

Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko-technologická

Průkaz autoprotilátek v séru pacientů s mnohočetným myelomem
v remisi

Diplomová práce

2022

Bc. Kateřina Štěpařová

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

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Kateřina Štěpařová**
Osobní číslo: **C19549**
Studijní program: **N0914P360001 Bioanalytická laboratorní diagnostika ve zdravotnictví**
Téma práce: **Průkaz autoprotilátek v séru pacientů s mnohočetným myelomem v remisi**
Téma práce anglicky: **Detection Of Autoantibodies In The Serum Of Patients With Multiple Myeloma In Remission**
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování

Teoretická část:

- 1) Základní informace o nádorovém onemocnění Mnohočetný myelom – patogeneze onemocnění, symptomy, laboratorní diagnostika, terapie – současný stav poznání.
- 2) Vyhledejte a komentujte nové poznatky týkající se patogeneze onemocnění a jeho terapie. Důraz kladte na práce popisující význam autoprotilátek v boji proti nádorovým buňkám. Po studiu všech dostupných odborných studií na toto téma sama zhodnoťte, zda má dobře zacílená protilátková autoreaktivita imunitního systému schopnost ovlivnit průběh, závažnost a terapii onemocnění.
- 3) Vyjmenujte a popište všechny dnes používané laboratorní metody vhodné pro průkaz autoprotilátek v lidském organismu. Detailněji popište metody pro průkaz autoprotilátek podílející se na protinádorové imunitě. Zhodnoťte, zda současný stav v laboratorní diagnostice odpovídá současnému stavu poznání.
- 4) Zaměřte se na popis a zhodnocení vědeckých výsledků dosažených v posledních 5-10 letech.

Experimentální část:

- 1) Použití elektroforetických technik a Western Blot metody pro analýzu proteinů v lidském séru, včetně optimalizace barvicích technik pro detekci proteinů přenesených na membránu.
- 2) Zavedení dvourozměrné elektroforetické techniky pro separaci buněčných proteinů s následnou imunodetekcí.
- 3) Zavedení metod 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:

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**

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

L.S.

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

V Pardubicích dne 26. února 2021

Prohlašuji:

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

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

V Pardubicích dne 2. 5. 2022

Bc. Kateřina Štěpařová v. r.

Poděkování

Tímto bych ráda poděkovala paní prof. RNDr. Zuzaně Bílkové, Ph.D. za věnovaný čas a vstřícnost, při vedení této práce. Mé díky patří i Mgr. Lucii Šacherlové za cenné rady. Děkuji i Mgr. Rudolfu Kupčikovi Ph.D. a Mgr. Marii Vajrychové Ph.D. z Centra biomedicínského výzkumu ve Fakultní nemocnici Hradec Králové za spolupráci na experimentech. Pokorně děkuji i své rodině, partnerovi a přátelům, kteří mě podporovali v průběhu celého studia.

Anotace

Teoretická část této práce je zaměřena na patogenezi onemocnění mnohočetný myelom. Práce popisuje fenomén tvorby autoprotiátok v rámci přirozené imunity s bližším zaměřením na problematiku určení vlastností a funkce protiátok v souvislostech s povahou onemocnění. V experimentální části je práce věnována metodice sérologické analýzy proteomu (SERPA) pro diagnostický screening autoprotiátok u pacientů s mnohočetným myelomem od doby stanovení diagnózy až po dosažení remise. Metodou SERPA je posuzována imunoreaktivita patientských sér a význam nalézáných skvrn s bližším zaměřením na nálezy protiátok proti proteinu enoláza (ENO).

Klíčová slova

Mnohočetný myelom, protinádorová imunita, přirozené autoprotiátky, enoláza, sérologická analýza proteomu

Title

Detection of autoantibodies in the serum of patients with multiple myeloma in remission.

Annotation

The theoretical part of this thesis is focused on the pathogenesis of multiple myeloma. It describes the phenomenon of autoantibody formation in innate immunity with a closer focus on the issue of determining the proberte and function of antibodies in relation to the nature of the disease. The experimental part is devoted to the methodology of serological analysis of proteome (SERPA) for diagnostic screening of autoantibodies in patients with multiple myeloma from the time of diagnosis to remission. Based od the used method SERPA is discussed revealed immunoreactivity of patient sera and the significance of the found spots with a closer focus on antibodies against protein enolase (ENO).

Keywords

Multiple myeloma, anti-tumor immunity, natural autoantibodies, enolase, serological proteome analysis

Obsah

Seznam obrázků a tabulek	8
Seznam zkratk	13
Úvod	15
1 Teoretická část	16
1.1 Charakteristika onemocnění mnohočetný myelom	16
1.1.1 Symptomy	18
1.1.2 Laboratorní diagnostika	20
1.1.3 Diferenciální diagnostika	22
1.1.4 Terapeutické strategie	26
1.2 Aktivita imunitního systému proti myelomovým buňkám	32
1.2.1 Výskyt přirozených autoprotilátek u mnohočetného myelomu	37
1.3 Enzym enoláza a jeho výskyt u nádorů	38
1.4 Přirozené autoprotilátky proti α -enoláze u mnohočetného myelomu	41
1.5 Laboratorní metody pro průkaz přirozených autoprotilátek	42
1.5.1 Moderní přístupy pro vyšetřování přirozených autoprotilátek u nádorů	43
2 Cíle práce	51
3 Experimentální část	52
3.1 Laboratorní vybavení (pomůcky a přístroje)	52
3.2 Seznam chemikálií a reagensů	53
3.3 Modelová buněčná linie a vzorky sér	54
3.4 Sérologická analýza proteomu (SERPA)	55
4 Výsledky a diskuze	64
4.1 Příprava buněčného lyzátu	65
4.2 Příprava proteomové mapy a vizualizace proteinů na gelu a membráně	67
4.3 Stanovení imunoreaktivity vyšetřovaných sér s proteiny buněčného lyzátu	69
4.4 Optimalizace reakčních podmínek vazby konjugátu na imunokomplex a následné chemiluminiscenční detekci	74
4.5 Vyšetření imunoreaktivity sér od pěti pacientů s mnohočetným myelomem	78
4.6 Identifikace reaktivních proteinů s využitím hmotnostní spektrometrie	92
4.7 Údržba a čištění promývací stanice FlexiWash FW400	95
5 Závěr	98
Citovaná literatura	100
Seznam příloh	113

Seznam obrázků a tabulek

Seznam obrázků

<i>Obrázek č. 1 - Klonální expanze plazmatických buněk</i>	17
<i>Obrázek č. 2 - Dynamika průběhu onemocnění mnohočetným onemocněním</i>	18
<i>Obrázek č. 3 - Přehled laboratorních vyšetření a jeho nálezy</i>	21
<i>Obrázek č. 4 - Schéma algoritmu diferenciální diagnostiky monoklonálních gamapatií</i>	26
<i>Obrázek č. 5 - Vývoj léčiv v čase a vzestup účinnosti terapie MM v letech 1960 - 2020</i>	29
<i>Obrázek č. 6 - Modelový cyklus T lymfocytární protinádorové reakce</i>	34
<i>Obrázek č. 7 - Příčiny vzniku anti-ENO1 protilátek</i>	40
<i>Obrázek č. 8 - Princip analýzy CIC</i>	47
<i>Obrázek č. 9 - Porovnání metod SERPA a AMIDA</i>	49
<i>Obrázek č. 10 - Schématické znázornění analýzy SERPA</i>	63
<i>Obrázek č. 11 - Hodnocení účinnosti buněčných linií jako modelů pro výzkum mnohočetného myelomu</i> ..	65
<i>Obrázek č. 12 - Záznam proteinové mapy na 12% akrylamidovém gelu po 2D elektroforetické separaci, barveno Coomassie blue</i>	67
<i>Obrázek č. 13 - Záznam proteinové mapy na 12% akrylamidovém gelu po 2D elektroforetické separaci, barveno Coomassie blue</i>	67
<i>Obrázek č. 14 - Záznam proteinové mapy na NC membráně, barveno amoniakálním stříbrem</i>	67
<i>Obrázek č. 15 - Záznam proteinové mapy na NC membráně, barveno amoniakálním stříbrem</i>	67
<i>Obrázek č. 16 - Záznam NC membrány po detekci imunoreaktivity protilátek ze séra s proteinovou mapou (č. 7368), ředění séra 1:500</i>	69
<i>Obrázek č. 17 - Záznam NC membrány po detekci imunoreaktivity protilátek ze séra s proteinovou mapou (č. 0304), ředění séra 1:500</i>	69
<i>Obrázek č. 18 - Záznam NC membrány po detekci imunoreaktivity protilátek ze séra s proteinovou mapou (č. 4570), ředění séra 1:500</i>	69
<i>Obrázek č. 19 - Záznam NC membrány po detekci imunoreaktivity protilátek ze séra s proteinovou mapou (č. 8381), ředění séra 1:500</i>	69
<i>Obrázek č. 20 - Záznam NC membrány po detekci imunoreaktivity protilátek ze séra s proteinovou mapou („zlatý standard“), ředění séra 1:500</i>	70
<i>Obrázek č. 21 - Záznam NC membrány po detekci imunoreaktivity protilátek ze séra s proteinovou mapou („zlatý standard“), ředění séra 1:500</i>	70
<i>Obrázek č. 22 - Záznam NC membrány po detekci imunoreaktivity protilátek ze séra s proteinovou mapou („zlatý standard“), ředění séra 1:500</i>	70
<i>Obrázek č. 23 - Záznam NC membrány po detekci imunoreaktivity protilátek ze séra s proteinovou mapou („zlatý standard“), ředění séra 1:500</i>	70

<i>Obrázek č. 24 - Záznam NC membrány po detekci imunoreaktivity protilátek ze séra s proteinovou mapou („zlatý standard“), ředění séra 1:1500.....</i>	<i>71</i>
<i>Obrázek č. 25 - Záznam NC membrány po detekci imunoreaktivity protilátek ze séra s proteinovou mapou („zlatý standard“), ředění séra 1:500.....</i>	<i>71</i>
<i>Obrázek č. 26 - Záznam NC membrány po detekci imunoreaktivity protilátek z patientského séra MM-15-41 CR +6, (Postup 2).....</i>	<i>73</i>
<i>Obrázek č. 27 - Záznam NC membrány po detekci imunoreaktivity protilátek z patientského séra MM-15-41 CR +6, (Postup 1).....</i>	<i>73</i>
<i>Obrázek č. 28 - Záznam NC membrány po detekci imunoreaktivity protilátek z patientského séra MM-15-41 DG +6, snímek 3 (9 s).....</i>	<i>75</i>
<i>Obrázek č. 29 - Záznam NC membrány po detekci imunoreaktivity protilátek z patientského séra MM-15-41 DG +6, snímek 1 (3 s).....</i>	<i>75</i>
<i>Obrázek 30 - Záznam NC membrány po detekci imunoreaktivity protilátek z patientského séra MM-15-41 DG +6, snímek 18 (244 s).....</i>	<i>75</i>
<i>Obrázek č. 31 - Záznam NC membrány po detekci imunoreaktivity protilátek z patientského séra MM-15-41 DG +6, snímek 9 (79 s).....</i>	<i>75</i>
<i>Obrázek č. 32 - Využití software GeneSys pro chemiluminiscenční detekci</i>	<i>76</i>
<i>Obrázek č. 33 - Nástroje softwaru GeneTools</i>	<i>77</i>
<i>Obrázek č. 34 - Záznam NC membrány po detekci imunoreaktivity protilátek z patientského séra 1-13-128 DG (Postup 1)</i>	<i>80</i>
<i>Obrázek č. 35 - Záznam NC membrány po detekci imunoreaktivity protilátek z patientského séra 1-13-128 DG+3 (Postup 1).....</i>	<i>80</i>
<i>Obrázek č. 36 - Záznam NC membrány po detekci imunoreaktivity protilátek z patientského séra 1-13-128 DG +6 (Postup 1).....</i>	<i>80</i>
<i>Obrázek č. 37 - Záznam NC membrány po detekci imunoreaktivity protilátek z patientského séra 1-13-128 DG +9 (Postup 1).....</i>	<i>80</i>
<i>Obrázek č. 38 - Záznam NC membrány po detekci imunoreaktivity protilátek z patientského séra 1-13-128 CR (Postup 1).....</i>	<i>80</i>
<i>Obrázek č. 39 - Záznam NC membrány po detekci imunoreaktivity protilátek z patientského séra 1-13-128 CR+3 (Postup 1)</i>	<i>80</i>
<i>Obrázek č. 40 - Záznam NC membrány po detekci imunoreaktivity protilátek z patientského séra 1-13-128 CR+6 (Postup 1)</i>	<i>81</i>
<i>Obrázek č. 41 - Záznam NC membrány po detekci imunoreaktivity protilátek z patientského séra 1-13-130 DG (Postup 1)</i>	<i>82</i>
<i>Obrázek č. 42 - Záznam NC membrány po detekci imunoreaktivity protilátek z patientského séra 1-13-130 DG +3 (Postup 1).....</i>	<i>82</i>

<i>Obrázek č. 43 - Záznam NC membrány po detekci imunoreaktivity protilátek z patientského séra 1-13-130 DG +6 (Postup 1).....</i>	<i>82</i>
<i>Obrázek č. 44 - Záznam NC membrány po detekci imunoreaktivity protilátek z patientského séra 1-13-130 DG +9 (Postup 1).....</i>	<i>82</i>
<i>Obrázek č. 45 - Záznam NC membrány po detekci imunoreaktivity protilátek z patientského séra 1-13-130 DG +12 (Postup 1).....</i>	<i>82</i>
<i>Obrázek č. 46 - Záznam NC membrány po detekci imunoreaktivity protilátek z patientského séra 1-13-130 DG +15 (Postup 1).....</i>	<i>82</i>
<i>Obrázek č. 47 - Záznam NC membrány po detekci imunoreaktivity protilátek z patientského séra 1-13-131 DG (Postup 2).....</i>	<i>84</i>
<i>Obrázek č. 48 - Záznam NC membrány po detekci imunoreaktivity protilátek z patientského séra 1-13-131 DG+3 (Postup 2).....</i>	<i>84</i>
<i>Obrázek č. 49- Záznam NC membrány po detekci imunoreaktivity protilátek z patientského séra 1-13-131 DG+6 (Postup 2).....</i>	<i>84</i>
<i>Obrázek č. 50 - Záznam NC membrány po detekci imunoreaktivity protilátek z patientského séra 1-13-131 DG+9 (Postup 2).....</i>	<i>84</i>
<i>Obrázek č. 51 - Záznam NC membrány po detekci imunoreaktivity protilátek z patientského séra 1-13-131 DG+12 (Postup 2).....</i>	<i>84</i>
<i>Obrázek č. 52 - Záznam NC membrány po detekci imunoreaktivity protilátek z patientského séra MM-15-41 DG (Postup 1).....</i>	<i>86</i>
<i>Obrázek č. 53 - Záznam NC membrány po detekci imunoreaktivity protilátek z patientského séra MM-15-41 DG+3 (Postup 1).....</i>	<i>86</i>
<i>Obrázek č. 54 - Záznam NC membrány po detekci imunoreaktivity protilátek z patientského séra MM-15-41 DG+6 (Postup 1).....</i>	<i>86</i>
<i>Obrázek č. 55 - Záznam NC membrány po detekci imunoreaktivity protilátek z patientského séra MM-15-41 CR (Postup 1).....</i>	<i>86</i>
<i>Obrázek č. 56 - Záznam NC membrány po detekci imunoreaktivity protilátek z patientského séra MM-15-41 CR+3 (Postup 2).....</i>	<i>86</i>
<i>Obrázek č. 57 - Záznam NC membrány po detekci imunoreaktivity protilátek z patientského séra MM-15-41 CR+6 (Postup 2).....</i>	<i>86</i>
<i>Obrázek č. 58 - Záznam NC membrány po detekci imunoreaktivity protilátek z patientského séra MM-15-108 DG (Postup 2).....</i>	<i>88</i>
<i>Obrázek č. 59 - Záznam NC membrány po detekci imunoreaktivity protilátek z patientského séra MM-15-108 DG+3 (Postup 2).....</i>	<i>88</i>
<i>Obrázek č. 60 - Záznam NC membrány po detekci imunoreaktivity protilátek z patientského séra MM-15-108 DG+6 (Postup 2).....</i>	<i>88</i>

<i>Obrázek č. 61- Záznam NC membrány po detekci imunoreaktivity protilátek z patientského séra MM-15-108 DG+9 (Postup 2)</i>	<i>88</i>
<i>Obrázek č. 62- Záznam NC membrány po detekci imunoreaktivity protilátek z patientského séra MM-15-108 DG+12 (Postup 2)</i>	<i>88</i>
<i>Obrázek č. 63 - Záznam NC membrány po detekci imunoreaktivity protilátek z patientského séra MM-15-108 DG+15 (Postup 2)</i>	<i>88</i>
<i>Obrázek č. 64 - Záznam NC membrány po detekci imunoreaktivity protilátek z patientského séra MM-15-108 DG+18 (Postup 2)</i>	<i>89</i>
<i>Obrázek č. 65 - Výřezy z NC membrán po detekci imunoreaktivity protilátek z patientského séra 1-13-128 v místě výskytu ENOI (přítomnost protilátek anti-ENO1 u všech sér).....</i>	<i>911</i>
<i>Obrázek č. 66 - Výřezy z NC membrán po detekci imunoreaktivity protilátek z patientského séra 1-13-130 v místě výskytu ENOI (negativní).....</i>	<i>911</i>
<i>Obrázek č. 67 - Výřezy z NC membrán po detekci imunoreaktivity protilátek z patientského séra 1-13-131 v místě výskytu ENOI (přítomnost protilátek anti-ENO1 u všech sér, chybí CR).....</i>	<i>91</i>
<i>Obrázek č. 68 - Výřezy z NC membrán po detekci imunoreaktivity protilátek z patientského séra MM-15-41 v místě výskytu ENOI (přítomnost protilátek anti-ENO1 i jiné neznámé imunoreaktivity). </i>	<i>91</i>
<i>Obrázek č. 69 - Výřezy z NC membrán po detekci imunoreaktivity protilátek z patientského séra MM-15-108 v místě výskytu ENOI (negativní chybí CR)</i>	<i>91</i>
<i>Obrázek č. 70 - Snímky membrán po imunodetekci s vybranými spoty k MS analýze</i>	<i>92</i>
<i>Obrázek č. 71 - Gel 1 s proteinovou mapou (RPMI 8226), 12% akrylamidový gel s vyznačenými spoty pro identifikaci na MS, barveno Coomasie Blue.....</i>	<i>93</i>
<i>Obrázek č. 72 - Gel 2 s proteinovou mapou (RPMI 8226), 12% akrylamidový gel s vyznačenými spoty pro identifikaci na MS, barveno Coomasie Blue.....</i>	<i>93</i>
<i>Obrázek č. 73 - promývací stanice FlexiWash FW400</i>	<i>95</i>
<i>Obrázek č. 74 - Záznam NC membrány po detekci imunoreaktivity séra zdravého dárce (č. 4430) (test promývací stanice)</i>	<i>97</i>
<i>Obrázek č. 75 - Záznam NC membrány po detekci imunoreaktivity séra zlatý standard“ (test promývací stanice</i>	<i>97</i>

Seznam tabulek

<i>Tabulka č. 1 - Přehled hlavních klinických příznaků</i>	19
<i>Tabulka č. 2 - Diagnostická kritéria dle Durieho a Salmona</i>	22
<i>Tabulka č. 3 - Nejčastěji využívaná léčiva v klinické praxi</i>	27
<i>Tabulka č. 4 - Přehled moderních metod pro systémovou analýzu TAA rozpoznávaných cirkulujícími protilátkami</i>	44
<i>Tabulka č. 5 - Příprava směsného roztoku</i>	56
<i>Tabulka č. 6 - Podmínky IEF nastavené v softwaru PROTEAN® IEF Cell</i>	57
<i>Tabulka č. 7 - Příprava gelů</i>	59
<i>Tabulka č. 8 - Nastavení programu promývání (FlexiWash FW400)</i>	63
<i>Tabulka č. 9 - Protokol focení membrány po inkubaci s ECL substrátem v programu GeneSys</i>	74
<i>Tabulka č. 10 - Seznam odebíraných vzorků sér od pacientů s MM v období od stanovení diagnózy (DG) po dosažení kompletní remise (CR) v tříměsíčních intervalech</i>	78
<i>Tabulka č. 11 - Výsledky identifikace proteinů pomocí MS</i>	94

Seznam zkratek

¹⁸FDG-PET/CT	pozitronová emisní tomografie/výpočetní tomografie se značeným izotopem fluorodeoxyglukózy
AMIDA	autoprotilátkami zprostředkovaná identifikace antigenů (z angl. „Autoantibody-Mediated Identification of Antigens“)
CIC	cirkulující imunokomplexy
CTA	antigeny rakoviny varlat (z angl. "Cancer Testis Antigens")
ELISA	enzymová metoda detekce antigenu (z angl. „Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay“)
ENO	enzym enoláza
EV	extracelulární váčky (z angl. „Extracellular Vesicles“)
HSCT	Transplantace hematopoetických kmenových buněk (z angl. „Hematopoetic Stem Cells“)
IL	interleukin
mAb	monoklonální protilátky
mAb	monoklonální protilátky (z angl. "Monoclonal Antibodies")
MAPPING	profilování víceafinitních proteinů (z angl. „Multiple Affinity Protein Profiling“)
MGRS	monoklonální gamapatie renálního významu (z angl. „Monoclonal Gammopathy of Renal Significance“)
MGUS	monoklonální gamapatie nejasného/neurčeného významu (z angl. „Monoclonal Gamopathy of Unknown Significance“).
MM	mnohočetný myelom
NMR	nukleární magnetická rezonance
NY-ESO1	z angl. "New York Esophageal Squamous Cell Carcinoma 1"
OFD1	protein orálně-obličejově-digitálního syndromu (z angl. "Protein Oral-Facial-Digital Syndrom 1")
ORFeome	otevřené čtecí rámce (z angl. „Open Reading Frames“)
pDC	plazmocytoidní dendritické buňky

PD-L1	ligand pro buněčný receptor spojeného s iniciací programované buněčné smrti (z angl. "Programmed Death-ligand 1")
PhIP-Seq	sekvenování na principu fágové imunoprecipitace (z angl. „Phage Immunoprecipitation Sequencing“)
PLATO	paralelní analýza přeložených otevřených čtecích rámců po translaci (z angl. „Parallel Analysis of Translated Open Reading Frames“)
POEMS	syndrom Crow-Fukase a Takatsukiho (akronym příznaků: polyneuropatie, organomegalie, endokrinopatie, monoklonální gamapatie, a kožní změny)
PSA	prostatický specifický antigen (z angl. "Prostate Specific Antigen")
SEREX	sérologická analýza nádorových antigenů za využití cDNA knihoven (z angl. „Serological Analysis of Expression cDNA Libraries“)
SERPA	sérologická analýza proteomu (z angl. „Serologic Proteome Analysis“)
SID-DIGE	sekvenční imunoafinitní deplečně-diferenční gelová elektroforéza (z angl. „Sequential Immunoaffinity Depletion-Differential in Gel Electrophoresis“)
SMM	doutnající myelom (z angl. „Smoldering Myeloma“)
SOX2	transkripční faktor 2 SRY-box
TAA	antigeny asociované s nádorem (z angl. “Tumor Associated Antigens“)
Tc lymfocyty	cytotoxické T lymfocyty
Th lymfocyty	pomocné lymfocyty (z angl. "T Helper Lymphocytes")
TNF	tumorový nekrotický faktor (z angl. "Tumor Necrosis Factor")
Treg lymfocyty	regulační T lymfocyty
TSA	nádorově specifické antigeny (z angl. „Tumor Specific Antigens“)
WHO	Světová zdravotnická organizace (z angl. „World Health Organisation“)

Úvod

Nádorová onemocnění jsou druhou nejčastější příčinou úmrtí. Mnohočetný myelom je druhé nejčastější hematologické onemocnění v České republice. Zasahuje do fungování imunitního systému a ochromuje jej útlakem kostní dřeně. Na přítomnost myelomových buněk reaguje organismus imunitní odpovědí v závislosti na jejich rozpoznávání. Mechanismy protinádorové imunity fungují na principech protizánětlivého působení a aktivace cytotoxických T lymfocytů, ale i tvorbou tzv. přirozených (auto)protilátek. Mnohé vědecké studie se zabývají tvorbou hypotéz a vyšetřováním přirozených autoprotilátek u nádorů s cíle odhalit skutečnost, zda jsou schopny přispívat k protinádorové imunitní odpovědi nebo dokonce cílit proti strukturám na nádorových buňkách. V nynější době existuje mnoho rozličných vědeckých hypotéz ohledně role, účelu a specifitě nalézáných protilátek a jejich potenciálu diagnosticky významných biomarkerů.

Jedním z faktorů, jenž je nutné při vyšetřování protilátek zohledňovat, je vliv farmakoterapeutické strategie a transplantace hematopoetických kmenových buněk, které ač mají vysokou prospěšnost na zlepšení prognózy, ovlivňují proteomický profil kostní dřeně i nádorového mikroprostředí, což může kompromitovat možnost monitorovat výskyt přirozených autoprotilátek.

Cílem moderní onkologie je časně odhalování nádorů a cílená terapie. Každoročně jsou publikovány nové vědecké studie, které se snaží upřesnit informace ohledně etiologie onemocnění mnohočetný myelom. V roce 2021 tým Yamamoto a spol. předložili hypotézu, která dokládá, že původ onemocnění je v selhávání lymfocytární frakce v kostní dřeni a navrhli imunoterapeutický přístup s cíleným posílením protinádorové imunity [1].

Vývoj nových diagnostických metod pro odhalování nádorových antigenů a přirozených autoprotilátek proti nim namířených napomáhá k optimalizaci imunoterapeutických přístupů. Moderní terapeutické přístupy využívají monoklonální protilátky nebo upravené T lymfocytární receptory (TCR) upravené pro zacílení struktur na nádorových buňkách.

1 Teoretická část

1.1 Charakteristika onemocnění mnohočetný myelom

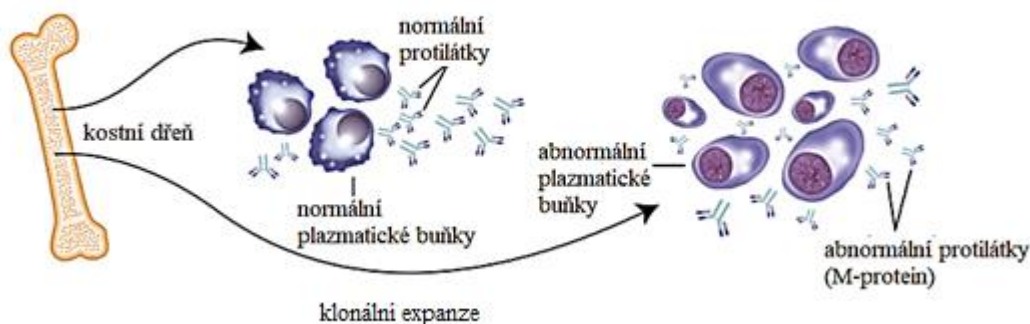
Mnohočetný myelom (MM) je maligní onemocnění, které je řazeno mezi hematologická onemocnění. Prevalence je 1,5 % ze všech nádorových onemocnění, mezi hematologickými onemocněními je onemocnění zastoupeno z 10 % [2]. Jedná se o lymfoproliferativní onemocnění, které postihuje plazmatické buňky. Příčinou rozvoje onemocnění je nekontrolovatelná proliferace jednoho či více klonů B lymfocytárních buněk v terminálním stadiu vyžívání. Při proliferaci jednoho klonu B lymfocytárních buněk s produkcí patologických protilátek je onemocnění nazýváno plazmocytom. [3]. Pokud pochází monoklonální proliferace z více než jednoho buněčných klonů onemocnění je nazýváno mnohočetný myelom [4]. Produktem proliferace maligně transformovaných B lymfocytů jsou maligní plazmatické buňky (též plazmocyty nebo myelomové buňky) [5]. Maligní transformace je neznámé etiologie. Dle WHO (Světová zdravotnická organizace, z angl. „World Health Organisation“) je mnohočetný myelom klinickou jednotkou, která odpovídá morfologicky onemocnění s názvem plazmocelulární myelom [6].

Prevalence nově diagnostikovaných pacientů činí každý rok přibližně 115 000 případů (ve světě). Incidence tohoto onemocnění v ČR je 2,65 případů na 100 tisíc obyvatel, incidence na 100 tisíc obyvatel činí 15,57 případů nad 75 let [7]. Mnohočetným myelomem trpí častěji muži, Afroameričané a z hlediska věku lidé starší 45 let [3]. Průměrný věk nemocných je 75 let nebo vyšší [7].

Pravděpodobnost onemocnění mnohočetným myelomem je prokazatelně zvýšena u pacientů s genetickými abnormalitami [8] jako jsou: translokace na chromozomu 14, hyperploidie, delece celého nebo části chromozomu 13 aj., rizikem je také např. mutace v genu pro protein p53 [9].

V pozdějších fázích onemocnění se objevují typické osteolytické změny skeletu. U pacientů je pozorováno zvýšené odbourávání kostní hmoty, což může vést ke spontánním patologickým zlomeninám. Takový stav je způsoben hromaděním maligních plazmatických buněk v kostní dřeni, které vytlačují normální populaci plazmatických buněk a narušují obnovu kostní tkáně. Myelomové buňky mohou aktivovat i další buněčné mechanismy vedoucí k odbourávání kostní hmoty. [6]

Normální plazmatické buňky hrají důležitou roli v boji s infekčními agens, jejich pokles v důsledku MM vede i k narušení správných funkcí imunitního systému. Maligní plazmatické buňky navíc produkují monoklonální imunoglobulin, tzv. M-komponentu též M-protein (viz Obrázek č. 1) [10].

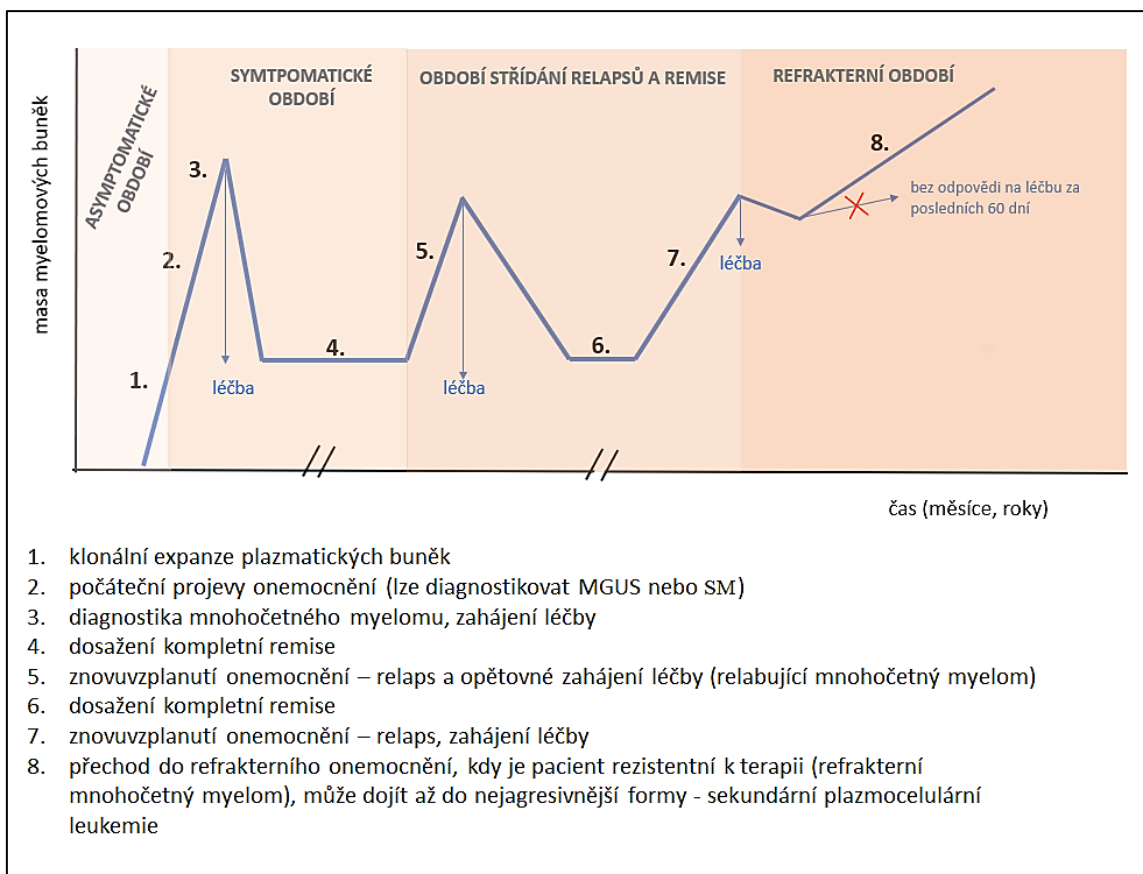


Obrázek č. 1 - Klonální expanze plazmatických buněk (převzato a upraveno dle [11])

Patologické monoklonální protilátky s neznámou specifitou nemají v těle určenou funkcionalitu a podporují rozvoj nádorového onemocnění, orgánová poškození (nejčastěji ledvin), destrukci kostní tkáně a snížení imunitních funkcí. Plasmocyty přispívají i k patologické produkci cytokinů, a to u každého případu individuálně (heterogenita symptomů). [10]

Na Obrázku č. 2 je znázorněn možný průběh onemocnění MM. Onemocnění lze rozdělit na tři období. V asymptomatickém období je stanovena diagnóza MGUS (monoklonální gamapatie nejasného/neurčeného významu, z angl. „Monoclonal Gamopathy of Unknown Significance“). nebo SM (doutnající myelom, z angl. „Smoldering Myeloma“). Po vyšetření následuje stanovení diagnózy MM a zahájení léčby (symptomatické období). V remisi může pacient setrvat měsíce i roky, po nějaké době zpravidla nastává období relapsů, kdy se onemocnění vrací. [12]

Výhodou je, že zahájení opakované léčby je rychlé a pokud je účinná, opět nastává remise. Pokud se vyskytne nedostatečná odpověď na léčbu nebo rezistence trvající déle než 60 dní, hrozí tzv. reincidentní relaps a transformace do refrakterního MM nebo dokonce plazmocelulární leukemie. Tato stádia MM jsou téměř neléčitelná a terminální. [13]



Obrázek č. 2 - Dynamika průběhu onemocnění mnohočetným onemocněním (upraveno dle [14])

1.1.1 Symptomy

Mnohočetný myelom je onemocnění, které je kvůli vysoké heterogenitě příznaků obtížné rozpoznat jen dle prvních projevů. Následující tabulka (Tabulka č. 1) poskytuje základní přehled. Dle osobní a rodinné anamnézy lékař usoudí, že se může jednat o hematoonkologické onemocnění a dle toho je sestaven vyšetřovací algoritmus.

Prvními příznaky jsou: dlouhodobá únava, malátnost, opakované infekce, dlouhodobá bolestivost kloubů/zad, bolesti hlavy, febrilie/subfebrilie, noční pocení, bledost kůže/sliznic, nevolnost, bolesti břišní dutiny nebo zad, vyšší krvácivost, hubnutí, neuropatie, ischemii, hepato/splenomegalie, otoky a jiné přidružené komplikace. [15]

Útlak normální krve tvorby v kostní dřeni vede k typickým příznakům jako jsou: anémie, zvýšená krvácivost, snížená obranyschopnost, orgánové poškození, poškození kostí [16]. Etiologie onemocnění je doposud neznámá, odhalení příčiny navíc komplikuje vysoká heterogenita onemocnění, tedy každý jednotlivý případ může být odlišný v projevech, patogenezi a může vyžadovat odlišnou terapii [3].

Podezření na MM zahrnuje pět kritérií:

- Projevy oslabené imunity.
- Trvale vysoká sedimentace erytrocytů, zvýšené celkové množství bílkovin v krvi.
- Klidové, noční bolesti páteře či jiných částí skeletu, trvající více než 1 měsíc z neznámých příčin, známky komprese míchy a míšních kořenů (osteoporóza).
- Renální insuficience (vzestup kreatininu, proteinurie, nefrotický syndrom).
- Hyperkalcemie (polyurie, dehydratace, nevolnost). [17]

Tabulka č. 1 - Přehled hlavních klinických příznaků (převzato a upraveno dle [7], [16])

Symptom	Příčina	Projevy a důsledky
Bolesti kostí	osteolýza	- difúzní nebo ložisková osteolýza - bolesti bederní páteře, až kompresivní fraktury - hyperkalcemie
Anémie	mechanický útlak krvetvorby myelomovými buňkami a vliv jimi produkovaných cytokinů	- pancytopenie - trombocytopenie - leukopenie
Poruchy hemostázy	adheze lehkých řetězců na povrch trombocytů	- trombocytopenie, zvýšená agregace trombocytů (hrozí zvýšená krvácivost/srážení)
Hyperviskozita	vysoká koncentrace monoklonálního imunoglobulinu IgM v krvi (případně řetězení imunoglobulinů IgA-IgG)	- hyperviskózní syndrom - <i>fundus paraproteinemicus</i> – změny očního pozadí
Infekce (opakující se)	imunosuprese B lymfocytárního původu, později i poruchy T lymfocytární imunity	- snížená produkce polyklonálních funkčních imunoglobulinů - lze řešit očkováním proti infekčním agens a podáváním imunoglobulinů
Polyneuropatie	monoklonální imunoglobulin způsobující polyneuropatii senzitivních vláken	- postih motorických vláken je vzácným jevem
Nefropatie	monoklonální lehké řetězce procházející glomeruly	- moč: tubulární válce, zvýšené koncentrace bílkoviny (poškození tubulů) - „myelomová ledvina“ vedoucí až k renální insuficienci (MGRS*) - - léčba dialýzou/transplantací

*MGRS - monoklonální gamapatie renálního významu (z angl. „Monoclonal Gammopathy of Renal Significance“)

1.1.2 Laboratorní diagnostika

Onemocnění je mnohdy objeveno náhodně, např. při preventivním vyšetření během fyzikálního vyšetření nebo při vyšetření krevního obrazu [15]. Přehled laboratorních nálezů u MM poskytuje Obrázek č. 3.

Biochemická a imunochemická vyšetření

Vyšetření kompletního krevního obrazu včetně vyšetření retikulocytů se u MM vyznačuje těmito nálezy: anemický obraz, trombocytopenie, leukopenie, pancytopenie). Z počátku jsou nejvíce signifikantní nálezy zvýšeného množství bílkovin v krvi a zvýšená sedimentace erytrocytů zapříčiněná jevem zvaným *rouleaux*, tzv. „penízkovatění“ (z nadměrné lepivosti), jež vede k podezření na hyperviskózní syndrom [18]. V rámci biochemického vyšetření jsou stanoveny tyto faktory: sérová hladina močoviny, albuminu, kyseliny močové, kreatininu a elektrolytů (Ca, Na, K, P, Cl), a to především vápníku (nález hyperkalcémie). Při nálezech mimo referenční rozmezí je dále provedena elektroforéza bílkovin ze séra, kvantitativní vyšetření imunoglobulinů IgM, IgG, IgA (nález paraproteinu) a vyšetření lehkých řetězců v moči na přítomnost Bence-Jonesovy bílkoviny (metoda imunofixace) [19].

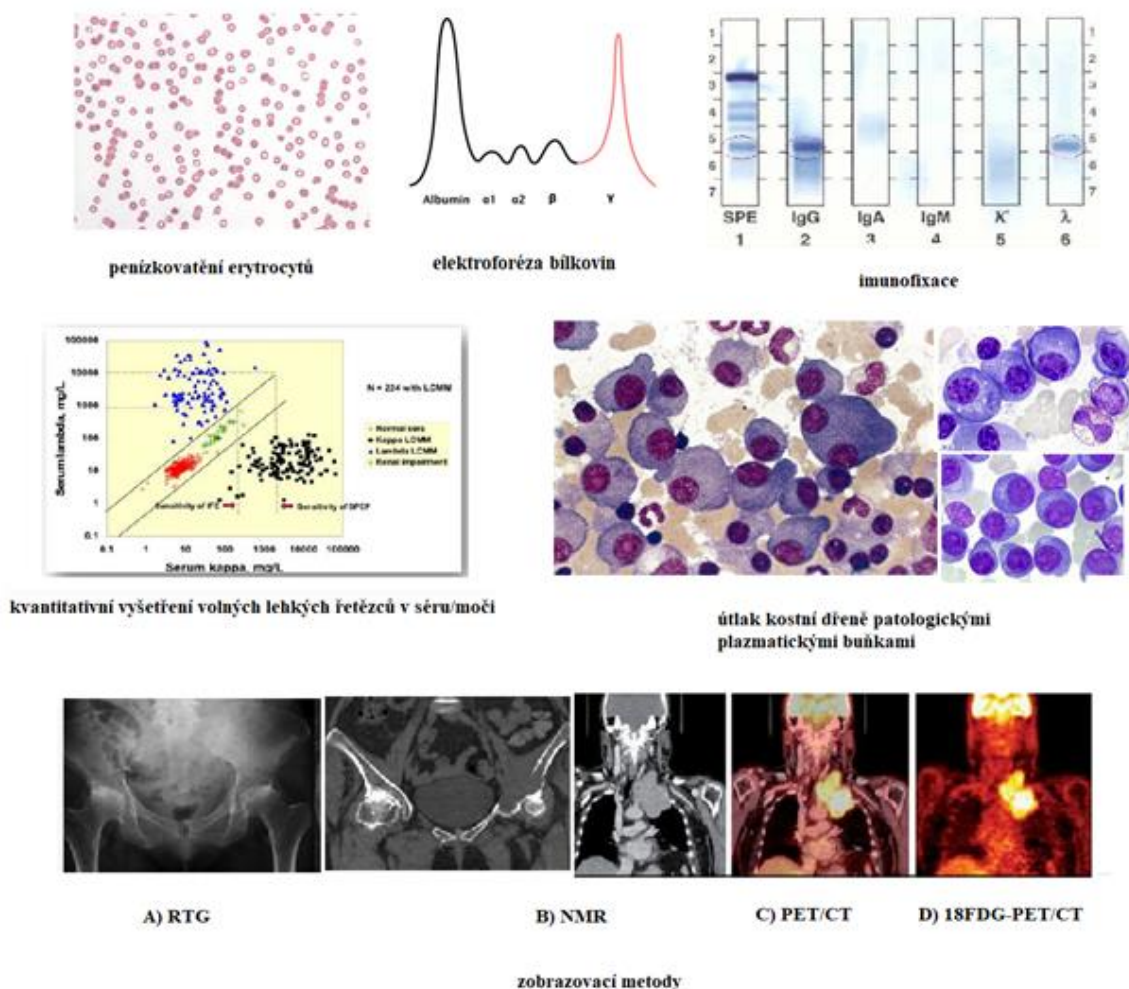
Cytologické vyšetření

Při nálezu monoklonální gamapatie přechozími vyšetřeními je dále přistoupeno k vyšetření kostní dřeně. Je odebrán aspirát kostní dřeně, ve kterém se při MM nalézá zvýšené množství plazmatických buněk, které se shlukují. U plazmatických buněk je pozorována změna perinukleárního průsvitu, kondenzace chromatinu (heterogenně rozptýlený), chybí radiální uspořádání bílkovin jádra, mohou se vyskytovat výběžky cytoplazmy (viz Obrázek č. 3) [20]. Pacient může být dále odeslán na cytogenetické vyšetření (FISH – fluorescenční *in situ* hybridizace) pro vyšetření výskytu genetických abnormalit nebo na konfirmační vyšetření, které zahrnuje trepanobiopsii kostní dřeně (cytologické vyšetření) [21].

Zobrazovací metody

Konvenční scintigrafie využívající rentgenové vyšetření (RTG) cytoskeletu je známa jako nedostačující pro vyšetření postižení skeletu u MM, proto je vhodnější využívat citlivějších zobrazovacích metod [3], kterými jsou např. nukleární magnetická rezonance (NMR) či radioizotopové vyšetření ¹⁸FDG-PET/CT (pozitronová emisní tomografie/počítačová tomografie se značeným izotopem fluorodeoxyglukózy). V rutinní praxi však není tomografické vyšetření běžně prováděno vzhledem k vysokým nákladům [22].

Standardní RTG vyšetření by mělo zahrnovat vyšetření skeletu včetně laterálního a předozadního zobrazení krční, hrudní a bederní páteře, lebky, pánve, kostí stehenních a hrudníku. Vyšetření za pomoci NMR je vhodné především pro vyloučení podezření na kompresi míšních nervů a kořenů [23]. Vyšetření pomocí počítačové tomografie umožňuje zobrazit i extramedulární poškození a v kombinaci s PET lze rozpoznat časná kostní ložiska (tzv. němá) i jiná mimokostní poškození. S využitím radioizotopového značení lze citlivost vyšetření skeletu mnohonásobně navýšit (porovnání na Obrázku č. 3) [19].



Obrázek č. 3 - Přehled laboratorních vyšetření a jeho nálezy (převzato a upraveno dle [20], [21], [23])

1.1.3 Diferenciální diagnostika

Laboratorní nálezy nemusejí v některých případech vést k jasné diagnóze. Mezi monoklonální gamapatií a mnohočetným myelomem je přechodová hranice. Z toho důvodu byla sestavena hlavní a rozšířená diagnostická kritéria dle Durieho a Salmona, která jsou v praxi stále nejvíce využívána (viz Tabulka č. 2). [15], [24]

Pro stanovení diagnózy MM je vyžadováno splnění všech tří hlavních kritérií. Pro určení stadia MM jsou využívána rozšířená diagnostická kritéria dle Durieho a Salmona, která zahrnují stadia i subtypy onemocnění (značeno písmeny). Stadium I zahrnuje všechna diagnostická kritéria uvedená v Tabulce č. 2. Stadium I je MGUS, v případě stanovení IA se jedná o doutnající nebo indolentní myelom, v případě IB stadia se jedná o mnohočetný myelom s fokálními lézemi. Stadium II je přechodové stadium mezi jednotlivými formami. Stadium III zahrnuje subtypy IIIA a IIIB, jedná se o MM s nálezem více jak 20 fokálních lézí se závažným postižením skeletu. [24]

Tabulka č. 2 - Diagnostická kritéria dle Durieho a Salmona [24]

1.	Přítomnost monoklonálních plazmatických buněk v kostní dřeni $\geq 10\%$ a/nebo nález plazmocyтому potvrzený biopsií
2.	Přítomnost monoklonálního proteinu v séru a/nebo v moči (sekretor) * (pokud chybí M-protein jedná se o tzv. non-sekretora, nález monoklonálních plazmatických buněk v kostní dřeni $\geq 30\%$ a/nebo nález plazmocyтому potvrzený biopsií)
3.	Jedna a více orgánových dysfunkcí souvisejících s myelomovým onemocněním a. C (Calcium) = hyperkalcemie (v séru $> 10,5$ mg/l nebo vyšší hladina vápníku než je běžné u daného jedince), b. R (Renal) = renální insuficience (sérový kreatinin > 2 mg/dl) c. A (Anemia) = hemoglobin < 10 g/dl (nebo < 2 g/dl méně než je běžné u daného jedince) d. B (Bone) = osteolytické léze nebo osteoporóza

* stadium IB, II, III A/B; stadium IA se vyvíjí do doutnajícího myelomu

Monoklonální gamapatie jsou děleny na benigní (MGUS) a maligní monoklonální gamapatie, kam jsou řazeny: mnohočetný myelom (a jeho variantní formy - doutnající myelom, indolentní myelom, asymptomatický myelom, nesekretorský myelom, solitární kostní plazmocytom, osteosklerotický myelom a plazmocelulární leukemie aj.), primární amyloidóza (nemoc lehkých řetězců), Waldenströмова makroglobulinémie, POEMS syndrom a MGRS syndrom. Některé vybrané formy budou blíže popsány. Algoritmus diferenciální diagnostiky MM je přiblížen na Obrázku č. 4. [25]

Monoklonální gamapatie nejasného původu (MGUS)

MGUS je stav charakterizovaný nálezem monoklonálního imunoglobulinu v séru či v moči. Takový nález je běžně přítomný u více než 3 % osob starších 50 let. Současný výskyt zvýšení jednoho typu lehkého řetězce (kappa, lambda) se vyskytuje u méně než 1 % osob starších 50 let [25]. Nálezy vedoucí ke stanovení MGUS: hladina monoklonálního imunoglobulinu < 30 g/l, přítomnost monoklonálních plazmatických buněk v kostní dřeni < 10 %, bez známek B lymfocytární proliferace, absence některých klinických příznaků, absence osteolytických ložisek (dále také: normální sérové hladiny vápníku, hemoglobinu, kreatininu, bez známek nemoci z ukládání lehkých řetězců). Z dostupných dat vyplývá, že k progresi do MM dochází u 1 % pacientů s MGUS ročně. Pacienti s MGUS jsou proto monitorováni v intervalech 6 až 12 měsíců [17].

Doutnající myelom (SMM)

Doutnající myelom (SMM, z angl. „Smoldering myeloma“) je onemocnění, které se vyznačuje vysokým rizikem progresu do mnohočetného myelomu. K progresi do MM dochází v prvních dvou letech až u 80 % pacientů s doutnajícím myelomem, v dalších letech riziko klesá. V roce 2014 byla stanovena kritéria pro určení SMM: přítomnost monoklonálního proteinu IgG nebo IgA v séru > 30 g/l nebo monoklonálního proteinu v moči > 500 mg/24 hodin nebo přítomnost 10 – 60 % monoklonálních plazmatických buněk v kostní dřeni při současné absenci jiných nálezů pro stanovení diagnózy mnohočetného myelomu (např. absence klinických příznaků, absence osteolytických ložisek). Rizikovými faktory pro MGUS i SMM pro rozvoj do mnohočetného myelomu jsou: non-IgG typ monoklonální gamapatie, vysoké hladiny monoklonálního imunoglobulinu, abnormální hladiny volných lehkých řetězců a genetické abnormality. Pacienti s MGUS i SMM by měli být pravidelně monitorováni na výskyt paraproteinu a výskyt lehkých řetězců v séru. U SMM se navíc doporučuje další vyšetření pomocí citlivých zobrazovacích metod (NMR nebo CT/PET). [15]

Indolentní, nesekreční a osteosklerotický myelom

Až 20 % pacientů s MM je bez nálezů osteolytických lézí. Tito pacienti se pohybují na hranici diagnostikování MGUS a MM. Typickými projevy této formy jsou: anémie, renální dysfunkce, imunosuprese. Pokud klinické příznaky zcela chybí, jedná se o tzv. indolentní myelom, který se vyznačuje přítomností tří a méně osteolytických ložisek a asymptomatickým průběhem. [25]

Nesekreční myelom je forma mnohočetného myelomu, u kterého nebyla prokázána přítomnost monoklonálního imunoglobulinu. U nesekrečního myelomu jsou nalézány pouze lehké řetězce imunoglobulinů. Tato forma myelomu vede k rozvoji difúzní osteoporózy bez přítomnosti osteolytických ložisek. Hlavní problematika spočívá v záměně diagnózy za primární osteoporózu. [26]

Jinou formou mnohočetného myelomu je naopak myelom s osteolytickými ložisky bez difúzní infiltrace kostní dřevě plazmocyty. Toto onemocnění je definováno přítomností vícečetných osteolytických ložisek a negativním nálezem na myelogramu. [25]

Atypickou formou maligní monoklonální gamapatie je osteosklerotický myelom, též zvaný POEMS syndrom, který se vyskytuje velmi vzácně (název syndromu je akronymem počátečních písmen hlavních projevů, viz dále). POEMS syndrom (též syndrom Crow-Fukase a Takatsukiho). Jedná se o onemocnění, které je charakterizováno nervovými poruchami. Hlavními projevy jsou: polyneuropatie (P), organomegalie - lymfadenopatie, hepatosplenomegalie (O), endokrinopatie – diabetes mellitus, amenorea (E), monoklonální gamapatie (M) a kožní změny – pigmentace, hemangiomy, hypertrichóza (S). Klinické příznaky Castlemanovy choroby a POEMS se obvykle prolínají. U syndromu P.O.E.M.S je obvyklým nálezem 5 % zastoupení plazmocytů v kostní dřevě. [27]

AL amyloidóza, MGRS, Waldenströмова makroglobulinémie

Na podkladě myelomu se může rozvíjet také primární amyloidóza (AL, z angl. „Amyloid Light Chain Disease“), která je řazena mezi nemoci z ukládání lehkých řetězců. Primární amyloidóza je stanovena na základě vyšetření volných lehkých řetězců. Existují dvě formy AL – systémová a ložisková. Hlavní problematikou je tvorba amyloidu, který se ukládá do tkání/orgánu a poškozuje své okolí nebo systémové funkce, což vede k renálnímu selhávání, postižení CNS nebo k malabsorpčnímu syndromu. [27]

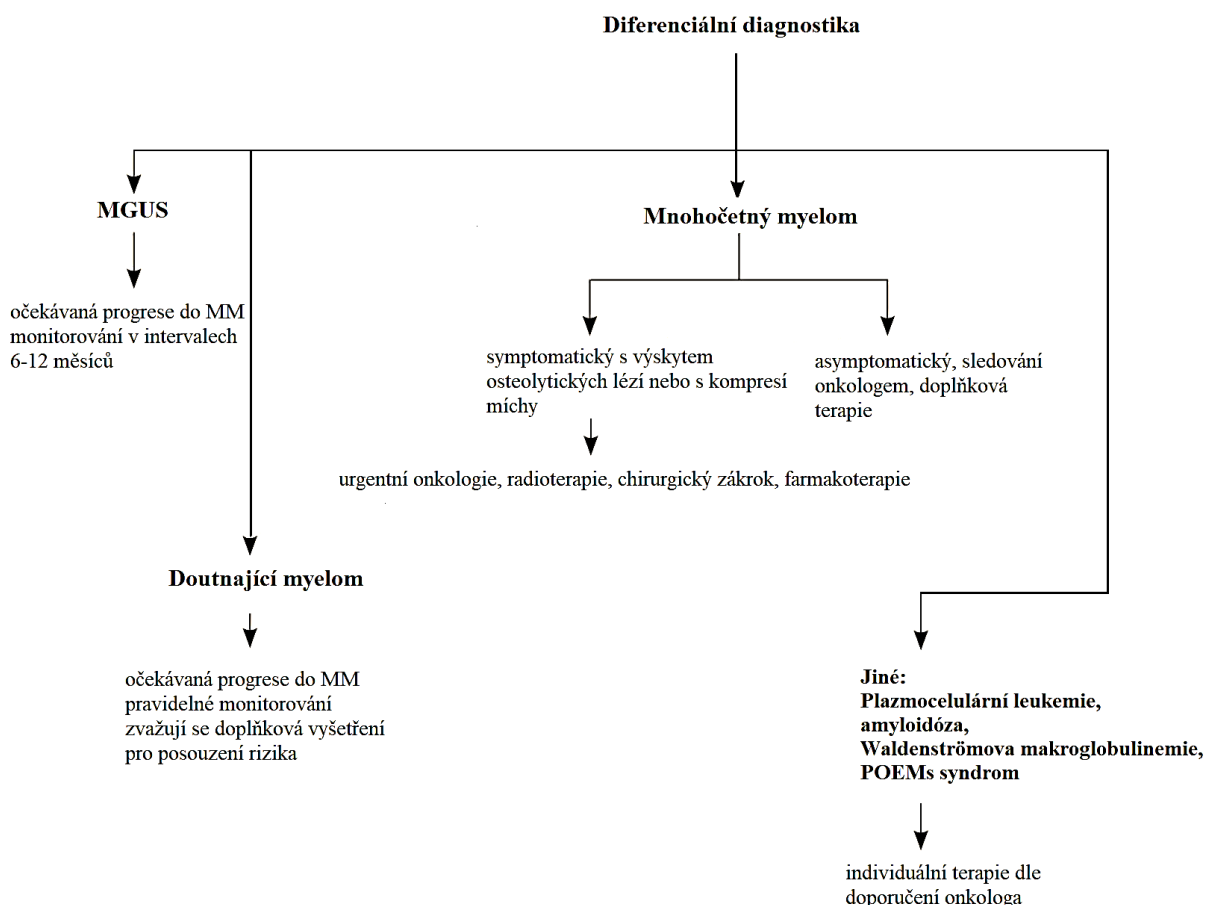
S AL amyloidózou může být spjatý i stav MGRS (monoklonální gamapatie renálního významu, z angl. „Monoclonal Gammopathy of Renal Significance“). MGRS je skupina poruch organismu zapříčiněných nadměrným výskytem monoklonálního imunoglobulinu. [26]

Tyto poruchy nesplňují kritéria pro symptomatický mnohočetný myelom nebo jiné lymfoproliferativní onemocnění, včetně MGUS. Pacienti s MGRS vykazují poškození ledvin monoklonálním imunoglobulinem nebo lehkými řetězci. MGRS se může prolínat s doutnajícím myelomem, Waldenströmovou makroglobulinémií, AL amyloidózou aj. Typickými nálezy jsou např. léze na ledvinách, glomerulonefritida s depozity monoklonálních imunoglobulinů, glomerulopatie C3 s monoklonální gamapatií, proximální tubulopatie z lehkých řetězců aj. [26]

Waldenströmova makroglobulinémie je onemocnění vycházející z infiltrace kostní dřene lymfoplazmocytárními buňkami, které nadměrně produkují imunoglobulin třídy IgM. Onemocnění se projevuje hyperviskózním syndromem, chronickou únavou, zvýšeným krvácením, osteolýzou, dušností, srdečním selháváním nebo např. výskytem chladových aglutininů IgM vedoucích k dalším příznakům. Pro odlišení od mnohočetného myelomu jsou zváženy všechny klinické příznaky. Mnohočetný myelom s nadprodukcí IgM je velmi vzácný. U Waldenströmovy makroglobulinémie jsou nálezy: lymfoplazmatické infiltrace kostní dřene $\geq 10\%$, anémie, hepatosplenomegalie aj. Histologicky se jedná o lymfoplazmocytický lymfom. [15]

Plazmocelulární leukemie (PCL)

Plazmocelulární leukemie je onemocnění vyznačující se přítomností klonálních plazmatických buněk v periferní krvi v počtu $> 20\%$ [15]. Plazmocelulární leukemie může být primární (*de novo*) nebo sekundární, jež vychází z mnohočetného myelomu. PCL je vzácný a velmi agresivní typ leukemie. Od mnohočetného myelomu se liší především počtem plazmatických buněk v kostní dřeni i periferní krvi, závažnějšími klinickými projevy (cytopenie, anémie, infiltrace vícera orgánů, výskyt většího množství kostních lézí) a rychlou gradací. Příčina nadměrného vylučování klonálních plazmatických buněk do periferní krve doposud nebyla objasněna, ovšem předpokládá se, že koreluje s výskytem genetických abnormalit. Léčba PCL je většinou málo účinná. Doba přežití je většinou přibližně 12 měsíců [28].



Obrázek č. 4 - Schéma algoritmu diferenciální diagnostiky monoklonálních gamapatií (převzato a upraveno dle [15])

1.1.4 Terapeutické strategie

Vzhledem k vysoké heterogenitě onemocnění se u každého pacienta liší odpověď na zahájenou léčbu, liší se i odhadovaná doba dlouhodobého přežití. Nejdůležitější roli hraje, v jaké době je stanovena diagnóza. Relabující nebo refrakterní případy MM nejsou ojedinělé. Léčebné strategie zahrnují i možné relapsy a úpravu farmakoterapeutik, protože u mnohých případů je odhalena léková rezistence. Cílem terapie je dosažení kontroly nad relapsy a útlum symptomů, které pacientovi znepříjemňují život. [29]

Léčba je většinou kombinovaná, využívá se více farmakoterapeutik najednou, které mají různé mechanismy působení. Mnohočetný myelom byl dříve považován za nevyléčitelné onemocnění, díky pokrokům moderní medicíny se však doba dlouhodobého přežití každý rok prodlužuje a zvyšuje se kvalita života pacientů. [30]

Volba terapeutické strategie se liší dle vyhodnocených rizik spojených s onemocněním a dle stavu pacienta. V poslední době je pozornost obrácena k farmakoterapii založené na inhibitech proteazomů a imunomodulačních léčivech, mezi nimiž mají důležité zastoupení monoklonální protilátky [31]. Přehled nejčastěji využívaných léčiv poskytuje Tabulka č. 3. Od 90. let minulého století do dnešní doby se zvýšil počet pacientů s přežitím 5 let o 15 %. Medián přežití se nyní pohybuje okolo 8-10 let [32].

Tabulka č. 3 - Nejčastěji využívaná léčiva v klinické praxi (převzato a upraveno dle [15], [31])

DRUH LÉČIVA	PŘÍKLADY
Inhibitory proteazomu	bortezomib, carfilzomib, ixazomib
Alkylační látky	mephalan, cyklofosfamid, bendamustin
Kortikosteroidy	dexamethazon, prednizon, methylprednizon
Imunomodulátory	thalidomid, lenalidomid, pomalidomid
Monoklonální protilátky	daratumumab, elotuzumab
Inhibitory histonových deacetyláz	panobinostat
Protinádorová antibiotika	doxorubicin

Moderní imunoterapeutické přístupy u léčby mnohočetného myelomu jsou založeny na bližším poznávání molekulární signalizace mezi myelomovými buňkami, plazmocytoidními dendritickými buňkami (pDC) a mezi imunokompetentními buňkami. Cílem takové terapie je navýšení imunitní odpovědi proti myelomovým buňkám. [33]

Terapeutické přístupy založené na zvýšení efektivity imunitní odpovědi a cytotoxicity proti myelomovým buňkám pomáhají zvýšit dlouhodobé přežití pacientů s MM. Proti tomu stojí však rostoucí podíl lékové rezistence. Na farmaceutický výzkum tak rostou požadavky na vývoj nových farmakoterapeutik [29]. Na lékové rezistenci se v největší míře podílí nádorové mikroprostředí. Nádorové buňky (nejen u MM) mohou měnit své metabolické dráhy. V přirozeném *niché* kostní dřeně myelomové buňky běžně využívají mechanismy aerobní glykolýzy a oxidační fosforylace. Tímto způsobem produkují energii pro svůj růst a výživu, udržují si hypoxické prostředí a syntetizují si potřebné lipidy a proteiny. Tento jev je nazýván jako Warburgův efekt [34].

Využití farmakoterapeutik pro léčbu MM

Pro terapii MM se v praxi často se využívá kombinace bortezomidu s lenalidomidem. Tato terapeutická strategie je výhodná, neboť jsou u nádorových buněk spouštěny obě apoptotické dráhy (vnitřní i vnější). Bortezomib zasahuje do ubikvitin-proteazomového systému (UPS) a aktivuje tak reakce vedoucí k cytotoxickému poškození myelomových buněk na principu narušení jejich proteinové rovnováhy. Dalšími inhibitory proteazomu jsou: carfilzomib a ixazomib. [29]

Thalidomid a jeho účinnější deriváty lenalidomid a pomalidomid jsou imunomodulátory, které jsou založeny na cytotoxickém, antiangiogenním a protinádorovém působení. U refrakterních MM je vhodné podávat carfilzomib v kombinaci s dexamethazonem či i s lenalidomidem. [35]

Od roku 2000 nastal rozvoj v imunoterapii MM. Do první generace léčiv jsou řazeny imunomodulátory. Posléze se staly velmi populárními terapeutické monoklonální protilátky. Dále pokračoval rozvoj chimérických a bispecifických protilátek, imunokonjugátů a inhibitorů kontrolních bodů [36]. Přehled poskytuje Obrázek č. 5.

V poslední době je velmi populární terapie nazývaná CAR-T, jež využívá T lymfocytů s receptory TCR, které se vážou s antigeny na povrchu nádorových buněk. Vznikem vazby dojde k aktivaci T lymfocytů, které nádorovou buňku zabijí. Tento terapeutický přístup je populární především proto, že se využívají T lymfocyty, které byly pacientovi vlastní, ale byly laboratorně upraveny, a to tak, že do nich byl vložen chimérický antigenní receptor (CAR). Receptor CAR napomáhá s lokalizací nádorové buňky a aktivuje T lymfocyty. [37]

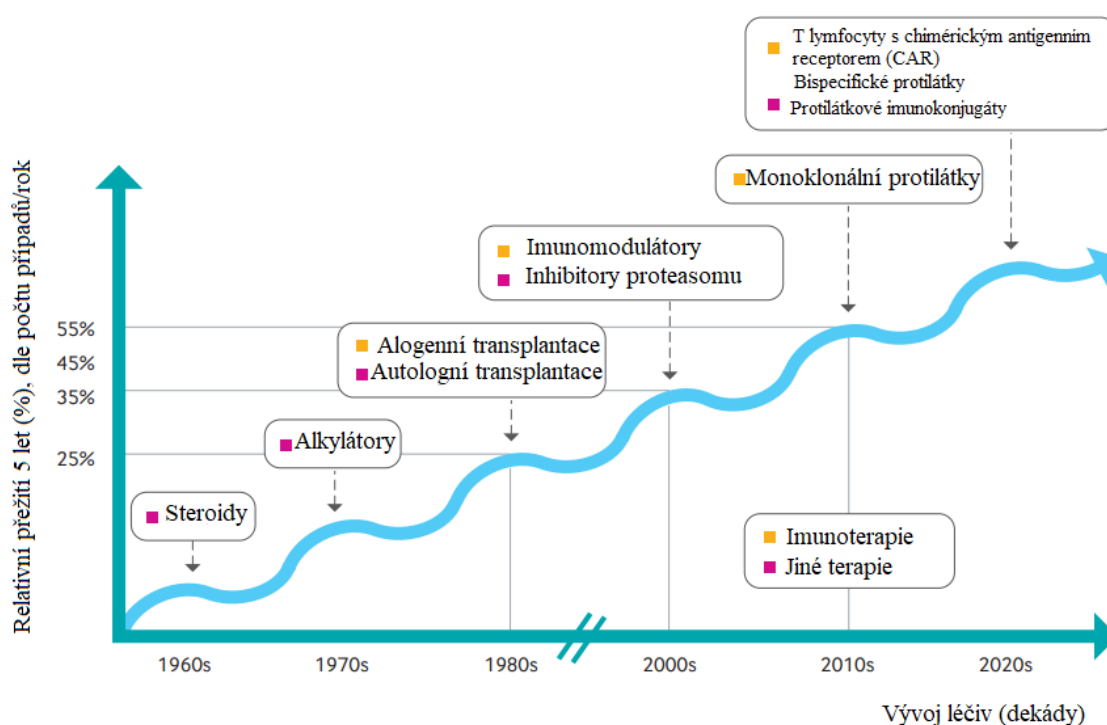
Nynější MM terapeutické přístupy se zakládají na kombinování léčiv: inhibitory proteazomu, dexametazon (nebo melfalan) a imunodulačních léků. Pacienti s časně diagnostikovaným MM jsou vhodní pro terapii s využitím monoklonálních protilátek, která je nyní populární. [1]

Využití monoklonálních protilátek (mAb) v terapii MM je považováno za moderní terapeutický přístup, neboť se stále nejedná o rutinně využívaná léčiva. Zástupcem terapeutických mAb je např. daratumab, který cílí na buňky nesoucí na svém povrchu znak CD38. Daratumab je využíván pro zahajovací indukční terapii i pro terapii refrakterního MM. Elotuzumab je mAb s aktivitou proti antigenu CS1 (též SLAMF7 nebo CD319) [38]. Elotuzumab je aplikován pacientům v relapsu nebo s refrakterním MM a je vhodné jej kombinovat s lenalidomidem a dexamethazonem [38]. Siltuximab je chimérická mAb, třídy IgG₁ proti zánětlivému interleukinu IL-6 [39].

Interleukin IL-6 je důležitým mediátorem pro růst nádoru a přežití nádorových buněk. Siltuximab funguje na principu blokáce IL-6. Používá se především pro léčbu doutnajícího myelomu. [39]

Dalšími mAb pro terapii MM jsou např. tabalumab (proti BAFF antigenu – B lymfocyty aktivující faktor), milatuzumab (proti molekule CD74), indatuximab (proti CD 138), nivolumab (proti PD-1), lucatumumab a dacetuzumab (proti CD40), ulocuplumab (proti chemokinovému receptoru CXCR4) aj. [40]

Výhodou terapie založené na mAb je dobrá tolerance a vysoká bezpečnost. Princip terapie spočívá v zabíjení myelomových buněk pomocí imunitního systému hostitele (cytotoxické mechanismy) nebo aktivace apoptotických drah. Terapie pomocí mAb je vhodná i pro pacienty s rezistencí na klasickou farmakoterapii, protože mAb nabízejí cílenou terapii namířenou proti antigenům na myelomových buňkách. Díky tomu je toxicky působeno pouze v oblasti nádorových buněk a léčba pacienta tolik neoslabuje. [41]



Obrázek č. 5 - Vývoj léčiv v čase a vzestup účinnosti terapie MM v letech 1960 - 2020 (převzato a upraveno dle [36])

Mezi nově testované mAb patří belantamab a mafodin. Jedná se o imunokonjugáty mAb a cytostatika. Část s monoklonální protilátkou váže antigen BCMA (antigen zrání B lymfocytů, z angl. „B Cell Maturation Antigen“), který se nachází na povrchu nádorových buněk. Komplex mAb a BCMA aktivuje uvolnění cytostatika s názvem mcMMAF, které blokuje buněčný cyklus ve fázi G2/M a indukuje apoptózu myelomových buněk a aktivuje makrofágy a fagocytózu závislou na protilátkách. [42]

Ukázalo se, že anti-BCMA v kombinaci s mcMMAF inhibuje kolonie myelomových buněk a zároveň cílí pouze na buňky nesoucí BCMA antigen (myelomové buňky). Belantamab a mafodin jsou díky vysoké účinnosti považovány za budoucí imunoterapeutika nové generace. [42]

Prostřednictvím protinádorových vakcín, které jsou založeny na mAb, je lze docílit antigenně specifické imunitní odpovědi proti myelomovým buňkám. Protinádorové vakcíny mohou obsahovat bázi dendritických buněk, proteiny, peptidy, viry, DNA nebo RNA molekuly. Vzhledem k absenci optimální odpovědi po očkování u pacientů s MM se dosud probíhající studie (NCT02728102) zabývá tím, zda kombinace protinádorových vakcín s IMiD může zvýšit klinicky významnou imunitní odpověď. [1]

Transplantace hematopoetických kmenových buněk

Dalším terapeutickým postupem je příprava pacienta na HSCT, pokud je pacient vhodným kandidátem pro tento léčebný krok (je zvažován věk, stav a prognóza) [43]. Mnohočetný myelom je nejčastější indikací k autologní HSCT. Alogenní HSCT je vhodná spíše pro pacienty s AML (akutní myeloidní leukemie). Kontraindikací k autologní HSCT jsou: víceorgánová postižení – nejčastěji srdeční postižení (snížená funkce levé srdeční komory). Mezi diskutabilní kontraindikace jsou řazeny stavy: opakované srdeční arytmie, výpotek perikardu, ledvinná nedostatečnost (snížená clearance kreatininu), postižení plic aj. respirační nedostatečnost, krvácení z gastrointestinálního traktu aj. [44], [43].

Vědecké studie dlouhodobě ukazují, že podstoupení autologní HSCT u pacientů s MM vede k lepší regeneraci fungování imunitního systému a obnovení narušených imunoregulačních drah. Předpokládá se, že pacienti po autologní HSCT setrvávají déle v remisi a mají v budoucnu šanci zcela se uzdravit. Podstoupení autologní HSCT zlepšuje prodloužení doby přežití průměrně minimálně o 1 rok. [44]

Výsledky transplantace se odvíjí od věku a pacienta a předchozí diagnózy. Mezi hlavní výhody zákroku patří, že oproti alogenní HSCT je bezpečný i pro starší pacienty a pacienty s atypickým buněčným fenotypem. [44]

Indikace k autologní HSCT je předmětem diskuzí a klinických studií, neboť tento transplantační zákrok přináší mnohá rizika. Hlavním rizikem je těžká imunosuprese, ve které se pacient nachází v rámci přípravy na transplantaci. Ta zahrnuje vysokodávkovou chemoterapii, jež má negativní dopad na celou kostní dřeň (nejen myelomové buňky). Proto jsou zároveň podávány podpůrné růstové faktory pro navýšení regeneračních schopností bílých krvinek (faktor stimulující granulocyty, ve zkr. G-CSF, z angl. „Granulocyte Colony Stimulating Factor“) a následuje transplantace vlastních kmenových buněk (dříve odebraných k tomuto účelu) [44]. Po autologní HSCT je zahájena konsolidační (ustalovací) a udržovací terapie která slouží k tomu, aby pacient setrval v remisi. Je založena na podávání nízkých dávek farmakoterapeutik [15].

1.2 Aktivita imunitního systému proti myelomovým buňkám

U každého nádorového onemocnění platí, že imunitní systém rozhoduje o tom, jakým směrem se onemocnění bude vyvíjet. Imunitní systém může dlouhodobě nádorové bujení utlumovat a udržovat homeostázu [45]. Naproti tomu nádorový proces může dlouhodobě imunitnímu doзору unikat díky lokální imunosupresi nebo jiným obranným mechanismům [46].

Myelomové buňky jsou odhaleny imunitním systémem na základě jejich imunogenicity [47], tuto úlohu zastávají hlavně dendritické buňky. Dlouhodobá interakce imunitního systému s myelomem vede k selekci odolnějších klonů myelomových buněk [48]. Komplexní porozumění problematiky myelomové heterogenity, nádorového mikroprostředí i infiltrace imunokompetentními složkami je žádoucí mimo jiné i pro objasnění často se vyskytující terapeutické rezistence u závažnějších případů [49].

Složky imunitního systému, které se dostávají do nádorového mikroprostředí hrají klíčovou roli v aktivaci protinádorové imunity. Některé imunokompetentní buňky však mohou růst a invazi nádoru podporovat [50], proto není protinádorová imunita přesně vymezena. Jedná se o individuální soubor imunitních složek a mechanismů působících proti rozvoji nádoru [45]. Mezi složky s „pronádorovým“ působením patří např.: Th17, IL-1, IL-6, TGF- β , IL-17 [51].

Nádorové antigeny

Nádorové buňky nesou na svém povrchu antigeny, proti kterým může imunitní systém reagovat tvorbou protilátek. Takové nádorové antigeny jsou generovány buď přímo nádorovými buňkami jako nádorově specifické antigeny zvané TSA (nádorově specifické antigeny, z angl. „Tumor Specific Antigens“) [52]. Nebo se jedná o antigeny exprimované zdravými buňkami, avšak vlivem nádorového bujení byla pozměněna jejich exprese, lokalizace výskytu nebo část jejich struktury aj. TAA (antigeny asociované s nádorem, z angl. „Tumor Associated Antigens“). U každého nádorového onemocnění lze nalézt komplexní směs obou antigenních skupin [53].

Některé TAA antigeny se vyskytovaly napříč klinickými studiemi tak často, že jsou nyní nazývány jako tzv. „univerzální antigeny“, jedná se o: p53, NY-ESO-1, MART-1 (melanomový antigen rozpoznávaný T buňkami 1, z angl. „Melanoma Antigen Recognized by T-cells 1“) a survinin aj. Tyto nádorové antigeny jsou nalézány u více než 50 % nádorových onemocnění (včetně mnohočetného myelomu). [54]

Za posledních dvacet let výzkumu protinádorové imunity bylo potvrzeno, že většina pacientů s MM exprimuje ve zvýšené míře některé imunogenní TAA antigeny jako např.: PSA (prostatický specifický antigen, z angl. „Prostatic Specific Antigen“), MAGE (z angl. „Melanoma Antigen“), NY-ESO1 (z angl. "New York Esophageal Squamous Cell Carcinoma 1") aj. Proti těmto TAA antigenům jsou nalézány specifické Tc lymfocyty. [52]

Mezi TSA antigeny patří např.: rodina CTA antigenů (antigeny rakoviny varlat, z angl. „Cancer Testis Antigens“) zahrnující antigeny LAGE, GAGE, BAGE (CTA antigeny značené „L“; „G“; „B“), modifikovaný protein p53, MHC-I glykoproteinové komplexy s abnormální proteinovými fragmenty, MHC-I glykoproteinové komplexy s proteinovými fragmenty onkogenních virů (EBV, HPV) nebo jiné strukturálně modifikované glykoproteiny. [53]

U pacientů s MGUS byly pozorovány odlišné fenotypy T lymfocytů než u pacientů v pokročilém stadiu MM. Je zřejmé, že u pokročilejších stadií onemocnění dochází k vyčerpání imunitního systému a vlivem progresu do agresivnějšího stadia MM dochází ke změnám fenotypů buněk klíčových pro protinádorové působení [49]. Kromě toho byly prokázány i nové imunogenní neoantigeny (TSA) [55].

TSA antigeny jsou více imunogenní než TAA. Z toho důvodu se TSA antigeny vyskytují v nízkých titrech [56]. Výskyt neoantigenů ve vyšší míře je zároveň považován za negativní prognostický faktor, protože jejich přítomnost je znakem větší zátěže mutacemi a lze usuzovat, že pacientovi hrozí vyšší riziko relapsů [57]. Nově získané poznatky ohledně neoantigenů u MM jsou podkladem pro výzkum, který se věnuje vývoji protinádorových vakcín [55].

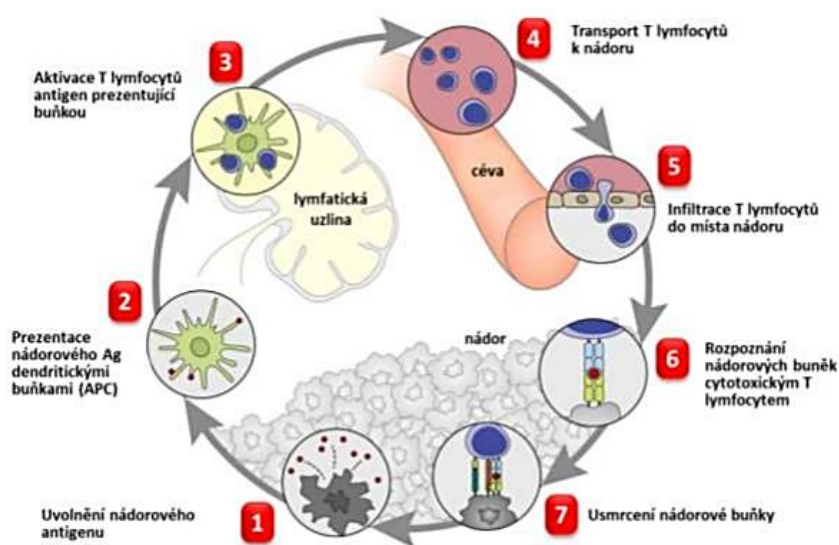
B lymfocyty, T lymfocyty a tvorba (auto)protilátek

Protilátky tvořené proti TAA antigenům jsou nazývány autoprotiilátkami právě proto, že TAA antigeny jsou antigeny těla vlastní, ale byly ovlivněny nádorovým procesem natolik, že došlo ke změnám některých jejich vlastností. Složky imunitního systému (APC, antigen prezentující buňky, z angl. „Antigen Presenting Cells“) je poté rozpoznávají jako cizí. Imunitní systém se snaží tvorbou anti-TAA přirozených autoprotiilátek kompenzovat změny spojené s invazí nádorových buněk do tkání. Doposud nebylo objasněno, proč jsou tvořeny přirozené autoprotiilátky i proti zcela fyziologickým antigenům. Existují hypotézy, že se může jednat o ztrátu kontroly nad tvorbou autoprotiilátek a možné zvrhnutí imunitní odpovědi směrem k autoimunitním procesům. [56]

To není překvapivé vzhledem k tomu, že mezi nádorovými a autoimunitními onemocněními není jasně vymezena hranice a mnohdy je náročné je od sebe rozlišovat nebo to ani nelze. Předpokládá se, že roli hrají i enviromentální faktory a genetické predispozice daného jedince. Je známo, že někteří jedinci jsou náchylnější ke ztrátě homeostázy imunitního systému a může docházet ke snazší aktivaci složek imunitního systému, např. lymfocytů reagujících s vlastními antigeny. [56]

Změny v poměru imunokompetentních složek jsou pozorovány i u pacientů po HSCT. Výzkumy zatím naznačují, že dochází ke změně poměru Th a Tc lymfocytů a k poklesu populace tzv. senescentních T lymfocytů [49], jejichž přítomnost je důkazem o tom, že organismus byl vystaven vyšší a dlouhodobé antigenní stimulaci a došlo k vyčerpání některých lymfocytárních subpopulací. [58]

Specifická protinádorová imunita je založena především na aktivaci T lymfocytů (viz Obrázek č. 6). Později jsou aktivovány i B lymfocyty, které mohou produkovat přirozené autoprotilátky. Tyto polyklonální protilátky s různou specifitou jsou nalézány u více než 50 % nádorových onemocnění. Jejich funkce nebyla doposud zcela objasněna, předpokládá se, že se podílejí na udržování homeostázy, blokaci metastazování a blokaci nádorových antigenů aj., což vede k lepší prognóze pacienta. Výskyt některých přirozených autoprotilátek tyto funkce pozbývající je naopak negativním prognostickým faktorem [59]. Výskyt autoprotilátek je v dnešní době mnohými vědci považován za průvodní projev onemocnění, nikoli za jeho samou příčinu [60].



Obrázek č. 6 - Modelový cyklus T lymfocytární protinádorové reakce (převzato a upraveno dle [61])

Primární funkce a přítomnost přirozených autoprotilátek je mnohdy nejasná. Je známo, že jsou pro každého jedince unikátní a jedná se o stabilně setrvávající soubor protilátek v lidském séru. Jedna z nově objevených funkcí přirozených autoprotilátek třídy IgM je vazba na apoptotické neoantigeny, kterými jsou např. kardiolipin, annexin IV a fosfatidylserin. Přirozené IgM se tímto způsobem účastní úklidu apoptotických buněčných zbytků. [62]

Přirozené autoprotilátky IgM jsou produkovány převážně podtřídou B₁ lymfocytů, kdežto přirozené IgG autoprotilátky (nejčastěji IgG₃) jsou produkovány lymfocyty podtřídy B₂ a jejich produkce je více odvislá od aktivity T lymfocytů. [62]

U autoimunitních onemocnění je přítomnost IgG autoprotilátek patologickým jevem a předpokladem pro horší průběh onemocnění [62]. Přirozené IgG autoprotilátky, které se v séru vyskytují ve zvýšeném množství je nutné posuzovat jako produkty imunitního systému, jež vznikají na pomezí přirozené a patologické reaktivity, a to především kvůli nejasnému účelu i vzhledem k faktu, že se vyskytují i u zcela zdravých jedinců [63].

Bylo rovněž prokázáno, že u pacientů s neurodegenerativními onemocněními jako jsou: Parkinsonova choroba, roztroušená skleróza, Alzheimerova choroba aj. je snížena schopnost produkovat přirozené autoprotilátky IgG typu. Tento jev koreloval také s vyšším věkem. Vzhledem k prevalenci mnohočetného myelomu u starších lidí je nutné brát v potaz výskyt tohoto jevu. [62]

Mnohé výsledky výzkumu oblasti přirozených autoprotilátek u nádorů se rozcházejí ve svých závěrech. U některých přirozených autoprotilátek byly totiž potvrzeny protektivní (protinádorové) účinky, kdežto u jiných autoprotilátek byly objeveny mechanismy podporující nádorový růst, metastazování aj. [64]

Dle závěrů Kinker a spol (2021) ohledně analyzování autoprotilátkové specifity, vyšlo najevo, že někteří pacienti s nádory produkují autoprotilátky ve vysoké míře a byla u nich potvrzena silná protinádorová imunitní odpověď [45]. Je známo, že některé autoprotilátky proti nádorovým antigenům se mohou objevit až po zahájení terapie, takové protilátky jsou považovány za užitečné prognostické biomarkery [52].

Naproti tomu je u mnohých pacientů sledován paraneoplastický autoimunitní fenomén, jež se projevuje zvýšenou aktivitou imunitního systému, a to v takové míře, že se tvorba autoprotilátek stává kontraproduktivní a zhoršuje pacientův stav kvůli zvýšenému poškozování vlastních tkání [65]. Tato problematika by mohla být vyřešena pečlivějším prošetřením všech příznaků a zohledněním výskytu paraneoplastického autoimunitního fenoménu [62].

Michaud a spol. (2021) popsali, že funkční vlastnosti B lymfocytů produkujících anti-TAA protilátky jsou odvozeny od skladby antigenů, které imunitní systém u daného nádorového onemocnění rozpoznává. Ukazuje se, že přítomnost B lymfocytů nesoucích znak CD20+ je předpokladem pro dlouhodobé přežití. V jiných případech byly nalézány B lymfocyty s regulační funkcí (B_{reg}), které působí imunosupresivně. U pacientů s nádory, u kterých byly zjištěny nálezy regulačních B lymfocytů namísto B lymfocytů nesoucích znak CD20+, bylo zjištěno vyšší riziko metastazování. [66]

Do dnešní doby bylo odhaleno mnoho anti-TAA protilátek a některé z nich byly potvrzeny jako významné biomarkery pro časnou diagnostiku, stanovení prognózy nebo např. pro terapeutické účely jako je vyhledávání cílových struktur, proti kterým jsou protilátky vyvíjeny. Takové znalosti lze využít pro sestavení individuální terapie, např. pro tvorbu protinádorových vakcín [52]. Vychází otázka, zda by zdraví jedinci pozitivní na přítomnost přirozených autoprotilátek proti významným TAA antigenům neměli být pravidelně monitorováni. Přirozené autoprotilátky u nádorových onemocnění byly již mnohokrát potvrzeny jako časně biomarkery [67].

V posledních několika letech se uvažuje o významu extracelulárních váčků (EV, z angl. „Extracellular Vesicles“), které se účastní protinádorové imunitní odpovědi a indukují tvorbu přirozených autoprotilátek. Bylo potvrzeno, že EV v nádorovém mikroprostředí napomáhají k lokalizaci nádorových buněk. Předpokládá se, že EV se účastní aktivace imunitních složek i transportu významných TAA antigenů pro imunokompetentní buňky (APC). Extracelulární váčky mohou s TAA a protilátkami tvořit cirkulující komplexy. Nové poznatky ohledně funkce a role protinádorových EV mohou být klíčové pro vývoj nových imunoterapeutických přístupů. [68]

Pro kontrolu a porovnání nejnovějších výsledků ohledně studování autoprotilátek slouží databáze portálu s názvem „AAgAtlas“, kde je možné vyhledat dostupné publikace ke konkrétním autoprotilátkám rozpoznávajícím cílové TAA [69]. Dalším užitečným vyhledávacím nástrojem je databáze „Antibodypedia“ [70].

Více informací o zapojení imunitního systému v boji proti nádorům a tvorbě přirozených autoprotilátek namířených proti specifickým nádorovým antigenům nebo antigenům s nádory asociovanými je shrnuto v bakalářské práci kompilačního typu *Role autoprotilátek v boji proti nádorům* (2021), viz [71].

1.2.1 Výskyt přirozených autoprotilátek u mnohočetného myelomu

Myelomové buňky exprimují velké množství TAA antigenů, proti kterým mohou být tvořeny specifické přirozené autoprotilátky. Bylo zjištěno, že mezi takové TAA antigeny lze řadit i klonální imunoglobulin [72]. Protilátky lze nalézat v séru pacientů i několik let před propuknutím onemocnění. Výzkumný tým Casey a spol. (2021) stanovil u 20 % sledovaných pacientů s diagnózou MGUS protilátky proti proteinům OFD1 (protein orálně-obličejově-digitálního syndromu (z angl. "Protein Oral-facial-digital Syndrom 1") a SOX2 (transkripční faktor 2 SRY-box). Tyto protilátky nebyly přítomné u pacientů s MM [48].

Při monitorování Tc lymfocytární odpovědi byla ovšem potvrzena přítomnost Tc lymfocytů namířených proti OFD1 a SOX2 proteinu u skupiny pacientů s MGUS i u pacientů s MM. Předpokládá se, že nepřítomnost Tc lymfocytů (z dysfunkce krvetvorby) namířených proti SOX2 proteinu u MGUS může znamenat vyšší riziko progresu MGUS do MM. [48]

U pacientů s MM se mnohdy vyskytují protilátky proti antigenům CTA skupiny (antigeny rakoviny varlat, z angl. „Cancer Testis Antigens“). Mnohočetný myelom je jedním z mála nádorových onemocnění, u kterého se anti-CTA protilátky vyskytují. Mezi antigeny skupiny CTA patří SSX-2 (protein synoviálního sarkomu) a NY-ESO-1 proteiny. Z pohledu časné diagnostiky se jedná o výhodu vzhledem k jejich vysoké specifitě. Z terapeutického pohledu je tomu naopak, neboť výskyt CTA antigenů je negativním prognostickým faktorem, neboť podporují přežívání myelomových buněk v kostní dřeni [73]. Anti-CTA protilátky náleží nejčastěji k podtřídě IgG₁ nebo IgG₃ [74]. Některé anti-CTA protilátky mají vliv na výslednou buněčnou odpověď proti nádoru. Výjimkou jsou např. protilátky anti-NY-ESO-1, jejichž úloha v protinádorové imunitě je nejasná a jsou považovány spíše za užitečné nádorové biomarkery [72], [75].

Luetkens a spol. (2014) v rámci svého výzkumu identifikovali a zkoumali specifitu protilátek proti TAA antigenům u MM. Ve výsledcích předpokládají, že protilátková odpověď je spontánní. Kvalitu protilátkové odpovědi se nepodařilo dát do širší souvislosti s mírou agresivity onemocnění jednotlivých pacientů. Specifita protilátek byla označena jako „jemná“. Luetkens a spol. (2014) popsali, že u MM se nejčastěji vyskytují protilátky proti proteinům: SSX-2, NY-ESO-1, MAGE A3 a PRAME (přednostně exprimovaný antigen melanomu, z angl. „Preferentially Expressed Antigen In Melanoma“). [75]

V nedávných studiích bylo odhaleno, že jsou ve zvýšené míře tvořeny protilátky proti enzymu ENO1 (izoforma α), které by mohly být zásadním nádorovým biomarkerem. Enzym ENO1 indukuje tvorbu přirozených autoprotilátek u mnohých nádorových onemocnění, nevyjímaje mnohočetný myelom. Panuje hypotéza, že pacienti s protilátkami anti-ENO1, které blokuje enzym ENO1 mohou dosahovat lepšího dlouhodobého přežití [33], proto se bude další kapitola enzymu ENO1 blíže věnovat [76], [77].

1.3 Enzym enoláza a jeho výskyt u nádorů

Enzym enoláza má tři izoformy (α , β , γ). Izoforma α , též ENO1, je zastoupena téměř ve všech tkáních organismu. Každá izoforma je složena ze dvou hetero nebo homodimerů ($\alpha\alpha$; $\alpha\beta$; $\alpha\gamma$; $\beta\beta$; $\gamma\gamma$) a vyznačuje se glykolytickým působením [78]. Izoforma β , zvaná ENO3 má obdobné vlastnosti a funkce jako ENO1 a vyznačuje se méně častým výskytem. ENO1 může u hlodavců přecházet na konformační formu ENO3 během vývoje svalové tkáně. U dospělých lidí se ENO3 nachází výhradně v buňkách kosterního svalstva, kde se podílí na jeho vývoji a regeneraci [79]. ENO2 (γ izoforma) se od ENO1 a ENO3, výrazně liší tím, že má tzv. neuron-specifickou funkci. Nachází se v neuronových buňkách, které se diferencují. ENO2 je ve vyšší míře produkována u malobuněčných karcinomů neuroendokrinního původu. Všechny izoformy enzymu enoláza mohou sloužit jako nádorové biomarkery [80].

ENO1 je považována za nejvýznamnější izoformu, poněvadž se jedná o jeden ze základních enzymů aerobní glykolytické dráhy [78]. ENO1 zprostředkovává přeměnu 2-fosfo-D-glycerátu na fosfoenolpyruát [81]. ENO1 je také plazminogenný receptor na buněčných membránách a účastní se tak, kromě glykolytické dráhy i fibrinolytického systému [82].

Role α -enolázy v nádorovém procesu

Bylo zjištěno, že původní funkce ENO1 v glykolytické dráze, se dle lokalizace v nádorovém mikroprostředí liší. Předpokládá se, že významnější roli může hrát působení ENO1 ve fibrinolytickém systému. Význam ENO1 na povrchu nádorových buněk je však nejasný, vzhledem k chybějícímu kódujícímu úseku pro GPI (glykofosfatidyl-inozitolová kotva) nebo obecně vzhledem k absenci transmembránové funkce. Zároveň bylo potvrzeno, že delecí genu pro ENO1 a absencí této izoformy dojde ke kompletní závislosti nádorových buněk na izoformě ENO2. [76]

ENO1 se vyskytuje nejen u mnohých nádorových, ale i autoimunitních onemocnění [77], kterými jsou např.: revmatoidní artritida [83], systémový lupus erythematoses (SLE), ulcerózní kolitida, Crohnova choroba, retinopatie nebo systémová sklerodermie, astma aj. [77]. Zvýšené hladiny anti-ENO1 protilátek byly pozorovány také u pacientů po infarktu myokardu, u žen s opakovanými potraty bez známé příčiny nebo u žen s endometriózou [84]. Enzym ENO1 je proto specifickým TAA antigenem pro mnohá onemocnění. Zvýšené hladiny ENO1 přispívají ke zvýšení cAMP (cyklický adenosinmonofosfát) [82].

Zvýšená exprese ENO1 je nejčastěji nalézána u karcinomu plic. Předpokládá se, že ENO1 má u karcinomu plic významný vliv na metastazování. Bylo zjištěno, že podáváním léčebných mAb se specifitou anti-ENO1 došlo u pacientů s plicním karcinomem ke snížení metastazování v plicích a kostech. [76]

Humorální imunitní odpověď na zvýšené hladiny α -enolázy

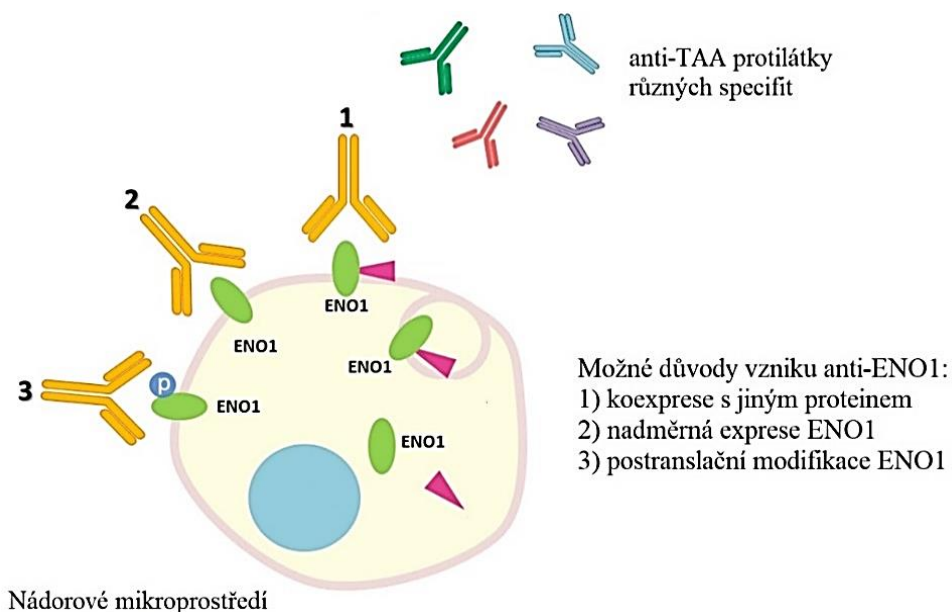
Mezi často zmiňované autoantigeny patří i glykolytický enzym ENO1 (a jeho izoformy), proti kterému jsou tvořeny autoprottilátky. V posledních letech se jednalo o jeden z nejvyhledávanějších antigenních cílů různých klinických studiích, které zahrnovaly testování patientských sér, pokusy s hlodavci i jiné testy *in vitro*. V každé z nezávislých studií byly autoprottilátky anti-ENO1 považovány za významné. Autoprottilátky proti ENO1 slouží jako biomarkery u širokého spektra stavů např. u opakovaných potratů, endometriózy, lymfocytární hypofyzitidy, jaterní fibrózy, glomerulonefritidy, retinopatie, mnohočetného myelomu, karcinomu plic, karcinomu slinivky, SLE, revmatoidní artritidy a jiných nádorových nebo autoimunitních onemocnění. [84]

Jak bylo již řečeno, zvýšené hladiny ENO1 jsou nalézány v souvislosti s mnohými patologickými procesy a onemocněními. Předpokládá se, že tvorba anti-ENO1 protilátek probíhá na podkladě změn fyziologického enzymu ENO1, jako je např. nadměrná exprese [85]. Předpokladem pro zvýšenou expresi ENO1 je hypoxické nebo ischemické prostředí a zvýšená exprese genů, které ENO1 kódují (viz Obrázek č. 7) [86]. Dalšími podklady pro vznik anti-ENO1 jsou: mutace, změna místa výskytu, aberantní degradace nebo chybné složení proteinu aj. [85].

Při blokaci ENO1 dochází k aktivaci a zvýšené proliferaci autologních T lymfocytů, NK buněk a jiných složek imunitního systému. Předpokládá se, že blokováním ENO1 dochází k výraznému posílení protinádorové imunity. [33]

Dále se také předpokládá, že přítomnost anti-PD-L1 (Programovaný smrtící ligand 1, z angl. "Programmed Death-ligand 1") nebo ACY241 (citarinostat) aj. protilátek může efektivitu buněčné imunitní odpovědi ještě posílit. [33]

Výzkumný tým Hsiao a spol. (2013) popsali, jak mohou protilátky anti-ENO1 regulovat metastazování pomocí aktivátoru plazminogenu typu urokinázy. Na základě těchto zjištění následně testovali anti-ENO1 specifické mAb pro terapeutické využití. Tyto mAb se akumulovaly v místě nádorové tkáně. Hsiao a spol. (2013) dokládají, že využití mAb specifity anti-ENO1 by mohlo být dobrou terapeutickou strategií pro nádory s prokázanou zvýšenou expresí ENO1. [76]



Obrázek č. 7 - Příčiny vzniku anti-ENO1 protilátek (převzato a upraveno dle [84])

1.4 Přirozené autoprotilátky proti α -enoláze u mnohočetného myelomu

Profilování genové exprese proteinů u pacientů s mnohočetným myelomem odhalilo, že zvýšená exprese ENO1 má pravděpodobně nepřímý vliv na dlouhodobé přežití [33]. Enzymu ENO1 je věnována pozornost kvůli své roli pro udržení metabolismu myelomových buněk. ENO1 podporuje proliferaci nádorových buněk, jejich adhezi a lékovou rezistenci. Porovnání hladin ENO1 u pacientů s MGUS, MM a zdravých jedinců, odhalilo, že u pacientů s MGUS a MM se nacházejí podstatně vyšší hladiny ENO1 [78].

Chauhan a spol. (2009) pomocí techniky oligonukleotidových mikročipů prokázali, že plazmocytoidní dendritické buňky (pDC) interagují s myelomovými buňkami. Tyto pDC následně indukují zvýšenou tvorbu enzymu ENO1 [87]. Bae a spol. (2012) potvrdili, že důležitou roli by mohla hrát i koexprese ENO1 s jinými proteiny. Diskutovali také skutečnost, že ENO1 tvoří pozitivní zpětnou vazbu s cytokiny IL-1 β , TNF- α a PGE2 (prostaglandin E2) a podílí se tak na rozvoji zánětlivé imunitní odpovědi [83].

Výzkumný tým Ray a spol. (2020) na základě předchozích poznatků vyslovil hypotézu, zda je možné pomocí terapeutického zacílení ENO1 dosáhnout zlepšení buněčné imunitní odpovědi proti myelomovým buňkám interagujícím s pDC buňkami. Zajištění anti-ENO1 aktivity na úrovni buněk by mohlo mít pozitivní vliv na prognózu v souvislosti s terapeutickým efektem. [33]

Na základě předchozího bádání Hsiao a spol. (2013) vědecký tým Li a spol. (2018) navrhuje využít monitorování přirozených autoprotilátek se specifitou anti-ENO1 pro časnou diagnostiku onemocnění, u kterých hraje významnou roli aktivátor plazminogenu typu urokinázy, jak bylo dříve potvrzeno u kostních nádorů (osteosarkom, mnohočetný myelom aj.). [88]

Pacienti léčení s MM, kteří měli vyšší zaznamenané hladiny ENO1, vykazovali horší předpoklady pro dlouhodobé přežití. Zvýšená exprese ENO1 může korelovat s dobou přežití. [89]. Výskyt protilátek namířených proti ENO1 je příznivým faktorem, neboť protilátky anti-ENO1 blokují proteiny ENO1 [88].

1.5 Laboratorní metody pro průkaz přirozených autoprotilátek

Laboratorní vyšetření patologických autoprotilátek slouží v praxi především k diagnostice autoimunitních onemocnění. Dle nalézáných autoprotilátek může být odhaleno autoimunitní onemocnění dříve, než se projeví jeho klinické příznaky. U již diagnostikovaných pacientů slouží vyšetření k monitorování jejich odpovědi na léčbu. K jejich stanovení jsou v laboratorní praxi využívány metody: nepřímá imunofluorescence (NIF), enzymová imunoassay ELISA (enzymová metoda detekce antigenu, z angl. „Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay“), radioimunoassay a imunoblotové techniky. Vyšetřovací metoda je volena dle požadavků na vyšetření. [60]

Pro stanovení autoprotilátek v souvislosti s jinými než autoimunitními onemocněními, např. nádorová onemocnění lze využít tytéž metody. V dnešní době je však navzdory mnohým novým poznatkům v praxi využíváno stanovení autoprotilátek pouze v souvislosti s diagnostikou a monitorováním aktivity autoimunitních onemocnění. Vyšetřování autoprotilátek u nádorových aj. onemocnění je prováděno spíše na poli vědeckého výzkumu. Je pravdou, že sběr informací a následná tvorba knihoven, kde jsou zaznamenávány nové poznatky o antigenech a autoprotilátkách u jednotlivých nádorových onemocnění, je stále pro rutinní využití omezená. [90]

Hlavní problematikou vyšetřování autoprotilátek u nádorových onemocnění je vysoká heterogenita jejich výskytu i rozličná specifita, proto nelze spolehlivě odhalit všechny přítomné autoprotilátky a jejich charakter. Vždy se jedná o screeningové vyšetření, které je v případě pozitivního nálezu nutné dodatečné vyšetření. Pro rutinní využití v laboratorní praxi je doporučována kombinace vyšetřovacích metod nepřímé fluorescence a enzymové imunoanalýzy, kterými jsou předchozí výsledky ověřeny. [60]

Vyšetřování autoprotilátek namířených proti nádorovým strukturám se potýká s redundancí souboru informací. U na sobě nezávislých klinických studií se mnohdy objevují závěry ohledně vyšetřování protilátkové specifity týchž autoprotilátek, které jsou však nalézány u rozličných nádorových nebo autoimunitních onemocnění. Posuzování protilátkové specifity může být irelevantní, pokud jsou specifické pro mnoho onemocnění zároveň. Dle Geng a spol. (2020) lze dané autoprotilátky považovat spíše za biomarkery tkáňové hypoxie způsobené nádorem, nežli biomarkery specifické pro konkrétní onemocnění [65]. Fenomén, kdy je mezi odlišnými onemocněními nalézána spojitost kvůli výskytu autoprotilátek stejné specifity, může být zkreslující (vědecké *déjà-vu.*) [91].

1.5.1 Moderní přístupy pro vyšetřování přirozených autoprotilátek u nádorů

V posledních dvaceti letech byly autoprotilátky proti TAA antigenům v mnohých studiích potvrzeny jako užitečné biomarkery pro časnou diagnostiku nádorů. Posouzení diagnostické hodnoty jednotlivých antigenů a proti nim namířených protilátek (anti-TAA) je cílem nejnovějších vědeckých studií. [92]

Časná nádorová diagnostika autoprotilátek u nádorů nachází uplatnění především u nádorových onemocnění s počátečním asymptomatickým nebo atypickým průběhem. U takových nádorů se pacientovi dostává stanovení diagnózy až v pokročilém stadiu onemocnění a pravděpodobnost dlouhodobého přežití je výrazně nižší. Úskalím vyšetřování přirozených autoprotilátek u nádorů je především citlivost stanovení a určení specifity. [93]

Diagnostika protilátek anti-TAA je populární vzhledem k větší spolehlivosti a jednoduchosti než samotné vyšetřování TAA antigenů. Protilátky jsou snadno přístupné ze séra pacienta, jejich titry jsou méně proměnlivé než u antigenů. Výhodou je také to, že se protilátky objevují i několik let před prvními klinickými příznaky a stanovení je neinvazivní [94]. Ve výzkumu převažuje detekce anti-TAA protilátek třídy IgG [95].

V posledních několika letech bylo odhaleno, že je žádoucí zaměřovat se na autoprotilátky proti glykolytickým enzymům, a to právě proto, že nejspíše sehrávají klíčovou roli v udržení či tvorbě hypoxického mikroprostředí nádoru a pravděpodobně přispívají ke zvýšení imunogenicity nádorových buněk. [96]

Identifikace autoprotilátek, jako složek humorální imunitní odpovědi proti nádorovým strukturám je založena na charakterizaci TAA antigenů, proti kterým jsou namířeny [96]. Znalosti ohledně TAA antigenů a anti-TAA protilátek nacházejí uplatnění především u nádorů s paraneoplastickým syndromem. Jedná se o syndrom definovaný klinickými projevy mimo tkáň s primárním nádorovým ložiskem [97].

Úskalím stanovování anti-TAA protilátek je nutnost předchozích vědeckých poznatků, kterých je doposud stále nedostatek, vzhledem k vysokému množství nádorových antigenů, proti kterým jsou protilátky namířeny. Častým problémem je také to, že jen část nalézaných protilátek je vhodnými časnými biomarkery, např. kvůli nestabilnímu výskytu, nízkým titrům, nízké specifitě nebo citlivosti stanovení aj. Bylo potvrzeno, že tyto problémy je možné minimalizovat pomocí sestavení vyšetřovacích panelů, pomocí kterých je vyšetřeno několik protilátek najednou. [98]

Sestavení protilátkových panelů je založeno na výběru protilátek typických pro dané nádorové onemocnění. Jedná se tak o vysoce specifické a přesné vyšetření, kterým lze potvrdit typ i podtyp nádoru a napomáhá stanovit prognostické a terapeutické cíle [98]. Následující tabulka (Tabulka č. 4) poskytuje přehled moderních metod, které budou dále blíže vysvětleny.

Tabulka č. 4 – Přehled moderních metod pro systémovou analýzu TAA rozpoznávaných cirkulujícími protilátkami (upraveno dle [99])

Metoda	Knihovna	Antigenní pool
SEREX	cDNA s využitím fágů	fragmenty proteinů uvolněné během infekce lytickými fágy
Fágový displej	fágový displej, cDNA, RPL	fágy nesoucí antigenní peptidy fúzované s fágovým kapsidovým proteinem
PhIP-Seq	syntetické oligonukleotidy	fágy nesoucí antigenní peptidy fúzované s fágovým kapsidovým proteinem
PLATO	ORFeome, cDNA	komplex mRNA-ribosom-protein získaný in vitro transkripcí/translací
Analýza CIC	<i>neexistuje</i>	imunogenní proteiny v cirkulujících imunokomplexech
AMIDA	<i>neexistuje</i>	proteiny přímo izolované z nádorové tkáně nebo z buněčné nádorové linie
SERPA	<i>neexistuje</i>	proteiny izolované přímo z nádorové tkáně nebo z buněčné nádorové linie
SID-DIGE	<i>neexistuje</i>	proteiny izolované přímo z nádorové tkáně nebo z buněčné nádorové linie
MAPPING	<i>neexistuje</i>	proteiny izolované přímo z nádorové tkáně nebo z buněčné nádorové linie

Moderní metody proteinového profilování umožňují multiplexní robustní analýzy až mnoha tisíců cílových antigenů. Jedním z hlavních omezení některých metod je, že nelze využít nebo vytvořit databáze s knihovnami, které napomáhají k identifikaci cílových molekul. Pro identifikaci molekul jsou proto využívány jiné metody. Další problematikou je, že některé metody neumožňují stanovit posttranslační modifikace aj. změny. Metody pro proteinové profilování jsou proto více komplementární než kompetitivní. Pro získání validních výsledků je vhodné metody kombinovat. [100]

SEREX

SEREX (sérologická analýza nádorových antigenů za využití cDNA knihoven, z angl. „Serological Analysis of Expression cDNA Libraries“) je výkonná metoda pro analýzu proteinových fragmentů ze vzorků nádorové tkáně. Ze vzorku tkáně je izolována cDNA a *in vitro* proběhne klonování do rekombinantních fágů, poté následuje transfekce do kultury *E. coli* [101]. Z kultury izolované rekombinantní proteiny jsou následně přeneseny na membránu (např. nitrocelulóza) a po izolaci s patientským sérem a detekci protilátek jsou cílové antigeny identifikovány pomocí cDNA knihovny. [102]

Mezi hlavní nevýhody SEREX patří pracnost, a také to, že není možné identifikovat posttranslační modifikace proteinů, z toho důvodu se mohou vyskytnout falešně pozitivní výsledky. Naopak výhodou metody SEREX je, že i velmi malé množství vzorku je dostačující a v jedné analýze lze stanovit až tisíce cílových antigenů [101]. SEREX je metoda konkurenční metodě „Phage display“. SEREX je momentálně populárnější pro rychlost analýzy, přesnost, vyšší selektivitu a možnost negativní selekce. [95]

Technika na principu „Phage display“ a metoda ELISA

„Phage display“ je metodou, která slouží k profilování antigenních peptidů rozpoznávaných cirkulujícími protilátkami. Umožňuje *in vitro* selekci proteinů nebo vazebných peptidů z heterogenních směsí. Proteiny je možné rychle izolovat dle jejich afinity, specifity, enzymové aktivity aj. vlastností. Síla „Phage display“ je dána fenotypovou vazbou na genotyp cílového proteinu na fágovém povrchu. Klony cílových proteinů nebo peptidů jsou dle vlastností identifikovány pomocí tzv. fágové knihovny. [103]

Příkladem použití je např. selekce proteinů na základě jejich vazebných vlastností. Cílové molekuly jsou imobilizovány na pevném nosiči (magnetické kuličky nebo povrch destičky s jamkami) a jsou přidány fágy. [103]

Nenavázané molekuly jsou odstraněny a cílové molekuly jsou uvolněny z vazby na nosič. Dalším příkladem využití je např. sledování kombinatorické mutagenese. Fágové knihovny jsou pro tento účel navrženy tak aby mohl protein kolísat mezi svými mutagenními variacemi, které jsou sledovány. Pro vyhodnocení je využíváno metody ELISA (enzymová metoda detekce antigenu, z angl. „Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay“), kterou je detekován fágový titr a dle rozsahu koncentrace fágů je stanovena vazebná reaktivita cílových molekul. [103]

Detekce pomocí ELISA slouží jako potvrzovací metoda, že v patientském séru nachází anti-TAA protilátka proti cílovému antigenu. Avšak vzhledem k polyklonalitě anti-TAA protilátek, je nutné brát úvahu, že se může jednat o soubor autoprotilátek namířených proti danému antigenu. Pro potvrzení, že se jedná o hledanou protilátku specifickou proti vybranému antigenu, je nutné využít další techniky např. PhIP-Seq aj. [104]

PhIP-Seq

PhIP-Seq (sekvenování fágové imunoprecipitace, z angl. „Phage Immunoprecipitation Sequencing“) slouží k charakterizaci sérových protilátek pomocí oligonukleotidem kódovaných peptidomů. Jedná se o multiplexní metodu, která je vhodná pro analýzu specifických anti-TAA protilátek. PhIP-Seq umožňuje určit vazebnou specifitu protilátek. Knihovny pro identifikaci jednotlivých proteinů jsou složeny ze syntetických oligonukleotidů. Pomocí protilátek ze vzorku jsou oligonukleotidy imunoprecipitovány a identifikovány pomocí sekvenování DNA. Výhodou metody je nízká cena a vysoká propustnost. Nevýhodou je, že knihovny neumožňují rozeznat posttranslační modifikace a diskontinuální epitopy [105], pro tyto účely je vhodnější využití proteinových mikročipů [100].

Pomocí knihoven PhIP-Seq lze zobrazit celý imunoproteom a vyšetřit tisíce oligonukleotidů. Oproti klasickému fágovému displeji je zde navíc imunoprecipitační krok, jež nabízí hlubší sekvenování. U protilátek tak lze určit i počet antigenních míst. V rámci jedné analýzy lze vyhodnotit mnoho vzorků sér najednou. [105]

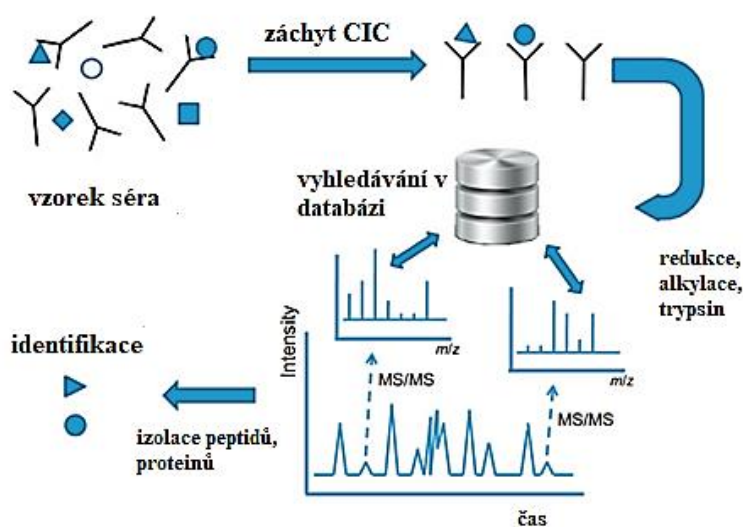
PLATO

PLATO analýza (paralelní analýza přeložených otevřených čtecích rámců, z angl. „Parallel Analysis of Translated Open Reading Frames“) slouží k vyhledávání interakcí mezi proteiny různé délky s imobilizovanými protilátkami. PLATO využívá cDNA knihoven nebo knihovny ORFeome (otevřené čtecí rámce, z angl. „Open Reading Frames“). [106]

Metoda využívá RT-qPCR (kvantitativní PCR s reverzní transkripcí) pro testování specifické vazby s vyšetřovanými proteiny. Principem je tvorba komplexu s antigenním epitopem a následná identifikace cílové molekuly pomocí tzv. zobrazování ribozomů. I u této metody je hlavní nevýhodou, že nelze určit posttranslační modifikace. [106]

Analýza CIC

Analýza CIC, též imunitní komplexomová analýza slouží k identifikaci antigenů v cirkulujícím imunitním komplexu (zkr. CIC). Lze tak odlišit volné a vázané antigeny. CIC jsou přímými produkty imunitní reakce a mohou odrážet konkrétní patofyziologické procesy. Metoda analýzy komplexomů byla navržena tak, aby byly CIC ze séra purifikovány pomocí magnetických kuliček s proteinem G a trypsinem (nebo dle dřívějšího postupu - izolace pomocí 2D-elektroforézy) a profilovány pomocí LC-MS/MS. Detekce CIC byla využita např. pro sledování a pochopení imunitní humorální odpovědi u revmatoidní artritidy. [107]



Obrázek č. 8 - Princip analýzy CIC (převzato a upraveno dle [107])

Na Obrázku č. 8 je znázorněn první krok CIC analýzy – zachycení imunokomplexu pomocí magnetických kuliček, druhým krokem je redukce/štěpení, nakonec jsou cílové molekuly zachyceny a identifikovány např. pomocí nano-LC-MS/MS. [107]

Proteinové mikročipy

Předchůdcem proteinových mikročipů (v angl. „Microarray“) je již zmíněná metoda ELISA, která je stále využívána. ELISA je vhodná pro analýzu menšího počtu vzorků (96 jamková destička). Proteinové mikročipy slouží již mnoho let jako alternativní metoda pro stanovení velkého množství proteinů/peptidů v jedné analýze (až deseti tisíce antigenů). Lze tak stanovit i specifické protilátky nebo rozdílné antigenní epitopy. Proteinové mikročipy a jejich modifikace jsou využívány především k verifikaci výsledků z předchozího screeningového vyšetření jinou metodou. [108]

Proteiny ve směsi jsou imobilizovány na sklíčku mikročipu a jsou aplikovány protilátky. Jejich výhodami jsou: detekce posttranslačních modifikací, miniaturizace, rychlost a snadné vyhodnocení (imunofluorescence). Nevýhodou jsou vyšší náklady. [100]

Existuje mnoho modifikací, mikročipy mohou být proteinové nebo peptidové s různou hustotou pole [109]. Tuto techniku lze upravit dle aktuálních potřeb a nároků, k tomu se pojí také vyšší náklady. Mikročipy mohou využívat nativní proteiny, rekombinantní proteiny, glykany aj. [108].

Pro profilování autoprotiáték je populární modifikace proteinových mikročipů zvaná HuProtTM (mikročipy s vysokou hustotou pole, z angl. “The Human Proteome Microarray“) Metoda HuProtTM může zajistit potvrzení až 20 tisíc odlišných cílových molekul. Nevýhodou je vyšší cena a nutnost předchozích screeningových vyšetření. [109]

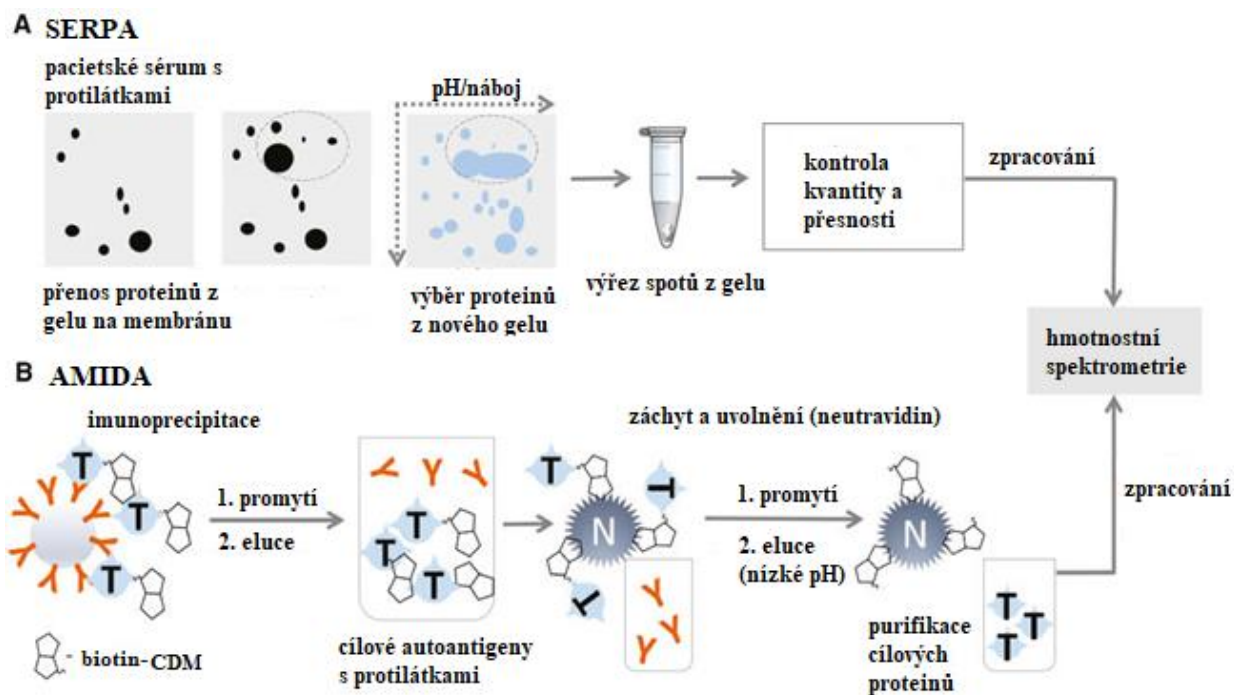
AMIDA

AMIDA (autoprotiátkami zprostředkovaná identifikace antigenů, z angl. „Autoantibody-Mediated IDentification of Antigens“) je metoda založená na identifikaci cílových molekul za pomoci imunoprecipitace specifických antigenů s protilátkami z patientského séra. Po imunoprecipitačním kroku následuje 2D elektroforéza a identifikace proteinů zájmu pomocí technik hmotnostní spektrometrie v kombinaci s kapalinovou chromatografií (LC-MS/MS). Mezi hlavní nevýhody patří nutnost komplexace protilátek s antigeny pro imunoprecipitaci i jejich následná společná eluce. Hrozí, že imunokomplex nebude stabilní nebo že během eluce dojde k zástině cílových molekul. AMIDA je přesto považována za jednu z nejspolehlivějších imunoproteomických metod, a to především proto, že eliminuje chyby, které u metody SERPA vznikají při přípravě gelu, přenosu proteinů z gelu na membránu aj. (viz Obrázek č. 9). [110]

SERPA

SERPA (sérologická analýza proteomu, z angl. „Serologic Proteome Analysis“) neboli PROTEOMEX či SPEAR (sérologické a proteomické hodnocení protilátkových odpovědí, z angl. „Serological and Proteomic Evaluation of Antibody Responses“) je metoda, která kombinuje 2D elektroforézu proteomu s imunodetekcí cílových proteinů. Identifikace imunoreaktivních nálezů je provedena pomocí technik hmotnostní spektrometrie (LC-MS/MS) [111]. SERPA poskytuje údaje i o posttranslačních modifikacích, lineárních epitopech a rozlišení izoform [112].

Výhodou oproti SEREX je také komplexní citlivost a vyšší rozlišovací schopnosti. Při analýze lze stanovit až stovky cílových struktur. Omezení SERPA spočívá v nižší reprodukovatelnosti výsledků (transfer z gelu na membránu, lokalizace vybraných spotů) a v nedostatečné identifikaci antigenních epitopů [112]. V posledních deseti letech většina výzkumů využila pro hodnocení autoprotilátkové specifity u nádorových onemocnění právě metodu SERPA nebo její modifikace [113].



Obrázek č. 9 - Porovnání metod SERPA a AMIDA (převzato a upraveno dle [112])

MAPPING

MAPPING (z angl. „Multiple Affinity Protein Profiling“) je metoda sloužící pro profilování víceafinitních proteinů pomocí chromatografie a hmotnostní spektrometrie. MAPPING je alternativní metodou k metodě SERPA. Principem je záchyt antigenů, proti kterým jsou namířeny protilátky ze vzorku séra. Purifikované protilátky jsou využívány pro přípravu nosičů pro imunoafinitní chromatografii. Získané eluáty jsou štěpeny trypsinem, frakciovány a analyzovány pomocí MS. [114]

DISER a SID-DIGE

Tým Pavoni a spol. (2004) navrhl modifikaci metod pro přesnější odhalování specifity autoprotilátek proti autoantigenům u nádorů. Nová metoda měla název DISER a jednalo se o kombinaci metod 2D DIGE (2D diferenciální gelová elektroforéza) a SERPA. DISER oproti metodě SERPA umožňuje nahradit klasickou 2D elektroforézu diferenciální 2D elektroforézou. V rámci jedné analýzy lze stanovovat kontrolní i vyšetřovanou proteinovou frakci a získávat validnější výsledky. [102]

O několik let později s podobným nápadem přišel vědecký tým Grandjean a spol. (2013), kteří navrhli metodu kombinující sekvenční imunoafinitní depleci a diferenciální gelovou elektroforézu (DIGE), metodu proto pojmenovali SID-DIGE (sekvenční imunoafinitní deplečně-diferenční gelová elektroforéza, z angl. „Sequential Immunoaffinity Depletion-Differential in Gel Electrophoresis“). SID-DIGE je založena na tvorbě imunokomplexů TAA a anti-TAA za přirozených podmínek. Principem je imunodeplece buněčných lyzátů a imunoafinitní separace, jež zaručí obohacení a purifikaci vzorku. Pomocí SID-DIGE lze stanovit na rozdíl od SERPA i imunogenní proteiny, konformační změny antigenních determinant (včetně posttranslačních modifikací). Tato metoda je vysoce účinná pro screening sér pacientů s nádory pro vyšetření anti-TAA protilátek a jejich identifikaci s možností využití hmotnostní spektrometrie (MS/MS). Hlavní výhodou SID-DIGE je především automatizace techniky 2D DIGE a odstranění kontaminujících protilátek, čímž je eliminováno mnoho chyb oproti klasické 2D elektroforéze, proto má SID-DIGE vysoký potenciál nahradit metodu SERPA aj. [96]

2 Cíle práce

Cílem práce bylo zavést laboratorní metodiku pro vyšetřování a průkaz specifických přirozených protilátek třídy IgG v séru pacientů s mnohočetným myelomem s bližším zaměřením na výskyt protilátek se specifitou anti-ENO1. Pro analýzu imunoproteomu byla zvolena imunoproteomická metoda zvaná SERPA (sérologická imunoproteomová analýza).

Dílčí cíle práce byly stanoveny následovně: příprava buněčného lyzátu z modelové nádorové linie a optimalizace 2D elektroforézy pro získání proteinové mapy, optimalizace ředění vzorků kontrolních a patientských sér, optimalizace semi-dry western blotu s následnou imunodetekcí, vyhodnocení výsledků pomocí zobrazovacího systému G:BOX Chemi XX6 s využitím software GeneSys a GeneTools, hodnocení získaných výsledků ve spojitosti s výskytem imunoreaktivních proteinových spotů (skvrn) a dobou odběru vzorku séra, zhodnocení výsledků identifikace proteinů z vybraných imunoreaktivních spotů pomocí metod hmotnostní spektrometrie (LC-MS) a zavedení postupů pro údržbu promývací stanice FlexiWash FW400.

3 Experimentální část

3.1 Laboratorní vybavení (pomůcky a přístroje)

- 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 nitrocelulózová membrána (NC) Trans-Blot® Transfer Medium, porozita 0,2 µm (Bio-Rad, Hercules, CA, USA),
- zobrazovací systém ChemiDoc™ XRS+ (CCD kamera s ImageLab softwarem), (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)
- zobrazovací systém G:BOX Chemi XX6 (CCD kamera s GeneSys a GeneTools softwary) (Syngene, USA),
- gelové proužky s imobilizovaným gradientem (stripy) 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 a plastové fólie (Eta, Praha, ČR),
- špičky eppendorf GELoader (Eppendorf, Hamburg, Německo),
- laboratorní třepačky:
 - multifunkční Orbital Shaker PSU-20i (BioSan SIA, Riga, Lotyšsko),
 - Vortex mixer – Wx (VELP Scientifica, Usmate, Italy),
 - Mini-rotátor Bio RS-24 (BioSan SIA, Riga, Lotyšsko),
- ultrasonikátor UP200H (Hielsches, Teltow, Německo),
- zařízení pro izoelektrickou fokusaci 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),
- destilační zařízení pro úpravu čistoty vody (zásobník s redestilovanou vodou) Halios 40 Type 1 (Neptec, Elbtal, Německo),
- centrifugační zařízení MiniSpin Plus (Merck, Eppendorf, Darmstadt, Německo),
- skla s výřezem Mini-PROTEAN® Spacer Plates with 1.0 mm Integrated Spacers (Bio-rad, Praha 4, Česká republika),
- krycí skla Mini-PROTEAN® Short Plates (Bio-rad, Praha 4, Česká republika).

3.2 Seznam chemikálií a reagensů

- 3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonat – CHAPS (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA),
- 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),
- citronan sodný (Penta, Chrudim, ČR),
- čistící roztok Coulter CLENZ Cleaning Agent (Beckman Coulter, SA, Švédsko)
- destilovaná voda, redestilovaná voda,
- DeStreak Reagent – hydroxyethyl disulfid (GE Healthcare, Uppsala, Švédsko),
- dihydrogenfosforečnan draselný (Lach:ner, Neratovice, ČR),
- dithiothreitol – DTT (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA),
- dodecylsulfát sodný - SDS (Lachema, Neratovice, ČR),
- dusičnan stříbrný (Penta, Chrudim, ČR),
- ethanol (Lachema, Neratovice, ČR),
- fenylmethylsulfonyl fluorid - PMSF (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA),
- formaldehyd 36 - 38% vodný roztok (Penta, Chrudim, ČR),
- glycerol (Penta, Chrudim, ČR),
- glycin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA),
- hexakvanoželezitan tridraselný (Penta, Chrudim ČR),
- hydrogenfosforečnan disodný dodekahydrát (Penta, Chrudim, ČR),
- hydroxid sodný (Penta, Chrudim, ČR),
- chlorid draselný (Penta, Chrudim, ČR),
- chlorid sodný (Lach:ner, Neratovice, ČR),
- jodacetamid – IAA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA),
- anti-human IgG A8667 (konjugát s HRP, původ – koží) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA),
- kyselina citronová bezvodá (Fluka, Buchs, Švýcarsko),
- kyselina octová 99% (Lach:ner, Neratovice, ČR),
- methanol (Lach:ner, Neratovice, ČR),
- minerální olej (Bio-Rad, Hercules, CA, USA),
- močovina (Lach:ner, Neratovice, ČR),
- N,N'-methylen-bis-akrylamid (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA),
- odtučněné sušené mléko (Aditiva CZ, Praha, ČR),
- persíran amonný - APS (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 Clarity Western ECL (Enhanced Chemiluminescence), (luminol, peroxid vodíku), (Bio-Rad, Hercules, CA, USA),
- N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin – TEMED (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA),
- thiomčovina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA),
- thiosulfát sodný (Sigma, St. Luis, MO, USA),
- Tris(hydroxymethyl)aminomethan – TRIS (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA),
- Tween 20 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

3.3 Modelová buněčná linie a vzorky sér

Buněčná linie RPMI 8226

Jako zdroj proteinů pro 2D proteinovou mapu byla využita lidská myelomová buněčná linie s názvem RPMI 8226 (ACC 402, Leibnitz Institute, DSMT – „German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH“). Jedná se o suspenzní buněčnou linii, která vychází z B lymfocytů z periferní krve od muže (61 let), který byl diagnostikován s plasmocytomem (odběr vzorku v roce 1966). Odebraný vzorek periferní krve byl bohatý na lymfoblasty a je uchováván v médiu RPMI 1640 (z angl. „Roswell Park Memorial Institute“), které podporuje růst lymfoidních buněk. Tato buněčná linie je vhodná pro výzkum poruch imunitního systému lymfocytárního původu.

Vzorky patientských sér

Pro účely analýzy byly vyšetřeny vzorky sér od pěti pacientů s diagnostikovaným mnohočetným myelomem. Celkem se jednalo o 32 vzorků sér. První odběr byl proveden v době stanovení diagnózy, další odběry následovaly vždy po třech měsících, až do doby, než pacient dosáhl remise. U některých pacientů nedošlo k dosažení remise, informace o jejich další léčbě nebo stavu nejsou nadále známy. Vzorky pacientů s MM poskytla biobanka Interní hematologické a onkologické klinika FN Brno (doc. MUDr. Luděk Pour, Ph.D., doc. RNDr. Sabina Ševčíková, Ph.D.). Pacienti s MM podepsali informovaný souhlas a byli poučeni o výkonu a účelu odběru. Odběr vzorků byl schválen etickou komisí Fakultní nemocnice v Brně.

Pro účely získání normálních vzorků sér, byli osloveni dobrovolní dárce. Dobrovolní dárce podepsali informovaný souhlas, že v době odběru séra netrpěli žádným nádorovým ani autoimunitním onemocněním. Jejich séra posloužila jako negativní kontrola.

Pro kontrolní testy byl jako zlatý standard využit vzorek séra od pacientky s MM, který poskytla Klinika hematologie a transfúziologie LF UK a UN Bratislava (MUDr. Ján Lakota Csc.). Vzorek byl vybrán pro vykazování velmi silné a specifické imunoreaktivity oproti ostatním vyšetřovaným vzorkům.

3.4 Sérologická analýza proteomu (SERPA)

A) Příprava buněčného lyzátu

Reagencie a přístrojová technika:

- lyzační roztok: 7M močovina, 2 M thiomočovina, 4% CHAPS, 1% DTT, 0,2% Pharmalyte (3-10), 1 mM PMSF,
- ultrasonikátor UP200H, odstředivka MiniSpin Plus.

Biologický materiál:

- suchá peleta buněk RPMI 8226 (5×10^6), -80°C , v kryozkumavce)

Postup:

Lyzační roztok byl připraven čerstvý nebo lze vytvořit alikvoty (7M močovina, 2M thiomočovina, 4% CHAPS, které se budou uchovávat zmrazené při -20°C), těsně před přípravou buněčného lyzátu byly k rozmrazené směsi přidány roztoky 1% DTT, 0,2% Pharmalyte (3-10), 1 mM PMSF. K suché peletě RPMI 8226 (5×10^6 buněk) bylo napipetováno 400 μl lyzačního roztoku. Buňky s lyzačním roztokem byly pečlivě promíchány a přeneseny do nové 1,5 ml zkumavky. V této zkumavce byla provedena sonikace, pro uvolnění proteinů s buněk (podmínky sonikace: 20 sekund, amplituda 80 %, cyklus 1). Po rozrušení buněk byl vzorek centrifugován po dobu 10 min při 12 300 rpm. Poté byl odebrán supernatant do nové mikrozkušavky. Získaný buněčný lyzát lze použít ihned pro navazující rehydrataci s gelovými stripy nebo jej lze jednorázově zamrazit (-80°C).

B) Rehydratace gelových stripů s buněčným lyzátem

Reagencie, pomůcky a přístrojová technika:

- rehydratační roztok: 6 M močovina, 2 M thiomočovina, 4% CHAPS, 40 mM Tris, 1,2% DeStreak, 10 μ l zásobního roztoku 1% bromfenolové modře,
- gelové stripy (proužky), Immobiline DryStrip 3-10 NL, 7 cm, -20°C,
- pinzeta, kazetka se žlábký na umístění stripů (šířka 7 cm), minerální olej,
- zařízení PROTEAN® IEF Cell.

Postup:

Rehydratační roztok byl připraven čerstvý (nebo lze vytvořit alikvoty uchovávané při -20°C). Dle následující tabulky (Tabulka č. 5) byl připraven směsný roztok pro počet stripů určený k rehydrataci s buněčným lyzátem.

Tabulka č. 5 - Příprava směsného roztoku

Směsný roztok	na 1 strip (120 μl)	na 5 stripů (600 μl)
Rehydratační roztok	80 μ l	343 μ l
Buněčný lyzát	60 μ l	257 μ l
Pharmalyte 3-10	1,3 μ l	5,6 μ l
Pharmalyte 8–10,5	0,65 μ l	2,8 μ l

Směsný roztok byl předpipetován do žlábků kazetky pro umístění gelových stripů. Do každé jamky bylo pipetováno 115 μ l směsného roztoku. Připravené (rozmrazené) stripy byly za pomoci pinzety zbaveny ochranné fólie a pokládány gelovou stranou dolů na směsný roztok ve žlábkách. Po ujištění, že se pod stripy nenachází vzduchové bublinky, došlo k převrstvení 1 ml minerálního oleje. Kazetka byla umístěna do zařízení PROTEAN® IEF Cell, na kterém byly nastaveny podmínky:

Rehydration → *Passive (20°C)* → *START*.

Rehydratace probíhala (dle návodu výrobce stripů) přes noc, po dobu 16-18 hodin. (Zvolený program „*Passive*“ znamená, že rehydratace probíhá za 0 μ A.)

C) Izoelektrická fokusace (IEF)

Reagencie, pomůcky a přístrojová technika:

- gelové stripy po rehydrataci s biologickým vzorkem,
- pinzeta, kazetka pro IEF (šířka 7 cm), minerální olej,
- filtrační papírky (Protean IEF systém – Electrode Wicks),
- zařízení PROTEAN® IEF Cell.

Postup:

Do kazetky pro IEF (se žlábků na stripy) byly nejprve umístěny filtrační papírky (navlhčené v destilované vodě) na drátky vedoucí k elektrodám. Rehydratované gelové stripy byly opláchnuty destilovanou vodou, osušeny pomocí filtračního papíru a přemístěny do kazetky gelovou stranou dolů na navlhčené filtrační papírky (filtrační papírky zprostředkovávají lepší kontakt gelové strany stripů s procházejícím napětím na elektrodách). Gelové stripy musí být umístěny tak, aby se kladný konec stripů nacházel ve správné pólové orientaci vzhledem k elektrodám (kladný konec k anodě). Stripy byly převrstveny 1 ml minerálním olejem. Bylo zkontrolováno, že se pod stripy nenachází vzduchové bublinky, stripy přiléhají na filtrační papírky a je správně přiloženo víko kazetky. Kazetka se stripy byla umístěna do přístroje PROTEAN® IEF Cell a byl spuštěn program s přednastavenými kroky pro izoelektrickou fokusaci. Jednotlivé kroky jsou znázorněny v Tabulce č. 6.

Tabulka č. 6 - Podmínky IEF nastavené v softwaru PROTEAN® IEF Cell

Nastavení programu IEF	Celkové napětí [V]	Doba trvání
Krok č. 1	150	2 h
Krok č. 2	300	1 h
Krok č. 3	900	1 h
Krok č. 4	2100	1h 20 min
Krok č. 5	3500	1 h
Krok č. 6	3500	1 h
Krok č. 7	3500	4 500 Vh

Před spuštěním programu byl na přístroji nastaven počet stripů (gelů) a velikost procházejícího proudu na 75 μ A/gel. Doba fokusace proteinů se odvíjí od typu vzorku, jeho kontaminant (např. vysoký obsah solí) a laboratorních podmínek. Izoelektrická fokusace trvala zpravidla 7,5 až 8 hodin. Proces fokusace byl ukončen při dosažení směrodatné hodnoty 9 000 – 10 000 Vh. Indikátorem správně fokusovaných proteinů (dle pI) byla i změna zbarvení barviva z modré na žlutou (bromfenolová modř). Po ukončené fokusaci byly gelové stripy opláchnuty destilovanou vodou, osušeny filtračním papírem a uchovány zamrazením při – 20 °C (pro delší uchování při - 80°C).

D) Dvourozměrná elektroforetická separace

Reagencie, pomůcky a přístrojová technika:

- roztoky pro přípravu gelů: 30% akrylamid, bisakrylamid; Tris pH 8; Tris pH 6,6; 10% SDS; 10% APS; TEMED,
- ekvilibrační pufr: 6M močovina, 30% glycerol, 0,07M SDS, 1,5M Tris pH 8,8,
- 1% DTT (s ekvilibračním pufrem), 4% IAA (s ekvilibračním pufrem),
- 0,5% agaróza,
- standard molekulových hmotností Precision Plus Protein Dual Color,
- elektrodový pufr: 0,025 M Tris, 0,192M glycin s 0,1% SDS, pH 8,3-8,6,
- 1 mm hřebínek, aparatura pro přípravu gelů a elektroforézu, pinzeta, nůžky,

Postup:

Dle návodu v Tabulce č. 7 byly připraveny 12% dělicí gely o tloušťce 1 mm, které byly převrstveny butanolem. Po polymerizaci byl butanol odstraněn filtračním papírem, nanesen zaostřovací gel a vložen hřebínek pro 2D elektroforézu. Mezitím byly rozmrazeny gelové stripy po IEF a připraven ekvilibrační roztok. Gelové stripy byly nejprve inkubovány s 1% roztokem DTT po dobu 15 minut, poté opláchnuty destilovanou vodou a osušeny filtračními papíry a inkubovány ve 4% roztoku IAA po dobu 15 minut ve tmě (poté opláchnuty destilovanou vodou, osušeny filtračními papíry). Gelové stripy byly poté umístěny do elektrodového pufru. Pomocí nůžek a pinzety byly konce stripu zastříhány a stripy přikládány mezi skla gelu připraveného v elektroforetické vaně.

Tabulka č. 7 - Příprava gelů

	12% Dělicí gel 4x [ml]	Zaostřovací gel 4x [ml]	12% Dělicí gel 2x [ml]	Zaostřovací gel 2x [ml]
Destilovaná voda	6,72	4,2	3,36	2,1
A – 30% AA a bisAA	8	1	4	0,5
B – 1,5 M Tris, pH 8,8	5	X	2,5	X
C – 1 M Tris, pH 6,8	X	0,75	X	0,375
D – 10% SDS	0,2	0,06	0,1	0,03
E – 10% APS	0,2	0,06	0,1	0,03
TEMED	0,008	0,006	0,004	0,003

Gelové stripy byly umístěny tak, aby se kladný konec nacházel u jamky pro standard molekulových hmotností a gelová strana stripu směřovala ke kratšímu sklu. Po umístění na gely byly stripy převrstveny vytemperovanou 0,5% agarózou a pomocí kopista byly vytlačeny bublinky pod stripy. Po dvou minutách (ztuhnutí agarózy) byl dolit do elektroforetické vany elektrodotový pufr a do jamky pro marker napipetovány 4 μ l standardu molekulových hmotností (Precision Plus Protein Dual Color). Elektroforetická aparatura byla připojena ke zdroji a nastaveno 60 V a 0,03 A/gel. Po pěti minutách (sestoupení vzorku z gelových stripů na gely mezi skly) bylo napětí přenastaveno na hodnoty: 180 V a 0,03 A/gel. Elektroforéza probíhala přibližně jednu hodinu (dle laboratorních podmínek) a byla ukončena, když barvivo téměř opustilo gel.

E) Semi-dry western blot

Reagencie, pomůcky a přístrojová technika:

- PBS-T pufr pH 7,4: 137 mM NaCl, 2,7mM KCl, 1,47 mM KH₂PO₄, 8,1 mM Na₂HPO₄.12H₂O, 25% Tween 20,
- transferový pufr (Towbin): 25 mM Tris, 192 mM glycin, 20% methanol,
- tlusté filtrační papíry, váleček, pinzety, nitrocelulósová (NC) membrána,
- aparatura pro blotovací přenos Trans-Blot® SD Semi-Dry.

Postup:

Nitrocelulóзовá membrána byla aktivována ponořením do transferového pufru (inkubace 10 minut). Gely po elektroforéze vyjmuté ze skel (po odřezu stripů) a tlusté filtrační papíry byly taktéž inkubovány v transferovém pufru. Na spodní elektrodu přístroje pro semi-dry western blot byl nanesen tlustý filtrační papír a uválen válečkem. Pomocí pinzety byla na filtrační papír umístěna NC membrána a na ní umístěn gel a převrstveno dalším tlustým filtračním papírem a opět uhlazeno válečkem. Po připojení do zdroje bylo nastaveno: 12 V a 0,3A/gel, 70 minut. Nakonec byly membrány i gely promyty 3 x 5 minut destilovanou vodou (příprava pro jejich kontrolní barvení).

F) Vizualizace proteinů na gelu (po Western blotu)***Reagencie:***

- fixační roztok: 5% kyselina octová, 50% ethanol,
- 10% glutaraldehyd,
- roztok amoniakálního stříbra: 20% roztok dusičnanu stříbrného, 26% amoniak, 9M hydroxid sodný, destilovaná voda,
- vyvolávací roztok: 0,05% kyselina citronová, 0,05% formaldehyd,
- ustalovací roztok: 5% kyselina octová.

Postup:

Gel (po elektroforetické separaci) byl inkubován přes noc (nebo minimálně 30 minut ve fixačním roztoku). Poté byl gel po dobu 30 minut rehydratován v destilované vodě. Následovalo 30 minut inkubace v roztoku s 10% glutaraldehydem a poté promývání 6 x 10 minut destilovanou vodou. Dále byl připraven roztok amoniakálního stříbra pomocí titrování dusičnanu stříbrného s roztoky amoniaku a hydroxidu sodného. Při změně zbarvení z bezbarvého na lehce hnědý zákal byla titrace ukončena a barvicí roztok přidán ke gelu. Po 15 minutách barvení byl gel promyt destilovanou vodou. Proteiny byly vizualizovány pomocí inkubace ve vyvolávacím a poté v ustalovacím roztoku. Gel byl následně vyfocen ve stanici G:BOX pomocí programu GeneSys. Vizualizace proteinů na gelu po přenosu proteinů na NC membránu je kontrolním krokem, kterým bylo ověřováno, zda došlo ke kvantitativnímu přenosu proteinů na membránu a transfer proběhl úspěšně, (tzn. na gelu by mělo být naprosté minimum proteinů).

G) Vizualizace proteinů na membráně

Reagencie:

- barvicí roztok: 0,2% AgNO₃, 0,8% FeSO₄, 2% citrát sodný,
- odbarvovací roztok: 50 mM thiosulfát sodný, 15 mM hexakvanoželezitan draselný.

Postup:

NC membrány po Western blotu byly inkubovány s barvicím roztokem po dobu 6 minut (nebo déle, dokud se slabě neprojeví viditelné spoty značící jednotlivé proteiny). Membrány byly následně několikrát rychle promyty destilovanou vodou, dokud nedošlo k vymytí veškerého barvicího roztoku. Membrána s proteinovou mapou byla vyfocena pomocí G:BOX stanice v programu GeneSys. Poté byly membrány inkubovány s odbarvovacím roztokem (přibližně po dobu 3 minut) do odbarvení s následným několikanásobným promytím destilovanou vodou až do kompletního promytí od odbarvovacího roztoku. Posléze je možné zvolit ze dvou možností, v případě přerušení práce lze membrány vysušit a uchovat v plastové folii bez přístupu vzduchu a vlhka v lednici po dobu několika týdnů (před použitím je nutné je rehydratovat v pufru po dobu alespoň 30 minut). Nebo lze ihned navázat dalším krokem, a to detekcí imunoreaktivních skvrn po inkubaci s protilátkami ze séra.

H) Imunodetekce reaktivních proteinových spotů

Reagencie, pomůcky a přístroje:

- blokovací roztok: 5% odtučněné sušené mléko (v PBS-T),
- primární protilátka: patientské sérum (ředění 1:500 s blokovacím roztokem),
- konjugát: anti-human IgG (ředění 1:5000 s blokovacím roztokem),
- chemiluminiscenční substrát: Clarity Western ECL (peroxid vodíku a luminol v poměru 1:1)
- promývací stanice FlexiWash FW400,
- roztoky pro promývací stanici Flexi Wash FW400: redestilovaná voda, 20% ethanol, 8% peroxid vodíku, čisticí roztok Coulter CLENZ Cleaning Agent, PBS-T pufr
- pinzeta, svářečka fólií, plastové folie, rotátor.

Postup:

V rámci zavádění protokolu SERPA byly optimalizovány dva postupy, první postup je manuální (Postup 1), druhý postup je automatizovaný (Postup 2). Oba postupy nabízejí výhody i nevýhody a jsou vzájemně komplementární.

Postup 1 – manuální:

NC membrány byly nejprve promyty v PBS-T pufru (3 x 5 minut), pak byly inkubovány po dobu 1 hodiny v blokovacím roztoku. Následovalo promytí v PBS-T pufru (2 x 10 minut). Současně byly připraveny vzorky patientských sér, jež byly připraveny ředěním v poměru 1:500 s blokovacím roztokem. Stejným způsobem byl připraven i roztok konjugátu 1:5000 (kozí anti-human IgG). Po promytí v PBS-T byly membrány umístěny do fólií a svařovány jejich strany. Před svařením poslední strany byly k membráně napipetovány 2 ml naředěného vzorku séra. Membrány ve fólii byly inkubovány s primární protilátkou po celou noc v lednici (4° C, na rotátoru). Druhý den byly membrány promyty 4 x 5 minut v PBS-T pufru a inkubovány s roztokem sekundární protilátky (konjugát) po dobu 1 hodiny. Posledním krokem bylo opětovné promytí 6 x 5 minut v PBS-T pufru a následovala chemiluminiscenční detekce.

Postup 2 - automatizovaný:

NC membrány byly promyty v PBS-T pufru (3 x 5 minut). Promývací stanici FlexiWash bylo před použitím nutné promýt pomocí programu „Clean“, a to 2 x redestilovanou vodou a 1 x PBS-T pufrem. Všechny reagenty byly připraveny vedle promývací stanice (blokovací roztok, roztok s primární protilátkou, roztok se sekundární protilátkou a PBS-T pufr). NC membrány byly umístěny do jednotlivých pozic a příslušné hadičky (kanály) byly dle Tabulky č. 8 umístěny do příslušných roztoků. V softwaru přístroje byly vybrány příslušné pozice umístění pro membrány (tzv. „Tray“), které budou využívány k analýze. Nastavení:

Program (kontrola nebo úprava jednotlivých kroků) → Load (výběr přednastaveného protokolu) → Confirm → Ok (nahore v liště přepnout na další „Tray“ → Main → dané „Tray“ pro analýzu hlásí „Ready“ → Start

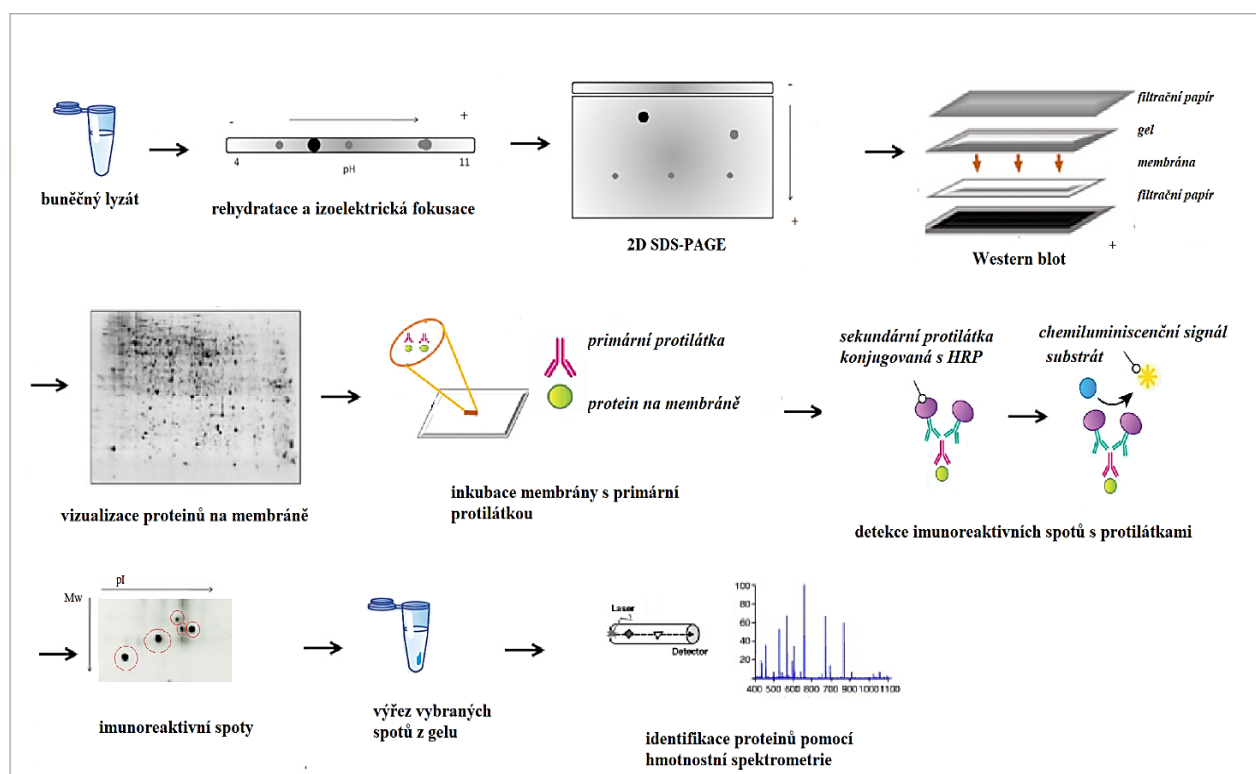
Inkubace s primární protilátkou probíhala 8 hodin za laboratorní teploty (25°C), inkubace s konjugátem probíhala 1h (ideálně přes noc). Druhý den byla zahájena chemiluminiscenční detekce. Promývací stanici FlexiWash bylo nutné vždy po použití promýt od všech použitých roztoků.

Tabulka č. 8 - Nastavení programu promývání (FlexiWash)

	Objem pro jednotlivé kanály [ml]	Čas inkubace [min]	Počet opakování
A (blokovací roztok)	10	60	1x
A (blokovací roztok)	1	1	1x
B (roztok s primární protilátkou)	10	480	1x
W (promývací pufr)	10	5	4x
C (roztok se sekundární protilátkou)	10	60	1x
W (promývací pufr)	10	50	9x

Pro chemiluminiscenční detekci byl připraven roztok ECL substrátu. Na NC membránu v nové Petriho misce byly napipetovány 2 ml substrátu (v laboratoři bylo udržováno přitímí), po 30 sekundové inkubaci se substrátem byla membrána přenesena do stanice G:BOX s CCD kamerou a spuštěn program pro chemiluminiscenční detekci. Posléze následovalo vlastní vyhodnocení získaných snímků v programech GeneSys a GeneTools.

Následující obrázek (Obrázek č. 10) poskytuje schéma celého průběhu metody SERPA. *br*



Obrázek č. 10 – Schématické znázornění analýzy SERPA (upraveno dle [115], [116], [117])

4 Výsledky a diskuze

Byla zavedena sérologická imunoproteomická analýza (SERPA) pro imundetekci protilátek v sérech pacientů s mnohočetným myelomem. Pro dosahování optimálních výsledků bylo nutné upravovat postupy pro analýzu imunoproteomu. Nejprve byl připraven buněčný lyzát z modelové nádorové linie pro mnohočetný myelom zvané RPMI 8226. Podmínky byly upraveny tak, aby bylo možné získat proteinovou mapu s jednotlivými separovanými proteiny. Byla zavedena metoda dvourozměrné elektroforetické separace proteinů z buněčného lyzátu, která zahrnovala úpravu podmínek pro izoelektrickou fokusaci gelových stripů s buněčným lyzátem a SDS-PAGE elektroforézu.

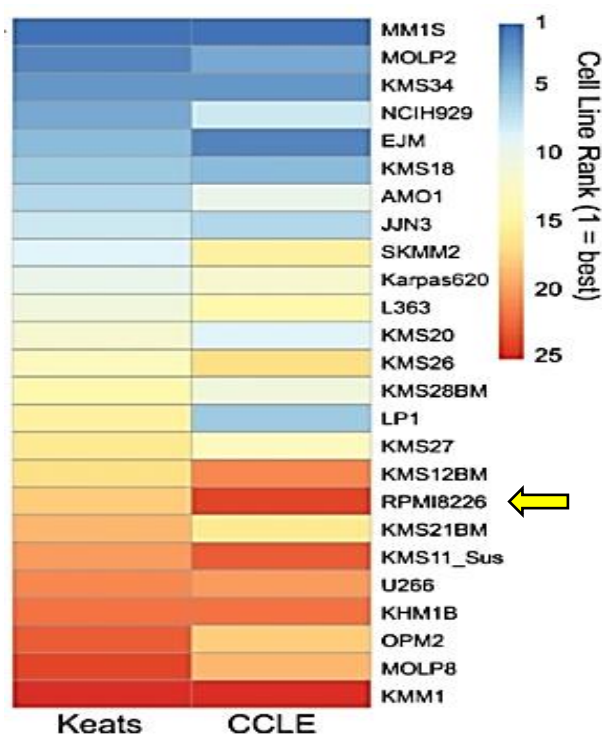
Posléze byla zavedena navazující metoda semi-dry western blot pro přenos proteinů z gelů na nitrocelulózovou membránu s následnou inkubací membrány s patientským sérem (primární protilátkou) a konjugátem s křenovou peroxidázou (sekundární protilátkou). Pro inkubaci membrány s protilátkami byly zavedeny dva postupy. U jednoho z postupů byla využívána promývací stanice FlexiWash FW400, proto bylo nutné zavést i postupy pro její údržbu. Poté proběhla imundetekce imunokomplexu vzniklého na principu reakce s chemiluminiscenčním substrátem. Výsledky byly vyhodnocovány pomocí zobrazovacího systému G:BOX Chemi XX6 s využitím software GeneSys a GeneTools. Byl optimalizován způsob hodnocení získaných výsledků ve spojitosti s výskytem imunoreaktivních proteinových spotů (skvrn) a dobou odběru vzorku séra. Proteiny z vybraných imunoreaktivních spotů byly identifikovány pomocí metod hmotnostní spektrometrie (LC-MS).

Pomocí zavedené sérologické imunoproteomické analýzy bylo vyšetřeno 32 vzorků sér od pěti pacientů s MM v remisi. Vzorky sér byly odebírány pacientům v tříměsíčních intervalech v době od stanovení diagnózy, v průběhu léčby i v období remise. Nalézané imunoreaktivní spoty byly tvořeny cílovými strukturami (antigeny), proti kterým byly namířeny (auto)protilátky (třídy IgG) z patientského séra. Pro validaci výsledků byl využíván tzv. „zlatý standard“, lidské sérum s prokázaným výskytem vysokého titru specifických anti-ENO1 IgG a séra zdravých dárců ve věkovém rozmezí kopírujícím věk sledovaných pacientů.

4.1 Příprava buněčného lyzátu

Pomocí zavedených postupů (viz podkapitola 3.4 A)) byl připraven buněčný lyzáát z buněčné linie RPMI 8226, která byla záměrně vybrána pro přímý vztah proteinů linie s proteiny vyskytujícími se v proteomu mnohočetného myelomu. Pro přípravu buněčného lyzátu byla zvolena koncentrace $5 \cdot 10^6$ buněk. Suchá peletka buněk o této koncentraci byla promítna s lyzačním roztokem, poté následovala sonikace za účelem rozrušení buněk a centrifugace pro získání supernatantu s proteiny uvolněnými u buněk. Supernatant byl dále nazýván jako buněčný lyzáát.

Vhodnost buněčné linie byla potvrzena výzkumem Sarin a spol. (2020) na základě vyšetřování RNA profilu pomocí transkriptomové korelační analýzy využívající RNA-sekvenční databáze Keats a CCLE, viz Obrázek č. 11. [118]



Obrázek č. 11 - Hodnocení účinnosti buněčných linií jako modelů pro výzkum mnohočetného myelomu (převzato [116])

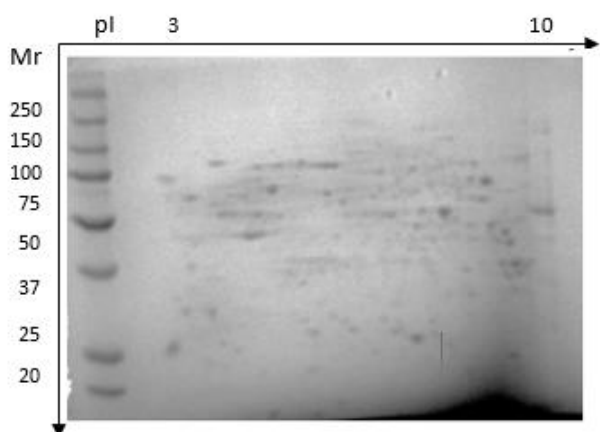
Nevýhodou využívání buněčné linie RPMI 8226 je skutečnost, že tato buněčná linie nemá standardizovanou proteinovou mapu jako některé jiné buněčné linie. Budoucí zmapování jednotlivých proteinů by mohlo identifikaci nalézaných reaktivních proteinů s protilátkami značně usnadnit, neboť se vyhledávání proteinových spotů na gelu pro identifikaci hmotnostní spektrometrií odvíjí od pozice proteinových spotů na NC membráně odečtených po chemiluminiscenční detekci.

Výběr buněčné linie byl ověřen i pilotními experimenty s analýzou imunoproteomu pacientů s MM se zaměřením na výskyt proteinu ENO1. Vzhledem k tomu, že protein ENO1 náleží u buněčné linie RPMI 8226 k proteinům vyskytujícím se ve vysoké koncentraci, byl zaveden postup využívající RPMI 8226 pro tvorbu buněčného lyzátu. Proteiny buněčného lyzátu byly v rámci této práce prostřednictvím 2D elektroforézy separovány ve dvou rozměrech pro získání tzv. proteinové mapy.

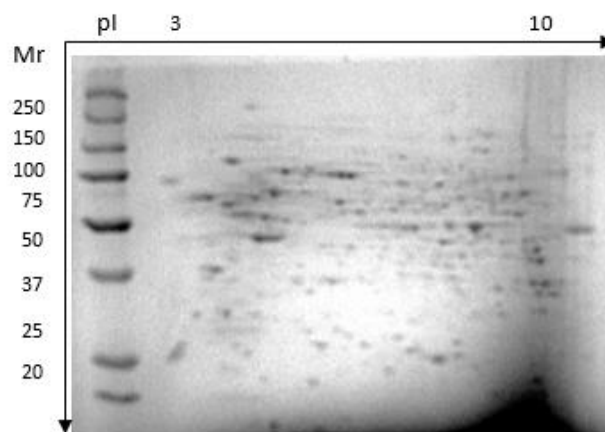
Bylo zjištěno, že čerstvost rehydratačního a lyzačního roztoku ovlivňuje výsledky izoelektrické fokusace, proto byla jejich trvanlivost stanovena na maximální dobu 6 měsíců (pro uchování alikvotů při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$). Doba sonikace byla snížena z 30 sekund na 20 sekund, neboť při delší sonikaci docházelo ke spálení buněčných zbytků, což mohlo negativně ovlivňovat kvalitu proteinů buněčného lyzátu. Při přípravě směsného roztoku bylo původní množství $120\text{ }\mu\text{l}$ poníženo na $115\text{ }\mu\text{l}$, tím se zároveň ukázalo, že připravený směsný roztok lze využít pro izoelektrickou fokusaci až pěti gelových stripů namísto dřívějších čtyř. Zvolená koncentrace $5 \cdot 10^6$ buněk RPMI 8226 vedla k tvorbě proteinových map bohatých na proteiny. Některé proteinové mapy však vykazovaly splnutí jednotlivých proteinových zón. Oblasti, kde docházelo k největšímu překryvu proteinů mohly ovšem vzniknout i v důsledku zasolení vzorku nebo nedokonalým odebráním supernatantu při přípravě buněčného lyzátu.

4.2 Příprava proteomové mapy a vizualizace proteinů na gelu a membráně

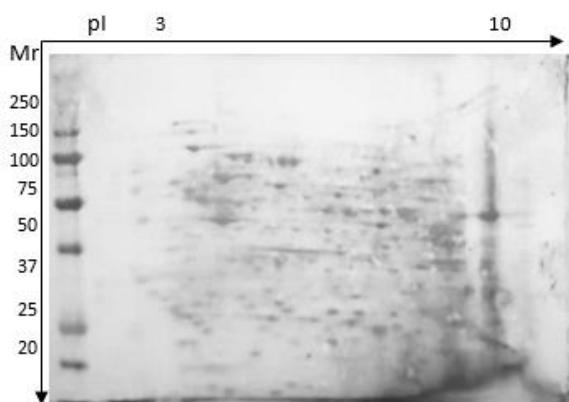
Přípravený buněčný lyzát byl inkubován s gelovými stripy v rámci zavedeného postupu pro rehydrataci (viz Kapitola 3.4 B) a následnou izoelektrickou fokusací proteinů v gelovém stripu dle izoelektrického bodu, viz Kapitola 3.4 C). Gelový strip s proteiny separovanými dle pI byl poté nanesen na připravený 12% akrylamidový gel a provedena separace proteinů v druhém rozměru (vertikálně) dle molekulových hmotností. Proteiny na gelu po dvourozměrné elektroforetické separaci (viz Kapitola 3.4 D) bylo možné vizualizovat pomocí amoniakálního stříbra (viz Kapitola 3.4 F) nebo barviva Coomassie blue, viz Obrázky č. 12 a 13. Gely s proteiny obarvené pomocí barviva Coomassie blue byly určeny (vzhledem k lepší kompatibilitě MS analýzy s barvivem) k následujícímu výřezu spotů pro identifikaci proteinů pomocí hmotnostní spektrometrie.



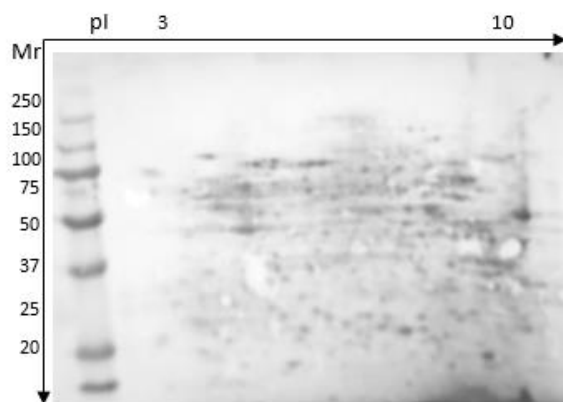
Obrázek č. 12 - Záznam proteinové mapy na 12% akrylamidovém gelu po 2D elektroforetické separaci, barveno Coomassie blue



Obrázek č. 13 - Záznam proteinové mapy na 12% akrylamidovém gelu po 2D elektroforetické separaci, barveno Coomassie blue



Obrázek č.14 - Záznam proteinové mapy na NC membráně, barveno amoniakálním stříbrem



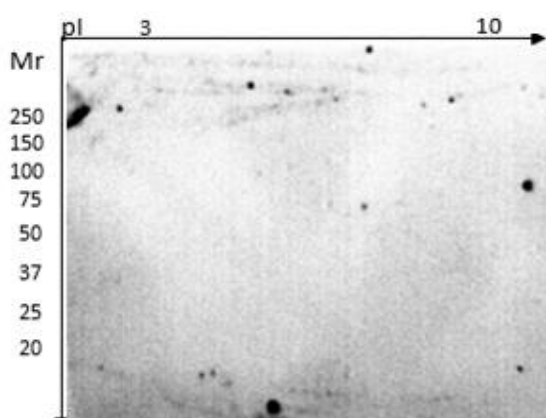
Obrázek č.15 - Záznam proteinové mapy na NC membráně, barveno amoniakálním stříbrem

Vizualizace proteinových map po přenesení z gelu (viz Kapitola 3.4 E, G) na nitrocelululózovou membránu, pomocí metody semi-dry western blot, byla prováděna za účelem kontroly správné přípravy buněčného lyzátu (zasolení vzorku, denzita a celistvost proteinových skvrn), úspěšnosti předchozí 2D elektroforetické separace (vznik jednotlivých skvrn, nikoli horizontálních nebo vertikálních proužků) a úspěšnosti transferu proteinové mapy z gelu na membránu (absence vzduchových bublin, které by vedly ke ztrátě proteinů). Proteinové mapy na NC membráně byly vizualizovány dle postupu pomocí roztoku koloidního stříbra (viz Kapitola 3.4 G), viz obrázky níže (Obrázky č. 14, 15). Vždy po levé straně je viditelný standard molekulových hmotností.

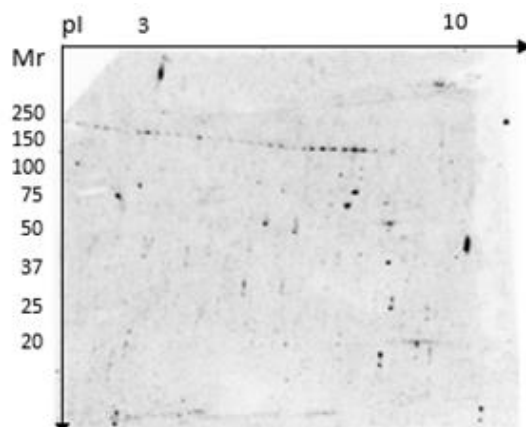
Cílem práce bylo získání co největšího počtu separovaných spotů. V rámci optimalizace postupu došlo k zisku proteinových map s lépe separovanými proteiny. Proteinové mapy byly reprodukovatelné a spoty s vysokou denzitou bylo možné identifikovat pomocí hmotnostní spektrometrie. Pro budoucí experimenty s účelem identifikovat jednotlivé proteinové skvrny z gelu pomocí metod hmotnostní spektrometrie by bylo žádoucí vyšší naředění buněčného lyzátu.

4.3 Stanovení imunoreaktivity vyšetřovaných sér s proteiny buněčného lyzátu

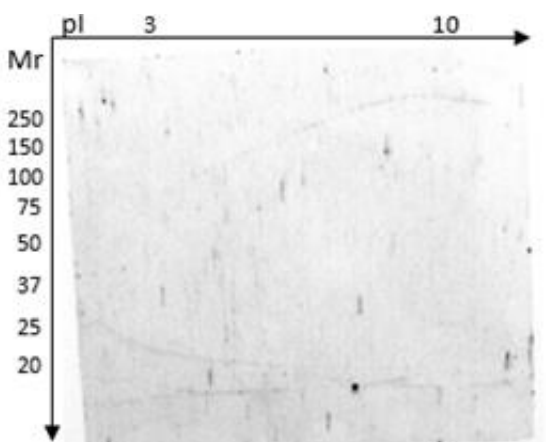
Nitrocelulózové membrány s proteiny byly po vizualizaci odbarveny odbarvovacím roztokem, promyty a inkubovány nejprve s blokovacím roztokem, poté s roztokem zředěného patientského séra a poté s konjugátem, který tvořila sekundární protilátka (anti-human IgG) s křenovou peroxidázou. Pomocí chemiluminiscenčního substrátu ECL (luminol a peroxid vodíku 1:1) proběhla imunodetekce. Bylo nutné zjistit, jaké ředění vzorků sér je pro imunodetekci optimální a provést validaci pro rozlišování specifické imunoreaktivity sér od imunoreaktivity sér zdravých jedinců s přiděleným značením (č. 0304, 7368, 4570 a 8381). Na následujících snímcích jsou snímky sér čtyř zdravých dárců, které sloužili jako negativní kontrola (Obrázky č. 16, 17, 18 a 19).



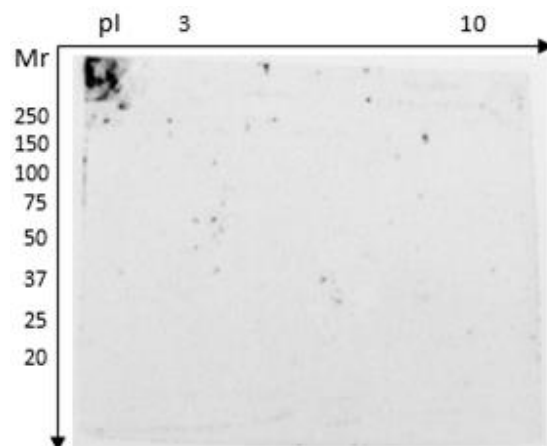
Obrázek č. 16 - Záznam NC membrány po detekci imunoreaktivity protilátek ze séra s proteinovou mapou (č. 0304), ředění séra 1:500



Obrázek č. 17 - Záznam NC membrány po detekci imunoreaktivity protilátek ze séra s proteinovou mapou (č. 7368), ředění séra 1:500

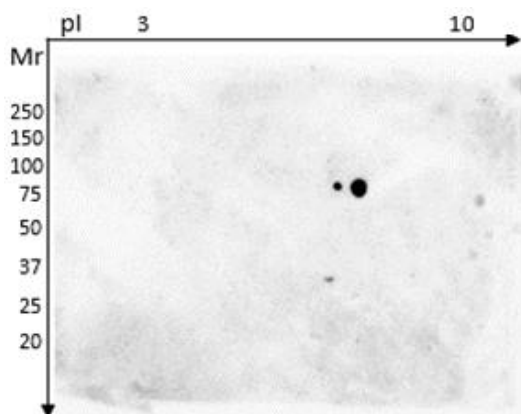


Obrázek č. 18 - Záznam NC membrány po detekci imunoreaktivity protilátek ze séra s proteinovou mapou (č. 4570), ředění séra 1:500

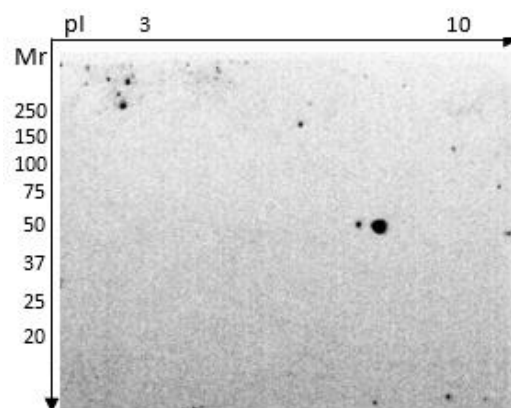


Obrázek č. 19 - Záznam NC membrány po detekci imunoreaktivity protilátek ze séra s proteinovou mapou (č. 8381), ředění séra 1:500

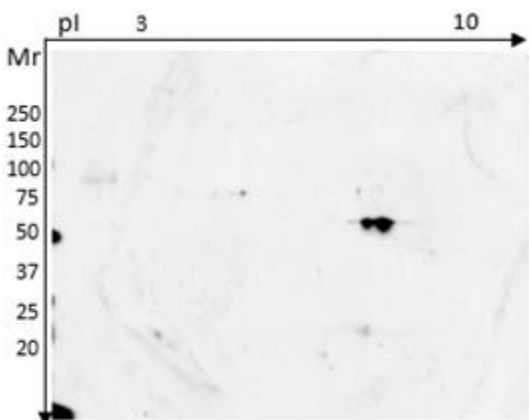
Vzorky sér zdravých dárců posloužili jako negativní kontrola. Ukázalo se, že séra zdravých dárců vykazovala určitou imunoreaktivitu s proteiny na membráně, jež je předpokládána jako nespecifická. Oproti snímkům pozitivního séra nebyly identifikovány žádné zřetelné spoty, mnohdy se objevovaly i artefakty (skvrny nepravidelných tvarů, čáry apod.). U zdravých dárců nebyla za stejných experimentálních podmínek prokázána přítomnost specifických anti-ENO1 IgG (47 kDa, pI 6,5-7)



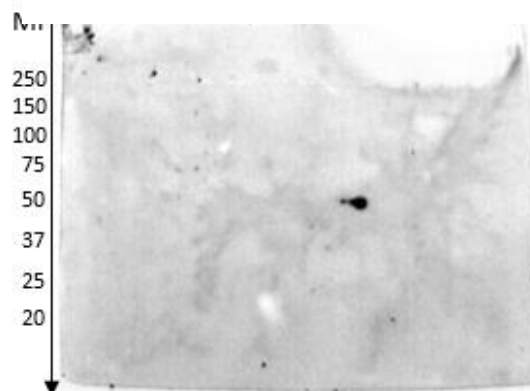
Obrázek č. 20 - Záznam NC membrány po detekci imunoreaktivity protilátek ze séra s proteinovou mapou („zlatý standard“), ředění séra 1:500



Obrázek č. 21 - Záznam NC membrány po detekci imunoreaktivity protilátek ze séra s proteinovou mapou („zlatý standard“), ředění séra 1:500

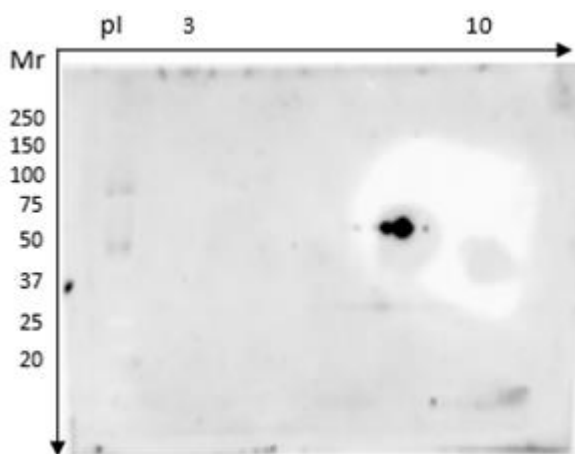


Obrázek č. 22 - Záznam NC membrány po detekci imunoreaktivity protilátek ze séra s proteinovou mapou („zlatý standard“), ředění séra 1:500

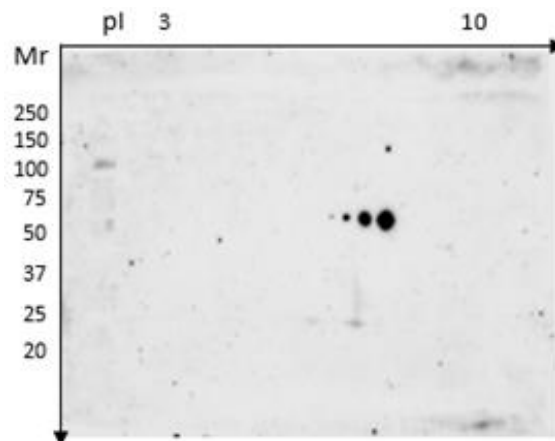


Obrázek č. 23 - Záznam NC membrány po detekci imunoreaktivity protilátek ze séra s proteinovou mapou („zlatý standard“), ředění séra 1:500

Pozitivní sérum vykazovalo výraznou imunoreaktivitu s ENO1 proteinem (47 kDa, pI 6,5 – 7), viz Obrázky č. 20, 21, 22, 23. Ředění všech vzorků sér bylo zvoleno 1:500, provedeno s blokovacím roztokem.



Obrázek č. 24 - Záznam NC membrány po detekci imunoreaktivity protilátek ze séra s proteinovou mapou („zlatý standard“), ředění séra 1:500



Obrázek č. 25 - Záznam NC membrány po detekci imunoreaktivity protilátek ze séra s proteinovou mapou („zlatý standard“), ředění séra 1:1500

Proteiny, které tvoří izoformy se projevují jako dva nebo tři spoty velmi blízko u sebe (dvourozměrná elektroforetická separace proteinů v 1. směru dle pI), až splývající. Ukázalo se, že u silně pozitivních vzorků bylo výhodné navýšit ředění séra a dosáhnout tak lepší reaktivity anti-ENO1 IgG s jednotlivými izoformami proteinu ENO, jak dokazuje následující snímek, na kterém je silně pozitivní sérum ředěno 1: 1500 (Obrázek č. 25). Pro porovnání je přiložen i snímek téhož séra ředěného 1:500, který vznikl v rámci jedné porovnávací analýzy (Obrázek č. 24). Z výsledků vyplývá, že anti ENO1 IgG autoprotiátky reagují s různými izoformami ENO (47 kDa, pI 6,5-7), díky čemuž bylo možné rozpoznat až čtyři izoformy proteinu v buněčném lyzátu. Isoformy ENO se pravděpodobně lišily jen typem a mírou posttranslačních modifikací přispívajících k celkovému náboji (tedy i pI)

Pro ředění sér pacientů s mnohočetným myelomem byl zvolen stupeň ředění 1:500, aby bylo možné detekovat i slabě imunoreaktivní séra a bylo vizualizováno více proteinových spotů. Protilátky ze séra poté mohly reagovat i s proteiny zastoupenými na membráně v nižší koncentraci. Pro účely analýzy byl jako sekundární protilátka zvolen konjugát anti-IgG s HRP (křenuvá peroxidáza). Nalézaná reaktivita proto vždy odpovídala přítomnosti lidských IgG protilátek vázaných na membránu.

Optimalizace podmínek pro vazbu protilátek ze séra na cílové antigeny

V rámci optimalizace protokolu metody SERPA byly vytvořeny dva různé postupy pro inkubaci membrán s protilátkami (viz Kapitola 3.4 H). První zavedený postup byl manuální (Postup 1) s využitím svařovačky, druhý postup byl automatizovaný (Postup 2) a využíval promývací stanici

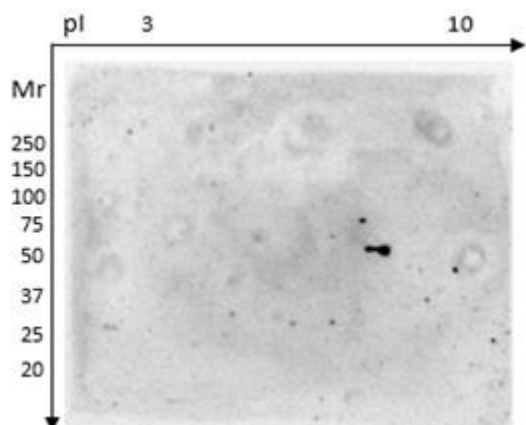
FlexiWash FW400. Oba postupy mají své výhody i nevýhody. Hlavní výhodou je, že lze získat výsledky dvěma různými postupy a ověřit si tak jejich validitu, tzn. vznik reaktivních spotů jen na základě specifické interakce mezi protilátkou a cílovou strukturou.

Jak již bylo dříve vysvětleno, po proběhlé 2D elektroforetické separaci a semi-dry western blotu následovala inkubace NC membrán s primární a sekundární protilátkou s navazující chemiluminiscenční detekcí. Postup nazvaný Postup 1 byl původním zavedeným postupem pracovního protokolu SERPA. Pro implementaci promývací stanice FlexiWash FW400 byl zaveden Postup 2. Vzhledem ke dvěma existujícím postupům byla porovnána citlivost a kvalita výsledků, jež nabízejí. Na Obrázcích níže jsou snímky téhož patientského séra („zlatý standard“) s využitím Postupu 1 (Obrázek č. 26) a Postupu 2 (Obrázek č. 27).

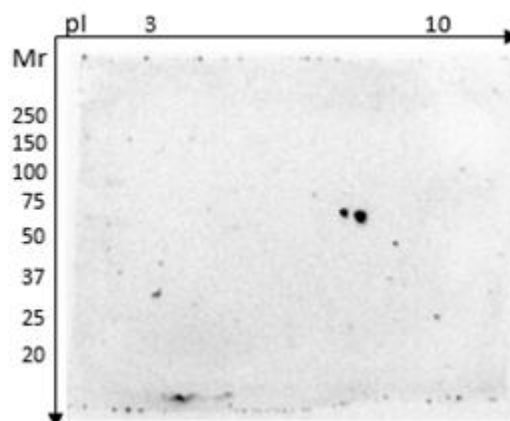
Postup 1 byl manuální, proto vyžadoval větší zručnost a vyznačoval se vyšší časovou náročností. Inkubace membrány s primární protilátkou probíhala přibližně 16-18 hodin (tzn. přes noc) minimální doba pro inkubaci membrány se sérem byla stanovena na 8 hodin. Při používání dříve připravených membrán po semi-dry western blotu uchovávaných v suchu v lednici bylo možné využít onu minimální inkubační dobu, tj. 8 hodin. S delší inkubací byla zvyšována citlivost analýzy (spoty byly výraznější, imunokomplexy stabilnější).

Postup 2, (využívající promývací stanici FlexiWash FW400) jež byl automatizovaný, poskytl usnadnění manuální práce, čímž byl ušetřen času a zavedeno méně chyb. S membránou bylo méně manipulováno. Další výhodou byla i skutečnost, že bylo se všemi membránami na promývačce zacházeno totožně za stejných podmínek. Nevýhodou bylo, že proces probíhal za laboratorní teploty. Inkubace se sérem probíhala 8 hodin. Hlavním úskalím bylo možné znečištění kanálů promývací stanice biofilmem, jež by mohlo ovlivňovat výsledky analýz. Proto bylo nutné neustále stanici promývat udržovat v čistotě, což samozřejmě enormně zvyšovalo množství chemikálií potřebných pro analýzu. Nevýhodou bylo i naředování roztoků s protilátkami roztoky z předchozího nastaveného kroku (např. PBS-T pufrem nebo blokovacím roztokem), neboť odsávání nebylo definitivní. Tento postup byl však přesto preferován kvůli lepší opakovatelnosti a reprodukovatelnosti výsledků a ve výsledku menší chybovosti než Postup 1.

Na Obrázku č. 26 je zřejmé, že s membránou bylo více manipulováno (nese známky pomačkání v důsledku zavaření membrány do fólie apod.). Splývání izomerních forem zobrazeného proteinu může být důsledkem delší inkubace s patientských sérem. Je zřejmé, že po oba postupy jsou funkční a vzájemně komplementární. Obrázek č. 27 nese minimum artefaktů. Lze pozorovat dva imunoreaktivní spoty, které pravděpodobně značí izomerní formy proteinu ENO1.



Obrázek č. 26 - Záznam NC membrány po detekci imunoreaktivity protilátek z patientského séra MM-15-41 CR +6, (Postup 1)



Obrázek č. 27 - Záznam NC membrány po detekci imunoreaktivity protilátek z patientského séra MM-15-41 CR +6, (Postup 2)

Předností Postupu 1 je i to, že inkubace probíhá v chladničce při teplotě 4 °C (kdy se předpokládá lepší průběh tvorby imunokomplexů) nebo menší spotřeba chemikálií než u Postupu 2. Nevýhodou této cesty jsou naopak vyšší časové nároky (až o několik hodin) a vyšší šance zanesení chyby vzhledem k manuálnímu postupu. Postup 1 navíc zahrnuje pouze inkubaci se sérem, po níž musí následovat další kroky jako jsou: promytí PBS-T pufrem, inkubace s konjugátem apod., které již probíhají v Petriho misce při laboratorní teplotě (druhý den).

Z našeho pohledu bylo proto vhodnější pro následující analýzy upřednostňovat Postup 2. Postup 1 byl vhodnější pro opakovací analýzy při předchozí analýze s využitím Postupu 2 nebo pro slabě reaktivní séra.

4.4 Optimalizace reakčních podmínek vazby konjugátu na imunokomplex a následné chemiluminiscenční detekci

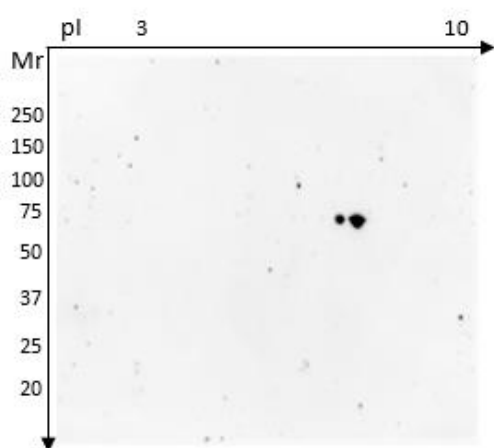
V metodické části bylo (viz Kapitola 3.4 H) popsáno, jak byly membrány po inkubaci s protilátkami vyhodnoceny pomocí chemiluminiscenční detekce. Pro tvorbu záznamu membrány a záchyt chemiluminiscenčního signálu křenové peroxidázy na vzniklém imunokomplexu na membráně s chemiluminiscenčním substrátem ECL (luminol a peroxid vodíku 1:1) byla využívána fotografovací stanice G:BOX Chemi XX6.

V softwaru GeneSys byly vytvořeny protokoly pro vyhodnocování nalézáných imunoreaktivních spotů po inkubaci membrán s ECL substrátem. Bylo zjištěno, že poskytovaný chemiluminiscenční signál závisí na době inkubace membrány se substrátem a světelných podmínkách v laboratoři. Proto byl po několik experimentech zaveden postup upravující původí převzatý postup, kde byla uvedena inkubace s ECL 5 minut a požadovaná doba focení 300 sekund, 20 snímků. Bylo pozorováno, že čím déle je membrána inkubována se substrátem, tím více dochází k zisku vysoce kontrastních snímků, které „zastiňují“ slabší imunoreaktivitu a zvýrazňují spoty o silnější denzitě, než je skutečnost. V programu GeneSys byl vytvořen protokol pro chemiluminiscenční detekci imunokomplexů (Tabulka č. 9).

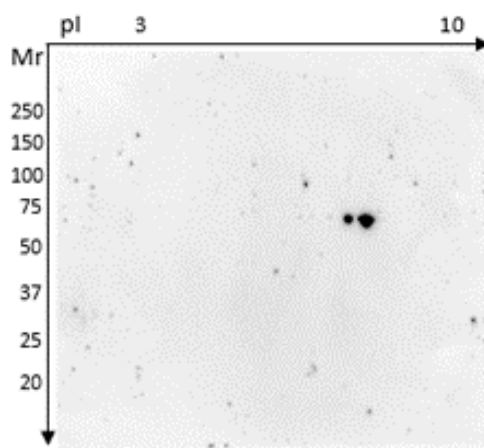
Tabulka č. 9 - Focení membrány po inkubaci s ECL substrátem v programu GeneSys

Snímek	Interval	Celkový čas	Snímek	Interval	Celkový čas
1	3 s	3 s	12	15 s	124 s
2	3 s	6 s	13	20 s	144 s
3	3 s	9 s	14	20 s	164 s
4	10 s	19 s	15	20 s	184 s
5	10 s	29 s	16	20 s	204 s
6	10 s	39 s	17	20 s	224 s
7	10 s	49 s	18	20 s	244 s
8	15 s	64 s	19	20 s	264 s
9	15 s	79 s	20	20 s	284 s
10	15 s	94 s	21	20 s	304 s
11	15 s	109 s			

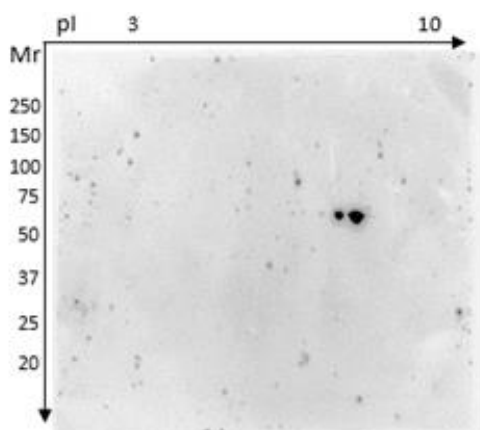
Následující snímky (Obrázky č. 28, 29, 30, 31) znázorňují vývoj chemiluminiscenčního signálu v průběhu focení. Je zřejmé, že úpravou protokolu došlo k dosažení lepšího signálu a lze pozorovat stoupající intenzitu signálu jako zvyšující se kontrast. (Je nutné podotknout, že software GeneSys snímky automaticky upravuje, proto není vývoj po vyfocení zřejmý a bylo třeba upravit kontrast snímků na původní hodnoty manuálně). Práce vždy probíhala za minimální osvětlení laboratoře.



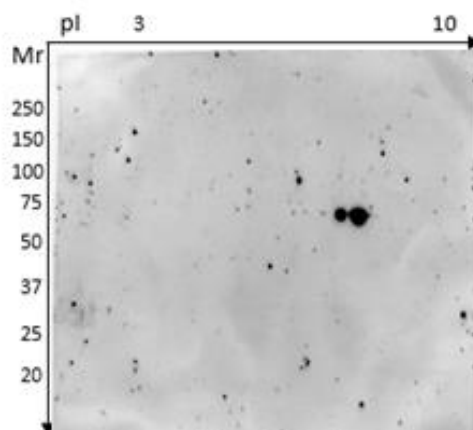
Obrázek č. 28 - Záznam NC membrány po detekci imunoreaktivity protilátek z patientského séra MM-15-41 DG +6, snímek 1 (3 s)



Obrázek č. 29 - Záznam NC membrány po detekci imunoreaktivity protilátek z patientského séra MM-15-41 DG +6, snímek 3 (9 s)



Obrázek č. 30 - Záznam NC membrány po detekci imunoreaktivity protilátek z patientského séra MM-15-41 DG +6, snímek 9 (79 s)



Obrázek č. 31 - Záznam NC membrány po detekci imunoreaktivity protilátek z patientského séra MM-15-41 DG +6, snímek 18 (244 s)

Jako ideální doba inkubace membrány se substrátem ECL bylo stanoveno 30 sekund. Membrána byla poté rovnou vložena do fotící stanice G:BOX Chemi XX6 (bez promytí od substrátu ECL). Inkubace membrány se substrátem ECL proto pokračovala i během focení snímků (celkem 300 sekund). Tento postup zajistil lepší vizualizaci vývoje chemiluminiscenčního signálu a zajištění nízké intenzity pozadí.

Vyhodnocení výsledků v zobrazovacím systému G:BOX Chemi XX6

Všechny snímky byly získány pomocí zobrazovacího systému G:BOX Chemi XX6, který umožňuje fotit a upravovat snímky prostřednictvím programu GeneSys a GeneTools. Oproti původnímu zobrazovacímu systému (ChemiDoc XRS+ systém s CCD kamerou a Image Lab™ softwarem) je G:BOX Chemi XX6 modernější a nabízí více funkcí pro detekci proteinů na gelech nebo membránách. Poskytuje chemiluminiscenční signál již od femtogramů, umožňuje i fluorescenční detekci aj. V software GeneSys lze nastavit protokoly pro focení a jeho podmínky, včetně nastavení CCD kamery (6 Mpx, chlazení, odstranění šumu pozadí aj.)

A) Software GeneSys (chemiluminiscenční detekce)

V hlavním menu (Obrázek č. 32 nalevo) byl vybrán typ materiálu k vyfocení (membrána), napravo byly předvolené nebo nově vytvořené protokoly pro konkrétní účely focení s danými podmínkami (viz Tabulka č. 9). Po zvolení protokolu a podmínek bylo zobrazeno okno snímající vzorek kamerou, membrána byla umístěna do správné pozice (Obrázek č. 32 napravo) a nastaveny podmínky chemiluminiscenčního snímání (dle Tabulky č. 9), viz podkapitola 3.4 H).



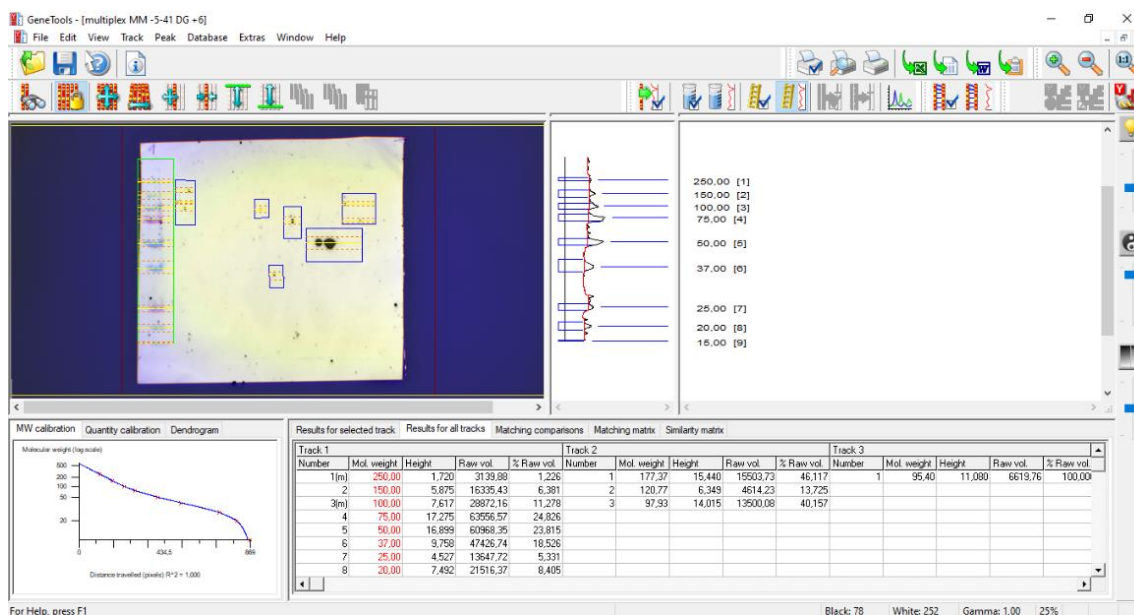
Obrázek č. 32 - Využití software GeneSys pro chemiluminiscenční detekci

Aby bylo možné odečíst molekulární hmotnost vizualizovaných proteinů bylo potřeba zaškrtnout políčka „Use Visible Marker“ a „Marker is Colour“. Poté bylo možné spustit vlastní focení, „Capture“. Získané snímky byly vždy všechny uloženy ve formátu .sgd a :jpeg v kvalitě 600 dpi. Mezi snímky se vždy nacházaly i tři snímky membrány, jež byly vyfoceny „nativně“ a na kterých je viditelný standard molekulových hmotností. Tyto snímky software využil k tvorbě tzv. „Multiplexu“, což je snímek vzniklý proložení snímků po chemiluminiscenční detekci a nativních snímků se standardem molekulových hmotností.

Díky tomu bylo možné na jednom snímku pozorovat standard molekulových hmotností i objevené imunoreaktivní spoty. Dalším krokem byl přestup do software GeneTools pomocí „Analyse“.

B) Software GeneTools

U snímku zvaného „Multiplex“ byla pomocí nástrojů GeneTools odečtena molekulová hmotnost standardu molekulových hmotností, dle kterého byly poté odečteny i hodnoty molekulových hmotností jednotlivých spotů (Obrázek č. 33).



Obrázek č. 33 - Nástroje softwaru GeneTools

Během optimalizace protokolů pro vyhodnocování získaných snímků membrán bylo zjištěno, že u odečítání molekulových hmotností proteinů v software GeneTools docházelo k nadhodnocování nebo podhodnocování hmotností. Bylo objeveno hned několik příčin: výsledky se odvíjí od přípravy gelu a 2D elektroforetické separace, výsledky jsou ovlivněny viditelností molekulového markeru, vliv na hodnoty má i „gatování“ spotů, protože při tvorbě orámování spotu (viz modré rámečky na Obrázku č. 33) a určování píků docházelo k falešně nadhodnoceným hodnotám. Vzhledem k tomu, že výsledky nejsou zcela kvantitativní lze odečtené hodnoty vnímat jako podklad pro budoucí identifikaci pomocí hmotností spektrometrie.

4.5 Vyšetření imunoreaktivity sér od pěti pacientů s mnohočetným myelomem

Pomocí optimalizovaných postupů zavedené metody SERPA byly vyšetřeny vzorky sér od pacientů s mnohočetným myelomem. Všechny vzorky sér byly analyzovány opakovaně. Pro validaci pozitivních a negativních výsledků byly využity výsledky vyšetřování sér zdravých dárců a silně pozitivního séra. Všechna séra byla inkubována dle postupů metodiky, která byla popsána v Kapitole 3.4.

Nejprve byla připravena proteinová mapa na 12% akrylamidovém gelu (izoelektrická fokusace gelových stripů s proteiny buněčné linie RPMI 8226 a SDS-PAGE), poté byly proteiny z gelu přeneseny na nitrocelulózovou membránu (semi-dry western blot), blokovány blokovacím roztokem a inkubovány s patientskými séry (ředění 1:500) a konjugátem (anti-human IgG, ředění 1:5000). Imunokomplex na membráně (protein pocházející z modelové nádorové linie-protilátka ze séra a sekundární protilátka) byl detekován pomocí chemiluminiscenční detekce (30 sekund inkubace s ECL substrátem) ve stanici G:BOX Chemi XX6 dle optimalizovaného postupu (304 sekund, 21 snímků, viz předchozí podkapitola 4.4). Molekulové hmotnosti imunoreaktivních spotů byly vyhodnoceny pomocí softwarů GeneSys a GeneTools (osa Mr). Pro lepší orientaci na snímcích byla přidána i osa značící pI (izoelektrický bod).

Tabulka č. 10 poskytuje seznam vyšetřovaných vzorků s dobou jejich odběru. Patientská séra nesla vždy určité označení, ke kterému byla přidána zkratka doby odběru, např. „DG“ – odběr v době diagnózy MM, „DG+6“ – odběr v době 6 měsíců od stanovení diagnózy MM nebo „CR“ – v době dosažení kompletní remise apod.

Tabulka č. 10 – Seznam odebíraných vzorků sér od pacientů s MM v období od stanovení diagnózy (DG) po dosažení kompletní remise (CR) v tříměsíčních intervalech

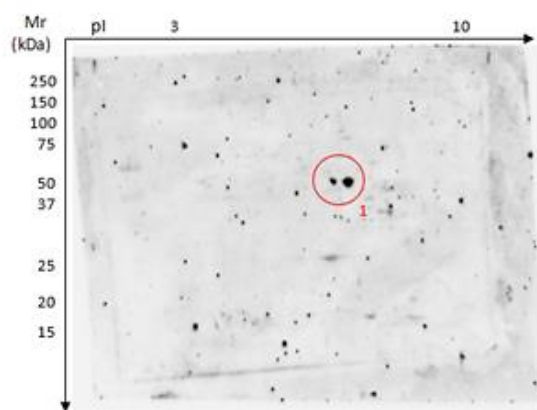
Označení pacienta	Období odběrů						
1-13-128	DG	DG+3	DG+6	DG+9	CR	CR+3	CR+6
1-13-130	DG	DG+3	DG+6	DG+9	DG+12	DG+15	CR
1-13-131	DG	DG+3	DG+6	DG+9	DG+12		
MM-15-41	DG	DG+3	DG+6	CR	CR+3	CR+6	
MM-15-108	DG	DG+3	DG+6	DG+9	DG+12	DG+15	DG+18

U jednotlivých snímků je uvedeno, který zavedený postup pro inkubaci membrány s protilátkami byl využit (Postup 1 – manuální svařování membrán do fólie, inkubace séra s membránou 16 hodin při 4°C nebo automatizovaný postup - Postup 2 na promývací stanici FlexiWash FW400, inkubace se sérem 8 hodin při 25°C)

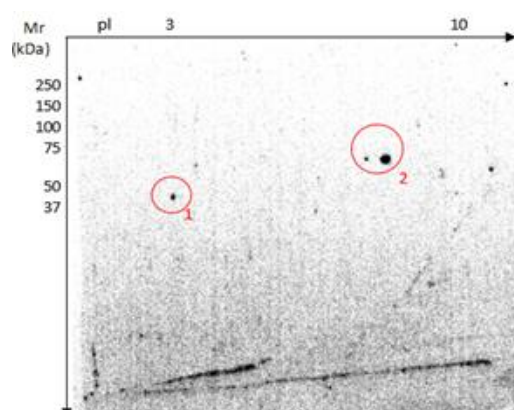
Během každé analýzy byly membrány po semi-dry western blotu barveny koloidním stříbrem pro kontrolu správnosti proteinových map, poté byly odbarveny.

Výstupem bylo hodnocení přítomnosti a změny titru protilátek ve vyšetřovaných sérech proti proteinům na nitrocelulózové membráně. Jednalo se o semikvantitativní vyšetření. Při nálezů neočekávaných jevů (artefakty, ztráta imunoreaktivity séra s pozitivním výsledkem v předchozí analýze aj.) byl vzorek séra proměřen ještě jednou s využitím druhého ze dvou postupů (Postup 1 nebo Postup 2 pro inkubaci s protilátkami).

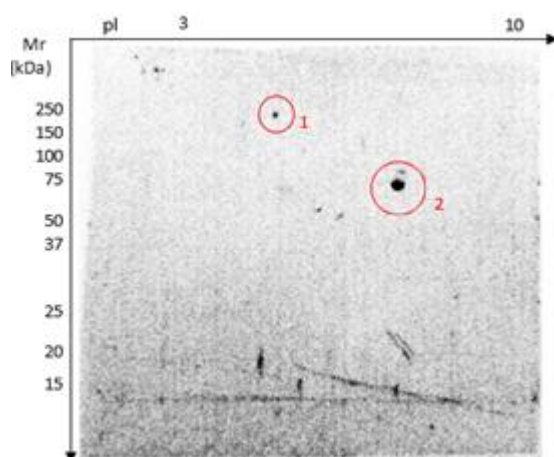
1. Imunoreaktivita vzorků sér pacienta 1-13-128



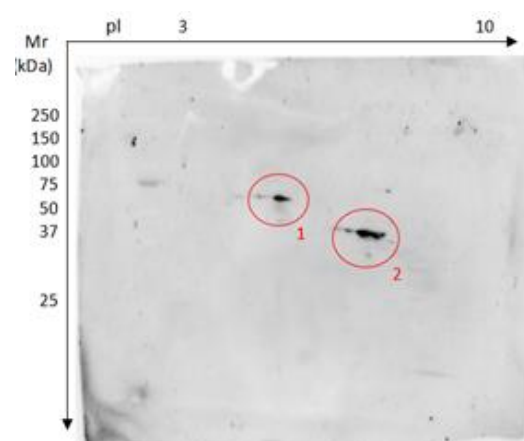
Obrázek č. 34 - Záznam NC membrány po detekci imunoreaktivity protilátek z pacientského séra 1-13-128 DG (Postup 1)



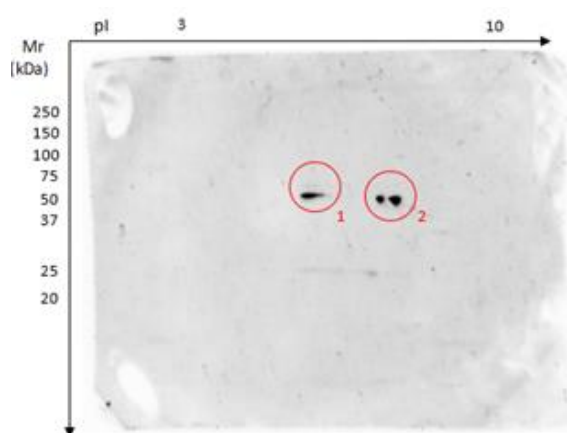
Obrázek č. 35 - Záznam NC membrány po detekci imunoreaktivity protilátek z pacientského séra 1-13-128 DG+3 (Postup 1)



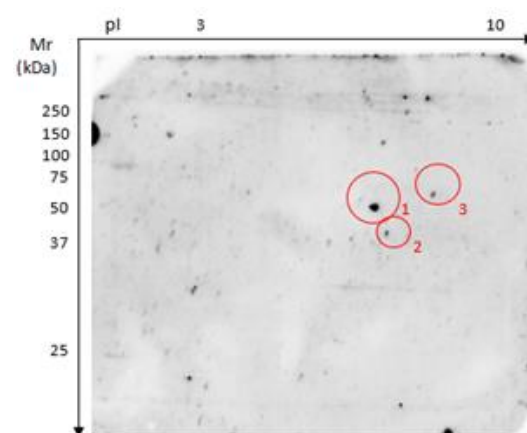
Obrázek č. 36 - Záznam NC membrány po detekci imunoreaktivity protilátek z pacientského séra 1-13-128 DG +6 (Postup 1)



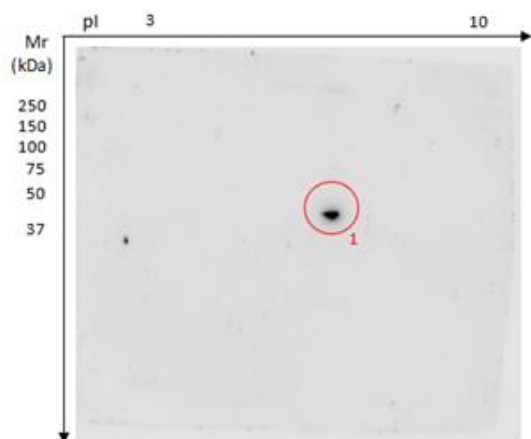
Obrázek č. 37 - Záznam NC membrány po detekci imunoreaktivity protilátek z pacientského séra 1-13-128 DG+9 (Postup 1)



Obrázek č. 38 - Záznam NC membrány po detekci imunoreaktivity protilátek z pacientského séra 1-13-128 CR (Postup 1)



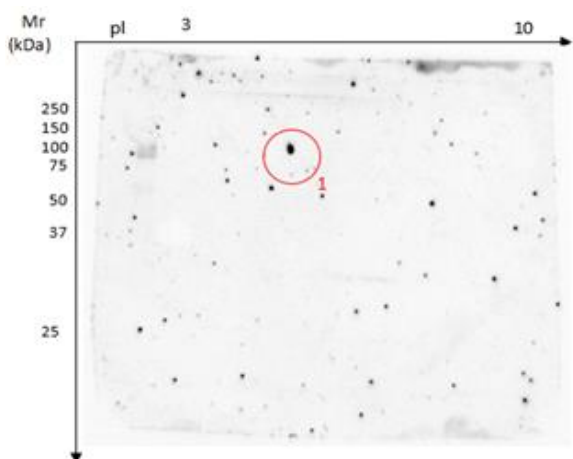
Obrázek č. 39 - Záznam NC membrány po detekci imunoreaktivity protilátek z pacientského séra 1-13-128 CR+3 (Postup 1)



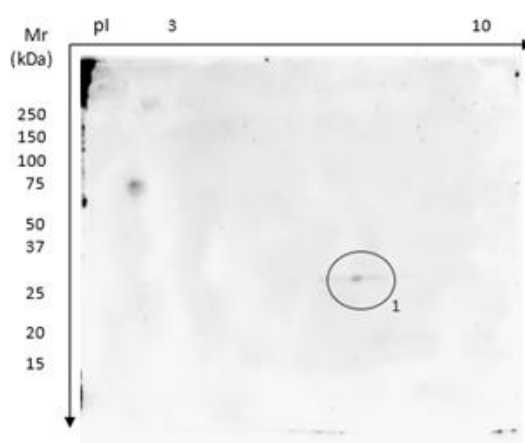
Obrázek č. 40 - Záznam NC membrány po detekci imunoreaktivity protilátek z pacientského séra 1-13-128 CR+6 (Postup 1)

U všech vzorků pacientských sér s označením 1-13-128 byla nalezena pravděpodobná přítomnost anti-ENO1 protilátek třídy IgG namířených proti proteinu ENO1, jak bylo vyhodnoceno odečtením molekulových hmotností. Molekulová hmotnost byla v softwaru GeneTools odečtena o vyšší hodnotě, než by odpovídala proteinu ENO1 (47 kDa, pI 6,5-7): spot č. 1 u období DG, CR+3 a CR+6, spot. č. 2 u DG+3, DG+6, DG+9 a CR. U některých vzorků sér byla zaznamenána i neznámá imunoreaktivita. Často se jednalo o spoty, jež svou velikostí, tvarem a denzitou odpovídaly negativní kontrole (séra zdravých dárců).

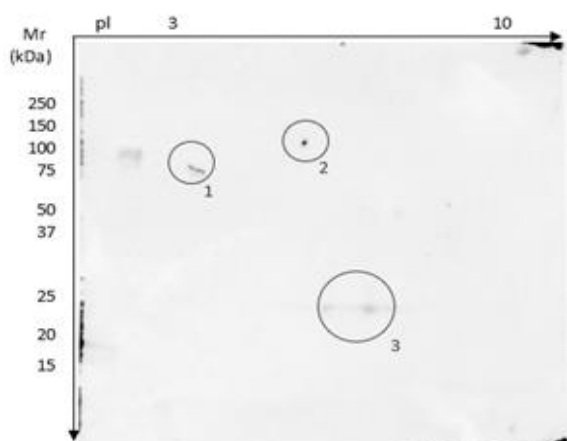
2. Imunoreaktivita vzorků sér pacienta 1-13-130



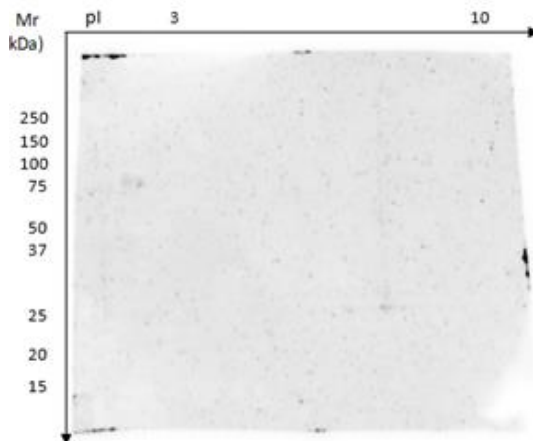
Obrázek č. 41 - Záznam NC membrány po detekci imunoreaktivity protilátek z pacientského séra 1-13-130 DG (Postup 1)



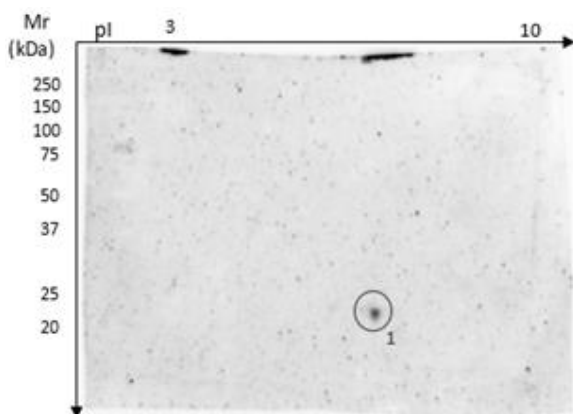
Obrázek č. 42 - Záznam NC membrány po detekci imunoreaktivity protilátek z pacientského séra 1-13-130 DG +3 (Postup 1)



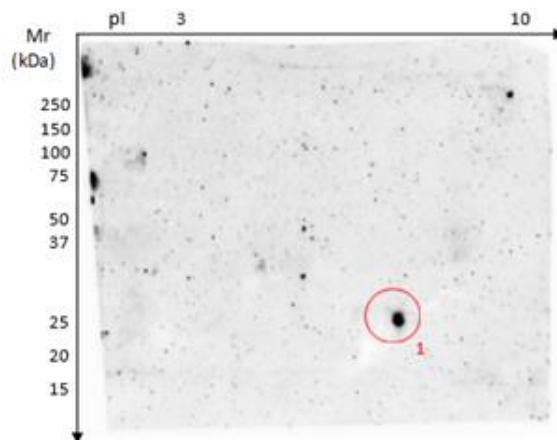
Obrázek č. 43 - Záznam NC membrány po detekci imunoreaktivity protilátek z pacientského séra 1-13-130 DG +6 (Postup 1)



Obrázek č. 44 - Záznam NC membrány po detekci imunoreaktivity protilátek z pacientského séra 1-13-130 DG +9 (Postup 1)



Obrázek č. 45 - Záznam NC membrány po detekci imunoreaktivity protilátek z pacientského séra 1-13-130 DG +12 (Postup 1)

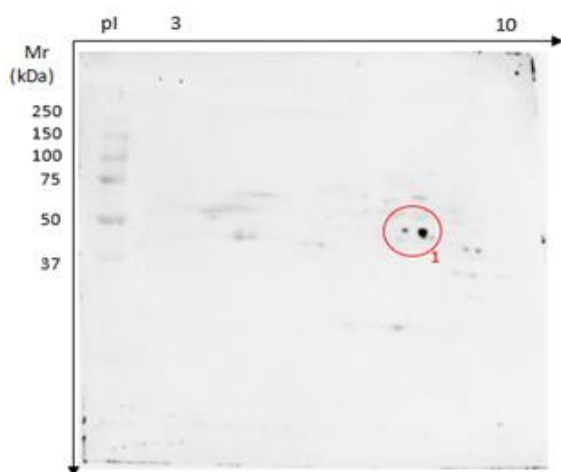


Obrázek č. 46 - Záznam NC membrány po detekci imunoreaktivity protilátek z pacientského séra 1-13-130 DG +15 (Postup 1)

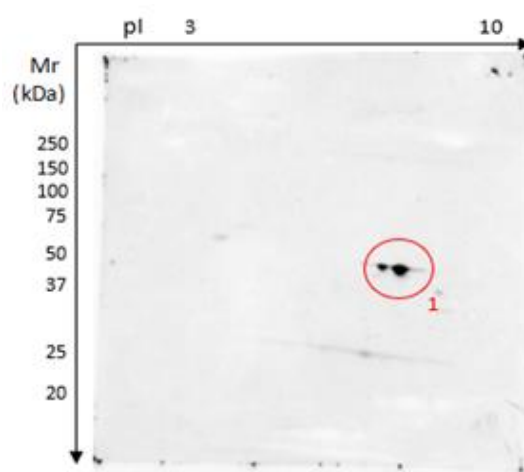
U vzorku séra 1-13-130 DG byla pozorována vícenásobná neznámá imunoreaktivita, často na úrovni negativní kontroly (spoty zvýrazněné šedým kroužkem). U vzorků sér DG a DG+15 byl odečten výraznější imunoreaktivní spot (spot č. 1) neznámé specifity. Vzorek séra 1-13-130 DG+3 se nevyznačoval výraznou imunoreaktivitou, vyznačený spot (spot č. 1) byl vybrán pro odečtení molekulové hmotnosti vzhledem k jeho narůstající denzitě u vzorku séra 1-13-130 DG+6 (spot č. 3).

U vzorku séra 1-13-130 DG+9 nebyla pozorována žádná imunoreaktivita. U vzorku séra 1-13-130 DG +12 byla pozorována neznámá imunoreaktivita jako neostře ohraničený spot (spot č. 1). U vzorku séra 1-13-130 DG+15 byla pozorována neznámá imunoreaktivita, která odpovídá spotu nalezenému u předchozích vzorků sér, u tohoto séra lze pozorovat výraznější denzitu tohoto spotu (spot. č 1). Vzorky s označením 1-13-130 lze celkově hodnotit jako negativní na výskyt anti-ENO1 protilátek.

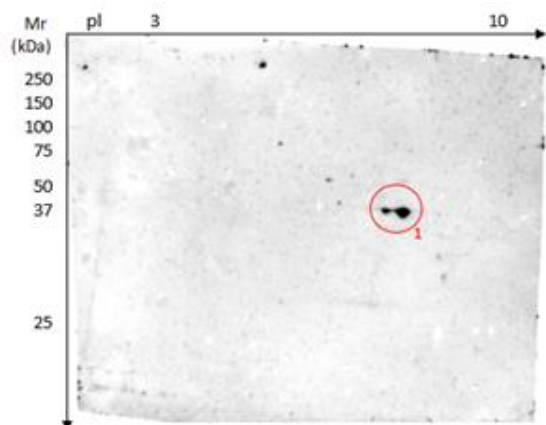
3. Imunoreaktivita vzorků sér pacienta s MM s označením 1-13-131



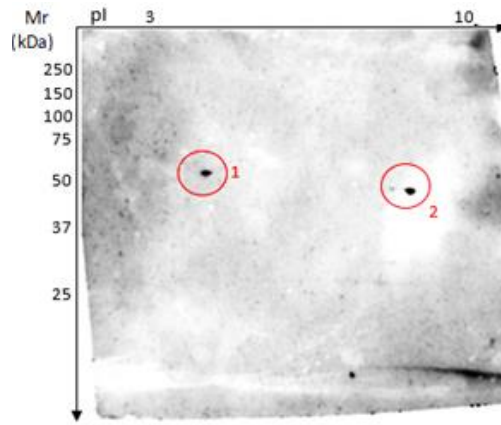
Obrázek č. 47 - Záznam NC membrány po detekci imunoreaktivity protilátek z pacientského séra 1-13-131 DG (Postup 2)



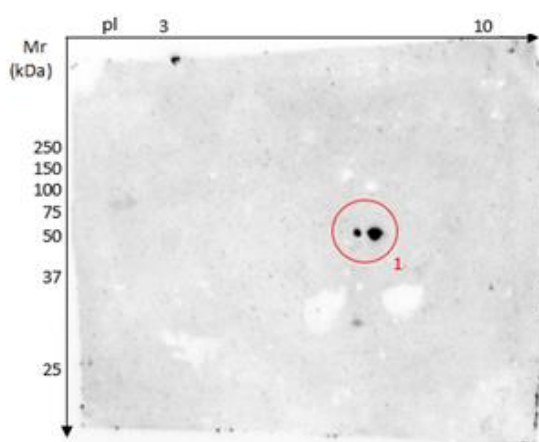
Obrázek č. 48 - Záznam NC membrány po detekci imunoreaktivity protilátek z pacientského séra 1-13-131 DG+3 (Postup 2)



Obrázek č. 49 - Záznam NC membrány po detekci imunoreaktivity protilátek z pacientského séra 1-13-131 DG+6 (Postup 2)



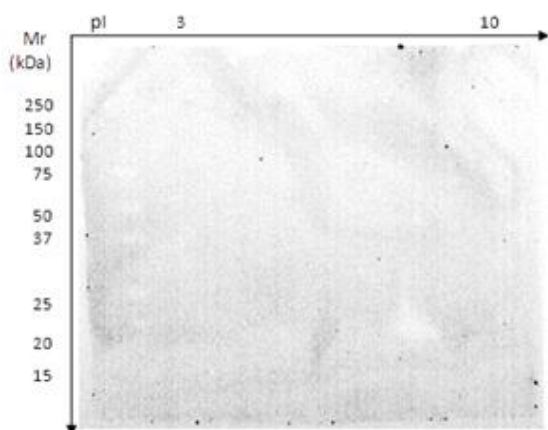
Obrázek č. 50 - Záznam NC membrány po detekci imunoreaktivity protilátek z pacientského séra 1-13-131 DG+9 (Postup 2)



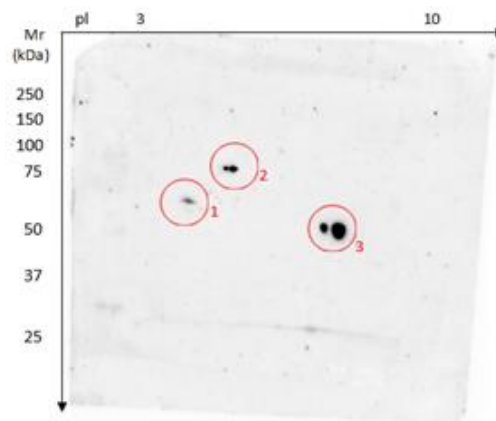
Obrázek č. 51 - Záznam NC membrány po detekci imunoreaktivity protilátek z pacientského séra 1-13-131 DG+12 (Postup 2)

U vzorků sér 1-13-131 DG, DG+6, DG+3, DG+12 byla pozorována nespecifická imunoreaktivita s markerem i jinými neznámými proteiny. Byl odečten jeden výrazný spot (spot č. 1), u DG+9 (spot č. 2) které pravděpodobně značí imunoreaktivitu sér s proteinem ENO1 (47 kDa, pI 6,5 – 7). U vzorku séra 1-13-131 DG+9 byla odečtena i neznámá imunoreaktivita, jež se u předchozích vzorků sér nevyskytovala

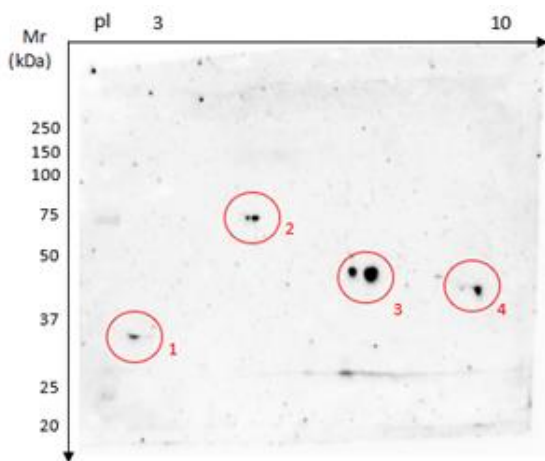
4. Imunoreaktivita vzorků sér pacienta MM-15-41



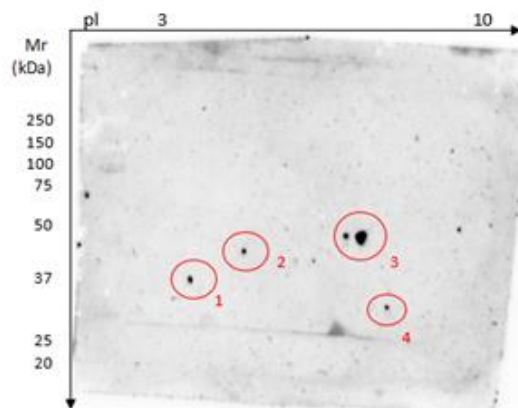
Obrázek č. 52 - Záznam NC membrány po detekci imunoreaktivity protilátek z patientského séra MM-15-41 DG (Postup 1)



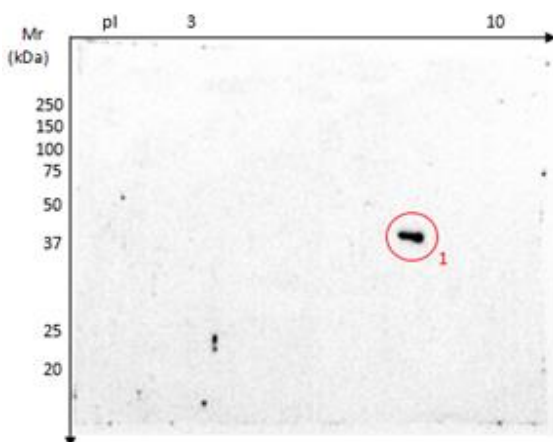
Obrázek č. 53 - Záznam NC membrány po detekci imunoreaktivity protilátek z patientského séra MM-15-41 DG+3 (Postup 1)



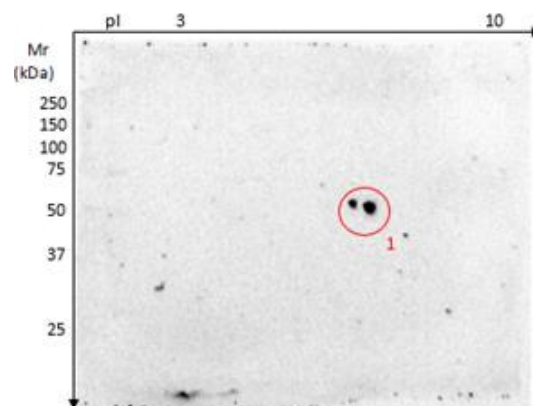
Obrázek č. 54 - Záznam NC membrány po detekci imunoreaktivity protilátek z patientského séra MM-15-41 DG+6 (Postup 1)



Obrázek č. 55 - Záznam NC membrány po detekci imunoreaktivity protilátek z patientského séra MM-15-41 CR (Postup 1)



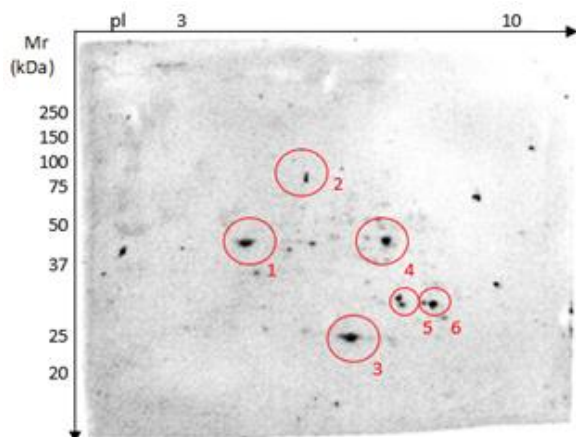
Obrázek č. 56 - Záznam NC membrány po detekci imunoreaktivity protilátek z patientského séra MM-15-41 CR+3 (Postup 2)



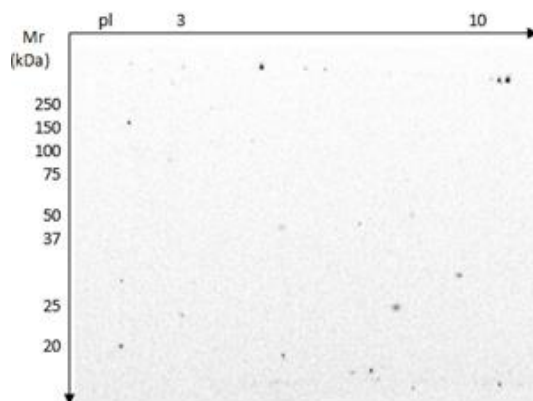
Obrázek č. 57 - Záznam NC membrány po detekci imunoreaktivity protilátek z patientského séra MM-15-41 CR+6 (Postup 2)

U vzorku séra MM-15-41 DG nebyla pozorována žádná imunoreaktivita. Séra MM-15-41 DG+3, DG+6 a CR vykazovala vícenásobnou imunoreaktivitu, spot č. 3 byl pravděpodobnou imunoreaktivitou s ENO1 (47 kDa, pI 6,5 – 7). U séra MM-15-41 CR byla zaznamenána imunoreaktivita, spoty 1, 2, 4 byly na pomezí negativní kontroly nebo se mohlo jednat o imunoreaktivitu s proteiny zastoupenými v buněčné linii RPMI 8226 v nižší koncentraci.

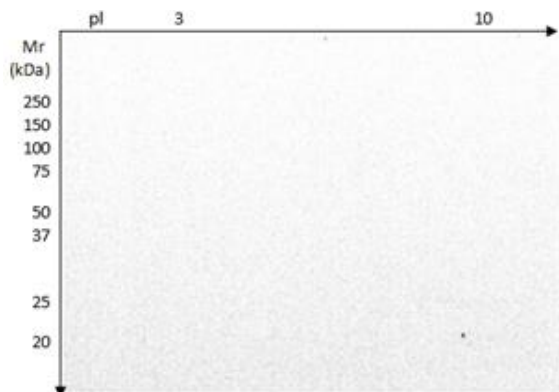
5. Imunoreaktivita vzorků sér pacienta MM-15-108



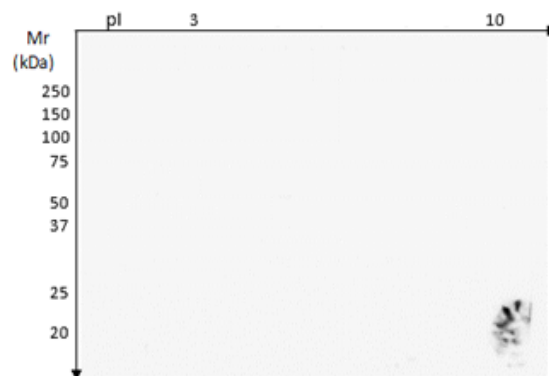
Obrázek č. 58 - Záznam NC membrány po detekci imunoreaktivity protilátek z patientského séra MM-15-108 DG (Postup 2)



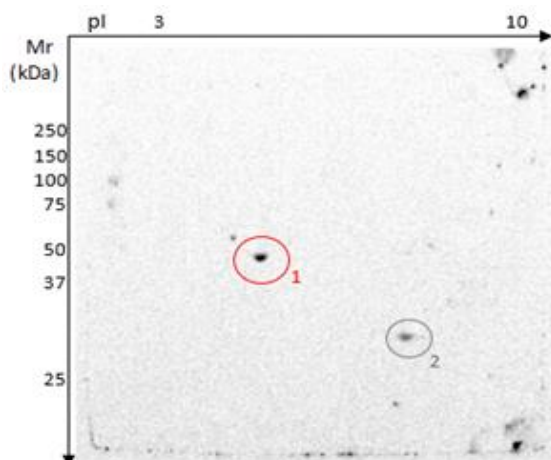
Obrázek č. 59 - Záznam NC membrány po detekci imunoreaktivity protilátek z patientského séra MM-15-108 DG+3 (Postup 2)



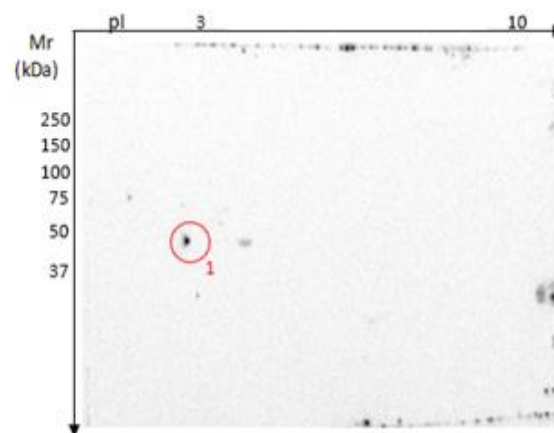
Obrázek č. 60 - Záznam NC membrány po detekci imunoreaktivity protilátek z patientského séra MM-15-108 DG+6 (Postup 2)



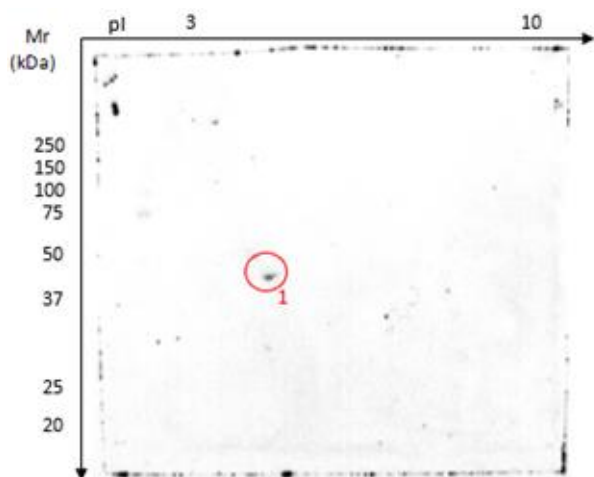
Obrázek č. 61 - Záznam NC membrány po detekci imunoreaktivity protilátek z patientského séra MM-15-108 DG+9 (Postup 2)



Obrázek č. 62 - Záznam NC membrány po detekci imunoreaktivity protilátek z patientského séra MM-15-108 DG+12 (Postup 2)



Obrázek č. 63 - Záznam NC membrány po detekci imunoreaktivity protilátek z patientského séra MM-15-108 DG+15 (Postup 2)



Obrázek č. 64 - Záznam NC membrány po detekci imunoreaktivity protilátek z patientského séra MM-15-108 DG+18 (Postup 2)

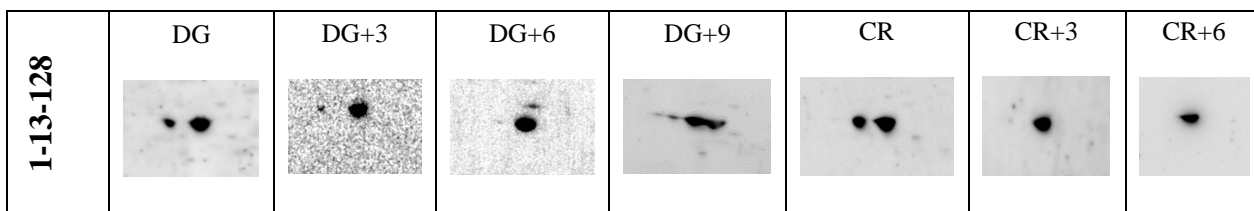
Všechny vzorky sér tohoto pacienta obsahovaly sedimentující složky, což mohlo analýzu ovlivnit. U vzorku séra MM-15-108 DG bylo pozorováno několik výraznějších imunoreaktivních spotů, které mohly poukazovat na další přítomné typy IgG autoprotilátek vázajících se na cílové struktury. Tyto spoty se však při dalších analýzách neukazovaly konstantně opakovaně. Záměrem však bylo sledovat výskyt anti-ENO1 autoprotilátek, proto dále nebyly prováděny další analýzy (ani identifikace protilátek pomocí metod In-gel-digest a tandemové LC-MS) s těmito patientskými séry.

Proteinu ENO1 by mohl u vzorku séra MM-15-108 DG odpovídat spot č. 4. Vzorek séra MM-15-108 DG+3 byl oproti předchozímu séru jen velmi slabě reaktivní, nalezené spoty odpovídaly úrovni negativní kontroly. Vzorek séra MM-15-108 DG+6 nevykazoval žádnou imunoreaktivitu. Vzorek séra MM-15-108 DG+9 vykazoval jeden imunoreaktivní spot s proteinem neznámé specifity (spot č. 1), byl pozorován ještě jeden spot (spot č. 2), který byl jen velmi slabě reaktivní. U vzorku séra MM-15-108 DG+18 byl nalezen jeden malý slabě imunoreaktivní spot, tentýž spot byl pozorován i u předchozího vzorku séra (MM-15-108 DG+15).

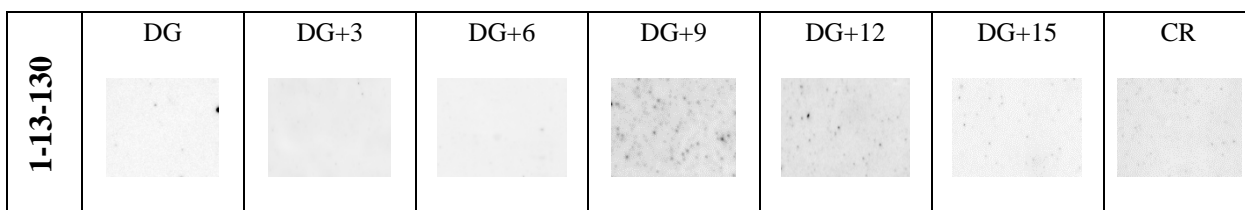
Na následující straně je přehled výřezů snímků membrán (Obrázky č. 65, 66, 67, 68, 69) pouze s oblastí očekávaného výskytu imunoreaktivity s enzymem ENO1 (47 kDa, pI 6,5 – 7). U séra MM-15-108 DG byl sice nalezen spot (spot č. 4) svou molekulární hmotností odpovídající proteinu enoláza, svou denzitou a tvarem se ovšem od všech předchozích výsledků odlišoval. Opakovací analýza k tomuto séru se nezdařila, proto nese označení *n.d.* – „nelze diagnostikovat“.

Pacientská séra 1-13-128, 1-13-131 a MM-15-41 lze považovat za pozitivní na přítomnost anti-ENO1 protilátek (nebo jiných specifických protilátek reagujících proti proteinu enoláza). Pacientská séra 1-13-130 a MM-15-108 lze je považovat za negativní na přítomnost anti-ENO1 protilátek.

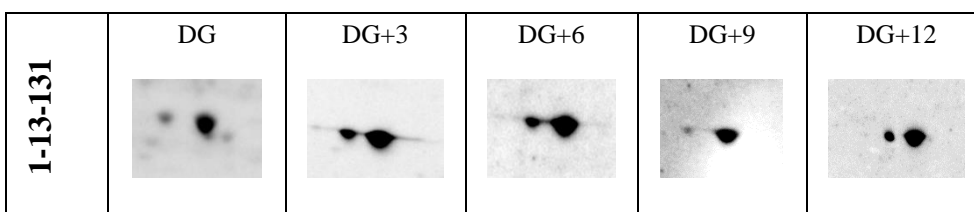
Přehled výskytu ENO1 reaktivních spotů v čase (výřezy membrán s výskytem imunokomplexu ENO1 proteinu a anti-ENO1 protilátek):



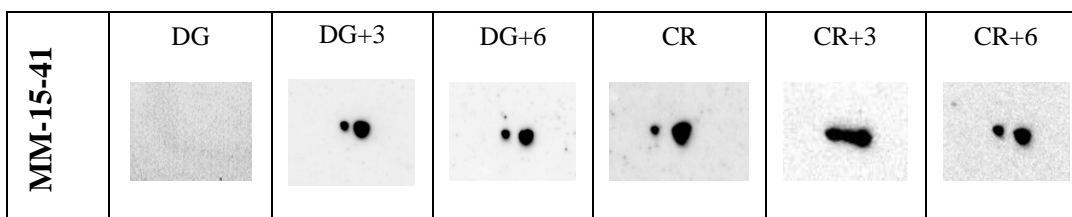
Obrázek č. 65 - Výřezy z NC membrán po detekci imunoreaktivity protilátek z pacientského séra 1-13-128 v místě výskytu ENO1 (přítomnost protilátek anti-ENO1 u všech sér)



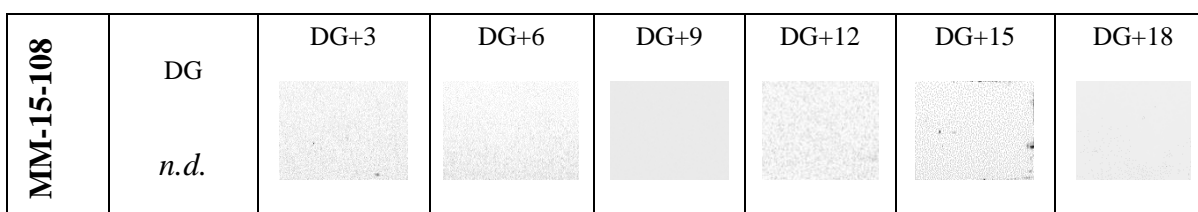
Obrázek č. 66 - Výřezy z NC membrán po detekci imunoreaktivity protilátek z pacientského séra 1-13-130 v místě výskytu ENO1 (negativní)



Obrázek č. 67 - Výřezy z NC membrán po detekci imunoreaktivity protilátek z pacientského séra 1-13-131 v místě výskytu ENO1 (přítomnost protilátek anti-ENO1 u všech sér, chybí CR)



Obrázek č. 68 - Výřezy z NC membrán po detekci imunoreaktivity protilátek z pacientského séra MM-15-41 v místě výskytu ENO1 (přítomnost protilátek anti-ENO1 i jiné neznámé imunoreaktivity)

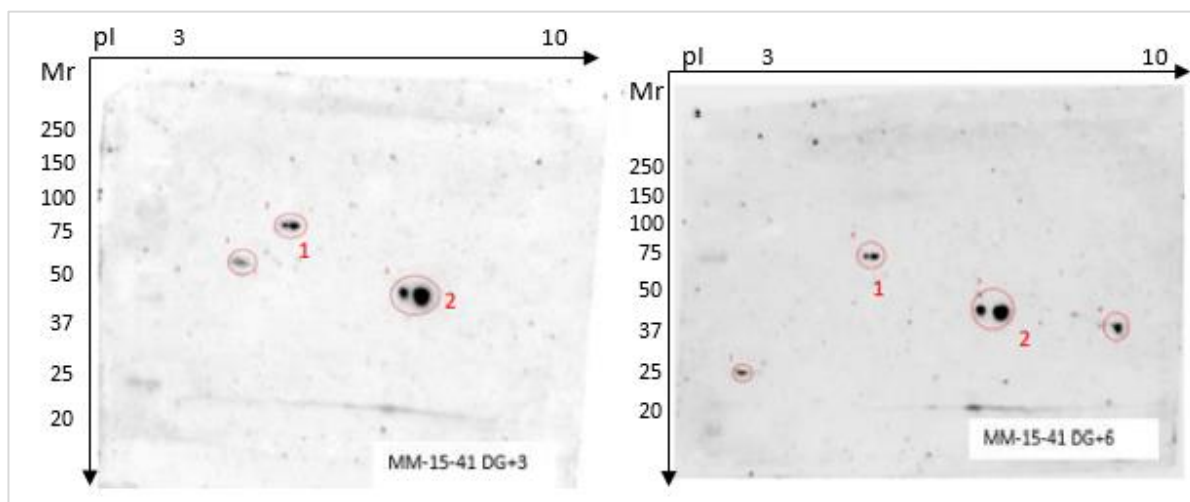


Obrázek č. 69 - Výřezy z NC membrán po detekci imunoreaktivity protilátek z pacientského séra MM-15-108 v místě výskytu ENO1 (negativní chybí CR)

4.6 Identifikace reaktivních proteinů s využitím hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie má v proteomice klíčovou roli pro identifikaci proteinů a peptidů. Výsledkem hmotnostní analýzy je hmotnostní spektrum, které je specifické pro daný protein. Pomocí proteomických knihoven je poté protein určen na základě shody. Pro studium proteinů je využíváno spojení hmotnostního spektrometru s kapalinovou chromatografií (LC-MS).

Proteiny pro identifikaci byly vybrány na základě výsledků vyšetření detekce imunoreaktivity sér: MM-15-41 DG+3 a MM-15-41 DG+6. Pro identifikaci byly vybrány zakroužkované spoty, spot. č. 2 u obou snímků membrán odpovídal umístění proteinu ENO1 (47 kDa, pI 6,5-7), viz Obrázek č. 70 se dvěma snímky membrán po imunodetekci.

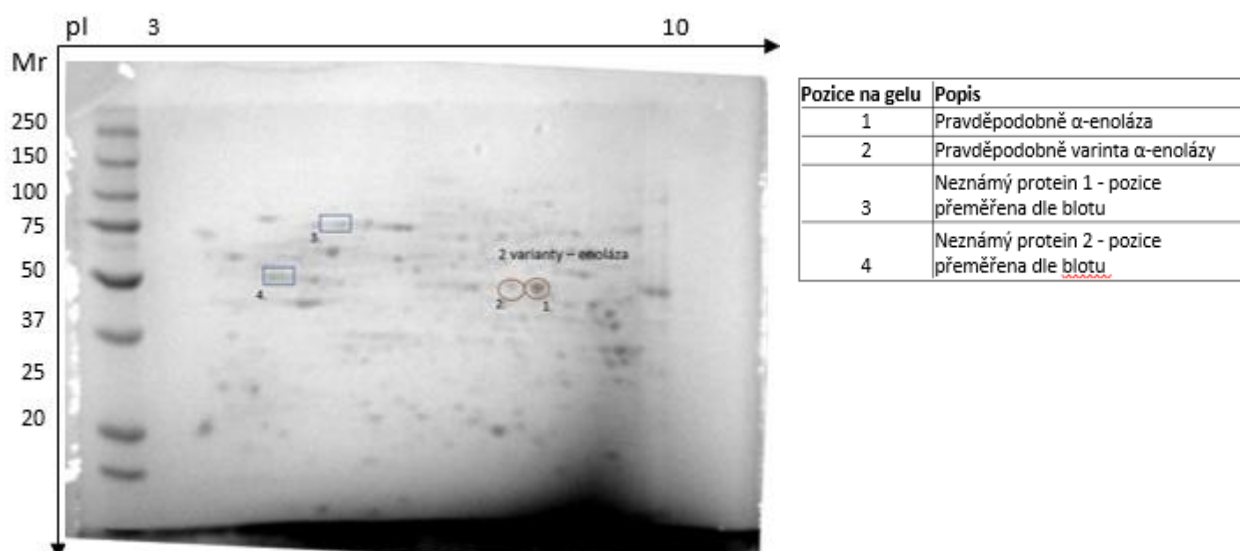


Obrázek č. 70 - Snímky membrán po imunodetekci s vybranými spoty k MS analýze

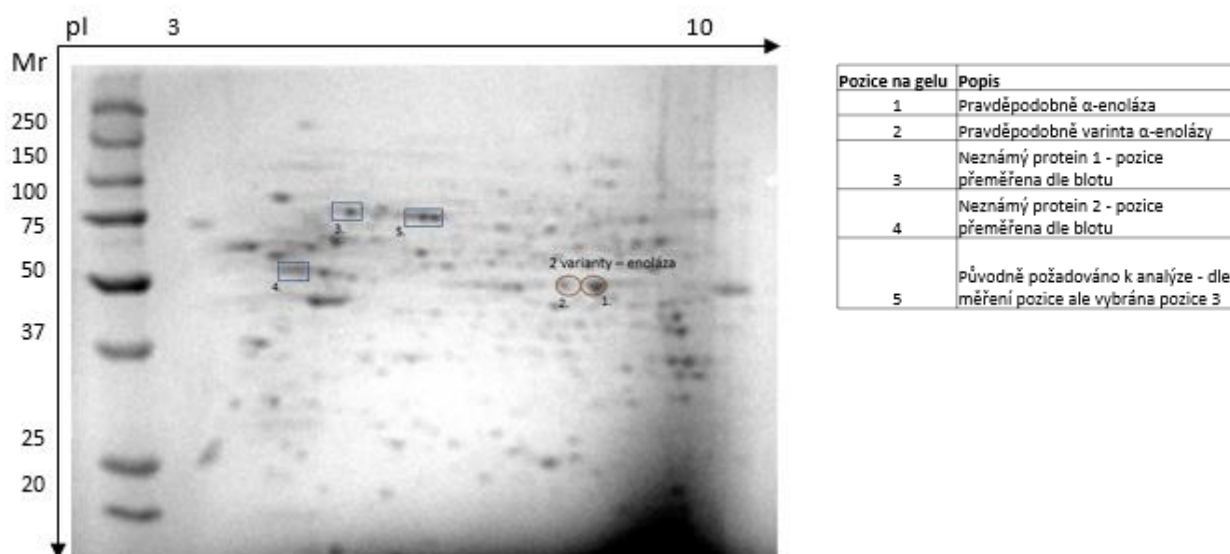
Pro analýzu LC-MS (kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní detekcí, MALDI), dále jen MS analýza, byly připraveny 12% akrylamidové gely s proteinovou mapou pomocí 2D elektroforézy (viz Kapitola 3.4 D), viz Obrázky č. 71 a 72. Proteinová mapa pocházející z buněčného lyzátu nádorové linie RPMI 8226 byla pro účely MS analýzy vizualizována pomocí komerčního barviva Coomassie blue (viz Kapitola 3.4 F), neboť byl daný postup přípravy vzorku k MS analýze s tímto barvením kompatibilní. Proteinové spoty určené k identifikaci byly z gelu vyříznuty (dle postupu In-gel-digest, viz Příloha B) a dále upravovány (reagencie a příprava potřebných roztoků viz příloha A) dle postupu pro přípravu vzorku uvedeného v příloze B.

Identifikace proteinů byla provedena na pracovišti Centra biomedicínského výzkumu ve Fakultní nemocnici Hradec Králové Mgr. Rudolfem Kupčíkem Ph.D., ve spolupráci s Mgr. Marií Vajrychovou Ph.D.

In-gel digest proteinů ze proteinové mapy na gelu (RPMI 8226)



Obrázek č. 71 - Gel 1 s proteinovou mapou (RPMI 8226), 12% akrylamidový gel s vyznačenými spoty pro identifikaci na MS, barveno Coomasie Blue (převzato od Mgr. Rudolf Kupčík Ph.D.)



Obrázek č. 72 - Gel 2 s proteinovou mapou (RPMI 8226), 12% akrylamidový gel s vyznačenými spoty pro identifikaci na MS, barveno Coomasie Blue (převzato od Mgr. Rudolf Kupčík Ph.D.)

V rámci postupu „In-gel digest“ (příloha B) byly vyříznuté kousky gelu s proteiny homogenizovány, promyty a bylo odstraněno barvivo Coomasie blue. Pevní část přípravy vzorku zahrnovala štěpení bílkovin pomocí trypsinu. Následovala extrakce proteinů pomocí extrakčního pufru v kyselém prostředí při 37°C. Byly získány purifikované proteiny určené k SPE extrakci (extrakce na tuhé fázi, z angl. „Solid Phase Extraction“). Po eluci zakoncentrovaného vzorku bylo možné přistoupit k vlastní MS analýze.

Vzorek s proteiny byl rozpuštěn v tzv. nanášecím pufru a na byl proveden nástřik 2 μ l na kolonu kapalinového chromatografu (NanoViperTrap), následně vzorek putoval na hmotnostní spektrometr a byla získána hmotnostní spektra, podle kterých byly vyhledána shoda s databází Uniprot a proteiny ze vzorku identifikovány (viz Příloha C). Přehled identifikovaných proteinů poskytuje Tabulka č. 11

Tabulka č. 11 - Výsledky identifikace proteinů pomocí MS

Vzorek	Uniprot ID	Protein	Pokrytí sekvence [%]	Peptidy	Unikátní peptidy	Počet amnokyselin proteinu	MW [kDa]	pI
Gel 1 Ex1	P06733	Alpha-enolase	21	10	10	434	47.1	7.39
Gel 1 Ex2	P06733	Alpha-enolase	8	5	5	434	47.1	7.39
Gel 1 Ex3	xx	xx	xx	xx	xx	xx	xx	xx
Gel 1 Ex4	P06576	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	12	6	6	529	56.5	5.4

Vzorek	Uniprot ID	Protein	Pokrytí sekvence [%]	Peptidy	Unikátní peptidy	Počet amnokyselin proteinu	MW [kDa]	pI
Gel 2 Ex1	P06733	Alpha-enolase	21	10	10	434	47.1	7.39
Gel 2 Ex2	P06733	Alpha-enolase	10	4	4	434	47.1	7.39
Gel 2 Ex3	E9PKE3	Heat shock cognate 71 kDa protein	7	4	4	627	68.8	5.52
Gel 2 Ex4	P06576	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	12	6	6	529	56.5	5.4
	Q8NB59	Thioredoxin domain-containing protein 5	12	4	4	432	47.6	5.97
	Q8I2P2	Putative protein FAM10A4	14	3	3	240	27.4	5.08
Gel 2 Ex5	P02768	Serum albumin	8	5	5	609	69.3	6.28

Cílem MS analýzy bylo identifikovat proteiny, se kterými reagovaly specifické protilátky IgG vyskytující se v patientských sérech MM-15-41 DG+3 a MM-15-41 DG+6. Výstupní data z hmotnostních spekter vyhodnocená pomocí proteinové databáze Uniprot potvrdila u obou vzorků sér přítomnost anti-ENO1 protilátek, neboť spot č. 2 na obou gelech byl identifikován jako ENO1 (v Tabulce č. 11 Gel 1 Ex1 a Ex2 a Gel 2 Ex1 a Ex2). Mezi identifikovanými proteiny byly i další proteiny, u Gelu 1 ATP-syntháza (mitochondriální podjednotka β) (Gel 1 Ex4) a u Gelu 2 protein Hsp71 („Heat Shock Protein 71“) (Gel 2 Ex3), thioredoxin5 (Gel 2 Ex3), FAM10A4 (Gel 2 Ex3) a sérový albumin (Gel 2 Ex5) avšak s nižším procentuálním pokrytím sekvence proteinu.

4.7 Údržba a čištění promývací stanice FlexiWash FW400

Promývací stanice FlexiWash FW400 je určena k plně automatizovanému promývání a inkubaci membrán s proteiny jako krok navazující na předchozí Western blot. Dle nastavení je možné využít stanici pro blokování membrán s blokovacím roztokem, inkubaci s primární i sekundární protilátkou a mezikrokové promývání pufrům (kromě jiného lze promývací stanici využít i pro barvení, promývání a odbarvování gelů a membrán). Stanice disponuje čtyřmi pozicemi („Tray“) pro umístění čtyř membrán (Obrázek č. 73), ke každé pozici náleží kanály (systém hadiček) vedoucí roztoky k membráně a do odpadu.

V podkapitole, kde je popsán postup používání stanice FlexiWash bylo zmíněno, že byl postup pro využívání stanice označen jako Postup 2. V Postupu 2 je uvedeno, že stanici je nutné pravidelně udržovat (program „Clean“), aby se kanály nezanesly biofilmem, neboť bylo zjištěno, že během používání k tomu opakovaně docházelo. Ukázalo se, že doporučení výrobce v příručce nebyly dostačující. Uváděly, že stanici je optimální promývat redestilovanou vodou několikrát, dokud nejsou hadičky čisté a po delší odstávce bez používání promývat hloubkově čistícím roztokem.

Vzhledem k tvorbě biofilmu, který vedl k ovlivňování analýz a nutnosti návratu k pracovnímu Postupu 1, bylo znečištění nejprve řešeno s prodejcem přístroje, který doporučil čistit stanici nejen redestilovanou vodou, ale i roztokem 1% SDS PBS pufru. To ovšem nestačilo ke kompletnímu vyčištění kanálů. Proto bylo přistoupeno na hloubkové čištění pomocí čistící roztok Coulter CLENZ Cleaning Agent, jenž se používá pouze po odstávce. Uvolňování biofilmu bylo navíc podpořeno pravidelným promýváním redestilovanou vodou a roztokem 1% SDS PBS pufru. Pro odstranění veškerého znečištění byla promývací stanice promyta 8% roztokem peroxidu vodíku. Pro „uchování“ proti opětovné kontaminaci bylo určeno, že bude vždy posledním roztokem promývání roztok 20% ethanolu, jež zajistí sterilní prostředí hadiček (dříve redestilovaná voda).



Obrázek č. 73 - promývací stanice FlexiWash FW400

Protokol pro promývání a údržbu promývací stanice byl stanoven následovně:

Před každým použitím:

- promytí všech kanálů redestilovanou vodou (2x), před samotnou analýzou promytí pufrem využívaným v analýze (1x, PBS-T).

Po každém použití:

- promytí všech použitých kanálů redestilovanou vodou (3x nebo vícekrát do vymytí roztoků z analýzy),
- kontrola čistoty hadiček:
 1. zcela bez znečištění → konečné promytí 20% ethanolem,
 2. slabě viditelné znečištění → promytí 1% SDS PBS (nechat působit 30 minut), poté promytí redestilovanou vodou (2x),
 3. viditelné znečištění → promytí 8% peroxidem vodíku (nechat působit 20 minut), promytí redestilovanou vodou (3x) (zkontrolovat, zda bylo znečištění uvolněno z hadiček do odpadu),
 4. nakonec promytí 20% ethanolem, (pozn. pokud je znečištění přetrvávající promývat kanály každý den, např. 2-3x týdně promýt 1% SDS PBS, 1x týdně promýt 8% peroxidem vodíku, v mezikrocích promýt redestilovanou vodou, nakonec vždy 20% ethanolem).

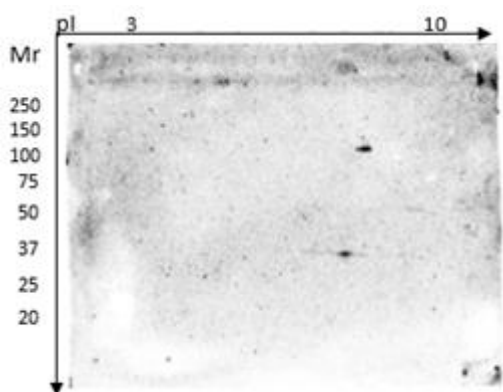
Po odstávce:

- promýt hloubkově čistícím roztokem (Coulter CLENZ Cleaning Agent), nechat působit minimálně 30 minut nebo do druhého dne, poté promývat redestilovanou vodou až do promytí od čistícího roztoku, nakonec promýt 20% ethanolem.

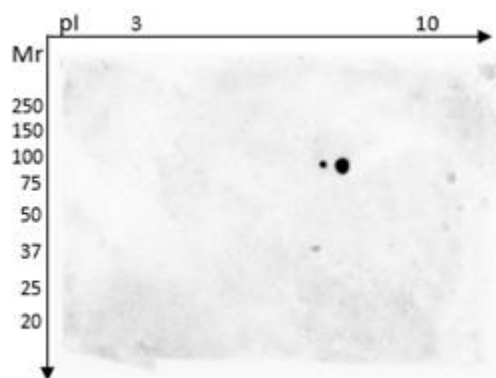
Na jeden cyklus promytí všech kanálů je nutné mít připraveno 600 ml promývacího roztoku. Při používání promývací stanice bylo vždy nutné počítat s objemem o 20 % větším, než je uvedeno v software, neboť tento objem zůstával v kanálovém systému. To vysvětluje i uváděné nevýhody spojené s využíváním Postupu 2, tzn. všechny používané roztoky jsou naředěny předchozími nasávanými roztoky, které zůstaly jako zbytkový objem v hadičkách stanice.

Promývací stanice byla po odhalení znečištění čištěna dle tohoto protokolu po dobu několika týdnů, dokud nedošlo ke kompletnímu vyčištění. U každé analýzy byl analyzován i již známý vzorek imunoreaktivního séra, znečištění bylo odhaleno ve chvíli, kdy několik analýz kontrolně pozitivních sér (nebo zlatého standardu) neposkytlo očekávané výsledky.

Předpokládá se, že biofilm zapříčinil nespecifickou sorpci některých proteinů séra, včetně protilátek. Kvalita promývacích kroků byla ověřena pomocí opakovaného vyšetření vzorků séra se známým obsahem protilátek (Obrázky č. 74 a 75). Výsledky pokusu odpovídali očekávaným výsledkům i výsledkům porovnávací analýzy Postupu 1, proto bylo možné promývací stanici opět začít využívat.



Obrázek č. 74 – Záznam NC membrány po detekci munoreaktivity séra zdravého dárce (č. 4430) (test promývací stanice)



Obrázek č. 75 - Záznam NC membrány po detekci munoreaktivity séra zlatý standard“ (test promývací stanice)

5 Závěr

V této práci byla zavedeny postupy pro vyšetřování a průkaz specifických přirozených autoprotilátek třídy IgG v sérech pacientů s mnohočetným myelomem pomocí metody sérologické proteomické analýzy (SERPA). Byly optimalizovány postupy pro jednotlivé kroky, od přípravy buněčného lyzátu s využitím modelové nádorové linie RPMI 8226, zavedení dvourozměrné elektroforetické separace proteinů z buněčného lyzátu a jejich přenos z gelu na nitrocelulózovou membránu pomocí metody semi-dry western blot a následnou inkubaci membrán s patientskými séry a sekundární protilátkou.

Byly zavedeny postup pro vizualizaci vzniklého imunokomplexu na membráně na principu detekce chemiluminiscenčního signálu s využitím substrátu ECL a vyfocení pomocí stanice G:BOX Chemi XX6, kde byly všechny snímky membrán s imunoreaktivními spoty dále vyhodnoceny pomocí software GeneSys a GeneTools. Pro analýzy využívající postup s promývací stanicí FlexiWash FW400 byly zavedeny postupy pro její údržbu a čištění.

Díky optimalizovanému postupu a úpravě podmínek pro analýzu SERPA bylo možné dosahovat lepších výsledků v kratším čase s vyšší reprodukovatelností a možností lépe ověřit předchozí výsledky. Postupně byla vyšetřena patientská séra od pěti pacientů (celkem se jednalo o 32 vzorků sér. Pro validaci bylo vyšetřeno i pět vzorků sér od zdravých dárců a v rámci kontroly pozitivních nálezů byly všechny výsledky vztahovány k silně pozitivnímu séru zvolenému „zlatým standardem“.

Bylo zjištěno, že se u některých pacientů objevují některé imunoreaktivní spoty opakovaně, obzvláště spot, který se objevoval v místě membrány s předpokládaným umístěním proteinu ENO1 (47 kDa, pI 6,5-7). Výskyt imunoreaktivity sér s proteinem ENO1 byl potvrzen pomocí LC-MS analýzy, kromě toho byly potvrzeny i další proteiny aj.

Pro nízký počet vyšetřovaných vzorků pacientů s mnohočetným myelome nebylo možné dosáhnout statisticky významných výsledků. Proto se jednalo se o pilotní výsledky, které budou dále sloužit jako podklad pro další analýzy vyšší kohorty pacientů, tak aby bylo možné výsledky statisticky vyhodnotit a provést závěry ohledně souvislosti výskytu přirozených protilátek s dobou odběru séra a prognózou pacienta.

Zatím lze pouze předpokládat, že výskyt specifických autoprotilátek sérech pacientů má souvislost s jejich prognózou. Lze diskutovat o roli protilátek, která může být protektivní a značit přímou účast v protinádorové imunitní odpovědi nebo být jen vedlejším projevem jako reakce na specifické nádorových antigenů nebo na zvýšenou expresi antigenů s nádory asociovanými.

Dosud nezodpovězenou otázkou je: „Jak rozpoznávat, zda se tvorba přirozených autoprotilátek vymkla kontrole nebo je cílená, a jakou měrou ji ovlivňuje nádorové mikroprostředí nebo zahájení terapie, včetně autologní hematopoetické transplantace kmenových buněk?“

Předpokládá se, že protilátky anti-ENO1 u mnohočetného myelomu mohou být v budoucnu významným diagnostickým a/nebo prognostickým biomarkerem. Pokud by se takový předpoklad potvrdil, bylo by možné uplatnit tyto znalosti i v imunoterapeutických přístupech, např. pro tvorbu monoklonálních protilátek se specifitou anti-ENO1. Výskyt přirozených autoprotilátek anti-ENO1 u pacientů s MM by mohl být i biomarkerem, jenž byl sloužil pro monitorování úspěšnosti imunoterapie. [33]

Obecně lze říci, že monitorování proteinové rovnováhy u pacientů s mnohočetným myelomem by měl být jeden z nejdůležitějších terapeutických cílů. V nynější době je snaha hledat nové efektivnější imunoterapeutické strategie pro zacílení myelomových buněk v nádorovém mikroprostředí. V klinické praxi jsou více a více uplatňovány nástroje genomiky a personalizovaná medicína. Na poli výzkumu jsou neustále vyvíjeny nové, robustnější a vyspělejší techniky, jedná se především o proteomické techniky. Jejich úskalím je však mnohdy vysoká finanční náročnost na provoz, např. vyžadují speciální chemické reagenty, software, robotické systémy apod. [119]

Citovaná literatura

- [1] YAMAMOTO, L., N. AMODIO, A. GULLA a K. ANDERSON. Harnessing the Immune System Against Multiple Myeloma: Challenges and Opportunities. *Frontiers in oncology* [online]. 2021, (10), 606368 [cit. 2022-03-19]. Dostupné z: doi:10.3389/fonc.2020.606368.
- [2] KUMAR, S., V. RAJKUMAR, R. KYLE, M. VAN DUIN, P. SONNEVELD a K. ANDERSON. Multiple myeloma. *Nature reviews: Disease primers* [online]. 2017, (3), 17046 [cit. 2022-03-19]. Dostupné z: doi:10.1038/nrdp.2017.46.
- [3] DEVITA, V.T., S. HELLMAN a S. ROSENBERG. Cancer: Principles and Practice of Oncology. In: *Leukemia, lymphoma and multiple myeloma* [online]. 11. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2018, 37:S68 [cit. 2022-01-16]. ISBN 978-1496394637. Dostupné z: <https://themmrf.org/multiple-myeloma/>
- [4] KYLE, R. a D. STEENSMA. History of multiple myeloma. *Recent results in cancer research* [online]. 2011, (183), 3–23 [cit. 2022-01-16]. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-540-85772-3_1.
- [5] GLAVEY, S. a N. LEUNG. Monoclonal gammopathy: The good, the bad and the ugly. *Blood reviews* [online]. 2016, **30**(3), 223–231 [cit. 2022-01-20]. Dostupné z: doi:10.1016/j.blre.2015.12.001.
- [6] VARDIMAN, J., N. HARRIS a R. BRUNNING. The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood* [online]. 2002, **100**(7), 2292–2302 [cit. 2022-01-20]. Dostupné z: doi:10.1182/blood-2002-04-1199.
- [7] Česká myelomová skupina. In: *CMG spolek* [online]. 2022 [cit. 2022-01-16]. Dostupné z: <https://www.myeloma.cz/index.php?pg=mnohocetny-myelom--zakladni-udaje--statistika>
- [8] KUMAR, S. a S. RAJKUMAR. The multiple myelomas - current concepts in cytogenetic classification and therapy. *Nature reviews Clinical oncology* [online]. 2018, **15**(7), 409–421 [cit. 2022-01-16]. Dostupné z: doi:/s41571-018-0018-y.
- [9] NARITA, T., A. INAGAKI, T. KOBAYASHI, Y. KURODA a T. FUKUSHIMA. Chromosomal translocation (14;16)-positive multiple myeloma shows negativity for cd56 expression and unfavorable outcome even in the era of novel drugs. *Blood* [online]. 2014, **124**(21), 3349 [cit. 2022-01-16]. Dostupné z: doi:10.1182/blood.V124.21.3349.3349.
- [10] PADALA, S., A. BARSOUK, A. BARSOUK, P. RAWLA a A. VAKITI. Epidemiology, Staging, and Management of Multiple Myeloma. *Medical sciences* [online]. Basel, Switzerland, 2021, **9**(1), 3 [cit. 2022-01-19]. Dostupné z: doi:10.3390/medsci9010003.

- [11] Multiple myeloma in numbers. In: *Oncopeptides* [online]. Stockholm, 2018 [cit. 2022-01-16]. Dostupné z: <https://www.oncopeptides.com/en/innovation/research-areas/multiple-myeloma>
- [12] KLEUTGHEN, P. Good News for Myeloma Patients: Steadily Improving Outcomes With "Total Therapy". In: *Myelomacrowd* [online]. Draper, Utah: HealthTree Foundation, 2020 [cit. 2022-02-26]. Dostupné z: <https://www.myelomacrowd.org/good-news-for-myeloma-patients-steadily-improving-outcomes-with-total-therapy/>
- [13] PALUMBO, A. a K. ANDERSON. Multiple myeloma. *New England Journal of Medicine* [online]. 2011, **11**(364), 1046–1060 [cit. 2022-02-26]. Dostupné z: doi:10.1056/NEJMra1011442.
- [14] KURTIN, S.E. a B. FAIMAN. The changing landscape of multiple myeloma: implications for oncology nurses. In: *Semantic scholar* [online]. Clinical journal of oncology nursing, 2013 [cit. 2022-02-26]. Dostupné z: <https://www.semanticscholar.org/paper/The-changing-landscape-of-multiple-myeloma%3A-for-Kurtin-Faiman/a088033421a4db8950c37745fcbc5d494311eb6b>
- [15] MICHELS, T. a K. PETERSEN. Multiple Myeloma: Diagnosis and Treatment. *American family physician* [online]. 2017, **6**(95), 373–383 [cit. 2022-02-25]. Dostupné z: <https://www.aafp.org/afp/2017/0315/p373.html?email=ZWw1U1NvTIZObEEwSkZBbEJNQUU0cGpRMldDWExRS1JjZW8za3kvOTYzVUJjSTVvBGlY0UdLZE50dzZ5d1ZwVY0tTnZ2T0d0RDJUMTg0ajUxeEk2V0c4dz09-->
- [16] PALUMBO, A., H. JOHNSEN, M. ENGELHARDT a F. GAY. The clinical relevance and management of monoclonal gammopathy of undetermined significance and related disorders: recommendations from the European Myeloma Network. *Guidelines* [online]. 2014, **99**(6), 984–996 [cit. 2022-01-16]. Dostupné z: doi:10.3324/haematol.2013.100552.
- [17] ESLICK, R. a D. TALAULIKAR. Multiple myeloma: from diagnosis to treatment. *Australian Family Physician* [online]. 2013, **42**(10) [cit. 2022-01-16]. Dostupné z: <https://www.racgp.org.au/afp/2013/october/multiple-myeloma/>
- [18] DIMOPOULOS, M., R. KYLE, J. FERMAND a S. RAJKUMAR. Consensus recommendations for standard investigative workup: Report of the International Myeloma Workshop Consensus Panel 3. *Blood* [online]. 2011, **18**(117), 4701–5 [cit. 2022-04-11]. Dostupné z: doi:10.1182/blood-2010-10-299529.
- [19] ŠÁLEK, T. Laboratorní diagnostika mnohočetného myelomu. *Interní medicína*. 2008, **9**(10), 407–409.
- [20] RIBOURTOUT, B. a M. ZANDECKI. Plasma cell morphology in multiple myeloma and related disorders. *ScienceDirect*. Institut de biologie en santé, 2015, **99**(325), 38–62. Dostupné z: doi:10.1016/j.morpho.2015.02.001.

- [21] XU, J., Y. TANG, S. ZHAO a Y. WU. Angioimmunoblastic T-Cell Lymphoma with Coexisting Plasma Cell Myeloma: A Case Report and Review of the Literature. *The Tohoku Journal of Experimental Medicine* [online]. 2015, **4**(235), 283-8 [cit. 2022-04-12]. Dostupné z: doi:10.1620/tjem.235.283.
- [22] MULÉ, S., E. REIZINE, P. BLANC-DURAND, L. BARANES, P. ZERBIB a R. BURNS. Whole-Body Functional MRI and PET/MRI in Multiple Myeloma. *Cancers* [online]. 2020, **11**(12), 3155 [cit. 2022-02-25]. Dostupné z: doi:10.3390/cancers12113155.
- [23] HILLEGASS, J., S. USMANI, S. RAJKUMAR, B. DURIE, M. MATEOS a S. LONIAL. International myeloma working group consensus recommendations on imaging in monoclonal plasma cell disorders. *The Lancet Oncology* [online]. 2019, **6**(20), 302–312 [cit. 2022-04-12]. Dostupné z: doi:10.1016/S1470-2045(19)30309-2.
- [24] DURIE, B., R. KYLE, A. BELCH, W. BENSINGER, J. BLADE a M. BOCCADORO. Myeloma management guidelines: a consensus report from the scientific advisors of the international myeloma foundation. *The Hematology Journal* [online]. 2003, **4**(6), 379–398 [cit. 2022-02-25]. Dostupné z: doi:10.1038/sj.thj.6200312.
- [25] ADAM, Z., M. KREJČÍ, L. POUR, E. ŠEVČÍKOVÁ, A. KŘIVANOVÁ a Z. ŘEHÁK. Monoklonální gamapatie nejistého významu a asymptomatický mnohočetný myelom z pohledu roku 2014. *Vnitřní lékařství* [online]. 2014, **10**(60), 861-879 [cit. 2022-04-12]. Dostupné z: https://www.casopisvnitrnilekarstvi.cz/artkey/vnl-201410-0010_monoclonal-gammopathy-of-undetermined-significance-and-asymptomatic-multiple-myelom-in-the-year-2014.php
- [26] RAJKUMAR, S., J. HOGAN a N. LEUNG. Diagnosis and treatment of monoclonal gammopathy of renal significance. *UpToDate* [online]. 2019 [cit. 2022-04-13]. Dostupné z: <https://www.uptodate.com/contents/diagnosis-and-treatment-of-monoclonal-gammopathy-of-renal-significance>
- [27] CHEE, C., A. DISPENZIERI a M. GERTZ. Amyloidosis and POEMS syndrome. *Expert opinion on pharmacotherapy* [online]. 2010, **9**(11), 1501–1514 [cit. 2022-04-12]. Dostupné z: doi:10.1517/14656561003769874.
- [28] ŽÁRSKÁ, M., D. VRÁBEL, R. BEZDĚKOVÁ, M. ŠTORK, M. JAROŠOVÁ a Z. ADAM. Plazmocelulární leukemie – zapomenutá nemoc. *Klinická onkologie* [online]. 2019, **1**(32), 40-46 [cit. 2022-04-13]. Dostupné z: doi:10.14735/amko201940.
- [29] SHUKRY, S., F. HARIRI a A. WAHAB AL-NEHMI. Target Therapy in Hematological Malignancies. *IntechOpen* [online]. National Oncology Center, 2019, 11-12 [cit. 2022-02-26]. Dostupné z: doi:10.5772/INTECHOPEN.84696.

- [30] KURTIN, S. E. Relapsed or relapsed/refractory multiple myeloma. *Journal of the Advanced Practitioner in Oncology* [online]. University of Arizona Cancer Center, 2013, **1**(4), 5-14 [cit. 2022-02-26]. Dostupné z: [https://www.advancedpractitioner.com/cme-supplements/volume-4,-supplement-1-\(novdec-2013\)/relapsed-or-relapsedrefractory-multiple-myeloma.aspx](https://www.advancedpractitioner.com/cme-supplements/volume-4,-supplement-1-(novdec-2013)/relapsed-or-relapsedrefractory-multiple-myeloma.aspx)
- [31] FAZEL, F. a F. BASSA. An approach to the diagnosis and management of multiple myeloma. *South African Medical Journal* [online]. 2019, **10**(109), 723 [cit. 2022-02-26]. Dostupné z: doi:10.7196/SAMJ.2019.v109i10.14376.
- [32] TORIMOTO, Y., M. SHINDO, K. IKUTA a Y. KOHGO. Current therapeutic strategies for multiple myeloma. *International journal of clinical oncology* [online]. 2015, **3**(20), 423–430 [cit. 2022-02-26]. Dostupné z: doi:10.1007/s10147-015-0826-3.
- [33] RAY, A., Y. SONG, T. DU, D. CHAUHAN a K. ANDERSON. Preclinical validation of Alpha-Enolase (ENO1) as a novel immunometabolic target in multiple myeloma. *Oncogene* [online]. 2020, **13**(39), 2786–2796 [cit. 2022-03-04]. Dostupné z: doi:10.1038/s41388-020-1172-0.
- [34] VAUPEL, P., H. SCHMIDBERGER a A. MAYER. The Warburg effect: essential part of metabolic reprogramming and central contributor to cancer progression. *International journal of radiation biology* [online]. 2019, **7**(95), 912–919 [cit. 2022-03-04]. Dostupné z: doi:10.1080/09553002.2019.1589653.
- [35] LUDWIG, H., W. POENISCH, S. KNOP, A. EGGLE, M. SCHREDER a D. LECHNER. Ixazomib–Thalidomide–Dexamethasone for induction therapy followed by Ixazomib maintenance treatment in patients with relapsed/refractory multiple myeloma. *British journal of cancer* [online]. 2019, (121), 751–757 [cit. 2022-02-26]. Dostupné z: doi:10.1038/s41416-019-0581-8.
- [36] SHAH, U. a S. MAILANKODY. Emerging immunotherapies in multiple myeloma. In: *British Medical Journal* [online]. 2020 [cit. 2022-02-26]. Dostupné z: <https://www.bmj.com/content/370/bmj.m3176>
- [37] HRABOVSKÝ, Š. CAR T-lymfocyty: horká novinka v léčbě nádorů. *Vnitřní lékařství* [online]. Interní hematologická a onkologická klinika LF MU a FN Brno, 2020, **7**(66), 420-424 [cit. 2022-02-26]. Dostupné z: <https://www.prolekare.cz/casopisy/vnitri-lekarstvi/2020-7-5/car-t-lymfocyty-horka-novinka-v-lecbe-nadoru-125184>
- [38] PINTO, P., R. BERGANTIM, H. CAIRES, H. SECA, J. GUIMARÃES a M. VASCONCELOS. Multiple Myeloma: Available Therapies and Causes of Drug Resistance. *Cancers* [online]. 2020, **2**(12), 407 [cit. 2022-02-26]. Dostupné z: doi:10.3390/cancers12020407.

- [39] BRIGHTON, T., A. KHOT, S. HARRISON, D. GHEZ, B. WEISS a A. KIRSCH. Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Multicenter Study of Siltuximab in High-Risk Smoldering Multiple Myeloma. *American Association for Cancer Research* [online]. 2019, **13**(25), 3772–3775 [cit. 2022-02-26]. Dostupné z: doi:10.1158/1078-0432.CCR-18-3470.
- [40] LONIAL, S., B. DURIE, A. PALUMBO a J. SAN-MIGUEL. Monoclonal antibodies in the treatment of multiple myeloma: current status and future perspectives. *Leukemia volume* [online]. 2016, (30), 526–535 [cit. 2022-02-26]. Dostupné z: <https://www.nature.com/articles/leu2015223>
- [41] O'DONNELL, E. a N. RAJE. New monoclonal antibodies on the horizon in multiple myeloma. *Therapeutic Advances in Hematology* [online]. 2017, **8**(2), 41–53 [cit. 2022-02-26]. Dostupné z: doi:10.1177/2040620716682490.
- [42] TAI, Y., P. MAYES, C. ACHARYA, M. ZHONG, M. CEA a A. CAGNETTA. Novel anti-B-cell maturation antigen antibody-drug conjugate (GSK2857916) selectively induces killing of multiple myeloma. *Blood* [online]. 2014, **20**(123), 3128–3138 [cit. 2022-03-20]. Dostupné z: doi:10.1182/blood-2013-10-535088.
- [43] FORMÁNKOVÁ, R. a J. STARÝ. Transplantace hematopoetických kmenových buněk v léčbě nemaligních onemocnění krvetvorby. *Vnitřní lékařství*. 2018, **5**(64), 530–536.
- [44] DU, J., D. YU, X. HAN, L. ZHU a Z. HUANG. Comparison of Allogeneic Stem Cell Transplant and Autologous Stem Cell Transplant in Refractory or Relapsed Peripheral T-Cell Lymphoma: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Network Open* [online]. 2021, **5**(4), 219807 [cit. 2022-04-13]. Dostupné z: doi:10.1001/jamanetworkopen.2021.9807.
- [45] KINKER, G., G. VITIELLO, W. FERREIRA, A. CHAVES, V. CORDEIRO DE LIMA a T. MEDINA. B Cell Orchestration of Anti-tumor Immune Responses: A Matter of Cell Localization and Communication. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* [online]. 2021, **9** [cit. 2022-02-27]. Dostupné z: doi:10.3389/fcell.2021.678127.
- [46] DUNN, G., L. OLD a R. SCHREIBER. The Immunobiology of Cancer Immunosurveillance and Immunoediting. *Immunity* [online]. 2004, **21**(2), 137-138 [cit. 2021-04-23]. Dostupné z: doi:10.1016/j.immuni.2004.07.017.
- [47] RIBATTI, D. The concept of immune surveillance against tumors. The first theories. *Oncotarget* [online]. 2017, **8**(4), 7175–7180 [cit. 2021-03-30]. Dostupné z: doi:10.18632/oncotarget.12739.
- [48] CASEY, M. a K. NAKAMURA. The Cancer-Immunity Cycle in Multiple Myeloma. *Immunotargets and therapy* [online]. 2021, **10**, 247-260 [cit. 2022-02-27]. Dostupné z: doi:10.2147/ITT.S305432.
- [49] NAKAMURA, K., M. SMYTH a L. MARTINET. Cancer immunoediting and immune dysregulation in multiple myeloma. *Blood* [online]. 2020, **24**(136), 2731–2740 [cit. 2022-02-27]. Dostupné z: doi:10.1182/blood.2020006540.

- [50] JOCHEMS, C. a J. SCHLOM. Tumor-infiltrating immune cells and prognosis: the potential link between conventional cancer therapy and immunity. *Experimental biology and medicine* [online]. 2011, **5**(236), 567–579 [cit. 2021-03-30]. Dostupné z: doi:10.1258/ebm.2011.011007.
- [51] WANG, S., Y. MA, X. WANG, J. JIANG, Ch. ZHANG a X. WANG. IL-17A increases multiple myeloma cell viability by positively regulating syk. *Translational Oncology* [online]. 2019, **12**(8), 1086-1091 [cit. 2022-02-27]. Dostupné z: doi:10.1016/j.tranon.2019.04.023.
- [52] DE JONGE, H., L. IAMELE, M. MAGGI, G. PESSINO a C. SCOTTI. Anti-Cancer auto-Antibodies: roles, applications and open issues. *Cancers* [online]. 2021, **4**(13), 813 [cit. 2022-03-11]. Dostupné z: doi:10.3390/cancers13040813.
- [53] SMITH, C., S. SELITSKY a S. CHAI. Alternative tumour-specific antigens. *Nature Reviews Cancer* [online]. 2019, **19**, 465–478 [cit. 2021-04-17]. Dostupné z: doi:10.1038/s41568-019-0162-4.
- [54] LIU, Z., T. POIRET, O. PERSSON, Q. MENG, L. RANE a J. BARTEK. NY-ESO-1- and survivin-specific T-cell responses in the peripheral blood from patients with glioma. *Cancer Immunology, Immunotherapy volume* [online]. 2018, (67), 237–246 [cit. 2022-03-18]. Dostupné z: doi:10.1007/s00262-017-2066.
- [55] WALZ, S., J. STICKEL, D. KOWALEWSKI, H. SCHUSTER, K. WEISEL a L. BACKERT. The antigenic landscape of multiple myeloma: mass spectrometry (re)defines targets for T-cell-based immunotherapy. *Blood* [online]. 2015, **10**(126), 1203–1213 [cit. 2022-02-27]. Dostupné z: doi:10.1182/blood-2015-04-640532.
- [56] ROSENBLUM, M., K. REMEDIOS a A. ABBAS. Mechanisms of human autoimmunity. *The Journal of clinical investigation* [online]. 2015, **6**(125), 2228–2233 [cit. 2022-03-11]. Dostupné z: doi:10.1172/JCI78088.
- [57] MILLER, A., Y. ASMANN, L. CATTANEO, E. BRAGGIO, J. KEATS a D. AUCLAIR. High somatic mutation and neoantigen burden are correlated with decreased progression-free survival in multiple myeloma. *Blood cancer journal* [online]. 2017, **9**(7), 612 [cit. 2022-02-27]. Dostupné z: doi:10.1038/bcj.2017.94.
- [58] CHOVANCOVÁ, Z. Imunosenescence – západ slunce nad imunitním systémem. *Vnitřní lékařství*. Lékařská fakulta Masarykovy univerzity, 2020, **6**(66), 353–358.
- [59] ELKON, K. a P. CASALI. Nature and functions of autoantibodies. *Nature clinical practice. Rheumatology* [online]. 2008, **4**(9), 491–494 [cit. 2021-04-21]. Dostupné z: doi:10.1038/npcrheum0895.
- [60] HRDÁ, P. a I. ŠTERZL. Vyšetření autoprotilátek - současné možnosti. *Interní medicína*. 2003, **5**(8), 410-413.

- [61] ZHENG, X. a T. WENWEI. Dual Face of V γ 9V δ 2-T Cells in Tumor Immunology: Anti- versus Pro-Tumoral Activities. In: *Frontiers in Immunology*. [online]. 2017 [cit. 2022-04-13]. Dostupné z: https://www.researchgate.net/figure/Antitumoral-versus-pro-tumoral-activities-of-human-Vg9Vd2-T-cells-Vg9Vd2-T-cells_fig2_319322185
- [62] NAGELE, E., M. HAN, N. ACHARYA, C. DEMARSHALL, M. KOSCIUK a R. NAGELE. Natural IgG autoantibodies are abundant and ubiquitous in human sera, and their number is influenced by age, gender and disease. *PLoS ONE* [online]. 2013, **4**(8), 60726 [cit. 2022-03-11]. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0060726.
- [63] AVRAMEAS, S., H. ALEXOPOULOS a H. MOUTSOPOULOS. Natural Autoantibodies: An Undersung Hero of the Immune System and Autoimmune Disorders—A Point of View. *Frontiers in immunology* [online]. 2018, **9**(1320) [cit. 2021-03-28]. Dostupné z: doi:10.3389/fimmu.2018.01320.
- [64] GU, Y., Y. LIU, L. FU, L. ZHAI, J. ZHU a Y. HAN. Tumor-educated B cells selectively promote breast cancer lymph node metastasis by HSPA4-targeting IgG. *Nature Medicine* [online]. 2019, (25), 312–322 [cit. 2022-03-18]. Dostupné z: doi:10.1038/s41591-018-0309-y.
- [65] GENG, G., X. YU, J. JIANG a X. YU. Aetiology and pathogenesis of paraneoplastic autoimmune disorders. *Autoimmunity Reviews* [online]. 2020, **1**(19), 102422 [cit. 2022-03-11]. Dostupné z: doi:10.1016/j.autrev.2019.102422.
- [66] MICHAUD, D., C. STEWARD, B. MIRLEKAR a Y. PYLAYEVA-GUPTA. Regulatory B cells in cancer. *Immunological reviews* [online]. 2021, **1**(299), 74–92 [cit. 2022-03-18]. Dostupné z: doi:10.1111/imr.12939.
- [67] CHAPMAN, C., A. MURRAY, J. MCELVEEN, U. SAHIN, U. LUXEMBURGER a Ö TÜRECI. Autoantibodies in lung cancer: possibilities for early detection and subsequent cure. *Thorax* [online]. 2008, (63), 228-233 [cit. 2022-03-11]. Dostupné z:
- [68] KATO, T., J. FAHRMANN, S. HANASH a J. VYKOUKAL. Extracellular vesicles mediate B cell immune response and are a potential target for cancer therapy. *Cells* [online]. 2020, **6**(9), 1518 [cit. 2022-03-18]. Dostupné z: doi:10.3390/cells9061518.
- [69] XIAOBO, Y. *AAG atlas* [online]. In: . [cit. 2022-03-11]. Dostupné z: http://biokb.cloudna.cn/aagatlas_portal/
- [70] *Antibodypedia* [online]. [cit. 2022-03-11]. Dostupné z: <https://www.antibodypedia.com/>
- [71] ŠTĚPAŘOVÁ, Kateřina. *Role autoprotilátek v boji proti nádorům* [online]. Univerzita Pardubice, 2021 [cit. 2022-04-24]. Dostupné z: <https://dk.upce.cz/handle/10195/78378>. Bakalářská práce. Univerzita Pardubice. Vedoucí práce Zuzana Bílková.
- [72] CHEN, D. a I. MELLMAN. Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle. *Immunity* [online]. 2013, **1**(39), 1–10 [cit. 2022-03-04]. Dostupné z: doi:10.1016/j.immuni.2013.07.012.

- [73] ATANACKOVIC, D., Y. HILDEBRANDT, A. JADCZAK, Y. CAO, T. LUETKENS a S. MEYER. Cancer–testis antigens MAGE-C1/CT7 and MAGE-A3 promote the survival of multiple myeloma cells. *Haematologica* [online]. 2010, **5**(95), 785–793 [cit. 2022-03-04]. Dostupné z: doi:10.3324/haematol.2009.014464.
- [74] BEVAART, L., M. JANSEN, M. VAN VUGT, J. VERBEEK, J. VAN DE WINKEL a J. LEUSEN. The high-affinity IgG receptor, FcγRI, plays a central role in antibody therapy of experimental melanoma. *Cancer research* [online]. 2006, **3**(66), 1261–1264 [cit. 2022-03-04]. Dostupné z: doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-2856.
- [75] LUETKENS, T., S. KOBOLD, Y. CAO, M. RISTIC, G. SCHILLING a S. TAMS. Functional autoantibodies against SSX-2 and NY-ESO-1 in multiple myeloma patients after allogeneic stem cell transplantation. *Cancer immunology, immunotherapy* [online]. 2014, **11**(63), 1151–1162 [cit. 2022-03-04]. Dostupné z: doi:10.1007/s00262-014-1588-x.
- [76] HSIAO, K., N. SHIH, H. FANG, T. HUANG, C. KUO a P. CHU. Surface α -enolase promotes extracellular matrix degradation and tumor metastasis and represents a new therapeutic target. *PloS one* [online]. 2013, **7**(8), 69354 [cit. 2022-03-06]. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0069354.
- [77] CAPELLO, M., S. FERRI-BORGOGNO, P. CAPELLO a F. NOVELLI. α -Enolase: a promising therapeutic and diagnostic tumor target. *The FEBS journal* [online]. 2011, **7**(278), 1064–1074 [cit. 2022-03-05]. Dostupné z: doi:10.1111/j.1742-4658.2011.08025.x.
- [78] CAPELLO, P., M. PRINCIPE, S. BULFAMANTE a F. NOVELLI. Alpha-Enolase (ENO1), a potential target in novel immunotherapies. *Frontiers in bioscience* [online]. 2017, **5**(22), 944–959 [cit. 2022-03-04]. Dostupné z: doi:10.2741/4526.
- [79] ENO3 enolase 3 [Homo sapiens (human)]. In: *National Library of Medicine* [online]. The National Center for Biotechnology Information [cit. 2022-04-20]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2027>
- [80] CLEGG, N., C. FERGUSON, L. TRUE, H. ARNOLD, A. MOORMAN a J. QUINN. Molecular characterization of prostatic small-cell neuroendocrine carcinoma. *The Prostate* [online]. 2003, **1**(55), 55-64 [cit. 2022-04-20]. Dostupné z: doi:10.1002/pros.10217.
- [81] LIN, Y., N. SATANI, N. HAMMOUDI, V. YAN, Y. BAREKATAIN a S. KHADKA. An enolase inhibitor for the targeted treatment of ENO1-deleted cancers. *Nature metabolism* [online]. 2020, (2), 1413–1426 [cit. 2022-03-04]. Dostupné z: doi:10.1038/s42255-020-00313-3.
- [82] PLOW, E. a R. DAS. Enolase-1 as a plasminogen receptor. *Blood* [online]. 2009, **22**(113), 5371–5372 [cit. 2022-03-06]. Dostupné z: doi:10.1182/blood-2009-03-208546.

- [83] BAE, S., H. KIM, N. LEE, C. WON, H. KIM a Y. HWANG. α -Enolase expressed on the surfaces of monocytes and macrophages induces robust synovial inflammation in rheumatoid arthritis. *Journal of immunology* [online]. 2012, **1**(189), 365–372 [cit. 2022-03-05]. Dostupné z: doi:10.4049/jimmunol.1102073.
- [84] YE, Y., C. KUHN, M. KÖSTERS, G. ARNOLD, H. ISHIKAWA-ANKERHOLD a C. SCHULZ. Anti α -enolase antibody is a novel autoimmune biomarker for unexplained recurrent miscarriages. *EBioMedicine* [online]. 2019, (41), 610–622 [cit. 2022-03-06]. Dostupné z: doi:10.1016/j.ebiom.2019.02.027.
- [85] SHIH, N., H. LAI, G. CHANG, H. LIN, Y. WU a J. LIU. Anti-alpha-enolase autoantibodies are down-regulated in advanced cancer patients. *Japanese journal of clinical oncology* [online]. 2010, **7**(40), 663–669 [cit. 2022-03-05]. Dostupné z: doi:10.1093/jjco/hyq028.
- [86] PRINGLE, K., K. KIND, A. SFERRUZZI-PERRI, J. THOMPSON a C. ROBERTS. Beyond oxygen: complex regulation and activity of hypoxia inducible factors in pregnancy. *Human reproduction update* [online]. 2010, **4**(16), 415–431 [cit. 2022-03-06]. Dostupné z: doi:10.1093/humupd/dmp046.
- [87] CHAUHAN, D., A. SINGH, M. BRAHMANDAM, R. CARRASCO, M. BANDI a T. HIDESHIMA. Functional interaction of plasmacytoid dendritic cells with multiple myeloma cells: a therapeutic target. *Cancer cell* [online]. 2009, **4**(16), 309–323 [cit. 2022-03-04]. Dostupné z: doi:10.1016/j.ccr.2009.08.019.
- [88] LI, J., M. HUANG, Z. GUO, J. TENG, W. LI a J. ZHANG. Detection of autoantibodies against alpha-enolase (ENO1) as potential biomarkers improving immunodiagnosis in human osteosarcoma by serological proteome analysis. *Journal of Clinical Oncology* [online]. 2018, **15**(36) [cit. 2022-03-04]. Dostupné z: doi:10.1200/JCO.2018.36.15_suppl.e23506.
- [89] BARLOGIE, B., G. TRICOT, E. ANAISSIE, J. SHAUGHNESSY, E. RASMUSSEN a F. VAN RHEE. Thalidomide and hematopoietic-cell transplantation for multiple myeloma. *The New England journal of medicine* [online]. 2006, **10**(354), 1021–1030 [cit. 2022-03-04]. Dostupné z: doi:10.1056/NEJMoa053583.
- [90] SOWA, M., R. HIEMANN, P. SCHIERACK, D. REINHOLD, K. CONRAD a D. ROGGENBUCK. Next-Generation Autoantibody Testing by Combination of Screening and Confirmation—the CytoBead® Technology. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology volume* [online]. 2017, (53), 87–104 [cit. 2022-03-21]. Dostupné z: doi:10.1007/s12016-016-8574-3.
- [91] PETRAK, J., R. IVANEK, O. TOMAN, R. CMEJLA, J. CMEJDOVA a D. VYORAL. Déjà vu in proteomics. A hit parade of repeatedly identified differentially expressed proteins. *Proteomics* [online]. 2008, (8), 1744-1749 [cit. 2022-03-10]. Dostupné z: doi:10.1002/pmic.200700919.

- [92] JIN, Y., S KIM, H. KIM, W. JU, Y. KIM a H. KIM. Use of autoantibodies against tumor-associated antigens as serum biomarkers for primary screening of cervical cancer. *Oncotarget* [online]. 2017, **8**(62), 105425-105439 [cit. 2021-03-29]. Dostupné z: doi:10.18632/oncotarget.22231.
- [93] MINICOZZI, P., P. WALSH, M. SÁNCHEZ, A. TRAMA, K. INNOS a R. MARCOS-GRAGERA. Is low survival for cancer in Eastern Europe due principally to late stage at diagnosis?. *European journal of cancer* [online]. 2018, (93), 127–137 [cit. 2022-03-07]. Dostupné z: doi:10.1016/j.ejca.2018.01.084.
- [94] DAI, L., N. LEI, M. LIU a J. ZHANG. Autoantibodies to tumor-associated antigens as biomarkers in human hepatocellular carcinoma (HCC). *Experimental hematology & oncology* [online]. 2013, **1**(2), 15 [cit. 2022-03-07]. Dostupné z: doi:10.1186/2162-3619-2-15.
- [95] BELOUSOV, P.V. Analysis of the Repertoires of Circulating Autoantibodies' Specificities as a Tool for Identification of the Tumor-Associated Antigens: Current Problems and Solutions. . *Biochemistry Moscow* [online]. 2021, (86), 1225–1242 [cit. 2022-03-10]. Dostupné z: doi:10.1134/S0006297921100060.
- [96] GRANDJEAN, M., M. DIE, M. RAES a O. FERONA. A new method combining sequential immunoaffinity depletion and differential in gel electrophoresis to identify autoantibodies as cancer biomarkers. *Journal of Immunological Methods* [online]. 2013, **1-2**(396), 23-32 [cit. 2022-03-10]. Dostupné z: doi:10.1016/j.jim.2013.07.006.
- [97] LU, X., Q. PENG a G. WANG. The role of cancer-associated autoantibodies as biomarkers in paraneoplastic myositis syndrome. *Current opinion in rheumatology* [online]. 2019, **6**(31), 643–649 [cit. 2022-03-07]. Dostupné z: doi:10.1097/BOR.0000000000000641.
- [98] LI, P., J. SHI, M. XING, L. DAI, J. LI a J. ZHANG. *Evaluation of serum autoantibodies against tumor-associated antigens as biomarkers in lung cancer* [online]. 2017, **10**(39) [cit. 2022-03-07]. Dostupné z: doi:10.1177/1010428317711662.
- [99] QIU, C., Y. DUAN, B. WANG, J. SHI, P. WANG a H. YE. Serum anti-PDLIM1 autoantibody as diagnostic marker in ovarian cancer. *Frontiers in immunology* [online]. 2021, (12), 698312 [cit. 2022-03-07]. Dostupné z: doi:10.3389/fimmu.2021.698312.
- [100] YU, X., B. PETRITIS a J. LABAER. Advancing translational research with next-generation protein microarrays. *Proteomics and Systems Biology* [online]. 2016, **16**(8), 1238-1250 [cit. 2021-03-29]. Dostupné z: doi:10.1002/pmic.201500374.

- [101] WANG, Y., P. WANG, M. LIU, X. ZHANG, Q. SI a T. YANG. Identification of tumor-associated antigens of lung cancer: SEREX combined with bioinformatics analysis. *Journal of immunological methods* [online]. 2021, (492), 112991 [cit. 2022-03-07]. Dostupné z: doi:10.1016/j.jim.2021.112991.
- [102] PAVONI, E., P. VACCARO, A. PUCCI, G. MONTERIÙ, E. BEGHETTO a S. BARCA. Identification of a panel of tumor-associated antigens from breast carcinoma cell lines, solid tumors and testis cDNA libraries displayed on lambda phage. *BMC Cancer* [online]. 2004, **4**(78) [cit. 2022-03-07]. Dostupné z: doi:10.1186/1471-2407-4-78.
- [103] FREI, J. a J. LAI. Protein and Antibody Engineering by Phage Display. *Methods in enzymology* [online]. 2016, (580), 45-50 [cit. 2022-03-07]. Dostupné z: doi:10.1016/bs.mie.2016.05.005.
- [104] GRAHAM, K., M. VAYSBERG, A. KUO a P. UTZ. Autoantigen arrays for multiplex analysis of antibody isotypes. *Proteomics* [online]. 2006, **21**(6), 5720–5724 [cit. 2022-03-18]. Dostupné z: doi:10.1002/pmic.200600345.
- [105] MOHAN, D., D.L. WANSLEY, B.M. SIE, S. MUHAMMAD, A. BAER a U. LASERSON. PhIP-Seq characterization of serum antibodies using oligonucleotide-encoded peptidomes. *Nature Protocols* [online]. 2018, (13), 1958–1978 [cit. 2022-03-08]. Dostupné z: doi:10.1038/s41596-018-0025-6.
- [106] LARMAN, H., A. LIANG, S. ELLEDGE a J. ZHU. Discovery of protein interactions using parallel analysis of translated ORFs (PLATO). *Nature protocols* [online]. 2014, **1**(9), 90–103 [cit. 2022-03-08]. Dostupné z: doi:10.1038/nprot.2013.167.
- [107] OHYAMA, K. a N. KURODA. Chapter Four - Immune Complexome Analysis. MAKOWSKI, G. *Advances in Clinical Chemistry* [online]. 1. USA: Academic Press, 2013, s. 129-141 [cit. 2022-03-09]. ISBN 9780128002926. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/B9780124076815000040?via%3Dihub>
- [108] EHRLICH, J., S. QIN a B. LIU. The 'reverse capture' autoantibody microarray: a native antigen-based platform for autoantibody profiling. *Nature protocols* [online]. 2006, **1**(1), 452–460 [cit. 2021-07-06]. Dostupné z: doi:10.1038/nprot.2006.66
- [109] AYOGLU, B., J. SCHWENK a P. NILSSON. Antigen arrays for profiling autoantibody repertoires. *Bioanalysis* [online]. 2016, (8), 1105-1126 [cit. 2022-03-09]. Dostupné z: doi:10.4155/bio.16.31.

- [110] KAMHIEH-MILZ, J., V. STERZER, H. CELIK, O. KHORRAMSHAHI, F. MOFTAH a A. SALAMA. Identification of novel autoantigens via mass spectroscopy-based antibody-mediated identification of autoantigens (MS-AMIDA) using immune thrombocytopenic purpura (ITP) as a model disease. *Journal of proteomics* [online]. 2017, (157), 59–70 [cit. 2022-03-09]. Dostupné z: doi:10.1016/j.jprot.2017.01.012.
- [111] FULTON, K., A. ANANCHENKO, L. WOLFRAIM, S. MARTIN a S. TWINE. Classical Immunoproteomics: Serological Proteome Analysis (SERPA) for Antigen Identification. *Methods in molecular biology* [online]. 2019, (2024), 59–78 [cit. 2021-07-11]. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-4939-9597-4_3.
- [112] GANESAN, V., D. ASCHERMAN a J. MINDEN. Immunoproteomics technologies in the discovery of autoantigens in autoimmune diseases. *Biomolecular Concepts* [online]. 2016, (7), 133-143 [cit. 2022-03-09]. Dostupné z: doi:10.1515/bmc-2016-0007.
- [113] DAI, L., Y. QU, J. LI, X. WANG a K. WANG. Serological proteome analysis approach-based identification of ENO1 as a tumor-associated antigen and its autoantibody could enhance the sensitivity of CEA and CYFRA 21-1 in the detection of non-small cell lung cancer. *Oncotarget* [online]. 2017, (8), 36664-36673 [cit. 2022-03-09]. Dostupné z: doi:10.18632/oncotarget.17067.
- [114] HARDOUIN, J., J. LASSERRE, L. SYLVIUS, R. CARON a M. CARON. Cancer Immunomics: From Serological Proteome Analysis to Multiple Affinity Protein Profiling. *Annals of the New York Academy of Sciences* [online]. 2007, 1(1107), 223-30 [cit. 2022-03-09]. Dostupné z: doi:10.1196/annals.1381.024.
- [115] MISHRA, M., S. TIWARI a A. GOMES. Protein purification and analysis: next generation Western blotting techniques. In: *Europe PMC* [online]. Expert Review of Proteomics, 2017 [cit. 2022-04-16]. Dostupné z: <https://europepmc.org/article/pmc/6810642>
- [116] STEWART, R. Western Blotting. In: *Antibodies.com* [online]. [cit. 2022-04-16]. Dostupné z: <https://www.antibodies.com/es/western-blotting>
- [117] GHOSH, R., J. GILDA a A. GOMES. The necessity of and strategies for improving confidence in the accuracy of western blots. In: *Europe PMC* [online]. Expert Review of Proteomics, 2014 [cit. 2022-04-16]. Dostupné z: <http://europepmc.org/article/PMC/4791038>
- [118] SARIN, V., K. YU, I.D. FERGUSON, O. GUGLIEMINI, A. NIX a B. HANN. Evaluating the efficacy of multiple myeloma cell lines as models for patient tumors via transcriptomic correlation analysis. *Leukemia* [online]. 2020, (34), 2754–2765 [cit. 2022-04-17]. Dostupné z: doi:10.1038/s41375-020-0785-1.

- [119] TOZZOLI, R., C. BONAGURI, A. MELEGARI, A. ANTICO, D. BASSETTI a N. BIZZARO. Current state of diagnostic technologies in the autoimmunology laboratory. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* [online]. 2013, 1(51), 129-138 [cit. 2022-03-21]. Dostupné z: doi:10.1515/cclm-2012-0191.

Seznam příloh

<i>Příloha A - Potřebné chemikálie a příprava roztoků pro MS analýzu</i>	114
<i>Příloha B - Postup pro přípravu a analýzu proteinů pomocí MS</i>	115
<i>Příloha C - Vyhodnocení dat z MS analýzy</i>	116

Přílohy

Příloha A - Chemikálie a příprava roztoků pro MS analýzu

MS analýza (převzato od Mgr. Rudolf Kupčík, Ph.D.)

Reagencie, chemikálie a laboratorní přístroje:

Vzorky: vybrané spoty od 2DE (SERPA) – podrobnosti viz RK054_gels.pptx. Gel 1 – s 1 seříznutým rohem, Gel 2 – čtvercový gel; Kyselina trifluoroctová (TFA) – LC-MS Grade 50 ml, Thermo Pierce #85183; H₂O LC-MS Grade, Honeywell, Fisherbrand #39253-1L-R; Acetonitril (AcN) – LC-MS Grade, Honeywell, Fisherbrand #34967-1L; Metanol (MeOH) – LC-MS Grade, Honeywell, Fisherbrand #34966-2,5L; 1M triethylamonium bikarbonát (TEAB) – Thermo Pierce, #90114; Axygenová mikrotrubička Max. zotavení; TPP zkumavky 15 a 50 l; NH₄HCO₃ (A6141; Sigma); Jodoacetamid (IAA; I6125; Sigma); Dithiothreitol (DTT; D0632; Sigma); H₂O, třída LC-MS (39253-1L-R; Sigma); Trypsin – Promega, Sequencing grade upravený trypsin, 5 x 20 µg, Eastport # V5111.

Příprava roztoků:

100 mM NH₄HCO₃ (ABC); 10mM DTT; 55 mM IAA; 60 % ACN/2 % FA (FA do vody 40 µl FA + 160 µl vody (200 µl celkem) – 20 %, přidat 300 µl ACN + 50 µl 20% FA + 150 µl H₂O); 40%ACN/50mM NH₄HCO₃ (smíchat 400 µl ACN + 500 µl 100 mM NH₄HCO₃ + 100 µl vody); roztok trypsinu (10ng/µl)(přípravit těsně před použitím); 20 % TFA; 50 % ACN/0,1 % TFA (1 ml) (smíchat 500 µl ACN (Sigma) se 495 µl H₂O, 5 µl 20% TFA); 2 % AcN, 0,1 % TFA (20 ml) (přidat 400 µl AcN do 19,5 ml H₂O, přidat 100 µl 20% TFA).

MS analýza (převzato od Mgr. Rudolf Kupčík, Ph.D.)

Postup In-gel digest

Trávení bílkovin:

Vyřízněte vybraná místa z gelu a vložte do 0,6 ml zkumavek (podrobnosti viz RK054_Gels.pptx) a rozdrťte je na malé kousky se žlutou špičkou. Přidejte 100 μ l 40%ACN/50mM NH_4HCO_3 do kousků gelu a inkubujte 15 minut, odstraňte obarvený supernatant a opakujte předchozí krok, dokud není gel čirý, a na konci odstraňte supernatant. Přidejte 300 μ l ACN a promíchejte na vortexu \rightarrow gel zbledlá \rightarrow odstraňte supernatant. Přidejte 30 μ l 10mM DTT a promíchejte na vortexu – inkubujte 30 minut při 60 $^\circ\text{C}$, po inkubaci odstraňte supernatant. Přidejte 300 μ l ACN a promíchejte na vortexu \rightarrow gel zbledlá \rightarrow odstraňte supernatant. Přidejte 30 μ l 55mM IAA a promíchejte na vortexu – inkubujte 30 minut při teplotě místnosti v temnu, po inkubaci odstraňte supernatant. Přidejte 300 μ l ACN a promíchejte na vortexu \rightarrow gel zbledlá \rightarrow odstraňte supernatant. Aby se zabránilo nadměrné alkylnaci mycího gelu s 200 μ l 100 mM ABC. Přidejte 300 μ l ACN a promíchejte na vortexu \rightarrow gel zbledlá \rightarrow odstraňte supernatant. Přidejte 20-30 μ l (podle množství gelu) 10ng/ μ l roztoku trypsinu a nechte roztok trypsinu nasáknout do gelu na ledu nebo v lednici po dobu 30 minut. Zkontrolujte hladinu roztoku ve zkumavkách, pokud nejsou kousky gelu zcela pokryty tekutinou, přidejte další roztok trypsinu. Pokračujte v inkubaci po dobu 45 minut na ledu nebo v lednici nezávisle na předchozím kroku. Přidejte 10 μ l 100 mM NH_4HCO_3 . Inkubujte O/N při 37 $^\circ\text{C}$ (Termomixér) 450 ot./min.

Extrakce peptidů:

Odeberte supernatant z kousků gelu a okyselte 20% TFA a uschovejte pro případnou další analýzu (záložní vzorek). Přidejte 30 μ l (podle množství gelu) extrakčního roztoku – 60 % ACN/2 % FA. Inkubujte 30 minut při 37 $^\circ\text{C}$ 900 ot./min (termomixér). Odstřed'te a shromážděte extrahovanou tekutinu (bez kousků gelu). Vysušte supernatant a extrahované vzorky ve speedvacu (30 min). Uchovávejte vzorek supernatantu (záložní) v mrazničce. Extrahovaný vzorek se rozpustí ve 100 μ l 2% AcN, 0,1% TFA

SPE extrakce:

Vložte 2 malé kousky extrakčního disku C18 do úzkého konce špičky 200 μ l pipety. Kusy kotouče se vyříznou tupou jehlou (nařezou se na tvrdém povrchu např. Petriho misky), malý kousek extrakčního kotouče lze vyjmout užší jehlou. 1 kapka/2 s je doporučená rychlost. Nenechávejte kazetu zaschnout (pouze před krokem eluce). Jemně protlačte kapalinu přes kolonu použitím tlaku vzduchu (stříkačky). Promyjte kazetu 100 μ l CAN, uveďte do rovnováhy pomocí 2 % AcN, 0,1 % TFA, 100 μ l. Připravte nakládací pufr, vložte vzorek do 2% AcN, 0,1% TFA – 50 μ l. Promyjte zachycené peptidy 2% AcN, 0,1% TFA, dvakrát, 100 μ l. Eluujte peptidy do čisté mikrozkušavky s 50 μ l 50% ACN/0,1% TFA. Připravte eluční pufr, vysušte vzorky ve speedvacu a skladujte při – 80 $^\circ\text{C}$, bílá krabice (RK016, 018...)

Příloha C - Vyhodnocení dat z MS analýzy

MS analýza (převzato od Mgr. Rudolf Kupčík, Ph.D.)

MS analýza:

Vzorky rozpustíte ve 20 µl nanášecího pufru A. Nastříknete 2 µl vzorku – celkem 9 vzorků. LC metoda: 60_30_2-34,5-45_250nl_LW_NanoViperTrap_5ul_left (Metoda: Top10_IDA_60min_centroid_noLock, Zbytek vzorků se vrátil do 500 µl zkumavek Eppendorf a skladoval se při – 80 °C, bílý rámeček (RK016, 018.)).