

Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko – technologická

Mechanismy rezistence u mnohočetného myelomu - buněčný model

Diplomová práce

2024

Kateřina Rubínová

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2023/2024

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Kateřina Rubínová**
Osobní číslo: **C22396**
Studijní program: **N0512A130006 Analýza biologických materiálů**
Téma práce: **Mechanismy rezistence u mnohočetného myelomu – buněčný model**
Téma práce anglicky: **Mechanisms of Resistance in Multiple Myeloma – Cellular Model**
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování

Teoretická část:

Mnohočetný myelom (MM) je druhé nejčastější hematopoetické onemocnění s dobou přežití od několika měsíců po desítky let (1). Tato hematologická malignita je charakterizovaná proliferací zralých plazmatických buněk a jedná se o velmi heterogenní chorobu jak na genetické bázi, tak klinickým fenotypem. I přes moderní terapeutické postupy, jakými jsou např. léčba inhibitory proteasomu, autologní transplantace kmenových buněk a imunoterapie s využitím monoklonálních a nově bispecifických protilátek, u více než třetiny pacientů není odpověď na léčbu dostatečná a dochází k rozvoji terapeutické rezistence u nádorových plazmatických buněk (2). Hmotnostní spektrometrie spojená s kapalinovou chromatografií (LC-MS) je dnes již nedílnou součástí moderní proteomiky, jinými slovy, analýzy proteinů v komplexních biologických systémech, jakými jsou buněčné populace. LC-MS je skvělým nástrojem pro výzkum mechanismů rezistence u nádorových buněčných linií MM *in vitro* na základě informace o proteomu těchto buněk. Hlavní cíle této diplomové práce jsou tedy následující: a) vyselektovat buněčnou linii rezistentní na dva inhibitory proteasomu (bortezomib a carfilzomib), kdy jako buněčný model bude využita linie UHKT-944 (3); b) seznámit se a využít moderní LC-MS metody pro mapování mechanismů rezistence na základě LC-MS komparativní analýzy proteomu buněk rezistentních a citlivých na daná terapeutika.

Experimentální část:

První část diplomové práce bude zaměřena na seznámení se základními postupy pro proteomickou LC-MS analýzu: a) stanovení celkové koncentrace proteinů; štěpení proteinů specifickými proteázami (lysináza C, trypsin) v bazickém prostředí; c) provedení samotné LC-MS na přístrojích Ultimate 3000 RSLCnano a Q-Exactive plus včetně vyhodnocení proteomických dat. Druhá část diplomové práce bude zaměřena na: a) kultivaci buněk UHKT-944; b) testování buněčné viability pomocí resazurinové esej; c) selekci UHKT-944 rezistentní na bortezomib a carfilzomib; d) komparativní 2D LC-MS/MS analýzu hladiny proteinů u rezistentní buněčné linie v porovnání s kontrolou.

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

Seznam doporučené literatury:

1. N. W. C. J. van de Donk, C. Pawlyn, K. L. Yong, *Lancet Lond. Engl.* 397, 410-427 (2021)
2. Swan D, Murphy P, Glavey S, Quinn J. *Cancers (Basel)*, 15(6) (2023)
3. Vyhliđalová I, Uherková L, Pleschnerová M, et al.: *Eur J Haematol*, 95, 352-60 (2015).

Vedoucí diplomové práce: **Mgr. Marcela Slováková, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd

Konzultant diplomové práce: **Mgr. Marie Vajrychová, Ph.D.**
Centrum biomedicínského výzkumu, Fakultní nemocnice Hradec Králové

Datum zadání diplomové práce: **22. prosince 2023**
Termín odevzdání diplomové práce: **10. května 2024**

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

L.S.

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

V Pardubicích dne 29. února 2024

Poděkování

Ráda bych vyjádřila poděkování Mgr. Marii Vajrychové Ph.D. za odborný dohled, cenné rady, vedení a podporu při zpracování mé diplomové práce. Za odborné znalosti a připomínky, které mi pomohly lépe se zorientovat v problematice tématu. Zvláště si cením její trpělivosti a pochopení v náročných chvílích. Dále bych ráda poděkovala Mgr. Marcele Slovákové Ph.D. za pomoc a ochotu při zpracování a kontrole diplomové práce.

Prohlašuji:

Tuto práci s názvem Mechanismy rezistence u mnohočetného myelomu - buněčný model jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

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

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

V Pardubicích dne

Kateřina Rubínová

ANOTACE

Mnohočetný myelom (MM) je druhé nejčastější hematologické nádorové onemocnění, způsobené abnormální proliferací jednoho nebo více klonů plazmatických buněk a jejich akumulací v kostní dřeni. Cílem diplomové práce byla kultivace UHKT-944 buněčné linie rezistentní na bortezomib a karfilzomib, globální proteomická analýza proteomu rezistentních buněk s cílem odhalit proteiny, které mohou hrát v mechanismech rezistence MM důležitou roli

KLÍČOVÁ SLOVA

UHKT-944, mnohočetný myelom, bortezomib, karfilzomib, proteomika, hmotnostní spektrometr

ANNOTATION

Multiple myeloma (MM) is the second most common hematological cancer, caused by abnormal proliferation of one or more plasma cell clones and their accumulation in the bone marrow. The aim of this thesis was to culture the UHKT-944 cell line resistant to bortezomib and carfilzomib, and to perform a global proteomic analysis of the proteome of resistant cells in order to reveal proteins that may play an important role in the resistance mechanism of MM

KEYWORDS

UHKT-944, multiple myeloma, bortezomib, carfilzomib, proteomics, mass spectrometry

SEZNAM ZKRATEK

ASCT – autologní transplantace buněk

ASCT – autologní transplantace krvevorných buněk

ASOqPCR – kvantitativní alelicky specifická oligonukleotidová polymerázová řetězová reakce

BZ – bortezomib

CAR – T – chimerický antigenní receptor

CF – karfilzomib

CRAB – Calcium, Renal, Anemie, Bone

DNA – deoxyribonukleová kyselina

FC – fold change

FLC – volné lehké řetězce

FSC – přímý rozptyl

HCD – kolizní energie, z angl. high-energy collision dissociation

HPLC – vysokotlaká kapalinová chromatografie

IC₅₀ – poloviční maximální inhibiční koncentrace

IL – 6 – interleukin 6

IMiD – imunomodulační léky

LC – MS – kapalinová chromatografie – hmotnostní spektrometrie

MFC – Multiparametrická průtoková cytometrie

MG – monoklonální gamapatie

MGUS – monoklonální gamapatie nejasného významu

MM – mnohočetný myelom

MMG – maligní monoklonální gamapatie

MoAb – monoklonální protilátky

MRD – minimální reziduální choroba

NF- κ B – nukleární faktor kappa B

NGS – sekvenování nové generace

PCR – polymerázová řetězová reakce

PI – inhibitor proteasomu

RNA – ribonukleová kyselina

RPMI – Roswell Park Memorial Institute médium

SMM – doutnající mnohočetný myelom

SSC – boční rozptyl

ssDNA – jednořetězcová DNA

TMT – Tandem Mass Tag

TNF- α – faktor nádorové nekrózy alfa

UHKT – Ústav hematologie a krevní transfuze v Praze

OBSAH

SEZNAM OBRÁZKŮ	22
SEZNAM TABULEK	22
ÚVOD	12
1. TEORETICKÁ ČÁST	13
1.1. KLINICKÁ MANIFESTACE MNOHOČETNÉHO MYELOMU	13
1.2. LABORATORNÍ DIAGNOSTIKA MNOHOČETNÉHO MYELOMU	16
1.3. MOLEKULÁRNÍ MECHANISMY VZNIKU MNOHOČETNÉHO MYELOMU	19
1.4. LÉČBA MNOHOČETNÉHO MYELOMU	20
1.5. REZISTENCE MNOHOČETNÉHO MYELOMU NA INHIBITORY PROTEASOMU	21
1.6. VYUŽITÍ PROTEOMICKÝCH METOD PRO VÝZKUM REZISTENCE MM	23
1.7. IDENTIFIKACE A KVANTIFIKACE PROTEINŮ POMOCÍ HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE	24
1.8. HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETR ORBITRAP EXPLORIS 480	24
1.9. IZOBARICKÉ ZNAČENÍ PEPTIDŮ TANDEM MASS TAG	25
2. CÍLE PRÁCE	26
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	27
3.1. ANALÝZA FENOTYPU, KULTIVACE A ZAMRAŽENÍ BUNĚK UHKT-944	30
3.2. STANOVENÍ VÝCHOZÍ KONCENTRACE INHIBITORŮ PROTEASOMU PRO KULTIVACI REZISTENTNÍ LINIE UHKT-944	31
3.3. KULTIVACE REZISTENTNÍ UHKT-944	31
3.4. PŘÍPRAVA BUNĚČNÉHO LYZÁTU	31
3.5. STANOVENÍ CELKOVÉ KONCENTRACE PROTEINŮ	32
3.6. ENZYMATICKÉ ŠTEPENÍ PROTEINŮ	32
3.7. STANOVENÍ CELKOVÉ KONCENTRACE PEPTIDŮ	32
3.8. ODSOLENÍ ZNAČENÝCH PEPTIDŮ EXTRAKCÍ NA PEVNÉ FÁZI	33
3.9. FRAKCIONACE ZNAČENÝCH PEPTIDŮ NA REVERZNÍ FÁZI V BAZICKÉM PROSTŘEDÍ	33
3.10. IZOBARICKÉ ZNAČENÍ PEPTIDŮ	34
3.11. IDENTIFIKACE A KVANTIFIKACE PROTEINŮ V PŘIPRAVENÝCH VZORCÍCH METODOU NANO LC-MS/MS	35
3.12. VYHODNOCENÍ PROTEOMICKÝCH DAT	36
3.13. OVĚŘENÍ ZÍSKANÝCH PROTEOMICKÝCH DAT	36
4. VÝSLEDKY A DISKUZE	38
4.1. ANALÝZA FENOTYPU A KULTIVACE BUNĚK UHKT-944	38
4.2. STANOVENÍ IC ₅₀ U BUNĚČNÉ LINIE 944 – UHKT	39
4.3. KULTIVACE REZISTENTNÍ UHKT-944 LINIE	40
4.4. STANOVENÍ IC ₅₀ U REZISTENTNÍ UHKT-944 LINIE	42
4.5. STANOVENÍ CELKOVÉ KONCENTRACE PROTEINŮ A NASTAVENÍ METODY PRO NANO LC – MS/MS	43
4.6. NANO LC-MS/MS ANALÝZA PROTEOMU REZISTENTNÍCH UHKT-944	43

4.7. OVĚŘENÍ A CHARAKTERIZACE VYBRANÝCH PROTEINŮ	46
5. ZÁVĚR	49
POUŽITÁ LITERATURA	50

Seznam obrázků

OBRÁZEK Č. 1 - INFILTRACE MALIGNÍCH BUNĚK (MR) – PŘEVZATO Z ADAM,ET. AL. PLAZMACELULÁRNÍ MALIGNITY [22].....	16
OBRÁZEK Č. 2 - OSTEOLYTICKÁ LOŽISKA VE STERNU (CT) - PŘEVZATO Z ADAM,ET. AL. PLAZMACELULÁRNÍ MALIGNITY [22].....	16
OBRÁZEK Č. 3 - ELEKTROFORÉZA SÉROVÝCH PROTEINŮ, PACIENT (85 LET), ZVÝŠENÁ FRAKCE GAMA. PRO ILUSTRACI BYL POUŽIT VÝSLEDEK ZÍSKANÝ BĚHEM ODBORNÉ PRAXE AUTORKY DIPLOMOVÉ PRÁCE	17
OBRÁZEK Č. 4 - VÝSLEDEK IMUNOFIXACE, PACIENT 85 LET (POZITIVNÍ NÁLEZ PRO IgG λ). PRO ILUSTRACI BYL POUŽIT VÝSLEDEK ZÍSKANÝ BĚHEM ODBORNÉ PRAXE AUTORKY DIPLOMOVÉ PRÁCE.	17
OBRÁZEK Č. 5- STANOVENÍ FENOTYPU BUNĚK UHKT-944 MULTIPARAMETRICKOU PRŮTOKOVOU CYTOMETRIÍ... 38	
OBRÁZEK Č. 6 - STANOVENÍ CITLIVOSTI UHKT-944 BUNĚK NA BORTEZOMIB.	39
OBRÁZEK Č. 7 - GRAF RESAZURIN ASSAY, STANOVENÍ IC 50, KARFILZOMIB.....	40
OBRÁZEK Č. 8 - GRAF RESAZURIN ASSAY, STANOVENÍ IC50, BORTEZOMIB	42
OBRÁZEK Č. 9 - CITLIVOST UHKT-944 NA 9 nM CF, STANOVENÍ IC50	42
OBRÁZEK Č. 10 - CITLIVOST UHKT-944 NA 12 nM CF, STANOVENÍ IC50	42
OBRÁZEK Č. 11 - GRAFICKÉ VYHODNOCENÍ NANO LC-MS/MS, BORTEZOMIB 3,7 nM VS KONTROLNÍ BUŇKY	45
OBRÁZEK Č. 12 - GRAFICKÉ VYHODNOCENÍ NANO LC-MS/MS, KARFILZOMIB 9 nM VS KONTROLNÍ BUŇKY	45
OBRÁZEK Č. 13 - GRAFICKÉ VYHODNOCENÍ NANO LC-MS/MS, KARFILZOMIB 12 nM VS. KARFILZOMIB 9 nM....	46
OBRÁZEK Č. 14 - GRAFICKÉ VYHODNOCENÍ NANO LC-MS/MS, KARFILZOMIB 12 nM VS. KONTROLNÍ BUŇKY	46
OBRÁZEK Č. 15 - VÝSLEDKY RT-PCR PRO TXN, PSME1 A CASP3 (3,7 nM BZ) A CITLIVOST UHKT -944 NA BZ	48
OBRÁZEK Č. 16 - VÝSLEDKY RT-PCR PRO TXN, PSME1 A CASP3 (9 nM CF) A CITLIVOST UHKT -944 NA CF .	48

Seznam tabulek

TABULKA Č. 1 - KRITÉRIA PRO DIAGNOSTIKU MM (ČESKÁ MYELOMOVÁ SKUPINA)	16
TABULKA Č. 2 - ROZDĚLENÍ ZNAČEK KE VZORKŮM, DO MULTIPLEXU	34
TABULKA Č. 3 - NASTAVENÍ ZÁKLADNÍCH PARAMETRŮ METODY MS PRO PEPTIDY OZNAČENÉ TMT ZNAČKAMI ...	35
TABULKA Č. 4 - NAMĚŘENÉ KONCENTRACE VZORKŮ METODOU MICROBCA	43

Úvod

Mnohočetný myelom (MM) je druhé nejčastější hematologické nádorové onemocnění způsobené abnormální proliferací jednoho nebo více klonů plazmatických buněk a jejich akumulací v kostní dřeni. Dle statistického vyhodnocení Ústavu zdravotnických informací a statistik v letech 2019-2021 incidence a prevalence pacientů s MM v ČR stabilně narůstá, především v mužské části populace. Na konci roku 2021 žilo v ČR 3 323 pacientů ve věku od 60 do 84 let a MM byl vyhodnocen jako 20. nejčastější příčina úmrtí. Onemocněním trpí nejčastěji lidé starší 65 let, před 40. rokem života je výskyt MM vzácný. Díky intenzivnímu výzkumu v oblasti léčby MM (inhibitory proteasomu, autologní transplantace kostní dřeně nebo kmenových hematopoetických buněk, CAR-T, bispecifické protilátky, aj.) a moderním diagnostickým metodám (průtoková cytometrie, sekvenování nové generace), je v současné době možné dosáhnout kompletní remise u více než 40 % pacientů. Přesto, že patogeneze MM stále nebyla plně objasněna a prognóza pacientů s MM po léčbě může být negativně ovlivněna výskytem perzistujících nádorových buněk, tzv. minimální reziduální chorobou u MM. Mechanismy rezistence MM jsou proto předmětem intenzivního výzkumu v oblasti personalizované medicíny s cílem lépe predikovat prognózu onemocnění u konkrétního pacienta a tím i navrhnout odpovídající léčbu. Tato diplomová práce byla proto zaměřena na kultivaci buněčné linie MM v prostředí nízké koncentrace dvou inhibitorů proteasomu (bortezomib a karfilzomib) s cílem získat *in vitro* model rezistentních buněk a odhalit proteiny, které se mohou podílet na vývoji rezistence MM.

1. Teoretická část

1.1. Klinická manifestace mnohočetného myelomu

Mnohočetný myelom (MM) je maligní nádor, který je charakterizován klonální proliferací maligních plazmatických buněk a tvoří přibližně 10 % hematologických maligních onemocnění. Obecně se MM řadí do skupiny monoklonálních gamapatií (MG), které jsou charakterizovány přítomností abnormálního monoklonálního proteinu v séru nebo moči, který produkuje abnormální protilátky třídy IgG, IgM nebo IgA, vzácně IgE nebo IgD. MG jsou skupinou onemocnění, která se dále dělí zprvu na maligní monoklonální gamapatie (MMG), které se dále dělí na mnohočetný myelom, variantní formy myelomu, nemoc těžkých řetězců, maligní lymfoproliferativní onemocnění a amyloidóza a za druhé na monoklonální gamapatie nejasného významu (MGUS). Symptomatický mnohočetný myelom vyžaduje systémovou léčbu a mohou mu předcházet dva premaligní stavy, MGUS a tzv. doutnající (smoldering) mnohočetný myelom (SMM).

1.1.1. Monoklonální gamapatie nejasného významu (MGUS)

Dle studií bylo zjištěno, že MGUS předchází MM a je spojen s progresí MM u 0,3 – 1 % pacientů za rok [1]. Tento stav je charakterizován nižší koncentrací monoklonálních protilátek a volných lehkých řetězců (FLC) v periferní krvi (≤ 30 g/l, méně než 10 % klonálních plazmatických buněk v kostní dřeni a jsou vyloučeny další klinické příznaky MMG (viz kap. 2.1.4). V moči pacienta je u MG hodnocena koncentrace FLC, tzv. Bence-Jonesova bílkovina, která se stala vůbec prvním onkologickým markerem na světě [2]. U MGUS by měla být koncentrace FLC v moči nižší než 500 mg/24 hod. MGUS je často diagnostikován jako náhodný laboratorní nález a jedná se spíše o „latentní“ formu hematologické malignity [3].

1.1.2. Doutnající (smoldering) mnohočetný myelom (SMM)

U doutnajícího mnohočetného myelomu (SMM) také nedochází k manifestaci klinických příznaků, přesto je riziko dalšího rozvoje MMG během 5 let po stanovení diagnózy vyšší než v případě MGUS. SMM se vyskytuje přibližně u 0,5 % populace starší 40 let a riziko maligní progresy se pohybuje okolo 10 % [4]. V případě SMM je koncentrace monoklonálních protilátek a FLC v séru vyšší než 30 g/l koncentrace FLC v moči je vyšší než 500 mg/24 hod a počet klonálních plazmatických buněk v kostní dřeni se pohybuje mezi 10 – 60 % [5].

Vzácně se může vyskytnout i SMM s lehkým řetězcem, u kterého jsou v nadbytku pouze volné lehké řetězce (FLC) bez průkazu monoklonálních těžkých řetězců [6].

1.1.3. Příznaky symptomatického mnohočetného myelomu

Mnohočetný myelom je kromě sekrece monoklonálních protilátek a FLC do krve a moči provázen i četnými klinickými projevy, které výrazně zhoršují kvalitu života pacientů. Klinické příznaky mnohočetného myelomu byly shrnuty pod akronym CRAB (Calcium, Renal, Anemie, Bone), který popisuje nejčastější oblasti poškození organismu v důsledku rozvoje MM [7]. Na základě těchto diagnostických kritérií je poté symptomatický MM odlišen od MGUS a SMM. Symptomatickým projevem MM je i negativní vliv onemocnění na imunitní systém. Maligní plazmatické buňky v kostní dřeni snižují počet lymfocytů např. zvýšenou apoptickou aktivitou prostřednictvím FasL [8] a zeslabují odpověď imunitního systému na patogenní podněty produkcí IL-10. Onemocnění jako takové, ale i následná léčba MM, tak snižuje odolnost pacienta vůči sekundárním infekcím [9].

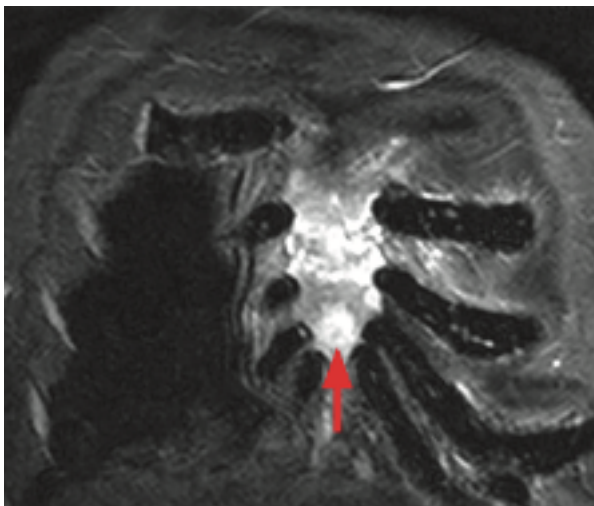
Hyperkalcémie (CRAB – Calcium) je u pacientů s MM většinou prokázána až v pozdější fázi onemocnění. Primární příčinou hyperkalcémie je abnormální vstřebávání (resorpce) kostní hmoty, která následně vede k uvolňování vápníku do periferní krve (≥ 2.8 mmol/L). Resorpce a narušení povrchu kostní tkáně je primárně způsobena zvýšenou aktivitou osteoklastů, která je vyvolána cytokiny (např. RANKL, TNF- α) a chemokiny (např. MIP-1 α), které jsou sekretovány nádorovými buňkami MM a makrofágy (MIP-1 α) [10]. Vysoká hladina vápníku v krvi výrazně narušuje funkci ledvin, zejména v kombinaci s dalším onemocněním, např. hypertenzí. Při dlouhodobé hyperkalcemii dochází k nefrokalcinóze, polyurii, dehydrataci a arytmií. Pacienti s MM mají často ireverzibilní poruchu funkce ledvin v důsledku infiltrace FLC. Schopnost ledvin účinně odstraňovat zvýšenou koncentraci vápníku z krevního oběhu je tak významně snížena.

Renální poškození u MM (RAB – Renal) je nejčastěji způsobené odliťkovou nefropatií (myelomová ledvina). Tato porucha intersticiálních tubulů je přímým důsledkem vysokých hladin monoklonálních FLC λ a κ . FLC jsou v důsledku své nízké molekulové hmotnosti volně filtrovány glomeruly a v proximálním tubulu jsou reabsorbovány endocytózou, která je zprostředkována tandemovými receptory megalinem a kubilinem. FLC jsou poté degradovány v endolyzozomálním oddílu proximální tubulární buňky lyzozomálními enzymy, konkrétně katepsinem B2 [11]. Při vysoké produkci FLC u MM nejsou schopné megalinové

a kubilinové receptory nadbytek FLC reabsorbovat. Velké množství FLC se tak dostane do lumen distálního tubulu, kde interaguje s Tamm-Horsfallovým proteinem a vytváří nerozpustné odlitkové válce [12]. Masivní reabsorpce FLC v proximálních tubulech vede ke kritickým morfologickým změnám jako je epiteliálně-mezenchymální přechod nebo nekróza. Navíc hromadění FLC stimuluje lokální produkci prozánětlivých cytokinů, například interleukinu 6 (IL-6) a TNF- α . Proto je selhání ledvin u myelomové odlitkové nefropatie důsledkem těžkého tubulointersticiálního zánětu, který rychle graduje do fibrózy. Je prokázáno, že časné snížení sérových hladin FLC umožňuje zotavení ledvin [13].

Příčinou anémie (CRAB – Anemia) u MM je narušení funkce kostní dřeně nadměrnou proliferací maligních plazmatických buněk (Obr. č. 1). Kostní dřeň v tomto případě není schopna produkovat zdravé červené krvinky v důsledku sníženého počtu hematopoetických kmenových a progenitorových buněk, zejména megakaryocytárních a erytrocytárních. Přistavení diagnózy je převládajícím příznakem normochromní – normocytární anémie (75 % pacientů) [14]. Méně častěji se pak vyskytuje trombocytopenie a leukopenie. Jedním z mechanismů negativní regulace erytropoézy u MM je proteolýza erytroidního transkripčního faktoru GATA-1 kaspázami [15] v důsledku abnormálně zvýšené hladiny pro-apoptických receptorů FasL a TRAIL na povrchu maligních plazmatických buněk [16]. Dalším patogenním faktorem u MM je zvýšená hladina hepcidinu, který reguluje metabolismus železa [17]. K narušení procesu krve tvorby přispívá i již zmíněné poškození ledvin FLC, které se projeví také sníženou produkcí erytropoetinu, který stimuluje tvorbu erytrocytů a je syntetizován v peritubulárních buňkách kortexu ledvin. V souvislosti s nedostatkem erytrocytů dochází ke snížení hemoglobinu v krvi a nedostatku přenosu kyslíku, projevující se únavou a malátností [18].

Osteoporóza u MM (CRAB – Bone) je způsobena několika faktory včetně již zmíněné nadměrné resorpce kostní tkáně a poruchy tvorby nové kostní hmoty. Maligní plazmatické buňky produkují růstové faktory a cytokiny, které aktivují osteoklasty (např. OAF) [19] buňky odpovědné za resorpci kostní tkáně, čímž dochází k nadměrné resorpci kostí a vzniku osteolytických ložisek (Obr. č. 2). Současně může nadměrná produkce interleukinu-6 (IL-6) inhibovat tvorbu osteoblastů, jejichž úkolem je tvorba kostní hmoty [20]. V důsledku úbytku kostní hmoty doprovází MM také obtížně léčitelná intenzivní bolest zad a zvýšené riziko zlomenin. Při pohybu vyvíjejí kostní léze v postižené oblasti tlak na nervová vlákna a míchu (radikulopatie) a u pacienta může dojít až k pohybové paralýze [21].



Obrázek č. 1 - Infiltrace maligních buněk (MR)
- Převzato z Adam, et. al. Plazmacelulární malignity [22]



Obrázek č. 2 - Osteolytická ložiska ve sternu (CT)
- Převzato z Adam, et. al. Plazmacelulární malignity [22]

1.2. Laboratorní diagnostika mnohočetného myelomu

Sekrece monoklonálních Ig a FLC do periferní krve a moči je jedním z diagnostických ukazatelů onemocnění. Laboratorní diagnostika MM je v současné době založena především na detekci monoklonálních protilátek a volných lehkých řetězců v séru a moči (elektroforéza, imunofixace) a stanovení počtu maligních plazmatických buněk v kostní dřeni a jejich fenotypizace (FISH, průtoková cytometrie, ASOqPCR a sekvenování nové generace). Hladina paraproteinu v séru pacienta je také důležitý diagnostický ukazatel pro odlišení MM od jiných monoklonálních gamapatií, např. MGUS nebo amyloidózy [6].

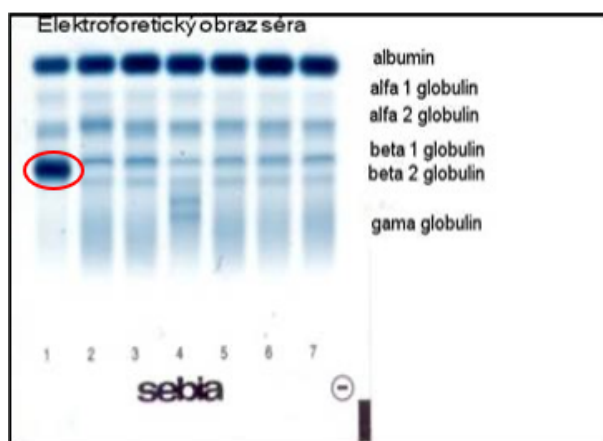
Základní kritéria pro diagnostiku MM navržená dle *International Myeloma Working Group 2023*, jsou uvedena v tabulce č. 1.

1	Přítomnost monoklonálních protilátek a FLC v krvi (> 30 g/l) a (nebo) FLC v moči (> 500 mg/24 h)
2	Počet monoklonálních plazmatických buněk v kostní dřeni vyšší než 10 %
3	Nejméně jedna dysfunkce nebo poškození orgánu (CRAB): (C - calcium) zvýšená hladina vápníku nad 2,8 mmol/l či nad horní limit (R - renal) renální insuficience s kreatininem nad 176,8 mmol/l (2 mg/ml) (A - anemia) anémie, hemoglobin pod 100 g/l nebo 20 g/l pod dolní limit normy (B - bone) osteolytické kostní destrukce nebo osteoporóza

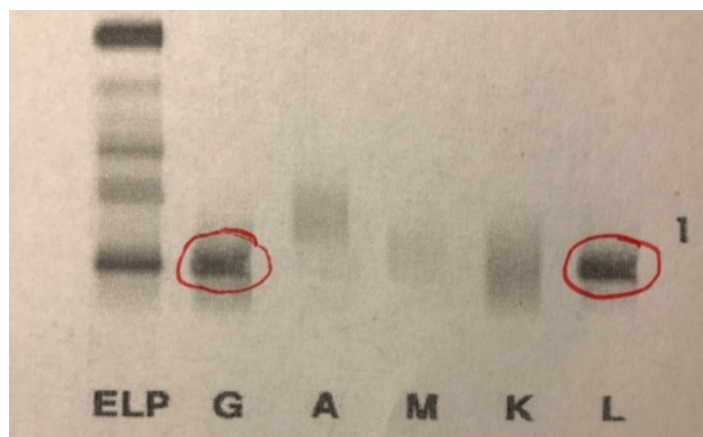
Tabulka č. 1 - Kritéria pro diagnostiku MM (Česká myelomová skupina)

1.2.1. Záchyt a typizace monoklonálních protilátek a FLC v séru a moči

Pro první záchyt frakce monoklonálních imunoglobulinů se v rutinní diagnostice používá klasická elektroforéza proteinů séra. Elektroforéza je separační technika pro rozlišení biomolekul (nukleové kyseliny a proteinů) na základě jejich velikosti a náboje v elektrickém poli [23]. Na obr. č. 3 lze vidět elektroforeogram, kde je výrazná frakce gama spojená dohromady s frakcí β_1 a β_2 .



Obrázek č. 3 - Elektroforéza sérových proteinů, pacient (85 let), zvýšená frakce gama. Pro ilustraci byl použit výsledek získaný během odborné praxe autorky diplomové práce



Obrázek č. 4 - Výsledek imunofixace, pacient 85 let (pozitivní nález pro IgG λ). Pro ilustraci byl použit výsledek získaný během odborné praxe autorky diplomové práce.

Pokud je přítomnost monoklonálních imunoglobulinů potvrzena, je provedena imunofixace s cílem identifikovat třídu monoklonální protilátky a typ lehkého řetězce. Při imunofixaci jsou nejprve proteiny elektroforeticky rozděleny a poté jsou naneseny specifické protilátky pro identifikaci monoklonálních protilátek třídy těžký IgG, IgA a IgM a FLC κ a λ (Obr. č. 4).

1.2.2. Cytogenetické vyšetření chromozomových aberací (FISH)

Fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) je mikroskopická cytogenetická technika, která umožňuje detekci chromozomových změn u MM, např. chromozomální přestavby IgH oblasti (14q32) [24]. K detekci vybraných chromozomových oblastí využívá metoda FISH již od 80. let fluorescenční DNA sondy, což jsou krátké úseky jednořetězcové DNA (ssDNA), které se navážou na komplementární úseky cílové denaturované DNA (*in situ* hybridizace). Navázání ssDNA na komplementární úsek se projeví jako fluorescenční signál [25].

1.2.3. Immunofenotypizace maligních plazmatických buněk

Multiparametrická průtoková cytometrie (MFC) je dnes již standardní metoda pro stanovení počtu a diferenciální diagnostiku maligních plazmatických buněk v kostní dřeni a je také vysoce citlivou metodou pro monitorování minimální reziduální choroby (MRD) u MM [26]. Vysoká citlivost metody je u MRD naprosto nezbytná z důvodu eliminace většiny maligních plazmatických buněk z organismu pacienta během léčby. Tato metoda je v současnosti schopna zachytit až 10^{-5} maligních plazmatických buněk. Na rozdíl od klasické průtokové cytometrie jsou k buňkám přidány fluorescenčně značené protilátky proti vybraným CD znakům. Buňky poté při průchodu paprskem laseru emitují fluorescenční světlo, které je specifické pro daný CD znak [27]. Značení protilátek různými fluorochromy poté umožňuje odlišit jednotlivé buněčné populace. Identifikace plazmatických buněk je založena zejména na detekci CD38 a CD138, nicméně pro odlišení maligních plazmatických buněk je třeba kombinace s dalšími CD znaky. Vícerozměrné analýzy jednotlivých plazmatických buněk normálních vs. myelomových vzorků kostní dřene ukázaly, že kombinované hodnocení CD138 a CD38 spolu s CD45, CD19, CD56, CD27, CD81 a CD117 je vhodnou volbou pro odhalení MRD [28].

1.2.4. Alelicky specifická oligonukleotidová qPCR

Kvantitativní alelicky specifická oligonukleotidová polymerázová řetězová reakce (ASOqPCR) je v současnosti zavedenou metodou molekulární biologie pro monitorování MRD u MM s limitem detekce 10^{-4} – 10^{-6} a pro detekci genetických změn u jednotlivých klonů maligních plazmatických buněk. Monitorování MRD pomocí ASOqPCR zahrnuje navržení primerů a sond, které jsou specifické pro tzv. CDR oblasti monoklonální protilátky (z angl. complementarity determining region) a které jsou unikátní pro každý maligní klon u každého pacienta. V dalším kroku jsou tyto oblasti amplifikovány a výsledný produkt je sekvenován dle Sangerova [29].

1.2.5. Mapování chromozomových změn a genetických mutací u maligních plazmatických buněk (NGS)

Sekvenování nové generace (NGS) umožňuje rychlou analýzu celého genomu nebo velkých úseků DNA nebo RNA a je výborným prognostickým nástrojem pro mapování genetických mutací [30] a např. translokací v IgH oblasti u maligních buněk [31]. Metoda NGS posunula limit detekce pro záchyt maligních plazmatických buněk u MRD až na 10^{-6} a čím dál více nahrazuje ASOqPCR [32]. Princip NGS spočívá v paralelním sekvenování obrovského množství krátkých úseků DNA nebo RNA (po reverzní transkripci na cDNA) v několika vzorcích současně. NGS je tedy výrazně méně časově náročná v porovnání se Sangerovou metodou, při které jsou úseky DNA sekvenovány postupně báze po bázi pomocí terminačních reakcí. [33] Při NGS je z původní izolované a fragmentované DNA nebo RNA připravena sekvenační knihovna [34]. Poté následuje amplifikace knihovny, kdy je vytvořeno množství klonů identických původním úsekům DNA přichyceným na pevný povrch a samotná sekvenace amplifikovaných úseků DNA. Výsledkem je obrovské množství dat určených pro bioinformatické hodnocení [35].

1.3. Molekulární mechanismy vzniku mnohočetného myelomu

Mnohočetný myelom je geneticky a fenotypově velice heterogenní onemocnění, u kterého nebyla patogeneze dosud zcela objasněna. Progrese MM do agresivnějšího formy a výskyt MRD jsou spojeny se změnami v počtu chromozomů a s přestavbou chromozomu 14 v IgH oblasti. V současné době jsou také známy mutace genů kódujících např. buněčnou proliferaci (MAPK) [36] a transkripci DNA (NF- κ B) [37] u maligních plazmatických buněk. Důležitým faktorem při patogenezi MM je také samotné mikroprostředí kostní dřeně [38].

1.3.1. Změny v počtu chromozomů u maligních buněk

Změny v počtu chromozomů (aneuploidie) se vyskytují přibližně u dvou třetin pacientů s MM. Ve 40 % případů je počet chromozomů u maligních klonů buněk nižší než 46. Monozomie se vyskytuje nejčastěji na chromozomech 13, 14, 16 a 22 a obecně je tento nálezn považován za negativní prognostický faktor. [25] Druhým případem je hyperdiploidie, která se nejčastěji projeví v maligních buňkách jako trisomie na chromosomech 3, 5, 7, 9, 11, 15, 19 a 21. Hyperdiploidie je v literatuře spojena s lepší prognózou a delší dobou přežití u pacientů [39, 40, 41].

1.3.2. Chromozomové přestavby u maligních buněk

Non-hyperdiploidní chromozomové změny jsou nejčastěji strukturní přestavby, které se vyskytují až u 40 % pacientů s MM. Vyznačují se zejména přemístěním (translokací) onkogenů do IgH lokusu (14q32) během izotypového přesmyku, ke kterému dochází při vývoji plazmatických buněk po aktivaci B-lymfocytů v germinálních centrech [40]. Nejčastěji je pozorována translokace lokusu na chromozomu 11 pro cyclin D (*CCND*), která způsobí abnormální buněčnou proliferaci [42]. U 15 % pacientů se vyskytuje translokace mezi chromozomem 4 a 14. Důsledkem je porucha exprese genů *NSD2* a *FGFR3*. Nadměrná exprese *NSD2* vede k aberrantní metylaci histonů, což podporuje růst a proliferaci maligních plazmocytů. Dále aktivuje protoonkogeny a inhibuje tumor supresorové geny, čímž dále přispívá k maligní transformaci společně s *FGFR3* [43, 44]. Nadměrná exprese onkogenu *c-maf* je způsobena translokací chromozomu 16 a 14 a způsobuje zvýšenou proliferaci, sníženou schopnost apoptózy a změny v mikroprostředí kostní dřeně [45]. Pacienti, kterým je tato translokace diagnostikována mají často horší prognózu [46]. Posledním příkladem je translokace zahrnující lokus lehkého řetězce imunoglobulinu lambda (IgL), např. IgL-MYC, která je také spojena s horší prognózou u pacientů s MM. IgL translokace se často vyskytuje společně s hyperdiploidií a je často opomenuta. Na pacienty s translokací IgL nemá vliv imunomodulační terapie pomocí IMiD, které se zaměřují na lymfocytárně specifický transkripční faktor Ikaros (*IKZF1*) [47].

1.4. Léčba mnohočetného myelomu

V současné době je cílem léčby dosáhnout kompletní remise a eliminovat riziko MRD. Kromě zvyšování citlivosti diagnostických metod je tak kladen důraz i na vývoj terapie MM. V současné době je pro léčbu MM schváleno sedm různých tříd léků – alkylační činidla (melfalan), kortikosteroidy (dexametazon), imunomodulační léky (IMiD, lenalidomid, thalidomid), inhibitory proteasomu (PI, bortezomib, karfilzomib), inhibitory histonové deacetylázy, monoklonální protilátky (MoAb, daratumumab) a inhibitory jaderného exportu. [48] Součástí terapie je dnes již standardně prováděná autologní transplantace kmenových buněk (ASCT), která v kombinaci s vysokými dávkami např. bortezomibu a lenalidomidu a následnou udržovací léčbou významně prodloužila dobu přežití pacientů [49]. Nejnovějším přístupem je genová terapie autologními chimérickými T-lymfocyty (CAR-T) [50].

1.4.1. Proces léčby u transplantabilních pacientů

U pacientů, kterým může být provedena ASCT probíhá zahajovací (indukční) terapie ve 3 – 6 cyklech, po které následuje transplantace a udržovací léčba. Na základě cytogenetických změn se pacienti rozdělují na rizikové a vysoce rizikové, kteří mají např. již zmíněné IgH translokace. Před zahájením ACST je pacientům podávána nejčastěji kombinace inhibitoru proteasomu (bortezomib), kortikosteroidu (dexamethason) a dalšího léčiva (lenalidomid, daratumumab, thalidomid) [48]. Po podání chemoterapeutik následuje infuze hematopoetických kmenových buněk, které byly pacientovi odebrány před zahájením léčby a která významně prodloužila dobu přežití pacientů s MM a snížila riziko další progresse MM trvale zlepšuje přežití bez progresse [51]. Délka udržovací léčby závisí na výsledku monitorování MRD. Pokud je dosaženo kompletní remise, léčba je ukončena z důvodu poměrně velké cytotoxicity podávaných léčiv. V opačném případě může udržovací léčba trvat v rozmezí 24 až 36 měsíců [48].

1.5. Rezistence mnohočetného myelomu na inhibitory proteasomu

Inhibitory proteasomu (PI) jsou používány již téměř dvacet let a staly se důležitým milníkem v léčbě MM. Inhibitorem I. generace je bortezomib (BZ), který byl původně používán nejprve při relapsu MM a později také při zahajovací léčbě [52]. Účinek BZ spočívá ve vazbě na chymotrypsinovou aktivní oblast proteasomu 26 S. Tím dochází k hromadění polyubikvitinovaných proteinů a spuštění apoptózy. Také potlačuje aktivaci NF- κ B, což vede ke snížení exprese protizánětlivých a protinádorových genů [53]. Zásadní překážkou je ale poměrně rychlé získání rezistence maligních buněk na účinky BZ, která brání dosažení kompletní remise u pacientů s MM. Rezistence buněk na BZ může být důsledkem genetických mutací, např. somatické mutace *PSMB5*, [54] ale také odlišných mechanismů, např. autofagie. [55] karfilzomib (CF) je inhibitorem II. generace, který byl schválen pro léčbu MM v roce 2012 v kombinaci s lenalidomidem, daratumumabem a dexametasonem [56]. Karfilzomib se stejně jako BZ váže na chymotrypsinovou oblast β 5 podjednotky proteasomu, vazba je ale ireverzibilní. Nicméně i v případě CF jsou buňky schopné si vyvinout rezistenci např. díky zvýšené expresi *KLF4*, která byla pozorována u maligních buněk s translokací mezi chromozomem 4 a 14 [57].

1.5.1. Mutace PSMB5

Mutace genu PSMB5, který kóduje $\beta 5$ podjednotku proteasomu, se vyskytuje u přibližně 20 % pacientů s mnohočetným myelomem (MM). Tato mutace je jedním z hlavních dosud známých mechanismů rezistence na BZ. Mutace *PSMB5* snižuje afinitu BZ k proteasomu a snižuje tak inhibiční účinek léčiva. Existuje několik typů mutací *PSMB5*, které se vyskytují u MM. Nejčastějším typem mutace je záměna jedné aminokyseliny v $\beta 5$ podjednotce a předčasné ukončení translace proteinu, čímž vzniká nefunkční proteasomová podjednotka [58, 59].

1.5.2. Autofagie a lysosomální degradace

Maligní plazmatické buňky jsou schopné aktivovat další mechanismy, které nahrazují funkci proteasomu. Mezi tyto mechanismy patří autofagie a lysosomální degradace proteinů. Autofagie je vedle cytosolické degradace proteinů v proteasomu hlavní mechanismu pro odbourávání nahromaděných nefunkčních proteinů prostřednictvím lysosomu [60]. U MM a jiných nádorových onemocnění se objevily důkazy, že k vývoji rezistence může přispívat autofagie v závislosti na HMGB1 proteinu (high mobility group box 1) [55, 61].

1.5.3. Aktivace alternativních proteolytických drah

Dalším způsobem je aktivace alternativních proteolytických drah například kalpainy nebo katepsiny, které rozkládají bílkoviny nezávisle na proteasomech. To jim umožňuje přežít, i když jsou proteasomy blokovány karfilzomibem. Kalpainy jsou skupinou proteáz, které hrají roli v aktivaci a degradaci proteinů regulujících buněčný cyklus, jako je cyklin B a p27. Dále štěpí proteiny zapojené do apoptózy, čímž napomáhají řízené buněčné smrti, podílejí se na zánětlivé odpovědi štěpením zánětlivých cytokinů a chemokinových receptorů. [62]

1.5.4. Aktivace signálních drah NF- κ B

Signální dráha NF- κ B hraje klíčovou roli v rozvoji a progresi MM. Jedná se o komplexní dráhu, která reguluje expresi mnoha genů zapojených do zánětu, proliferace buněk, přežití buněk a imunitní odpovědi. U MM je dráha NF- κ B konstitutivně aktivována, což znamená, že je aktivní i v nepřítomnosti vnějších stimulů. To přispívá k růstu a přežití nádorových buněk a potlačuje imunitní systém, čímž umožňuje myelomovým buňkám vyhnout se destrukci. Existuje několik mechanismů, které vedou k aktivaci dráhy NF- κ B u MM. První je mutace v genech regulujících NF- κ B nebo abnormální mikroprostředí nádoru, protože je bohaté na faktory, které aktivují dráhu NF- κ B, jako je TNF- α a IL-1 β . Aktivace dráhy NF- κ B u MM má řadu negativních

důsledků. Například reguluje expresi genů Bcl-2 a cyklin D1, které přispívají k expanzi buněk MM. Některé terapeutické strategie se na inhibici dráhy NF-κB zaměřují [63, 64].

1.6. Využití proteomických metod pro výzkum rezistence MM

Soubor proteinů včetně proteinových funkcí a interakcí v daném okamžiku u dané tkáně či buňky je definován jako proteom [65]. Na rozdíl od souboru všech genů, tzv. genomu, proteom odráží aktuální stav buňky, nebo tkáně. Změny hladin proteinů, či jejich posttranslačně modifikovaných forem, jsou tak přímou odpovědí na probíhající onemocnění nebo jiné podněty např. vývoj rezistence na aplikované léčivo. Změny v proteomu mapuje biochemický obor, který se nazývá proteomika a která tak rozšiřuje další „omické“ vědy, genomiku, transkriptomiku a metabolomiku [66]. Proteomické metody představují řadu přístupů od afinitní reakce specifických protilátek po hmotnostní spektrometrii a mohou být využity např. pro identifikaci proteinů, které sehrávají důležitou roli v patogenezi (nejen) nádorových onemocnění a mohou představovat zajímavé cíle pro léčbu. Široké uplatnění nejen v základním výzkumu, ale i v klinické praxi, našly zejména proteomické metody využívající afinitní vazbu specifické protilátky na zkoumaný protein. V tomto případě se jedná o cílené proteomické metody a příkladem může být detekce monoklonálních protilátek a FLC v séru pacienta s MM metodou imunofixace [67].

Ve 20. století došlo k rychlému rozvoji hmotnostní spektrometrie (MS), která se velmi rychle stala moderním proteomickým nástrojem pro globální identifikaci a stanovení hladin tisíce proteinů v jedné analýze. Globální mapování proteinů pomocí MS je tedy skvělým nástrojem pro výzkum tak heterogenního onemocnění, jakým je i MM. V současné době je již hmotnostní spektrometrie využívána pro detekci monoklonálních protilátek a FLC v séru pacienta pro citlivější monitorování MRD u MM, tzv. miRAMM [68]. Širšímu uplatnění MS v diagnostice MM ale stále brání poměrně velké finanční nároky na přístrojové vybavení, náročné postupy pro vyhodnocení dat a časově náročný vývoj MS metod. Na druhou stranu omické metody spojené s hmotnostní spektrometrií jsou dnes nedílnou součástí výzkumu nádorové rezistence u MM [69].

Inhibice proteasomu je stále jeden z hlavních terapeutických cílů při léčbě MM [70] zároveň ale bylo v řadě publikací prokázáno, že maligní plazmatické buňky jsou schopné se bránit účinkům i pokročilých inhibitorů proteasomu (bortezomib a karfilzomib) [71, 72, 73]. Globální proteomické mapování pomocí MS představuje možnost, jak lépe porozumět mechanismům,

keré v maligních plazmatických buňkách probíhají v reakci na proteasomové inhibitory a otevírá cestu pro identifikaci klíčových proteinů, které jsou v mechanismech rezistence MM zahrnuté.

1.7. Identifikace a kvantifikace proteinů pomocí hmotnostní spektrometrie

Proteiny lze pomocí hmotnostního spektrometru identifikovat a kvantifikovat dvěma přístupy. Jedním z nich je proteomická MS analýza intaktních proteinů, tzv. top-down. Příkladem je již zmíněná miRAMM technika analýzy intaktních těžkých řetězců protilátek a FLC [74]. Druhým přístupem je tzv. bottom-up proteomická analýza, která identifikuje a kvantifikuje prostřednictvím peptidů, které jsou produktem enzymatického štěpení původních proteinů [75]. Enzymatickým štěpením, např. trypsinem, vznikají stovky tisíc peptidů, které je třeba rozlišit v hmotnostním analyzátoru, proto je před MS předřazena separace peptidů pomocí kapalinové chromatografie (LC-MS) [76]. V této diplomové práci byl mapován komplexní proteom modelových buněk MM, proto byla použita vícedimenzionální kapalinová chromatografie [77]. Nejdříve byly připravené vzorky rozděleny na frakce na reverzní fázi v bazickém prostředí, poté byla každá frakce znovu chromatograficky rozdělena na reverzní fázi v kyselém prostředí a eluované peptidy byly postupně uvolňovány z analytické kolony do ionizačního zdroje hmotnostního spektrometru. Chromatografická separace ve druhé dimenzi probíhala při průtoku mobilní fáze v řadu stovek nl/min (nanoLC-MS) za použití kapilárních kolon. nanoLC-MS je v proteomické analýze pevně zakotvena zejména pro nízké nároky na množství vzorku [78].

1.8. Hmotnostní spektrometr Orbitrap Exploris 480

Hmotnostní spektrometrie je fyzikálně-chemická metoda, která rozlišuje ionty na základě poměru jejich hmotnosti a náboje (m/z) [79]. Výstupem je grafický záznam relativní intenzity naměřených iontů na hodnotách m/z , hmotnostní spektrum. Po eluci v gradientu mobilní fáze s vyšším procentem organického rozpouštědla (acetonitrilu) získávají původně neutrální molekuly náboj ionizací elektrosprejem [80] a jsou nastříkovány přes vstupní kapiláru do hmotnostního spektrometru, kde jsou poté detekovány v hmotnostním analyzátoru. Exploris 480 je hybridní hmotnostní spektrometr, který využívá dva typy hmotnostního analyzátoru, kvadrupól a specifický typ iontové pasti, tzv. orbitrap [81]. Funkcí kvadrupólu je v tomto případě selekce iontů o předem definovaném rozsahu m/z , které prochází dále do orbitální pasti

[82]. Předností toho hmotnostního spektrometru je vysoké rozlišení hmot a vysoká frekvence skenování, díky tomu je možné kvantifikovat v jednom vzorku několik tisíc proteinů.

1.9. Izobarické značení peptidů Tandem Mass Tag

Pro kvantifikaci proteinů bylo v této diplomové práci použito izobarické značení peptidů Tandem Mass Tag (TMT). [83], které se používá ke kvantifikaci proteinů ve více vzorcích současně. TMT značky jsou malé molekuly, které jsou složeny ze tří částí; vazebné skupiny, balanční skupiny a reportéru. Vazebná skupina (NHS-ester) se váže na primární amin na peptidovém N-konci nebo na lysinu. Balanční skupina balancuje hmotnost reportérových iontů, které mají odlišnou hmotnost. Každý vzorek je tedy „označen“ odlišnou TMT značkou a poté se všechny vzorky mohou smíchat do tzv. „multiplexu“ a provést nástřik multiplexu do (nano) LC systému. Hladina peptidů je poté stanovena na základě intenzity reportérových iontů, které se odštěpí při fragmentaci peptidových prekurzorů (MS/MS). K fragmentaci peptidových iontů dochází při tzv. tandemové hmotnostní spektrometrii, kdy kolizí s molekulami inertního plynu zaniká peptidová vazba v původním prekurzoru a vznikají tzv. fragmentační spektra, která obsahují hmoty vzniklých fragmentových iontů. Fragmentační spektra jsou potom základem pro identifikaci původních proteinových sekvencí ve vzorku.

2. Cíle práce

Prvním cílem diplomové práce byla kultivace UHKT-944 buněčné linie rezistentní na bortezomib a karfilzomib. Druhým cílem diplomové práce byla globální proteomická analýza (nanoLC-MS/MS) proteomu rezistentních buněk s cílem odhalit proteiny, které mohou hrát v mechanismu rezistence MM důležitou roli a na které by se v budoucnu mohl zaměřit další výzkum jako na slibné terapeutické cíle pro léčbu MM.

3. Experimentální část

Spotřební materiál

- 96-jamková mikrotitrační deska Optical Btm Plt (kat. č. 165305; Thermo Sci Nunc)
- 96-jamková mikrotitrační deska (kat. č. 92096, TPP Techno Plastic Products, Trasadingen, Švýcarsko)
- Mikrotitrační deska PCR (kat. č. P781364, Brand, Wertheim, Německo)
- Pipetovací špičky Eppendorf (Eppendorf, Leipzig, Německo)
- Pipetovací špičky s filtrem AHN (AHN Biotechnology GmbH, Nordhausen - Německo)
- Pipety Eppendorf Reference 2 (Eppendorf, Leipzig, Německo)
- Mikrozukmavky Eppendorf (Eppendorf, Leipzig, Německo)
- Kultivační láhve TPP75 (kat. č. 90078, TPP Techno Plastic Products, Trasadingen, Švýcarsko)
- Kultivační láhve TPP25 (kat. č. 90028, TPP Techno Plastic Products, Trasadingen, Švýcarsko)
- Sérologické pipety 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml (kat. č. 95002, 91005, 91010, 91025, SPL Life Science, Gyeonggi-do, Korejská republika)
- PipetMan (kat. č. 26351, Accu Jet Brand, Wertheim, Německo)
- Centrifugační zkušavky, 15 a 50 ml Falcon tube (kat. č. 91014, 91054, TPP Techno Plastic Products, Trasadingen, Switzerland)
- Kryozkušavky (kat. č. 89020, TPP Techno Plastic Products, Trasadingen, Švýcarsko)

Komerční soupravy

- Resazurin Assay Kit (kat. č. ab129732, Abcam, Cambridge, Velká Británie)
- MicroBCA Protein Assay Kit (kat. č. 23235, ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)
- Peptide Fluorimetric Assay (kat. č. 23290, ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)
- TMT10plex Label Reagent Set (kat. č. 90110, Lot Number WL320956, ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)
- Peptide Desalting Spin Columns (kat. č. 89852, Pierce, ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)
- RNeasy Mini Kit 250 (kat. č. 172021179, Qiagen, Hilden, Německo)
- Reverse Transcription Kit High Capacity cDNA (kat. č. 4368814, ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)
- Gene Expression Assays (kat. č. 4331182, TaqMan, ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)
- MasterMix (kat. č. 4440040, TaqMan, ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)

- Primery (kat. č. 4331182, TaqMan, Life Technologies, ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)
 - CASP3 (HS00234387)
 - PSME1 (HS00389210)
 - TXN (HS01555214)
 - TBP (HS00427620)

Chromatografické kolony

- XBridge BEH, C18, 2,5 um, 2,1 mm x 150 mm (kat. č. 186006709, Waters, Milford, USA)
- Acclaim PepMap, C18, 75µm x 250 mm (kat. č. 164941 ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)
- PepMap Viper, C18, x 20 mm (kat. č. 164946, ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)

Přístrojové vybavení

- Exploris 480 (ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)
- Ultimate 3000 RSLC nano (ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)
- Ultimate 3000 RSLC (ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)
- Tecan Spark
- Stolní centrifuga UNIVERSAL 320 / 320R (Hettich)
- Inverzní mikroskop
- Inkubátor Forma Direct Heat CO₂ (ThermoScientific)
- Laminární box HF Safe 1200 (Heal Force)
- ThermoMixer C (Eppendorf)
- Kolektor frakcí (FC204, Gilson)
- LightCycler 96 Real-Time PCR System
- Navios 10 (Beckman Coulter, Brea, Kalifornie, USA)

Chemikálie a rozpouštědla

- Karfilzomib, 5 mg (kat. č. HY-10455, MedChem Express, NJ, USA)
- Bortezomib, 5 mg (kat. č. HY-10227, MedChem Express, NJ, USA)
- RPMI Medium 1640 (kat. č. 61870-010, Gibco, Waltham, Massachusetts, USA)
- Antibiotic Antimycotic Solution (100×), 20 ml (kat. č. A5955, Sigma Aldrich, Darmstadt, Německo)
- Fetální hovězí sérum (FBS, kat. č. 16629525, Gibco, Waltham, Massachusetts, USA)

- Dimethylsulfoxid (DMSO, kat. č. D8418, Darmstadt, Německo)
- Albumin Standard 2mg/ml (kat. č. 23210, ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)
- Voda, LC – MS Grade, 1 L (kat. č. 34967-1L-R, Honeywell, Charlotte, Severní Karolína)
- Tris(2- carboxyethyl)phosphine hydrochlorid (TCEP, kat.č. C4706-2G, Sigma Aldrich, Darmstadt, Německo)
- S-Methyl methanthiosulfonát (MMTS, kat. č. 64306-1ML, Sigma Aldrich, Darmstadt, Německo)
- Isopropanol LC-MS grade (kat. č. 34965, Honeywell, Charlotte, Severní Karolína)
- Aceton LC-MS grade (kat. č. 34850, Optima)
- Trypsin/Lysin-C Mix (kat. č. 527608, Promega, Fitchburg, USA)
- Triethylammonium bicarbonate, 1M roztok (TEAB, kat. č. 90114 ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)
- Benzonase Nuclease (kat. č. E1014, Merck, Sigma Aldrich, Darmstadt, Německo)
- Deoxycholát sodný (kat. č. S1827 SDC, Sigma Aldrich, Darmstadt, Německo)
- Kyselina trifluoroctová LC-MS Grade 50 ml (TFA, 5183, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)
- Acetonitril LC-MS, 1l (AcN, kat.č. 34967-1l-R Honeywell, Charlotte, Severní Karolína)
- Methanol LC-MS, 2.5 l (MeOH, kat. č. 858.320, HiPerSilv Chromanorm, Pensylvánie, USA)
- Hydroxid amonný, 28 %, (NH₄OH, kat.č. 338818-100ML Sigma Aldrich, Darmstadt, Německo)
- Kyselina mravenčí LC-MS Grade, 98% -100%, 50 ml (FA, kat. č. 5330020050 LC-MS LiChropurTM, Burlington, Massachusetts, USA)

Programové vybavení

- Perseus software platform v.2.0.6.0 (freely available at <https://maxquant.net/perseus/>)
- R v. 3.6.3 (CRAN, freely available at <https://cran.r-project.org/>)
- RStudio v. 2023.12.1 (Posit Software, Boston, MA, USA, freely available at <https://www.rstudio.com/>)
- GraphPad Prism v. 10 (GraphPad Software, Boston, MA, USA)
- Chromeleon CDC system v. 7 (Thermo Fisher Sci, Waltham, MA USA)
- Gilson GSIOC
- Proteome Discoverer v. 3.0 (Thermo Fisher Sci, Waltham, MA USA)
- String database (<https://string-db.org/>)
- Biorender
- LightCycler 96 v. 1.1.0. 1320 (Roche Diagnostics, Basilej, Švýcarsko)
- Kaluza C, v. 1.1. (Beckman Coulter, Brea, Kalifornie, USA)

3.1. Analýza fenotypu, kultivace a zamražení buněk UHKT-944

Buněčná linie UHKT – 944 byla získána z Ústavu hematologie a krevní transfuze v Praze [84]. V rámci s Ústavem klinické imunologie a alergologie FNHK byl ověřen fenotyp pomocí průtokové cytometrie (FC) stanoven fenotyp této linie. Pozitivní frakce CD138⁺ PCs byla promyta PBS, a byla inkubována s fluorochromem značeným monoklonálními protilátkami proti vybraným molekulám CD (CD138, CD38, CD19, CD27, CD56, CD20, CD45, CD117) po dobu 15 min při pokojové teplotě. Suspenze byla odstředěna a pelety resuspendovány ve fyziologickém roztoku. Čistota CD138⁺ frakce byla stanovena pomocí průtokového cytometru Navios 10 a data vyhodnocena v Kaluza C, verze 1.1. Buněčná linie 944 byla uchovávána v kultivačním médiu RPMI 1640.

Buňky byly kultivované v médiu RPMI 1640 s přidavkem 10% FBS a směsí antibiotik (pen/strep) a antimykotik. Buňky byly pasážovány každý 5. – 7. den. V laminárním boxu byla buněčná suspenze převedena do zkumavky Falcon (50 ml) a stočeny v centrifuze po dobu 5 minut při rychlosti 350 g. Peleta byla resuspendována v 10 ml čistého média, následně bylo odebráno 10 µl buněčné suspenze do mikrozkušavky, do které bylo rovněž přidáno 10 µl trypanové modře, suspenze byla promíchána a v Bürkerovy komůrce byly spočítány živé buňky v 25 čtvercích dle následujícího výpočtu:

Do nové kultivační láhve bylo přidáno 2×10^6 buněk ve 20 ml kult. média. Kultivační médium odebrané od pelety při pasážování buněk bylo odebráno do čisté zkumavky a buněčná drť (debris) byla odstraněna centrifugací (4000 ot/min, 15 min.). Postup byl dvakrát zopakován a médium bylo následně uchováno jako kondicionované.

V případě potřeby, byly buňky dlouhodobě uchovávány v mrazícím médiu o složení 5 % DMSO a 95 % FBS. Peleta obsahující počet buněk $5 - 10 \times 10^6$ /ml byla resuspendována, přenesena do kryozkušavky a uložena v boxu do mrazáku (-80 °C) po dobu maximálně 5 dnů. Poté byly zkumavky přeneseny do tekutého dusíku.

3.2. Stanovení výchozí koncentrace inhibitorů proteasomu pro kultivaci rezistentní linie UHKT-944

Výchozí koncentrace inhibitorů proteasomu pro kultivaci rezistentní linie UHKT-944 byla stanovena na základě stanovení citlivosti UHKT-944 na oba inhibitory pomocí resazurinové eseje. Do každé jamky mikrotitrační desky bylo odebráno 2×10^4 buněk v objemu 75 μ l. K tomuto objemu jsem pipetovala 25 μ l příslušného inhibitoru (CF nebo BZ) se vzrůstající koncentrací 0 – 15 nM. Po 20 hodinové inkubaci v při 37 °C jsem přidala 100 μ l resazurinu a po 4 hodinách byl stanoven počet živých buněk na základě intenzity fluorescence produkovaného resorufinu (EX 530 nm /EM 590 nm). Na základě získaných dat byla v programu GraphPad Prism stanovena hodnota inhibiční koncentrace (IC_{50}).

3.3. Kultivace rezistentní UHKT-944

Inhibitory proteasomu BZ a CF byly k UHKT-944 buňkám přidávány v pravidelných týdenních cyklech reflektující standardní léčebný postup u MM. Inhibitory byly přidávány k buňkám v koncentraci 3nM (BZ) a 7 nM (CF) po dobu 4-5 týdnů s odstupem min. 5 dnů. K1 milionu buněk v objemu média 5 ml bylo přidáno 50 μ l inhibitoru o stanovené koncentraci. Po 24 hodinách byly buňky pasážovány do 2,5 ml čistého media s přídavkem 2,5 ml kondiciovaného média. Po 4 – 5 týdnech byla stanovena citlivost buněk na oba inhibitory.

Na základě dosažených pilotních výsledků byl postup poté upraven. Bortezomib byl k buňkám podáván po dobu 21 dnů ve dnech 1, 4, 8 a 11, Karfilzomib byl podáván po dobu 28 dnů ve dnech 1, 2, 8, 9, 15 a 16. Inhibitory byly podávány k 1 milionu buněk v 5 ml, nicméně zde působil pouze 1 hodinu. Poté byly buňky pasážovány do čistého media o složení 75 % nové médium, 25 % kondiciované médium.

3.4. Příprava buněčného lyzátu

Pro přípravu buněčného lyzátu bylo odebráno kultivační médium s 1×10^6 buněk. Po centrifugaci (5 minut, 300 g) byl odtažen supernatant a k peletě bylo přidáno 100 μ l lyzačního pufru (3 % SDC rozpuštěný v 200 mM TEAB). Buňky byly lyzovány 5 minut při 65°C. DNA byla naštěpena přidáním 0,5 μ l benzonasy nukleasy Po dobu 5 minut byly zkumavky ponechány v ultrazvukové lázni a po centrifugaci (stočíme p,10 000 g, 2 min.) byl supernatant zamražen na – 80°C.

3.5. Stanovení celkové koncentrace proteinů

Pro stanovení celkové koncentrace proteinů v buněčném lyzátu byla použita komerční MicroBCA esej. Byla připravena kalibrační křivka v rozmezí 0, 5, 10, 20, 30, 40 a 50 µg/ml BSA. Všechny body kalibrační křivky byly připraveny v 1.34 mM TEAB, aby byla zachována srovnatelná koncentrace TEAB ve vzorcích po naředění. Do mikrotitrační desky bylo v triplicátech pipetováno 150 µl kalibračních standardů. Z každého vzorku byl odebrán 1 µl do 149 µl vody. Ke vzorkům i kalibračním standardům byla přidána kyselina bicinchoninová, Cu²⁺ ionty a alkalický pufr v poměru doporučeném výrobcem a celkovém objemu 150 µl na jamku. Po inkubaci po dobu 30 min, při 37 °C (450 rpm) byla odečtena absorbance při 562 nm na spektrofotometru Tecan. Koncentrace proteinů v každém vzorku byla odečtena z rovnice lineární regrese v program GraphPad.

3.6. Enzymatické štěpení proteinů

Z každého vzorku bylo odebráno 25 µg proteinů. Objemy všech vzorků byly doplněny lyzačním pufrům na objem 20 µl. Každý vzorek (kontrolní UHKT-944, UHKT-944 rezistentní na 3nM BZ, 9nM CF a 12 nM CF) byl připraven v triplicátu (tabulka č. 1). Ke každému vzorku bylo přidáno 4,44 µl 50 mM TCEP pro redukci cystinových můstků (5 mM TCEP) po dobu 30 minut při 37°C. Volné sulfhydrylové skupiny byly alkylovány přidáním 2,34 µl MMTS naředěným v isopropanolu. Alkylace probíhala 15 minut při pokojové teplotě. Ke vzorkům bylo dále přidáno 280,7 µl 100% aceton pro odstranění nadbytku alkylačního činidla proteinovou precipitací přes noc při teplotě -20°C. Vzorky byly poté centrifugovány (12 000 g, 5 min.), supernatant byl odtážen od pelety a zbytky acetonu byly odpařeny ve vakuové odparce po dobu 2 min. Takto připravené pelety byly rozpuštěny ve 100 mM TEAB a bylo přidáno 2,5 µl směsi enzymů lysinasaC a trypsin (1 µg) rozpuštěných ve 100mM TEAB. Štěpení proteinů probíhalo po přidání proteáz přes noc při 37°C.

3.7. Stanovení celkové koncentrace peptidů

Pro stanovení celkové koncentrace peptidů po enzymatickém štěpení byla využita fluorimetrická peptidová esej (Peptide Fluorimetric Assay). Nejprve byla připravena kalibrační řada v rozmezí 500, 250, 125, 62,5, 31,3, 15,6, 7,8 a 0 ng/µl peptidového standardu a 10 µl od každého kalibračního standardu bylo v duplikátu přidáno do mikrotitrační desky. Od každého vzorku bylo odebráno 2,5 µl a přidáno k 7,5 µl vody v každé jamce. Do každé jamky

bylo dále přidáno 70 μ l pufru a 20 μ l fluorimetrického činidla pro značení peptidů. Mikrotitrační destička byla inkubována 5 minut, při 450 ot/min. Intenzita fluorescence byla odečtena při Ex/Em 390nm/475 nm na spektrofotometru Tecan. Koncentrace peptidů v každém vzorku byla odečtena z rovnice lineární regrese v programu GraphPad.

3.8. Odsolení značených peptidů extrakcí na pevné fázi

Pro odstranění zbytku pufru, rozpouštědel a volných TMT značek byly použity komerční centrifugační kolonky plněné reverzní stacionární fází C18 (Peptide Desalting Spin Columns). Nejprve byl z kolonek odstraněn uchovávací pufr centrifugací po odbu 1 min, 5000 g. Poté bylo přidáno 300 μ l acetonitrilu (2x) pro aktivaci stacionární fáze. Acetonitril byl odstraněn centrifugací (5000 g, 1 min) a sorbent byl ekvilibrován přidáním 300 μ l (2x) 0.1% TFA a kolonky byly po vložení do čisté mikrozkušavky připravené pro nanášku vzorků. Peptidy byly nanášeny na reverzní C18 fázi centrifugací po dobu 1 minuty (3000 g) a vazebná frakce (flow-through) byla uchována. Po nanášení vzorku na kolonky a centrifugaci byly kolonky promyty 3x 300 μ l 0.1% TFA (3000 g, 1 min.). Pro odstranění případných zbytků nenavázaných TMT značek byly kolonky promyty 300 μ l roztokem 5% methanolu/0,1% TFA. Po promytí byly kolonky vloženy do čisté mikrozkušavky a peptidy byly z pevného sorbentu uvolněny přidáním 300 μ l 50% AcN/0.1% TFA (3000 g, 1 min.). Celý objem byl přepipetován do mikrozkušavky o objemu 0.6 ml, sorbent v kolonkách byl opět promyt 200 μ l elučního roztoku a celý objem byl přidán k předchozímu eluátu do stejné mikrozkušavky. Celý objem byl poté odpařen ve vakuové odparce do sucha.

3.9. Frakcionace značených peptidů na reverzní fázi v bazickém prostředí

Komplexní směs značených peptidů byla před proteomickou nanoLC-MS/MS analýzou rozdělena chromatografickou separací na reverzní fázi v bazickém prostředí NH_4FA do 24 frakcí. Tato frakcionace byla provedena na vysokotlakém kapalinovém chromatografu Ultimate 3000 RSLC jakožto součástí běžných proteomických LC-MS/MS analýz v Centru biomedicínského výzkumu, kde byla splněna praktická část této diplomové práce. Celý postup je proto v této diplomové práci popsána zjednodušeně, neboť frakcionace připravených TMT multiplexů byla součástí frakcionace větší sady vzorků a nebyla prováděna autorem diplomové práce. Pro frakcionaci připravených TMT multiplexů byl tedy využit již zavedený postup pro přípravu mobilní fáze, přípravu analytického systému, gradientovou eluci peptidů a sběr frakcí. Samotná frakcionace v bazickém prostředí byla provedena na chromatografické koloně

XBridge (C18, 2.1 mm x 150 mm), při průtoku 0.3 ml/min a teplotě 40°C. Vzorek byl nastříkovan do mobilní fáze A (2% AcN, 10 mM NH₄FA - pH 10) a komplexní směs peptidů byla chromatograficky rozdělena v gradientové eluci o délce 55.5 min s lineárním profilem od 2 do 52 % mobilní fáze B (80% AcN, 10 mM NH₄FA - pH 10). Frakce byly sbírány automaticky sběračem frakcí v rozmezí 3,7 min – 57,7 min každých 45 s do polypropylenové 96-jamkové mikrotitrační desky a následně přeskupeny do výsledných 24 frakcí. Každý takto rozdělený TMT multiplex byl odpařen do sucha a uchován pro následnou nanoLC-MS/MS analýzu.

3.10. Izobarické značení peptidů

Pro tento experiment byl použit kit pro izobarické značení peptidů v 10 různých vzorcích (TMT10plex Isobaric Label Reagent Set). Ke každé TMT značce bylo přidáno 40 µl acetonitrilu. Po inkubaci při pokojové teplotě (5 min) byly zkumavky s TMT značkami krátce centrifugovány (1500 rpm, 2 min). Ke každému vzorku byly přidány 2,5 µl 100 mM TEAB a 12,5 µl zvolené TMT značky (250 µg). Izobarické značení peptidů probíhalo 1 hodinu při 25 °C a otáčkách 500 rpm. Reakce byla ukončena přidáním 3 µl 5 % hydroxylaminu a inkubací celého objemu směsi 15 minut při 25 °C a 500 rpm.

Poté bylo 11 µg peptidů od každého vzorku smícháno do multiplexů dle tabulky č. 1. Objem každého vzorku byl stanoven na základě stanovení celkové koncentrace peptidů popsané v předchozí kapitole.

TMT 10	126	127 N	127 C	128 N	128 C	129 N	129 C	130 N	130 C	131
TMT BZ	Kontrola BZ 1	Kontrola BZ 2	Kontrola BZ-3	-	-	-	-	BZ-1 3nM	BZ-2 3nM	BZ-3 3nM
TMT CF	Kontrola CF 1	Kontrola CF 2	Kontrola CF 3	Treat CF 9nM 1	Treat CF 9nM 2	Treat CF 9nM 3	Treat CF 12nM 1	-	Treat CF 12nM 2	Treat CF 12nM 3

Tabulka č. 2 - Rozdělení značek ke vzorkům, do multiplexu

Každý multiplex byl odpařen ve vakuové odparce a rozpuštěn ve 300 µl 0.1 % TFA v H₂O (v/v).

3.11. Identifikace a kvantifikace proteinů v připravených vzorcích metodou nanoLC-MS/MS

Identifikace a kvantifikace proteinů byla provedena na základě získaných dat nanoLC-MS/MS analýzy každého TMT multiplexu, který byl nejdříve rozdělen na 24 frakcí, jak bylo popsáno v kapitole 5.9. Postup pro nanoLC-MS/MS analýzu je standardní součástí proteomických analýz v Centru biomedicínského výzkumu a metodu tedy nebylo nutné zavádět v rámci této diplomové práce. Chromatografická separace peptidů pro nanoLC-MS/MS analýzu byla provedena na přístroji Ultimate 3000 RSLCnano a akvizice MS spekter poté probíhala na hmotnostním spektrometru Exploris 480. Jednotlivé frakce byly rozpuštěny ve 2% AcN/0.1% TFA. Následně byl 1 µg vzorku nanášen na předkolonu PepMap (C18, 75 µm x 20 mm) v mobilní fázi (2% AcN/0.1% TFA), při průtoku 5 ml/min, po dobu 5 min, kde byl zachycen. Zachycené peptidy byly následně uvolněny a chromatograficky rozděleny gradientovou elucí na analytické koloně Acclaim (75 µm x 250 mm) při průtoku 250 nl/min. Gradientová eluce s lineárním profilem gradientu mobilních fází A (2% AcN, 0,1% FA) a B (80% AcN, 0,1% FA) s dvěma segmenty. První segment od 5 do 75 minuty odpovídal složení mobilní fáze 2 - 34,5% B a druhý segment od 75 do 85 minuty odpovídal složení mobilní fáze 34,5 – 45% B.

Peptidy byly po uvolnění z analytické kolony ionizovány nanoelektrosprejem v ionizačním zdroji při napětí 1.8 kV. Sběr dat probíhal na hmotnostním spektrometru Exploris 480 dle parametřů uvedených v tab. č. 2., což odpovídá standardním parametřům pro proteomickou analýzu TMT značených peptidů v Centru biomedicínského výzkumu

Základní parametry MS 1, MS 2	
Orbitrap resolution MS 1	60 000
FAIMS MS1	-45, -60 CV
Scan Range MS 1	350 -1400 m/z
Polarity	Positive mode
Orbitrap resolution MS 2	15 000
HCD (Collision energy)	35%
First Mass	110

Tabulka č. 3 - Nastavení základních parametrů metody MS pro peptidy označené TMT značkami

3.12. Vyhodnocení proteomických dat

3.12.1. Interpretace hmotnostních spekter

Pro vyhodnocení naměřených hmotnostních spekter byl využit program Proteome Discoverer v 3.0. Prostřednictvím platformy Proteome Discoverer byl pro charakterizaci spekter a prohledávání proteinových databází využit algoritmus Mascot. Spektra byla prohledávána proti referenční databázi lidských proteinů stažené z databáze Uniprot. Jako enzyme byl nastaven trypsin s max. počtem tzv missed cleavage 2, jako fixní modifikace byla nastavena alkylace sulfhydrylových skupin, TMT značení na lysinu a N-konci peptide, jako variabilní modifikace byla nastavena oxidace methioninu a acetylace N-konce proteinů. Pro každou TMT značku byly zadány příslušné korekční faktory deklarované výrobcem. Výstupem vyhodnocení byl seznam všech identifikovaných proteinů s vysokou hladinou spolehlivosti a intenzity reportérových iontů.

3.12.2. Komparativní analýza naměřených dat

Výsledky byly z programu Proteome Discoverer exportovány ve formátu textového souboru a nahrána do programu Perseus. Zde byly hodnoty intenzit reportérových iontů převedeny do $\log_2(x)$ formátu. Pro další vyhodnocení byly zachovány pouze ty proteiny, u kterých byly nalezeny alespoň dvě platné hodnoty intenzit reportérových iontů ve kontrolní skupině a zároveň skupině rezistentní na daný inhibitor. Výsledný soubor dat byl exportován v tabulkovém formátu a byla provedena diferenciativní expresní LIMMA analýza v programu R na základě skriptu, který byl autorce diplomové práce poskytnut konzultujícím školitelem.

3.13. Ověření získaných proteomických dat

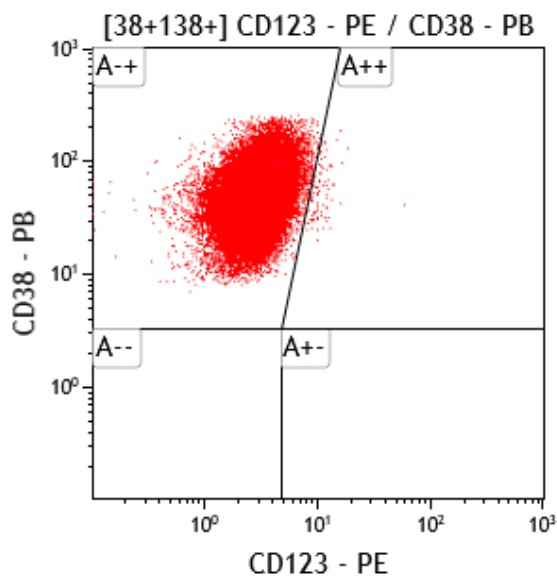
Získané proteomické výsledky byly ověřeny kvantifikací exprese vybraných genů metodou PCR. V prvním kroku byl pro izolaci RNA použita komerční souprava RNeasy Mini Kit. Přípravené buněčné pelety ($7,5 \times 10^5$ buněk) byly nejprve lyzovány ve 350 μ l lyzačního pufru a po krátkém promíchání bylo přidáno 350 μ l 70 % ethanolu. Celý objem byl přemístěn do centrifugačních kolonek, které byly součástí komerční sady, a izolace RNA byla provedena dle pokynů od výrobce. Následně byla stanovena koncentrace RNA na spektrofotometru Tecan při 260 nm. Byla rovněž sledována čistota izolované RNA na základě hodnot poměrů 260/280 nm a 260/230 nm. Poté byly všechny vzorky naředěny na nejnižší zjištěnou koncentraci RNA (97,5 ng/ μ l). Reverzní transkripce do cDNA byla provedena s použitím komerční soupravy

Reverse Transcription High Capacity dle pokynů výrobce. Bylo připraveno 100 μ l Master Mixu smícháním 20 μ l reakčního pufru, 8 μ l směsi nukleotidů, 20 μ l random primerů, 10 μ l reverzní transkriptázy a 42 μ l ultračisté vody pro PCR (nuclease-free). Na základě výsledků proteomické analýzy bylo vybrány primery pro thioredoxin (TXN), podjednotka komplexu aktivátoru proteazomu (PSME1), kaspáza 3 (CASP3). TATA-box vazebný protein (TBP) byl použit jako referenční (housekeeping) gen. Ke 20 μ l primeru bylo přidáno 380 μ l Master Mixu a všechny vzorky byly naředěny ultračistou vodou 5x do celkového objemu 100 μ l. Do každé jamky mikrotitrační desky určené pro PCR bylo přidáno 18 μ l primeru a 2 μ l vzorku. Všechny vzorky byly měřeny v dublikátu. Pomocí programu LightCycler 96 byl definován obsah mikrotitrační destičky a informace byly přeneseny do softwaru přístroje. Vyhodnocení dat po ukončení PCR reakce probíhalo v totožném program a data byla přenesena do tabulky excel, kde byla vypočítána fold change mezi kontrolami a příslušnými treatovanými buňkami pro každý zvolený gen.

4. Výsledky a diskuze

4.1. Analýza fenotypu a kultivace buněk UHKT-944

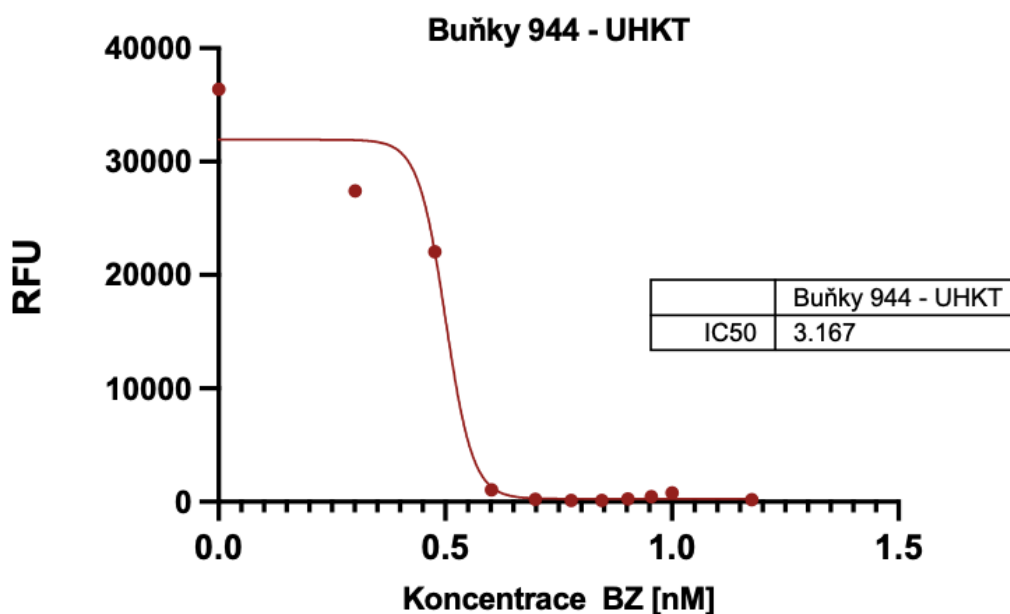
Fenotyp MM u získané buněčné linie UHKT – 944 [84] byl ověřen ve spolupráci s Ústavem klinické imunologie a alergologie FNHK. Na tomto pracovišti byla provedena MFC buněčné suspenze UHKT-944 buněk ve fosfátovém pufru a bylo potvrzeno, že buněčná linie UHKT-944 exprimuje povrchové CD znaky charakteristické pro maligní plazmatické buňky CD138+, CD38+, CD123- (Obr. č. 5). Pro další kultivaci buněk bylo zvoleno médium RPMI 1640 (Gibco) na základě informací získaných z literatury a ve spolupráci s UHKT v Praze. Kultivační médium obsahuje glutathion, biotin, vitaminu B12 a kyselina 4-aminobenzoovou, inositol a cholin. Do média bylo před kultivací přidáno 10 % fetální bovinní sérum (FBS) pro podporu růstu buněk [85] a antibiotikum streptavidin a penicilin, aby nebyly buňky během kultivace kontaminovány mykoplazmaty. K udržení fyziologického pH vyžaduje prostředí s 5-10 % CO₂, proto byly buňky v médiu vkládány vždy do inkubátoru s přístupem CO₂ a teplotě 37 °C. Buňky UHKT-944 rostly v kultivačním médiu poměrně stabilně a spíše pomaleji, proto byly pravidelně pasážovány přibližně po pěti dnech.



Obrázek č. 5- Stanovení fenotypu buněk UHKT-944 multiparametrickou průtokovou cytometrií.

4.2. Stanovení IC₅₀ u buněčné linie 944 – UHKT

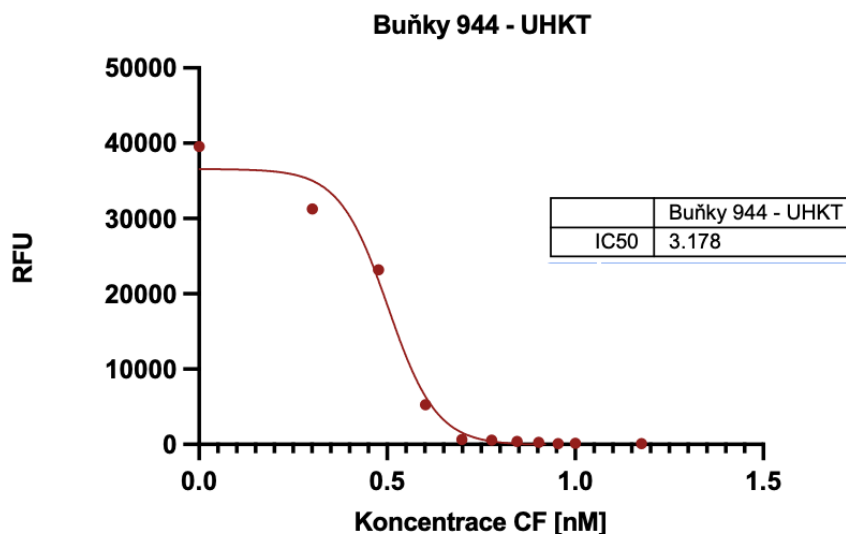
Tato diplomová práce navazuje na předchozí experimenty proteomické skupiny Centra biomedicínského výzkumu FNHK s cílem vyselektovat rezistentní buněčnou linii UHKT-944. Rezistentní UHKT-944 by poté bylo možné využít jako model pro studium mechanismů rezistence MM. Vzhledem ke stěžejní roli inhibitorů proteasomu při léčbě MM (viz kap. 2.4) a již známým mechanismům rezistence maligních plazmatických buněk (viz kap. 2.5) byly pro další experimenty v této diplomové práci vybrány inhibitory proteasomu BZ a CF. V první řadě byla stanovena koncentrace obou léčiv, při které dochází k úmrtí 50 % buněk (IC₅₀). IC₅₀ byla stanovena pomocí resazurinové eseje a znázorňuje citlivost UHKT-9444 buněk na bortezomib (Obr. č. 6) a karfimizomib (Obr. č. 7).



Obrázek č. 6 - Stanovení citlivosti UHKT-944 buněk na bortezomib.

Bylo provedeno stanovení citlivosti UHKT-944 buněk na bortezomib v koncentrační řadě od 0 do 15 nM (Obr. č. 6). Jako hodnota IC₅₀ byla stanovena koncentrace BZ 3,167 nM. Na základě těchto výsledků byla zvolena 3 nM koncentrace BZ jako výchozí pro kultivaci rezistentní UHKT-944 linie.

Obdobným způsobem byla stanovena hodnota IC_{50} pro CF (obr. č. 7).



Obrázek č. 7 - Graf Resazurin Assay, stanovení IC_{50} , karfilzomib

Hodnota IC_{50} u CF byla stanovena při koncentraci 3,178 nM ovšem při předchozích experimentech, které předcházely této diplomové práci, se tato hodnota pohybovala okolo 7nM. Rozdílné výsledky byly pravděpodobně způsobeny nestabilitou CF během dlouhodobém zamražení při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. V předchozích experimentech byla použita zbytková léčiva již naředěna ve fyziologickém roztoku pro podání pacientům. Tento naředěný objem CF byl zamražen a uchován pro další experimenty, což mohlo vést k degradaci CF a snížení citlivosti UHKT-944. V rámci této diplomové práce byla proto používány komerčně dostupné inhibitory proteasomu ředěné v dimethylsulfoxidu (DMSO). Bylo provedeno srovnání účinků dlouhodobě zamraženého a čerstvě připraveného CF opět pomocí resazurinové eseje, ale nebyl prokázán významný rozdíl, proto byla pro další kultivaci UHKT-944 buněk rezistentních na CF použita 7 nM koncentrace.

4.3. Kultivace rezistentní UHKT-944 linie

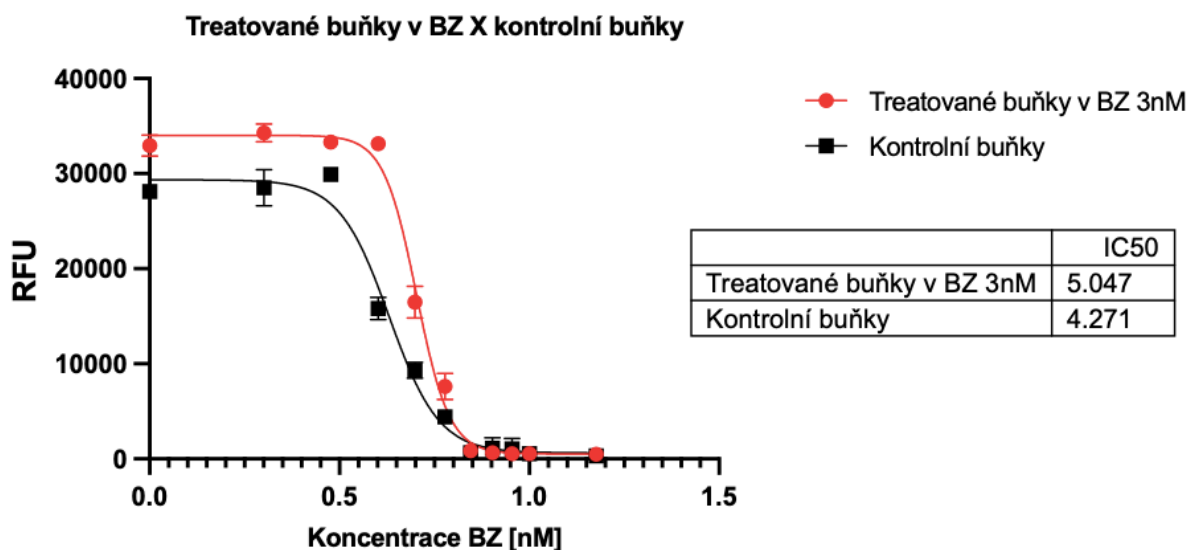
Podkladem pro další postup byla snaha o simulaci léčebného postupu u pacientů. Základním předpokladem byl pravděpodobný vývoj buněčné rezistence po kultivaci buněk v prostředí BZ a CF po dobu 4 - 5 týdnů. Po této době jsme očekávali, že bude možné sledovat změny v proteomu takto kultivovaných buněk. V průběhu diplomové práce byl ale process upravován na základě aktuálních výsledků. UHKT-944 buňky byly pro tyto experimenty kultivovány v 50 % čistého média RPMI 1640 a 50 % kondiciovaného média. V tomto médiu byly obsaženy

interleukiny, které si buňky samy během růstu vytvořily a pro treatované buňky sloužily pro regeneraci. Kondiciované médium bylo vždy ponecháno před použitím několik dní v inkubátoru, aby bylo možné včas odhalit případnou kontaminaci mykoplazmaty.

V první fázi, kdy byly buňky kultivovány v prostředí 3 nM BZ nebyl pozorován žádný rozdíl v růstu buněk oproti kontrolní linii, zatímco v prostředí 7 nM CF buňky nebyly schopné přežít vůbec. Po 3. cyklu (3. týden) byla zvýšena koncentrace BZ (6 nM) a experiment s CF byl ukončen po 4. cyklu, neboť nebyly pozorovány žádné živé buňky. Na základě těchto výsledků jsme potvrdily, že CF je jako léčivo účinnější. Dalším faktorem, který ovlivnil výsledek, byl ale také počet cyklů podání inhibitorů. Po 3. cyklu UHKT-944 buňky přeživaly, nicméně po 4. dávce nepřežila buňka žádná. Stejný výsledek přinesl i experiment kultivace UHKT-944 v 6 nM BZ.

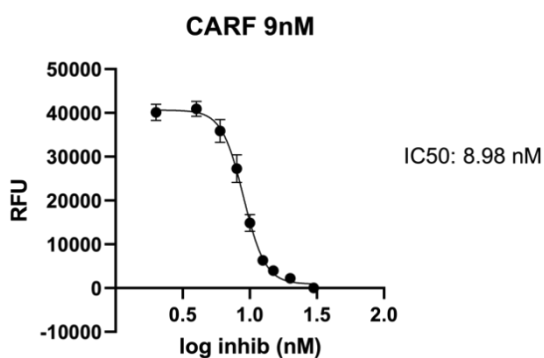
Pro další experiment byl upraven postup pro přidávání inhibitorů k buňkám. Bortezomib byl přidáván k buňkám po dobu 21 dnů ve dnech 1, 4, 8 a 11. Karfilzomib po dobu čtyř týdnů ve dnech 1, 2, 8, 9, 15 a 16. UHKT-944 buňky byly s léčivou inkubovány pouze po dobu jedné hodiny. V první fázi experiment trvala inkubace buněk v prostředí léčiv 24 hodin. Tento postup se ukázal jako vhodnější pro dlouhodobé udržení buněk v prostředí PI a bylo již možné pozorovat snížení citlivosti UHKT-944 buněk na BZ a CF. Vzhledem k časové náročnosti experimentů byly pro další experiment získány buněčné linie, u kterých byla prokázána snížená citlivost na 9 nM a 12 nM CF ve spolupráci s Dr. Monikou Schmidt z Univerzity Hradec Králové. Z těchto buněk byly připraveny lyzáty pro nanoLC-MS/MS analýzu. Dále byly tyto „rezistentní“ UHKT-944 buňky použity pro kultivaci ve vyšší koncentraci CF (18 nM a 24 nM,) nicméně tento postup nebyl úspěšně dokončen z důvodu úmrtnosti buněk. Na základě získaných zkušeností a konzultace s Dr. Schmidt byl proveden v rámci diplomové práce nový experiment kultivace UHKT-944 buněk v 9 nM CF.

4.4. Stanovení IC₅₀ u rezistentní UHKT-944 linie

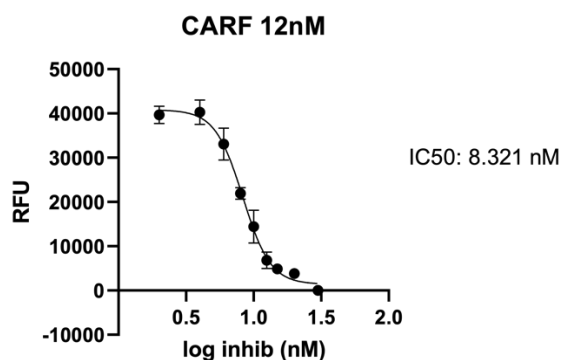


Obrázek č. 8 - Graf Resazurin Assay, stanovení IC₅₀, Bortezomib

Po ukončení experimentu kultivace UHKT-944 v prostředí PI byla ověřena citlivost buněk na obě léčiva. Pomocí resazurinové esejí byla opět stanovena IC₅₀ u buněk kultivovaných v médiu s přidavkem 3 nM BZ (Obr. č. 8) a 9 nM, 12 nM CF (Obr. č. 9 a 10).



Obrázek č. 9 - Citlivost UHKT-944 na 9 nM CF, stanovení IC₅₀



Obrázek č. 10 - Citlivost UHKT-944 na 12 nM CF, stanovení IC₅₀

Výsledky všech tří stanovení prokázaly snížení citlivosti UHKT-944 buněk v porovnání s kontrolní linií a z těchto buněk byly připraveny lyzáty pro proteomickou nanoLC-MS/MS analýzu.

4.5. Stanovení celkové koncentrace proteinů a nastavení metody pro nanoLC – MS/MS

Celková koncentrace proteinů v připravených lyzátech byla stanovena spektrofotometricky metodou microBCA. Na základě výsledků (tabulka č. 4) pak bylo pro nanoLC-MS/MS analýzu odebráno stejné množství proteinů v každém vzorku (25 µg), aby nedošlo ke zkreslení výsledků při stanovení hladin proteinů v proteomickém experimentu.

Vzorek	Koncentrace µg/µl
Bortezomib 3 nM	2
Kontrola (pro BZ)	2,04
Karfilzomib 9 nM	3,83
Karfilzomib 12 nM	3,2
Kontrola (pro CF)	3,03

Tabulka č. 4 - Naměřené koncentrace vzorků metodou microBCA

Stěžejním bodem pro kvantifikaci proteinů bylo značení pomocí TMT značek, jejichž použití bylo nutné zahrnout do LC-MS/MS metody (viz kap. 6.10). Pro tzv. first mass, neboli nastavení spodní nejnižší hranice m/z pro fragmentaci (MS/MS) [86] bylo zvolena hodnota 110 m/z , aby bylo možné detekovat celý rozsah TMT značek (126 – 131 m/z). Hodnota kolizní energie byla nastavena na vyšší hodnotu (35 %) pro efektivnější fragmentaci značených peptidů [87]. Další nastavení metody pro nanoLC-MS/MS bylo převzato ze zavedených LC-MS/MS metod pro proteomické analýzy prováděné v Centru biomedicínského výzkumu a na základě doporučení výrobce (Thermo Fisher Scientific).

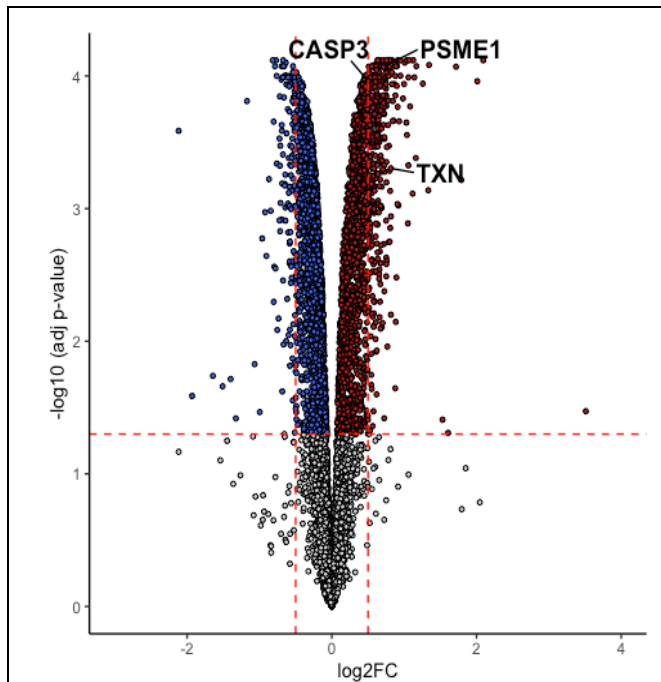
4.6. nanoLC-MS/MS analýza proteomu rezistentních UHKT-944

Interpretace získaných spekter byla provedena v platformě Proteome Discoverer. Tato platforma je široce využívána pro vyhodnocení proteomických dat a výstupem je seznam identifikovaných proteinů a jejich relativní kvantifikace. Identifikace proteinů je provedena na základě porovnání fragmentačních spekter a proteinové databáze, do kterých jsou zaneseny známé proteinové sekvence. Složení sekvence peptidů a poté i proteinů a prohledávání databází provádí tzv. search-engine algoritmus. V tomto případě byl využit program Mascot [88].

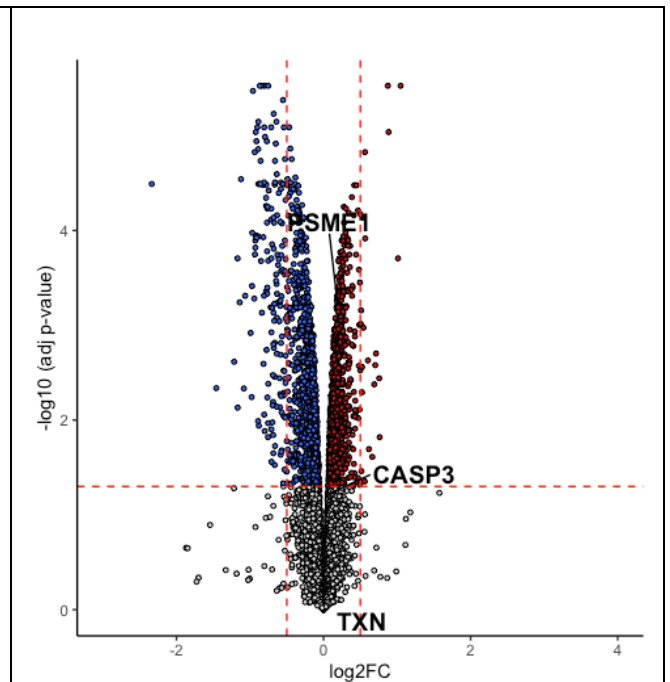
Proteiny UHKT-944 buněk byly v jednotlivých vzorcích kvantifikovány na základě relativních intenzit TMT značek, které byly stanoveny pro každý peptid. Podle hladiny peptidů unikátních pro každý identifikovaný protein byla tedy stanovena i relativní hladina každého proteinu v každém vzorku [89]. Data byla dále importována do programu Perseus, ve kterém byly kvantifikační hodnoty pro každý protein převedeny do \log_2 formátu. Logaritmování dat je opět běžným postupem při vyhodnocení proteomických dat, neboť hladiny proteinů se mohou lišit i o několik řádů a logaritmizací je dosaženo normálního rozdělení dat. V programu Perseus byly také filtrovány proteiny s nízkým počtem validních hodnot. Přesto ale bylo možné kvantifikovat více než 6000 proteinů napříč všemi vzorky. Takto vysoký počet proteinů byl dosažen díky chromatografické separaci peptidů na reverzních fázích ve dvou různých dimenzích vysoké a nízké pH) a díky vysokému rozlišení a skenovací rychlosti hmotnostního spektrometru. Porovnání hladin proteinů v jednotlivých vzorcích bylo provedeno v programu R, který je dnes široce využíván právě pro vyhodnocení omických dat [90, 91]. Diferenciální analýza hladin proteinů v kontrolních buňkách a rezistentních liniích byla provedena pomocí tzv. LIMMA testu, který byl doporučen konzultantem diplomové práce. LIMMA test byl původně zaveden pro vyhodnocení genomických dat, ale je možné jej využít i v proteomice [92].

V případě UHKT-944 buněčné linie kultivované v prostředí 3.7 nM BZ jsme zjistili celkem 4 219 proteinů (Obr. č. 11), u kterých byla LIMMA testem prokázána signifikantní změna po Benjamin-Hochberg korekci p-hodnoty (FDR $q = 0.05$). [93] U buněk, ke kterým byl přidáván 9 nM CF, 2 207 proteinů (Obr. č. 12), u kterých byla změna vyhodnocena jako signifikantní porovnání s kontrolní buněčnou linií. Překvapivě, u buněk, ke kterým byl přidáván 12 nM CF jsme pozorovali změnu pouze u 288 proteinů při porovnání s kontrolní UHKT-944 linií (Obr. č. 13), ale při porovnání „9 nM a 12 nM CF“ jsme našli 2 301 změněných proteinů (Obr. č. 14). Změny velkého počtu proteinů v případě 3.7 nM BZ a 9 nM CF v porovnání s kontrolami ovšem byly relativně nízké. Velký počet signifikantních změn si proto vysvětlujeme jednak nízkou technickou variabilitou analýzy, což je další výhoda TMT kvantifikace, ale také absencí biologických replikátů. Každá podmínka (kontrola, BZ, CF) byla připravena pro proteomickou analýzu ve třech analytických replikátech, tj. z jedné buněčné pelety byly odebrány tři stejné alikvoty pro proteomickou analýzu. Data tedy nebyla zatížena biologickou variabilitou. Biologické replikáty nebyly do tohoto experimentu zařazeny jednak kvůli časové náročnosti kultivace rezistentních UHKT-944 buněk a z důvodu problémů, při hledání vhodného postupu pro kultivaci. Naopak nízký počet signifikantních změn u 12 nM CF

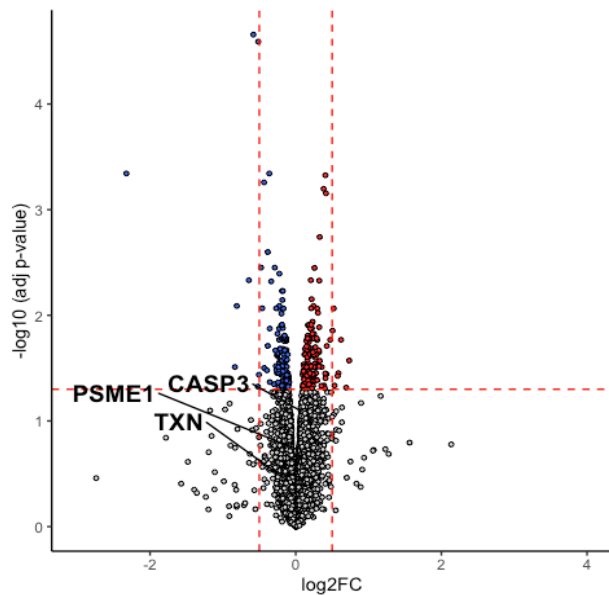
(vs. kontrola) (Obr. č. 13) by mohl být způsoben ztrátou rezistence UHKT-944 buněk, neboť zde byla delší časová prodleva mezi stanovením citlivost resazurinovou esejí a přípravou buněčné pelety. V této době byly buňky udržovány v kultivačním médiu bez přidané koncentrace CF a mohlo tedy dojít ke ztrátě rezistence. Dalším argumentem pro tuto hypotézu je velký počet signifikantních změn v porovnání s 9 nM CF (Obr. č. 14). Nicméně ověření těchto hypotéz přesahuje rámec diplomové práce, a proto bude předmětem navazujících experimentů, ve kterých již budou zahrnuty biologické replikáty jednotlivých podmínek.



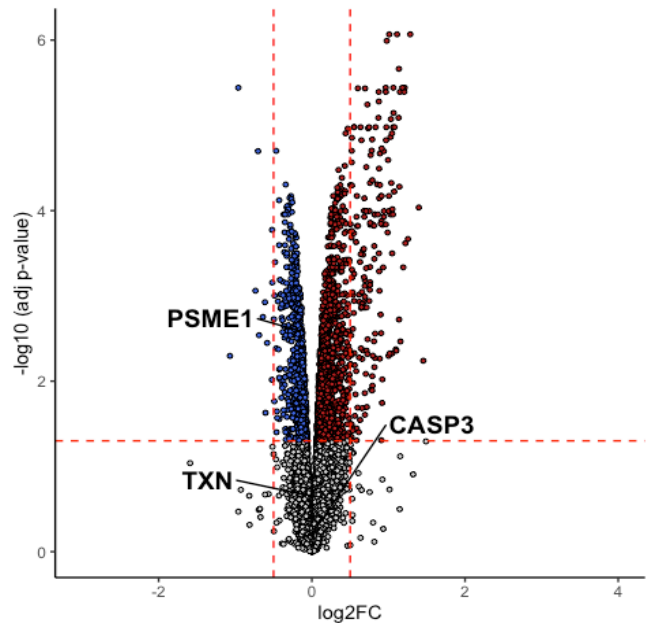
Obrázek č. 11 - Grafické vyhodnocení nanoLC-MS/MS, bortezomib 3,7 nM vs kontrolní buňky



Obrázek č. 12 - Grafické vyhodnocení nanoLC-MS/MS, Karfilzomib 9 nM vs kontrolní buňky



Obrázek č. 14 - Grafické vyhodnocení nanoLC-MS/MS, karfilzomib 12 nM vs. kontrolní buňky



Obrázek č. 13 - Grafické vyhodnocení nanoLC-MS/MS, karfilzomib 12 nM vs. karfilzomib 9 nM

4.7. Ověření a charakterizace vybraných proteinů

Detailní funkční analýza získaných proteomických dat a hlubší charakterizace takto velkého rozsahu zjištěných proteinových změn je časově velice náročná a přesahuje rámec diplomové práce. Proto bylo na závěr diplomové práce vybráno a charakterizováno několik proteinů spojených s MM a byla ověřena hladina RNA metodou real-time PCR (RT-PCR). Metodou RT-PCR byla ověřena hladina RNA pro thioredoxin (*TXN*), podjednotku 1 proteasomového aktivačního komplexu (*PSME1*) a kaspázy 3 (*CASP3*). Dalším charakterizovaným proteinem je *ISG15*. Exprese *ISG15* nebyla metodou PCR ověřena, protože nebyl dostupný primer. Nicméně změna hladiny *ISG15* byla vyhodnocena jako nejvyšší. Mezi buňkami v BZ 3,7 nM. A kontrolami byla hodnota $\log_2FC = 1.34$, mezi CF 9 nM a kontrolami $\log_2FC = -0,47$, CF 12 nM a kontrolami $\log_2FC = 0,047$ a CF 9 nM a CF 12 nM $\log_2FC = 0,52$. U maligních plazmatických buněk indukuje *ISG15* apoptózu, na druhou stranu je součástí mechanismů, díky kterým není maligní buňka rozpoznávána T-lymfocyty a dendritickými buňkami [82].

4.7.1.Thioredoxin

Thioredoxin (TXN nebo TRX) je součástí redoxního signalizace v buňkách [94] a podílí se na regulaci apoptózy prostřednictvím nitrosylace cysteinu 163 u CASP3. [95, 96] Vyšší hladiny TXN u nádorových buněk rezistentních na BZ [97]. V proteomické analýze jsme potvrdili zvýšenou hladinu TXN u UHKT-944 buněk kultivovaných v médiu po přidavku 3,7 nM BZ ($\log_2FC = 0,81$) v porovnání s kontrolou (obrázek č. 11). Hladina genu pro *TXN* ale zvýšená nebyla (obrázek č. 15). Rozpor mezi výsledky nanoLC-MS/MS a RT-PCR by mohl být vysvětlen ztrátou rezistence UHKT-944 buněk, které byly před provedením metody RT-PCR drženy delší dobu v médiu bez přidavku BZ a kontrolní resazurinová esej, která byla provedena paralelně s RT-PCR neprokázala posun v hodnotě IC_{50} (Obr. č. 15). Nicméně hypotézu o ztrátě rezistence UHKT-944 buněk v čase je třeba dále ověřit. V případě CF (9 nM, 12 nM) signifikantní změna v hladině proteinu TXN pozorována nebyla, na druhou stranu byla pozorovány vyšší hladina *TXN* u 9 nM CF (Obr. č. 16), přestože resazurinová esej, která byla provedena paralelně s RT-PCR prokázala pouze mírný posun v hodnotě IC_{50} . Rozpor mezi hladinou proteinu a *TXN* RNA tedy nelze uspokojivě vysvětlit ztrátou rezistence a je třeba dalších analýz, které tento výsledek potvrdí či vyvrátí. Možným vysvětlením by mohla být obecně nízká korelace mezi hladinou genové exprese a hladinou samotného proteinu [98].

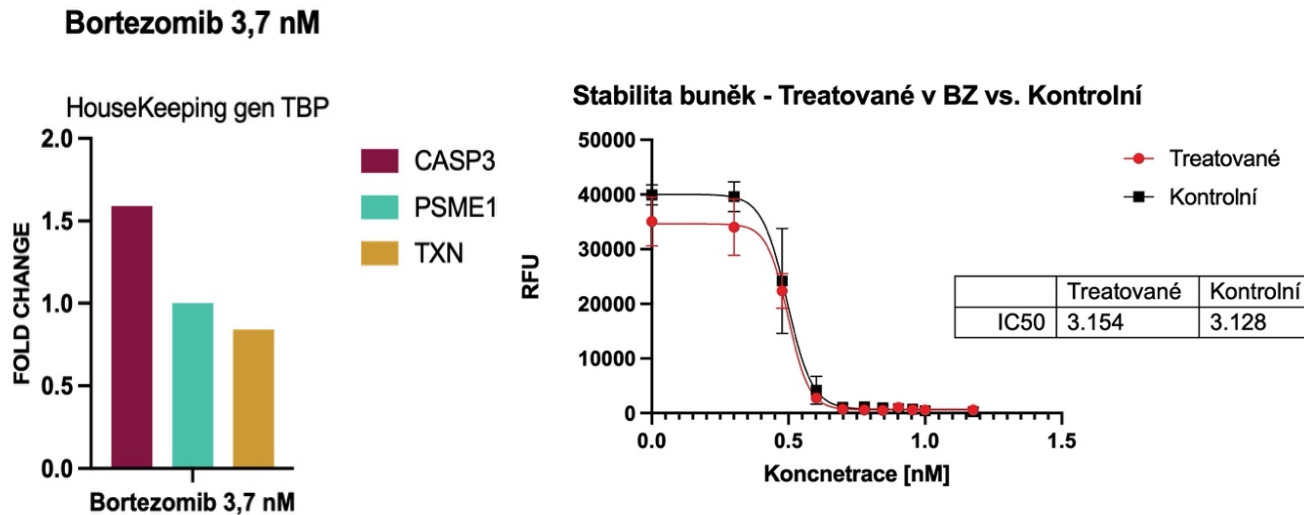
4.7.2.Podjednotka 1 proteasomového aktivačního komplexu

Podjednotka 1 proteasomového aktivačního komplexu PSME1 se podílí na sestavování imunoproteasomu a je nezbytná pro účinné zpracování antigenů. Vyšší hladina PSME 1 a dalších podjednotek proteasomu byla nalezena v buňkách rezistentních na BZ. [99] nanoLC-MS/MS analýza prokázala vyšší hladinu PSME1 u 3,7 nM BZ ($\log_2FC = 0,72$) a 9 nM CF ($\log_2FC = 0,19$), ale nikoli v případě 12 nM CF (Obr. č. 11-13). RT-PCR nepotvrdila zvýšenou hladinu *PSME1* u 3.7 nM BZ, ale potvrdila zvýšenou hladinu *PSME1* u 9 nM CF (obr. č. 15 – 16).

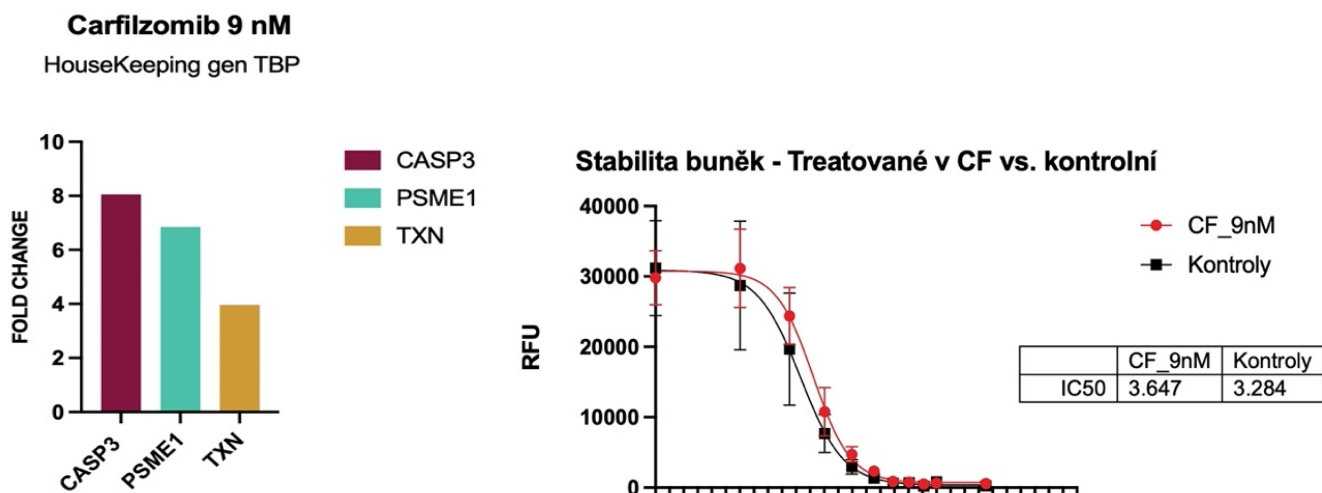
4.7.3.Kaspáza 3

Kaspáza 3 (CASP3) je proteáza, která se podílí na indukci apoptózy interakcí s dalšími kaspázami 8 a 9. Předchozí studie prokázaly, že BZ indukuje apoptotickou buněčnou smrt prostřednictvím signalizace kaspáz v různých buněčných liniích MM. [100] Výsledky získané nanoLC-MS/MS analýzou jsou podobné jako v případě TXN. Opět jsme pozorovali zvýšenou hladinu CASP3 u 3,7 nM BZ ($\log_2FC = 0,5$) (obr. č. 11), ale u CF žádná změna CASP3

prokázána nebyla (Obr. č. 11-14). Na rozdíl od TXN jsme ale u 3,7 nM BZ i 9 nM CF pozorovali zvýšenou hladinu *CASP3* metodou RT-PCR (Obr. č. 15 – 16). V detailnějším vyhodnocení proteomických dat tedy bude třeba se zaměřit i na další kvantifikované apoptické proteiny a zjistit, zda je zde globální posun v apoptóze.



Obrázek č. 15 - Výsledky RT-PCR pro TXN, PSME1 a CASP3 (3,7 nM BZ) a citlivost UHKT -944 na BZ



Obrázek č. 16 - Výsledky RT-PCR pro TXN, PSME1 a CASP3 (9 nM CF) a citlivost UHKT -944 na CF

5. Závěr

Rezistence maligních plazmatických buněk na inhibitory proteasomu představuje významnou překážku při léčbě MM a stále nejsou objasněny všechny mechanismy rezistence. Cílem této diplomové práce bylo osvojit si základní postupy pro kultivaci buněk UHKT-944, resazurinovou esej a základní principy proteomické analýzy spojené s hmotnostní spektrometrií. Na základě získaných poznatků bylo poté možné v rámci diplomové práce pokračovat v kultivaci buněčné linie UHKT-944 rezistentní na dva inhibitory proteasomu, které se v současnosti používají pro léčbu pacientů s MM. U buněčné linie UHKT-944 byl nejdříve ověřen fenotyp odpovídající maligním plazmatickým buňkám u MM (CD138⁺, CD38⁺, CD123⁻) a poté byla stanovena výchozí koncentrace BZ a CF, která byla přidávána do kultivačního média s cílem selektovat rezistentní UHKT-944. Již samotný postup selekce rezistentních buněk bylo nutné na základě pilotních výsledků upravit a podstatně snížit dobu inkubace buněk s BZ s CF. I přes tyto časově náročné experimenty se podařilo připravit buněčné linie, u kterých byla prokázána snížená citlivost na oba PI a mohla být provedena nanoLC-MS/MS analýza, které předcházela chromatografická separace peptidů na reverzní fázi v bazickém pH. nanoLC-MS/MS analýza prokázala velký počet změn v proteomu UHKT-944 buněk indukovaných BZ (3,7 nM) a CF (9 nM), nicméně takto komplexní data je třeba podrobit hlubší funkční analýze, která přesahuje rámec diplomové práce. V závěru diplomové práce byly proto vybrány tři proteiny TXN, PSME1 a CSP3 a byla stanovena hladina RNA. Opět byly prokázány změny indukované PI v porovnání s kontrolami, zároveň ale vyvstala otázka ohledně možné ztráty rezistence v čase. Je tedy třeba dalších navazujících experimentů, která rozšíří již získané výsledky.

Použitá literatura

- [1] CARROLL, Antonia S.; LUNN, Michael PT. Paraproteinaemic neuropathy: MGUS and beyond. *Practical Neurology*, 2021, 21.6: 492-503. Dostupné z: DOI: 10.1136/practneurol-2020-002837
- [2] RAMAKRISHNAN, Neeraj; JIALAL, Ishwarlal. Bence-Jones Protein. 2019. Dostupné z: PMID: 31082079
- [3] RAJKUMAR, S. Vincent; KUMAR, Shaji. Multiple myeloma: diagnosis and treatment. In: Mayo Clinic Proceedings. Elsevier, 2016: 01-119. Dostupné z: DOI: 10.1016/j.mayocp.2015.11.007
- [4] KYLE RA, Remstein ED, Therneau TM, Dispenzieri A, Kurtin PJ, Hodnefield JM, et al. Clinical course and prognosis of smoldering (asymptomatic) multiple myeloma. *N Engl J Med*. 2007;356:2582–90. Dostupné z: DOI: 10.1056/NEJMoa070389
- [5] THORSTEINSDOTTIR, Sigrun; KRISTINSSON, Sigurdur Yngvi. The consultant's guide to smoldering multiple myeloma. *Hematology*, 2022, 2022.1: 551-559. Dostupné z: DOI: 10.1182/hematology.2022000355
- [6] RAJKUMAR, S. Vincent, et al. International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. *The lancet oncology*, 2014, 15.12: e538-e548. Dostupné z: DOI: 10.1016/S1470-2045(14)70442-5
- [7] NAKAYA, Aya, et al. Impact of CRAB symptoms in survival of patients with symptomatic myeloma in novel agent era. *Hematology reports*, 2017, 9.1: 6887. Dostupné z: DOI: 10.4081/hr.2017.6887
- [8] SILVESTRIS, Franco, et al. Fas-L up-regulation by highly malignant myeloma plasma cells: role in the pathogenesis of anemia and disease progression. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 2001, 97.5: 1155-1164. Dostupné z: DOI: 10.1182/blood.v97.5.1155
- [9] SOEKOJO, Cinnie Yentia; CHNG, Wee Joo. The evolution of immune dysfunction in multiple myeloma. *European Journal of Haematology*, 2022, 109.5: 415-424. Dostupné z: DOI: 10.1111/ejh.13839

- [10] ABE, Masahiro. Hypercalcemia in myeloma. *Nihon rinsho. Japanese Journal of Clinical Medicine*, 2007, 65.12: 2245-2249. Dostupné z: PMID: 18069268
- [11] LI, Min, et al. Silencing megalin and cubilin genes inhibits myeloma light chain endocytosis and ameliorates toxicity in human renal proximal tubule epithelial cells. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 2008, 295.1: F82-F90. Dostupné z: DOI: 10.1152/ajprenal.00091.2008
- [12] LEUNG, Nelson, et al. Treating myeloma cast nephropathy without treating myeloma. *The Journal of clinical investigation*, 2012, 122.5: 1605-1608. Dostupné z: DOI: 10.1172/JCI63248
- [13] HUTCHISON, Colin A.; BRIDOUX, Frank. Renal impairment in multiple myeloma: time is of the essence. *Journal of Clinical Oncology*, 2011, 29.11: e312-e313. Dostupné z: DOI: 10.1200/JCO.2010.34.3038
- [14] BRUNS, Ingmar, et al. Multiple myeloma–related deregulation of bone marrow–derived CD34+ hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 2012, 120.13: 2620-2630. Dostupné z: DOI: 10.1182/blood-2011-04-347484
- [15] DE MARIA, Ruggero, et al. Negative regulation of erythropoiesis by caspase-mediated cleavage of GATA-1. *Nature*, 1999, 401.6752: 489-493. Dostupné z: DOI: 10.1038/46809
- [16] SILVESTRIS, Franco, et al. Negative regulation of erythroblast maturation by Fas-L+/TRAIL+ highly malignant plasma cells: a major pathogenetic mechanism of anemia in multiple myeloma. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 2002, 99.4: 1305-1313. Dostupné z: DOI: 10.1182/blood.v99.4.1305
- [17] MAES, Ken, et al. In anemia of multiple myeloma, hepcidin is induced by increased bone morphogenetic protein 2. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 2010, 116.18: 3635-3644. Dostupné z: DOI: 10.1182/blood-2010-03-274571
- [18] ROGERS, S.; RUSSELL, N. H.; MORGAN, A. G. Effect of erythropoietin in patients with myeloma. *BMJ: British Medical Journal*, 1990, 301.6753: 667. Dostupné z: DOI: 10.1136/bmj.301.6753.667-a

- [19] ROODMAN, G. David. Mechanisms of bone lesions in multiple myeloma and lymphoma. *Cancer: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society*, 1997, 80.S8: 1557-1563. Dostupné z: DOI: 10.1002/(sici)1097-0142(19971015)80:8+<1557::aid-cncr5>3.3.co;2-k
- [20] TERPOS, Evangelos, et al. Management of bone disease in multiple myeloma. *Expert review of hematology*, 2014, 7.1: 113-125. Dostupné z: DOI: 10.1586/17474086.2013.874943
- [21] RAJE, N ROODMAN GD. Advances in the biology and treatment of bone disease in multiple myeloma. *Clin Cancer Res*. 2011 Sep 1;17:1278-86. Dostupné z: DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-10-1804
- [22] ADAM, Zdeněk, et al. Plazmocelulární malignity (mnohočetný myelom, solitární plazmocytom a plazmocelulární leukemie), přehled klinických příznaků, diagnostických kritérií a léčby. 2022.
- [23] KLEPÁRNÍK, Karel; BOČEK, Petr. Electrophoresis today and tomorrow: Helping biologists' dreams come true. *Bioessays*, 2010, 32.3: 218-226. Dostupné z: DOI: 10.1002/bies.200900152
- [24] RAJKUMAR, S. Vincent. Multiple myeloma: 2022 update on diagnosis, risk stratification, and management. *American journal of hematology*, 2022, 97.8: 1086-1107. Dostupné z: DOI: 10.1002/ajh.26590
- [25] KUGLÍK, P., et al. Význam a současné možnosti diagnostiky cytogenetických změn u mnohočetného myelomu. *Vnitřní lékařství*, 76. Dostupné z: PMID: 18175433
- [26] MEDINA-HERRERA, Alejandro, et al. Minimal Residual Disease in Multiple Myeloma: Past, Present, and Future. *Cancers*, 2023, 15.14: 3687. Dostupné z: DOI: 10.3390/cancers15143687
- [27] SUN, James; KROEGER, Jodi L.; MARKOWITZ, Joseph. Introduction to multiparametric flow cytometry and analysis of high-dimensional data. *Translational Bioinformatics for Therapeutic Development*, 2021, 239-253. Dostupné z: DOI: 10.1007/978-1-0716-0849-4_13

- [28] MANZANERA, Gema Mateo; SAN MIGUEL IZQUIERDO, Jesús F.; DE MATOS, Alberto Orfao. Immunophenotyping of plasma cells in multiple myeloma. *Multiple Myeloma: Methods and Protocols*, 2005, 5-24, FLORES-MONTERO, Juan, et al. Immunophenotype of normal vs. myeloma plasma cells: Toward antibody panel specifications for MRD detection in multiple myeloma. *Cytometry Part B: Clinical Cytometry*, 2016, 90.1: 61-72. Dostupné z: DOI: 10.1002/cyto.b.21265
- [29] BOURGEOIS, Stéphane; LABUDA, Damian. Dynamic allele-specific oligonucleotide hybridization on solid support. *Analytical biochemistry*, 2004, 324.2: 309-311, MEDINA-HERRERA, Alejandro, et al. Minimal Residual Disease in Multiple Myeloma: Past, Present, and Future. *Cancers*, 2023, 15.14: 3687. Dostupné z: DOI: 10.1016/j.ab.2003.10.006
- [30] CHAPMAN, Michael A., et al. Initial genome sequencing and analysis of multiple myeloma. *Nature*, 2011, 471.7339: 467-472. Dostupné z: DOI: 10.1038/nature09837
- [31] ROSA-ROSA, Juan Manuel, et al. NGS-based molecular karyotyping of multiple myeloma: results from the GEM12 clinical trial. *Cancers*, 2022, 14.20: 5169. Dostupné z: ROSA-ROSA, Juan Manuel, et al. NGS-based molecular karyotyping of multiple myeloma: results from the GEM12 clinical trial. *Cancers*, 2022, 14.20: 5169. Dostupné z: DOI: 10.3390/cancers14205169
- [32] TAKAMATSU, Hiroyuki. Comparison of minimal residual disease detection by multiparameter flow cytometry, ASO-qPCR, droplet digital PCR, and deep sequencing in patients with multiple myeloma who underwent autologous stem cell transplantation. *Journal of clinical medicine*, 2017, 6.10: 91. Dostupné z: DOI: 10.3390/jcm6100091
- [33] BEHJATI, Sam; TARPEY, Patrick S. What is next generation sequencing? *Archives of Disease in Childhood-Education and Practice*, 2013, 98.6: 236-238. Dostupné z: DOI: 10.1136/archdischild-2013-304340
- [34] HEAD, Steven R., et al. Library construction for next-generation sequencing: overviews and challenges. *Biotechniques*, 2014, 56.2: 61-77. Dostupné z: DOI: 10.2144/000114133
- [35] VOELKERDING, Karl V.; DAMES, Shale A.; DURTSCHI, Jacob D. Next-generation sequencing: from basic research to diagnostics. *Clinical chemistry*, 2009, 55.4: 641-658. Dostupné z: DOI: 10.1373/clinchem.2008.112789

- [36] PERROUD, Camille, et al. Effect of MAPK activation via mutations in NRAS, KRAS and BRAF on clinical outcome in newly diagnosed multiple myeloma. *Hematological oncology*, 2023, 41.5: 912-921. Dostupné z: DOI: 10.1002/hon.3208
- [37] ROY, Payel; SARKAR, Uday Aditya; BASAK, Soumen. The NF- κ B activating pathways in multiple myeloma. *Biomedicines*, 2018, 6.2: 59. Dostupné z: DOI: 10.3390/biomedicines6020059
- [38] NIKESITCH, Nicholas; LING, Silvia CW. Molecular mechanisms in multiple myeloma drug resistance. *Journal of clinical pathology*, 2016, 69.2: 97-101. Dostupné z: DOI: 10.1136/jclinpath-2015-203414
- [39] ANKATHIL, Ravindran, et al. Hyperdiploid multiple myeloma with novel complex structural chromosome abnormalities associated with poor prognosis: a rare case report. *International journal of hematology-oncology and stem cell research*, 2021, 15.3: 199. Dostupné z: DOI: 10.18502/ijhoscr.v15i3.6852
- [40] GONZÁLEZ, David, et al. Immunoglobulin gene rearrangements and the pathogenesis of multiple myeloma. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 2007, 110.9: 3112-3121. Dostupné z: DOI: 10.1182/blood-2007-02-069625
- [41] KYRTSONIS, Marie-Christine, et al. Genetic and molecular mechanisms in multiple myeloma: a route to better understand disease pathogenesis and heterogeneity. *The Application Of Clinical Genetics*, 2010, 41-51. Dostupné z: DOI: 10.2147/tacg.s7456
- [42] BERGSAGEL, P. Leif, et al. Cyclin D dysregulation: an early and unifying pathogenic event in multiple myeloma. *Blood*, 2005, 106.1: 296-303. Dostupné z: DOI: 10.1182/blood-2005-01-0034
- [43] STONG, Nicholas, et al. The location of the t (4; 14) translocation breakpoint within the NSD2 gene identifies a subset of patients with high-risk NDMM. *Blood*, 2023, 141.13: 1574-1583. Dostupné z: DOI: 10.1182/blood.2022016212
- [44] CHESI, Marta, et al. Frequent translocation t (4; 14) (p16. 3; q32. 3) in multiple myeloma is associated with increased expression and activating mutations of fibroblast growth factor receptor 3. *Nature genetics*, 1997, 16.3: 260-264. Dostupné z: DOI: 10.1038/ng0797-260

- [45] HURT, Elaine M., et al. Overexpression of c-maf is a frequent oncogenic event in multiple myeloma that promotes proliferation and pathological interactions with bone marrow stroma. *Cancer cell*, 2004, 5.2: 191-199. Dostupné z: DOI: 10.1016/s1535-6108(04)00019-4
- [46] KADAM AMARE, Pratibha, et al. Cytogenetic Abnormalities in Multiple Myeloma: Incidence, Prognostic Significance, and Geographic Heterogeneity in Indian and Western Populations. *Cytogenetic and Genome Research*, 2022, 162.10: 529-540. Dostupné z: DOI: 10.1159/000529191
- [47] BARWICK, B. G., et al. Multiple myeloma immunoglobulin lambda translocations portend poor prognosis. *Nat Commun.* 2019; 10 1: 1911. Dostupné z: DOI: 10.1038/s41467-019-09555-6
- [48] MINAŘÍK, Jiří, et al. Léčba mnohočetného myelomu v roce 2021. *Klinická farmakologie a farmacie*, 2021, 35.3: 70-77.
- [49] MORÈ, Sonia, et al. Autologous stem cell transplantation in multiple myeloma: where are we and where do we want to go? *Cells*, 2022, 11.4: 606. Dostupné z: DOI: 10.3390/cells11040606
- [50] SHEYKHHASAN, Mohsen, et al. CAR T therapies in multiple myeloma: unleashing the future. *Cancer Gene Therapy*, 2024, 1-20. Dostupné z: DOI: 10.1038/s41417-024-00750-2
- [51] ATTAL, Michel, et al. Lenalidomide, bortezomib, and dexamethasone with transplantation for myeloma. *New England Journal of Medicine*, 2017, 376.14: 1311-1320. Dostupné z: DOI: 10.1056/NEJMoa1611750
- [52] GE, Maolin, et al. Modulating proteasome inhibitor tolerance in multiple myeloma: an alternative strategy to reverse inevitable resistance. *British Journal of Cancer*, 2021, 124.4: 770-776. Dostupné z: GE, Maolin, et al. Modulating proteasome inhibitor tolerance in multiple myeloma: an alternative strategy to reverse inevitable resistance. *British Journal of Cancer*, 2021, 124.4: 770-776. Dostupné z: DOI: 10.1038/s41416-020-01191-y
- [53] FIELD-SMITH, Antonia; MORGAN, Gareth J.; DAVIES, Faith E. Bortezomib (Velcade™) in the treatment of multiple myeloma. *Therapeutics and clinical risk management*, 2006, 2.3: 271-279. Dostupné z: DOI: 10.2147/tcrm.2006.2.3.271

- [54] BARRIO, Santiago, et al. Spectrum and functional validation of PSMB5 mutations in multiple myeloma. *Leukemia*, 2019, 33.2: 447-456. Dostupné z: DOI: 10.1038/s41375-018-0216-8
- [55] BASHIRI, Hamed; TABATABAEIAN, Hossein. Autophagy: a potential therapeutic target to tackle drug resistance in multiple myeloma. *International journal of molecular sciences*, 2023, 24.7: 6019. Dostupné z: DOI: 10.3390/ijms24076019
- [56] ZHOU, Xiang, et al. High-dose carfilzomib achieves superior anti-tumor activity over low-dose and recaptures response in relapsed/refractory multiple myeloma resistant to low-dose carfilzomib by co-inhibiting the $\beta 2$ and $\beta 1$ subunits of the proteasome complex. *Haematologica*, 2023, 108.6: 1628. Dostupné z: DOI: 10.3324/haematol.2022.282225
- [57] MATTIOLI, Michela, et al. Gene expression profiling of plasma cell dyscrasias reveals molecular patterns associated with distinct IGH translocations in multiple myeloma. *Oncogene*, 2005, 24.15: 2461-2473. Dostupné z: DOI: 10.1038/sj.onc.1208447
- [58] LÜ, Shuqing; WANG, Jianmin. The resistance mechanisms of proteasome inhibitor bortezomib. *Biomarker research*, 2013, 1: 1-9. Dostupné z: DOI: 10.1186/2050-7771-1-13
- [59] KOZALAK, Gül, et al. Review on bortezomib resistance in multiple myeloma and potential role of emerging technologies. *Pharmaceuticals*, 2023, 16.1: 111. Dostupné z: DOI: 10.3390/ph16010111
- [60] KLIONSKY, Daniel J.; EMR, Scott D. Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. *Science*, 2000, 290.5497: 1717-1721. Dostupné z: DOI: 10.1126/science.290.5497.1717
- [61] SUN, Xiaofang; TANG, Daolin. HMGB1-dependent and-independent autophagy. *Autophagy*, 2014, 10.10: 1873-1876. Dostupné z: DOI: 10.4161/auto.32184
- [62] KOVACS, Laszlo; SU, Yunchao. The critical role of calpain in cell proliferation. *Journal of biomolecular research & therapeutics*, 2014, 3.3. Dostupné z: DOI: 10.4172/2167-7956.1000112

- [63] ROY, Payel; SARKAR, Uday Aditya; BASAK, Soumen. The NF- κ B activating pathways in multiple myeloma. *Biomedicines*, 2018, 6.2: 59. Dostupné z: DOI: 10.3390/biomedicines6020059
- [64] KRAVTSOVA-IVANTSIV, Yelena; CIECHANOVER, Aaron. The ubiquitin-proteasome system and activation of NF- κ B: Involvement of the ubiquitin ligase KPC1 in p105 processing and tumor suppression. *Molecular & cellular oncology*, 2015, 2.4: e1054552. Dostupné z: DOI: 10.1080/23723556.2015.1054552
- [65] WASINGER, Valerie C., et al. Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: *Mycoplasma genitalium*. *Electrophoresis*, 1995, 16.1: 1090-1094. Dostupné z: DOI: 10.1002/elps.11501601185
- [66] GONÇALVES, Emanuel, et al. Pan-cancer proteomic map of 949 human cell lines. *Cancer Cell*, 2022, 40.8: 835-849. e8. Dostupné z: DOI: 10.1016/j.ccell.2022.06.010. Dostupné z: DOI: 10.1016/j.ccell.2022.06.010
- [67] BRADWELL, Arthur R., et al. Highly sensitive, automated immunoassay for immunoglobulin free light chains in serum and urine. *Clinical chemistry*, 2001, 47.4: 673-680. Dostupné z: PMID: 11274017
- [68] MILLS, J. R., et al. High sensitivity blood-based M-protein detection in sCR patients with multiple myeloma. *Blood cancer journal*, 2017, 7.8: e590-e590. Dostupné z: DOI: 10.1038/bcj.2017.75
- [69] ZAAL, Esther A., et al. Bortezomib resistance in multiple myeloma is associated with increased serine synthesis. *Cancer & metabolism*, 2017, 5: 1-12. Dostupné z: DOI: 10.1186/s40170-017-0169-9
- [70] MOREAU, Philippe, et al. Proteasome inhibitors in multiple myeloma: 10 years later. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 2012, 120.5: 947-959. Dostupné z: DOI: 10.1182/blood-2012-04-403733
- [71] KUBICKI, Tadeusz, et al. Bortezomib-and carfilzomib-resistant myeloma cells show increased activity of all three arms of the unfolded protein response. *American Journal of Cancer Research*, 2022, 12.7: 3280. Dostupné z: PMID: 35968359

- [72] BESSE, Andrej, et al. Carfilzomib resistance due to ABCB1/MDR1 overexpression is overcome by nelfinavir and lopinavir in multiple myeloma. *Leukemia*, 2018, 32.2: 391-401. Dostupné z: DOI: 10.1038/leu.2017.212
- [73] BAI, Yang; SU, Xing. Updates to the drug-resistant mechanism of proteasome inhibitors in multiple myeloma. *Asia-Pacific Journal of Clinical Oncology*, 2021, 17.1: 29-35. Dostupné z: DOI: 10.1111/ajco.13459
- [74] MILLS, J. R., et al. High sensitivity blood-based M-protein detection in sCR patients with multiple myeloma. *Blood cancer journal*, 2017, 7.8: e590-e590. Dostupné z: DOI: 10.1038/bcj.2017.75
- [75] MILLER, Rachel M.; SMITH, Lloyd M. Overview and considerations in bottom-up proteomics. *Analyst*, 2023, 148.3: 475-486. Dostupné z: DOI: 10.1039/d2an01246d
- [76] ZHANG, Yaoyang, et al. Protein analysis by shotgun/bottom-up proteomics. *Chemical reviews*, 2013, 113.4: 2343-2394. Dostupné z: DOI: 10.1021/cr3003533
- [77] ZHOU, Yu, et al. Multidimensional separation using HILIC and SCX pre-fractionation for RP LC-MS/MS platform with automated exclusion list-based MS data acquisition with increased protein quantification. *Journal of proteomics & bioinformatics*, 2015, 8.11: 260. Dostupné z: DOI: 10.4172/jpb.1000378
- [78] GASPARI, Marco; CUDA, Giovanni. Nano LC–MS/MS: A robust setup for proteomic analysis. *Nanoproteomics: methods and protocols*, 2011, 115-126. Dostupné z: DOI: 10.1007/978-1-61779-319-6_9
- [79] URBAN, Pawel L. Quantitative mass spectrometry: an overview. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 2016, 374.2079: 20150382. Dostupné z: DOI: 10.1098/rsta.2015.0382
- [80] HO, Chung Shun, et al. Electrospray ionisation mass spectrometry: principles and clinical applications. *The Clinical Biochemist Reviews*, 2003, 24.1: 3. Dostupné z: PMID: 18568044
- [81] PERRY, Richard H.; COOKS, R. Graham; NOLL, Robert J. Orbitrap mass spectrometry: instrumentation, ion motion and applications. *Mass spectrometry reviews*, 2008, 27.6: 661-699. Dostupné z: DOI: 10.1002/mas.20186

- [82] EXACTIVE, Q. Mass spectrometry-based proteomics using Q Exactive, a high-performance benchtop quadrupole Orbitrap mass spectrometer. 2011. Dostupné z: DOI: 10.1074/mcp.M111.011015
- [83] ZECHA, Jana, et al. TMT labeling for the masses: a robust and cost-efficient, in-solution labeling approach*[S]. *Molecular & cellular proteomics*, 2019, 18.7: 1468-1478. Dostupné z: DOI: 10.1074/mcp.TIR119.001385
- [84] VYHLÍDALOVÁ, Ilona, et al. Characterization of a new human plasma cell leukemia cell line UHKT-944. *European Journal of Haematology*, 2015, 95.4: 352-360. Dostupné z: DOI: 10.1111/ejh.12505
- [85] LIU, Shuai, et al. Fetal bovine serum, an important factor affecting the reproducibility of cell experiments. *Scientific Reports*, 2023, 13.1: 1942. Dostupné z: DOI: 10.1038/s41598-023-29060-7
- [86] DOMON, Bruno; AEBERSOLD, Ruedi. Mass spectrometry and protein analysis. *science*, 2006, 312.5771: 212-217. Dostupné z: DOI: 10.1126/science.1124619
- [87] CHIVA, Cristina; SABIDÓ, Eduard. HCD-only fragmentation method balances peptide identification and quantitation of TMT-labeled samples in hybrid linear ion trap/orbitrap mass spectrometers. *Journal of Proteomics*, 2014, 96: 263-270. Dostupné z: DOI: 10.1016/j.jprot.2013.11.013
- [88] PERKINS, David N., et al. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *ELECTROPHORESIS: An International Journal*, 1999, 20.18: 3551-3567. Dostupné z: DOI: 10.1002/(SICI)1522-2683(19991201)20:18<3551::AID-ELPS3551>3.0.CO;2-2
- [89] CLAASSEN, Manfred. Inference and validation of protein identifications. *Molecular & cellular proteomics*, 2012, 11.11: 1097-1104. Dostupné z: DOI: 10.1074/mcp.R111.014795
- [90] GATTO, Laurent; CHRISTOFOROU, Andy. Using R and Bioconductor for proteomics data analysis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 2014, 1844.1: 42-51. Dostupné z: DOI: 10.1016/j.bbapap.2013.04.032

- [91] DINALANKARA, Wikum, et al. An R package for divergence analysis of omics data. *PloS one*, 2021, 16.4: e0249002. Dostupné z: DOI: 10.1371/journal.pone.0249002
- [92] YU, Lianbo, et al. Fully moderated t-statistic in linear modeling of mixed effects for differential expression analysis. *BMC bioinformatics*, 2019, 20: 1-9. Dostupné z: DOI: 10.1186/s12859-019-3248-9
- [93] FERREIRA, José A. The Benjamini-Hochberg method in the case of discrete test statistics. *The international journal of biostatistics*, 2007, 3.1. Dostupné z: DOI: 10.2202/1557-4679.1065
- [94] LEE, Samuel; KIM, Soo Min; LEE, Richard T. Thioredoxin and thioredoxin target proteins: from molecular mechanisms to functional significance. *Antioxidants & redox signaling*, 2013, 18.10: 1165-1207. Dostupné z: DOI: 10.1089/ars.2011.4322
- [95] MITCHELL, Douglas A.; MARLETTA, Michael A. Thioredoxin catalyzes the S-nitrosation of the caspase-3 active site cysteine. *Nature chemical biology*, 2005, 1.3: 154-158. Dostupné z: DOI: 10.1038/nchembio720
- [96] SZKLARCZYK, Damian, et al. The STRING database in 2023: protein–protein association networks and functional enrichment analyses for any sequenced genome of interest. *Nucleic acids research*, 2023, 51.D1: D638-D646. Dostupné z: DOI: 10.1093/nar/gkac1000
- [97] RANINGA, Prahlad V., et al. Inhibition of thioredoxin 1 leads to apoptosis in drug-resistant multiple myeloma. *Oncotarget*, 2015, 6.17: 15410. Dostupné z: DOI: 10.18632/oncotarget.3795
- [98] SALOVSKA, Barbora, et al. Isoform-resolved correlation analysis between mRNA abundance regulation and protein level degradation. *Molecular systems biology*, 2020, 16.3: e9170. Dostupné z: DOI: 10.15252/msb.20199170
- [99] CAILLOT, Mélody, et al. Targeting reactive oxygen species metabolism to induce myeloma cell death. *Cancers*, 2021, 13.10: 2411. Dostupné z: DOI: 10.3390/cancers13102411

[100] OBENG, Esther A., et al. Proteasome inhibitors induce a terminal unfolded protein response in multiple myeloma cells. *Blood*, 2006, 107.12: 4907-4916. Dostupné z: DOI: 10.1182/blood-2005-08-3531