

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

α -Enoláza – význam v patogenezi nádorových
buněk a v diagnostice

Diplomová práce 2022

Bc. Tomáš Mikeš

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

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Tomáš Mikeš**
Osobní číslo: **C21458**
Studijní program: **N0914P360001 Bioanalytická laboratorní diagnostika ve zdravotnictví**
Téma práce: **α -Enoláza – význam v patogenezi nádorových buněk a v diagnostice**
Téma práce anglicky: **α -Enolase – The Role In The Pathogenesis Of Tumor Cells And In Diagnostics**
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování

Teoretická část:

1. Vyhledejte a komentujte nové poznatky týkající se a) patogeneze vzniku nádorových buněk, b) role glykolytického enzymu α -Enoláza při vzniku nádorových buněk a buněk s metastatickým potenciálem, c) metabolických drah, kde se α -Enoláza uplatňuje a které mohou mít vztah ke vzniku buněk s maligním potenciálem.
2. Vymenujte a popište všechny dnes používané laboratorní metody a) vhodné pro průkaz α -Enolázy v biologickém materiálu (buněčném lyzátu) a pro jeho strukturní analýzu, b) vhodné pro izolaci a purifikaci α -Enolázy z biologického materiálu, c) vhodné pro stanovení aktivity enzymu. Uveďte a stručně popište i metody umožňující prokazovat přítomnost specifických protilátek proti Enoláze 1 v biologickém materiálu.
3. 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 průkaz α -Enolázy v buněčných lyzátech, tělních tekutinách, včetně optimalizace barvicích technik pro detekci proteinů přenesených na membránu.
2. Zavedení dvourozměrné elektroforetické techniky pro separaci buněčných proteinů s následnou imunodetekcí α -Enolázy.
3. Příprava vzorků pro strukturní analýzu α -Enolázy pomocí HPLC-ESI-MS.
4. Zavedení metod pro stanovení aktivity enzymu α -Enoláza.

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

Seznam doporučené literatury:

Vedoucí diplomové práce: **prof. RNDr. Zuzana Bílková, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd
Konzultant diplomové práce: **Mgr. Marcela Slovákova, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd
Datum zadání diplomové práce: **23. prosince 2022**
Termín odevzdání diplomové práce: **5. května 2023**

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

L.S.

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

V Pardubicích dne 28. února 2023

Prohlašuji:

Práci s názvem α -Enoláza – význam v patogenezi nádorových buněk a v diagnostice jsem vypracoval samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využil, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byl jsem seznámen s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., 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 5.5.2023

Bc. Tomáš Mikeš v.r.

Poděkování

Tímto bych rád poděkoval vedoucí mé diplomové práce paní prof. RNDr. Zuzaně Bílkové, Ph.D. za spolupráci a konzultace při zpracování mé diplomové práce a zejména pak za cenné rady, podnětné připomínky a konstruktivní kritiku, kterou mi při vedení práce poskytla. Mé díky patří i Bc. Michaele Dvořákové za spolupráci v laboratoři. Dále bych chtěl poděkovat paní Janě Kňavové a Mgr. Ondrovi Morávkovi za cenné rady při práci v laboratoři. Pokorně děkuji i své rodině a přátelům, kteří mě podporovali v průběhu celého studia.

Anotace

Diplomová práce se zaměřila na význam a funkci enzymu α -Enolázy a její vliv nejen při vzniku nádorových buněk, ale i v rámci boje imunitního systému proti nádorovým buňkám. V práci jsou popsány metody pro průkaz α -Enolázy, stanovení její aktivity a také metody pro průkaz protilátek proti α -Enoláze. V rámci experimentální části byla popsána a použita metoda sérologická imunoproteomová analýza, která byla použita k průkazu autoprotilátek anti-ENO1 IgG v séru pacientů s mnohočetným myelomem. Součástí experimentální části bylo stanovení aktivity enzymu α -Enoláza.

Klíčová slova

Mnohočetný myelom, α -Enoláza, přirozené autoprotilátky, SERPA

Annotation

The diploma thesis deals with the importance and function of the enzyme α -Enolase and its influence not only in the formation of tumor cells, but also in the fight of the immune system against tumor cells. The work describes methods for the detection of α -Enolase, determination of its activity, as well as methods for the detection of antibodies against α -Enolase. As part of the experimental part, the method of serological immunoproteome analysis was described and used to detect anti-ENO1 IgG autoantibodies in the serum of patients with multiple myeloma. Part of the experimental part was the determination of the activity of the enzyme α -Enolase.

Keywords

Multiple myeloma, α -Enolase, natural autoantibodies, SERPA

Obsah

Seznam obrázků a tabulek	10
Seznam zkratk	12
Úvod.....	14
1. Teoretická část	15
1.1. Patogeneze vzniku nádorových buněk	15
1.1.1. Udržení proliferativní signalizace.....	17
1.1.2. Zvýšení invazivity a vznik metastáz	18
1.1.3. Indukce angiogeneze.....	18
1.1.4. Schopnost nádorových buněk unikat indukci apoptózy	18
1.1.5. Deregulace buněčné energie	19
1.1.6. Schopnost nádorových buněk unikat imunitnímu dozoru	19
1.1.7. Neodpovídavost nádorových buněk k supresorům růstu	19
1.2. Faktory ovlivňující vznik nádorových buněk	20
1.2.1. Fyzikální faktory	20
1.2.2. Chemické noxy	20
1.2.3. Biologické noxy	21
1.3. Změny v genetické informaci.....	21
1.3.1. Chromozomové mutace	23
1.3.2. Genové mutace	25
1.4. Enzym α -Enoláza a jeho význam při vzniku nádorových buněk.....	26
1.4.1. Fyziologická funkce enzymu α -Enoláza.....	26
1.5. Glykolýza	27
1.6. Role enzymu při vzniku nádorových buněk.....	27
1.6.1. Aktivace plazminu	28
1.6.2. Warburgův efekt	29

1.6.3.	Warburgův efekt a tvorba ATP.....	29
1.7.	Role α -Enolázy u nádorových buněk.....	30
1.7.1.	Udržení proliferativní signalizace.....	30
1.7.2.	Zvýšení invazivity a vznik metastáz.....	31
1.7.3.	Indukce angiogeneze.....	31
1.7.4.	Snížená reaktivita na indukci buněčné smrti	31
1.7.5.	Deregulace buněčné energie	31
1.7.6.	Kompetice nádorových buněk se zdravými buňkami o zdroje energie	32
1.7.7.	Snížená reaktivita s růstovými supresory	32
1.8.	Metody pro průkaz a stanovení α -Enolázy a jejich protilátek	33
1.8.1.	Metody pro průkaz α -Enolázy	33
1.8.2.	Metody pro stanovení aktivity enzymu	34
1.8.3.	Metody vhodné pro separaci α -Enolázy.....	37
1.8.4.	Metody pro průkaz specifických protilátek proti α -Enoláze	37
1.8.4.1.	ELISA	37
1.8.4.2.	Metoda SERPA s následnou imunodetekcí.....	39
2.	Cíle práce	42
3.	Experimentální část.....	43
3.1.	Seznam laboratorního vybavení.....	43
3.2.	Seznam chemikálií	45
3.3.	SERPA (Serological Proteome Analysis).....	47
3.3.1.	Příprava buněčného lyzátu.....	47
3.3.2.	Rehydratace gelových stripů s buněčným lyzátem.....	48
3.3.3.	Izoelektrická fokuzace (IEF)	49
3.3.4.	2D SDS-PAGE	50
3.3.5.	Semi-Dry Western Blot	52
3.3.6.	Barvení proteinů na gelu.....	52

3.3.7.	Barvení proteinů na nitrocelulózové membráně	53
3.3.8.	Imunodetekce reaktivních spotů	53
3.4.	Stanovení aktivity ENO1	55
3.4.1.	Stanovení aktivity ENO1 pomocí diagnostické soupravy Abcam.....	55
3.4.2.	Aktivita rekombinantní ENO1	55
3.4.3.	Warburgův optický test	56
4.	Výsledky a diskuze	57
4.1.	Výsledky SERPA metody	57
	Pacient č. 1	58
	Pacient č. 2	60
	Pacient č. 3	61
	Pacient č. 4	62
	Pacient č. 5	63
	Pacient č. 6	64
	Pacient č. 7	65
	Pacient č. 8	67
	Pacient č. 9	68
	Pacient č. 10	69
4.2.	Aktivita ENO1	74
4.2.1.	Stanovení aktivity ENO1 pomocí diagnostické soupravy Abcam.....	74
4.2.2.	Stanovení aktivity ENO1 pomocí metody Warburgův optický test	81
5.	Závěr	83
	Citace	84

Seznam obrázků a tabulek

Obrázek 1 - Schématické vyobrazení charakteristických znaků rakoviny podle Hanahan Douglas a Roberta A. Weiberga [3].....	17
Obrázek 2 - Schématické vyobrazení charakteristických znaků rakoviny podle Hanahan Douglas a Roberta A. Weiberga [3].....	17
Obrázek 3 - Úloha p53 při snížení pravděpodobnosti vzniku patologického buněčného klonu [10].....	20
Obrázek 4 - Vznik Filadelfského chromozomu translokací mezi chromozomy 9 a 22 [74]....	23
Obrázek 5 - Amplifikace n-MYC na p raménku 2. chromozomu do jiného chromozomu, extrachromozomálně amplifikovaný n-MYC tzv. „double minutes“ [22]	24
Obrázek 6 - FISH analýza nádorových buněčných linií kolorektálního nádoru. [24]	25
Obrázek 7 - Schématické zobrazení funkcí ENO1 v buňce v závislosti na její lokalizaci [29]	26
Obrázek 8 - Schéma enzymatické reakce ENO1 při glykolýze [75]	27
Obrázek 9 - Schématické zobrazení ENO1 jako plazminového receptoru na povrchu buňky [28]	28
Obrázek 10 - Aktivita Enolázy po ovlivnění fluoridy z kompozitních pryskyřic [67].....	35
Obrázek 11 - Schéma reakce v rámci manuálu pro diagnostickou soupravu Abcam [76].....	36
Obrázek 12 - Schématické zobrazení různých typů metody ELISA [77].....	38
Obrázek 13 - Bodový graf zachycující výsledky ELISA testů na průkaz specifických protilátek anti ENO1 u pacientů s osteosarkomem, osteochondromem [72].....	39
Obrázek 14 - Proteinová mapa ze vzorku lidské moči [78].....	40
Obrázek 15 - Schéma techniky Western Blot pro přenos proteinu z gelu na membránu [73] .	40
Obrázek 16 - Potvrzení úspěšnosti přenosu z gelu na membránu	57
Obrázek 17 - Výsledky SERPA analýzy pacienta číslo 1.	58
Obrázek 18 - Výsledky SERPA analýzy pacienta číslo 2	60
Obrázek 19 - Výsledky SERPA analýzy pacienta číslo 3.	61
Obrázek 20 - Výsledky SERPA analýzy pacienta číslo 4	62
Obrázek 21 - Výsledky SERPA analýzy pacienta číslo 5.	63
Obrázek 22 - Výsledky SERPA analýzy pacienta číslo 6.	64
Obrázek 23 - Výsledky SERPA analýzy pacienta číslo 7.	65
Obrázek 24 - Výsledky SERPA analýzy pacienta číslo 8.	67
Obrázek 25 - Výsledky SERPA analýzy pacienta číslo 9.	68

Obrázek 26 - Výsledky SERPA analýzy pacienta číslo 10.	69
Obrázek 27 - Výsledky aktivity ENO1 při použití diagnostické soupravy při měření na přístroji BioTek PowerWave 340	75
Obrázek 28 - Výsledky testu pro potvrzení reaktivity rekombinantního enzymu ENO1.....	75
Obrázek 29 - Výsledky měření aktivity ENO1 v nativním vzorku buněčné linie RPMI 8226	76
Obrázek 30 - Výsledky měření aktivity rekombinantní ENO1 při měření na přístroji TECAN infinite M200	77
Obrázek 31 - Výsledky měření aktivity ENO1 při 22 °C	78
Obrázek 32 - Výsledky měření aktivity ENO1	79
Obrázek 33 - Výsledky měření aktivity ENO1	80
Obrázek 34 - Výsledky stanovení aktivity ENO1 pomocí Warburgova optického testu	81
Obrázek 35 – Výsledky stanovení aktivity ENO1 pro zjištění optimálních podmínek a kalibraci pomocí Warburgova optického testu	82
Tabulka 1 - Příklady buněčných protoonkogenů a mechanismy přeměny v onkogeny [10] ...	22
Tabulka 2 - Příklad onkogenů s přiřazenými nádorovými onemocněními [15]	22
Tabulka 3 - Poměry reagensů pro přípravu směšného roztoku pro jeden strip	49
Tabulka 4 - Poměry reagensů pro přípravu 12% gelu pro elektroforézu	51
Tabulka 5 - Nastavení promývací stanice FlexiWash pro metodu SERPA.....	54
Tabulka 6 - Dostupné informace o pacientovi č. 1	58
Tabulka 7 - Dostupné informace o pacientovi č. 2	60
Tabulka 8 - Dostupné informace o pacientovi č. 3	61
Tabulka 9 - Dostupné informace o pacientovi č. 4	62
Tabulka 10 - Dostupné informace o pacientovi č. 5	63
Tabulka 11 - Dostupné informace o pacientovi č. 6	64
Tabulka 12 - Dostupné informace o pacientovi č. 7	65
Tabulka 13 - Dostupné informace o pacientovi č. 8	67
Tabulka 14 - Dostupné informace o pacientovi č. 9	68
Tabulka 15 - Dostupné informace o pacientovi č. 10	69
Tabulka 16 - Souhrn detailů nitrocelulózových membrán z oblastí výskytu ENO1 od všech testovaných vzorků	71
Tabulka 17 - Souhrn detailů nitrocelulózových membrán z oblastí výskytu ENO1 od všech testovaných vzorků	72
Tabulka 18 - Jednotlivé body pro vytvoření kalibrační řady	74

Seznam zkratek

2-PG - 2-fosfoglycerát

AMPK – aktivovaná protein kináza (z angl. "Adenosine Monophosphate-activated Protein Kinase")

BAX – regulátor apoptózy (z angl. "Bcl-2 Associated X Protein")

c-MYC – protoonkogen kódující proteiny se specifickou funkcí v nádorových buňkách

CTL – cytotoxický T-lymfocyt

EBV – virus Epstein-Barrové (z angl. "Epstein-Barr Virus")

ECM – extracelulární matrix

EMT – epiteliálně-mezenchymální tranzice

ENO1 – α -Enoláza

FISH – fluorescenční in situ hybridizace (z angl. "Fluorescent In Situ Hybridization")

HBV – virus hepatitidy B

HCV – virus hepatitidy C

HIV-1 – lidský virus imunologické nedostatečnosti typ 1

HPV-16 – lidský papillomavirus typ 16 (z angl. "Human PapillomaVirus type 16")

HRAS – Harveyho virus krysího sarkomu (z angl. "Harvey Rat sarcoma virus")

HRP – křenová peroxidáza

HTLV-1 – lidský T-lymfotropní virus

LDH – laktátdehydrogenáza

MBP1 – c-MYC vázající protein (z angl. "Myc promoter-Binding Protein-1")

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

MGC-803 – buněčná linie karcinomu žaludku

MKN-45 – buněčná linie karcinomu žaludku

MM – mnohočetný myelom

mTOR – serin/threoninová kináza (z angl. “Mammalian Target Of Rapamycin“)

MYC – protoonkogen

NHS – normální lidské sérum (z angl. “Normal Human Serum“)

NIH 3T3 – myší buněčná linie

n-MYC – protoonkogen spojený s neuroblastomem

OC – osteochondrom

OS – osteosarkom

PA – aktivace plazminogenu

PAI-1,2 – specifický inhibitor aktivace plazminogenu 1,2

PCNA – proliferační antigen buněčného jádra

PI3K – fosfatidylinositol-3-kináza

PK – pyruvátkináza

PKB – protein kináza B

PTEN – supresorový gen

ras – rodina genů ze skupiny protoonkogenů, GTPázy

RB – retinoblastomový protein

SERPA – sérologická analýza proteomu (z angl. “Serologic Proteome Analysis“)

SK-BR-3 – buněčná linie karcinomu prsu

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

TIL – tumor infiltruující lymfocyty

TP53 – tumor supresorový gen

Treg – regulační T-lymfocyt

Tx – transplantace

UV – ultrafialové záření

Úvod

Nádorová onemocnění vznikají jako kumulace změn v DNA zdravých buněk. Existuje více jak 100 druhů nádorových onemocnění s odlišným původem, rizikovými faktory a epidemiologií. Nádorové maligní buňky se na rozdíl od buněk benigních vyznačují neomezenou proliferací, které mají schopnost pronikat za hranice původních tkání a metastázovat do vzdálených orgánů. Nádory rozdělujeme na solidní a tzv. nádory krevních buněk. Jedním ze závažných hematologických onemocnění je mnohočetný myelom. Jedná se o nevléčitelné, biologicky heterogenní onemocnění plazmatických buněk. Mnohočetný myelom je charakterizován nekontrolovaným růstem monoklonálních plazmatických buněk v kostní dřeni, který vede k nadprodukci nefunkčních intaktních imunoglobulinů nebo imunoglobulinových řetězců jednoho nebo výjimečně více klonů. Akumulace těchto imunoglobulinů a interakce aberantních monoklonálních plazmatických buněk s jinými buňkami v kostní dřeni vedou k řadě problémů včetně anémie, vzniku kostních lézí, infekcí, hyperkalcémie, selhání ledvin, únavy a bolesti. Mnohočetný myelom je druhá nejčastější hematologická malignita, která se vyskytuje především u lidí nad 65 let. V České republice je incidence 2,65/100 000 obyvatel. U věkové kategorie 75-79 let je to až 15,57/100 000 obyvatel.

Jelikož se stále jedná o nevléčitelné onemocnění, je snaha najít způsob, jak jej diagnostikovat co nejdříve a následně zahájit léčbu, aby se zpomalil rozvoj onemocnění. Dnes se již běžně aplikuje protimyelomová léčba cytostatiky, transplantací kostní dřeně, nebo tzv. biologickou léčbou. Aby byla léčba účinná, je žádoucí identifikovat tzv. terč, tedy molekulu specifickou pro nádorovou, v tomto případě konkrétně myelomovou buňku a tento terč vhodným terapeutikem zasáhnout. Součinnost s přirozenou protinádorovou imunitou je pro likvidaci takto označených nádorových buněk nezbytná. Slibným biomarkerem se zdá být v poslední době enzym α -Enoláza. V odborných článcích byly popsány studie, kde byla potvrzena zvýšená hladina tohoto enzymu u nádorových, ale i myelomových buněk [1]. Nastává otázka, zda je právě tento enzym vhodným imunologickým terčem pro včasnou diagnózu. Hledáme odpověď na otázku, zda vyšší hladina a aktivita α -Enolázy zvýhodňuje myelomové buňky na úkor buněk zdravých. Výsledky této práce by měly pomoci objasnit význam autoreaktivních protilátek vyskytujících se v séru pacientů s mnohočetným myelomem.

1. Teoretická část

1.1. Patogeneze vzniku nádorových buněk

Vznik nádorových buněk je patologický proces, při kterém dochází k nekontrolovatelnému zmnožení buněk. Navíc se takto rychle množící buňky často vyhýbají běžným mechanismům buněčné smrti jako je například apoptóza. Tato nerovnováha v proliferaci a apoptóze následně vede k zmnožení nádorových buněk a vzniku nádoru.

Existuje mnoho cest, které mohou vést jednotlivou buňku k malignímu zvrhnutí, ale všechny zahrnují mnohočetné genetické a epigenetické změny. Progrese nádoru je proces, při kterém buňky, získávají více vlastností, které vedou k malignitě a metastázám. Růst nádoru začíná klonálně jedinou buňkou, která prošla neoplastickou transformací a počínající nádor se vyvíjí klonální expanzí této buňky. Když je populace buněk identifikována jako klonální, je to silný indikátor, že populace je neoplastická. Mezi děje přispívající k nádorovému zvratu patří různé typy oprav DNA, zachování délky telomer při buněčném dělení, replikace DNA a segregace chromozomů. Některé genetické změny vedou k buněčné smrti, zatímco jiné změny propůjčují buňkám nové vlastnosti a fenotypy a poskytují přirozené výhody proliferace.

Genetické poškození je výchozím stavem pro rozvoj neoplazie, přičemž somatické mutace v genech jsou identifikovány v 90 % případů a mutace v zárodečné linii jsou identifikovány u 20 % lidských neoplazií. V některých případech stačí mutace jednoho páru bází ke změně kritické aminokyseliny, což může mít za následek změnu funkce proteinu, a to vede k zvýšenému riziku neoplastické transformace. Jiné typy mutací zahrnují inserce, delece nebo duplikace genových segmentů. Strukturální chromozomální změny, jako jsou translokace, které vedou k chimérickým transkriptům nebo deregulaci genové exprese prostřednictvím pohybu promotorů, mohou také řídit maligní transformaci. Kromě toho může také dojít ke zvýšení nebo snížení počtu kopií genu.

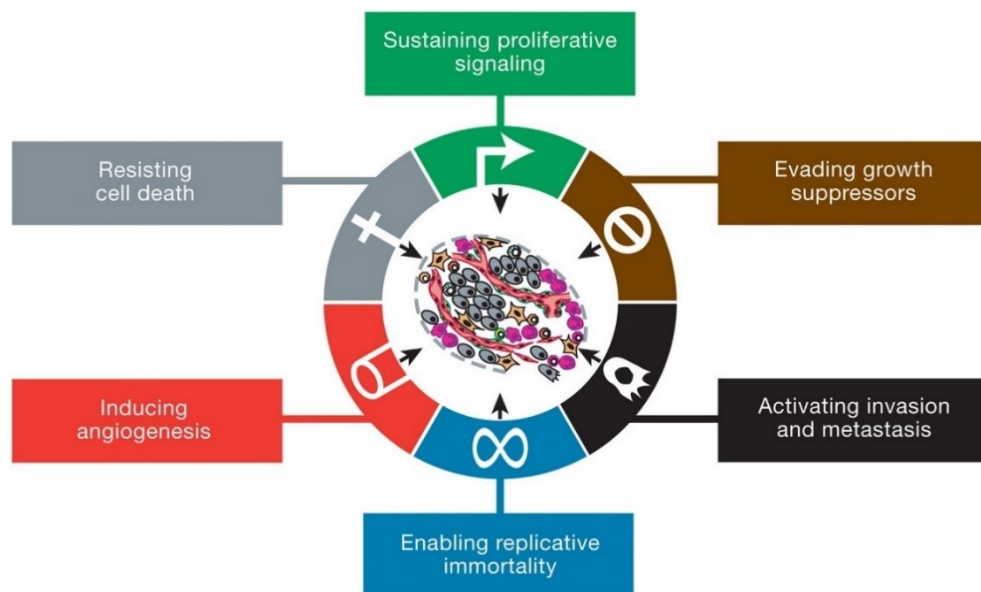
Epigenetické mechanismy regulují genovou expresi, aniž by způsobily strukturální změny genomu a také hrají roli v maligní transformaci. Epigenetické změny jsou reverzibilní, dědičné změny genové exprese bez mutace genomu. Tři hlavní formy epigenetické genové regulace zahrnují metylaci DNA, acetylaci histonů a tzv. silencing pomocí miRNA. Expresi genu lze umlčet, snížit nebo zvýšit změnou metylačních vzorců v DNA. Aberantní metylační vzorce, jako je hypermethylace a hypomethylace, jsou běžné u různých novotvarů a jsou spojeny s abnormálními hladinami genové exprese. Zejména methylace tumor supresorových genů

vedoucí k jejich supresi je rozpoznána u řady lidských nádorových onemocnění, včetně karcinomů prsu, tlustého střeva a ledvin [2].

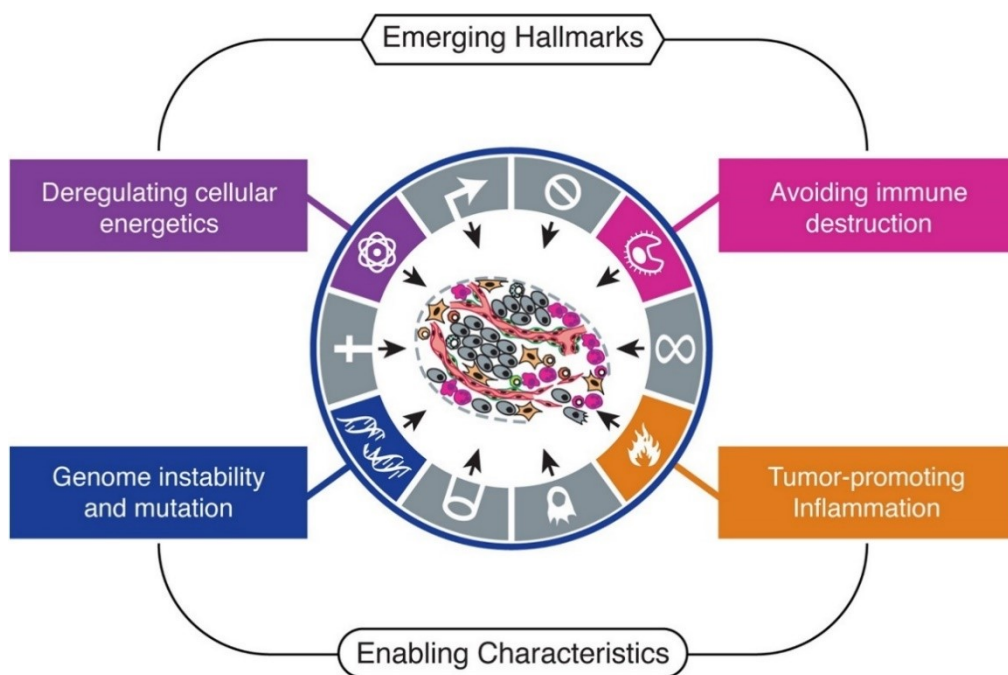
Prvním znakem nádorové buňky je zvýšená proliferace a zvýšení mitotické aktivity. Mnoho typů nádorů má zvýšenou míru mitózy, vyčíslenou spočítáním počtu mitotických obrazců pozorovaných ve specifickém počtu mikroskopických polí.

Benigní neboli nezhoubný nádor se skládá z buněk, které nepředstavují hrozbu pronikání do okolních tkání, a samotný nádor je ohraničený. Klinický problém nastává v případě, že zvětšující se masa nádorových buněk vyvíjí tlak na okolní tkáň, nervy, nebo cévy. Maligní neboli zhoubný nádor je tvořen nádorovými buňkami, které mohou nekontrolovaně růst a pronikat do okolních tkání. Nádorové buňky v maligním nádoru mají vlastnosti odlišné od buněk zdravých. Buňky maligních nádorů mohou metastázovat, tedy cestovat krevním řečištěm nebo lymfatickým systémem do jiných částí těla.

Pro účely klasifikace neoplastických onemocnění byly vytvořeny tzv. „Hallmarks of cancer“ (znaky rakoviny) podle biologických rysů, které nádory získaly během vývoje v lidském těle (Obrázek 1 a 2) [3].



Obrázek 1 - Schématické vyobrazení charakteristických znaků rakoviny podle Hanahan Douglas a Roberta A. Weiberga [3]



Obrázek 2 - Schématické vyobrazení charakteristických znaků rakoviny podle Hanahan Douglas a Roberta A. Weiberga [3]

1.1.1. Udržení proliferativní signalizace

Jednou ze základních vlastností nádorových buněk je chronická nekontrolovatelná proliferace. Standardně je růst monitorován a ovlivňován pomocí signálů podporujících růst. Ty zajišťují správný růst a dělení buněk. Pokud jsou tyto signály v nerovnováze dochází k nádorovému zvratu. Signály jsou přenášeny růstovými faktory, které se pojí k receptorům na buněčné membráně. Typicky obsahují domény intracelulární tyrosinkinázy. Ty vysílají signály dále

prostřednictvím intracelulárních signálních drah, které poté regulují buněčný cyklus a tím růst i proliferaci buněk. Nádorové buňky si mohou udržet schopnost proliferativní signalizace hned několika způsoby. Jednou z nich je vytváření vlastních ligandů růstových faktorů, na které reagují prostřednictvím exprese příslušných receptorů. Nebo mohou nádorové buňky vysílat signály k buňkám normálním, stimulovat je k vytváření zásob růstového faktoru pro nádorové buňky. Dalším mechanismem je navýšení počtu receptorů na povrchu nádorové buňky. Tím se tyto buňky stanou hyperresponzivní a stačí jim menší počet růstových faktorů v okolí, jelikož je větší šance pro jejich záchyt [4].

1.1.2. Zvýšení invazivity a vznik metastáz

Po dlouhou dobu byly mechanismy invazivity a vzniku metastáz do značné míry záhadou. Bylo dokázáno, že když karcinomy vycházející z epiteliálních tkání přecházely do vyšších patologických stupňů malignity, došlo u nich k zvýšení proliferace a vytváření vzdálených metastáz. Dále se u asociovaných nádorových buněk typicky vyvinuly změny ve tvaru a také byly pozorovány změny v jejich propojení s jinými buňkami a extracelulární matrix. Nejlépe charakterizovaná změna zahrnovala ztrátu E-kadherinu, tedy klíčové molekuly adheze mezi zdravými buňkami a nádorovými buňkami. Vytvořením adhezivních spojení se sousedními epiteliálními buňkami pomáhá E-kadherin sestavit vrstvy epiteliálních buněk a udržet stabilitu takto vzniklých spojení. Zvýšená exprese E-kadherinu byla spojena se snížením invazivity nádoru a vzniku metastáz. Zatímco při snížené hladině E-kadherinu byl výsledek opačný. Tato často se opakující korelace mezi zvýšenou, nebo sníženou hladinou E-kadherinu a vznikem metastáz u lidských karcinomů poskytly silnou podporu pro jeho roli klíčového supresoru této charakteristické schopnosti [5].

1.1.3. Indukce angiogeneze

Nádorová angiogeneze je proliferace sítě krevních cév, která zásobuje nádorové buňky mikroprostředím obohaceným kyslíkem a živinami. Pokud by nádor nebyl takto zásobován, jeho velikost by nepřesáhla 2 mm, zůstal by nečinný nebo by degeneroval, popřípadě byl zlikvidován imunitním systémem bez možnosti vytvoření metastáz [6]. Avšak za takto vzniklých podmínek mají nádorové buňky ideální podmínky pro růst a další proliferaci.

1.1.4. Schopnost nádorových buněk unikat indukci apoptózy

Nádorové buňky vyvíjejí různé strategie k omezení nebo obcházení apoptózy. Nejběžnější je ztráta supresorové funkce *TP53* (tumor supresorový gen), která eliminuje tento kritický senzor poškození z obvodů indukujících apoptózu. Alternativně mohou nádory dosáhnout podobných

cílů zvýšením exprese antiapoptotických regulátorů (např. Bcl-2, Bcl-xL), snížením hladin proapoptotických faktorů (Bax, Bim, Puma) nebo přerušением vnější dráhy buněčné smrti zprostředkované ligandem (FasL). Mnohočetnost mechanismů vyhýbání se apoptóze pravděpodobně odráží rozmanitost signálů indukujících apoptózu, s nimiž se populace nádorových buněk setkávají během svého vývoje do maligního stavu.

1.1.5. Deregulace buněčné energie

Většina nádorových buněk dává přednost zisku energie prostřednictvím tzv. Warburgova efektu (viz 1.6.2.). Tím se urychluje glykolýza v nádorových buňkách. Dochází k využití anaerobní glykolýzy pro zisk energie, a to i v případě že se buňky vyskytují v aerobním prostředí.

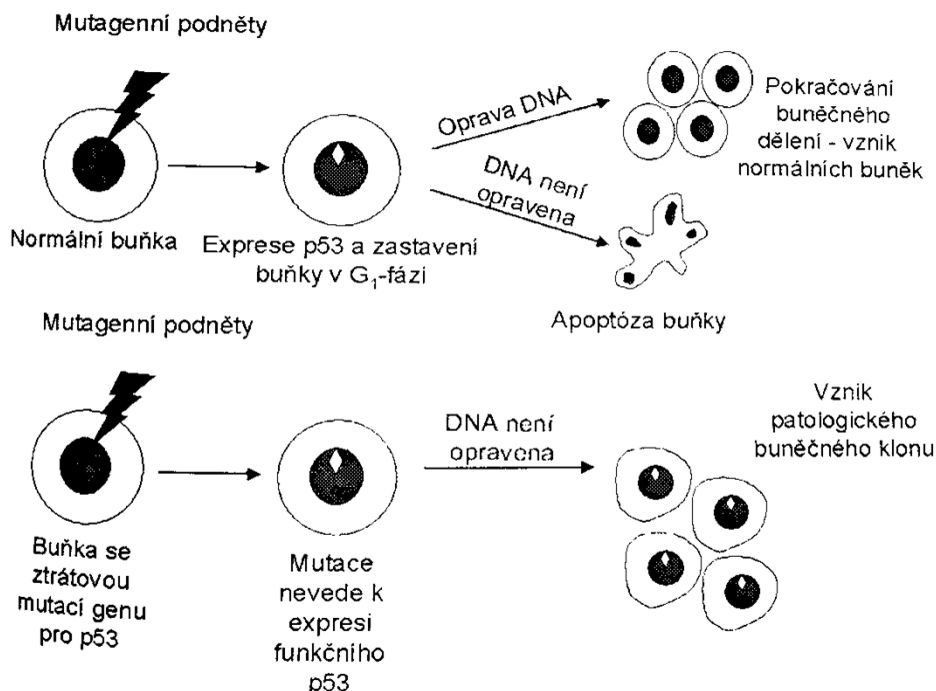
1.1.6. Schopnost nádorových buněk unikat imunitnímu dozoru

Problém v rozpoznání a následné likvidaci nádorových buněk nastává, když si nádorové buňky začnou vytvářet mechanismy, jak imunitnímu systému uniknout. Vysoce imunogenní nádorové buňky mohou unikat imunitnímu systému (IS) tím, že vyřadí z činnosti složky IS, které byly odeslány k jejich odstranění. Například nádorové buňky mohou paralyzovat infiltrující cytotoxické T-lymfocyty (CTL) a NK buňky sekrecí TGF- β nebo jiných imunosupresivních faktorů. Jemnější mechanismy fungují prostřednictvím přitahování zánětlivých buněk, které jsou aktivně imunosupresivní, včetně regulačních T lymfocytů (Tregs) a myeloidních supresorových buněk (MDSC). Oba typy buněk mohou potlačit působení cytotoxických T-lymfocytů [7].

1.1.7. Neodpovídavost nádorových buněk k supresorům růstu

Dva významné tumor supresorové geny *RBI* a *TP53*, které kódují proteiny RB (retinoblastomový protein) a p53, fungují jako centrální řídicí uzly ve dvou klíčových komplementárních buněčných regulačních obvodech. Tyto proteiny řídí rozhodnutí buněk proliferovat nebo alternativně aktivovat senescenci a zahájení apoptózy. Protein RB reaguje na signály z různých extracelulárních a intracelulárních zdrojů a vyhodnocuje, zda by buňka měla pokračovat v růstu, popřípadě zda by se měla buňka dělit. Nádorové buňky s defekty ve funkci RB tak nemají základní kontrolu a dochází k nekontrolovatelné proliferaci [8]. Zatímco RB přenáší signály inhibující růst, které pocházejí z extracelulárního prostředí, p53 přijímá informace ze senzorů stresu, které fungují v intracelulárních operačních systémech buňky. Pokud by buňka nebyla v optimálním stavu např. nadměrný stupeň poškození genomu nebo pokud by nebyly ideální hladiny nukleotidových poolů, signálů podporujících růst, hladiny

glukózy nebo by hladina okysličení byla příliš nízká, může p53 vyvolat zastavení další progresse buněčného cyklu, dokud nebudou tyto podmínky normalizovány. Popřípadě ve stavu velkého poškození, nebo nevratných hladin předem zmíněných faktorů může p53 iniciovat apoptózu.



Obrázek 3 - Úloha p53 při snížení pravděpodobnosti vzniku patologického buněčného klonu [10]

1.2. Faktory ovlivňující vznik nádorových buněk

Vznik nádorových buněk může mít hned několik příčin. Například vliv mutagenů. Jako mutagen lze označit cokoli, co způsobuje změnu na úrovni DNA buňky. Změny DNA způsobené mutageny mohou poškodit buňky a způsobit pak jejich neřízenou proliferaci.

1.2.1. Fyzikální faktory

Řadíme sem různé typy záření. UV záření, rentgenové záření, γ -záření. Jelikož UV záření způsobuje nejběžnější typ nádorového onemocnění, kterým je rakovina kůže, můžeme UV záření považovat za velmi významný mutagen. UV záření způsobuje poškození DNA a genetické mutace, které následně vedou až k rakovině kůže [9].

1.2.2. Chemické noxy

Chemické látky, které mohou způsobit vznik nádorových buněk, se dají rozdělit do dvou skupin. Látky schopné přímé interakce s DNA, anebo látky označované jako epigenetické. To jsou látky, které přímo nemění DNA, nicméně se projeví fenotypová změna. Expozici chemickým kancerogenům nelze zabránit, stejně jako u UV záření, nicméně ji lze významně

ovlivnit. Prokazatelně největší vliv chemických kancerogenů dopadá na gastrointestinální trakt, játra, respirační trakt a urogenitální trakt [10]. Významným problémem u chemických kancerogenů je fakt, že některé látky do těla vstupují zcela neškodně a na škodlivou formu se přemění až vlivem metabolismu [11]. Mezi nejvýznamnější přímo působící chemické kancerogeny patří: dimethyl sulfát, některá cytostatika (cyklofosfamid). Mezi chemické kancerogeny vyžadující metabolickou aktivaci patří: polycyklické aromatické uhlovodíky (benzpyren, 3-methylcholantren), benzidín, polychlorované bifenyly.

1.2.3. Biologické noxy

Lze sem zařadit kancerogeny biologického původu (viry, bakterie), které se prokazatelně angažují ve vzniku nádorových onemocnění. Mezi hlavní zástupce patří EBV, HBV, HCV, HIV-1, HPV-16, *Helicobacter pylori* [12]. Virové kancerogeny lze označovat jako onkotické viry. Lze je také dělit na DNA a RNA viry. Mezi DNA onkotické viry patří např. EBV, HPV. Do skupiny RNA onkotických virů patří např. RNA retrovirus HTLV-1, který způsobuje leukemii T-lymfocytů. V případě retrovirů je jejich genetická informace do organismu přenášena reverzní transkriptázou [13]. Jako další sem patří aflatoxin, jakožto vyvolávač nádorového onemocnění jater a žaludku. Aflatoxin je metabolickým produktem plísně *Aspergillus flavus*.

1.3. Změny v genetické informaci

Protoonkogeny jsou skupinou genů, které v případě mutace způsobují, že se zdravé buňky mohou stát nádorovými. Protoonkogeny často kódují proteiny, které stimulují buněčné dělení, inhibují buněčnou diferenciaci a zastavují buněčnou smrt. Všechny tyto procesy jsou důležité pro normální vývoj člověka. Takto zmutované geny se poté nazývají onkogeny. Onkogeny však typicky vykazují zvýšenou produkci těchto proteinů, což vede ke zvýšenému buněčnému dělení, snížené buněčné diferenciaci a inhibici buněčné smrti. Dohromady tyto fenotypy definují nádorové buňky. Onkogeny jsou tedy v současnosti hlavním molekulárním cílem pro návrh nových protinádorových léčiv. Dnes je známo více než 40 různých lidských protoonkogenů. Pro přeměnu protoonkogenu na onkogen je potřeba tzv. aktivace protoonkogenu (Tabulka 1). Toho lze dosáhnout několika způsoby. Aktivační mechanismy protoonkogenů se značně liší z hlediska genetických změn, které způsobují. Ačkoli jsou způsoby aktivace různé, společným prvkem je deregulace exprese protoonkogenu. Přestože se skutečný mechanismus aktivace může podstatně lišit, konečným efektem je aberantní exprese, regulace nebo odlišný genový produkt.

Normální funkce	Protoonkogen	Mechanismus přeměny na onkogen	Nádorové onemocnění
Růstové faktory řetězec β destičkového růstového faktoru	sis	nadměrná exprese	osteosarkom astrocytom
Receptory pro růstové faktory CSF-1 receptor pro faktory z rodiny epidermálního růstového faktoru	fms ebr-B1 ebr-B2	bodová mutace nadměrná exprese zmnožení	některé leukemie některé nádory plic karcinom prsní žlázy, ovarií, plic, žaludku
Proteiny nitrobuněčných signálních drah G-protein	ras	bodové mutace	různé maligní nádory
Jaderné proteiny Transkripční faktory	<i>MYC</i> <i>n-MYC</i> <i>l-MYC</i>	translokace zmnožení zmnožení	Burkittův lymfom neuroblastom, malobuněčný nádor plic, malobuněčný nádor plic

Tabulka 1 - Příklady buněčných protoonkogenů a mechanismy jejich přeměny v onkogeny [10]

Ztráta nebo změna regulačních oblastí kontrolujících expresi nebo funkci protoonkogenu účinně odděluje gen od jeho normálních fyziologických omezení. Neschopnost buňky modulovat expresi nebo funkci protoonkogenu vede k tomu, že buňka nereaguje na intracelulární a extracelulární signály, které normálně regulují buněčnou proliferaci a diferenciaci, což vyústí ve vznik nádorového onemocnění [14]. V dnešní době je již prokázáno spojení několika onkogenů s konkrétními nádorovými onemocněními (Tabulka 2).

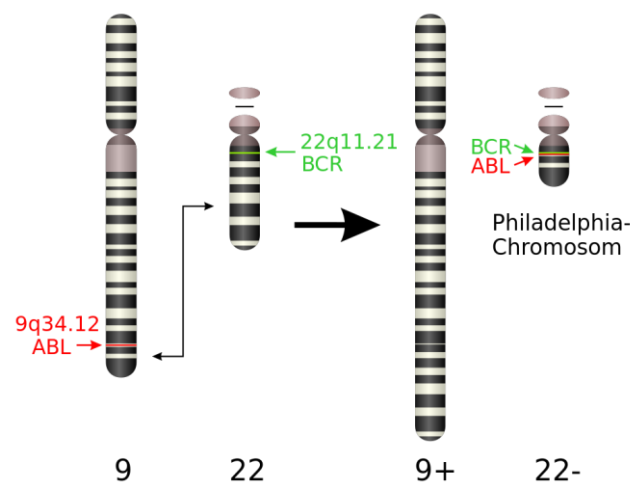
Targeted oncogene	Cancer cell line
Her-2/neu	Breast
Cyclin D1	Esophagus Colon Pancreas Squamous Nasopharynx
<i>K-ras</i> ^{mut}	Pancreas
<i>K-ras</i> ^{v12}	Pancreas
β -Catenin	Colon
Cyclin E	Liver
Mutant B-Raf	Melanoma
MITF	Melanoma

Tabulka 2 - Příklad onkogenů s přiřazenými nádorovými onemocněními [15]

Díky stále se zdokonalujícím metodám v oboru molekulární biologie a genetiky bylo možné nahlédnout do genomů zasažených nádorovým onemocněním. Důkaz o tom, že za vznikem nádorových onemocnění je změna v genotypu, byl objeven v roce 1982. Šlo o sérii pokusů, kdy se nejprve zavedla celková genomová informace z nádorové buňky do zdravé myší buňky NIH 3T3. Ta se následně nádorově zvrhla a vytvořila tak nádorovou buňku [16]. Následnou izolací specifického segmentu DNA, který mohl za tuto změnu, se podařilo identifikovat první přirozeně se vyskytující změny sekvence DNA, které způsobují nádorové bujení i u člověka. Konkrétně pak dochází k substituci jedné báze G > T, která způsobuje substituci glycinu za valin v 12. kodonu genu *HRAS* [17].

1.3.1. Chromozomové mutace

Jedním z prvních objevů byla translokace mezi chromozomy 9 a 22 u chronické myeloidní leukemie (Obrázek 4). Dnes známý jako Filadelfský chromozom [18]. Tento chromozom vzniká reciprokovou translokací [t(9;22)(q34;q11.2)], která vede k fúzi sekvencí genu *ABL1* (9q34) se sekvencemi genu *BCR* (22q11). Výsledný chimérický protein BCR/ABL1 je stále aktivní tyrosinkináza, která aktivuje více signálních drah, které společně vedou k maligní transformaci a tvorbě onkoproteinu [19].

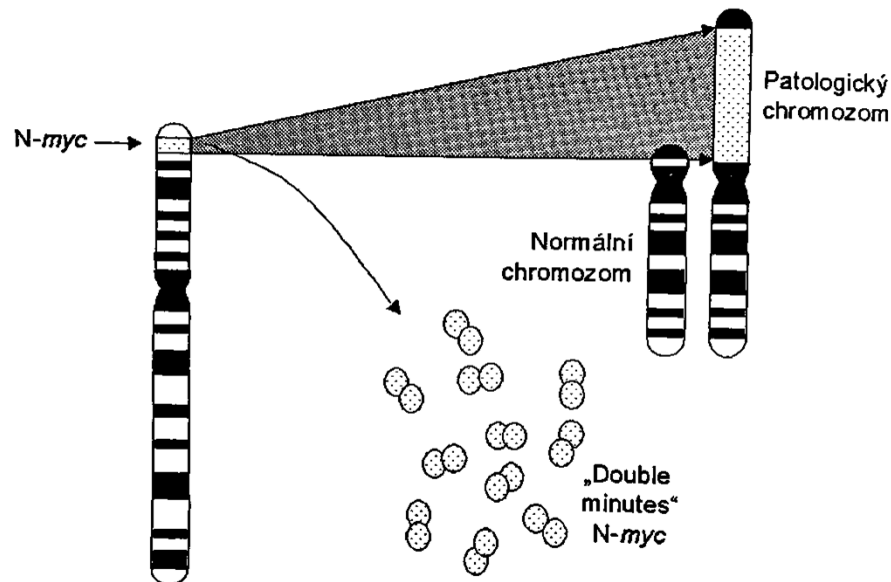


Obrázek 4 - Vznik Filadelfského chromozomu translokací mezi chromozomy 9 a 22 [74]

Podobným případem je translokace u chromozomů 8 a 14, přesněji t(8;14)(q24;q32). Tato změna v genomu je pozorována u 70-80 % pacientů s Burkittovým lymfomem [20]. Burkittův lymfom je vysoce agresivní B-buněčný non-Hodgkinův lymfom a je nejrychleji rostoucím lidským nádorem. Onemocnění je spojeno s virem Epstein-Barrové a bylo jedním z prvních nádorů, u kterých bylo prokázáno, že mají chromozomální translokaci, která aktivuje onkogen *c-MYC* [21].

Amplifikace neboli zmnožení některé části genomu, může vést k nádorovému zvratu zasažené buňky. Může se stát, že dojde k amplifikaci již existujícího, přirozeně se vyskytujícího onkogenu a k projevu jeho onkogenního vlivu dojde až po dostatečném zmnožení, nebo se může amplifikovat cizorodá virová DNA, nebo pouze její část [22].

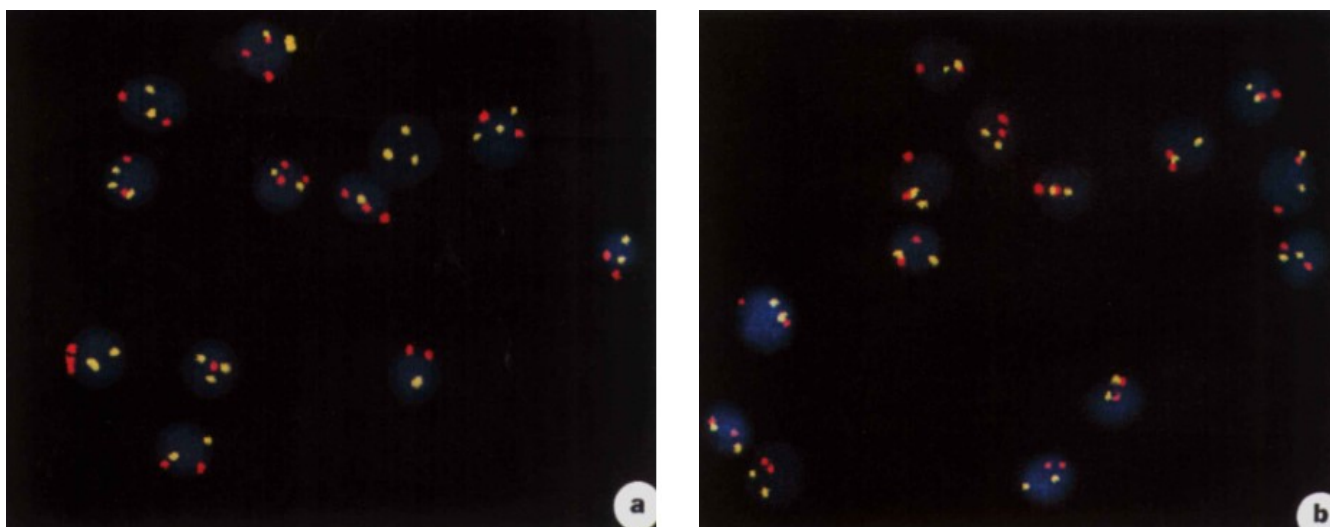
Zmnožení části genomu se například projevuje při amplifikaci na p raménku 2. chromozomu. Zde se vyskytuje *n-MYC*, což je protoonkogen pro neuroblastom (Tabulka 1). Zmnožení *n-MYC* bylo pozorováno téměř u 40 % pacientů diagnostikovaných s neuroblastomem. Jedná se o nádorové onemocnění nejčastěji postihující děti kojeneckého věku [23]. Po amplifikaci *n-MYC* se tato nově zmnožená genetická informace začlení do jiného chromozomu, nebo se vyskytuje extrachromozomálně jako tzv. „double minutes“ [22] (Obrázek 5).



Obrázek 5 - Amplifikace *n-MYC* na p raménku 2. chromozomu do jiného chromozomu, extrachromozomálně amplifikovaný *n-MYC* tzv. „double minutes“ [22]

Změna části genomu může vést ke vzniku nádorových buněk. Ať už se jedná například o delecí celého chromozomu, či delecí pouze jeho části. Tím může být narušena jeho správná funkčnost a tím i následná exprese genu. Podle této teoretické myšlenky byly následně prokázány geny, které v buňce brání nádorovému zvratu. Jedná se o nádorové supresorové geny. Ty mají následující funkce. Dohlížení nad správností genetického kódu (*TP53*). Udržování buňky v G_0 stavu a tím snižují její proliferační aktivitu (*RBI*). Zpomalování buněčného cyklu (*p15*, *p16*, *p21*) a tím umožňují následnou reparaci DNA [22].

Úplná ztráta chromozomu může vést k vzniku různých nádorových onemocnění. Například v pokusech s kolorektálními nádorovými liniemi bylo zjištěno, že u některých buněčných linií dochází k delecí celých chromozomů (Obrázek 6). Klony buněčných linií HT29 (a) a HCT116 (b) byly pasážovány 25 generací před FISH analýzou. Jádra v interfázi byla hybridizována a označena sondami navazujícími centromeru specificky pro chromozom 7 (červená) a chromozom 18 (žlutá). Buňky HCT116 obsahovaly dvě kopie od obou chromozomů, kdežto počet signálů zaznamenaných v buňkách HT29 byla nejednotná. To nasvědčuje chromozomové nestabilitě [24].



Obrázek 6 - FISH analýza nádorových buněčných linií kolorektálního nádoru. [24]

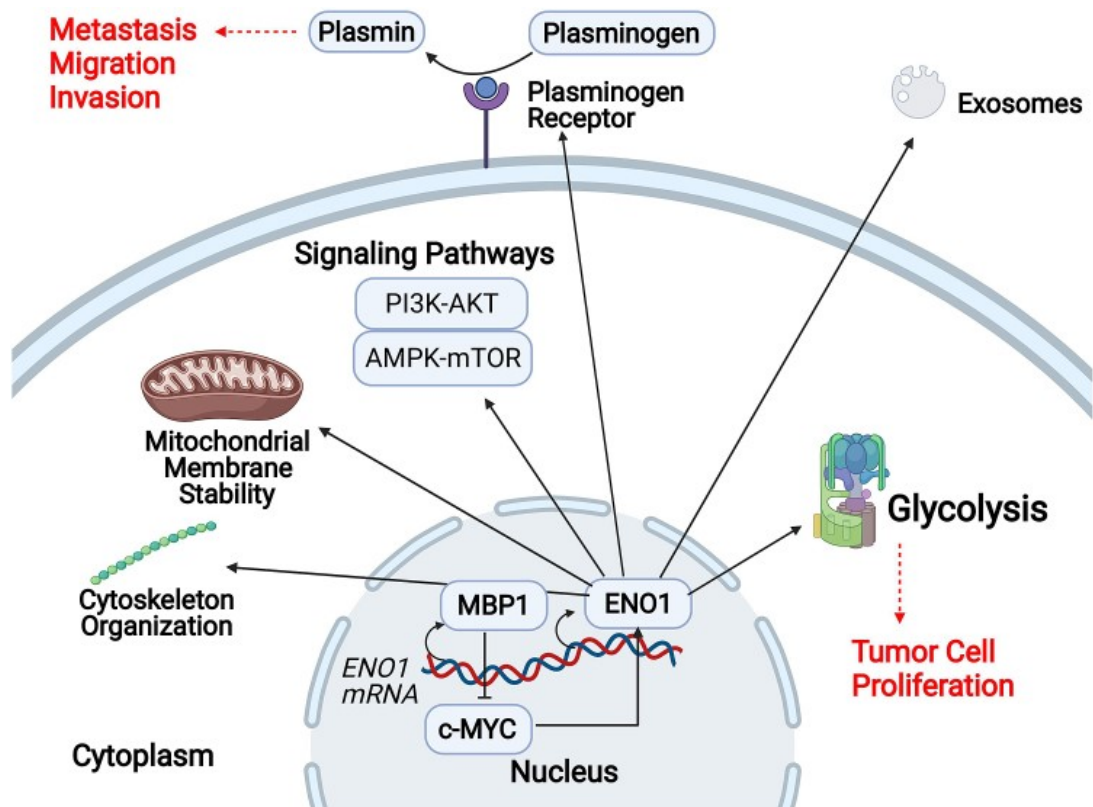
1.3.2. Genové mutace

Pouze u onkogenů *ras* a *ret* jsou známé bodové mutace. Mutace v kodonu 12, 13 nebo 61 jednoho ze tří genů *ras*, *H-ras*, *K-ras* a *N-ras*, převádějí tyto geny na aktivní onkogeny. Rychlé testy pro detekci těchto bodových mutací byly vyvinuty nedávno a použity ke zkoumání role, kterou hrají mutované geny *ras* v patogenezi lidských nádorů. Ukázalo se, že mutace genu *ras* lze nalézt u různých typů nádorů, i když výskyt se velmi liší. Nejvyšší výskyt byl zjištěn u adenokarcinomů slinivky břišní (90 %), tlustého střeva (50 %), plic (30 %), u nádorů štítné žlázy (50 %); a u myeloidní leukémie (30 %). U některých typů nádorů může existovat vztah mezi přítomností mutace *ras* a klinickými nebo histopatologickými rysy nádoru [25].

1.4. Enzym α -Enoláza a jeho význam při vzniku nádorových buněk

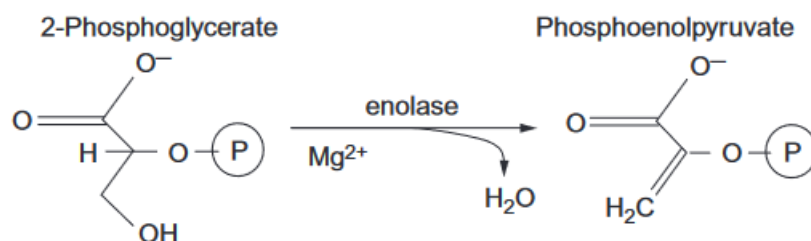
1.4.1. Fyziologická funkce enzymu α -Enoláza

ENO1 je multifunkční protein, který se účastní různých důležitých intracelulárních a extracelulárních aktivitách. Jeho funkce závisí na jeho lokalizaci (Obrázek 7). Primární funkcí ENO1 je katalýza při glykolýze, kdy přeměňuje 2-fosfoglycerát na fosfoenolpyruvát. Tato reakce je také katalyzována pomocí Mg^{2+} iontů (Obrázek 8). Když je ENO1 lokalizována na buněčném povrchu, působí jako receptor plasminogenu a zprostředkovává degradaci extracelulární matrix (ECM). Pokud se ENO1 vyskytuje v centrosomu, pomáhá zde organizovat mikrotubuly a cytoskelet v interfázi [26]. V extracelulárním prostoru ENO1 reaguje s exozomy nebo zde může být vylučována jako rozpustný protein [27]. V cytoplazmě poté ENO1 udržuje stabilitu mitochondriální membrány. Může se také podílet na regulaci dalších intracelulárních signálních drah [28].



Obrázek 7 - Schématické zobrazení funkcí ENO1 v buňce v závislosti na její lokalizaci [29]

1.5. Glykolýza



Obrázek 8 - Schéma enzymatické reakce ENO1 při glykolýze [75]

Glykolýza probíhá ve všech buňkách těla. Enzymy této dráhy jsou přítomny v cytozomální frakci buňky. Glykolýza probíhá buď za nepřítomnosti kyslíku (anaerobní) nebo za přítomnosti kyslíku (aerobní). Při anaerobních podmínkách je konečným produktem laktát. V aerobních podmínkách vzniká pyruvát, který se následně oxiduje na CO₂ a H₂O [30]. Glykolýza je hlavní cestou pro syntézu ATP v tkáních/buňkách postrádajících mitochondrie, např. erytrocyty, rohovka a čočka. Glykolýza je velmi důležitá pro mozek, který je energeticky závislý na glukóze. Glukóza v mozku musí projít glykolýzou, než se oxiduje na CO₂ a H₂O. Glykolýza je centrální metabolická dráha s mnoha meziproducty poskytujícími odbočovací bod do mnoha jiných metabolických drah. Meziproducty glykolýzy jsou užitečné pro syntézu aminokyselin a lipidů. Obrácený průběh glykolýzy spolu s alternativním uspořádáním v nevratných krocích povede k syntéze glukózy (glukoneogeneze). Rychlost glykolýzy je u nádorových buněk 200krát vyšší než u normálních buněk [31].

1.6. Role enzymu při vzniku nádorových buněk

Nádorové buňky vykazují zvýšený příjem glukózy a tím i zvýšený průběh glykolýzy. Jak nádory rychle rostou, krevní cévy jsou ve stavu hypoxie [32]. Díky nedostatku kyslíku dochází převážně k anaerobní glykolýze, která dodává nádorovým buňkám energii. Nádorové buňky se adaptují na hypoxickou glykolýzu prostřednictvím zapojení transkripčního faktoru, jmenovitě hypoxií indukovatelného faktoru (HIF) [33]. HIF zvyšuje syntézu glykolytických enzymů a transportérů glukózy. Avšak nádorové buňky nemohou růst a přežít bez řádné vaskularizace. Jednou z metod léčby nádoru je použití léků, které mohou inhibovat vaskularizaci nádorů [34].

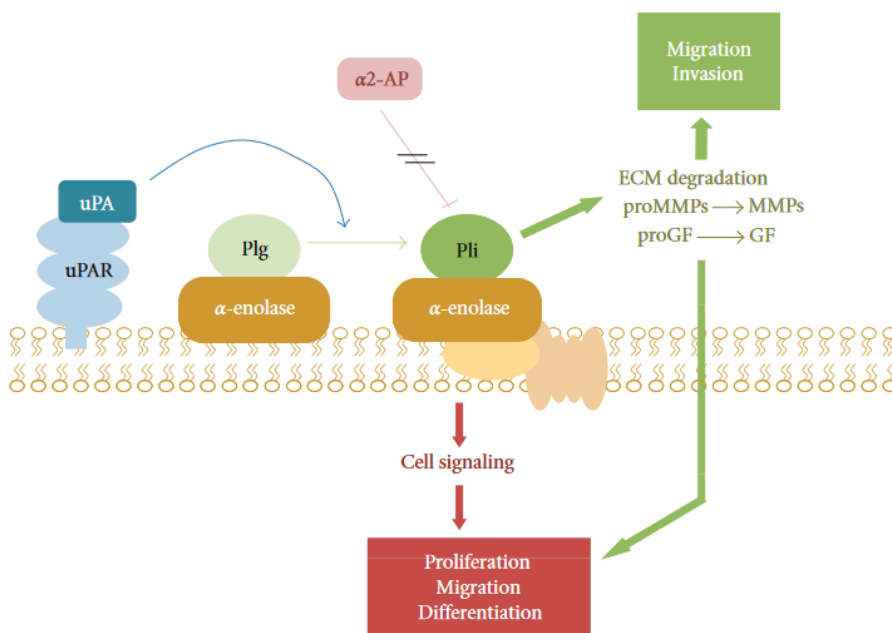
Bylo prokázáno, že inhibice glykolýzy zabíjí buňky nádoru tlustého střeva a buňky lymfomu v anaerobních podmínkách. Deplece ATP glykolytickou inhibicí také silně indukovala apoptózu u multirezistentních buněk, což naznačuje, že nedostatek buněčné energie může být účinným způsobem, jak překonat multirezistenci v buňkách odolných vůči více léčivům. Studie ukázala,

že inhibice glykolýzy je užitečná při léčbě nádorových onemocnění a také překonává rezistenci vůči lékům [35].

Všechny tyto funkce jsou zásadní pro prospívání zdravých buněk v organismu. Nicméně bylo zjištěno, že až v 70 % všech světových případů nádorových onemocnění byla nalezena nadměrná exprese genů glykolytické dráhy, zejména pak pro ENO1 [36]. Například u nádorů plic, je vyšší exprese ENO1 proteinu spojena s horšími klinickými výsledky [37]. U nádorových onemocnění v oblasti hlavy a krku byla exprese mRNA pro ENO1 zvýšena v 68 % vzorků [38]. U nádorů slinivky břišní jsou hladiny ENO1 spojovány s klinickým stádiem onemocnění a množstvím metastáz do lymfatických uzlin [39]. U kolorektálního karcinomu ENO1 podporuje tumorigenezi a vznik metastáz regulací AMPK/mTOR dráhy [40]. Zároveň se podařilo spojit korelaci hladiny ENO1 a velikosti nádoru u karcinomu prsu [41].

1.6.1. Aktivace plazminu

Plazmin jakožto proteolytický enzym má za úkol degradovat velkou řadu plazmatických proteinů. Plazmin vzniká z plazminogenu dvěma typy aktivátorů. Aktivátory plazminogenu tkáňového typu (tPA), nebo aktivátory urokinázového typu (uPA). Celý systém aktivace plazminogenu (PA) může být inhibován několika způsoby a na několika úrovních. Jedním ze systémů je prostřednictvím specifických inhibitorů PAI-1 a PAI-2. Nebo inhibicí přímo na úrovni plazminu α 2-antiplazminem [42]. PA systém je klíčový regulátor v remodelaci ECM. Po průkazu ENO1 jakožto plazminového receptoru (Obrázek 9) na povrchu nádorových buněk byl proveden test, který dokazoval vliv ENO1 na zvýšení PA [43].



Obrázek 9 - Schématické zobrazení ENO1 jako plazminového receptoru na povrchu buňky [28]

Zároveň ENO1 chrání plazmin před inhibicí α 2-antiplazminem [44]. V testu byly k leukocytárním buňkám a k neutrofilům z periferní krve přidány monoklonální protilátky MAb11G1, které specificky blokovaly vazbu ENO1/plazminogen. Výsledky potvrdily, že po blokování této vazby nebyl plazminogen přeměňován na plazmin prostřednictvím aktivátorů tPA a uPA [45]. Nicméně nedošlo u úplnému zastavení přeměny plazminogenu na plazmin, tudíž je jasné, že ENO1 není jediným plazminovým receptorem a její příspěvek k přeměně byl pouze částečný.

1.6.2. Warburgův efekt

Vzhledem k velkým nárokům na energii převedou nádorové buňky svůj metabolismus tak, aby podporovaly růst, přežití, proliferaci a dlouhodobou údržbu. Společným rysem tohoto změněného metabolismu je zvýšený příjem glukózy a fermentace glukózy na laktát. Tento jev je pozorován i v přítomnosti zcela funkčních mitochondrií a je znám jako Warburgův efekt. Též se dá označit jako aerobní glykolýza v nádorových buňkách. Je dokázáno, že přeprogramování metabolismu nádorů je řízeno různými onkogenními signály, jako jsou *RAS*, *PKB*, *MYC*, *PI3K*, *mTOR*, spolu s nádorovými supresory, včetně *TP53* a *PTEN*, které mění metabolismus a umožňují rakovinným buňkám přežít a proliferovat v hypoxickém a na živiny chudém mikroprostředí [46].

1.6.3. Warburgův efekt a tvorba ATP

Ve srovnání s mitochondriální respirací je aerobní glykolýza nádorových buněk v přepočtu na jednotku glukózy málo efektivním prostředkem pro tvorbu ATP [47]. Rychlost metabolismu glukózy prostřednictvím aerobní glykolýzy je však vyšší, takže produkce laktátu z glukózy probíhá 10×-100× rychleji než úplná oxidace glukózy v mitochondriích. Ve skutečnosti je množství ATP syntetizované za jakékoli dané časové období srovnatelné, když se využívá kterákoli z forem metabolismu glukózy [48]. Jedna z teorií je, že buňky s vyšší rychlostí, ale nižším výtěžkem produkce ATP mohou získat selektivní výhodu, když soutěží o sdílené a omezené zdroje energie [49]. Byla pozorována zvyšující se aerobní glykolýza během exponenciálního růstu kvasinek, což naznačuje další fyziologické role pro aerobní glykolýzu. Tyto role se zkoumaly ve vsádkových kulturách kvasinek kvantifikací spotřeby O_2 , produkce CO_2 , aminokyselin, mRNA, proteinů, posttranslačních modifikací a citlivosti na stres v průběhu devíti cyklů zdvojení konstantní rychlostí. Během tohoto průběhu buňky podporovaly konstantní rychlost produkce biomasy se snižující se rychlostí dýchání a produkce ATP, ale také snižovaly svou odolnost vůči stresu. S poklesem rychlosti dýchání se snižují hladiny enzymů katalyzujících rychlost určující reakce cyklu trikarboxylových kyselin (poskytující

NADH pro dýchání) a mitochondriální folátem zprostředkovanou produkci NADPH (nutná pro oxidační obranu). Zjištění ukazují, že exponenciální růst může představovat nikoli jeden metabolický či fyziologický stav, ale kontinuitu měnících se stavů a že aerobní glykolýza může snížit energetické nároky spojené s respiračním metabolismem a přežitím ve stresu [50].

V další studii se zkoumaly změny v metabolismu glukózy po poruchách membránové aktivity v různých normálních a nádorových buněčných liniích. Bylo zjištěno, že inhibice nebo aktivace pump na buněčné membráně vedla ke snížení nebo zvýšení glykolýzy, zatímco oxidativní fosforylace zůstala nezměněna. Výsledky ukázaly, že glykolytický metabolismus plní fyziologickou funkci za normoxických podmínek tím, že reaguje na rychlou energetickou poptávku, zejména z membránových transportních aktivit, a to i v přítomnosti kyslíku. To podporuje nový model metabolismu glukózy, ve kterém glykolýza a oxidativní fosforylace poskytují různé typy energetické potřeby. Buňky využívají účinný, ale pomalu reagující aerobní metabolismus, aby pokryly základní, ustálenou energetickou náročnost a glykolytický metabolismus, který je neefektivní, ale může rychle zvýšit produkci adenosintrifosfátu (ATP), aby uspokojily krátkodobé energetické požadavky, zejména z membránových transportních aktivit [51].

1.7. Role α -Enolázy u nádorových buněk

Nároky na ENO1 a její glykolytickou funkci u nádorových buněk je značně větší, jelikož nádorové buňky mají mnohonásobně větší spotřebu energie při neustálé proliferaci. Pro ENO1 bylo zjištěno, že k ní lze přiřadit 7 z 10 charakteristických znaků (viz 1.1.), které jsou následující: 1) udržení proliferativní signalizace, 2) aktivace invazivity a tvorby metastáz, 3) indukce angiogeneze, 4) vyhýbání se supresorům růstu, 5) odolávání buněčné smrti, 6) deregulace buněčné energie a 7) vyhýbání se eliminaci imunitním systémem [3]. Všechny tyto body z listu Hallmarks of cancer ukazují, jak je ENO1 v lidském organismu rozšířeným a důležitým proteinem a v kolika důležitých metabolických drahách hraje roli.

1.7.1. Udržení proliferativní signalizace

Například u karcinomu prsu SK-BR-3 bylo po regulaci ENO1 pozorováno snížení proliferace nádorových buněk. Navíc se jako další efekt projevila zvýšená rychlost apoptózy nádorových buněk, a to zvýšením hladin proteinu BAX a snížením hladin Bcl-2. Podobný efekt byl pozorován u dráhy PI3K/AKT, kdy byla snížena hladina fosforylace PI3K a PKB a došlo tak k následnému tlumení příslušných signálních drah [52]. Dalším příkladem je útlum ENO1 u

rakoviny žaludku. Vlivem toho došlo k zastavení buněčného cyklu ve fázi G1 a zároveň se zvýšila míra apoptózy buněk MKN-45 a MGC-803 [53].

1.7.2. Zvýšení invazivity a vznik metastáz

Mnoho studií prokázalo, že nadměrná exprese ENO1 pozitivně koreluje s invazivitou, migrací a metastázami u různých typů nádorových onemocnění [40, 52,54]. Tato role pro ENO1 vychází z jeho úlohy jako plazminogenového receptoru (Obrázek 7, 9). Dochází k urychlení vazby plazminogenu. Ten je poté přeměňován na serinovou proteázu, tedy plazmin. Ten je při zánětlivých stavech aktivován a dochází k fibrinolýze a degradaci ECM, což je hlavní hnací síla migrace a metastázování nádorových buněk [55,56].

Dalším příkladem, jak ENO1 napomáhá s šířením nádorových buněk v organismu je epiteliální – mezenchymální přechod (EMT). Jde o transformování epiteliálních buněk na mezenchymální buňky. Tím buňky ztrácí polaritu a schopnost adheze, ale získají schopnost migrovat, volně proliferovat a diferenciovat se. Tato dráha, která buňkám umožní mít podobné vlastnosti jako buňka kmenová, je kritická pro šíření nádorových buněk po organismu [57].

1.7.3. Indukce angiogeneze

Aktivace glykolytické dráhy zprostředkované ENO1 zvyšuje transkripci a inhibuje apoptózu buněčného onkogenu. To vede k angiogenezi a kompenzuje hypoxii v nádorových buňkách, čímž chrání nádorové buňky před zahynutím z důvodu nedostatku kyslíku [58].

1.7.4. Snížená reaktivita na indukci buněčné smrti

Hlavním problémem tedy nastává fakt, že přítomnost vyšších hladin ENO1 vede k urychlení proliferace a tlumení apoptotické smrti nádorových buněk. Dochází k tomu kvůli urychlení G1 fáze buněčného cyklu a díky zvýšení hladin cyklin-dependentní kinázy 6. K prodloužení přežití buněk došlo díky ENO1 prostřednictvím zvýšení hladiny p38 v kaskádě MAPK a zvýšením p-PKB v kaskádě PKB. Tato dráha byla prokázána na nádorových buňkách u rakoviny plic [59].

Na druhou stranu bylo zjištěno, že některé nádorové buňky nevyužívají Warburgova efektu pro zvýšení glykolytického toku a zvýšení ENO1 může mít přesně obrácený efekt. Například u neuroblastomu zvýšení hladin ENO1 inhibuje buněčnou proliferaci a indukuje apoptózu [60].

1.7.5. Deregulace buněčné energie

Jelikož ENO1 je důležitým katalyzátorem při glykolýze, tak její hladiny silně ovlivňují její průběh. A tím i celkový zisk energie z ní. Při inhibici glykolýzy, snížením hladiny ENO1,

dochází k metabolickým změnám, které vedou k autofagii, oxidaci mastných kyselin a katabolismu aminokyselin. To vše vede k menšímu růstu nádorových buněk [61].

1.7.6. Kompetice nádorových buněk se zdravými buňkami o zdroje energie

ENO1 má klíčovou roli v zajišťování energie pro buňky. Zvýšené množství ENO1 u nádorových buněk odpovídá vyšším nárokům na energii. Kvůli tomu nastává nedostatek glukózy pro ostatní zdravé buňky včetně buněk imunitního systému. Navíc při nedostatku glukózy dochází k snížení aktivity ENO1, a tím dochází k snížení glykolytické aktivity CD8+ TIL (tumor infiltrující lymfocyty) [62]. Nastává tedy otázka, zda je vhodné tlumit aktivitu ENO1, jelikož dochází k útlumu glykolýzy jak u nádorových buněk, tak ale i zároveň u CD8+ TIL.

1.7.7. Snížená reaktivita s růstovými supresory

Pokud se při transkripci genu pro ENO1 posune start kodon o jedno místo, začne se transkribovat tzv. *c-MYC* vázající protein (MBP1). Tento protein se vyskytuje v jádře na rozdíl od ENO1, která je především v cytoplazmě, nebo na povrchu buněk (Obrázek 7) [63]. ENO1 a MBP1 spolu interagují prostřednictvím onkoproteinu *c-MYC*, který dereguluje glykolýzu prostřednictvím aktivace několika složek metabolické dráhy glukózy, včetně zvýšení hladiny ENO1. Na druhé straně se MBP1 váže na promotor P2 *c-MYC* a funguje jako transkripční represor pro transkripci *c-MYC* za podmínek buněčného stresu a nízké hladiny glukózy, čímž zpomaluje buněčnou proliferaci. Při hypoxii mají nádorové buňky tendenci zvyšovat expresi *c-MYC*, což současně zvyšuje hladinu ENO1 na podporu glykolýzy a snižuje hladinu MBP1, aby se urychlila buněčná proliferace. U karcinomu prsu existoval inverzní vztah mezi expresí MBP1 a aktivitou ENO1, kde byl pokles MBP1 spojen se špatnou prognózou [64].

1.8. Metody pro průkaz a stanovení α -Enolázy a jejich protilátek

ENO1 je metaloprotein o molekulové hmotnosti 47 kDa a izoelektrickém bodu 7. Kvůli jeho vlastnostem a výskytu v mnohých metabolických drahách se stává výborným nádorovým biomarkerem. Výskyt ENO1 na povrchu buněk ji dělá dobře dostupnou pro případnou léčbu, nebo ovlivnění její hladin. V porovnání se zdravými buňkami se v nádorových buňkách ENO1 vyskytuje nadměrně. Následně fakt, že její vyšší exprese koreluje s horší prognózou a klinickým stavem některých nádorových onemocnění. Je tedy ideální jako biomarker nádorových onemocnění. ENO1 se vyskytuje v několika izoformách. Často se vyskytuje ve vysoce komplexních biologických materiálech. Bylo tedy potřeba vyvinout určité laboratorní postupy pro její průkaz, stanovení její aktivity a separaci [29].

1.8.1. Metody pro průkaz α -Enolázy

1.8.1.1. ELISA

V dnešní době se už používá převážně předem připravených diagnostických souprav pro stanovení izoform proteinu α -Enolázy. Jedná se o soupravu, který obsahuje mikrotitrační destičku (standardně 96 jamek), kde je každá z jamek potažena protilátkami proti antigenu enolázy. Po přidání vzorku s enolázou se vytvoří komplex antigen-protilátka. Po dostatečně dlouhé inkubaci (37 °C, 30 minut) se destička několikrát promyje. Následně se přidá křenová peroxidáza a nechá se inkubovat. Dále se jamky promyjí a přidá se chromogen, který způsobí viditelnost barevné změny. Po přibližně 10 minutách se reakce zastaví. Následuje měření na spektrofotometru (přesná vlnová délka se nastavuje podle typu reakce) většinou při 450 nm. Následně se pro vyhodnocení používá kalibrační křivka [65].

1.8.1.2. 2D elektroforéza

Při provedení 2D elektroforézy se proteiny nejprve rozdělí podle izoelektrického bodu pI v gradientu pH a následně podle své molekulové hmotnosti provedením klasické elektroforézy. Po provedení těchto dvou metod a následném obarvení gelů vznikne tzv. proteinová mapa, kde při správném provedení můžeme vidět jednotlivé izoformy proteinů. Pro přesnější stanovení je poté potřeba provést metodu in gel digest s následnou MS analýzou. Jde o vyříznutí spoty z gelu, extrakci proteinu z gelu a následné MS analýzy.

1.8.1.3. Hmotnostní spektrometrie

Pro průkaz ENO1 lze využít kapalinovou chromatografii s tandemovou hmotnostní spektrometrií (LC-MS/MS). Při této metodě je směs proteinů štěpena proteolytickým enzymem za vzniku velkého souboru peptidů. Směs komplexních peptidů se pak oddělí on-line pomocí

tandemového hmotnostního spektrometru, čímž se získá velký počet tandemových hmotnostních spekter. Tandemová hmotnostní spektra se pak použijí k prohledání databáze proteinů a následnému porovnání spekter k identifikaci konkrétních, přítomných proteinů. Výsledky ze standardních proteinových směsí ukazují, že proteiny přítomné v jednoduchých směsích lze snadno identifikovat [66]. Tato metoda může sloužit také k rozlišení izoform α -Enolázy. Prvním krokem pro identifikaci izomerů α -Enolázy ve vzorku je ji izolovat. Izolace probíhá například prostřednictvím afinitní chromatografie, kdy se enoláza specificky váže na nosič uvnitř kolony, který se potažený např. anti-ENO1 IgG. Poté se kolona několikrát promyje a následně je enoláza eluována z kolony ven např. NH_4OH . Jiným způsobem může být provedení SDS-PAGE, kdy se na gelu rozdělí proteinová frakce podle pI a Mr (viz. 1.8.1.2.). Po obarvení gelu stříbrem, nebo Coomassie Blue se vyřízne gel v místě spoty. Gel se odbarví a enzymaticky se proteiny extrahují z gelu. Vzorek se poté odsolí a tím je připraven na MS analýzu. Po provedení MS analýzy se výsledky porovnávají s knihovnamí pro přesnou identifikaci izomeru proteinu.

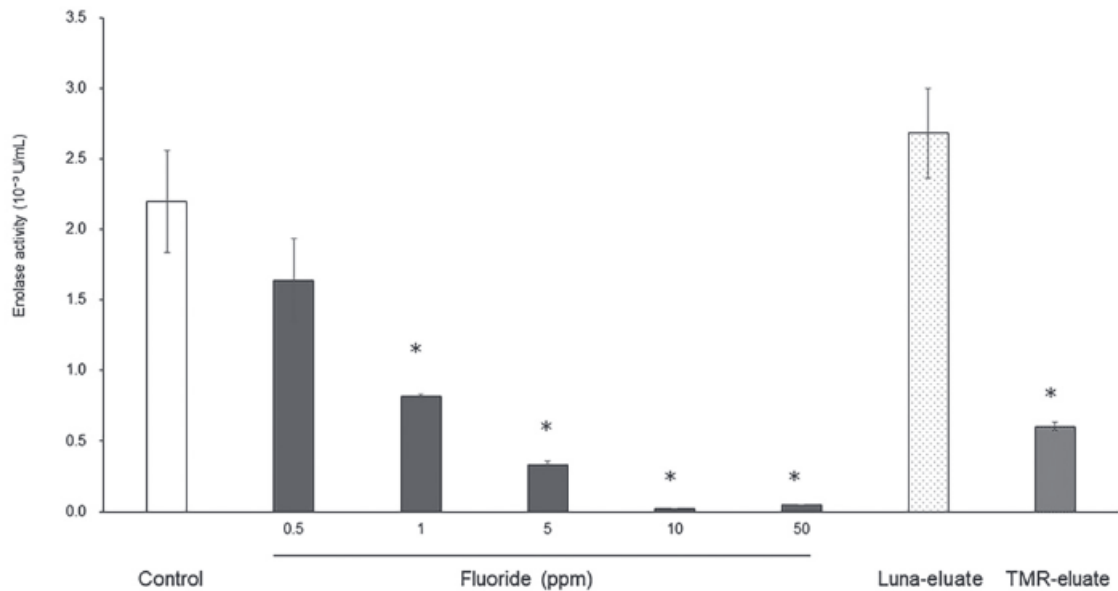
1.8.2. Metody pro stanovení aktivity enzymu

1.8.2.1. Optický test

Měření změny v hodnotách absorbance při vlnových délkách (př. 240nm, 340nm, 570 nm), kde záleží na typu stanovení a absorpčním maximu. Sleduje se změna absorbance, která je zapříčiněna přeměnou substrátu na produkt s jiným absorpčním maximem. V dnešní době se dá enoláza prokázat pomocí diagnostických souprav vyrobených přímo pro konkrétní isomer (α, β, γ -Enoláza). Výrobci těchto diagnostických souprav si nechávají přesně složení roztoků jako obchodní tajemství, nicméně jde o převážně o reakce přeměny 2-fosfoglycerátu na fosfoenolpyruvát, jelikož se α -Enoláza přímo podílí na tomto kroku glykolýzy (viz. 1.5.).

V této studii se zkoumal vliv kompozitních pryskyřic, které uvolňují fluoridy, na aktivitu α -Enolázy u bakterie *Streptococcus mutans* (*S. mutans*). Byly použity 2 pryskyřice. První z nich TMR-Z Fill 10, u které bylo potvrzeno postupné uvolňování fluoridů v průběhu času a druhá Luna-Wing, která neobsahuje fluoridové částice, a tudíž neuvolňuje fluoridy. Bakterie byly inkubovány s oběma pryskyřicemi po dobu 24 hodin při 37 °C a následně se z nich připravil buněčný lyzát. Jako pozitivní kontrola se nechaly bakterie inkubovat v BHI 24 hodin při 37 °C s různými koncentracemi fluoridu (1, 10, 50, 100, 1,000 ppm). K testu se použil Enolase Activity Colorimetric/ Fluorometric Assay Kit od firmy BioVision. Kde α -Enoláza přeměňuje 2-PG na PEP, který poté reaguje se sondou OxiRed™, která mění zabarvení reakce. Podle protokolu diagnostické soupravy se napipetovalo do mikrotitrační destičky 25 μl lyzátu

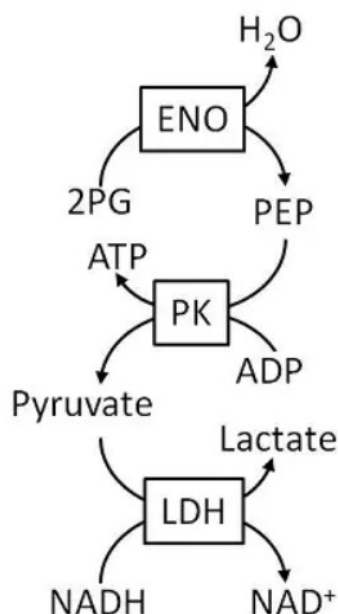
S. mutans s různými koncentracemi fluoridu, do dalších jamek poté lyzát inkubovaný s TMR-Z Fill 10 a do další jamky lyzát inkubovaný s Luna-Wing. Poté se do každé jamky přidalo 50 μ l reakční směsi z diagnostické soupravy a měřila se absorbance při vlnové délce 570 nm v kinetickém módu po dobu 20-60 minut při 25 °C. Jako kontrola byl použit lyzát z neovlivněné kultury *S. mutans*.



Obrázek 10 - Aktivita Enolázy po ovlivnění fluoridy z kompozitních pryskyřic [67]

Z výsledků jasně vyplývá, že u bakterií inkubovaných s fluoridy se aktivita Enolázy snížila. Následně se potvrdilo i tvrzení, že pryskyřice TMR-Z Fill 10, které uvolňují fluoridy také snižují aktivitu Enolázy v porovnání s pryskyřicí Luna-Wing, která fluoridy neuvolňuje. Lze tedy říct, že pryskyřice s postupným uvolňováním fluoridů inhibují adhezi a tvorbu biofilmu bakterie *S. mutans* prostřednictvím snižování aktivity Enolázy jakožto důležitým enzymem v těchto mechanismech [67].

1.8.2.2. Imunospecifická sorpce



Obrázek 11 - Schéma reakce v rámci manuálu pro diagnostickou soupravu Abcam [76]

Za použití diagnostické soupravy pro stanovení aktivity ENO1 od firmy Abcam. Využívá se mikrotitrační destičky s předem navázanými Ab anti-ENO1 IgG na stěně jamek. Sleduje se úbytek signálu, který je zapříčiněn přeměnou NADH na NAD⁺ prostřednictvím laktátdehydrogenázy (Obrázek 11). Po inkubaci vzorků v jamce a jejich promytí se do jamek přidá aktivační roztok, který obsahuje enzymy potřebné k proběhnutí enzymatické reakce. Konkrétně se v tomto případě jedná pyruvátkinázu a laktátdehydrogenázu. α -Enoláza je potřebná pro odstartování celé reakce a je tedy potřeba se zaměřit na krok izolace ENO1 z komplexního biologického materiálu, kapalného vzorku. Výsledky reakce se poté měří kineticky po dobu potřebnou k proběhnutí reakce (vyčerpání substrátu, vyrovnání substrát/produkt) na spektrofotometru při vlnové délce 340 nm.

1.8.2.3. Warburgův optický test

V této metodě se sleduje změna absorbance při přeměně substrátu 2-fosfoglycerátu (2-PG) na fosfoenolpyruvát (PEP), což je jedna z reakcí glykolýzy (viz kapitola 1.5.). α -Enoláza zde figuruje jako katalytický enzym, který reakci startuje. Reakce probíhá v imidazolovém pufru o pH 7,4. Po smíchání substrátu (2-PG) a enzymu (ENO 1) se okamžitě odstartuje reakce, kterou zaznamenáváme kineticky na spektrofotometru při 240 nm.

1.8.3. Metody vhodné pro separaci α -Enolázy

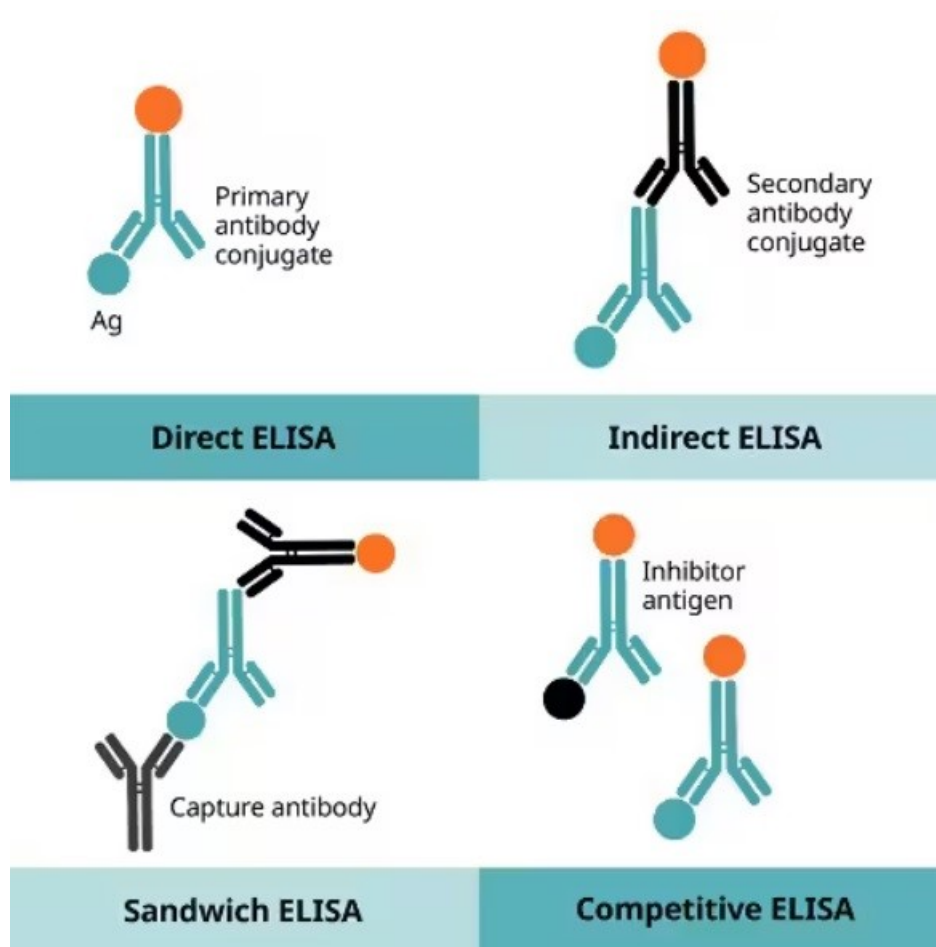
Pro separaci α -Enolázy ze vzorku se volí postupy podle metod používaných k jejímu průkazu. Proveďte se zlyzování materiálu pro získání veškerých proteinů obsaženými ve vzorku. Následně se provede rozdělení izoelektrickou fokuzací na gelovém stripu. Dojde k rozdělení proteinů podle izoelektrického bodu. Následně se provede elektroforéza, kde se proteiny rozdělí podle relativní molekulové hmotnosti. Tímto druhým dělením vzniká tzv. proteinová mapa. Díky předpokládané pozici ENO1 $pI = 7$ a $M_r = 47,169$ kDa jsme poté schopni z gelu vyříznout spotu, která odpovídá ENO1. Což lze ověřit prostřednictvím hmotnostní spektrometrie [68].

Další metodou pro izolaci ENO1 je například afinitní chromatografie. Jedná se o separační metodu založenou na specifické vazebné interakci mezi imobilizovaným ligandem a jeho vazebným partnerem. Příklady zahrnují interakce protilátka/antigen, enzym/substrát a enzym/inhibitor. Stupeň čištění může být poměrně vysoký v závislosti na specifčnosti interakce a v důsledku toho je obecně prvním krokem, ne-li jediným krokem v purifikační strategii [69].

1.8.4. Metody pro průkaz specifických protilátek proti α -Enoláze

1.8.4.1. ELISA

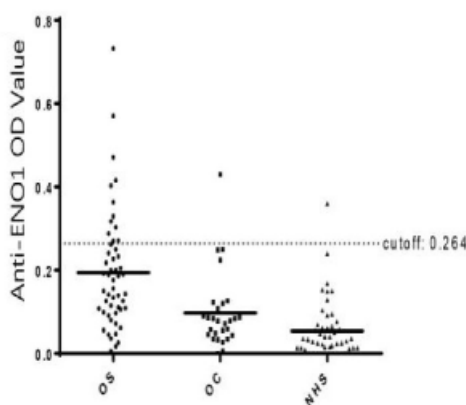
Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) je značený imunotest, který je dnes široce využíván napříč všemi odvětvími. Tento imunologický test je velmi citlivý a používá se k detekci a kvantifikaci látek, včetně protilátek, antigenů, proteinů, glykoproteinů a hormonů. Detekce těchto produktů se provádí na základě tvoření komplexů. Podle uspořádání můžeme rozlišovat různé druhy ELISA metody (Obrázek 12). Přímá ELISA (antigenem potažená destička; screening protilátky). Nepřímá ELISA (antigenem potažená destička; screening antigenu/protilátky). Sendvičová ELISA (titrační destička potažená protilátkou; screening antigenu). Kompetitivní ELISA (screening protilátky) [70, 71].



Obrázek 12 - Schématické zobrazení různých typů metody ELISA [77]

Pro průkaz specifických protilátek proti ENO1 se použije princip nepřímé ELISA metody. Jde o uspořádání, kdy je na podložce, zkumavce, nebo stěně mikrotitrační destičky navázán antigen (Ag), který je specifický pro anti-ENO1. Následně se zbytek povrchu zkumavky, nebo stěny mikrotitrační destičky blokován blokovacím roztokem 1% BSA. Po přidání vyšetřovaného vzorku (sérum, plazma), se vytvoří imunokomplex antigen-protilátka. Nechá se dostatečně dlouho inkubovat a po promytí se přidá konjugát, který je značený peroxidázou. Konjugát se v případě přítomnosti anti-ENO1 naváže. Po promytí se přidá peroxidáza a chromogen. V případě pozitivity dojde ke změně barvy chromogenu, a tedy k změně měřeného signálu.

Protein ENO1 byl zředěn z původní koncentrace na konečnou koncentraci 1,0 µg/ml v PBS a nanesen na Clear Flat-Bottom Immuno Nonsterile 96-jamkové destičky, které byly poté inkubovány přes noc při 4 °C. Po blokování 2% BSA byly destičky třikrát promyty s 1 × PBS-T. Lidská séra byla zředěna v poměru 1:100 v antigenem potažených jamkách. Po pětinasobném promytí 1 x PBST, kozí anti-Human IgG (H + L) sekundární protilátka, HRP a substrát (1 mg/ml 2,2-azino-bis[3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonová kyselina] s 0,005% peroxidem vodíku v citrátovém pufru, pH 4,6) byly použity jako detekční činidla. Optická hustota (OD) byla měřena při 405 nm. pomocí spektrofotometru [72]. V rámci provádění a sjednocení výsledků provedených metodou ELISA jsou vytvářeny diagnostické soupravy, které mají rozmezí detekce 0.313-20 ng/ml. Citlivost obvykle kolem 0.188 ng/ml a odchylkou pod 8 % [72].



Obrázek 13 - Bodový graf zachycující výsledky ELISA testů na průkaz specifických protilátek anti ENO1 u pacientů s osteosarkomem (OS), osteochondromem (OC) a porovnání se zdravým dárce (NHS – Normal Human Serum) [72]

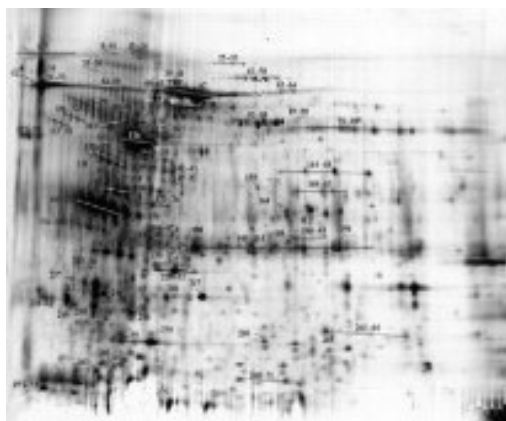
1.8.4.2. Metoda SERPA s následnou imunodetekcí

SERPA neboli sérologická analýza proteomu je komplexní spojení metod dvourozměrné elektroforézy na polyakrylamidovém gelu (2D-PAGE) v kombinaci s Western Blotem. Tato metoda se využívá k separaci proteinových antigenů a umožňuje lepší rozlišení proteinů reaktivních s imunitním sérem pro následnou imunodetekci.

2D SDS-PAGE s izoelektrickou fokuzací

Celá metoda začíná přípravou buněčného lyzátu z nádorových buněk. Následuje nanesení nádorových buněk na gelové stripy. Provede se izoelektrická fokuzace (viz. 3.3.3.). Po rozdělení proteinů na stripu podle pI se stripy vloží do elektroforetické vany a provede se klasická elektroforéza na polyakrylamidovém gelu. Po rozdělení podle Mr vznikne

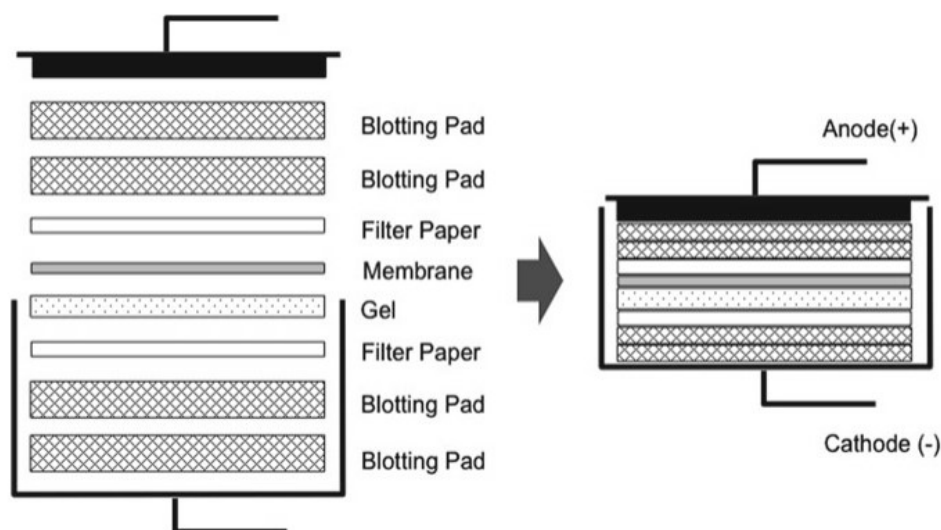
tzv. proteinová mapa vzorku (viz Obrázek 14). Ta je specifická pro každou buněčnou linii, jelikož se jedná o veškeré proteiny obsažené v buňkách lyzátu naneseného na stripy.



Obrázek 14 - Proteinová mapa ze vzorku lidské moči [78]

Western Blot

Western Blot je metoda, která slouží k přenosu proteinů z gelu na membránu. Tento proces převede proteiny, které jsou rozprostřeny v celé tloušťce gelu na povrch membrány a proteiny jsou tedy lépe dosažitelné pro další kroky analýzy. Samotný přenos je zapříčiněn působením elektrického proudu, kdy uspořádání je (od spodu) katoda, filtrační papír, nitrocelulózová membrána, gel s proteiny, filtrační papír, anoda (Obrázek 15). Po přenesení proteinů na nitrocelulózovou membránu následuje barvení.



Obrázek 15 - Schéma techniky Western Blot pro přenos proteinu z gelu na membránu [73]

Barvení membrány a gelů

Pro zjištění kvality přenosu z gelu na membránu se oba nosiče obarví. Obarvení membrány se provádí pro zjištění přenesených proteinů. Standardně barvení pomocí stříbra. Zároveň se barví i gely, pro zjištění nepřenesených proteinů. Barvení gelů se provádí pomocí stříbra nebo Coomassie Blue. Finální záznam přenosu se provádí pomocí fotografické stanice.

Imunodetekce

Po potvrzení kvality přenosu proteinové mapy následuje aplikace vzorků (pacientské sérum, zjišťovaný protein). Membrána se nechá inkubovat podle potřeby se vzorkem (ideálně přes noc). Následně se k membráně přidá konjugát (sekundární protilátka), která je namířena specificky proti zjišťovanému proteinu. Po inkubaci s konjugátem se provede ECL chemiluminiscenční detekce pomocí luminolu a HRP. Focení výsledků probíhá ve fotografické stanici po dobu 304 sekund. Jako pozitivní výsledek se považuje zvýrazněná imunoreaktivní spota v oblasti odpovídající zkoumanému enzymu.

2. Cíle práce

Cílem práce bylo zdokonalit a použít metodu SERPA pro identifikaci anti-ENO1 IgG v séru pacientů s mnohočetným myelomem. Následně zavést a validovat metodu pro stanovení aktivity enzymu ENO1 pomocí diagnostické soupravy.

Dílčí cíle práce byly: pomocí SERPA metody otestovat patientská séra na přítomnost anti-ENO1 IgG a zjistit korelaci mezi naměřenými výsledky a progresí onemocnění mnohočetný myelom, zavést metodu pro stanovení aktivity enzymu ENO1 s využitím diagnostické soupravy, ověření aktivity rekombinantního enzymu ENO1 již ověřenou metodou Warburgův optický test.

3. Experimentální část

3.1. Seznam laboratorního vybavení

- analytické váhy Scaltec SBC 32 (Scaltec Instruments, GmbH, Göttingen, Německo)
- aparatura pro blotovací přenos Trans-Blot® SD Semi-Dry (Bio-Rad, CA, USA)
- aparatura pro diskontinuální elektroforetickou separaci Mini-PROTEAN Tetra Cell (Bio-Rad, CA, USA)
- automatické pipety Eppendorf Research (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- BioTek PowerWave 340 Microplate Reader (Agilent, Santa Clara, USA)
- blotovací nitrocelulózová membrána (NC) Trans-Blot® Transfer Medium, porozita 0,2 µm (Bio-Rad, CA, USA)
- centrifugační zařízení MiniSpin Plus (Merck, Eppendorf, Darmstadt, Německo)
- destilační zařízení pro úpravu čistoty vody (zásobník s redestilovanou vodou) Halios 40 Type 1 (Neptec, Elbtal, Německo)
- gelové stripy s imobilizovaným gradientem (stripy) pH Immobiline™ DryStrip pH 3–10 NL, 7 cm (GE Healthcare, Uppsala, Švédsko)
- krycí skla Mini-PROTEAN® Short Plates (Bio-Rad, Praha 4, Česká republika)
- magnetické míchadlo s ohřevem model MSH-300 (Biosan SIA., Riga, Lotyšsko)
- mikrozkušavky (BioTech a.s., Praha, ČR a Eppendorf, Hamburg, Německo)
- Mini-rotátor Bio RS-24 (BioSan SIA, Riga, Lotyšsko)
- multifunkční Orbital Shaker PSU-20i (BioSan SIA, Riga, Lotyšsko)
- pH metr model Orion 420 (Thermo Electron Corporation, Massachusetts, USA)
- promývací stanice FlexiWash FW400 (Cellagen Technology, Praha, ČR)
- předvážky KERN 440-33N (Kern & Sohn GmbH, Balingen, Německo)
- skla Mini-PROTEAN® Spacer Plates with 1.0 mm Integrated Spacers (Bio-Rad, Praha 4, Česká republika)
- skleněná kyveta 10 mm s víčkem PTFE (Hellma Optik GmbH, Jena, Germany)
- spektrofotometr Libra S22 UV/VIS (Biochrom, Cambridge, Velká Británie)
- svářečka folií Freshie 1762 a plastové fólie (Eta, Praha, ČR)
- špičky eppendorf GELoader (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- TECAN infinite M200 (Tecan, Männedorf, Switzerland)
- TECAN Spark (Tecan, Männedorf, Switzerland)
- ultrasonikátor UP200H (Hielsches, Teltow, Německo)

- ultrazvukový procesor UP100H (Hielscher, Berlín, Německo)
- Vortex mixer Wx (VELP Scientifica, Usmate, Italy)
- zařízení pro izoelektrickou fokuzaci PROTEAN® IEF Cell (Bio-Rad, CA, USA)
- zdroj napětí Power-Pac 200 (Bio-Rad, CA, USA)
- zkumavky s víčkem, centrifugační, 15 ml a 50 ml
- zobrazovací systém G:BOX Chemi XX6 (CCD kamera s GeneSys a GeneTools softwary) (Syngene, USA)
- zobrazovací systém ChemiDoc™ XRS+ (CCD kamera s ImageLab softwarem), (Bio-Rad, CA, USA)

3.2. Seznam chemikálií

- 2-(+)-fosfoglycerát (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- 3-[(3-Cholamidopropyl)dimethyl-ammonio]-1-propansulfonat – CHAPS (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- agaróza (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- akrylamid (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- bromfenolová modř (Lachema, Neratovice, ČR)
- butanol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- citronan sodný (Penta, Chrudim, ČR)
- Coomassie Blue G-250 Stain (Bio-Rad, CA, USA)
- čisticí roztok Coulter CLENZ Cleaning Agent (Beckman Coulter, SA, Švédsko)
- destilovaná voda, redestilovaná voda
- DeStreak Reagent, hydroxyethyl disulfid (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Švédsko)
- dihydrogenfosforečnan draselný (Lach-Ner, Neratovice, ČR)
- dithiothreitol, DTT (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- dodecylsulfát sodný, SDS (Lachema, Neratovice, ČR)
- dusičnan stříbrný (Sigma-Aldrich, Chrudim, ČR)
- ENO1 protein, Human, Recombinant (His Tag) (Sinobiological, Beijing, Čína)
- ethanol (Penta, Chrudim, ČR)
- fenylmethylsulfonyl fluorid, PMSF (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- glycerol (Penta, Chrudim, ČR)
- glycin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- hexakynoželezitan tridraselný (Penta, Chrudim ČR)
- hydrogenfosforečnan disodný dodekahydrát (Lach-Ner, Neratovice, ČR)
- hydroxid sodný (Penta, Chrudim, ČR)
- chlorid draselný (Penta, Chrudim, ČR)
- chlorid sodný (Lach-Ner, Neratovice, ČR)
- imidazol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- jodacetamid, IAA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- KCl (Penta, Chrudim, Česká republika)
- kyselina citronová bezvodá (Fluka, Buchs, Švýcarsko)

- kyselina octová 99% (Lach-Ner, Neratovice, ČR)
- methanol (Penta, Chrudim, ČR)
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Penta, Chrudim, Česká republika)
- minerální olej (Bio-Rad, CA, USA)
- močovina (Lach-Ner, Neratovice, ČR)
- N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin, TEMED (Bio-Rad, CA, USA)
- N,N'-metylen-bis-akrylamid (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- odtučněné sušené mléko (Aditiva CZ, Praha, ČR)
- peroxidisíran amonný, APS (Penta, Chrudim, ČR)
- protilátka anti-human IgG (WM, HRP, původ kozí, A8667, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- síran železnatý heptahydrát (Lach-Ner, Neratovice, ČR)
- směs amfolytů Pharmalyte pH 3–10 pro IEF (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Švédsko)
- směs amfolytů Pharmalyte pH 8–10,5 pro IEF (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Švédsko)
- standard molekulových hmotností (10–250 kDa) Precision Plus Protein Dual Color Standards (Bio-Rad, CA, USA)
- substrát Clarity Western ECL (Enhanced Chemiluminescence, luminol, peroxid vodíku, Bio-Rad, CA, USA)
- thiomočovina (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)

Vzhledem k slibným výsledkům při testech s α -Enolázou ve spojení s nádorovými onemocněními jakožto biomarkeru, se experimentální část této diplomové práce zaměřuje na otestování α -Enolázy jako biomarkeru pro onemocnění mnohočetný myelom.

3.3.SERPA (Serological Proteome Analysis)

3.3.1. 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), uskladněno v $-80\text{ }^\circ\text{C}$ v kryozkumavce

Buněčná linie RPMI 8226

Pro vytvoření buněčného lyzátu k následnému vytvoření proteinových map byla použita buněčná linie RPMI 8226. Tato nádorová buněčná linie je běžně používaný model myelomových buněk pro výzkumné účely. Jedná se buněčnou linii B lymfocytů, která pochází z periferní krve 61letého pacienta, kterému byl prokazatelně diagnostikován mnohočetný myelom. Zároveň je tato linie prokazatelně pozitivní na přítomnost α -Enolázy. Je tedy zcela vyhovující pro naše testování.

Vzorky patientských sér

Byla testována séra 10 pacientů, kterým byl diagnostikován mnohočetný myelom. Celkem bylo otestováno 46 vzorků. První odběr byl proveden vždy v době diagnózy a další odběry byly provedeny při pravidelné kontrole, v některých případech byly odběry prováděny před, nebo po transplantaci kostní dřeně podle potřeby a typu terapie. Vzorky patientských sér poskytla Biobanka Kliniky hematooonkologie Fakultní nemocnice v Ostravě (přednosta kliniky, pan prof. MUDr. Roman Hájek, CSc., a vedoucí výzkumné laboratoře s biobankou, paní Mgr. Lucie Broskevičová). Pacienti, kterým byly vzorky odebrány podepsali informovaný souhlas a byli seznámeni s účelem odběru. Vzorky pacientů byly označeny kódem a bylo u nich uvedeno pouze pohlaví pacienta a datum odběru, žádné další informace o vzorcích poskytnuty nebyly.

Pro získání negativních kontrol byly osloveni dobrovolní dárci. Bylo testováno 5 dobrovolných dárců, kteří poskytli vzorky krve a podepsali informovaný souhlas, že v době odběru vědomě netrpěli žádným nádorovým onemocněním. Jednalo se o dárce ve věkovém rozmezí 50-75 let. Krevní vzorky byly odebrány odborným pracovníkem na Katedře biologických a biochemických věd Fakulty chemicko-technologické Univerzity Pardubice.

Jako pozitivní kontrola bylo použito sérum pacientky s mnohočetným myelom, které opakovaně prokazovalo silnou imunoreaktivitu při stanovení anti-ENO1 Ab metodou SERPA. Vzorky sér poskytla Klinika hematologie a transfúziologie LF UK a UN Bratislava (MUDr. Ján Lakota Csc.). Pacientka byla 68letá žena stredo-evropského původu, které byl mnohočetný myelom diagnostikován již v roce 2002. Pacientka podstoupila chemoterapii, na kterou však neodpovídala dobře. Další terapií proto byla zvolena autologní transplantace krvetvorných kmenových buněk. V následujících 2 letech byla u pacientky pozorována částečná remise a rozvinutá AA amyloidóza. V letech 2004-2005 byla pacientka léčena IFN α z důvodu relapsu, ale léčba byla ukončena z důvodu intolerance na IFN α . Dále byla pacientka pozorována a stabilizována s částečnou remisí a bez nutnosti další léčby po autologní transplantaci.

Postup

Lyzační roztok byl připraven čerstvý, nebo se část roztoku připravila do alikvotů, které byly zamrazeny při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Pro přípravu 5 ml alikvotů lyzačního roztoku bylo smícháno 2,1 g močoviny, 0,76 g thiomočoviny a 0,2 g CHAPS. Do mikrozkušavky (0,5 ml) byly naváženy 4 mg DTT. K DTT se do mikrozkušavky přidalo 400 μl lyzačního roztoku. Následně bylo přidáno 8 μl Pharmalyte 3-10 a 4 μl PMSF. Buňky RPMI 8226 byly přeneseny z $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ na ledu a byly rozmrazeny podle správného postupu. 400 μl kompletního lyzačního roztoku bylo přidáno k peletě buněk do kryozkušavky a přeneseno do jiné 1,5 ml zkumavky. Buňky byly po dobu 17 sekund sonikovány na ultrasonikátoru (amplituda 80%, cycle 1). Následně byla provedena centrifugace 12,3 tisíc rpm po dobu 10 minut. Supernatant byl odebrán do nové zkumavky a tím byl připraven buněčný lyzát, který se mohl rovnou použít pro další kroky metody, nebo se mohl dát zamrazit do $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.3.2. Rehydratace gelových stripů s buněčným lyzátem

Reagencie a přístrojová technika

- rehydratační roztok: 6 M močovina, 2 M thiomočovina, 4% CHAPS, 40 mM TRIS, 1,2% DeStreak, zásobní roztok 1% bromfenolové modře, Pharmalyte 3 – 10, Pharmalyte 8 – 10,5, minerální olej

- 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

Na přípravu 5 ml rehydratačního roztoku bylo smícháno 1,8 g močoviny, 0,76 g thiomčoviny, 0,2 g CHAPS, 0,024 g TRIS, 60 μ l DeStreaku a 10 μ l bromfenolové modře. Rehydratační roztok byl čerstvý, nebo po přípravě zamražený do alikvotů v - 20 °C. Následně se podle tabulky 2 připravil směsný roztok podle počtu připravovaných stripů.

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

Tabulka 3 - Poměry reagentů pro přípravu směsného roztoku pro jeden strip

Takto připravený směsný roztok byl napipetován do jamek kazetky pro gelové stripy. Do každé jamky bylo napipetováno 115 μ l směsného roztoku. Po rozmrazení stripů se z nich sundala ochranná fólie pomocí pinzet a byly vloženy do jamek kazetky gelovou stranou dolů na směsný roztok. Po odstranění vzduchových bublin se stripy převrstvily 1 ml minerálního oleje. Kazetka se vložila do zařízení PROTEAN® IEF Cell, kde se spustil program rehydratace.

Nastavení přístroje: *Rehydration -> Passive -> START*

Rehydratace probíhala po dobu 16-18 hodin.

3.3.3. Izoelektrická fokuzace (IEF)

Reagencie 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

Před dokončením rehydratace byla připravena kazetka pro IEF, kde na každý drátek vedoucí k elektrodám byl položen kousek navlhčeného filtračního papíru v destilované vodě. Po dokončení rehydratace gelových stripů byly gely vyndány z jamek kazetky a opláchnuty destilovanou vodou a pinzetou byly přeneseny do kazetky pro IEF gelovou stranou dolů. Bylo potřeba hlídat správnou orientaci stripu, aby byl kladný konec stripu u anody a záporný u katody (pro správné rozdělení proteinů při IEF). Stripy byly převrstveny 1 ml minerálního oleje. Následně byly stripy přikryty víčkem kazetky, a tím byl zajištěn dostatečný kontakt stripů s drátky přes navlhčený filtrační papír. Kazetka se vložila do zařízení PROTEAN® IEF Cell, kde byl spuštěn přednastavený program pro izoelektrickou fokuzaci. Před spuštěním IEF byl nastaven přesný počet stripů a proud 75 μ A na 1 gel. Fokuzace standardně probíhala 7,5 - 8 hodin, ale doba se lišila podle konkrétních laboratorních podmínek. IEF se musela ukončit, pokud došlo k změně barviva z modré na žlutou a zároveň stoupla směrodatná hodnota nad 9000 Vh. Tím bylo dosaženo ideálního rozdělení proteinů podle pI. Po ukončení IEF byly gelové stripy opláchnuty a připraveny k dalšímu použití, nebo byly osušeny a přeneseny do čistých kazetek a uskladněny v $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (v $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ při delším skladování).

3.3.4. 2D SDS-PAGE

Reagencie a přístrojová technika

- roztoky pro přípravu gelů: 30% akrylamid, bisakrylamid, Tris pH 8, Tris pH 6,8; 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

Podle údajů v tabulce 4 (Tabulka 4) byly připraveny 12% dělicí gely, které byly převrstveny butanolem. Po polymerizaci byl butanol odsán a nad dělicí gel byl doplněn zaostřovací gel, do kterého se vložil hřebínek pro vytvoření jamky pro gelový strip. Během polymerizace gelu byly připraveny roztoky pro ekvilibraci. 10 ml ekvilibračního roztoku bylo přidáno k 0,1g DTT.

10 ml ekvilibračního roztoku bylo přidáno k 0,4 g IAA. Nejprve byly stripy inkubovány 15 minut v DTT (1,5 ml na jeden strip), následně byly opláchnuty destilovanou vodou a přeneseny do čisté kazetky s IAA také na 15 minut ve tmě. Poté se stripy opláchly destilovanou vodou a vložily do elektrodového pufru. Během ekvilibrace byla připravena elektroforetická aparatura a po jejím skončení byly stripy zastřiženy nůžkami, aby se vešly do jamek v gelech.

Směsný roztok na gely	12% Dělicí gel – 4x	Zaostřovací gel – 4x
Destilovaná voda	6,72 ml	4,2 ml
A – 30% AA a bisAA	8 ml	1 ml
B – 1,5 M Tris, pH 8,8	5 ml	X
C- 1 M Tris, pH 6,8	X	0,75 ml
D – 10% SDS	0,2 ml	0,06 ml
E – 10% APS	0,2 ml	0,06 ml
TEMED	0,008 ml	0,006 ml

Tabulka 4 - Poměry reagentů pro přípravu 12% gelu pro elektroforézu

Orientace stripů na gelech byla tak, aby kladný konec stripu byl u jamky pro standard molekulových hmotností a aby gelová strana stripu směřovala ke kratšímu sklu. Poté byly stripy převrstveny 0,5% agarózou, která byla předtím vytemperována. Před zatuhnutím agarózy byly vytlačeny bublinky zpod stripu. Po zatuhnutí agarózy byla elektroforetická vana naplněna elektrodovým pufrem podle počtu gelů. Poté byl napipetován standard molekulových hmotností (Precision Plus Protein Dual Color) v objemu 4 μ l pipetou s použitím speciální špičky eppendorf GELoader. Elektroforetická vana byla zapojena do zdroje a puštěna s nastavením: 60V, 0,03A na 1 gel, po dobu 5 minut. Tím bylo dosaženo zkoncentrování proteinů na hranici zaostřovacího gelu. Následně bylo nastavení upraveno na 180 V, 0,03A na gel. Čas elektroforézy se lišil podle laboratorních podmínek. Přibližně však 55 minut. Elektroforéza byla ukončena těsně předtím, než čelo elektroforézy opustilo gely.

3.3.5. Semi-Dry Western Blot

Reagencie 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, nitrocelulózová (NC) membrána
- aparatura pro blotovací přenos Trans-Blot® SD Semi-Dry

Postup

Před ukončením elektroforézy byla nastříhána nitrocelulózová membrána podle šablony. Byla ponořena do transferového pufru. Zároveň byly tlusté filtrační papíry ponořeny do transferového pufru. Po skončení elektroforézy byly gely vyjmuty ze skel a byla odříznuta zaostřovací část gelu. Dělicí gel byl ponořen do transferového pufru. Na přístroj pro Semi-Dry Western Blot byl nejprve položen tlustý filtrační papír, na něj byla pinzetou přenesena nitrocelulózová membrána a na ni dělicí gel. Na gel byl položen další tlustý filtrační papír a pomocí válečku byly odstraněny bubliny (Obrázek 15). Na tento „sendvič“ byla položena elektroda a celý přístroj byl uzavřen a připojen ke zdroji. Byl nastaven na 12V, 0,3A na gel na 70 minut. Po skončení přenosu byly gely i membrány obarveny pro kontrolu kvality přenosu.

3.3.6. Barvení proteinů na gelu

Reagencie a přístrojová technika

- fixační roztok: 5% kyselina octová, 50% ethanol
- Coomassie Blue G-250 Stain
- G:BOX Chemi XX6

Postup

Po přenosu byly gely 3x promyty destilovanou vodou a poté vloženy na 30 minut do fixačního roztoku. Poté byly rehydratovány destilovanou vodou dobu 30 minut. Následně bylo ke gelům přilito Coomassie Blue a nechalo se barvit podle potřeby (přibližně 30 minut). Po obarvení byly gely několikrát promyty destilovanou vodou a následně vyfoceny na stanici G:BOX pomocí softwaru GeneSys. Tím byla zkontrolována kvalita přenosu z gelu na membránu.

3.3.7. Barvení proteinů na nitrocelulózové membráně

Reagencie a přístrojová technika

- Barvicí roztok: 0,2% AgNO₃, 0,8% FeSO₃, 2% citrát sodný
- Odbarvovací roztok: 50 mM thiosulfát sodný, 15 mM hexakynoželezitan draselný
- G:BOX Chemi XX6

Postup

Po vyjmutí NC membrán z blotovacího přístroje byly membrány 3x promyty destilovanou vodou a poté obarveny roztokem AgNO₃ (přibližně 6 minut). Poté se membrány promývaly, dokud nebyl odmyt veškerý barvicí roztok. Poté byly membrány vyfoceny na stanici G:BOX s použitím softwaru GeneSys. Po uložení fotek byly membrány odbarveny pomocí odbarvovacího roztoku (přibližně 2 minuty). Poté se membrány promyly a zbavilo se tak odbarvovacího roztoku. Následně se membrány vložily do PBS-T pufru.

3.3.8. Imunodetekce reaktivních spotů

Reagencie a přístrojová technika

- blokovací roztok: 5% odtučněné sušené mléko (v PBS-T)
- primární protilátka: patientské sérum
- konjugát: anti-human IgG (kozí, 1:5000 s blokovacím roztokem)
- chemiluminiscenční substrát: Clarity Western ECL (luminol s H₂O₂ 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, izolepa, plastové folie, rotátor

Postup

Pro imunodetekci v rámci SERPA metody byly optimalizovány dva postupy. Jeden z nich byl manuální a druhý využíval automatické promývačky FlexiWash FW400. U obou způsobů byly zaznamenány výhody i nevýhody a byly porovnány.

Manuální postup

Membrány po promytí v PBS-T byly hodinu inkubovány v blokovacím roztoku na třepačce. Poté byly 2x10 minut promyty pufrům PBS-T. Během tohoto času byly připraveny patientská séra podle potřeby ředění (standardně 1:500: 3 µl pac. séra + 1,5 ml blokovacího roztoku).

Z dvouvrstvé laminovací fólie byly nastříhány větší obdélníky, pro vytvoření “kapes“ pro membrány. Jedna strana byla svařena a membrána byla vložena mezi vrstvy fólie. Následně byly svařeny další dvě strany a tím byla vytvořena kapsa. Do té byl napipetován veškerý roztok patientského séra. Vzduch z kapsy byl odstraněn a poslední strana byla zavařena. Takto zavařené membrány byly přilepeny izolepou k rotátoru a ten byl vložen do lednice 4 °C, kde probíhala inkubace s pac. sérem po dobu 17 hodin. Po inkubaci byly membrány vystřiženy z fólie, promyty 5x PBS-T a poté byl k membránám přidán konjugát (10 ml na membránu) po dobu 1 hodiny. Následně se membrány promyly 6 x 5minut PBS-T a membrány byly připraveny na chemiluminiscenční detekci.

Automatizovaný postup

Membrány po promytí PBS-T byly vloženy do promývací stanice FlexiWash. Před použitím stanice ji bylo potřeba pokaždé promýt pomocí čistícího roztoku Coulter CLENZ Cleaning Agent a následně vymýt čistící roztok pomocí redestilované vody a PBS-T. V případě velkého znečištění bylo potřeba použít 8% H₂O₂ a opět vypláchnout redestilovanou vodou a poté PBS-T. Po promytí byly veškeré reagenty položeny vedle stanice a hadičky byly rozděleny podle nastavení přednastaveného programu (viz. Tabulka č. 5). Nitrocelulózkové membrány byly vloženy do misek promývací stanice a po kontrole nastavení přístroje a správného rozdělení příslušných hadiček vedoucích k reagentům byla imunodetekcí zahájena.

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

Tabulka 5 - Nastavení promývací stanice FlexiWash pro metodu SERPA

Rozdíl v automatické imunodetekci byla teplota, při které docházelo k inkubacím. Zde byla teplota laboratorní, kdežto v manuální verzi byla inkubace s primární protilátkou při 4 °C.

Po dokončení manuální, či automatické metody byl připraven roztok ECL pro chemiluminiscenční detekci (2 ml na membránu). Bylo potřeba udržovat minimální přístup světla po dobu inkubace membrány s roztokem ECL. Poté se membrána vložila do stanice G:BOX s CCD kamerou a membrána se vyfotila prostřednictvím přednastaveného programu pro chemiluminiscenční detekci. Následovalo samotné vyhodnocení pomocí softwaru GeneSys a GeneTools.

3.4. Stanovení aktivity ENO1

Stanovení aktivity enzymu α -Enolázy ve vzorku. Cílem bylo vytvořit metodu pro rychlé a přesné stanovení aktivity ENO1 ve vzorcích pacientů a následné zjištění, zda má nějaký vliv přítomnost protilátek anti-ENO1 ve spojení s progresí onemocnění.

3.4.1. Stanovení aktivity ENO1 pomocí diagnostické soupravy Abcam

Reagencie a přístrojová technika

- diagnostická souprava od firmy Abcam (ab117994): 8x12 jamková mikrotitrační destička s anti-ENO1 protilátkami, extrakční pufr, blokovací pufr, základní pufr, reakční mix, pyruvát kináza (PK), laktát dehydrogenáza (LDH)
- rekombinantní lidská ENO1 s His Tag
- suchá peleta buněk RPMI 8226 (5×10^6), uskladněno v $-80\text{ }^\circ\text{C}$ v kryozkumavce
- BioTek PowerWave 340 Microplate Reader
- TECAN infinite M200
- TECAN Spark
- multikanálová pipeta

3.4.2. Aktivita rekombinantní ENO1

Byl připraven promývací pufr smícháním pufru na ředění roztoků a ultračisté vody v poměru 1:19. Dále byl připraven inkubační pufr smícháním blokovacího pufru s promývacím pufrům v poměru 1:9. K přípravě aktivačního roztoku byla rehydratována reakční směs přidáním 1 ml ultračisté vody. Byla inkubována po dobu 3 minut, dokud se nerozpustila. Do základního pufru byly přidány enzymy PK, LDH spolu s 1 ml reakčního mixu. Takto vytvořený aktivační roztok byl skladován v alikvotech v $-80\text{ }^\circ\text{C}$.

Připravené reagencie byly vytemperovány na laboratorní teplotu. Do mikrotitrační destičky bylo napipetováno 50 μl vzorku rekombinantní ENO1 v různých koncentracích. Jako slepý vzorek byl použit inkubační pufr, ve kterém byly ředěny vzorky. Mikrotitrační destička byla zalepena a po dobu 2 hodin byla inkubována na třepačce (300 rpm). Po inkubaci byla mikrotitrační destička 2x promyta promývacím pufrům. Po promytí a osušení destičky byl přidán aktivační roztok multikanálovou pipetou a okamžitě byla měřena absorbance v kinetickém módu.

Příprava buněčného lyzátu buněk RPMI 8226 pro stanovení aktivity ENO1

Příprava buněčného lyzátu z pelety buněk RPMI 8226 byla provedena dle návodu, kdy do zkumavky s buňkami nádorové linie RPMI 8226 odkládané na led bylo připipetováno příslušné množství extrakčního pufru. Suspenze nádorových buněk buněčné linie RPMI 8226 a extrakčního pufru byla inkubována 20 minut na ledu. Poté byla provedena centrifugace 16000 x g po dobu 20 minut při 4 °C. Následně byl odebrán supernatant a ten byl použit jako vzorek. Poté byl vzorek buněčného lyzátu zpracován stejně jako při použití rekombinantní ENO1.

3.4.3. Warburgův optický test

Pro stanovení aktivity další metodou byl zvolen Warburgův optický test. Kde se sleduje přeměna 2-fosfoglycerátu na fosfoenolpyruvát za přítomnosti ENO1 jakožto enzymu zprostředkovávajícímu tuto reakci (viz. 1.5.).

Reagencie a přístrojová technika

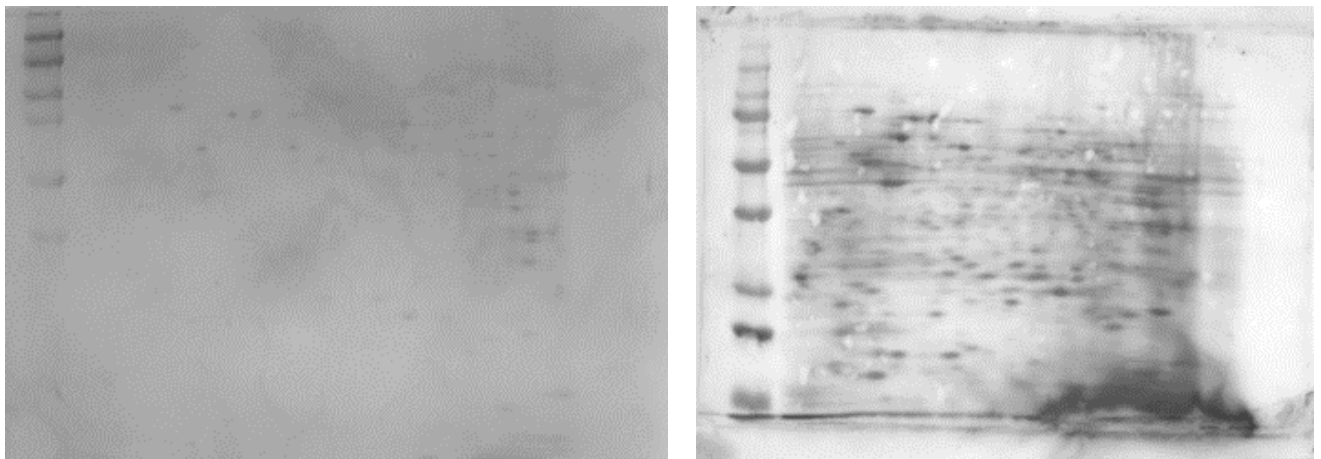
- imidazolový pufr: 50mM pufr s HCl pH 7,4
- MgSO₄, KCl
- 2-(+)-fosfoglycerát (2-PG)
- spektrofotometr Libra S22 UV/VIS, termostatický držák kyvety

Byl připraven imidazolový pufr, kdy bylo rozpuštěno 0,0340 g imidazolu s 0,0584 g NaCl a doplněno na 100 ml ultračistou vodou. Poté bylo upraveno pH na 7,4 pomocí HCl. Následně byla připravena reakční směs přidáním 2,982 g KCl a 0,0245 g MgSO₄ do 100 ml imidazolového pufru. Poté byl připraven 100mM substrát 2-(+)-fosfoglycerátu. V 500 µl pufru bylo rozpuštěno 0,0093 g 2-PG. Do Spektrofotometru Libra S22 byl vložen termostatický držák (Peltier) pro udržování teploty v kyvetě. Na počítači byl spuštěn program BioDc. Měření bylo prováděno kineticky a byly nastaveny podmínky: 30 °C, vlnová délka 240 nm, každých 10 sekund po dobu 350 sekund. Poté byly jednotlivé roztoky temperovány v termostatu a poté postupně proměřeny. Vzorky byly měřeny v předem promyté a vysušené kyvetě. Nejdříve byl napipetována reakční směs (bez enzymu). Poté byla kyveta vložena do termostatického držáku, aby se vytemperovala teplota. Následně byl tento vzorek použit jako slepý vzorek. Poté byla kyveta vypláchnuta, promyta, osušena a následně do ní byla napipetována reakční směs s příslušným množstvím enzymu. Opět byla kyveta vložena do termostatického držáku pro vytemperování. Poté byl napipetován substrát, směs byla rychle promíchána a změřena.

4. Výsledky a diskuze

4.1. Výsledky SERPA metody

Sérologickou analýzou proteomu byly vyšetřeny vzorky 10 pacientů z Fakultní nemocnice v Ostravě. Jednalo se o pacienty s mnohočetným myelomem. Vzorky byly poskytnuty panem prof. MUDr. Romanem Hájkem, CSc. z Fakultní nemocnice Ostrava. U každého z 10 pacientů byly odebírány vzorky sér v různých intervalech (Tabulka 6-15). První odběr byl vždy v době diagnózy mnohočetného myelomu a další odběry byly prováděny podle průběhu onemocnění a typu terapie (transplantace kmenových buněk). V případě provedení transplantace (Tx) byl pacientovi odebrán vzorek séra před a po provedení transplantace. Vzorky pacientů byly označeny kódem, bylo uvedeno pohlaví a datum odběru. V následující části budou prezentovány výsledky pro pacienty 1-10 spolu s kontrolami. Pro vlastní analýzu sér pacientů byla použita buněčná linie RPMI 8226. Pro 2D elektroforézu byl připraven lyzát (viz. 3.3.1.). Poté byl proveden přenos technikou Semi-Dry Western Blot na nitrocelulózovou membránu. Vždy po přenosu byla provedena vizuální kontrola účinnosti přenosu, a to obarvením gelu i membrány (viz. 3.3.6., 3.3.7.).



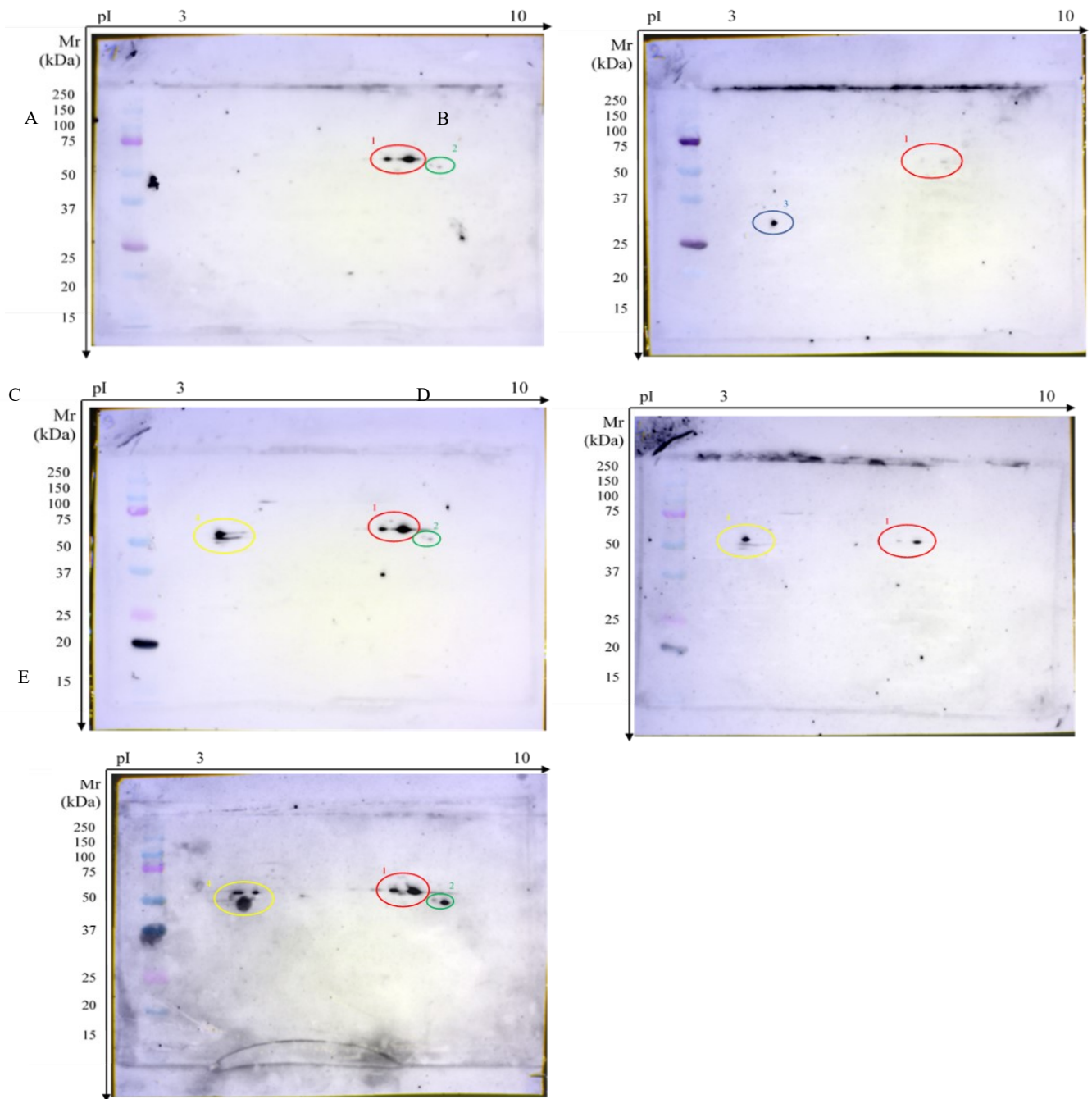
Obrázek 16 - Potvrzení úspěšnosti přenosu z gelu (vlevo) na membránu (vpravo)

V případě, že byl přenos separovaných proteinů úspěšný, byl proveden další krok. Poté byla membrána inkubována s vyšetřovaným sérem. Imunoreaktivní protilátky v séru vytvořily s cílovým antigenem imunokomplex, který byl poté vizualizován konjugátem kozí anti-human IgG (viz. 3.3.8.) značeným HRP. Místo tradičního chromogenu 3,3'-diaminobenzidinu, bylo použito barvení ECL, kvůli možnosti dosáhnout vyšší citlivosti detekce.

Pacient č. 1

	Označení	kód	pohlaví	interval	odběr
1	A	M-20-001	muž	DG	nový
	B	M-20-091	muž	+ 5M	před Tx
	C	M-20-132	muž	+ 9M	před tandem Tx
	D	M-21-004	muž	+ 12M	po tandem Tx
	E	M-22-006	muž	+ 24M	po 12M

Tabulka 6 - Dostupné informace o pacientovi č. 1



Obrázek 17 - Výsledky SERPA analýzy pacienta číslo 1. Významné imunoreaktivní spoty jsou označeny kroužky.

Dle pozice proužků molekulového markeru a dle pozice spotu v rámci stripu při pI 3 – 10 byla orientačně stanovena molekulová hmotnost a izoelektrický bod reaktivního proteinu z buněčného lyzátu. Pro vlastní identifikaci a konfirmaci reaktivních proteinů bylo nutné ještě provést metodu „in gel digest“ v kombinaci s MALDI MS. Námi sledovaná α -Enoláza má molekulovou hmotnost 47 kDa a izoelektrický bod 7. Dle předchozí MS analýzy při identifikaci imunoreaktivních spotů bylo pravděpodobné místo výskytu na membráně označeno červeným kroužkem a označeno číslem jedna. Toto potvrzení metodou MALDI MS bylo provedeno v předcházející sérii vzorků pacientů s MM. Analýzy byly provedeny na pracovišti CBV Centrum Biomedicínského Výzkumu ve FNHK. Analýzu provedl Mgr. Rudolf Krupčík PhD. MALDI MS analýzou byl potvrzen v pozici reaktivního spotu enzym α -Enoláza.

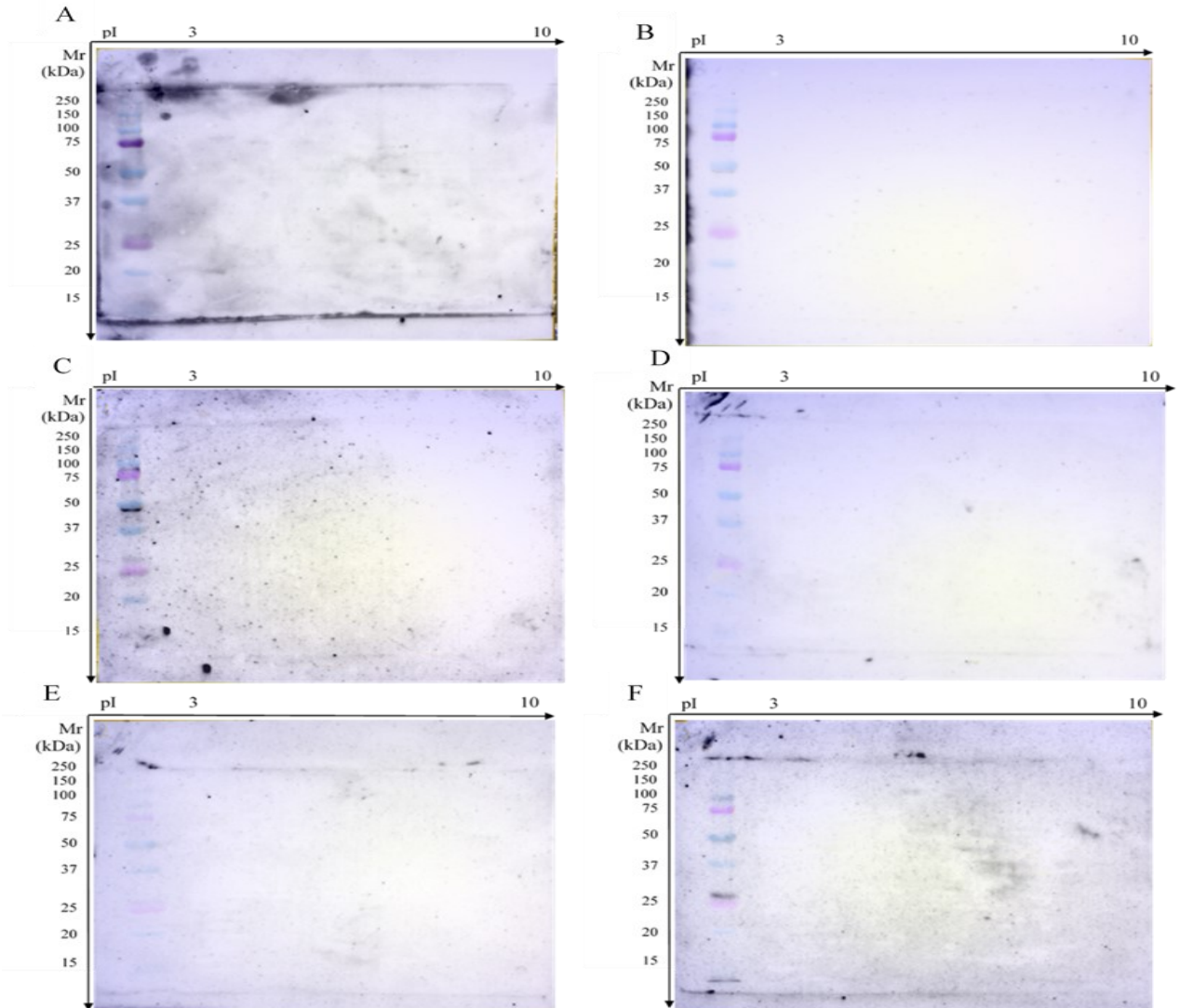
Analýzy pro všechny zbylé pacienty byly provedeny dle stejného postupu.

Pacient 1 (Obrázek 17) byl pozitivní na přítomnost autoprotilátek anti-ENO1 IgG, a to masivně v době diagnózy (A). Před transplantací (Tx) množství protilátek výrazně pokleslo (B). V dalším odběru se protilátky opět vyskytují masivně (C). Dočasný pokles autoprotilátek byl pozorován při dalším odběru (D) a značný nárůst autoprotilátek byl opět pozorován u posledního odběru (E).

Pacient č. 2

2	Označení	kód	pohlaví	interval	odběr
	A	M-20-002	žena	DG	nový
	B	M-20-087	žena	+ 5M	před Tx
	C	M-20-131	žena	+ 9M	před tandem Tx
	D	M-21-047	žena	+ 15M	po Tx
	E	M-21-121	žena	+ 20M	po 6M
	F	M-22-022	žena	+ 25M	po 12M

Tabulka 7 - Dostupné informace o pacientovi č. 2



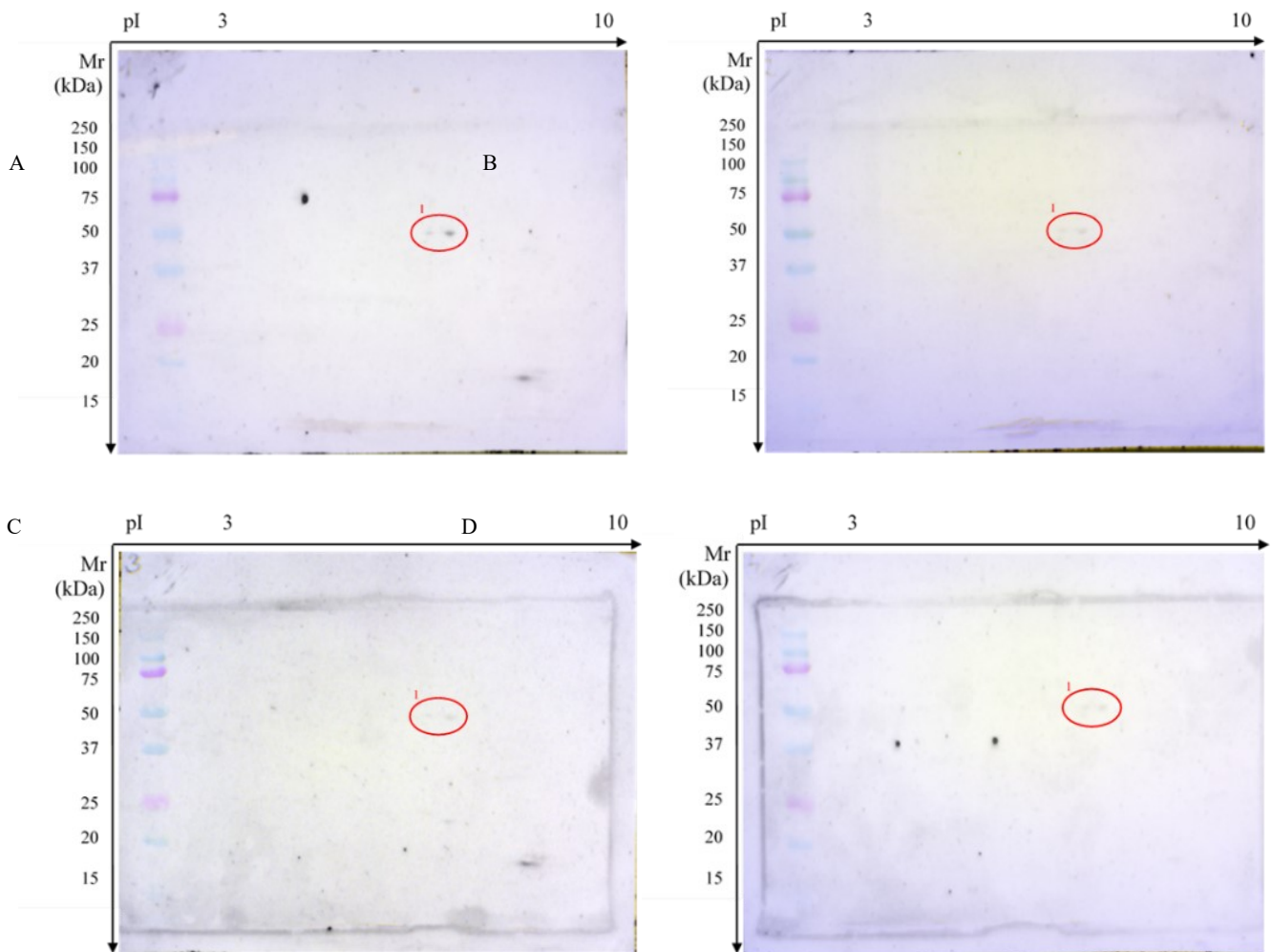
Obrázek 18 - Výsledky SERPA analýzy pacienta číslo 2

U pacienta číslo 2 v žádném z odebraných sér nebyly prokázány anti-ENO1 IgG.

Pacient č. 3

3	Označení	kód	pohlaví	interval	odběr
	A	M-20-034	žena	DG	nový
	B	M-20-106	žena	+ 5M	před Tx
	C	M-20-156	žena	+ 9M	před tandem Tx
	D	M-21-077	žena	+ 15 M	po tandem Tx

Tabulka 8 - Dostupné informace o pacientovi č. 3



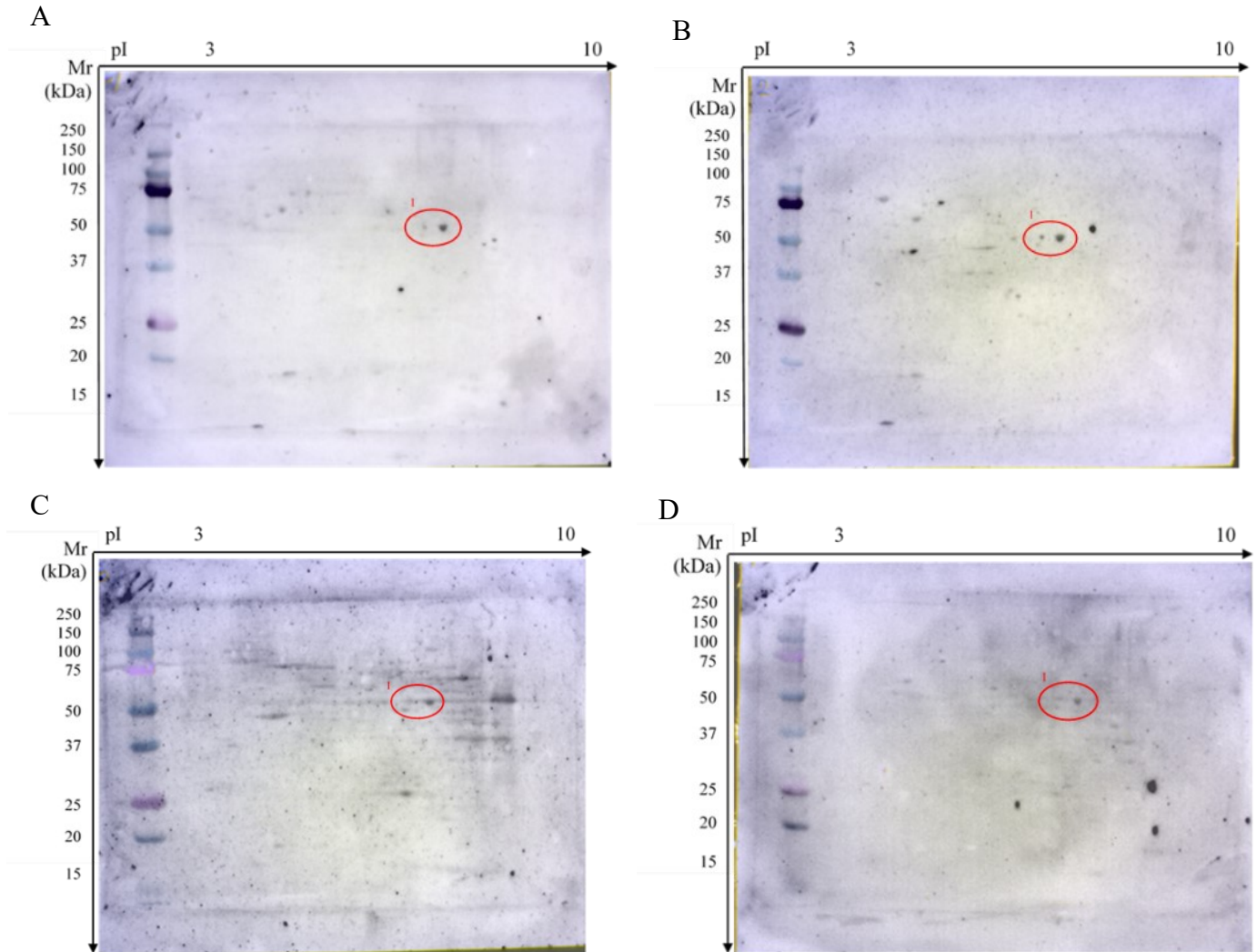
Obrázek 19 - Výsledky SERPA analýzy pacienta číslo 3. Významné imunoreaktivní spoty jsou označeny kroužky.

U pacienta číslo 3 v době odběru (A) byla pozorována mírná reaktivita s cílovým proteinem. Ve všech následujících odběrech (B, C, D) byla také pozorována pouze mírná reaktivita. To značí malé množství autoprotilátek anti-ENO1 IgG. Žádné jiné reaktivní spoty nebyly v sérech pozorovány.

Pacient č. 4

4	Označení	kód	pohlaví	interval	odběr
	A	M-20-099	muž	DG	nový
	B	M-21-025	muž	+ 7M	před Tx
	C	M-21-109	muž	+ 13M	po Tx
	D	M-22-028	muž	+ 19 M	po 6M

Tabulka 9 - Dostupné informace o pacientovi č. 4



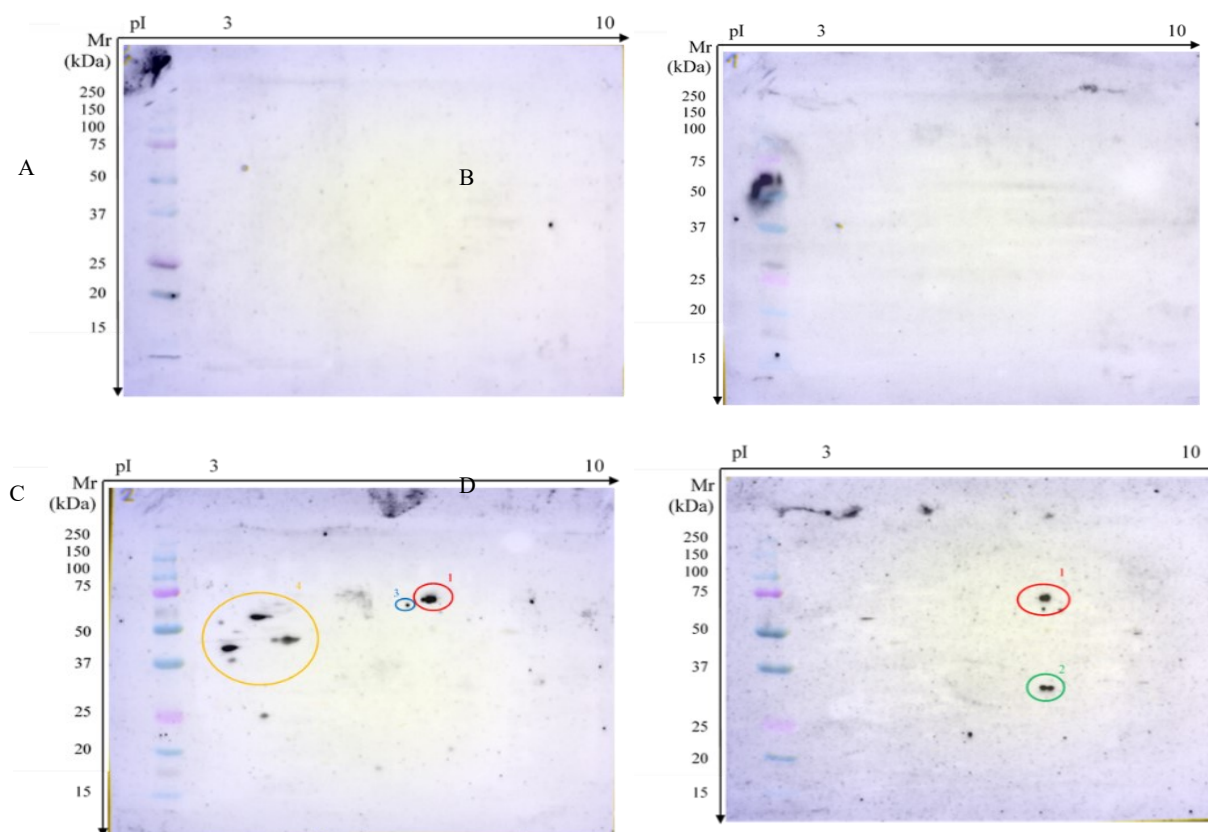
Obrázek 20 - Výsledky SERPA analýzy pacienta číslo 4. Významné imunoreaktivní spoty jsou označeny kroužky.

U pacienta číslo 4 byla ve všech odebraných a otestovaných vzorcích (A, B, C, D) pozorována mírná reaktivita. To značí malé množství autoprotilátek anti-ENO1 IgG.

Pacient č. 5

5	Označení	kód	pohlaví	Interval	odběr
	A	M-20-060	muž	DG	nový
	B	M-20-138	muž	+ 5 M	před Tx
	C	M-21-056	muž	+ 11 M	po Tx
	D	M-21-130	muž	+ 16 M	po 6M
	E	M-22-054	muž	+22 M	po 12M

Tabulka 10 - Dostupné informace o pacientovi č. 5



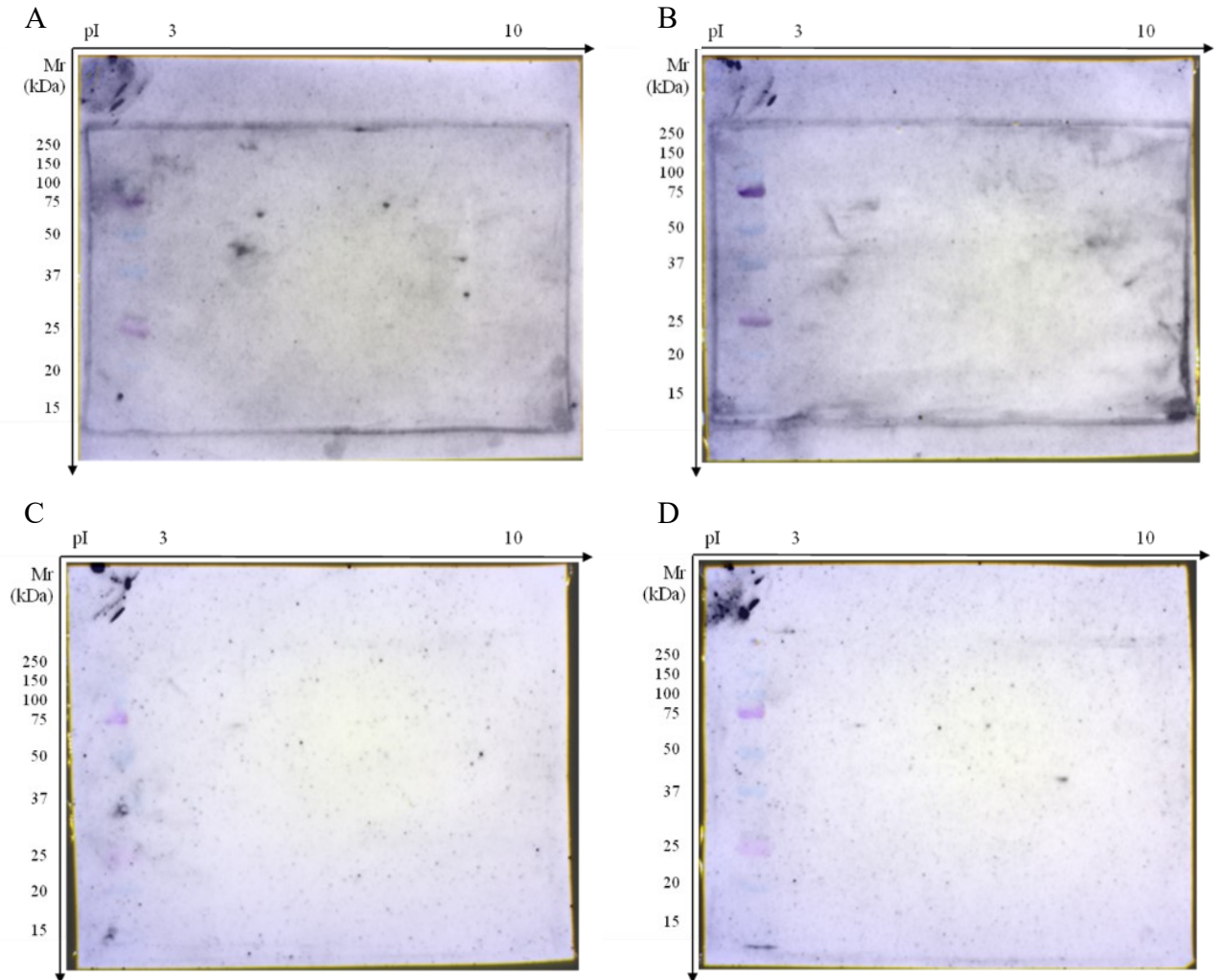
Obrázek 21 - Výsledky SERPA analýzy pacienta číslo 5. Významné imunoreaktivní spoty jsou označeny kroužky.

U pacienta číslo 5 v prvním odběru (A) a druhém odběru (B) nebyly pozorovány žádné imunoreaktivní spoty. Ve třetím odběru (C) se objevily imunoreaktivní spoty v rozsahu izoelektrického bodu 7, ale molekulová hmotnost je vyšší. To platí pro spotu označenou číslem 1 a 3. U spotu 1 se jedná o protein vyskytující se ve třech izoformách. Na membráně se u třetího odběru nacházejí další výrazné imunoreaktivní spoty označené číslem 4, které nebyly identifikované. Tyto neidentifikované spoty se vyskytovaly v oblasti pI 3-3,2 a v rozsahu molekulové hmotnosti 40-60 kDa. U dalších odběrů (A, B, D) se tyto imunoreaktivní spoty nevyskytovaly. V posledním odběru (D) zůstala imunoreaktivní spota v oblasti pI odpovídající ENO1 a objevila se spota 2 odpovídající hodnotou pI, ale s nižší molekulovou hmotností.

Pacient č. 6

6	Označení	kód	pohlaví	interval	odběr
	A	M-20-120	žena	DG	nový
	B	M-21-037	žena	+ 6 M	před Tx
	C	M-21-125	žena	+ 12M	po Tx
	D	M-22-047	žena	+ 18M	po 6M

Tabulka 11 - Dostupné informace o pacientovi č. 6



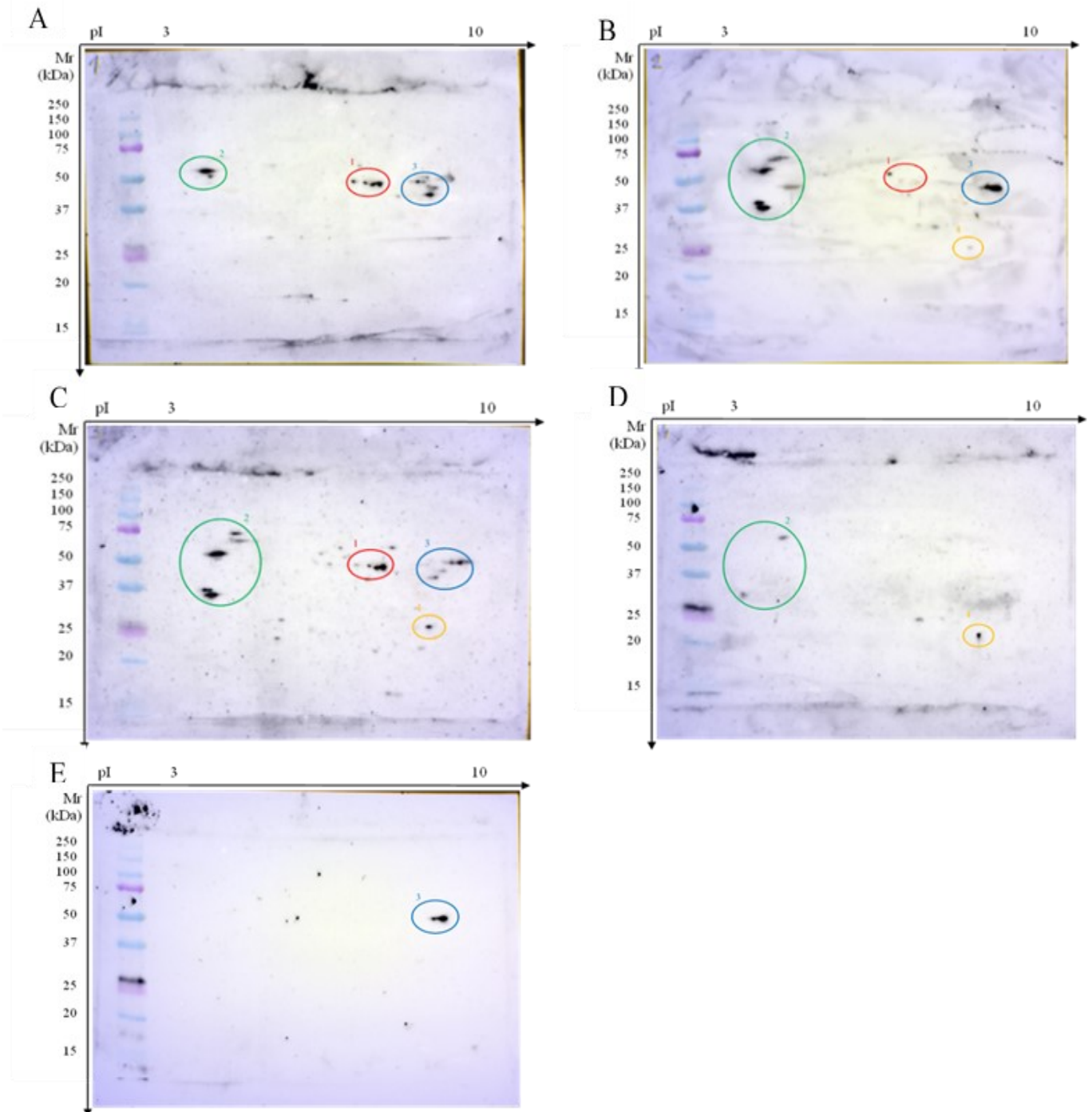
Obrázek 22 - Výsledky SERPA analýzy pacienta číslo 6. Významné imunoreaktivní spoty jsou označeny kroužky.

U pacienta číslo 6 v žádném z odebraných sér nebyly v oblasti výskytu anti-ENO1 IgG tyto autoprotilátky prokázány.

Pacient č. 7

7	Označení	kód	pohlaví	Interval	odběr
	A	M-20-019	žena	DG	nový
	B	M-20-103	žena	+ 6M	před Tx
	C	M-20-140	žena	+ 10M	před tandem Tx
	D	M-21-068	žena	+ 16M	po tandem Tx
E	M-21-140	žena	+ 21M	po 6M	

Tabulka 12 - Dostupné informace o pacientovi č. 7



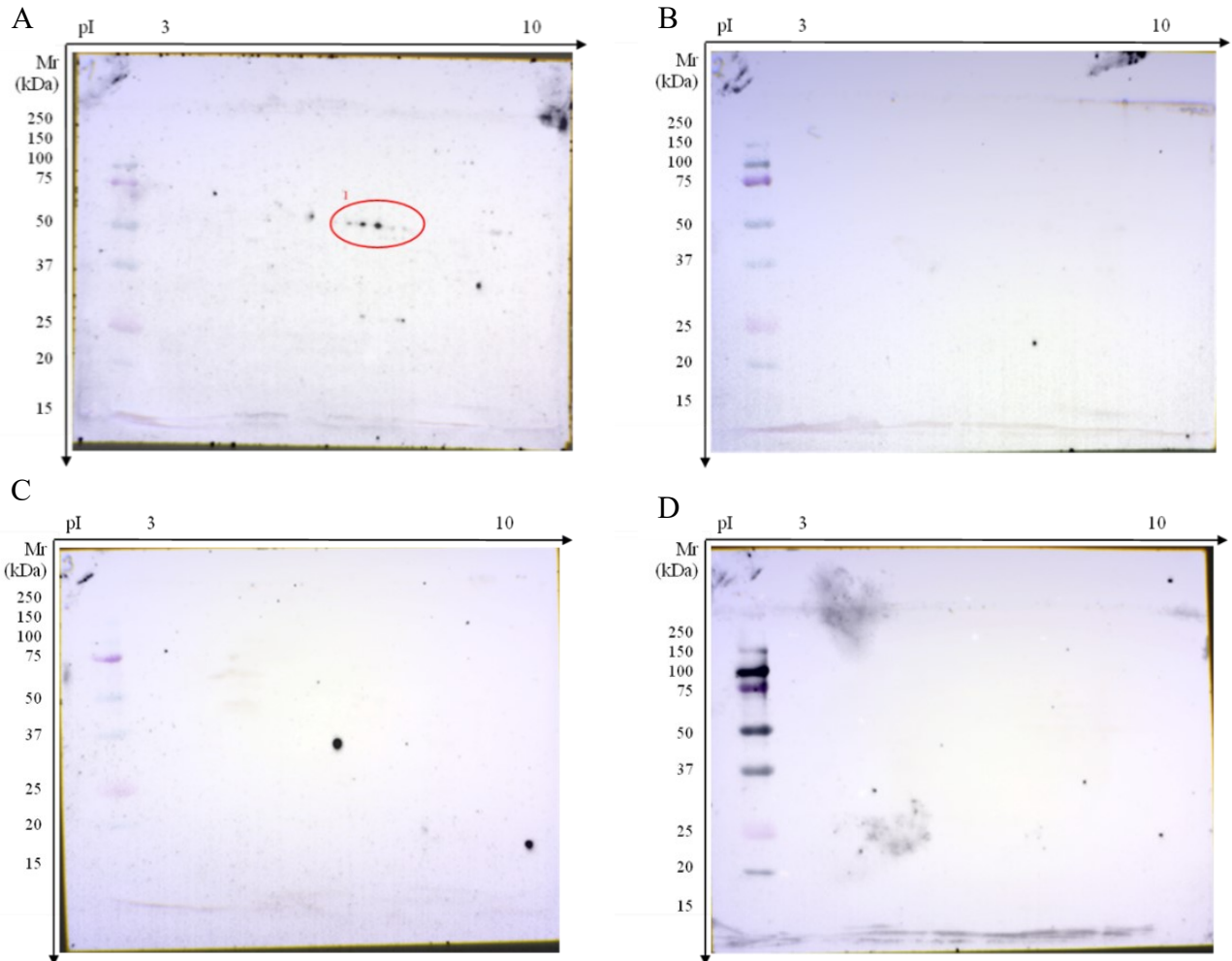
Obrázek 23 - Výsledky SERPA analýzy pacienta číslo 7. Významné imunoreaktivní spoty jsou označeny kroužky.

U pacienta číslo 7 byla imunoreaktivita masivní již v době diagnózy (A). V průběhu dalších odběrů se reaktivita měnila. V druhém odběru (B) byly pozorovány další významné imunoreaktivní spoty, avšak v oblasti výskytu anti-ENO1 IgG byla u druhého odběru imunoreaktivita slabší. V třetím odběru (C) byl pozorován výskyt anti-ENO1 IgG a i dalších imunoreaktivních spotů. V dalších odběrech (D, E) došlo k výraznému útlumu výskytu imunoreaktivních spot, a to včetně spot pro anti-ENO1 IgG. Spoty v oblasti označené číslem 2 měly pI přibližně 4 a Mr od 37 do 75 kDa. Spoty v oblasti označené číslem 3 byly v oblasti Mr 50 kDa a pI 8,5. Spot označený číslem 4 měl Mr 25 kDa a pI 8.

Pacient č. 8

8	Označení	kód	pohlaví	interval	odběr
	A	M-17-075	žena	DG	nový
	B	M-18-034	žena	+6M	před Tx
	C	M-18-070	žena	+9M	před tandem Tx
	D	M-18-143	žena	+14M	po tandem Tx

Tabulka 13 - Dostupné informace o pacientovi č. 8



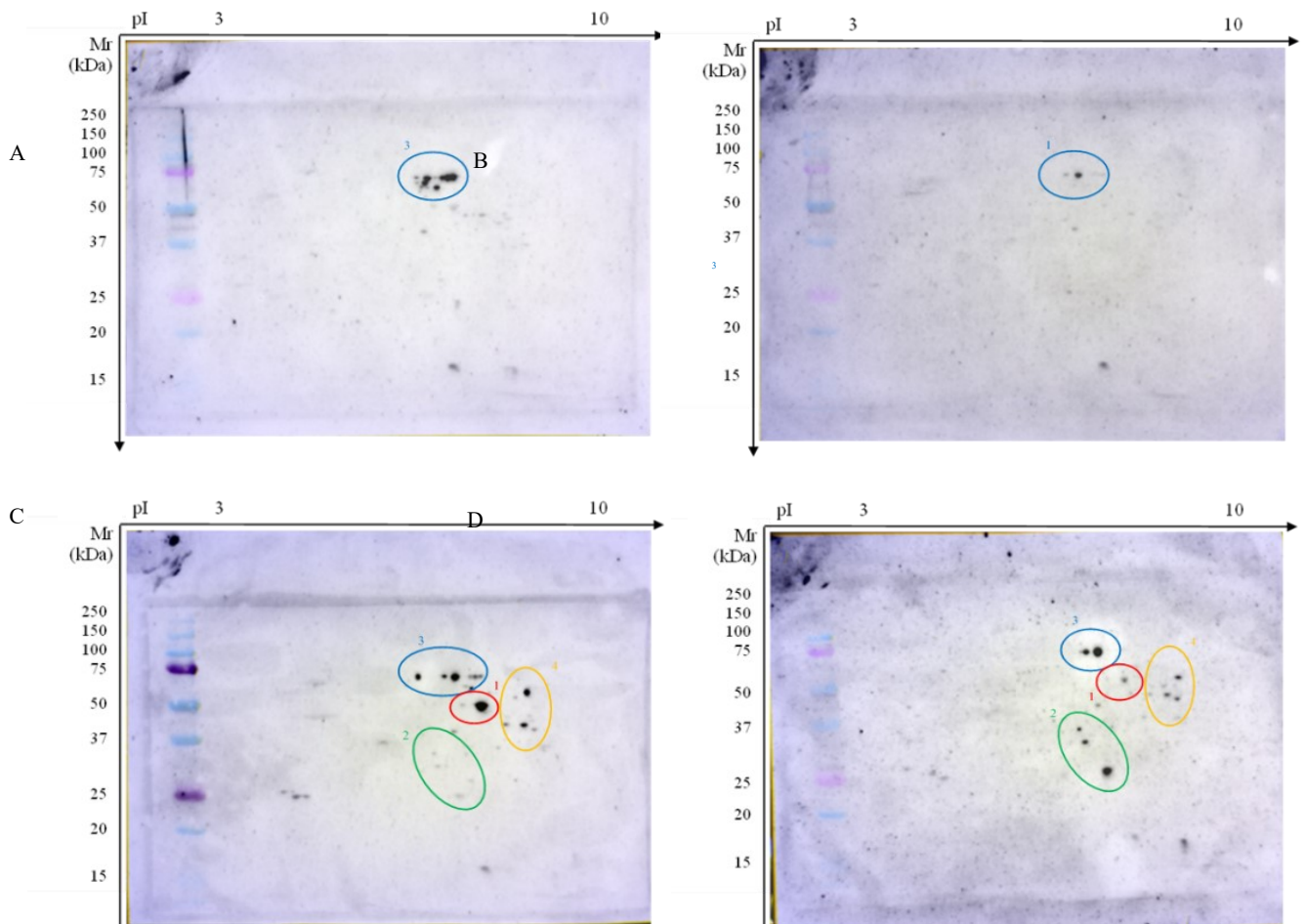
Obrázek 24 - Výsledky SERPA analýzy pacienta číslo 8. Významné imunoreaktivní spoty jsou označeny kroužky.

U pacienta číslo 8 se pouze u prvního odběru (A) objevil imunoreaktivní spot v oblasti anti-ENO1 IgG, kde se α -Enoláza vyskytuje v několika izoformách. V žádném z dalších odebraných sér (B, C, D) nebyly prokázány anti-ENO1 IgG.

Pacient č. 9

9	Označení	kód	pohlaví	Interval	odběr
	A	M-17-082	muž	DG	nový
	B	M-18-045	muž	+ 7M	před Tx
	C	M-18-136	muž	+13M	po tandem Tx
	D	M-19-029	muž	+ 17M	po tandem Tx

Tabulka 14 - Dostupné informace o pacientovi č. 9



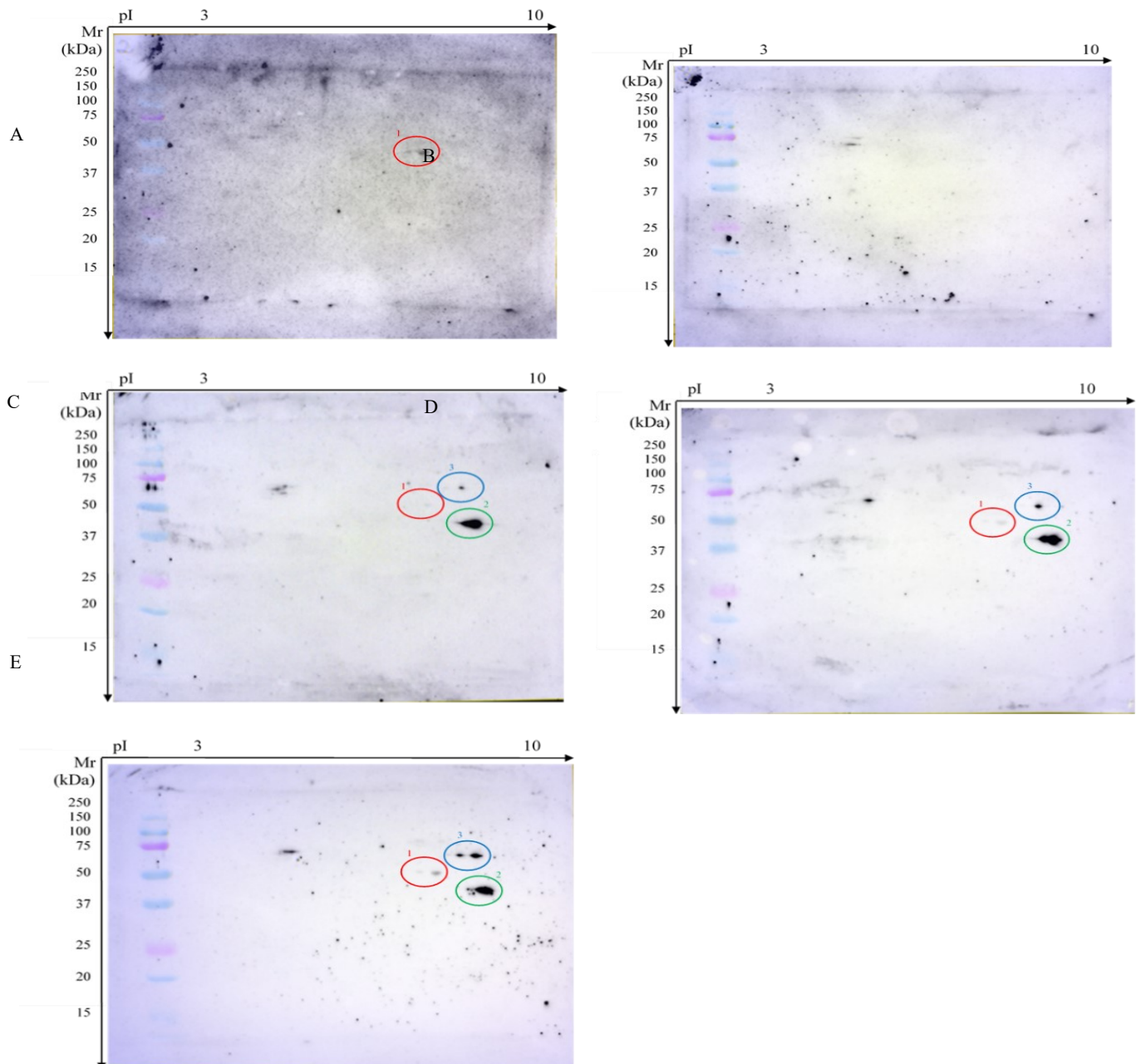
Obrázek 25 - Výsledky SERPA analýzy pacienta číslo 9. Významné imunoreaktivní spoty jsou označeny kroužky.

U pacienta číslo 9 byly u prvních dvou odběrů (A, B) pozorovány imunoreaktivní spoty, které odpovídaly α -Enoláze pouze hodnotou izoelektrického bodu, ale molekulová hmotnost byla 75 kDa. U dalšího odběru (C) byla masivní imunoreaktivita v oblasti výskytu anti-ENO1 IgG. Dále byly pozorovány další imunoreaktivní spoty, které se vyskytovaly i v následujícím odběru (D). Pro jejich identifikaci a confirmaci reaktivních proteinů by bylo nutné provést metodu „in gel digest“ v kombinaci s MALDI MS.

Pacient č. 10

10	Označení	kód	pohlaví	Interval	odběr
	A	M-20-038	muž	DG	nový
	B	M-20-117	muž	+ 6M	před Tx
	C	M-21-064	muž	+13M	po tandem Tx
	D	M-21-132	muž	+18M	po 6M
	E	M-22-049	+24M	po 12M	

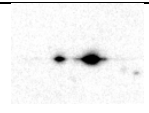
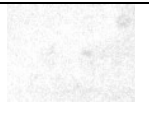
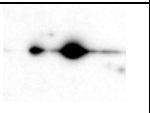
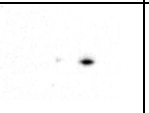
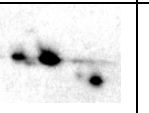





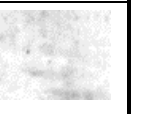
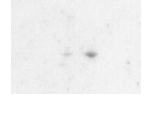
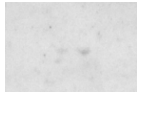


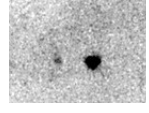
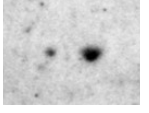
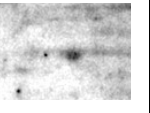
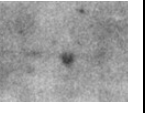
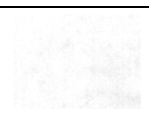
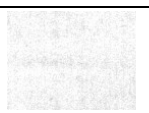
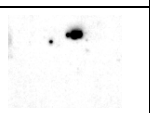
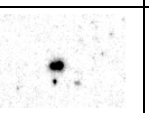

Tabulka 15 - Dostupné informace o pacientovi č. 10



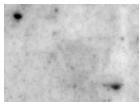
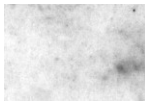
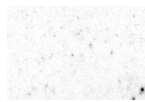
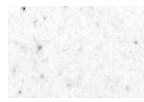


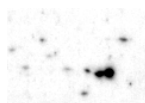
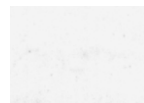
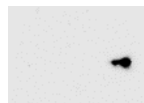

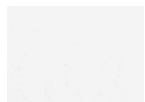
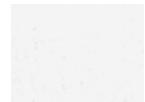
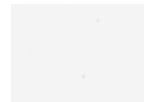
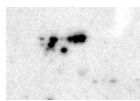
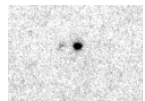
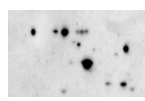
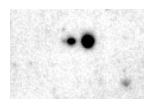
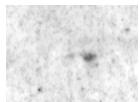

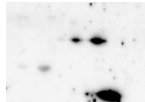
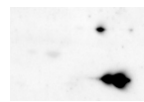
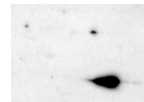
Obrázek 26 - Výsledky SERPA analýzy pacienta číslo 10. Významné imunoreaktivní spoty jsou označeny kroužky.

U pacienta číslo 10 byla pozorována mírná imunoreaktivita v oblasti výskytu anti-ENO1 IgG (A). Při dalším odběru (B) nebyla pozorována žádná imunoreaktivita. Při třetím oděru (C) byla pozorována velmi mírná reaktivita v oblasti výskytu anti-ENO1 IgG a zároveň byla pozorována masivní reaktivita v oblasti molekulové hmotnosti 37 kDa a pI 8,5. Další výrazná imunoreaktivita byla pozorována při molekulové hmotnosti 70 kDa a pI 8. V následujících odběrech (D, E) se všechny tyto imunoreaktivní spoty objevily znovu a ve větší intenzitě.

V následujícím přehledu (Tabulka 16, 17) jsou výsledky seřazeny dle pacientů a doby odběru séra. V přehledu je označena doba diagnózy a intervaly, v jakých se odběry prováděly.

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

Tabulka 16 - Souhrn detailů nitrocelulózových membrán z oblastí výskytu ENO1 od všech testovaných vzorků

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

Tabulka 17 - Souhrn detailů nitrocelulózových membrán z oblastí výskytu ENO1 od všech testovaných vzorků

Na přítomnost anti-ENO1 IgG bylo otestováno 46 vzorků od 10 pacientů s diagnostikovaným MM. U 8 pacientů byly anti-ENO1 protilátky přítomny alespoň v některém z odběrů v průběhu sledování. U 4 pacientů byly anti-ENO1 přítomny ve všech odběrech, tedy v celém průběhu sledování a léčby pacienta s MM. U 2 pacientů se anti-ENO1 neobjevily v žádném z odběrů. Vzhledem k malému množství vzorků není možné vyvodit jakékoliv klinicky významné závěry a bude vhodné i nadále sledovat tyto pacienty v delším časovém rozmezí. Jedině tak bude možné zhodnotit, zda výskyt protilátek koreluje s dobrou prognózou pacienta a s jeho dobrou odpovědí na terapii. Cílem je ověřit, zda by průkaz anti-ENO1 protilátek mohl být diagnostickým biomarkerem, usnadňujícím diagnózu a nastavení terapeutického postupu, případně, zda by ENO1 mohla být i tzv. terapeutickým cílem. Podání anti-ENO1 IgG molekul by mohlo podpořit účinnost imunitního systému v rámci tzv. protinádorového dozoru. Předpokládaný min. počet pacientů je 100 – 125 s dobou sledování 2 – 3 roky. Pak bude možné výsledky vyhodnotit v klinickém kontextu.

4.2. Aktivita ENO1

4.2.1. Stanovení aktivity ENO1 pomocí diagnostické soupravy Abcam

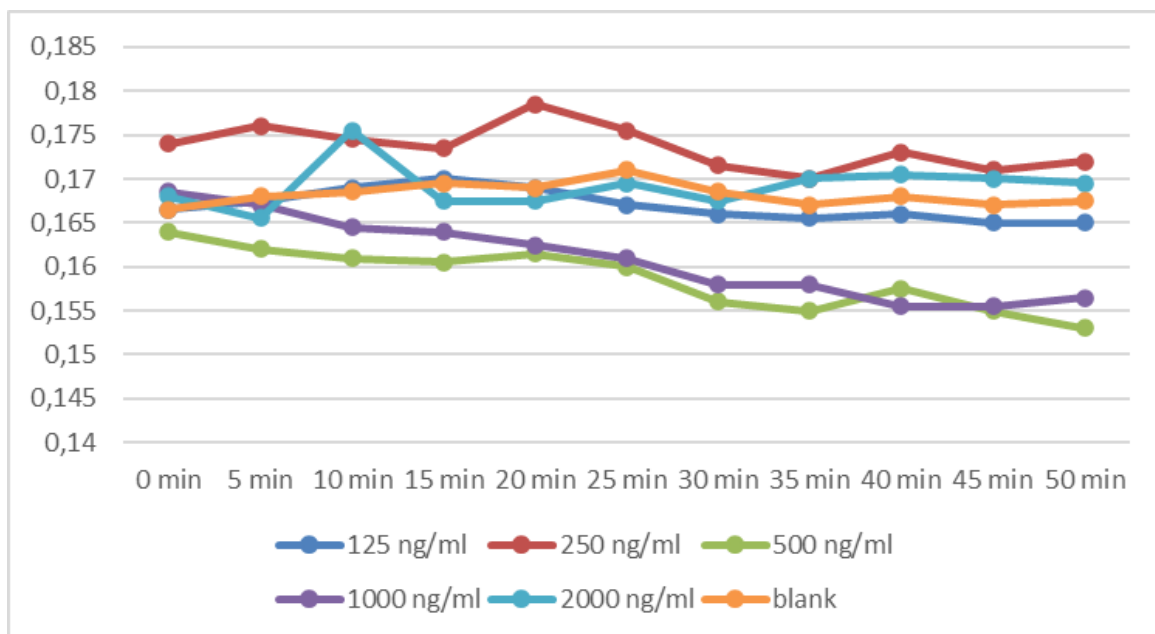
Pro stanovení aktivity ENO1 byla použita diagnostická souprava od společnosti Abcam (viz. 3.4.1.). Vzhledem k tomu, že se ENO1 vyskytuje ve vztahu k ostatním proteinům v poměrně malém množství, tak tato sada využívá nejprve separaci prostřednictvím protilátek anti-ENO1 IgG navázaných na vnitřní stěnu jamek mikrotitrační destičky. Tím je ENO1 vyvázána ze vzorku a následně lze stanovit aktivitu. Principem reakce této diagnostické soupravy bylo sledování úbytku signálu při přeměně NADH na NAD⁺ prostřednictvím laktátdehydrogenázy (viz. 1.8.2.). Prvním úkolem bylo připravit kalibrační řadu pro následné stanovení aktivity ENO1 v patientských sérech. K přípravě kalibrační řady byla použita rekombinantní ENO1 s histidinovou kotvou (viz 3.4.1.). Bylo postupováno předně podle návodu přiloženému k diagnostické soupravě. Aktivita byla měřena na 3 různých přístrojích (BioTek PowerWave 340 Microplate Reader, TECAN infinite M200, TECAN Spark) a výsledky se porovnály.

Ze zásobního roztoku (100µg/100µl) byla připravena kalibrační řada o různých koncentracích (Tabulka 18). Jako slepý vzorek byl použit inkubační roztok, pomocí kterého byl ředěn zásobní roztok. Vše bylo prováděno v dubletu.

c ng/ml	c ng/ml
125	125
250	250
500	500
1000	1000
2000	2000
slepý vzorek	slepý vzorek

Tabulka 18 - Jednotlivé body pro vytvoření kalibrační řady

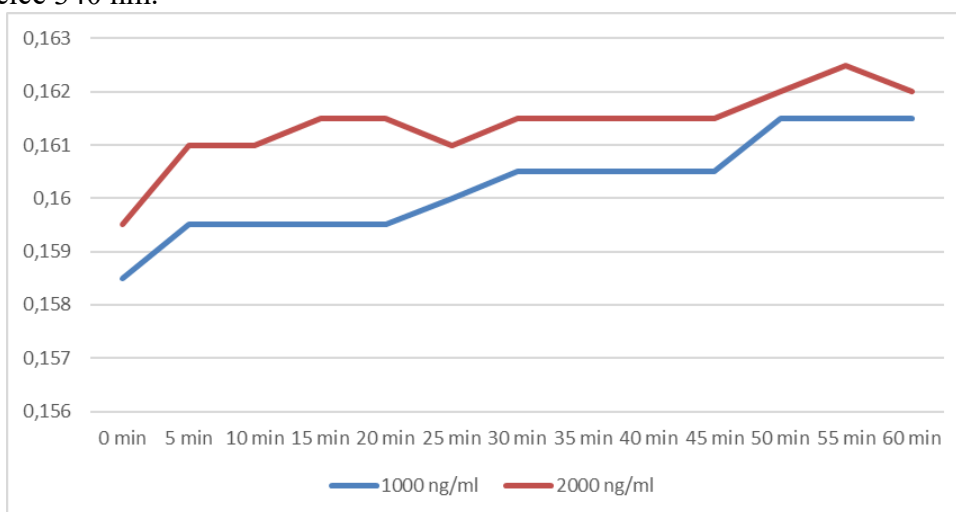
Měření se provádělo na přístroji BioTek PowerWave 340 kineticky, při laboratorní teplotě, po dobu 60 minut každých 30 sekund při vlnové délce 340 nm.



Obrázek 27 - Výsledky aktivity ENO1 při použití diagnostické soupravy při měření na přístroji BioTek PowerWave 340 s koncentracemi enzymu 125 ng/ml, 250 ng/ml, 500 ng/ml, 1000 ng/ml, 2000 ng/ml

Byl pozorován mírný pokles signálu, avšak tato změna signálu byla natolik minimální, že ji lze přičíst variabilitě při přípravě vzorků, i měření v průběhu reakce. Zaznamenané změny v signálu (Obrázek 27) byly pouze v řádu tisícín a takové změny nelze přičítat aktivitě enzymu. Zde tedy nebyla pozorována závislost mezi množstvím enzymu a jeho aktivitou.

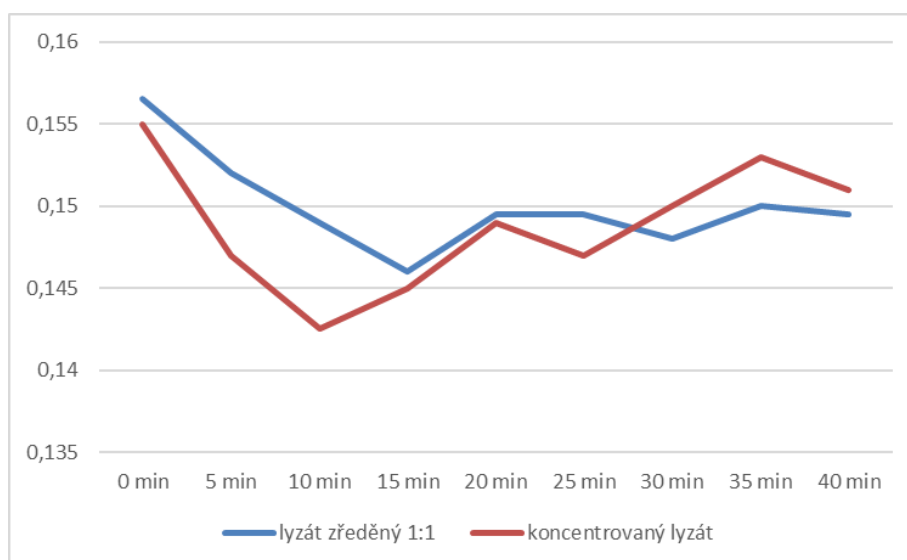
Předmětem dalšího testu bylo potvrdit reaktivitu rekombinantního enzymu ENO1 se substrátem z diagnostické soupravy. Byla tedy připravena reakce v obyčejné mikrotitrační destičce (bez navázaných anti-ENO1 Ab). V rámci úspor byly při tomto testu použity jenom 2 koncentrace ENO1 (2000 ng/ml a 1000 ng/ml). Měření bylo provedeno na BioTek PowerWave 340 za stejných podmínek kineticky, při laboratorní teplotě, po dobu 60 minut každých 30 sekund při vlnové délce 340 nm.



Obrázek 28 - Výsledky testu pro potvrzení reaktivity rekombinantního enzymu ENO1, koncentrace enzymu 1000ng/ml, 2000 ng/ml

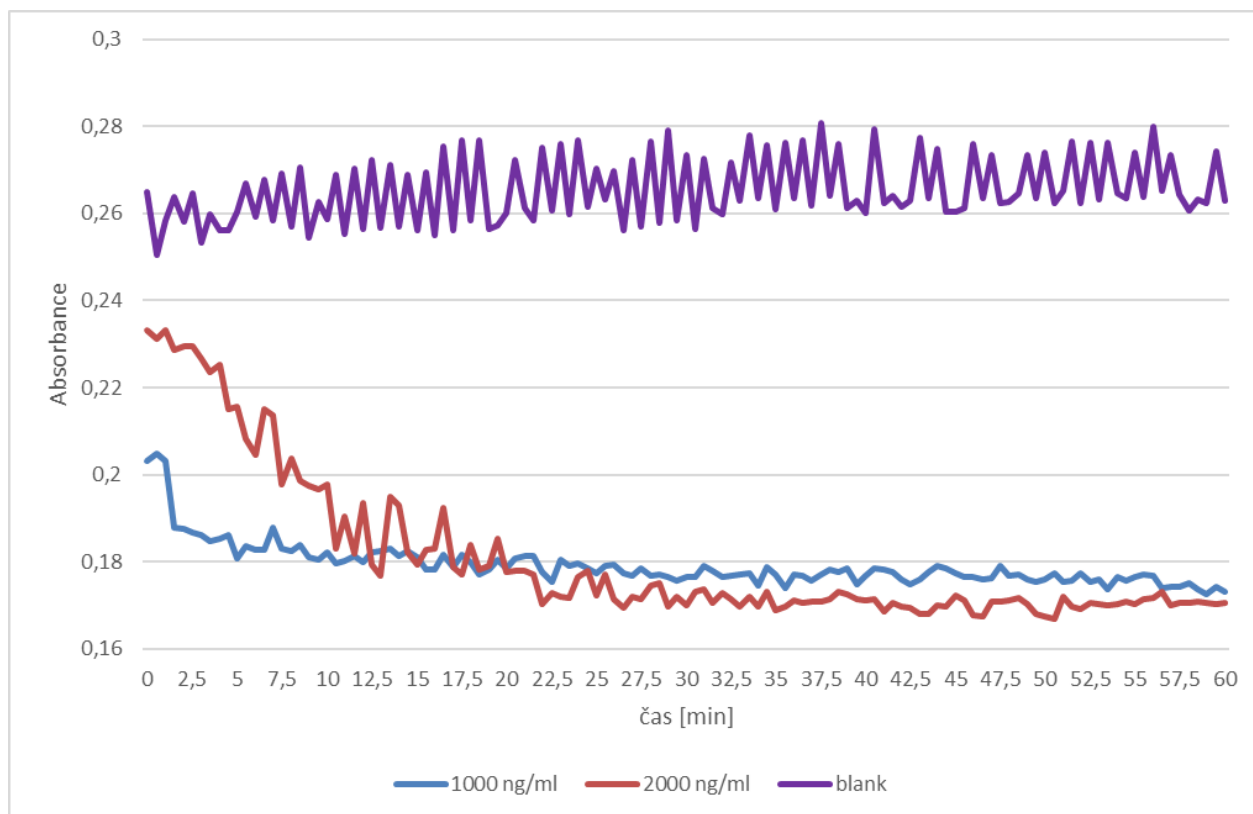
Zaznamenané změny v signálu byly opět minimální pouze v řádu tisícin (Obrázek 28). I přes vynechání imunospesifické sorpce a použití vyšších koncentrací rekombinantního enzymu ENO1 byly výsledky obdobné jako v předešlém testu a nepozorovali jsme žádnou závislost. Nebylo možné ověřit, že námi používaný rekombinantní enzym vykazuje deklarovanou aktivitu.

Proto jsme se v dalším kroku rozhodli další experimenty provést s lyzátem buněk RPMI 8226, kde se vyskytuje tento enzym v nativní formě. Pro práci s lyzátem byl předpoklad, že nativní enzym ENO1 bude substrát metabolizovat. Po konzultaci s vedoucí práce byl připraven lyzát přesně podle návodu k diagnostické soupravě a do reakce diagnostické soupravy s mikrotitrační destičkou potaženou anti-ENO1 Ab byl vložen alikvot koncentrovaného lyzátu a lyzátu ředěného 1:1. Měření proběhlo za stejných podmínek na přístroji BioTek PowerWave 340. Měření proběhlo při laboratorní teplotě, po dobu 40 minut každých 30 sekund při vlnové délce 340 nm.



Obrázek 29 - Výsledky při měření aktivity ENO1 v nativním vzorku buněčné linie RPMI 8226

V rámci prvních 10 minut byl zaznamenán očekávaný pokles signálu a signál, který odpovídá množství lyzátu, který byl do reakce přidán (Obrázek 29). Koncentrovaný lyzát dosáhl minima již za deset minut, kdežto lyzát zředěný 1:1 dosáhl minima až po 15 minutách. Z dosažených výsledků lze usuzovat, že nativní forma enzymu se vyvázala na protilátky, jimiž byl potažen vnitřní povrch jamek mikrotitrační destičky, a došlo k přeměně substrátu na produkt. Pokles signálu byl pozorován během prvních 10 – 15 minut v korelaci s množstvím lyzátu do reakce přidaného.

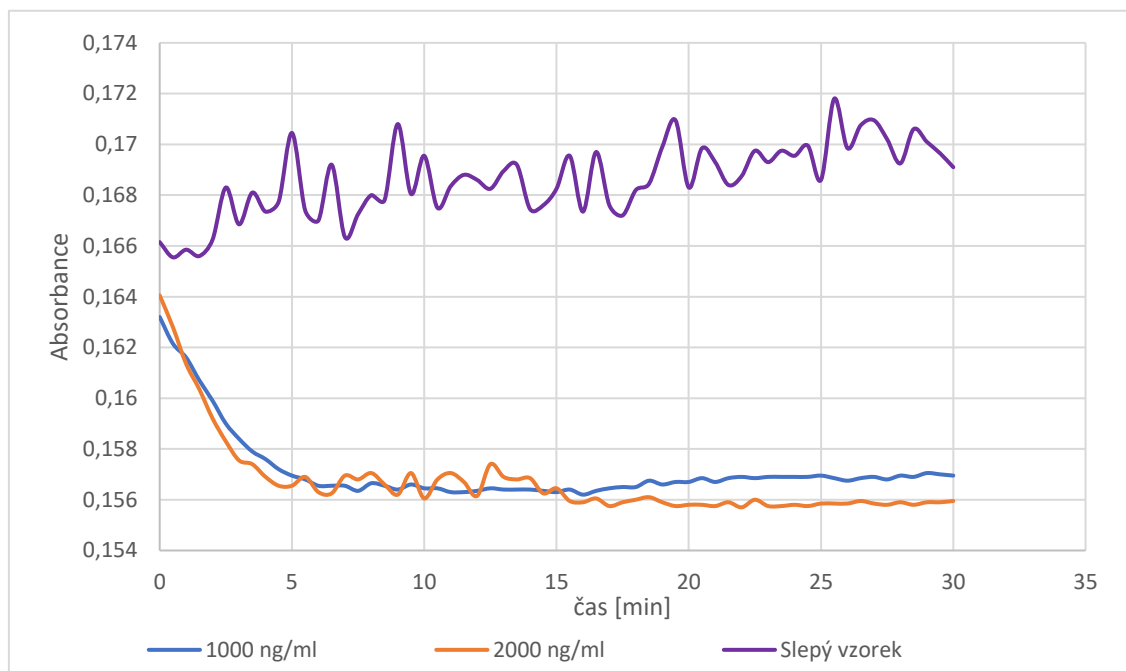


Obrázek 30 - Výsledky měření aktivity rekombinantní ENO1 při měření na přístroji TECAN infinite M200, koncentrace enzymu 1000ng/ml, 2000 ng/ml

S cílem zvýšit citlivost stanovení, byl pro další sérii experimentů použit přístroj TECAN infinite M200 (Obrázek 30). Příprava vzorků proběhla podle protokolu stejně jako v předchozích měření, kdy byly ze zásobního roztoku rekombinantní ENO1 (100 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) připraveny 2 koncentrace (2000 $\text{ng}/\mu\text{l}$ a 1000 $\text{ng}/\mu\text{l}$). Podmínky pro toto měření byly upraveny. Chtěli jsme ověřit, že použití teploty 37 °C povede ke zvýšení aktivity enzymu, a tedy umožní lépe kvantifikovat množství enzymu ve vyšetřovaných vzorcích. Měření bylo provedeno při 37 °C, po dobu 60 minut, každých 30 sekund s třepáním každých 5 sekund při vlnové délce 340 nm.

Při tomto měření jsme zaznamenali oscilace měřených hodnot, avšak trend úbytku signálu byl při obou koncentracích enzymu zřejmý a odpovídal katalýze reakce. Pro obě koncentrace byl pozorován opět rychlý pokles signálu během 10 minut. Co však stojí za diskuzi je vyšší hodnota počátečního signálu slepého vzorku. Domníváme se, že v případě, že enzym není vázán na stěně jamek mikrotitrační destičky prostřednictvím specifických protilátek, ale je volně v roztoku, kde probíhá měření, pak se lze domnívat, že pouhý přírůstek proteinu (enzymu) vede k mírnému zhasnutí signálu, a tedy k rozdílné výchozí hodnotě signálu v čase 0. Nicméně vzhledem k oscilaci hodnot bylo další měření provedeno na dalším přístroji, konkrétně přístroji TECAN Spark.

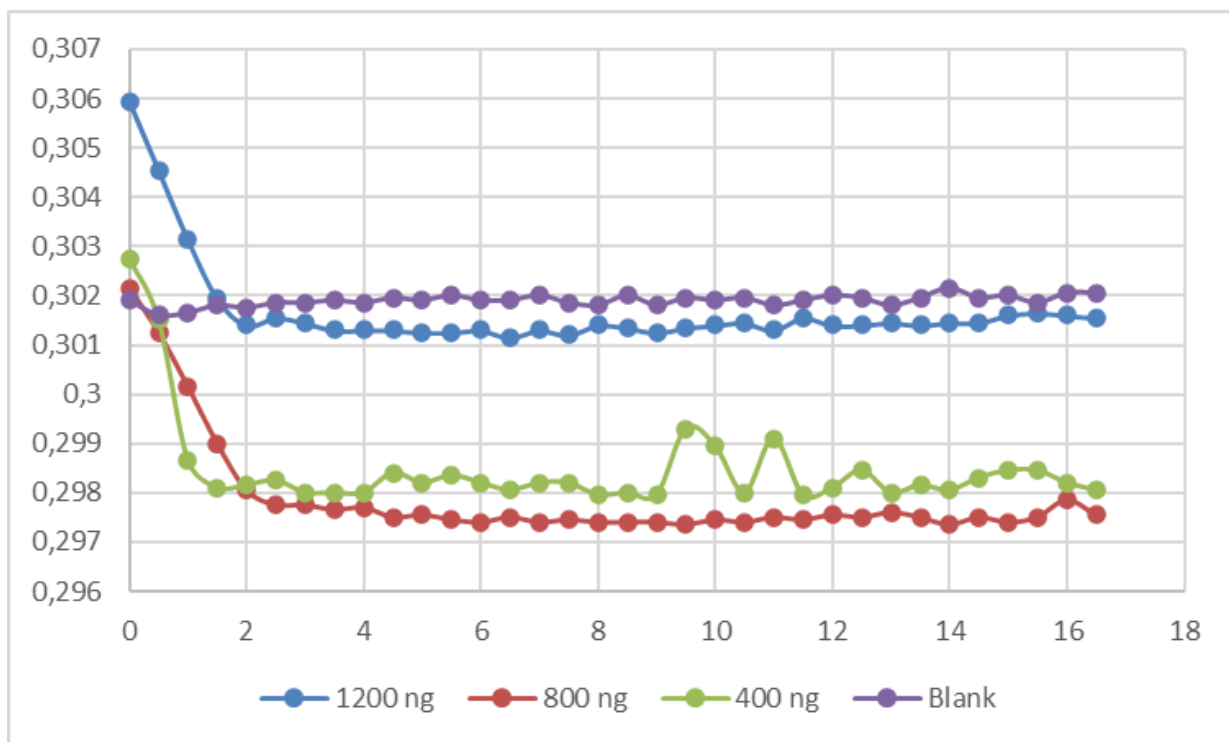
Další test byl zaměřen na změnu teploty reakce. Vzorčky pro test byly připraveny podle stejného postupu jako v předešlém testu při 37 °C. Avšak v toto měření bylo provedeno při laboratorní teplotě (22 °C) a doba měření se zkrátila na 30 minut, ostatní podmínky měření byly zachovány. Měřilo se při vlnové délce 340 nm, 30 minut, každých 30 sekund, při 22 °C, s třepáním každých 5 sekund.



Obrázek 31 - Výsledky měření aktivity ENO1 při 22 °C, s koncentracemi ENO1 1000 ng/ml, 2000 ng/ml

Při 22 °C proběhla reakce téměř shodně s 37 °C (Obrázek 31). Výrazný vliv teploty 37 °C vs. 22 °C nebyl potvrzen. I v tomto testu při 22 °C jsme pozorovali rychlý úbytek signálu, a to již při 4 minutách. Všechna další měření probíhala na tomto přístroji.

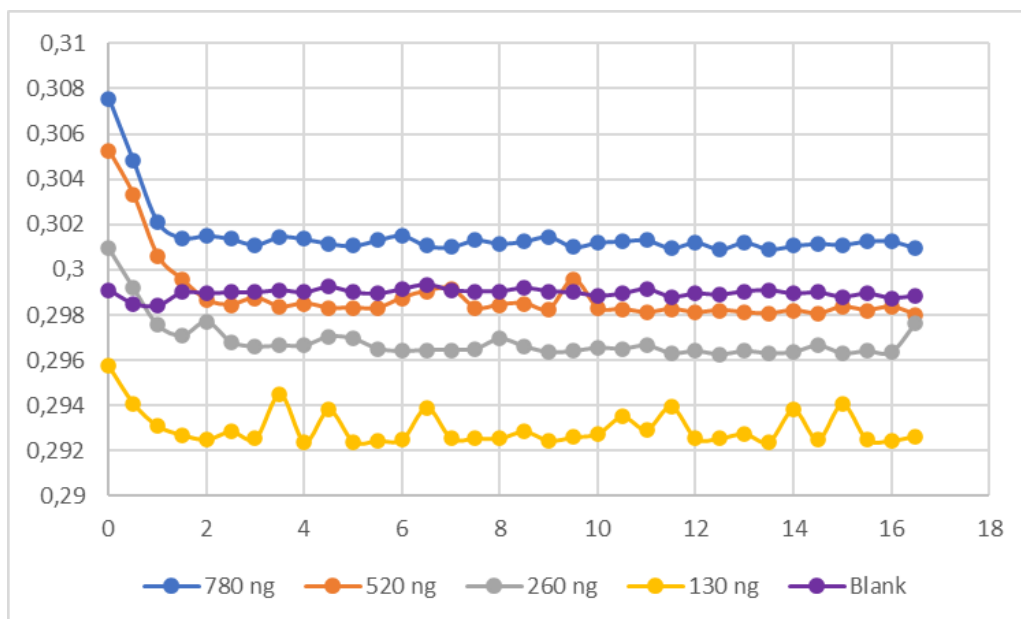
V dalším měření jsme si chtěli ověřit, jaké minimální množství enzymu lze touto metodou měřit, zajímal nás limit kvantifikace. Ze zásobního roztoku ENO1 (100 µg/100 µl) byly odebrány 4 µl a byly přidány k 6 µl inkubačního roztoku, tím vznikl roztok o koncentraci 4000 ng/10 µl. Do jamek bylo napipetováno 100 µl reakčního roztoku, který byl vytemperován na 37 °C. Poté bylo do jamek přidáno ze zásobního roztoku (4000 ng/10 µl) 3 µl, 2 µl a 1 µl. Vznikly tak tři body kalibrační křivky: 1200 ng, 800 ng a 400 ng. Proměření pouze 3 vzorků s rozdílným množstvím enzymu bylo z úsporných důvodů, k dispozici byla pouze jedna diagnostická souprava s omezeným počtem stanovení. Jako slepý vzorek bylo použito 100 µl aktivačního roztoku. Měření proběhlo při 37 °C na přístroji TECAN Spark při vlnové délce 340 nm, 16 a půl minuty, po 30 sekundách, třepání 3 sekundy.



Obrázek 32 - Výsledky měření aktivity ENO1, s množstvím enzymu 1200 ng, 800 ng, 400 ng

U nejvyšší koncentrace proteinu ENO1 je výchozí hodnota lehce vyšší, což může být opětovně způsobeno vyšším přidavkem proteinu do reakce (Obrázek 32). V rámci měření byl pozorován pokles signálu a veškerý substrát byl v tomto případě spotřebován již po 2 minutách.

Kvůli rychlé spotřebě substrátu se v dalším testu vytvořila kalibrační řada s menšími koncentracemi enzymu ENO1. Ze zásobního roztoku byly připraveny vzorky (780 ng, 520 ng, 260 ng, 130 ng). Jako slepý vzorek bylo použito 100 μ l aktivačního roztoku. Měření proběhlo na přístroji TECAN Spark při 37 °C, vlnové délce 340 nm, 16 a půl minuty, po 30 sekundách, třepání 3 sekundy.



Obrázek 33 - Výsledky měření aktivity ENO1 s koncentracemi 780 ng, 520 ng, 260 ng, 130 ng

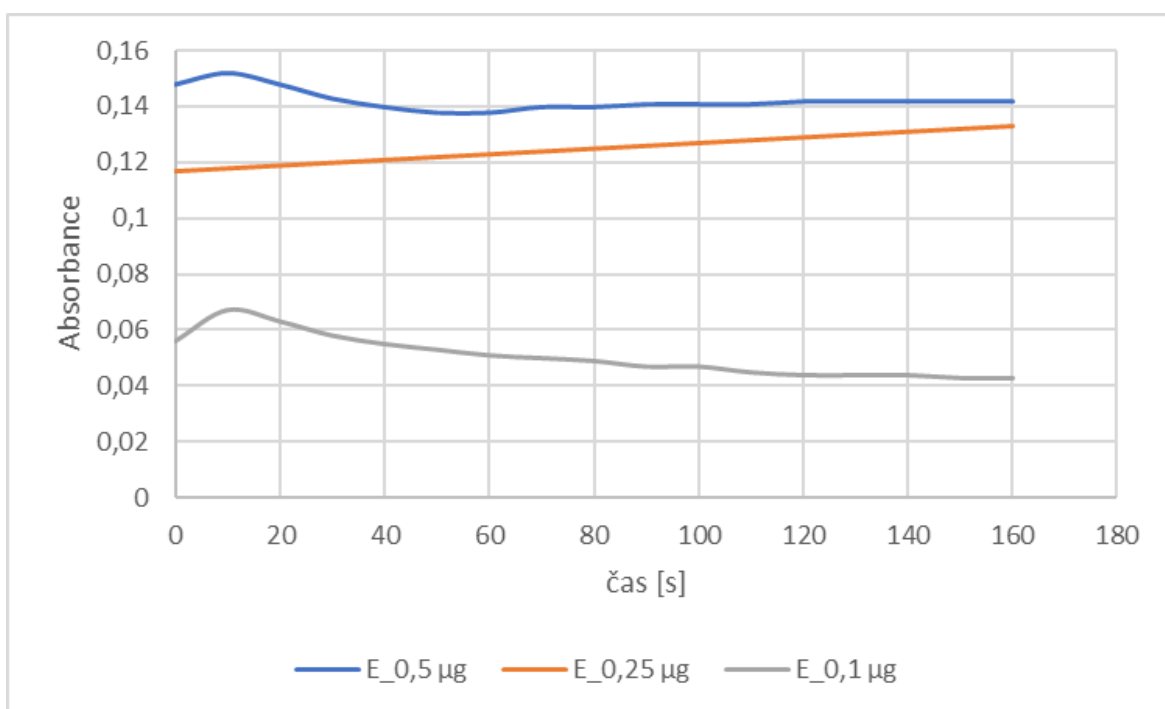
V tomto měření bylo jednoznačně potvrzeno, že rozdíly počátečních hodnot korelují s množstvím proteinu přidaném do reakce (Obrázek 33). To dokazuje interferenci proteinů se signálem substrátu, a tedy nezbytnost vychytání enzymu pomocí protilátek na stěny jamek. Jak jsme opakovaně proměřili, jedná se o specifikum této diagnostické soupravy a její použití je poté striktně vázáno na reaktivitě volného enzymu se specifickou protilátkou na stěně jamek. V případě, že k vazbě nedochází nebo jen omezeně, slabě, pak jsou výsledky zkreslené a nelze tuto soupravu použít.

V tomto uspořádání metody je imunisorpce na povrch destičky nutná pro eliminaci vlivu proteinu pro interferenci signálu. V rámci těchto experimentů se podařilo ověřit, že lze stanovovat aktivitu v relativně širokém rozmezí teplot. Dostatečná doba pro měření je 5-10 minut. Je nutné zvolit vhodně citlivý přístroj pro měření. A na základě těchto zjištěných parametrů bude nutné provést další experimenty. Tyto výsledky budou použity v následujících experimentech realizovaných mimo rámec této diplomové práce.

4.2.2. Stanovení aktivity ENO1 pomocí metody Warburgův optický test

Vedle diagnostické soupravy byl pro stanovení aktivity ENO1 zaveden tzv. Warburgův optický test. Princip této metody spočívá v měření změna signálu při přeměně 2-fosfoglycerátu na fosfoenolpyruvát za přítomnosti enzymu ENO1 (viz 1.8.2.3.)

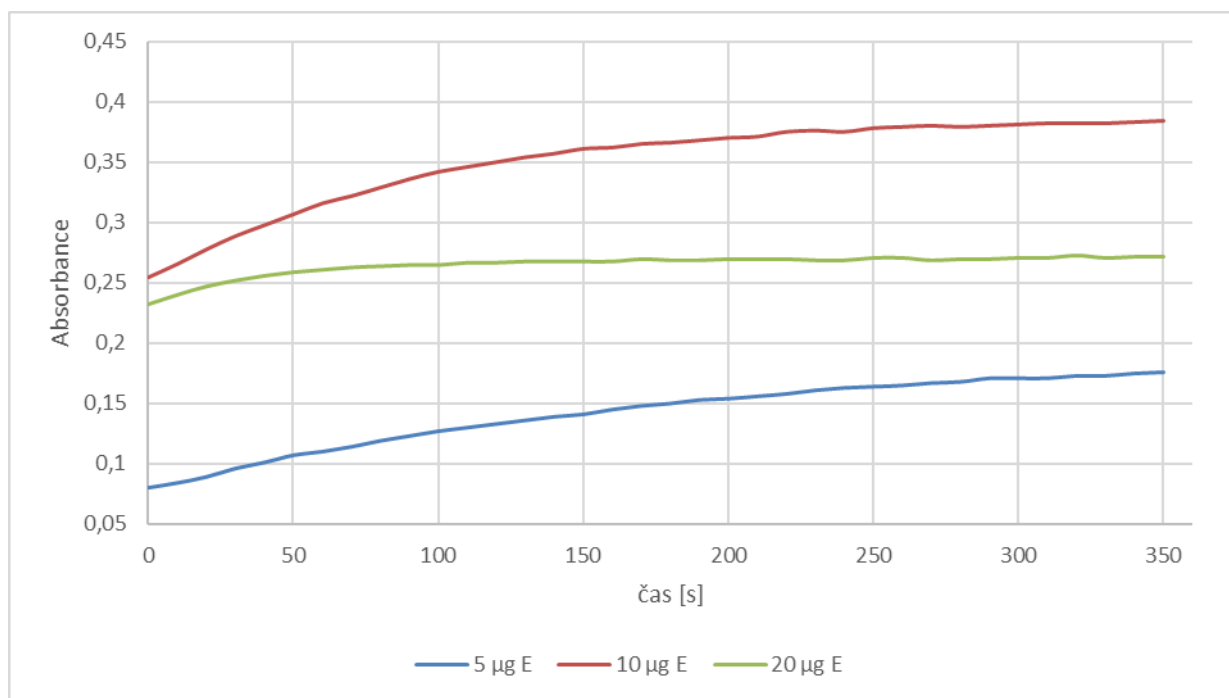
Test byl proveden pro stanovení potřebného množství enzymu, při kterém by reakce probíhala po dobu 160 sekund. Měření bylo provedeno na spektrofotometru Libra S22 při 30 °C. Byla měřena kinetika reakce při 240 nm, po dobu 160 sekund, se záznamem každých 10 sekund. Jako substrát byl použit 3 mM 2-PG a množství enzymu ENO1 bylo 0,1 µg, 0,25 µg a 0,5 µg.



Obrázek 34 - Výsledky stanovení aktivity ENO1 pomocí Warburgova optického testu: koncentrace substrátu 3mM, množství enzymu 0,5 µg, 0,25 µg, 0,1 µg, při 240 nm

Výsledky měření neodpovídaly množství enzymu vloženého do reakce a záznam v čase neodpovídal spotřebovanému substrátu a jeho přeměně na produkt.

Vzhledem k předešlým výsledkům bylo množství enzymu vkládanému do reakce výrazně zvýšeno. Jako substrát byl použit 3 mM 2-PG a byly měřeny tři vzorky s 5 μ g, 10 μ g, 20 μ g ENO1.



Obrázek 35 – Výsledky stanovení aktivity ENO1 pro zjištění optimálních podmínek a kalibraci pomocí Warburgova optického testu: koncentrace substrátu 3mM, množství enzymu 5 μ g, 10 μ g, 20 μ g, při 240 nm, při 30 °C

Jak je zřejmé z výsledků (Obrázek 35), zde již bylo možné pozorovat nárůst signálu v čase u všech tří koncentrací enzymu, reakce katalýzy – přeměna substrátu na produkt probíhala v čase, přesto nebylo možné pozorovat korelaci mezi vloženým množstvím enzymu do reakce a vyjádřit kalibrační závislost. Také se ukázalo, že je tato tradiční metoda málo citlivá a k našemu účelu nevhodná.

Jak uvádí výrobce, diagnostická souprava od firmy Abcam je pro měření aktivity malých množství enzymu ENO1 vhodnější, je ale nutné vždy ověřit, že standard enzymu pro vytvoření kalibrační závislosti vykazuje stejnou míru reaktivity s použitými protilátkami. Zavedení metody stanovení aktivity ENO1 nebylo úspěšné. Důvodem byla omezená reaktivita rekombinantního enzymu se specifickými protilátkami v destičce z diagnostické soupravy, Také cena samotné diagnostické soupravy a rekombinantního enzymu je vysoká a nebylo tak možné provést další zpřesňující experimenty. Pro naše účely bude nutné reakční podmínky pro stanovení aktivity ještě optimalizovat.

5. Závěr

Enzym α -Enoláza je významný enzym, který zasahuje do mnoha metabolických signálních drah. Aktivita tohoto multifunkčního enzymu je nezbytná pro každou eukaryotní buňku. Doposud publikované informace ukazují, že nádorové buňky toho využívají a zvýšenou expresí genu kódujícího α -Enolázu si vůči zdravým buňkám zajišťují výhody, které vedou k neomezené proliferační aktivitě a k omezené odpovědnosti na signály z prostředí v okolí buněk.

V rámci diplomové práce bylo zjištěno, že v séru pacientů s mnohočetným myelomem se objevují ve zvýšené míře autoreaktivní protilátky, u nichž se lze domnívat, že se mohou podílet na identifikaci a eliminaci nádorových buněk z krevního oběhu z ložisek v kostní dřeni a podpořit tak protinádorový dozor imunitního systému pacientů. U autoreaktivních protilátek vyskytujících se v sérech pacientů nejčastěji byla metodou MS zjištěna identita cílové molekuly, kdy se jednalo o enzym α -Enoláza. Výsledky analýz sér metodou SERPA byly v souladu s výsledky uváděnými v mnoha odborných publikacích, a to nejen pro mnohočetný myelom. Celkem bylo analyzováno 46 vzorků sér odebraných 10 pacientům. Kohorta pacientů byla doplněna o vzorky sér zdravých dobrovolných dárců. Hodnotícím kritériem výsledků byl výskyt autoprotilátek proti α -Enoláze ve vztahu k fázi onemocnění. Vzhledem k malému počtu vzorků není možné v klinickém kontextu vytvářet jednoznačné závěry, ale byl pozorován trend v průběhu onemocnění a výskytu anti-ENO1 Ab. Dosavadní výsledky u pacientů s mnohočetným myelomem léčených nejmodernějšími způsoby včetně transplantací je možné pozorovat aktivní zapojení imunitního systému, a to formou syntézy specifických autoprotilátek proti klíčovému enzymu α -Enoláza.

Dalším dílčím cílem bylo zavést metodu pro stanovení aktivity enzymu ENO1. K tomu byla použita diagnostická souprava, která jak naše výsledky naznačují je pro stanovení nízkých hladin ENO1 v buněčném lyzátu vhodná, je však nutné některé kroky optimalizovat a validovat pomocí vhodných standardů.

Citace

1. RAY, Arghya, Yan SONG, Ting DU, Dharminder CHAUHAN a Kenneth C. ANDERSON. Correction: Preclinical validation of Alpha-Enolase (ENO1) as a novel immunometabolic target in multiple myeloma. *Oncogene* [online]. 2021, 40(41), 6057-6057 [cit. 2023-04-26]. ISSN 0950-9232. Dostupné z: doi:10.1038/s41388-021-01996-y
2. CULLEN, John M. a Matthew BREEN. An Overview of Molecular Cancer Pathogenesis, Prognosis, and Diagnosis. In: MEUTEN, Donald J., ed. *Tumors in Domestic Animals* [online]. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, 2016, 2016-11-12, s. 1-26 [cit. 2023-03-23]. ISBN 9781119181200. Dostupné z: doi:10.1002/9781119181200.ch1
3. HANAHAN, Douglas a Robert A. WEINBERG. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* [online]. 2011, 144(5), 646-674 [cit. 2023-01-21]. ISSN 00928674. Dostupné z: doi:10.1016/j.cell.2011.02.013
4. BUSSARD, Karen M., Lysette MUTKUS, Kristina STUMPF, Candelaria GOMEZ-MANZANO a Frank C. MARINI. Tumor-associated stromal cells as key contributors to the tumor microenvironment. *Breast Cancer Research* [online]. 2016, 18(1) [cit. 2023-04-14]. ISSN 1465-542X. Dostupné z: doi:10.1186/s13058-016-0740-2
5. BERX, G. a F. VAN ROY. Involvement of Members of the Cadherin Superfamily in Cancer. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* [online]. 2009, 1(6), a003129-a003129 [cit. 2023-03-23]. ISSN 1943-0264. Dostupné z: doi:10.1101/cshperspect.a003129
6. VIALARD, Claire a Bruno LARRIVÉE. Tumor angiogenesis and vascular normalization: alternative therapeutic targets. *Angiogenesis* [online]. 2017, 20(4), 409-426 [cit. 2023-01-22]. ISSN 0969-6970. Dostupné z: doi:10.1007/s10456-017-9562-9
7. OSTRAND-ROSENBERG, Suzanne a Pratima SINHA. Myeloid-Derived Suppressor Cells: Linking Inflammation and Cancer. *The Journal of Immunology* [online]. 2009, 182(8), 4499-4506 [cit. 2023-03-23]. ISSN 0022-1767. Dostupné z: doi:10.4049/jimmunol.0802740
8. BURKHART, Deborah L. a Julien SAGE. Cellular mechanisms of tumour suppression by the retinoblastoma gene. *Nature Reviews Cancer* [online]. 2008, 8(9), 671-682 [cit. 2023-03-23]. ISSN 1474-175X. Dostupné z: doi:10.1038/nrc2399
9. NARAYANAN, Deevya L., Rao N. SALADI a Joshua L. FOX. Review: Ultraviolet radiation and skin cancer. *International Journal of Dermatology* [online]. 2010, 49(9), 978-986 [cit. 2023-02-04]. ISSN 00119059. Dostupné z: doi:10.1111/j.1365-4632.2010.04474.x
10. NEČAS, Emanuel. *Obecná patologická fyziologie*. Vydání páté, upravené. Praha: Univerzita Karlova, nakladatelství Karolinum, 2021. ISBN 9788024646336

11. MOORTHY, Bhagavatula, Chun CHU a Danielle J. CARLIN. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: From Metabolism to Lung Cancer. *Toxicological Sciences* [online]. 2015, 145(1), 5-15 [cit. 2023-02-04]. ISSN 1096-6080. Dostupné z: doi:10.1093/toxsci/kfv040
12. BOUVARD, Véronique, Robert BAAN, Kurt STRAIF, et al. A review of human carcinogens—Part B: biological agents. *The Lancet Oncology* [online]. 2009, 10(4), 321-322 [cit. 2023-02-04]. ISSN 14702045. Dostupné z: doi:10.1016/S1470-2045(09)70096-8
13. COFFIN, John M. a Hung FAN. The Discovery of Reverse Transcriptase. *Annual Review of Virology* [online]. 2016, 3(1), 29-51 [cit. 2023-05-05]. ISSN 2327-056X. Dostupné z: doi:10.1146/annurev-virology-110615-035556
14. TORRY, DONALD S. a GEOFFREY M. COOPER. Proto-Oncogenes in Development and Cancer. *American Journal of Reproductive Immunology* [online]. 1991, 25(3), 129-132 [cit. 2023-03-29]. ISSN 10467408. Dostupné z: doi:10.1111/j.1600-0897.1991.tb01080.x
15. WEINSTEIN, I Bernard a Andrew K JOE. Mechanisms of Disease: oncogene addiction—a rationale for molecular targeting in cancer therapy. *Nature Clinical Practice Oncology* [online]. 2006, 3(8), 448-457 [cit. 2023-03-29]. ISSN 1743-4254. Dostupné z: doi:10.1038/ncponc0558
16. SHIH, Chiaho, L. C. PADHY, Mark MURRAY a Robert A. WEINBERG. Transforming genes of carcinomas and neuroblastomas introduced into mouse fibroblasts. *Nature* [online]. 1981, 290(5803), 261-264 [cit. 2023-03-04]. ISSN 0028-0836. Dostupné z: doi:10.1038/290261a0
17. TABIN, Clifford J., Scott M. BRADLEY, Cornelia I. BARGMANN, et al. Mechanism of activation of a human oncogene. *Nature* [online]. 1982, 300(5888), 143-149 [cit. 2023-03-04]. ISSN 0028-0836. Dostupné z: doi:10.1038/300143a0
18. ROWLEY, JANET D. A New Consistent Chromosomal Abnormality in Chronic Myelogenous Leukaemia identified by Quinacrine Fluorescence and Giemsa Staining. *Nature* [online]. 1973, 243(5405), 290-293 [cit. 2023-03-04]. ISSN 0028-0836. Dostupné z: doi:10.1038/243290a0
19. OSMAN, Afaf E.G. a Michael W. DEININGER. Chronic Myeloid Leukemia: Modern therapies, current challenges and future directions. *Blood Reviews* [online]. 2021, 49 [cit. 2023-03-05]. ISSN 0268960X. Dostupné z: doi:10.1016/j.blre.2021.100825
20. BERTRAND, Suzanne, Roland BERGER, Thierry PHILIP, et al. Variant translocation in a non endemic case of Burkitt's lymphoma: t (8;22) in an Epstein-Barr virus negative tumour and in a derived cell line. *European Journal of Cancer (1965)* [online]. 1981, 17(5), 577-581 [cit. 2023-03-05]. ISSN 00142964. Dostupné z: doi:10.1016/0014-2964(81)90060-8

21. MOLYNEUX, Elizabeth M, Rosemary ROCHFORD, Beverly GRIFFIN, et al. Burkitt's lymphoma. *The Lancet* [online]. 2012, 379(9822), 1234-1244 [cit. 2023-03-05]. ISSN 01406736. Dostupné z: doi:10.1016/S0140-6736(11)61177-X
22. NEČAS, Emanuel. *Obecná patologická fyziologie*. Vydání páté, upravené. Praha: Univerzita Karlova, nakladatelství Karolinum, 2021. ISBN 9788024646336
23. AYGUN, Nevim. Biological and Genetic Features of Neuroblastoma and Their Clinical Importance. *Current Pediatric Reviews* [online]. 2018, 14(2), 73-90 [cit. 2023-03-05]. ISSN 15733963. Dostupné z: doi:10.2174/1573396314666180129101627
24. LENGAUER, C., K. W. KINZLER a B. VOGELSTEIN. Genetic instability in colorectal cancers. *Nature* [online]. 1997, 386(6625), 623-627 [cit. 2023-03-05]. ISSN 0028-0836. Dostupné z: doi:10.1038/386623a0
25. Bos JL. ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res*. 1989 Sep 1;49(17):4682-9. Erratum in: *Cancer Res* 1990 Feb 15;50(4):1352. PMID: 2547513
26. DIDIASOVA, Miroslava, Dariusz ZAKRZEWICZ, Viktor MAGDOLEN, Chandran NAGARAJ, Zoltán BÁLINT, Manfred ROHDE, Klaus T. PREISSNER a Malgorzata WYGRECKA. STIM1/ORAI1-mediated Ca²⁺ Influx Regulates Enolase-1 Exteriorization. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 2015, 290(19), 11983-11999 [cit. 2023-01-21]. ISSN 00219258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M114.598425
27. DIDIASOVA, Miroslava, Liliana SCHAEFER a Malgorzata WYGRECKA. When Place Matters: Shuttling of Enolase-1 Across Cellular Compartments. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* [online]. 2019, 7 [cit. 2023-01-21]. ISSN 2296-634X. Dostupné z: doi:10.3389/fcell.2019.00061
28. DÍAZ-RAMOS, Àngels, Anna ROIG-BORRELLAS, Ana GARCÍA-MELERO a Roser LÓPEZ-ALEMANY. A -Enolase, a Multifunctional Protein: Its Role on Pathophysiological Situations. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* [online]. 2012, 2012, 1-12 [cit. 2023-01-21]. ISSN 1110-7243. Dostupné z: doi:10.1155/2012/156795
29. HUANG, Chen Kai, Ying SUN, Lei LV a Yong PING. ENO1 and Cancer. *Molecular Therapy - Oncolytics* [online]. 2022, 24, 288-298 [cit. 2023-01-21]. ISSN 23727705. Dostupné z: doi:10.1016/j.omto.2021.12.026
30. BACCI, Gaetano, Rodolfo CAPANNA, Maurizio ORLANDI, Iris MANCINI, Graziano BETTELLI, Dante DALLARI a Mario CAMPANACCI. Prognostic significance of serum lactic acid dehydrogenase in Ewing's tumor of bone. *La Ricerca in Clinica e in Laboratorio* [online]. 1985, 15(1), 89-96 [cit. 2023-03-05]. ISSN 0390-5748. Dostupné z: doi:10.1007/BF03029166

31. AKRAM, M. Mini-review on Glycolysis and Cancer. *Journal of Cancer Education* [online]. 2013, 28(3), 454-457 [cit. 2023-03-05]. ISSN 0885-8195. Dostupné z: doi:10.1007/s13187-013-0486-9
32. WARBURG, Otto, Franz WIND a Erwin NEGELEIN. THE METABOLISM OF TUMORS IN THE BODY. *Journal of General Physiology* [online]. 1927, 8(6), 519-530 [cit. 2023-03-05]. ISSN 1540-7748. Dostupné z: doi:10.1085/jgp.8.6.519
33. LU, Huasheng, Robert A. FORBES a Ajay VERMA. Hypoxia-inducible Factor 1 Activation by Aerobic Glycolysis Implicates the Warburg Effect in Carcinogenesis. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 2002, 277(26), 23111-23115 [cit. 2023-03-05]. ISSN 00219258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M202487200
34. Schwickert G, Walenta S, Sundfør K, Rofstad EK, Mueller-Klieser W. Correlation of high lactate levels in human cervical cancer with incidence of metastasis. *Cancer Res.* 1995 Nov 1;55(21):4757-9. PMID: 7585499
35. Xu RH, Pelicano H, Zhou Y, Carew JS, Feng L, Bhalla KN, Keating MJ, Huang P. Inhibition of glycolysis in cancer cells: a novel strategy to overcome drug resistance associated with mitochondrial respiratory defect and hypoxia. *Cancer Res.* 2005 Jan 15;65(2):613-21. PMID: 15695406
36. ALTENBERG, B. a K.O. GREULICH. Genes of glycolysis are ubiquitously overexpressed in 24 cancer classes. *Genomics* [online]. 2004, 84(6), 1014-1020 [cit. 2023-01-21]. ISSN 08887543. Dostupné z: doi:10.1016/j.ygeno.2004.08.010
37. CHANG, Gee-Chen, Ko-Jiunn LIU, Chia-Ling HSIEH, et al. Identification of α -Enolase as an Autoantigen in Lung Cancer: Its Overexpression Is Associated with Clinical Outcomes. *Clinical Cancer Research* [online]. 2006, 12(19), 5746-5754 [cit. 2023-01-21]. ISSN 1078-0432. Dostupné z: doi:10.1158/1078-0432.CCR-06-0324
38. TSAI, Sen-Tien, I-Hsiu CHIEN, Wen-Hao SHEN, et al. ENO1, a potential prognostic head and neck cancer marker, promotes transformation partly via chemokine CCL20 induction. *European Journal of Cancer* [online]. 2010, 46(9), 1712-1723 [cit. 2023-01-21]. ISSN 09598049. Dostupné z: doi:10.1016/j.ejca.2010.03.018
39. YIN, Hang, Lei WANG a Hai-Lin LIU. ENO1 Overexpression in Pancreatic Cancer Patients and Its Clinical and Diagnostic Significance. *Gastroenterology Research and Practice* [online]. 2018, 2018, 1-7 [cit. 2023-01-21]. ISSN 1687-6121. Dostupné z: doi:10.1155/2018/3842198
40. ZHAN, Panpan, Shihu ZHAO, Hua YAN, et al. A-enolase promotes tumorigenesis and metastasis via regulating AMPK/mTOR pathway in colorectal cancer. *Molecular*

- Carcinogenesis* [online]. 2017, 56(5), 1427-1437 [cit. 2023-01-21]. ISSN 08991987. Dostupné z: doi:10.1002/mc.22603
41. TU, Shih-Hsin, Chih-Chiang CHANG, Ching-Shyang CHEN, et al. Increased expression of enolase α in human breast cancer confers tamoxifen resistance in human breast cancer cells. *Breast Cancer Research and Treatment* [online]. 2010, 121(3), 539-553 [cit. 2023-01-21]. ISSN 0167-6806. Dostupné z: doi:10.1007/s10549-009-0492-0
 42. VASSALLI, J D, A P SAPPINO a D BELIN. The plasminogen activator/plasmin system. *Journal of Clinical Investigation* [online]. 1991, 88(4), 1067-1072 [cit. 2023-02-04]. ISSN 0021-9738. Dostupné z: doi:10.1172/JCI115405
 43. LOPEZ-ALEMANY, R., P. CORREC, L. CAMOIN a P. BURTIN. Purification of the plasmin receptor from human carcinoma cells and comparison to α -enolase. *Thrombosis Research* [online]. 1994, 75(4), 371-381 [cit. 2023-02-04]. ISSN 00493848. Dostupné z: doi:10.1016/0049-3848(94)90252-6
 44. REDLITZ, Alexander, Bruce J. FOWLER, Edward F. PLOW a Lindsey A. MILES. The Role of an Enolase-Related Molecule in Plasminogen Binding to Cells. *European Journal of Biochemistry* [online]. 1995, 227(1-2), 407-415 [cit. 2023-02-04]. ISSN 0014-2956. Dostupné z: doi:10.1111/j.1432-1033.1995.tb20403.x
 45. LÓPEZ-ALEMANY, Roser, Colin LONGSTAFF, Stephen HAWLEY, et al. Inhibition of cell surface mediated plasminogen activation by a monoclonal antibody against α -Enolase. *American Journal of Hematology* [online]. 2003, 72(4), 234-242 [cit. 2023-02-04]. ISSN 03618609. Dostupné z: doi:10.1002/ajh.10299
 46. LEVINE, Arnold J. a Anna M. PUZIO-KUTER. The Control of the Metabolic Switch in Cancers by Oncogenes and Tumor Suppressor Genes. *Science* [online]. 2010, 330(6009), 1340-1344 [cit. 2023-03-29]. ISSN 0036-8075. Dostupné z: doi:10.1126/science.1193494
 47. VANDER HEIDEN, Matthew G., Lewis C. CANTLEY a Craig B. THOMPSON. Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation. *Science* [online]. 2009, 324(5930), 1029-1033 [cit. 2023-03-29]. ISSN 0036-8075. Dostupné z: doi:10.1126/science.1160809
 48. SHESTOV, Alexander A, Xiaojing LIU, Zheng SER, et al. Quantitative determinants of aerobic glycolysis identify flux through the enzyme GAPDH as a limiting step. *ELife* [online]. 2014, 3 [cit. 2023-03-29]. ISSN 2050-084X. Dostupné z: doi:10.7554/eLife.03342
 49. PFEIFFER, Thomas, Stefan SCHUSTER a Sebastian BONHOEFFER. Cooperation and Competition in the Evolution of ATP-Producing Pathways. *Science* [online]. 2001,

- 292(5516), 504-507 [cit. 2023-03-29]. ISSN 0036-8075. Dostupné z: doi:10.1126/science.1058079
50. SLAVOV, Nikolai, Bogdan A. BUDNIK, David SCHWAB, Edoardo M. AIROLDI a Alexander VAN OUDENAARDEN. Constant Growth Rate Can Be Supported by Decreasing Energy Flux and Increasing Aerobic Glycolysis. *Cell Reports* [online]. 2014, 7(3), 705-714 [cit. 2023-03-29]. ISSN 22111247. Dostupné z: doi:10.1016/j.celrep.2014.03.057
 51. EPSTEIN, Tamir, Liping XU, Robert J GILLIES a Robert A GATENBY. Separation of metabolic supply and demand: aerobic glycolysis as a normal physiological response to fluctuating energetic demands in the membrane. *Cancer & Metabolism* [online]. 2014, 2(1) [cit. 2023-03-29]. ISSN 2049-3002. Dostupné z: doi:10.1186/2049-3002-2-7
 52. Zhang J., Li H., Miao L., Ding J. Silencing of ENO1 inhibits the proliferation, migration and invasion of human breast cancer cells. *J. Buon.* 2020;25:696–701
 53. QIAO, Hui, Yufeng WANG, Bingdong ZHU, Lei JIANG, Wenzhen YUAN, Yongning ZHOU a Quanlin GUAN. Enolase1 overexpression regulates the growth of gastric cancer cells and predicts poor survival. *Journal of Cellular Biochemistry* [online]. 2019, 120(11), 18714-18723 [cit. 2023-01-22]. ISSN 0730-2312. Dostupné z: doi:10.1002/jcb.29179
 54. FU, Qiao-Fen, Yan LIU, Yue FAN, et al. Alpha-enolase promotes cell glycolysis, growth, migration, and invasion in non-small cell lung cancer through FAK-mediated PI3K/AKT pathway. *Journal of Hematology & Oncology* [online]. 2015, 8(1) [cit. 2023-01-22]. ISSN 1756-8722. Dostupné z: doi:10.1186/s13045-015-0117-5
 55. HSIAO, Kuan-Chung, Neng-Yao SHIH, Hsun-Lang FANG, et al. Surface α -Enolase Promotes Extracellular Matrix Degradation and Tumor Metastasis and Represents a New Therapeutic Target. *PLoS ONE* [online]. 2013, 8(7) [cit. 2023-01-22]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0069354
 56. KUMARI, Seema a Ramarao MALLA. New Insight on the Role of Plasminogen Receptor in Cancer Progression. *Cancer Growth and Metastasis* [online]. 2015, 8 [cit. 2023-01-22]. ISSN 1179-0644. Dostupné z: doi:10.4137/CGM.S27335
 57. ZHANG, Yun a Robert A. WEINBERG. Epithelial-to-mesenchymal transition in cancer: complexity and opportunities. *Frontiers of Medicine* [online]. 2018, 12(4), 361-373 [cit. 2023-01-22]. ISSN 2095-0217. Dostupné z: doi:10.1007/s11684-018-0656-6
 58. GAO, JIE, RONGRONG ZHAO, YAN XUE, ZUOXING NIU, KAI CUI, FACHANG YU, BO ZHANG a SHENG LI. Role of enolase-1 in response to hypoxia in breast cancer: Exploring the mechanisms of action. *Oncology Reports* [online]. 2013, 29(4), 1322-1332 [cit. 2023-01-22]. ISSN 1021-335X. Dostupné z: doi:10.3892/or.2013.2269

59. CHEN, Jo-Mei, Shao-Chih CHIU, Kun-Chieh CHEN, Yun-Ru HUANG, Yu-Ting LIAO a Chang-Tze YU. Enolase 1 differentially contributes to cell transformation in lung cancer but not in esophageal cancer. *Oncology Letters* [online]. 2020 [cit. 2023-01-22]. ISSN 1792-1074. Dostupné z: doi:10.3892/ol.2020.11427
60. EJESKÄR, Katarina, Cecilia KRONA, Helena CARÉN, Faten ZAIBAK, Lingli LI, Tommy MARTINSSON a Panayiotis A IOANNOU. Introduction of in vitro transcribed ENO1 mRNA into neuroblastoma cells induces cell death. *BMC Cancer* [online]. 2005, 5(1) [cit. 2023-01-22]. ISSN 1471-2407. Dostupné z: doi:10.1186/1471-2407-5-161
61. CAPELLO, Michela, Sammy FERRI-BORGOGNO, Chiara RIGANTI, et al. Targeting the Warburg effect in cancer cells through ENO1 knockdown rescues oxidative phosphorylation and induces growth arrest. *Oncotarget* [online]. 2016, 7(5), 5598-5612 [cit. 2023-01-22]. ISSN 1949-2553. Dostupné z: doi:10.18632/oncotarget.6798
62. GEMTA, Lelisa F., Peter J. SISKA, Marin E. NELSON, et al. Impaired enolase 1 glycolytic activity restrains effector functions of tumor-infiltrating CD8 + T cells. *Science Immunology* [online]. 2019, 4(31) [cit. 2023-01-23]. ISSN 2470-9468. Dostupné z: doi:10.1126/sciimmunol.aap9520
63. SUBRAMANIAN, Aruna a Donald M. MILLER. Structural Analysis of α -Enolase. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 2000, 275(8), 5958-5965 [cit. 2023-01-23]. ISSN 00219258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.275.8.5958
64. SEDORIS, Kara C, Shelia D THOMAS a Donald M MILLER. Hypoxia induces differential translation of enolase/MBP-1. *BMC Cancer* [online]. 2010, 10(1) [cit. 2023-01-23]. ISSN 1471-2407. Dostupné z: doi:10.1186/1471-2407-10-157
65. OWUSU, Lawrence, Caiming XU, Hailong CHEN, et al. Gamma-enolase predicts lung damage in severe acute pancreatitis-induced acute lung injury. *Journal of Molecular Histology* [online]. 2018, 49(4), 347-356 [cit. 2023-04-03]. ISSN 1567-2379. Dostupné z: doi:10.1007/s10735-018-9774-3
66. MCCORMACK, Ashley L., David M. SCHIELTZ, Bruce GOODE, Shirley YANG, Georjana BARNES, David DRUBIN a John R. YATES. Direct Analysis and Identification of Proteins in Mixtures by LC/MS/MS and Database Searching at the Low-Femtomole Level. *Analytical Chemistry* [online]. 1997, 69(4), 767-776 [cit. 2023-03-14]. ISSN 0003-2700. Dostupné z: doi:10.1021/ac960799q
67. HAYASHI, Miki, Ritaro MATSUURA a Tetsuya YAMAMOTO. Effects of low concentration fluoride released from fluoride-sustained-releasing composite resin on the

- bioactivity of *Streptococcus mutans*. *Dental Materials Journal* [online]. 2022, 41(2), 309-316 [cit. 2023-04-15]. ISSN 0287-4547. Dostupné z: doi:10.4012/dmj.2021-219
68. MELEADY, Paula. Two-Dimensional Gel Electrophoresis and 2D-DIGE. In: OHLENDIECK, Kay, ed. *Difference Gel Electrophoresis* [online]. New York, NY: Springer New York, 2018, 2018-10-11, s. 3-14 [cit. 2023-03-14]. Methods in Molecular Biology. ISBN 978-1-4939-7267-8. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-4939-7268-5_1
69. PERRET, G. a E. BOSCHETTI. Aptamer-Based Affinity Chromatography for Protein Extraction and Purification. In: URMANN, Katharina a Johanna-Gabriela WALTER, ed. *Aptamers in Biotechnology* [online]. Cham: Springer International Publishing, 2020, 2019-09-05, s. 93-139 [cit. 2023-03-14]. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology. ISBN 978-3-030-54060-9. Dostupné z: doi:10.1007/10_2019_106
70. ENGVALL, Eva. The ELISA, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Clinical Chemistry* [online]. 2010, 56(2), 319-320 [cit. 2023-03-14]. ISSN 0009-9147. Dostupné z: doi:10.1373/clinchem.2009.127803
71. KOHL, Thomas O. a Carl A. ASCOLI. Direct Competitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). *Cold Spring Harbor Protocols* [online]. 2017, 2017(7) [cit. 2023-03-14]. ISSN 1940-3402. Dostupné z: doi:10.1101/pdb.prot093740
72. LI, Jitian, Liping DAI, Manyu HUANG, Yan MA, Zhiping GUO, Xiao WANG, Wuyin LI a Jian-Ying ZHANG. Immunoseroproteomic profiling in autoantibody to ENO1 as potential biomarker in immunodiagnosis of osteosarcoma by serological proteome analysis (SERPA) approach. *OncoImmunology* [online]. 2021, 10(1) [cit. 2023-03-24]. ISSN 2162-402X. Dostupné z: doi:10.1080/2162402X.2021.1966969
73. HIRANO, Seishiro. Western Blot Analysis. In: REINEKE, Joshua, ed. *Nanotoxicity* [online]. Totowa, NJ: Humana Press, 2012, 2012-7-24, s. 87-97 [cit. 2023-04-11]. Methods in Molecular Biology. ISBN 978-1-62703-001-4. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-62703-002-1_6
74. News from new Hampshire. *Nhpr.org* [online]. 2013, 20.5.2013 [cit. 2023-05-05]. Dostupné z: <https://www.nhpr.org/post/philadelphia-chromosome-mutant-gene-and-quest-cure-cancer>
75. FUKANO, Keigo a Kazuhiro KIMURA. Measurement of Enolase Activity in Cell Lysates. In: *Conceptual Background and Bioenergetic/Mitochondrial Aspects of Oncometabolism* [online]. Elsevier, 2014, 2014, s. 115-124 [cit. 2023-05-05]. Methods in Enzymology. ISBN 9780124166189. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-416618-9.00006-6

76. Abcam - ENO1 Assay Kit. *Abcam.com* [online]. [cit. 2023-05-05]. Dostupné z:
<https://www.abcam.com/products/assay-kits/enol1-assay-kit-alpha-enolase-human-ab117994.html>
77. Abcam - ELISA principle and types. *Abcam.com* [online]. [cit. 2023-05-05]. Dostupné z:
<https://www.abcam.cn/kits/elisa-principle>
78. CANDIANO, Giovanni, Laura SANTUCCI, Andrea PETRETTO, Maurizio BRUSCHI, Veronica DIMUCCIO, Andrea URBANI, Serena BAGNASCO a Gian Marco GHIGGERI. 2D-electrophoresis and the urine proteome map: Where do we stand?. *Journal of Proteomics* [online]. 2010, **73**(5), 829-844 [cit. 2023-05-05]. ISSN 18743919. Dostupné z:
doi:10.1016/j.jprot.2009.12.003