dle získaných snímků vyplývá, že první známky přítomnosti anti-ENOL1 bylo možné pozorovat u séra DG+3. Co však nemůžeme říct, že protilátka nebyla přítomna před samotnou diagnózou. Ze snímků NC membrán lze také vyzorovat, že největší koncentrace anti-ENOL1 protilátek se nacházela v séru DG+3. S postupem času u pacienta docházelo ke ztrátám této protilátky



až nakonec v séru DG+6 nebyly žádné známky její přítomnosti. Byly přítomny i nevysvětlené artefakty i reaktivity neznámých proteinů (vyznačeny modře). V tomto případě vidíme, že intenzita reaktivních proteinů je největší u séra z období diagnózy. U séra odebraného v období DG+3 vidíme, že většina reaktivních proteinů mizí a objevuje se důkaz přítomnosti protilátky. V tomto séru je i její intenzita ze všech uvedených sér nejvýznamnější. V následujících vzorcích sér hladiny protilátek klesaly a opět docházelo k výskytu reaktivních proteinů. Lze se domnívat, že tyto proteiny mohou hrát důležitou roli.

V tomto případě by bylo opět vhodné provést kvantitativní analýzu pomocí metody ELISA i identifikaci zobrazených reaktivních proteinů pomocí metody MS-MALDI.

## **Imunoreaktivita sér zdravého pacienta C201009107368 s proteiny buněčné linie RPMI**

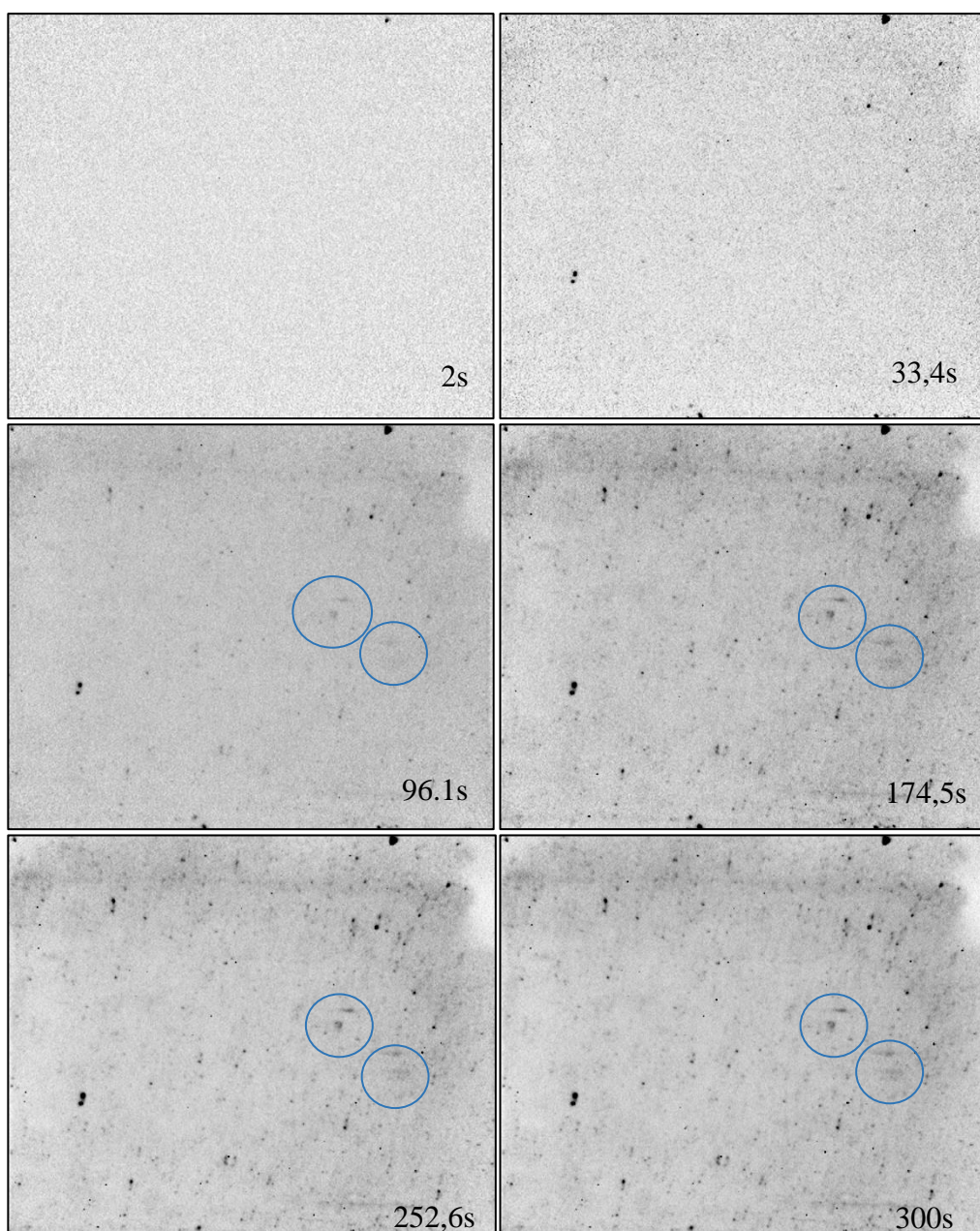
Na následujícím obrázku je zobrazen výsledek imunoreaktivity séra zdravého patientského séra. Toto sérum bylo analyzováno jelikož má charakter kontrolního negativního séra. To znamená, že by zde nemělo dojít k zobrazení spotů, jaké pozorujeme u pacientů s MM. Snímek odpovídá 2 vteřině doby expozice.



**Obrázek č. 26:** Výsledky imunoblotové analýzy patientského negativního séra (C201009107368) s proteiny RPMI buněčného lyzátu.

## Snímky v závislosti na době expozice

Na těchto snímcích je možné pozorovat, že obraz snímku závisí také na době nastavení expozice. Čím déle snímek fotíme, tím je vyšší intenzita jednotlivých spotů, artefaktů i pozadí. Snímky jsou vytvořené z analýzy zdravého patientského séra. Expozice byla nastavena dle pracovního protokolu metody SERPA na dobu snímání 300s, 20 snímků, kdy první snímek je vytvořen při 2. s.



**Obrázek č. 27:** Výsledky imunoblotové analýzy patientského negativního séra (C201009107368) s proteiny RPMI buněčného lyzátu v různých časových intervalech

Sérum pacienta C201009107368 sloužilo jako negativní kontrola. Tento vzorek byl měřen pouze jednou a je možné konstatovat, že přítomnost anti-ENOL1 není patrná. Těchto šest snímků bylo provedeno v rámci jednoho průkazu imunoreaktivity séra. Liší se v čase vytvoření snímku. Důvodem prezentace snímků bylo poukázat na změnu intenzity pozadí i zobrazení spotů či artefaktů v čase záznamu detekce Na snímku vytvořeném při 2. s nebyl nalezen původně téměř žádný artefakt či jiný protein. S rostoucím časem však docházelo jednak ke změně pozadí, tak i k zvýšenému výskytu artefaktů, včetně náznaku reaktivních proteinů, které bylo možné pozorovat u všech tří pacientů s MM. Můžeme se tedy domnívat, že tyto reaktivní proteiny mohou, ale nemusí mít zásadní význam u pacientů postižených MM. Co se týká podmínek pro pořizování snímků, byly u všech hodnocených sér stejné. Měření probíhalo po dobu 300s, kdy bylo vytvořeno 20 snímků a první snímek byl vytvořen při 2. s doby expozice.

### **Barvení NC membrány koloidním stříbrem**

V rámci každé analýzy patientských sér bylo provedeno jedno kontrolní barvení NC membrány koloidním stříbrem. Důvodem bylo zjistit, zda došlo ke správné 2D separaci.

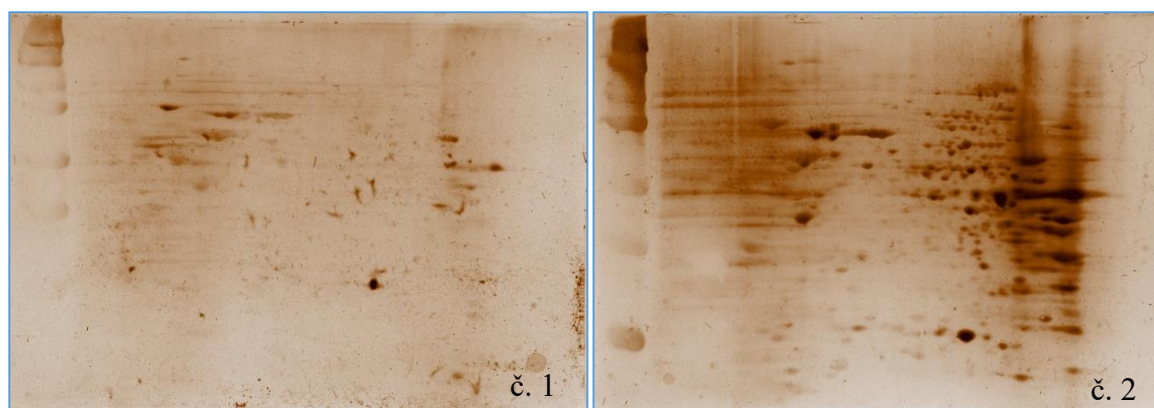


**Obrázek č. 28:** Kontrolní barvení NC membrány koloidním stříbrem; M (molekulový marker), přítomné spoty odpovídají jednotlivým proteinům

Na obrázku č. 25 je možné pozorovat, že došlo k úspěšné v 2D separaci. Proteiny jsou rozděleny dle jejich izoelektrických bodů a molekulové hmotnosti, to je vyjádřeno tmavými spoty na uvedené membráně (Obrázek č. 25).

### Kontrolní barvení gelů $\text{AgNO}_3$

V rámci každé analýzy patientských sér bylo provedeno jedno kontrolní barvení gelu dusičnanem stříbrným. Důvodem bylo zjistit, zda došlo ke kvantitativnímu přenesení proteinů z gelu na NC membránu metodou Western blot.



**Obrázek č. 29:** Kontrolní barvení gelů  $\text{AgNO}_3$

Na obrázku č. 26 je možné pozorovat dva snímky kontrolního barvení gelů. Snímek č. 1 představuje gel, u kterého došlo ke přenosu většího množství proteinů na NC membránu, nežli u snímku č. 2.

## ZÁVĚR

V této práci byla použita metoda SERPA spolu s nově implementovanou promývací stanicí FW400, konkrétně pro průkaz imunoreaktivity sér u pacientů s MM v remisi.

V rámci této práce byla nastavena a implementována promývací stanice FW400 tak, aby ji bylo možné zařadit do metody SERPA a tím umožnit analyzovat reprodukovatelně více NC membrán a v kratším čase. Dále byly provedeny analýzy imunoproteomu u vybraných pacientů v 3 – 6 měsíčních intervalech od okamžiku diagnózy a v průběhu léčby a dosažení tzv. CR. V rámci analýzy patientských sér bylo úkolem zjistit, zda séra nevykazují reaktivitu s ENOL1 a dalšími proteiny z buněčného lyzátu. Pomocí bioinformatiky se hledaly souvislosti mezi výskytem těchto specifických autoprotilátek s klinickým průběhem onemocnění u sledovaného pacienta s MM v remisi. Pro stanovení specifických autoprotilátek byla použita buněčná linie RPMI 8226.

Proteiny z buněčné linie RPMI 8226 byly separovány pomocí 2D-elektroforézy a přeneseny na NC membránu metodou Western blot. Jedna membrána byla vždy barvena koloidním stříbrem, tak aby bylo jasné, zda došlo k úspěšné 2D separaci. Důkazem byl vznik proteinové mapy. Následovalo zjišťování imunoreaktivity sér probíhající v promývací stanici, za působení blokovacího roztoku, patientského séra fungující jako primární protilátka a konjugátu značeného enzymem křenovou peroxidázou (HRP). Závěrem byl přidán substrát, který vedl k vizualizaci imunoreaktivních proteinů na NC membráně, kdy intenzita jeho signálu měla odpovídat množství antigenu. Na čem však také záleželo je afinita mezi antigenem a protilátkou.

Na přítomnost anti-ENOL1 protilátky byly pozitivní dva ze tří analyzovaných pacientů s MM v remisi. Pozitivní nález na tuto protilátku byl detekován u pacientů 1-13-128 a MM-15-41. Spolu s těmito proteinovými skvrnami bylo možné zaznamenat skvrny, které neodpovídaly této protilátce. Tyto skvrny nebyly dále identifikovány hmotnostním spektrometrem, tudíž nelze říct o jaký typ se jedná. Pacient 1-13-130 byl na průkaz protilátky negativní.

Výskytem anti-ENOL1 protilátek u sér pacientů s MM v remisi lze říci, že by se v budoucno mohlo jednat o diagnostický marker nebo by mohl být využit při diagnostice tohoto onemocnění. Dále by mohl sloužit jako ukazatel úspěšnosti zvolené terapie.

## 5 POUŽITÁ LITERATURA

1. STRAUB, J., Z. ADAM, E. GREGORA, et al. Mnohočetný myelom - časná diagnostika. *Medicína pro praxi*. 2009, 6(4), 197-199
2. RÖLLIG, Ch., KNOP, S., BORNHÄUSER, M., Multiple myeloma. *The Lancet*. 2015, **385**(9983), 2197-2208. ISSN 01406736. Dostupné z: doi:10.1016/S0140-6736(14)60493-1
3. BARTUŇKOVÁ, DRSC., Prof. MUDr. Jiřina. Protinádorová imunita. *Zdravotnictví a medicína* [online]. Praha: Novák, 2012 [cit. 2021-02-11]. Dostupné z: <https://zdravi.euro.cz/clanek/postgradualni-medicina/protinadorova-imunita-463471>
4. SUBHRA K. BISWAS. Metabolic Reprogramming of Immune Cells in Cancer Progression, *Immunity*, Volume 43, Issue 3, 2015, Pages 435-449, ISSN 1074-7613, <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.09.001>.  
(<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1074761315003611>)
5. WHITESIDE TL, HEBERMAN RB. Antitumor Effector Cells in Humans. In: Kufe DW, Pollock RE, Weichselbaum RR, et al., editors. *Holland-Frei Cancer Medicine*. 6th edition. Hamilton (ON): BC Decker; 2003. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK13070/>
6. KENNETH HUNG, ROBERT HAYASHI, ANNE LAFOND-WALKER, CHARLES LOWENSTEIN, DREW PARDOLL, HYAM LEVITSKY. The Central Role of CD4<sup>+</sup> T Cells in the Antitumor Immune Response . *J Exp Med* 21 December 1998; 188 (12): 2357–2368. doi: <https://doi.org/10.1084/jem.188.12.2357>
7. TAMURA, RYOTA, TOSHIHIDE TANAKA, YOHEI YAMAMOTO, YASUHARU AKASAKI A HIKARU SASAKI. Dual role of macrophage in tumor immunity. *Immunotherapy*. 2018, **10**(10), 899-909. ISSN 1750-743X. Dostupné z: doi:10.2217/imt-2018-0006
8. PATHRIA, PAULINA, TIANI L. LOUIS A JUDITH A. VARNER. Targeting Tumor-Associated Macrophages in Cancer. *Trends in Immunology*. 2019, **40**(4), 310-327. ISSN 14714906. Dostupné z: doi:10.1016/j.it.2019.02.003
9. WYLIE, PAULINA, TIANI L. MACRI, JUDITH A. MINTERN A WAITHMAN. Dendritic Cells and Cancer: From Biology to Therapeutic Intervention. *Cancers*. 2019, **11**(4), 310-327. ISSN 2072-6694. Dostupné z: doi:10.3390/cancers11040521
10. CHISTIakov, DIMITRY A., ALEXANDER N. OREKHOV, IGOR A. SOBENIN A YURI V. BOBRYshev. Plasmacytoid dendritic cells: development, functions, and role in atherosclerotic inflammation. *Frontiers in Physiology*. 2014, **5**(4), 310-327. ISSN 1664-042X. Dostupné z: doi:10.3389/fphys.2014.00279
11. MACRI, CHRISTOPHE, EE SHAN PANG, TIMOTHY PATTON A MEREDITH O'KEEFFE. Dendritic cell subsets. 2018, **84**, 11-21. ISSN 10849521. Dostupné z: doi:10.1016/j.semcd.2017.12.009
12. VILLANI, ALEXANDRA-CHLOÉ, RAHUL SATIJA, GARY REYNOLDS, et al. Single-cell RNA-seq reveals new types of human blood dendritic cells, monocytes, and progenitors. *Science*. 2017, **356**(6335). ISSN 0036-8075. Dostupné z: doi:10.1126/science.aah4573
13. MIN, JIYOUN, DONGCHAN YANG, MIRANG KIM, et al. Inflammation induces two types of inflammatory dendritic cells in inflamed lymph nodes: development, functions, and role in atherosclerotic inflammation. *Frontiers in Physiology*. 2018, **50**(3), e458-e458. ISSN 1226-3613. Dostupné z: doi:10.1038/emm.2017.292
14. KENNEDY, RICHARD, ESTEBAN CELIS, MIRANG KIM, et al. Multiple roles for CD4 T cells in anti-tumor immune responses: development, functions, and role in atherosclerotic inflammation. *Immunological Reviews*. 2008, **222**(1), 129-144. ISSN 0105-2896. Dostupné z: doi:10.1111/j.1600-065X.2008.00616.x
15. MONU, NGOZI R. A ALAN B. FREY. Myeloid-Derived Suppressor Cells and anti-tumor T cells: a complex relationship. *Immunological Investigations*. 2012, **41**(6-7), 595-613. ISSN 0882-0139. Dostupné z: doi:10.3109/08820139.2012.673191



16. MALECH, HARRY L., FRANK R. DELEO A MARK T. QUINN. The Role of Neutrophils in the Immune System: An Overview. *Neutrophil*. New York, NY: Springer US, 2020, 2020-11-15, , 3-10. Methods in Molecular Biology. ISBN 978-1-0716-0153-2. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-0716-0154-9\_1
17. URIBE-QUEROL, EILEEN A CARLOS ROSALES. Neutrophils in Cancer: Two Sides of the Same Coin. *Journal of Immunology Research*. 2015, **2015**, 1-21. ISSN 2314-8861. Dostupné z: doi:10.1155/2015/983698
18. GRANOT, ZVI A JADWIGA JABLONSKA. Distinct Functions of Neutrophil in Cancer and Its Regulation. *Mediators of Inflammation*. 2015, **2015**, 1-11. ISSN 0962-9351. Dostupné z: doi:10.1155/2015/701067
19. WALDHAUER, I a A STEINLE. NK cells and cancer immunosurveillance. *Oncogene*. 2008, **27**(45), 5932-5943. ISSN 0950-9232. Dostupné z: doi:10.1038/onc.2008.267
20. LARGEOT, ANNE, GIULIA PAGANO, SUSANNE GONDER, ETIENNE MOUSSAY A JEROME PAGGETTI. The B-Side of Cancer Immunity: The Underrated Tune. *Cells*. 2019, **8**(5), 5932-5943. ISSN 2073-4409. Dostupné z: doi:10.3390/cells8050449
21. ELKON, KEITH A PAOLO CASALI. Nature and functions of autoantibodies. *Nature Clinical Practice Rheumatology*. 2008, **4**(9), 491-498. ISSN 1745-8382. Dostupné z: doi:10.1038/ncprheum0895
22. MACDONALD, ISABEL K., CELINE B. PARSY-KOWALSKA CAROLINE J. CHAPMAN. Autoantibodies: Opportunities for Early Cancer Detection. *Trends in Cancer*. 2017, **3**(3), 198-213. ISSN 24058033. Dostupné z: doi:10.1016/j.trecan.2017.02.003
23. BALDWIN, R W. Immunity to Transplanted Tumour: The Effect of Tumour Extracts on the Growth of Homologous Tumours in Rats. *British Journal of Cancer*. 1955, **9**(4), 646-651. ISSN 0007-0920. Dostupné z: doi:10.1038/bjc.1955.69
24. BALDWIN, R. W. Tumour-specific immunity against spontaneous rat tumours. *International Journal of Cancer*. 1966, **1**(3), 257-264. ISSN 00207136. Dostupné z: doi:10.1002/ijc.2910010305
25. TURNBULL, A R, D T TURNER, J D FRASER, R S LLOYD, C J LANG a R WRIGHT. Autoantibodies in early breast cancer: a stage-related phenomenon? *British Journal of Cancer*. 1978, **38**(3), 461-463. ISSN 0007-0920. Dostupné z: doi:10.1038/bjc.1978.230
26. ZHONG, LI, SARAH P. COE, ARNOLD J. STROMBERG, NADA H. KHATTAR, JAMES R. JETT A EDWARD A. HIRSCHOWITZ. Profiling Tumor-Associated Antibodies for Early Detection of Non-small Cell Lung Cancer. *Journal of Thoracic Oncology*. 2006, **1**(6), 513-519. ISSN 15560864. Dostupné z: doi:10.1016/S1556-0864(15)30352-X
27. ANDERSON, KAREN S., JOSHUA LABAER, ARNOLD J. STROMBERG, NADA H. KHATTAR, JAMES R. JETT A EDWARD A. HIRSCHOWITZ. The Sentinel Within: Exploiting the Immune System for Cancer Biomarkers. *Journal of Proteome Research*. 2005, **4**(4), 1123-1133. ISSN 1535-3893. Dostupné z: doi:10.1021/pr0500814
28. LEE, SANG-GUK, JISOOK YIM, YEIN LIM A JEONG-HO KIM. Validation of a liquid chromatography tandem mass spectrometry method to measure oxidized and reduced forms of glutathione in whole blood and verification in a mouse model as an indicator of oxidative stress. *Journal of Chromatography B*. 2016, **1019**, 45-50. ISSN 15700232. Dostupné z: doi:10.1016/j.jchromb.2015.10.041
29. HOLDERRIED, T. A. W., P. A. LANG, H.-J. KIM a H. CANTOR. Genetic disruption of CD8 Treg activity enhances the immune response to viral infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2013, **110**(52), 21089-21094. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.1320999110



30. KIM, HYE-JUNG, BERT VERBINNEN, XIAOLEI TANG, LINRONG LU A HARVEY CANTOR. Inhibition of follicular T-helper cells by CD8 regulatory T cells is essential for self tolerance. *Nature*. 2010, 467(7313), 328-332. ISSN 0028-0836. Dostupné z: doi:10.1038/nature09370
31. REUSCHENBACH, MIRIAM, MAGNUS VON KNEBEL DOEBERITZ NICOLAS WENTZENSEN. A systematic review of humoral immune responses against tumor antigens. *Cancer Immunology, Immunotherapy*. 2009, 58(10), 1535-1544. ISSN 0340-7004. Dostupné z: doi:10.1007/s00262-009-0733-4
32. MATSUMOTO, ISAO, MARIANA MACCIONI, DAVID M. LEE, MADELON MAURICE, BARRY SIMMONS, MICHAEL BRENNER, DIANE MATHIS A CHRISTOPHE BENOIST. How antibodies to a ubiquitous cytoplasmic enzyme may provoke joint-specific autoimmune disease. *Nature Immunology*. 2002, 3(4), 360-365. ISSN 1529-2908. Dostupné z: doi:10.1038/ni772
33. BINSTADT, BRYCE A, PRATIK R PATEL, HERLEN ALENCAR, ET AL. Particularities of the vasculature can promote the organ specificity of autoimmune attack. *Nature Immunology*. 2006, 7(3), 284-292. ISSN 1529-2908. Dostupné z: doi:10.1038/ni1306
34. TAN, ENG M. A JIANYING ZHANG. Autoantibodies to tumor-associated antigens: reporters from the immune system. *Immunological Reviews*. 2008, 222(1), 328-340. ISSN 0105-2896. Dostupné z: doi:10.1111/j.1600-065X.2008.00611.x
35. EVANS, RICK L., JAMES V. POTTALA KRISTI A. EGLAND. Classifying Patients for Breast Cancer by Detection of Autoantibodies against a Panel of Conformation-Carrying Antigens. *Cancer Prevention Research*. 2014, 7(5), 545-555. ISSN 1940-6207. Dostupné z: doi:10.1158/1940-6207.CAPR-13-0416
36. JAMES, JUDITH A. JOHN B. HARLEY. B-cell epitope spreading in autoimmunity. *Immunological Reviews*. 1998, 164(1), 185-200. ISSN 0105-2896. Dostupné z: doi:10.1111/j.1600-065X.1998.tb01220.x
37. ANTHONY, ROBERT M., FREDRIK WERMELING A JEFFREY V. RAVETCH. Novel roles for the IgG Fc glycan. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2012, 1253(1), 170-180. ISSN 00778923. Dostupné z: doi:10.1111/j.1749-6632.2011.06305.x
38. IMAI, H, E K CHAN, K KIYOSAWA, X D FU a E M TAN. Novel nuclear autoantigen with splicing factor motifs identified with antibody from hepatocellular carcinoma. *Journal of Clinical Investigation*. 1993, 92(5), 2419-2426. ISSN 0021-9738. Dostupné z: doi:10.1172/JCI116848
39. CARROLL, MICHAEL C. The lupus paradox. *Nature Genetics*. 1998, 19(1), 3-4. ISSN 1061-4036. Dostupné z: doi:10.1038/ng0598-3
40. YURASOV, SERGEY A MICHEL C NUSSENZWEIG. Regulation of autoreactive antibodies. *Current Opinion in Rheumatology*. 2007, 19(5), 421-426. ISSN 1040-8711. Dostupné z: doi:10.1097/BOR.0b013e328277ef3b
41. CASALI, P, S. BURASTERO, M NAKAMURA, G INGHIRAMI a A. NOTKINS. Human lymphocytes making rheumatoid factor and antibody to ssDNA belong to Leu-1 B-cell subset. *Science*. 1987, 236(4797), 77-81. ISSN 0036-8075. Dostupné z: doi:10.1126/science.3105056
42. CASALI, P. a E. W. SCHETTINO. Structure and Function of Natural Antibodies. *Immunology of Silicoes*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1996, 1996, , 167-179. Current Topics in Microbiology and Immunology. ISBN 978-3-642-85228-2. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-642-85226-8\_17
43. KYLE R.A., STEENSMA D.P. History of Multiple Myeloma. In: Moehler T., Goldschmidt H. (eds) Multiple Myeloma. Recent Results in Cancer Research, vol 183. Springer, Berlin, Heidelberg. [https://doi.org/10.1007/978-3-540-85772-3\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-540-85772-3_1)
44. ŠALEK, T. Laboratorní diagnostika mnohočetného myelomu. *Interní Med.*, 2008, vol. 10, iss. 9, p. 407-409.

45. ABD, BASIMA A MUSHTAQ MOHAMMED. Multiple myeloma, the plasma cell cancer: An overview. *Medical Journal of Babylon*. 2020, **17**(3). ISSN 1812-156X. Dostupné z: doi:10.4103/MJBL.MJBL\_20\_20
46. Mnohočetný myelom - stádia [online]. 2020 [cit. 2020-09-25]. Dostupné z: <https://www.myeloma.cz/index.php?pg=mnohocetny-myelom--zakladni-udaje--stadia>
47. BERGSAGEL, P. LEIF A W. MICHAEL KUEHL. Molecular Pathogenesis and a Consequent Classification of Multiple Myeloma. *Journal of Clinical Oncology*. 2005, **23**(26), 6333-6338. ISSN 0732-183X. Dostupné z: doi:10.1200/JCO.2005.05.021
48. RICCARDI, ALBERTO, PAOLO G. GOBBI, GIOVANNI UCCI, DANIELE BERTOLONI, RENATA LUONI, LEONARDO RUTIGLIANO, EDOARDO ASCARI. Changing clinical presentation of multiple myeloma. *European Journal of Cancer and Clinical Oncology*. 1991, **27**(11), 1401-1405. ISSN 02775379. Dostupné z: doi:10.1016/0277-5379(91)90020-E
49. KYLE, R A, S V RAJKUMAR. Criteria for diagnosis, staging, risk stratification and response assessment of multiple myeloma. *Leukemia*. 2009, **23**(1), 3-9. ISSN 0887-6924. Dostupné z: doi:10.1038/leu.2008.291
50. DIMOPOULOS, M, E TERPOS, R L COMENZO, et al. International myeloma working group consensus statement and guidelines regarding the current role of imaging techniques in the diagnosis and monitoring of multiple Myeloma. *Leukemia*. 2009, **23**(9), 1545-1556. ISSN 0887-6924. Dostupné z: doi:10.1038/leu.2009.89
51. Mnohočetný myelom - statistika. *Česká myelomová skupina* [online]. Česká republika: CMG Myeloma, 2020 [cit. 2020-09-25]. Dostupné z: <https://www.myeloma.cz/index.php?pg=mnohocetny-myelom--zakladni-udaje--statistika>
52. ADAM, Z. J. VANÍČEK, J., VORLÍČEK. Diagnostické a léčebné postupy u maligních chorob. 2., aktualiz. a dopl. vyd. Praha: Grada, 2004. ISBN 80-247-0896-5.
53. BAČOVSKÝ, J., ŠČUDLA, V. Současné možnosti vyšetření skeletu u mnohočetného myelomu. *Interní Med.*, 6(8), 385-388
54. Multiple Myeloma: Diagnosis [online]. Spain: Cancer.Net, 05/2020n. 1. [cit. 2020-09-25]. Dostupné z: <https://www.cancer.net/cancer-types/multiple-myeloma/diagnosis>
55. KONRAD C. NAU, MD, and WILLIAM D. LEWIS, MD, West Virginia University Department of Family Medicine Eastern Division, Harpers Ferry, West Virginia *Am Fam Physician*. 2008 Oct 1;78(7):853-859.
56. RAJKUMAR, S. VINCENT a ROBERT A. KYLE KYLE. Symposium on oncology practice: hemmaultloiplleo mygeliocmaa:L D IAMGNAOLSISI GANND ATRNEATCMIEENS: Multiple Myeloma: Diagnosis and Treatment. *Mayo Clinic Proceedings*. 2005, **10**(80), 1371-1382.
57. Mnohočetný myelom - léčba: chemoterapie. *CMG: Česká myelomová skupina* [online]. II. interní klinice FN Brno Bohunice: Roman Hájek, Zdenek Adam, 1996, 17.4.1996 [cit. 2020-11-30]. Dostupné z: <https://www.myeloma.cz/index.php?pg=mnohocetny-myelom--lecba--chemoterapie>
58. RAJKUMAR, S. VINCENT, MORIE A. GERTZ, ROBERT A. KYLE A PHILIP R. GREIPP. Current Therapy for Multiple Myeloma. *Mayo Clinic Proceedings*. 2002, **77**(8), 813-822. ISSN 00256196. Dostupné z: doi:10.4065/77.8.813
59. Combination chemotherapy versus melphalan plus prednisone as treatment for multiple myeloma: an overview of 6,633 patients from 27 randomized trials. Myeloma Trialists' Collaborative Group. *Journal of Clinical Oncology*. 1998, **16**(12), 3832-3842. ISSN 0732-183X. Dostupné z: doi:10.1200/JCO.1998.16.12.3832
60. ALEXANIAN, RAYMOND, BART BARLOGIE A SUSAN TUCKER. VAD-based regimens as primary treatment for multiple myeloma. *American Journal*

- of *Hematology*. 1990, **33**(2), 86-89. ISSN 03618609. Dostupné z: doi:10.1002/ajh.2830330203
61. ADAM, Z., J. STRAUB, L. POUR, M. KREJČÍ, J. NEUBAUER a J. VANÍČEK. Časnou diagnózou mnohočetného myelomu k lepší kvalitě života nemocných. 2007, **5**(4), 180-201.
  62. Mnohočetný myelom - léčba: transplantace. *CMG: Česká myelomová skupina* [online]. II. interní klinice FN Brno Bohunice: Roman Hájek, Zdenek Adam, 1996, 17.4.1996 [cit. 2020-11-30]. Dostupné z: <https://www.myeloma.cz/index.php?pg=mnohocetny-myelom--lecba--transplantace>
  63. KING, J., M., FIALA, S., GOLDSMITH, K., STOCKERL-GOLDSTEIN, M., SCHROEDER, A., GHOBADI, R., V., TANYA WILDES. Multiple Myeloma: Autologous Stem Cell Transplant in an aging population. *Clinical Lymphoma Myeloma and Leukemia*. 2019, **19**(10), e293-e294. ISSN 21522650. Dostupné z: doi:10.1016/j.clml.2019.09.482
  64. Mnohočetný myelom - léčba: bisfosfonáty. *CMG: Česká myelomová skupina* [online]. II. interní klinice FN Brno Bohunice: Roman Hájek, Zdenek Adam, 1996, 17.4.1996 [cit. 2020-11-30]. Dostupné z: <https://www.myeloma.cz/index.php?pg=mnohocetny-myelom--lecba--bisfosfonaty>
  65. *CMG: Léčba bisfosfanáty*. Brno, 2010, 16 s. Dostupné také z: <https://www.myeloma.cz/res/file/brozury/bisfosfonaty.pdf>
  66. Mnohočetný myelom - léčba: radioterapie. *CMG: Česká myelomová skupina* [online]. II. interní klinice FN Brno Bohunice: Roman Hájek, Zdenek Adam, 1996, 17.4.1996 [cit. 2020-11-30]. Dostupné z: <https://www.myeloma.cz/index.php?pg=mnohocetny-myelom--lecba--radioterapie>
  67. Mnohočetný myelom - léčba: léčba infekcí. *CMG: Česká myelomová skupina* [online]. II. interní klinice FN Brno Bohunice: Roman Hájek, Zdenek Adam, 1996, 17.4.1996 [cit. 2020-11-30]. Dostupné z: <https://www.myeloma.cz/index.php?pg=mnohocetny-myelom--lecba--lecba-infekci>
  68. SOEKOJO, CINNIE YENTIA, MELISSA OOI, SANJAY DE MEL A WEE JOO CHNG. Immunotherapy in Multiple Myeloma. *Cells*. 2020, **9**(3). ISSN 2073-4409. Dostupné z: doi:10.3390/cells9030601
  69. FUKANO, KEIGO KAZUHIRO KIMURA. Measurement of Enolase Activity in Cell Lysates. *Conceptual Background and Bioenergetic/Mitochondrial Aspects of Oncometabolism*. Elsevier, 2014, 2014, , 115-124. *Methods in Enzymology*. ISBN 9780124166189. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-416618-9.00006-6
  70. MERKULOVA, TATYANA, MARGUERITE LUCAS, CAROLE JABET, NOËL LAMANDÉ, JEAN-DENIS ROUZEAU, FRANÇOIS GROS, MONIQUE LAZAR A ANGÉLICA KELLER. Biochemical characterization of the mouse muscle-specific enolase: developmental changes in electrophoretic variants and selective binding to other proteins. *Biochemical Journal*. 1997, **323**(3), 791-800. ISSN 0264-6021. Dostupné z: doi:10.1042/bj3230791
  71. MARANGOS, P. J., A. M. PARMA a F. K. GOODWIN. Functional properties of neuronal and glial isoenzymes of brain enolase. *Journal of Neurochemistry*. 1978, **31**(3), 727-732. ISSN 0022-3042. Dostupné z: doi:10.1111/j.1471-4159.1978.tb07847.x
  72. DÍAZ-RAMOS, ÀNGELS, ANNA ROIG-BORRELLAS, ANA GARCÍA-MELERO A ROSER LÓPEZ-ALEMANY.  $\alpha$ -Enolase, a Multifunctional Protein: Its Role on Pathophysiological Situations. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2012, **2012**, 1-12. ISSN 1110-7243. Dostupné z: doi:10.1155/2012/156795
  73. CAPELLO, MICHELA, SAMMY FERRI-BORGOGNO, PAOLA CAPELLO A FRANCESCO NOVELLI. A-enolase: a promising therapeutic and diagnostic tumor target. *FEBS Journal*. 2011, **278**(7), 1064-1074. ISSN 1742464X. Dostupné z: doi:10.1111/j.1742-4658.2011.08025.x

74. JIN, SHENGGAN, ROBERT S. DIPAOLO, ROBIN MATHEW A EILEEN WHITE. Metabolic catastrophe as a means to cancer cell death. *Journal of Cell Science*. 2007, **120**(3), 379-383. ISSN 1477-9137. Dostupné z: doi:10.1242/jcs.03349
75. ABIKO, YOSHIHIRO, MICHIKO NISHIMURA, KAORU KUSANO, et al. Expression of MIP-3 $\alpha$ /CCL20, a macrophage inflammatory protein in oral squamous cell carcinoma. *Archives of Oral Biology*. 2003, **48**(2), 171-175. ISSN 00039969. Dostupné z: doi:10.1016/S0003-9969(02)00167-X
76. ZHOU, WEIDONG, MICHELA CAPELLO, CLAUDIA FREDOLINI, LORENZO PIEMONTE, LANCE A. LIOTTA, FRANCESCO NOVELLI A EMANUEL F. PETRICOIN. Mass Spectrometry Analysis of the Post-Translational Modifications of  $\alpha$ -Enolase from Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Cells. *Journal of Proteome Research*. 2010, **9**(6), 2929-2936. ISSN 1535-3893. Dostupné z: doi:10.1021/pr901109w
77. LOPEZ-ALEMANY, R., P. CORREC, L. CAMOIN P. BURTIN. Purification of the plasmin receptor from human carcinoma cells and comparison to  $\alpha$ -enolase. *Thrombosis Research*. 1994, **75**(4), 371-381. ISSN 00493848. Dostupné z: doi:10.1016/0049-3848(94)90252-6
78. MILES, LINDSEY A., CAROL M. DAHLBERG, JANET PLESCIA, JORDI FELEZ, KANEFUSA KATO A EDWARD F. PLOW. Role of cell-surface lysines in plasminogen binding to cells: identification of  $\alpha$ -enolase as a candidate plasminogen receptor. *Biochemistry*. 1991, **30**(6), 1682-1691. ISSN 0006-2960. Dostupné z: doi:10.1021/bi00220a034
79. PANCHOLI, V. Multifunctional  $\alpha$ -enolase: its role in diseases. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2001, **58**(7), 902-920. ISSN 1420-682X. Dostupné z: doi:10.1007/PL00000910
80. REDLITZ, ALEXANDER, BRUCE J. FOWLER, EDWARD F. PLOW LINDSEY A. MILES. The Role of an Enolase-Related Molecule in Plasminogen Binding to Cells. *European Journal of Biochemistry*. 1995, **227**(1-2), 407-415. ISSN 0014-2956. Dostupné z: doi:10.1111/j.1432-1033.1995.tb20403.x
81. LÓPEZ-ALEMANY, ROSER, COLIN LONGSTAFF, STEPHEN HAWLEY, ET AL. Inhibition of cell surface mediated plasminogen activation by a monoclonal antibody against  $\alpha$ -Enolase. *American Journal of Hematology*. 2003, **72**(4), 234-242. ISSN 03618609. Dostupné z: doi:10.1002/ajh.10299
82. DISIS, M L, S M PUPA, J R GRALOW, R DITTADI, S MENARD M. A. CHEEVER. High-titer HER-2/neu protein-specific antibody can be detected in patients with early-stage breast cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 1997, **15**(11), 3363-3367. ISSN 0732-183X. Dostupné z: doi:10.1200/JCO.1997.15.11.3363
83. TAYLOR, JANE M., JOHN D. DAVIES A CHARLOTTE A. PETERSON. Regulation of the Myoblast-specific Expression of the Human  $\beta$ -Enolase Gene. *Journal of Biological Chemistry*. 1995, **270**(6), 2535-2540. ISSN 00219258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.270.6.2535
84. SAULOT, VINCENT, OLIVIER VITTECOQ, ROLAND CHARLIONET, et al. Presence of autoantibodies to the glycolytic enzyme  $\alpha$ -enolase in sera from patients with early rheumatoid arthritis. 2002, **46**(5), 1196-1201. ISSN 00043591. Dostupné z: doi:10.1002/art.10252
85. WEGNER, NATALIA, KARIN LUNDBERG, ANDREW KINLOCH, BENJAMIN FISHER, VIVIANNE MALMSTRÖM, MARC FELDMANN, PATRICK J. VENABLES. Autoimmunity to specific citrullinated proteins gives the first clues to the etiology of rheumatoid arthritis. *Immunological Reviews*. 2010, **233**(1), 34-54. ISSN 01052896. Dostupné z: doi:10.1111/j.0105-2896.2009.00850.x
86. DÍAZ-RAMOS, ÀNGELS, ANNA ROIG-BORRELLAS, ANA GARCÍA-MELERO, ROSER LÓPEZ-ALEMANY.  $\alpha$ -Enolase, a Multifunctional Protein: Its Role on Pathophysiological Situations. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2012, **2012**, 1-12. ISSN 1110-7243. Dostupné z: doi:10.1155/2012/156795

87. VIZIN, TJASA, JANKO KOS. Gamma-enolase: a well-known tumour marker, with a less-known role in cancer. *Radiology and Oncology*. 2015, **49**(3), 217-226. ISSN 1581-3207. Dostupné z: doi:10.1515/raon-2015-0035
88. WILD, D., The Immunoassay Handbook: *Theory and Applications of Ligand Binding, ELISA and related techniques*. 4. Oxford: Elsevier, 2013. ISBN 9780080970370.
89. MARANGOS, P. J., A. M. PARMA a F. K. GOODWIN. Functional properties of neuronal and glial isoenzymes of brain enolase. *Journal of Neurochemistry*. 1978, **31**(3), 727-732. ISSN 0022-3042. Dostupné z: doi:10.1111/j.1471-4159.1978.tb07847.x
90. PORPORATO, PAOLO E., SUVEERA DHUP, RAJESH K. DADHICH, TAMARA COPETTI A PIERRE SONVEAUX. Anticancer Targets in the Glycolytic Metabolism of Tumors: A Comprehensive Review. *Frontiers in Pharmacology*. 2011, **2**. ISSN 1663-9812. Dostupné z: doi:10.3389/fphar.2011.00049
91. SEDORIS, Kara C, Shelia D. THOMAS, Donald M MILLER. Hypoxia induces differential translation of enolase/MBP-1. *BMC Cancer*. 2010, **10**(1). ISSN 1471-2407. Dostupné z: doi:10.1186/1471-2407-10-157
92. TAPIA, F.J., A.J.A. BARBOSA, P.J. MARANGOS, J.M. POLAK, S.R. BLOOM, C. DERMODY, A.G.E. PEARSE. Neuron-specific enolase is produced by neuroendocrine tumours. *The Lancet*. 1981, **317**(8224), 808-811. ISSN 01406736. Dostupné z: doi:10.1016/S0140-6736(81)92682-9
93. HAO, XISHAN, BAOCUN SUN, LIMEI HU, et al. Differential gene and protein expression in primary breast malignancies and their lymph node metastases as revealed by combined cDNA microarray and tissue microarray analysis. *Cancer*. 2004, **100**(6), 1110-1122. ISSN 0008-543X. Dostupné z: doi:10.1002/cncr.20095
94. SOH, MAUREEN, JANE R. DUNLEVY, SCOTT H. GARRETT, CHRISTINA ALLEN, DONALD A. SENS, XU DONG ZHOU, MARY ANN SENS, SEEMA SOMJI. Increased neuron specific enolase expression by urothelial cells exposed to or malignantly transformed by exposure to Cd2 or As3. *Toxicology Letters*. 2012, **212**(1), 66-74. ISSN 03784274. Dostupné z: doi:10.1016/j.toxlet.2012.05.003
95. HAFNER, ANJA, GORDANA GLAVAN, NATAŠA OBERMAJER, MARKO ŽIVIN, REINHARD SCHLIEBS, JANKO KOS. Neuroprotective role of  $\gamma$ -enolase in microglia in a mouse model of Alzheimer's disease is regulated by cathepsin X. *Aging Cell*. 2013, **12**(4), 604-614. ISSN 1474-9718. Dostupné z: doi:10.1111/accel.12093
96. TAKEI, NOBUYUKI, JUN KONDO, KAZUHIRO NAGAIKE, KEIKO OHSAWA, KANEFUSA KATO, SHINICHI KOHSAKA. Neuronal Survival Factor from Bovine Brain Is Identical to Neuron-Specific Enolase. *Journal of Neurochemistry*. 1991, **57**(4), 1178-1184. ISSN 0022-3042. Dostupné z: doi:10.1111/j.1471-4159.1991.tb08277.x
97. BEZEK, S., PETER BIBERTHALER, I. MARTINEZ-ESPINA A VIKTORIA BOGNER-FLATZ. Pathophysiology and clinical implementation of traumatic brain injury biomarkers: neuron-specific enolase. *Biomarkers for Traumatic Brain Injury*. Elsevier, 2020, 2020, , 169-182. ISBN 9780128163467. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-816346-7.00011-7
98. JIANG, WEI, XIA LI, SHAOQI RAO, et al. Constructing disease-specific gene networks using pair-wise relevance metric: Application to colon cancer identifies interleukin 8, desmin and enolase 1 as the central elements. *BMC Systems Biology*. 2008, **2**(1), 1064-1074. ISSN 1752-0509. Dostupné z: doi:10.1186/1752-0509-2-72
99. GEORGES E, BONNEAU AM, PRINOS P. RNAi-mediated knockdown of  $\alpha$ -enolase increases the sensitivity of tumor cells to antitubulin chemotherapeutics. *Int J Biochem Mol Biol*. 2011;2(4):303-8. Epub 2011 Oct 21. PMID: 22187664; PMCID: PMC3242425.
100. TROJANOWICZ, BOGUSZ, ANJA WINKLER, KATHRIN HAMMJE, et al. Retinoic acid-mediated down-regulation of ENO1/MBP-1 gene products caused decreased invasiveness of the follicular thyroid carcinoma cell lines. *Journal of Molecular Endocrinology*. 2009, **42**(3), 249-260. ISSN 0952-5041. Dostupné z: doi:10.1677/JME-08-0118

101. TSAI, SEN-TIEN, I-HSIU CHIEN, WEN-HAO SHEN, et al. ENO1, a potential prognostic head and neck cancer marker, promotes transformation partly via chemokine CCL20 induction. *European Journal of Cancer*. 2010, **46**(9), 1712-1723. ISSN 09598049. Dostupné z: doi:10.1016/j.ejca.2010.03.018