

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta

Katedra medicínské biologie



**Dynamika sérových antiproteáz při
(pro)enzymoterapii nádorových onemocnění**

Bakalářská práce

Irena Bartoňová

Vedoucí práce: RNDr. Jan ŽENKA, CSc.

České Budějovice, 2010

BARTOŇOVÁ I., 2010: DYNAMIKA SÉROVÝCH ANTIPROTEÁZ PŘI
(PRO)ENZYMOTERAPII NÁDOROVÝCH ONEMOCNĚNÍ [DYNAMICS OF SERUM
ANTIPROTEASES DURING THE (PRO)ENZYME THERAPY OF TUMOR DISEASES, BC.
THESIS, IN CZECH] – 52 P., FACULTY OF SCIENCE, THE UNIVERSITY OF SOUTH
BOHEMIA, ČESKÉ BUDĚJIVICE, CZECH REPUBLIC

Annotation: The aim of this study was to observe dynamics of serum antiproteases (α -2-macroglobulin, α -1-antitrypsin, contrapsin) during proenzyme and enzyme therapies. We used mass spectrometry for both qualitative and quantitative analyses of pooled mouse serum samples.

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. V platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

V Českých Budějovicích dne 28.4.2010

.....
Irena Bartoňová

PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému školiteli RNDr. Janu Ženkovi, CSc za skvělé vedení práce a cenné rady, trpělivost a nadšení se kterým mi pomáhal řešit všechny problémy. Dále bych chtěla velmi poděkovat Mgr. Peteru Koníkovi také za trpělivost při přípravných pracích, analýzách a přínosné rady při všeobecné spolupráci. Ráda bych poděkovala Bc. Lucii Kalferstové za poskytnutí zamražených myších sér, díky nimž mohla tato práce vzniknout. Mé díky patří i kolektivu Laboratoře strukturní biologie a Laboratoře genomiky za vytvoření příjemného pracovního prostředí. Mé velké díky patří i mé rodině a blízkým přátelům, kteří mě vždy podpořili.

OBSAH:

ÚVOD	6
1.1 NÁDOROVÉ ONEMOCNĚNÍ	6
1.2 NÁDOROVÁ IMUNOLOGIE	6
1.3 SYSTÉMOVÁ ENZYMOTERAPIE	8
1.4 PROENZYMOVÁ TERAPIE	11
1.4.1 ALFA-2-MAKROGLOBULIN	12
1.4.2 ALFA-1-ANTITRYPSIN	14
1.4.3 CONTRAPSIN A ALFA-1-ANTITRYPSIN	15
1.4.4 ALFA-1-ANTICHYMOTRYPSIN	16
1.5 PROTEOMIKA A HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE	16
1.5.1 PROTEOMIKA	16
1.5.2 OBECNÝ ÚVOD O MS	17
1.5.2.1 KONSTRUKCE HMOTNOSTNÍCH SPEKTROMETRŮ	18
1.5.3 PRINCIPY METOD NA NÁMI POUŽÍVANÉM PŘÍSTROJI	21
1.5.3.1 ULTRA PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY	21
1.5.3.2 IONIZACE ELEKTROSPREJEM	21
1.5.3.3 MASS FILTER	23
1.5.3.4 HMOTNOSTNÍ ANALYZÁTOR A DETEKTOR	24
2. CÍLE PRÁCE	26
3. MATERIÁL A METODY	27
3.1 EXPERIMENT LUCIE KALFESTROVÉ	27
3.1.1 LABORATORNÍ ZVÍŘATA	27
3.1.2 BUNĚČNÉ LINIE	27
3.1.3 TRANSPLANTACE NÁDORU	27
3.1.4 SLOŽENÍ PODÁVANÝCH ROZTOKŮ	28
3.1.5 TERAPIE U JEDNOTLIVÝCH SKUPIN	28
3.1.6 MĚŘENÍ VELIKOSTI NÁDORŮ	29
3.1.7 PŘÍPRAVA VZORKŮ SÉRA	29
3.2 ANALÝZA VZORKŮ SÉR Z POKUSU L. KALFESTROVÉ	30
3.2.1 VZORKY A CHEMIKÁLIE	30

3.2.2	METODIKA	30
3.2.2.1	PŘÍPRAVA VZORKU PRO DIGESCI A DIGESCE.....	30
3.2.2.2	UPLC A MS	31
3.2.2.3	SOFTWAREVÉ ZPRACOVÁNÍ.....	31
4.	VÝSLEDKY.....	33
4.1	VÝSLEDKY PRÁCE LUCIE KALFERSTOVÉ.....	33
4.1.1	VLIV TERAPIE NA VELIKOST NÁDORU.....	33
4.2	VÝSLEDKY MS ANALÝZY VZORKŮ SÉR Z JEDNOTLIVÝCH SKUPIN – EXPERIMENT L. KALFERSTOVÉ.....	34
4.2.1	VLIV JEDNOTLIVÝCH ZPŮSOBŮ TERAPIE NA HLADINY JEDNOTLIVÝCH ANALYTŮ	35
5.	DISKUSE.....	41
6.	SOUHRN.....	43
7.	LITERATURA	44

1. ÚVOD

1.1 NÁDOROVÉ ONEMOCNĚNÍ

Nádorové onemocnění je též obecně nazýváno rakovinou. Jde o různorodou skupinu chorob, kterou znal již lékař Hipokratés (asi 460-377 př. n. l.). Je důsledkem mutace v genetickém kódu většinou jen jediné buňky (Fearon, 1997), která se pak začne nekontrolovatelně dělit. Takto transformované buňky často vůbec neodumírají a dále se nekontrolovatelně dělí. Mají schopnost napadat jiné tkáně a rozšiřovat se pomocí metastáz do jiných částí těla. Shluk takovýchto buněk nazýváme nádorem či tumorem. Jak toto onemocnění komplexně léčit je stále otázkou.

Rozeznáváme dva druhy tumorů – benigní a maligní. Benigní tumory nejsou tak závažné, protože nemají schopnost šířit se do okolních tkání a neomezeně růst. Druhou skupinou jsou nádory maligní. Pro ně je charakteristický nekontrolovatelný růst a tvorba metastáz, a proto jsou velmi závažné.

Nádory se dělí do skupin podle typu původní tkáně, ze které vznikly. Rozeznáváme tumory epitelální, stromální, hematopoetické, neuroektodermální, germiomy, nádory ze žláзовých tkání a vzácné nádory z ostatních tkání.

Objevení účinného způsobu jejich léčby by bylo pro lidstvo velkým přínosem.

1.2 NÁDOROVÁ IMUNOLOGIE

Imunita dokáže rakovinou buňku rozpoznat jen díky existenci nádorově specifických antigenů na jejím povrchu. Tyto nádorové antigeny byly identifikovány a rozděleny do dvou kategorií (viz. Tab. 1). První kategorii tvoří antigeny specifické pro nádory (TSA - vyskytující se pouze na nádorových buňkách). Druhá kategorie je tvořena antigeny asociovanými s nádory (TAA - vyskytující se i na normálních buňkách za podmínek, které neindukují stav imunologické tolerance).

TAB. 1: TSA A TAA ANTIGENY. JEJICH PŘÍKLADY A VÝSKYT.

Kategorie antigenu	Příklad antigenů	Výskyt tohoto antigenu
TSA	Komplexy MHC I a abnormální fragmenty buněčných proteinů	Chemicky indukované nádory, některé leukémie
	Komplexy MHC I s fragmenty proteinů onkogenních virů	Nádory vyvolané viry
	Abnormální formy glykoproteinů	Kdekoliv
	Idiotopy myelomů a lymfomů	Kdekoliv
TAA	Onkofetální antigeny	Normální fetální buňky, např. α -fetoprotein, karcinoembryonální antigen
	Některé melanomové antigeny (MAGE-1, Melan-A)	Buňky melanomu
	Antigen HER2/neu (receptor růstového faktoru)	Epiteliální buňky
	PSA (prostatický specifický antigen)	Kdekoliv
	EPCAM (adhezivní molekula epiteliálních buněk)	Metastázy karcinomů
	Tzv. diferenciační antigeny	Leukemické buňky

Mezi buňky rozpoznávající tyto antigeny a likvidující nádorové buňky patří lymfocyty typu Natural Killers (NK-buňky), Natural Cytotoxin (NC-buňky) a Natural Killers T cells (NKT buňky). Jejich počty v organismu bývají běžně dostatečně vysoké. Mohou se však ještě zvýšit Interferonem gamma (IFN- γ) a Interleukinem 2 (IL-2). Druhou skupinou jsou aktivované makrofágy, uvedené do činnosti pomocí IFN γ a makrofágy aktivujícím faktorem (MAF). Po aktivaci makrofágy produkují větší množství cytokinů, které tak dosahují vysokých lokálních koncentrací (např. Tumor Necrosis Factor (TNF- α)).

Různé typy nádorových buněk se liší způsoby, kterými se mohou vyhnout imunitě. Řada těchto mechanismů je analogická s únikovými mechanismy infekčních mikroorganismů. Mezi nejvýznamnější způsoby úniku nádoru imunitnímu systému se řadí:

- variabilita nádorových buněk (mutantní formy bez nádorového antigenu)
- nízká hustota exprese nádorových antigenů
- zamaskování některých epitopů nádorových antigenů

- produkce faktorů inaktivujících T-lymfocyty nebo jiných blokujících faktorů (Interleukin 10 (IL-10), Transforming Growth Factor beta (TGF-β))
- produkce faktorů inhibujících funkce nebo životnost dendritických buněk (NO, IL-10, TGF-β)

Nádory produkují mnoho faktorů, které mohou pozměnit bilanci Th1 a Th2 cytokinů. V případě zánětu převládá Th1 odpověď. V případě nádorového onemocnění dojde k větší produkci Th2 cytokinů. Mezi tyto faktory patří TGF-β, IL-10, prostaglandiny a mnoho dalších látek (Asselin-Paturel a spol., 1998; Chouaib a spol., 1997; Kim a spol., 1995). Th1 lymfocyty produkují kromě jiných také IFN-γ, TNF a IL-2, Th2 lymfocyty IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 atd. Produkce těchto cytokinů je úzce spojena se stavem a stupněm malignity (Onishi a spol., 1999).

1.3 SYSTÉMOVÁ ENZYMOTERAPIE

Za hlavní mechanismus působení se pokládá aktivace α₂-makroglobulinu (α₂M) a jeho následné zachytávání cytokinů obsažených v krvi. Aktivace proběhne navázáním proteázy a následnou konformační změnou α₂M. Tím se objeví dříve skryté aktivní místo, které je nyní schopné na sebe navázat řadu cytokinů (Webb, 1996), růstový hormon (Kratzsch, 1996), leptin (Birkenmeier, 1998) a β₂-mikroglobulin (Gouin-Charnett, 2000). Přehled hlavních cytokinů, které váže aktivovaný α₂M, uvádí Tab. 2.

Komplex α₂M s proteázou a cytokinem je odstraňován hepatocyty, makrofágy a fibroblasty. Konečným výsledkem je odstraňování cytokinů ze séra. Samotný α₂M cytokiny váže slabě. Pro zajištění silnějšího vychytávání cytokinů je třeba, aby α₂M nejprve vázal proteázy a tím se zvýšila jeho schopnost vázat cytokiny. Dochází k pohlcování jak prozánětlivých, tak protizánětlivých cytokinů. Dochází k narušení Th1/Th2 rovnováhy, která bývá při imunosupresivním působení nádorů posunuta na stranu Th2 (Shurin a spol., 1999).

TAB. 2: CYTOKINY VÁZANÉ NA ALFA-2-MAKROGLOBULIN.

Cytokiny vázané na aktivovaný α -2-makroglobulin	Autor
IL-1 β , IL-2, IL-12	Borth a Teodorescu 1986; Borth a Luger, 1989
IL-6	Matsuda a spol., 1989
Defensin	Panyutich a Ganz, 1991
IFN- γ	James a spol., 1992
NT-3, CNTF	Liebl a Koo, 1993
TGF- α	Liebl a Koo, 1993
Inhibin, Activin	Vaughan a Vale, 1993; Niemuller a spol., 1995
PDGF-BB	Crookston a spol., 1994
TNF- α	Crookston a spol., 1994
TGF- β 1, TGF- β 2	Crookston a spol., 1994; Feige a spol., 1996
IGF-1	Da Silva a spol., 1996
Growth hormone GH	Kratzsch a spol., 1996
IL-8	Kurdowska a spol., 1997
Leptin	Birkenmeier a spol., 1998
IL-4	Garber a spol., 2000
IL-10	Garber a spol., 2000
β -2 microglobulin	Gouin-Charnett a spol., 2000

Hlavními imunosupresivními cytokiny jsou TGF- β , IL-4, IL-6 a IL-10 (Krasagakis a spol., 1998; Pawelec, 1999). Nádorové buňky a buňky imunitního systému, které infiltrují a obklopují nádorové tkáně, navozují pomocí těchto cytokinů stav imunitolerance. Nejvýznamnější roli přitom hraje TGF- β a IL-10 (viz Tab. 3; Finke a Bukowski, 2004). Působení IL-10 však není tak jednoznačné, někdy je schopen vývoj nádorů pouze inhibovat (Finke a Bukowski, 2004).

Předpokládá se, že snižování vysokých hladin TGF- β , ale i IL-10, případně IL-4 a IL-6 je důležitým principem enzymoterapie nádorů. Snížení hladiny TGF- β pomocí enzymoterapie bylo prokázáno (Desser a spol., 2001). V úvahu přicházejí však i jiné mechanismy, jako je např. indukce antiproteáz. Otázka mechanismů systémové enzymoterapie tak zůstává stále otevřená (Leipner a Saller, 2000). Účinnost systémové enzymoterapie prokázaly i klinické studie (Leipner a Saller, 2000).

TAB. 3: PROKÁZANÉ VLASTNOSTI TGF- β A IL-10.

TGF-β	Inhibuje cytotoxicitu makrofágů a NK buněk
	Inhibuje TCR signalizaci
	Inhibuje CTL odpověď
	Inhibuje MHC-I
	Stimuluje angiogenezi
	Stimuluje produkci IL-1
	Suprimuje DCs, T-cell proliferaci
	Zesiluje metastázování nádorů
	Zesiluje produkci sama sebe
	Výrazně zhoršuje prognózu
IL-10	Inhibuje angiogenezi
	Suprimuje DCs, Th1, IFN- γ , IL-2, antigenní prezentaci
	Snižuje expresi MHC I
	Zvyšuje expresi HLA-G (což brání NK ataku)

Systémová enzymoterapie je doporučována po chemoterapii a radiační terapii, při kterých dochází k nárůstu sérového TGF- β . Klinické studie však nedosahují dostatečně dobrých výsledků, což je zřejmě způsobeno nevhodnou aplikační cestou a nemožností exaktního dávkování.

Na trhu jsou k dostání preparáty od několika firem na bázi pankreatických a rostlinných proteáz (trypsin, chymotrypsin, papain, bromelin). Jejich účinek je však diskutabilní. Jsou podávány perorálně i v gramových množstvích. Studie zabývající se touto problematikou uvádějí, že je vstřebáno jen nepatrné množství proteáz (0.002-0.0025%, Ziv a spol., 1987, 0.01 – 0.001%, Šťastný a spol., 2002). Gewert a spol., 2004, dokonce vstřebatelnost úplně popírá.

Perrektální podání je při experimentálních studiích používáno častěji. Stejně jako v předchozím případě bývají dávky agens vysoké, ale do krve se dostane zlomek preparátu. Výrazné úspěchy s perrektálním podáním učinil Wald a spol. při použití na myších s Lewisovým plicním karcinomem (Wald a spol., 1998) a melanomem (Wald a spol., 2001).

1.4 PROENZYMOVÁ TERAPIE

Za zakladatele (pro)enzymoterapie je považován John Beard. Jeho terapii označujeme jako enzymoterapii, ale jak z dalšího vyplyne, měli bychom hovořit spíše o proenzymoterapii. On sám ji však nazýval „trypsinovou terapií“. Beard velmi zdůrazňoval čerstvost svých extraktů z pankreatu, a proto s největší pravděpodobností jeho směs obsahovala jak enzymy, tak i výrazné množství proenzymů.

Beard zakládal svou terapii na podobnosti nádoru a trofoblastu. Oboje jmenované je invazivní, agresivní a schopné expandovat. Klíčovým rozdílem je pozdější utlumení těchto vlastností u embrya. Beard se domníval, že je to přítomností pankreatických enzymů v embryu. Působením trypsinu na rakovinné buňky experimentálně dokázal, že terapie má pozitivní vliv (Beard, 1906, 1911). Beardem se poté nechal inspirovat Krebs (Krebs a spol., 1950), Wolf, či Benitzová. Jiní Beardovi následovníci nebyli úspěšní (Hald, 1907; Bainbridge, 1909). V nedávné době se použitím proenzymů v léčbě rakoviny věnovali Novák a Trnka (Novák a Trnka, 2005). Směs, kterou používali, byla tvořena trypsinogenem a amylázou, u *in vitro* studií i chymotrypsinogenem. Amyláza byla ve směsi na základě Beardova doporučení (účastní se pravděpodobně odbourávání nádorového glykogenu) a přispěla k celkovému terapeutickému efektu. Ten byl nejvýraznější v případě metastázového modelu myši (melanom B16/F10).

Rozdílem oproti systémové enzymoterapii je, že kromě systémových procesů se v tomto případě uplatňuje i lokální působení.

Proenzymy jsou v krvi neaktivní a mohou v ní tedy volně putovat. Předpokládá se, že v místě nádoru jsou aktivovány nádorovými proteázami (Tab. 4). Zvažuje se i účast enterokinase-like enzymu (Nyberg a spol., 2002) či enterokinázy (Miyata a spol., 1999).

TAB. 4: NÁDOROVÉ PROTEÁZY AKTIVUJÍCÍ SE V MÍSTĚ NÁDORU.

Název	Autor
Membrane associated cathepsin B	Kobayashi a spol., 1993, Figarella a spol., 1988
Nádorový trypsin	Koivunen a spol., 1991, Nyberg a spol., 2006
Urokinase-type plasminogen activator	Uchima a spol., 2003

Klíčovým enzymem k iniciaci a aktivaci chymotrypsinogenu je trypsin. V místě nádoru probíhá vyčytávání a postupné hromadění aktivních enzymů.

1.4.1 α -2-makroglobulin

Z výše uvedeného vyplývá, že pro (pro)enzymovou terapii má klíčový význam α -2-makroglobulin (α 2M). Zastává důležitou biologickou funkci, protože spojuje metabolismus proteáz s regulací cytokinové aktivity (Lauer a spol., 2001). Váže na sebe proteázy všech čtyř hlavních tříd:

- aspartátové proteázy
- cysteinové proteázy
- matrixové metaloproteázy
- serinové proteázy.

α 2M je tetrametrický glykoprotein o relativní molekulové hmotnosti 718 kDa. V plazmě je přítomný ve vysokých koncentracích ($c=2-4$ mg/ml), (James, 1990).

Je složen ze čtyř identických podjednotek. Tyto podjednotky jsou disulfidickými můstky spojeny v dimery, které tvoří nekovalentními vazbami homotetramer (Swenson a spol., 1979).

Hepatocyty v játrech jsou zřejmě hlavní zdroj cirkulujícího α 2M. V kultivačních podmínkách bylo prokázáno, že mají schopnost syntetizovat α 2M:

- lidské embryonální plicní fibroblasty (Mosher a spol., 1977)
- krevní monocyty – makrofágy (Hovi a spol., 1977)
- alveolární makrofágy (White a spol., 1980).

α 2M může zřejmě hrát roli na buněčné úrovni tím, že může měnit bilanci cytokinů a tím vlastně i mikroenvironmentální okolí obklopující buňky (Saksela a spol., 1984; Webb a spol., 1994). Nejvyšších hodnot dosahuje α 2M u dětí ($c=3-5$ mg/ml séra). Zřejmě je součástí důležitých biologických funkcí ve vývoji těla. Ve starším věku je však pozorovaný jeho výrazný pokles ($c=0,8-1,2$ mg/ml séra). Toto je zřejmě spojeno s náparem nemocí, jako jsou infekce, degenerační nemoci a rakovina. Vyskytuje se i v ostatních tělních tekutinách, např. pohrudní tekutině, lymfě a plodové vodě, díky čemuž hraje roli v kontrole proteolýzy i v odpovídajících extracelulárních prostorech.

Bylo zjištěno, že α 2M se vyskytuje ve dvou konformacích. V nativní formě („slow“ forma) je aktivní jako proteázový inhibitor. Tato forma není rozpoznávaná LRP receptorem a je stabilní v krvi a intersticiálním prostoru. Aktivovaná forma α 2M („fast“ forma) vzniká po navázání proteázy konformační změnou a je rozpoznávaná LRP receptorem.

Konformační změnou se v $\alpha 2M$ odhaluje vazebné místo pro LRP. Některé buňky jsou vybaveny těmito membránovými LRP receptory pro $\alpha 2M$ -proteázový komplex. Nacházejí se především na hepatocytech, fibroblastech a makrofázích (Pizzo a Gonias, 1984). Makrofágy způsobují velmi rychlý přesun $\alpha 2M$ -proteázových komplexů z cirkulující krve (Saksela a spol., 1984). $\alpha 2M$ reaguje ireverzibilně, nasycení jedním enzymem zabraňuje následnému navázání jiného enzymu.

Proteáza a inhibitor jsou spojeny nekovalentně. Poblíž centra každé podjednotky se nalézá „bait“ region. Ten je tvořen třemi distinkčními doménami. Dále obsahuje interní β -cysteinyl- γ -glutamyl thiolester a receptor rozeznávající doménu. Proteázy při reakci s $\alpha 2M$ hydrolyticky rozštěpí peptidovou vazbu uvnitř „bait“ regionu. Konformační změnu inhibitoru podporuje doprovodné štěpení interního thiolesteru. Tímto způsobem zůstávají proteázy zachycené ve struktuře podobné pasti. Stále ale zůstávají aktivními k malým substrátům či polypeptidům, které jsou schopny projít strukturou této pasti. Proteiny, které jsou větší a nedokážou projít touto strukturou, nemůžou být zachyceny a rozštěpeny. Trypsin štěpí všechny čtyři štěpitelné peptidické vazby $\alpha 2M$. Plasmin dokáže štěpit polovinu těchto vazeb. Chymotrypsin štěpí 2-3 peptidické vazby. Trypsin je také na $\alpha 2M$ vázán čtyřikrát rychleji, než chymotrypsin, a stokrát rychleji než plasmin (Howell a spol., 1982).

$\alpha 2M$ je hlavní nosič TGF- β *in vivo* (Webb a spol., 1998). Cytokiny a růstové faktory jsou vázány jiným mechanismem než vazby proteáz. Jejich zachycení nepotřebuje konformační změnu $\alpha 2M$ (ale k aktivované $\alpha 2M$ konformaci vykazují daleko vyšší afinitu). Při jejich vazbě není narušená thiolesterová vazba a ani nejsou štěpeny žádné peptidové vazby (Crookston a spol., 1993). Pro vazbu TGF- β je důležitá stechiometrie komplexu $\alpha 2M$ a proteázy. Binární komplexy (1:1) $\alpha 2M$ s trypsinem a chymotrypsinem vykazují zvýšené vázání TGF- $\beta 1$ v poměru k nativnímu $\alpha 2M$. Když je $\alpha 2M$ nasycený proteázami do formy (2:1) $\alpha 2M$ - proteázových komplexů, je TGF- β vazba stejná či nižší oproti nativnímu $\alpha 2M$ (Hall a spol., 1992). Růstové faktory se neváží ireversibilně a kovalentně. TGF $\beta 1$ a TGF $\beta 2$ tvoří vysoce afinitní interakce. TGF- β vázaný na neporušený $\alpha 2M$ není rozeznávaný specifickými protilátkami. Jeho aktivita k různým buňkám je neutralizována (Hall a spol., 1992; Webb a spol., 1994). Interakce je ukončena rychlým odstraněním komplexu $\alpha 2M$ -proteáza-cytokin z cirkulující krve díky makrofágů a jejich schopnosti endocytózy, která je zprostředkována LRP receptory. Komplex je definitivně zničen ve vakuolách (Lillis a spol., 2005).

In vitro bylo dokázáno, že přibližně 30% dodaného trypsinu je zachyceno $\alpha 2M$, i přes to, že se v séru hojně vyskytují jiné inhibitory trypsinu. Množství transformovaného $\alpha 2M$

v plazmě zdravých jedinců se normálně vyskytuje mezi 0,1-1% celkového α 2M. Zřejmě existuje jeho fyziologická variabilita (Birkmeier a Stigbrand, 1993).

Zatím bylo objeveno několik společných znaků mezi lidským α 2M ($h\alpha$ 2M) a myším α 2M ($m\alpha$ 2M). Oba jsou přítomni v plazmě v konstantních koncentracích (1-2 g/l séra). Strukturálně jsou to oba tetrametrické proteiny, hrající důležitou úlohu při vychytávání proteáz. Jejich inhibice je způsobená konformačními změnami (Abe a spol., 1989). Inhibují široké spektrum proteáz velmi podobným mechanismem zachycení. Vzniklé proteázové komplexy jsou odstraňovány díky stejnému receptoru.

Schopnost vmezeřit neproteolytické ligandy byla pozorována jak u $h\alpha$ 2M, tak u $m\alpha$ 2M, přestože existují určité strukturální odlišnosti mezi těmito molekulami (Bhattacharjee a spol., 1999).

α 2M v myším séru se shoduje s $h\alpha$ 2M, vykazuje však částečnou konformační změnu, která je způsobena posttranslačním štěpením podjednotek. Molekula $m\alpha$ 2M se skládá ze čtyř podjednotek o relativní molekulové hmotnosti 165 kDa a 35 kDa. Molekula $m\alpha$ 2M je pravděpodobně daleko méně ohebná než je $h\alpha$ 2M (Bhattacharjee a spol., 2000). Menší podjednotka (35kDa) vykazuje sekvenci, která není podobná s žádnou známou α 2M sekvencí. Ve struktuře $m\alpha$ 2M chybí disulfidické můstky a cysteinové zbytky jsou nahrazeny fenylalaninovými zbytky. Přesto je $m\alpha$ 2M velmi stabilní i bez těchto dalších disulfidických můstků (VanLeuven a spol., 1992).

Do rodiny $m\alpha$ 2M patří i proteázový inhibitor muringlobulin (MUG). Má jednoduchý řetězec ($M_r = 180$ KDa), který je stejně jako α 2M nalézán v plazmě dospělých myši ve vysokých koncentracích ($c=1$ mg/ml séra), (Abe a spol., 1989).

1.4.2 α -1-antitrypsin

Kromě α 2-makroglobulinu nás musí při studiu (pro)enzymoterapie zajímat i další proteázové inhibitory, neboť ty s tímto inhibitorem kompetují a mohly by tak výsledek (pro)enzymoterapie ovlivnit. Jedním z nejdůležitějších inhibitorů je α -1-antitrypsin (α 1AT). Jedná se o glykoproteinový inhibitor trypsinu o relativní molekulové hmotnosti 54 kDa. Inhibuje širokou paletu serinových proteáz jako je trypsin, chymotrypsin a elastáza (Laurell a Jeppsson, 1975).

Při akutní fázi mnoha onemocnění se zvýší hodnoty α 1AT v séru. Toho se využívá pro diagnostiku a prognostické hodnocení. Mechanismus tohoto zvýšení je však stále nedokonale prozkoumán (Takahara a Sinohara, 1982).

V populaci bylo identifikováno více než dvacet jeho alel. S výskytem určitých alel je spojen výskyt nízkých hodnot α 1AT v séru. Tyto fenotypy jsou spojeny s mnoha chronickými nemocemi hlavně v dětství, např. rozedma plic, jaterní cirhóza, revmatoidní artritida a glomerulonefritida (Takahara a Sinohara, 1982). Intenzivně se zkoumá vztah α 1AT a patogenezi těchto poruch na již vyšlechtěných imbredních kmenech myši (Takahara a Sinohara, 1982).

Homologní proteiny byly izolovány z opice (Berninger a Mathis, 1976), koně (Pellegrini a Fellenberg, 1980), psa (Abrams a spol. 1978), králíka (Koj a spol. 1978), a potkana (Takahara a spol. 1980; Ikehara a spol. 1981). Předpokládá se, že všichni savci mají v plazmě několik homologních inhibitorů trypsinu, ale zřejmě se liší druh od druhu (Takahara a Sinohara, 1982).

Molekulová hmotnost $m\alpha$ 1AT je 53 kDa. Při pokusech byly objeveny rozdíly hodnot u $m\alpha$ 1AT mezi myšími samci a samicemi. Sérové hladiny $m\alpha$ 1AT u myších samců byly vyšší ($c=5,2 \pm 0,6$ mg/ml, $n=5$) než u samic ($c=3,5 \pm 0,2$ mg/ml, $n=5$), (Takahara a Sinohara, 1982).

1.4.3 Contrapsin a α -1-antitrypsin

Contrapsin (CONT) je ryze myší inhibitor. Mezi lidskými plazmatickými bílkovinami chybí jemu odpovídající analog. Byl objeven roku 1982 (Takahara a Sinohara, 1982). Dlouho se zkoumal jeho původ. CONT inhibuje pouze trypsin a odtud dostal svůj název (contra + trypsin), (Takahara a Sinohara, 1983).

Myší CONT a α 1AT se navzájem podobají v chemických a fyzikálně-chemických vlastnostech. Byly zkoumány UV absorpcí a CD spektroskopií. Oba tyto inhibitory serinových proteáz jsou monomerní glykoproteiny o velikosti 53-55 kDa, s 10-15% obsahem sacharidů (Wait a spol., 2005). Mají stejnou sekundární strukturu (24-29% α -helix, 31% β -sheet a 10-11% β -turn), (Takahara a spol., 1984). Jejich terciální struktura je ale podstatně odlišná, což může být příčina rozdílů v antigenicitě inhibitorů a jejich specifičnosti (Takahara a spol. 1983). Inhibiční spektrum lidského α 1AT je širší než $m\alpha$ 1AT a je blízko společné hodnoty myšího CONT a $m\alpha$ 1AT. Oba inhibitory se liší i v citlivosti k pH. Při vystavení CONT pH nižšímu než 5,8 a vyššímu než 10,3, prodělal nezvratné změny. $M\alpha$ 1AT má podobnou pH závislost, ale v širším intervalu. Při pH 11,3 byl $m\alpha$ 1AT plně aktivní, zatímco CONT ztratil asi polovinu své činnosti - zřejmě se jedná o případ, kdy dva podobné enzymy mají odlišnou stabilitu (Takahara a spol., 1984).

Předpokládá se, že myší CONT i lidský α 1AT se vyvinuly ze stejných předků jako $m\alpha$ 1AT, ale u hominidů k vývoji CONT nedošlo. Ontogeneze CONT je poněkud odlišná od $m\alpha$ 1AT (Yamamoto a spol. 1981; Takahara a Sinohara 1982a, b, 1983; Takahara a spol., 1983).

Inhibiční spektra obou ($m\alpha$ 1AT i CONT) se nepřekrývají na vzdory jejich široké specifitě. CONT inhibuje proteázy z podčelistní žlázy jako je trypsin, plazmin a další trypsin-like proteázy. Inhibice trypsinu, chymotrypsinu, elastázy je rychlá a stechiometrická, kdežto inhibice ostatních proteáz je relativně pomalá (Takahara a Sinohara, 1983). Nebyla prokázána cross reaktivita mezi CONT a antisérem specifickým na α 1AT nebo mezi α 1AT a antisérem specifickým na CONT. Podle uskutečněných pokusů (Takahara a Sinohara, 1982a, b, 1983; Takahara a spol., 1983) se zdá, že mezi těmito inhibitory u myší existuje dělba práce. Označují se jako kontrazymy (Takahara a Sinohara 1982a).

Jako u α 1AT, jsou i sérové hladiny CONT u myších samců vyšší ($c=2,8 \pm 0,2$ mg/ml, $(n=5)$) než u samic ($c=2,1 \pm 0,4$ mg/ml, $(n=5)$), (Takahara a Sinohara, 1982). Malá změna v hodnotě hladiny contrapsinu byla pozorována i po indukci zánětem (Yamamoto a spol., 1985) nebo u myší s nádory v ascitu (Yamamoto a spol., 1988).

„Contrapsin-like bílkoviny“ byly popsány u potkanů, a jsou down-regulovány zánětem (Ohkubo a spol., 1991).

1.4.4 α -1-antichymotrypsin

α -1-antichymotrypsin (α 1ACHT) patří také do rodiny serinových proteáz. Prvně byl charakterizován v plazmě jako inhibitor proteáz akutní fáze (Dickson a Alper, 1974). Je produkován hepatocyty (Chandra a spol., 1983), epiteliálními buňkami bronchů (Cichy a spol., 1995) a neurony (Hwang a spol., 1999). Hraje významnou roli při regulaci proteáz produkovaných lymfocyty během zánětlivé odpovědi (Travis a spol., 1978).

Jeho struktura a mechanismy zachycení proteáz jsou stejné jako u všech členů rodiny serpin. Tento inhibitor proteáz je velmi důležitý u lidí. U myší zřejmě jeho roli zastává α 1AT (Horvath a spol., 2005).

1.5 PROTEOMIKA A HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE

1.5.1 Proteomika

Proteomika je vědecký obor, který se zabývá globálním hodnocením exprese genetické informace na úrovni bílkovin (proteomem), rovněž však zkoumá strukturu a interakce

proteinů. Exprese proteinů v rámci jednoho organismu se liší. Dva nejzákladnější nástroje proteomiky jsou 2D gelová elektroforéza a hmotnostní spektrometrie (MS). V posledních 20 letech tvořily 2D gely jádro proteomických technologií a byly použity u většiny prací týkajících se krevní plazmy. Tato technika má několik nevýhod, jako je nedostatečná schopnost separovat kyselé a bazické proteiny a proteiny s malou (<15 kDa) nebo naopak velkou (>200 kDa) molekulovou hmotností, reprodukovatelnost, pracnost a časová náročnost. S MS jde oproti tomu dosáhnout lepších výsledků ve všech výše uvedených bodech, avšak je finančně náročnější.

V proteomice se skrývá velký potenciál pro aplikaci v medicíně. Jedním z použití je zjištění úlohy proteinů u nemocí a hledání jejich biomarkerů. Tyto informace jsou pak využity na vývoj nových či individuálních léků.

Charakteristika proteinů lidské plazmy postupuje rychle. Kromě “klasických” plazmatických proteinů, které zprostředkovávají její funkce, obsahuje také všechny proteiny uvolňující se z tkání, množství různých protilátek a látek hormonální povahy. Vedle bohatého spektra proteinů, jsou tyto proteiny v plazmě zastoupeny v širokém rozmezí koncentrací. Koncentrace některých těchto proteinů je ve srovnání s albuminem až o deset řádů nižší (Liu a spol., 2006), což výrazně znesnadňuje analýzu. Proteomické analýze jiných savců se dostává ještě mnohem méně pozornosti. Existují již dříve publikované studie proteinů v séru *Rattus norvegicus* (Haynes a spol., 1998; Miller a spol., 1998; Gianazza a spol., 2002), *Bos taurus* (Wait a spol., 2002) a *Equus caballus* (Miller a spol., 2004) a probíhají práce na prasečím a psím séru. (Miller a spol. nepublikované). Proteomické studie myších tělních tekutin nejsou časté (Wait, 2005).

1.5.2 Obecný úvod o MS

Hmotnostní spektrometrie (MS) je analytická metoda pro identifikování chemických látek díky zjištění jejich hmotnosti. Zkoumané molekuly jsou charakterizovány svou hmotností a tou se vzájemně odlišují. Hmotnostní spektrometr generuje ze vzorku ionty v plynné fázi, rozděluje je podle poměru hmoty a náboje (m/z) a zaznamená hmotnostní spektrum. Hmotnostní spektrum je v podstatě grafické znázornění závislosti četnosti iontů na hodnotě m/z (hmotnost / náboj).

Při fragmentaci organických látek pro MS existují určitá pravidla. To je hlavním důvodem, proč je na základě fragmentace struktury analytu možné definovat molekulovou

hmotnost, elementární složení, přítomnost některých funkčních skupin, a často i strukturu analytu (Ekman a spol., 2009).

MS patří mezi unikátní metody pro svou specifitu, rychlost, jednoduchou interpretaci dat a citlivost (moderní MS dokáží bezpečně detekovat analyt již při 10^{-21} mol/l ve vzorku), (Ekman a spol., 2009). MS se stala v posledních dvaceti letech jednou z hlavních používaných technik zejména v oboru analytické chemie a analýzy biologických (makro)molekul. MS má široké využití při správné konfiguraci komponent hmotnostního spektrometru. Může sloužit k určení izotopového složení elementů uvnitř vzorku, detekci stopových množství látek (Lee a Kerns, 1999), studiu farmakokinetiky (Cheng a Hochlowski, 2002) či charakterizaci proteinů (Smith a spol., 1997). Další, již velmi speciální využití, je v astronomii při průzkumu vesmíru (např. měření složení atmosféry).

Tento vývoj byl spuštěn objevem nových technik. Zejména po vývoji technik uvedení molekuly do plynné fáze a posléze do vakua hmotnostního analyzátoru, a techniky detekce neutrální molekuly. V obou těchto krocích docházelo často k vnitřní excitaci molekul a tím i ztrátě analytických dat (Busch, 2000).

1.5.2.1 Konstrukce hmotnostních spektrometrů

Hmotnostní spektrometr je složitý přístroj, který může být sestaven z různých kombinací komponent. Každý typ komponenty je většinou uzpůsobený pro určitý typ vzorků (např. jen pro sacharidy, jen proteiny, atd.). Přístroje se v principu sestávají z těchto na sebe navazujících součástí: A/ separační část, B/ ionizační nebo desorbčně/ionizační část, C /analyzátor a D/ detektor.

A/ Separací část. Účelem je rozdělení původně často velmi složitých směsí (Ekman a spol., 2009).

B/ Ionizační nebo desorbčně/ionizační část. Účelem této části je ionizovat materiál (vzorek) podle typu analýzy či analytu. Ionty jsou přenášeny pomocí elektromagnetického pole na hmotnostní analyzátor. Pro chemickou nebo elektronovou ionizaci se používají plyny a páry. Ionizační metody jsou velmi rozmanité. Nejběžnějšími metodami jsou ionizace elektrosprejem (ESI), Matrix-assisted laser desorpce/ionizace (MALDI) či ionizace indukční plazmou (Inductively Coupled Plasma, ICD). Při ESI je kapalina obsahující analyt rozptýlena elektrosprejem do jemného aerosolu. Základem MALDI je matrice, na kterou se nanese rozpuštěný vzorek, ozáří se laserovým paprskem, a díky následným reakcím dojde k ionizaci vzorku. ICD je tvořena trvalým proudem plazmy, do kterého je přiváděn plyn (nejčastěji

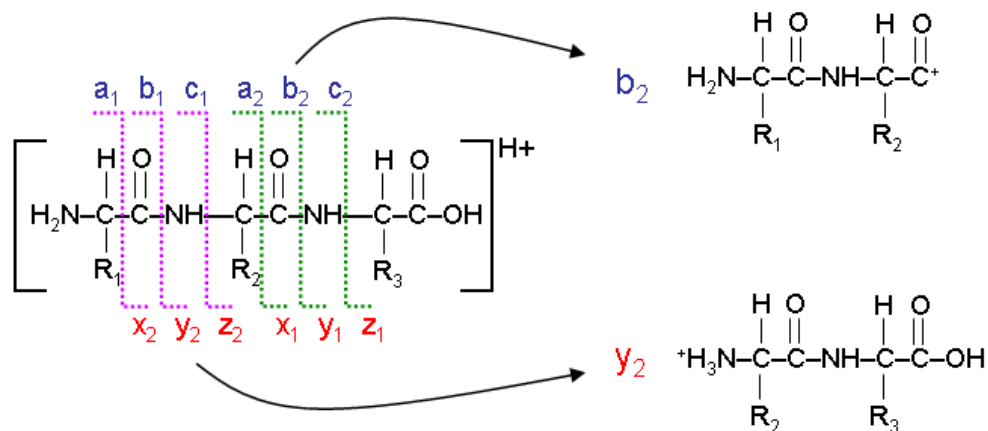
argon) a teplota plazmy způsobí rozpad vzorku na jednotlivé atomy. Tyto techniky jsou zcela odlišné a zároveň i jejich použití se uplatňuje v rozdílných oblastech. MALDI a ESI byly vyvinuty zcela nezávisle na sobě a na trhu se objevily v roce 1988 (Ekelman a spol., 2009).

C/ Analyzátor. Toto zařízení je schopno rozdělit od sebe látky jako jsou ionty, molekuly nebo shluky nabitých peptidů na základě jejich hmotnosti. Existuje opět mnoho typů, využívající elektrostatické či elektromagnetické pole, ale principiálně všechny fungují na fyzikálních zákonech popisujících pohyb nabitých částic v poli. Každý typ analyzátoru má své silné a slabé stránky. Mnoho hmotnostních spektrometrů používá dva nebo více hmotnostních analyzátorů pro tandemovou hmotnostní spektrometrii (MS/MS). Mezi běžné analyzátory patří Time-of-Flight (TOF), Quadrupole Mass Filter (QMS), Quadrupole Ion Trap (QIT). TOF analyzátor využívá elektrostatického pole k urychlení iontů přes stejný potenciál a poté měří čas potřebný k dosažení detektoru. QMS využívá oscilující elektrické pole, aby selektivně stabilizovalo nebo destabilizovalo trajektorii procházejících iontů. QIT funguje na stejných fyzikálních principech jako QMS, ale ionty jsou lapeny v pasti a následně vypuštěny k detektoru. Existuje lineární a 3D QIT (Ekelman a spol., 2009).

Existuje také speciální typ hmotnostního spektrometru - trojitý kvadrupólový hmotnostní spektrometr. Je to MS/MS zapojený v sérii a mezi nimi je kolizní cela. V kolizní cele dochází k fragmentaci iontů (molekul, atd.). První z hmotnostních spektrometrů (Q1) a třetí (Q3) slouží jako QMS. Prostřední (Q2) slouží ke kolizi s použitím inertního plynu jako je argon, helium nebo dusík. Tohoto se využívá při studiu struktur původních iontů.

Při fragmentaci se nabité peptidy se rozpadnou na dvě či více částí. Fragmenty mohou být různé, ale upřednostňuje se štěpení v místě peptidické vazby. Nejběžnějšími peptidovými fragmenty pozorovanými v nízkoenergetických kolizích jsou tedy b a y ionty. B ionty se vyskytují v nižších frekvencích a jsou často používány jako diagnostické. Fragmentace je poněkud náhodná a rozhodně ne sekvenční.

De Novo sekvenování peptidů (Obr. 1) je softwarové poskládání sekvence peptidu z fragmentů, bez porovnání s databází.



OBR. 1: SCHÉMA FRAGMENTACE DE NOVO (INTERNETOVÉ STRÁNKY MONROE M.).

Fragmenty jsou různě dlouhé a mají i různé hmotnosti. Podle rozdílů mezi nimi se peptid identifikuje (Obr. 2).



OBR. 2: UKÁZKA NALEZENÝCH FRAGMENTŮ A IDENTIFIKACE PEPTIDU.

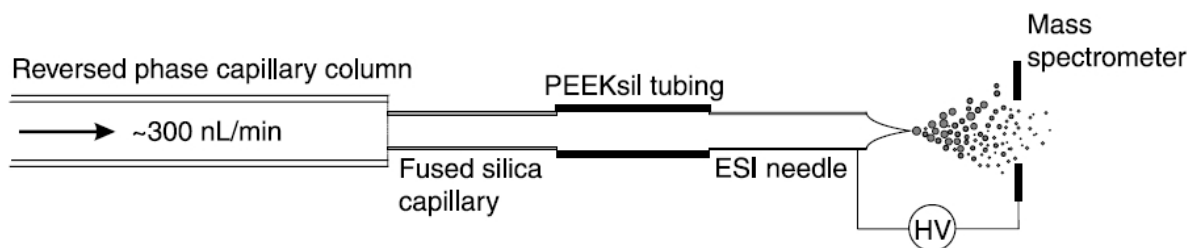
D/ Detektor. Účelem této části je převést energii iontu na elektrický signál. Ten registruje elektronické zařízení a přivádí ho do počítače, kde se sbírají data. Často se používají hybridy různých typů detektorů (Eklman a spol., 2009).

1.5.3 Principy metod na námi používaném přístroji

Pro analýzu vzorků myších sér z experimentu L.Kalfestrové byl použit přístroj Q-ToF Premier vyrobený firmou Waters. Nano Acquity UPLC je on-line připojena na hmotnostní spektrometr typu ESI-Q-TOF (ukázka výstupu viz. Obr. 3). Kombinace jednotlivých částí tohoto hmotnostního spektrometru je zvláště výhodná k analýze peptidů. Ionizace elektrosprejem je zvláště vhodná pro kvantifikaci (Eklman a spol., 2009).

1.5.3.1 Ultra Performance Liquid Chromatography

První součástí systému je Ultra Performance Liquid Chromatography. Vznikla zvýšeným účinností High Performance Liquid Chromatography (HPLC). Na rozdíl od HPLC pracuje UPLC s tisícinásobně vyšším tlakem 10 000 PSI (68,9475 MPa). Rovněž průtok kolonou je oproti HPLC (desítky ml/min) u UPLC (stovky nl/min) lépe přizpůsoben menší spotřebě vzorku. Objem kolony u UPLC je mnohem menší.



OBR. 3: UKÁZKA ON-LINE ZAPOJENÍ UPLC NA ESI MS (EKELMAN A SPOL., 2009).

1.5.3.2 Ionizace elektrosprejem

Následuje ionizace elektrosprejem (ESI). Ta byla poprvé zavedena v roce 1968 Dolem a spolupracovníky. Ve spojení s MS byla použita v roce 1984 Yamashitou a Fennem. Typ ESI byl použit ve spojení se všemi běžnými hmotnostními analyzátory. V režimu pozitivní ionizace se často přidávají roztoky kyseliny mravenčí nebo kyseliny octové o nízké koncentraci (0,1%), která napomáhají protonizaci analyzovaných molekul.

V ESI je vzorek rozpuštěn v polárním těkavém rozpouštědlu a transportován přes jehlu nastavenou na vysoké napětí s opačnou polaritou vzhledem k ústí trysky (Yamashita a Fenn, 1984; Aleksandrov a spol., 1984; Fenn a spol., 2000). Vysoké elektrické napětí (1-4 kV)

mezi jehlou a tryskou způsobuje, že se tekutina zformuje do tzv. Taylorova kuželu. Na špičce tohoto kuželu jsou nejvíce koncentrovány kladně nabitě peptidy (viz Obr. 4).

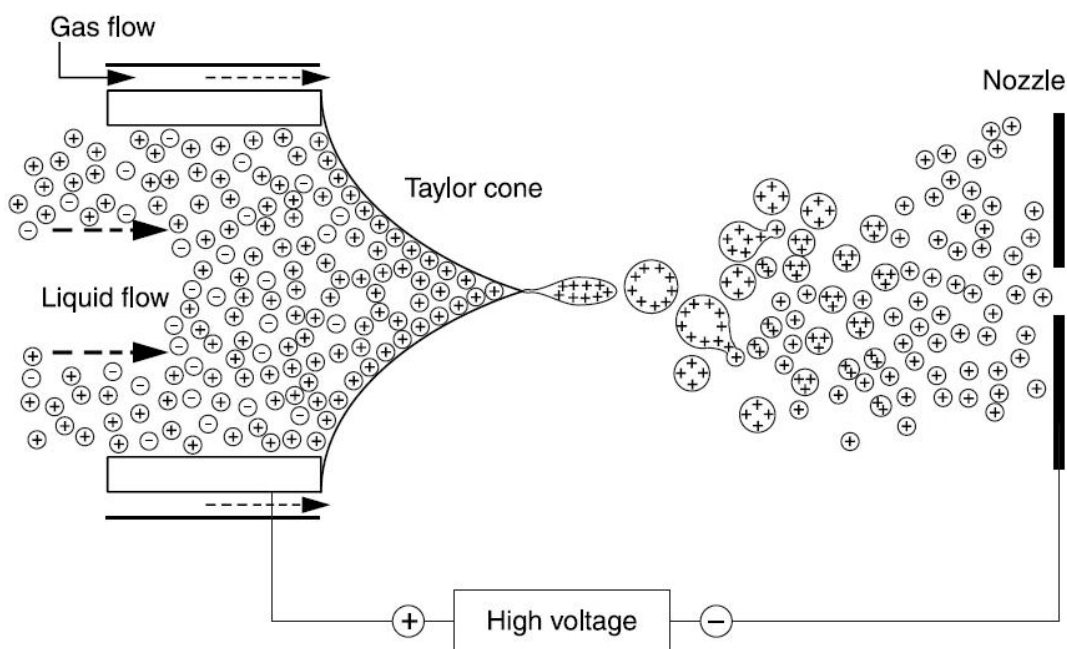
Z Taylorova kuželu je pak vypuzován elektrickým polem sprej nabitých kapiček. Kapičky se smršťují díky vypařování a zvyšujícímu se kladnému náboji na povrchu, který sám sebe odpuzuje a tím fragmentuje kapičky. Toto je do značné míry podporováno prouděním plynného dusíku přes přední část ionizačního zdroje. Celá struktura je vyhřívána na 80 °C. Nabitě peptidy vznikají při atmosférickém tlaku a jsou nasávány skrz otvor kuželovitého tvaru do střední části s vakuem a poté nepatrným otvorem do části s hmotnostním analyzátozem, kde je rovněž vakuum. Přesný mechanismus vzniku iontů z nabitých kapiček nebyl dosud plně objasněn, ale navrhuje se několik různých teorií (Dole a spol., 1968; Mora a spol., 2000; Iribarne a Thomson, 1976).

ESI je velmi jemná ionizační metoda s velmi malou schopností fragmentovat vytvořené peptidy. Tato metoda je velmi citlivá na kontaminace. Kvantifikace lze dosáhnout pomocí dobře zvoleného vnitřního standardu o známé koncentraci a chemické podobnosti kvantifikované molekuly (Carrascal a spol., 1998).

ESI-MS je citlivá metoda, dokáže detekovat nízké hladiny koncentrací (femto či attomolární) mnoha peptidů.

Nano-ESI je novější typ ESI s nízkou rychlostí proudění (300 až 400 nl/min). Spotřeba vzorku je výrazně nižší než u klasické ESI. Zároveň lépe spolupracuje s UPLC.

Důležitým rysem ESI je, že má schopnost vytvořit i vícenásobně nabitě peptidy. To umožňuje provádět analýzu i u velkých proteinů (např. α -2-makroglobulin), (Ekelman a spol., 2009).



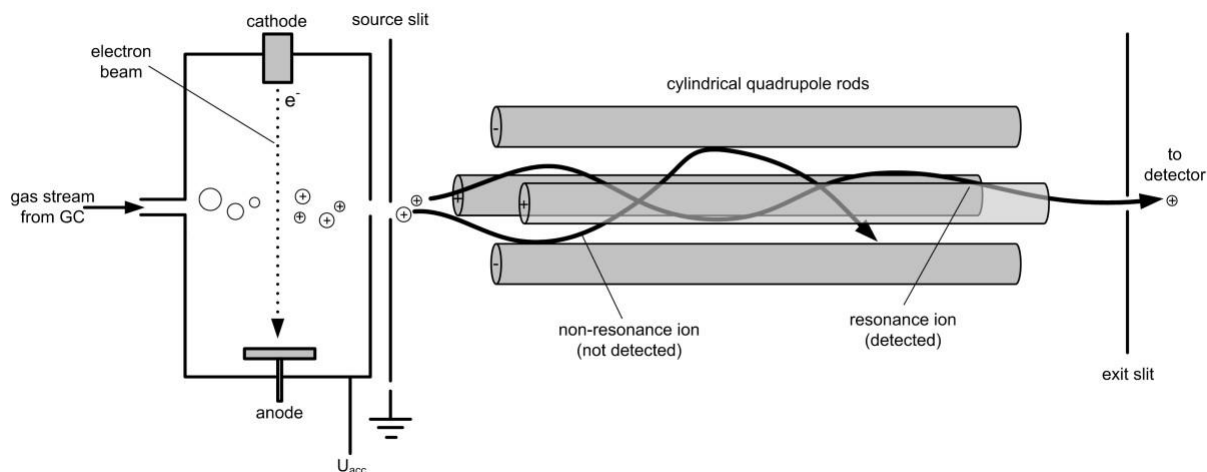
OBR. 4: SCHÉMA IONIZACE ELEKTROSPEJEM (EKLMAN A SPOL., 2009).

1.5.3.3 Mass filter

Hmotnostnímu analyzátoru TOF předchází kvadrupolový Mass filter (Q-TOF). Umožňuje průchod pouze nabitým peptidům v určitém rozmezí poměrů m/z . Odfiltruje vše, co je mimo oblasti zájmu (Obr. 5). To usnadňuje analýzu a zmenšuje objem dat ke zpracování.

Základní principy kvadrupolového hmotnostního filtru byly zveřejněny v roce 1953 (Paul a Steinwedel, 1953, 1960). Zařízení se skládá ze čtyř paralelně a symetricky umístěných tyčí. Paralelní tyče jsou elektricky spojené ve dvojicích. Každá z dvojic má v dané chvíli potenciál o stejné velikosti, ale s opačným nábojem. Střídáním potenciálů se mění trajektorie nabitých peptidů. Nabité peptidy se urychlují v cyklech potenciálů s hodnotami v rozmezí 5 – 20 V. U těch peptidů, které se liší poměrem m/z od zvoleného rozmezí, dojde dříve nebo později ke kolizi s tyčemi a následné ztrátě náboje. Nabité peptidy s nízkou hmotností reagují rychleji.

Mass filter má dva módy filtrace. Může filtrovat pouze námi určenou jednu látku (úzký rozptyl poměrů m/z) nebo filtrovat určitou skupinu látek (širší rozptyl poměrů m/z), (Ekelman a spol., 2009).

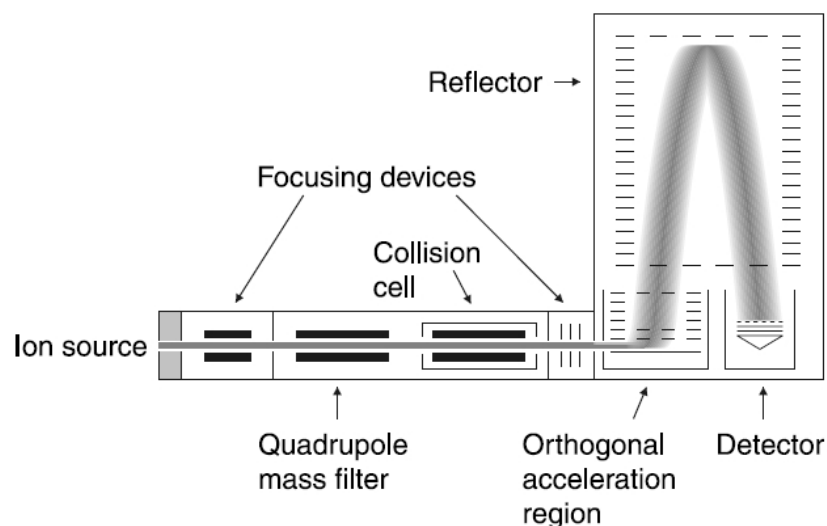


OBR. 5: SCHÉMA ZAPOJENÍ Q-MASS FILTRU. NA OBRÁZKU JE JINÁ SKLADBA OSTATNÍCH KOMPONENT NEŽ NA NÁMI POUŽÍVANÉM PŘÍSTROJI (Wittmann 2007).

1.5.3.4 Hmotnostní analyzátor a detektor

Hmotnostní analyzátor Time-of-flight (TOF) rozděluje nabité peptidy podle časového rozdílu mezi vypuštěním a pulsem vzniklým při nárazu na detektor. Detektor funguje na principu vypuštění skupiny nabitých peptidů do elektromagnetického pole, čímž je jejich dráha vychylována do tvaru písmene V. Ve vrcholu tohoto V jsou částice vychylovány tím více, čím větší je jejich hmotnost. Ta určuje jejich rychlost a tím zároveň „dobu letu“ (Time-of-flight). Na detektor dopadnou v různém čase a s různou velikostí signálu. Tyto hodnoty byly experimentálně určeny a byla vytvořena databáze, podle které jsou údaje dále vyhodnocovány a zpracovávány softwarem.

Hmotnostní analyzátor má dva typy nastavení. Může být ve tvaru jednoduchého V (Obr. 6), tehdy upřednostňuje velikost signálu na úkor jeho vyššího rozlišení. Druhým typem nastavení je hmotnostní analyzátor ve tvaru písmene W a jeho preference jsou opačné vůči typu V.



OBR. 6: SCHÉMA TOF ANALYZÁTORU S Q-MASS FILTEREM (EKLMAN A SPOL. 2009).

Na TOF hmotnostní analyzátor navazuje detektor. Elektronový násobič (EM, electron multiplier) je typ detektoru, který zesiluje slabý proud přichozích částic pomocí řady sekundárních emisních elektrod neboli dynod. Když nabitý peptid dopadne na dynodu, převede svou energii přímo na elektrony v materiálu dynody a sekundární elektrony, které vypustil. Je dnes nejpoužívanějším typem detektoru při MS a má řadu podtypů.

Jedním z nich je microchannel plate (MCP, někdy také multichannel plate), (Wiza, 1979). MCP se skládá ze soustavy paralelně uspořádaných elektronznásobujících kanálků (Ekelman a spol., 2009).

2. CÍLE PRÁCE

1. Zvládnutí metodiky stanovení α -2 makroglobulinu, α -1 antitrypsinu a contrapsinu v séru pomocí MS.
2. Sledování dynamiky antiproteáz u myší s nádory, myší léčených (pro)enzymoterapií a u kontrolních myší nevystavených působení (pro)enzymů.
3. Vyhodnocení analýz a posouzení možných mechanismů.

3. MATERIÁL A METODY

3.1 EXPERIMENT LUCIE KALFESTROVÉ

3.1.1 Laboratorní zvířata

Při pokusu byly použity samice SPF myšího kmenu C57BL/6 (Charles River). Na počátku pokusu byly myši staré 8 měsíců a vážily 19-21g. Myši byly chovány ve standardních podmínkách ve zvěřinci Parazitologického ústavu Biologického centra AV ČR v Českých Budějovicích. Krmeny byly standardní komerční granulovanou stravou a vodou ad libitum.

3.1.2 Buněčné linie

Použity byly nádorové buňky melanomu B16-F10 (dar prof. Říhové, MBÚ AV ČR, Praha). Buňky byly kultivovány v RPMI 1640 obsahujícím 10% fetálního bovinního séra a antibiotika (Sigma). Kultivace probíhala v termostatu při 37°C v atmosféře nasycené vodními parami a obsahující 5% oxidu uhličitého.

3.1.3 Transplantace nádoru

Bylo oholeno 78 samic C57BL/6 (záda, pravá strana dole). Příprava buněk - médium (RPMI s 10% FCS) bylo slito, buňky byly dvakrát promyty větším množstvím PBS. Následovalo krátké opláchnutí adheovaných buněk trypsinizační směsí (0,02% trypsin, 0,5 mM EDTA v PBS). Poté se k nim přidalo cca 0,5 ml trypsinizační směsi. Následovala 1-5 minutová inkubace při 37°C, dokud nedošlo k zakulacení a uvolnění buněk. Poté se k buňkám přidalo 5 ml RPMI s 10% FCS a buňky byly centrifugovány 10 min při 40°C a přetížení 150g. Následně byly buňky dvakrát centrifugačně promyty s RPMI bez séra za stejných podmínek centrifugace. Promyté buňky byly resuspendovány v 5 ml RPMI a poté spočítány (Trypanová modř, medium s buňkami, 1:1). Výsledná koncentrace buněk byla upravena na 5 mil/ml. Myším bylo s.c. transplantováno 500 000 buněk B16-F10 v 0,1 ml RPMI bez séra. Po transplantaci buněk melanomu B16-F10 byly myši pozorovány, aby byl včas zachycen rozvoj nádorů. 10. den po transplantaci bylo 48 myší shledáno pozitivních. Nádory byly změřeny kaliperem a myši podle jejich velikosti rovnoměrně rozděleny do šesti skupin. Do každé skupiny bylo poté přidáno 6 myší, u kterých se nádor prozatím nerozvinul. Tentýž den byla zahájena níže uvedená terapie.

3.1.4 Složení podávaných roztoků

Beta glukan

Beta glukan byl získán jako dar (Transfer Point, USA). Použit byl produkt Beta-1,3-D glukan, 500 mg na kapsli (v kapslích se beta glukan nachází čisté formě). Beta glukan od Transfer Point byl v experimentálních testech vyhodnocen jako neúčinnější (Vetvicka a Vetvickova, 2007). Myším byly podávány 3 mg beta glukanu resuspendované v 0,05 ml vody. Pro perorální aplikaci byla připravena suspenze 60 mg beta glukanu na 1 ml vody.

Proenzymoterapie

- 24 mg amylázy (A6380), aktivita: 2050 maltose U/mg protein
- 33,6 mg trypsinogenu (T1143), aktivita: 11300 BAEE U/mg protein
- 33,6 mg α -chymotrypsinogenu A (C4879), aktivita: 56 BTEE U/mg solid (po akt.), (1 U před aktivací)
- Vše na 60 ml fyziologického roztoku, sterilizováno filtrací, pak zamražení po 1,5 ml.

Enzymoterapie

- 24 mg amylázy (A6380), aktivita: 2050 maltose U/mg protein
- 2,8 mg trypsinu (T1426), aktivita: 13 500 BAEE U/mg protein
- 3,42 mg α -chymotrypsinu (C4129), aktivita: 55 BTEE U/mg solid
- Vše na 60 ml fyziologického roztoku, sterilizováno filtrací, potom zamražení po 1,5 ml.

3.1.5 Terapie u jednotlivých skupin

Skupina I (beta glukan)

Myším v této skupině bylo denně perorálně podáváno 0,05 ml suspenze beta glukanu (= 3 mg beta glukanu). K perorálnímu podání suspenze myším byla používána mikropipeta.

Skupina II (kombinovaná terapie - beta glukan + proenzymoterapie + enzymoterapie)

V této skupině byl myším denně podáván beta glukan jako ve skupině I. K tomu zde byla aplikována proenzymoterapie kombinovaná s enzymoterapií.

Proenzymoterapie – v liché dny (počítání dnů bylo započato spolu s vlastní terapií) se

myším i.m. do levé zadní nohy podávalo 0,1 ml proenzymové směsi.

Enzymoterapie – v sudé dny se myším i.m. do pravé zadní nohy podávalo 0,1 ml enzymové směsi.

Skupina III (kombinovaná terapie - proenzymoterapie + enzymoterapie)

V této skupině byla použita proenzymoterapie kombinovaná s enzymoterapií.

Proenzymoterapie – v liché dny (počítání dnů bylo započato spolu s vlastní terapií) se myším i.m. do levé zadní nohy podávalo 0,1 ml proenzymové směsi.

Enzymoterapie – v sudé dny se myším i.m. do pravé zadní nohy podávalo 0,1 ml enzymové směsi.

Skupina IV (proenzymoterapie)

U myší v této skupině byla aplikována pouze proenzymoterapie. Podávání probíhalo pouze v liché dny - 0,1 ml proenzymové směsi i.m. do levé zadní nohy.

Skupina V (enzymoterapie)

V této skupině byla aplikována pouze enzymoterapie. Myším bylo v lichých dnech i.m. do levé zadní nohy podáváno 0,1 ml enzymové směsi.

Skupina VI (kontrola)

Tato skupina byla určena jako kontrolní, myším nebylo nic podáváno.

3.1.6 Měření velikosti nádorů

V obou pokusech byl růst nádorů sledován. Nádory byly dvakrát týdně měřeny pomocí kaliperu. Měřily se tři hodnoty (šířka, délka, výška), podle kterých se vypočítal pravděpodobný objem jednotlivých nádorů (Inaba a spol., 1986).

3.1.7 Příprava vzorků séra

Krev byla myším odebírána z ocasní žíly před pokusem, dále 17. a 29. den pokusu. Po vysrážení a centrifugaci byly spojeny stejné alikvoty sér v rámci jednotlivých skupin a tak získáno 13 vzorků pro další analýzy (1. vzorek před experimentem, 6 vzorků 17. den z jednotlivých skupin, 6 vzorků 29. den z jednotlivých skupin).

3.2 ANALÝZA VZORKŮ SÉR Z POKUSU L. KALFESTROVÉ

3.2.1 Vzorky a chemikálie

Na analýzu byly použity 500x zředěné vzorky poolovaných myších sér v aminobikarbonátovém roztoku (ABC, $c=100$ mmol/l, Sigma). Jako vnitřní standard byla použita enoláza ($c=1250$ fmol/ μ l, Sigma) z kvasinek *Saccharomyces cerevisiae*. Vzorek byl štěpen trypsinem ($c=100$ ng/ml, Proteomic grade, Sigma). Lyofilizovaný trypsin byl ředěn v HCl ($c=100$ mM, Penta). Do chromatografické kolony byla použita voda z filtračního přístroje MilliQ[®] (Millipore), acetonitril (Sigma), kyselina mravenčí (0,1%, Fluka). Při filtraci byly použity centrifugační mikrofiltry Microcon (MWCO10 000Da, Millipore). Při analýze v MS byly použity skleněné mikrozkušavky (12x32 mm Glass screw neck vial, Lectra bone cap, PTFE/silicone septa, Waters).

3.2.2 Metodika

3.2.2.1 Příprava vzorku pro digesci a digesce

Vzorky i všechny chemikálie (kromě ABC) byly uchovávány v koncentrovaných zásobních roztocích při -20°C .

Při přípravě vzorku bylo postupováno podle následujícího protokolu.

První den:

- rozmražení séra
- krátké zvortexování séra
- zředění séra v poměru 1:500 v ABC
- zajištění uzávěru mikrozkušavky prafilmem
- vložení na 10 minut do předehřátého thermoblocku na 100°C
- zchlazení roztoku
- rozmražení a naředění enolázy a trypsinu ze zásobních roztoků
- příprava vzorku o složení:
 - 46 μ l 500x zředěného a následně povařeného myšího séra
 - 2 μ l enolázy o koncentraci 1250 fmol/ μ l
 - 2 μ l trypsinu o koncentraci 100 ng/ml

- krátká centrifugace (30s při přetížení 10 000 g)
- termostat po dobu 12-16 hodin při 37°C .

Druhý den:

- filtrace přes centrifugační mikrofiltry Microcon při přetížení 10 000 g po dobu 40 minut
- přemístění filtrátu do skleněných mikrozkušavek

Poté následuje umístění do řadiče vzorků v MS a vlastní analýza vzorků.

3.2.2.2 UPLC a MS

Naštěpené vzorky byly analyzovány na Nano Acquity UPLC (Waters) on-line připojené na MS. Parametry chromatografické kolony popisuje Tab. 5.

TAB. 5: TECHNICKÉ PARAMETRY KOLONY.

Materiál	Název	Bridged Ethyl Hydrid
	Vlastnosti	Hydrofobní /reverzní fáze
	Délka řetězce	18 C
Rozměry	Délka	150 μ m
	Vnitřní průměr	75 μ m
	Velikost částic v koloně	1,7 μ m

Průtok kolonou byl 400 nanolitřů za minutu. Postupně se v ní zvyšoval poměr acetonitrilu z 3% na 60% vůči vodě. Délka gradientu chromatografie byla 60 minut. Po skončení gradientu následovalo promytí 85% roztokem acetonitrilu po dobu 15 minut a poté návrat na 3% koncentraci acetonitrilu. Z kolony byl vzorek veden přímo k ESI. K fragmentaci peptidů byla použita metoda postupné změny srážkové energie při střídajících se scanech (o hodnotách 5V a 15-35V).

3.2.2.3 Softwarové zpracování

Po analýze naštěpených vzorků v MS byly údaje vyhodnocovány pomocí softwarového nástroje od společnosti Waters – PLGS 2.3.

Surová data byla sbírána metodou MS^E (Identity). Z těchto dat se zpracovávají data potřebná k výrobě hmotnostního spektra. Používá se algoritmus deizotopizace. Signály všech izotopů se převedou na monoizotopickou hmotnost pomocí nástroje Max Ent 3. Fragmenty se přiřazují k prekursoru pomocí jedenácti matematických operací. Hlavní čtyři by se daly formulovat takto :

- Retenční časy jednotlivých fragmentů, které byly přiřazeny k jednomu peptidu, by měly být při chromatografickém měření podobné.
- Výška peaku každého z fragmentů (přiřazeného k jednomu peptidu) by měla být podobná výšce peaku ostatních fragmentů tohoto peptidu (všechny fragmenty jednoho peptidu by vůči sobě měly být ve vzorku v ekvimolárním množství).
- Teoretická hmotnost peptidu, vzniklá po sečtení hmotností jeho fragmentů, by se měla rovnat skutečné hmotnosti daného peptidu.
- Teoretická hodnota celkového náboje peptidu, vzniklá po sečtení náboje jednotlivých fragmentů, by se měla rovnat skutečné hodnotě celkového náboje.

Hodnoty celého měření se vystředí pomocí vnitřní standardní hodnoty Lock Mass. Dojde ke korekci šumu, kdy se stanoví hladina, od které už není signál považovaný za šum.

Hmotnostní spektrum bylo porovnáno s databází druhově specifickou (myši - *Mus musculus*) a druhově nespecifickou (UniProt). Tyto databáze přiřadily jednotlivé peptidy k proteinům, ze kterých byly pravděpodobně naštěpeny. Pro identifikaci peptidu je potřeba minimální počet tří jeho fragmentů. K identifikaci proteinu je třeba nalézt devět jeho fragmentů a tři jeho peptidy. Koncentrace se vypočítává z poměrů proteinů k vnitřnímu standardu (enoláza, $c=50$ fmol/l). Ten má známou koncentraci, která se nastaví jako měřítko. Na základě výšky peaků ostatních proteinů k peaku standardu se vypočítá koncentrace jednotlivých proteinů.

K analýze a srovnání výsledků jednotlivých vzorků a skupin vzorků byla využita funkce Expression Analysis téhož programu. U této metody je možnost sledování up- či downregulací analyzovaných proteinů. Ke statistickému vyhodnocení, výpočtu průměrů, směrodatných odchylek a tvorbě grafů byl využit program Microsoft Excel 2003.

4. VÝSLEDKY

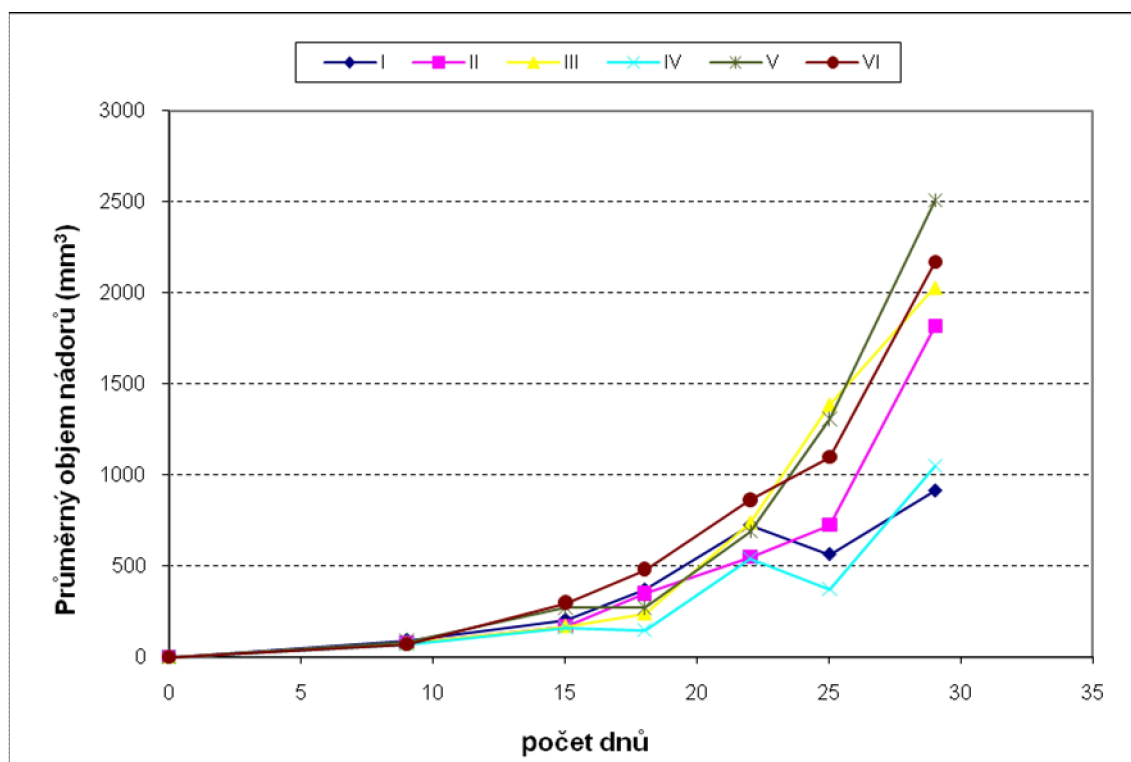
4.1 VÝSLEDKY PRÁCE LUCIE KALFERSTOVÉ

Ve všech vyhodnoceních, která byla provedena, bylo počítáno pouze s myšmi, u kterých se nádor (i během pokusu) uchytil. V tomto pokusu se nádor neuchytil u 21,8% ze všech myší, kterým byl nádor transplantován. Výsledný počet myší, u kterých se nádor uchytil, a které byly zahrnuty do pokusu, byl tento: skupina I - 11 myší, skupina II - 11 myší, skupina III - 9 myší, skupina IV - 8 myší, skupina V - 10 myší a skupina VI - 12 myší.

4.1.1 Vliv terapie na velikost nádoru

Jedním z hlavních sledovaných parametrů byla velikost nádoru u myší.

Nádory byly měřeny dvakrát týdně do doby počátku většího úhynu myší. Z naměřených hodnot byly vypočítány průměrné objemy nádorů ve skupině (Obr. 7).



OBR. 7: PRŮMĚRNÁ VELIKOST NÁDORU U JEDNOTLIVÝCH SKUPIN BĚHEM PRŮBĚHU POKUSU. I- BETA GLUKAN, II- BETA GLUKAN + PROENZYMOTERAPIE + ENZYMOTERAPIE, III- PROENZYMOTERAPIE + ENZYMOTERAPIE, IV- PROENZYMOTERAPIE, V- ENZYMOTERAPIE, VI- KONTROLA (KALFERSTOVÁ, 2008)

Největší redukce nádorového růstu byla zaznamenána ve skupinách I a IV. (beta glukan a proenzymoterapie). V období 15.- 29. den experimentu beta glukan snížil růst nádorů na 50,1% kontroly, směs proenzymů pak dokonce na 42,1% kontroly. Rozdíl velikostí nádorů ve skupinách IV a VI byl 25. den pokusu statisticky významný, ($P \leq 0,05$).

Enzymoterapie se ukázala jako neúčinná a rovněž tak neúčinné byly pokusy o kombinovanou terapii.

4.2 VÝSLEDKY MS ANALÝZY VZORKŮ SÉR Z JEDNOTLIVÝCH SKUPIN – EXPERIMENT L. KALFERSTOVÉ

Základní metoda analýzy byla postupně upravována spolu s Mgr. Koníkem (Laboratoř strukturní biologie), aby bylo dosaženo optimálních poměrů množství komponent a kvality výsledků. Základem optimalizace bylo zvolení vnitřního standardu. Ten by měl mít podobnou strukturu a vlastnosti námi sledovaných analytů. Zároveň by však neměl být zaměnitelný s jiným proteinem obsaženým ve vzorku. Enolázu jsme použili pro její snadnou dostupnost. Pro dosažení optimálních výsledků bylo třeba najít správnou koncentraci tohoto vnitřního standardu ve vzorku. Po sérii zkušebních analýz jsme stanovili konečnou koncentraci enolázy ve vzorku na $c=50$ fmol/ μ l jako optimální.

Zároveň bylo třeba zjistit optimální naředění krevního séra myši. Po sérii zkušebních analýz jsme dospěli k ředění v poměru 1:500 myšního séra v aminobikarbonátovém roztoku (ABC).

Koncentrace trypsinu ve vzorku není příliš podstatná, stačí se pouze držet nad minimální hraniční hodnotou.

Následně bylo třeba vhodně zvolit samu analýzu. Po sérii zkušebních analýz jsme stanovili optimální protokol pro vzorky ze séra pro MS měření. Tento protokol je výsledkem kompromisu mezi dobou trvání analýzy a počtem identifikovaných proteinů. Pro tuto práci byly podstatné pouze tři analyty (α 2M, α 1AT a CONT). Identifikovat či kvantifikovat proteiny s menší relativní molekulovou hmotností by bylo možné, avšak délka analýzy by byla značně delší.

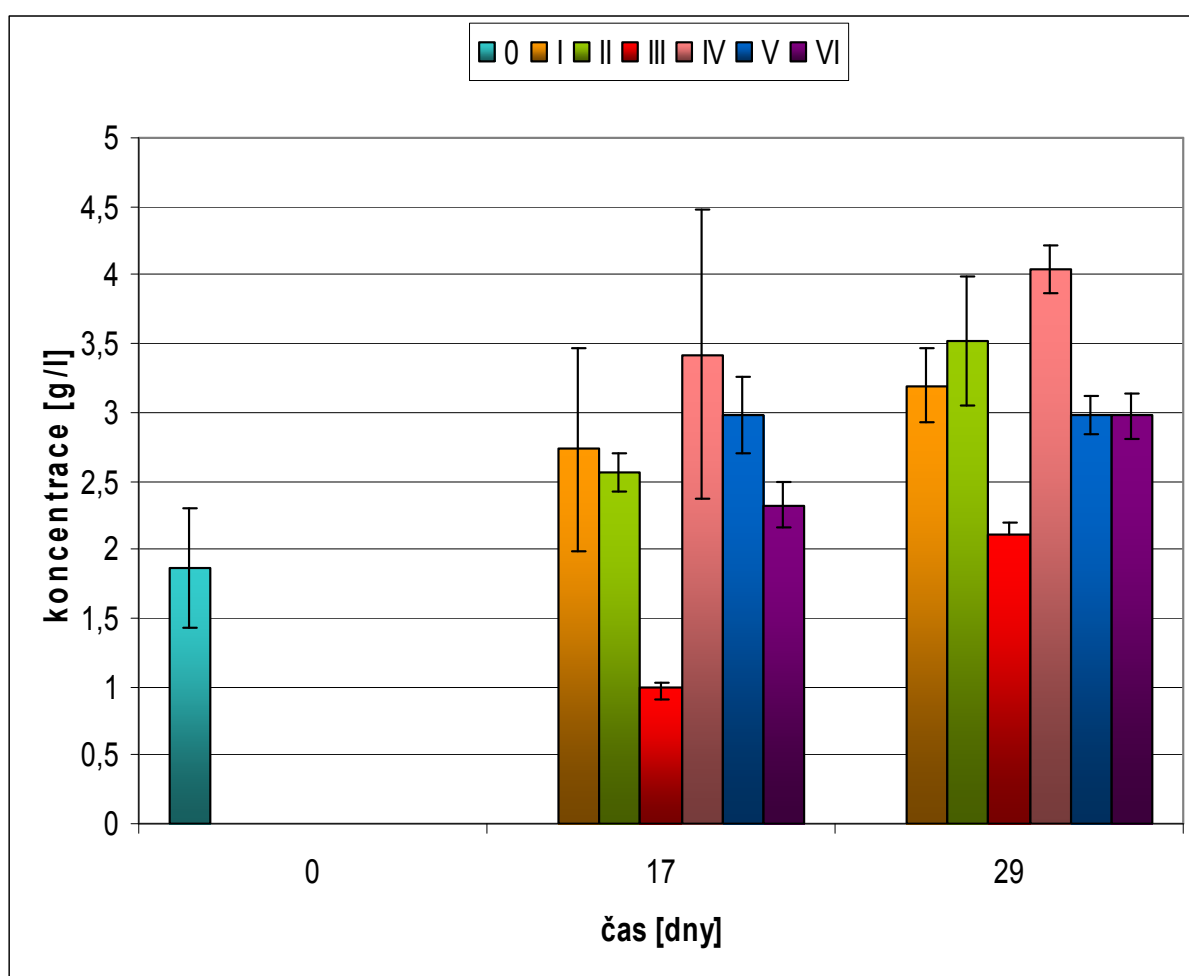
Vzorky byly měřeny třikrát a vyhodnocovány pro jednotlivé analyty zvlášť. Nejvíce nás zajímala úspěšná terapie ve skupině ovlivňované směsí proenzymů, případně analýza neúspěchů ve skupině enzymoterapie, či kombinace proenzymoterapie a enzymoterapie.

Zanalyzovali jsme však veškeré vzorky z tohoto experimentu, protože i v případě beta glukanu, jak bude dále diskutováno, mohla otázka proteázových inhibitorů hrát svoji roli.

4.2.1 Vliv jednotlivých způsobů terapie na hladiny jednotlivých analytů

Vliv terapií na α -2M

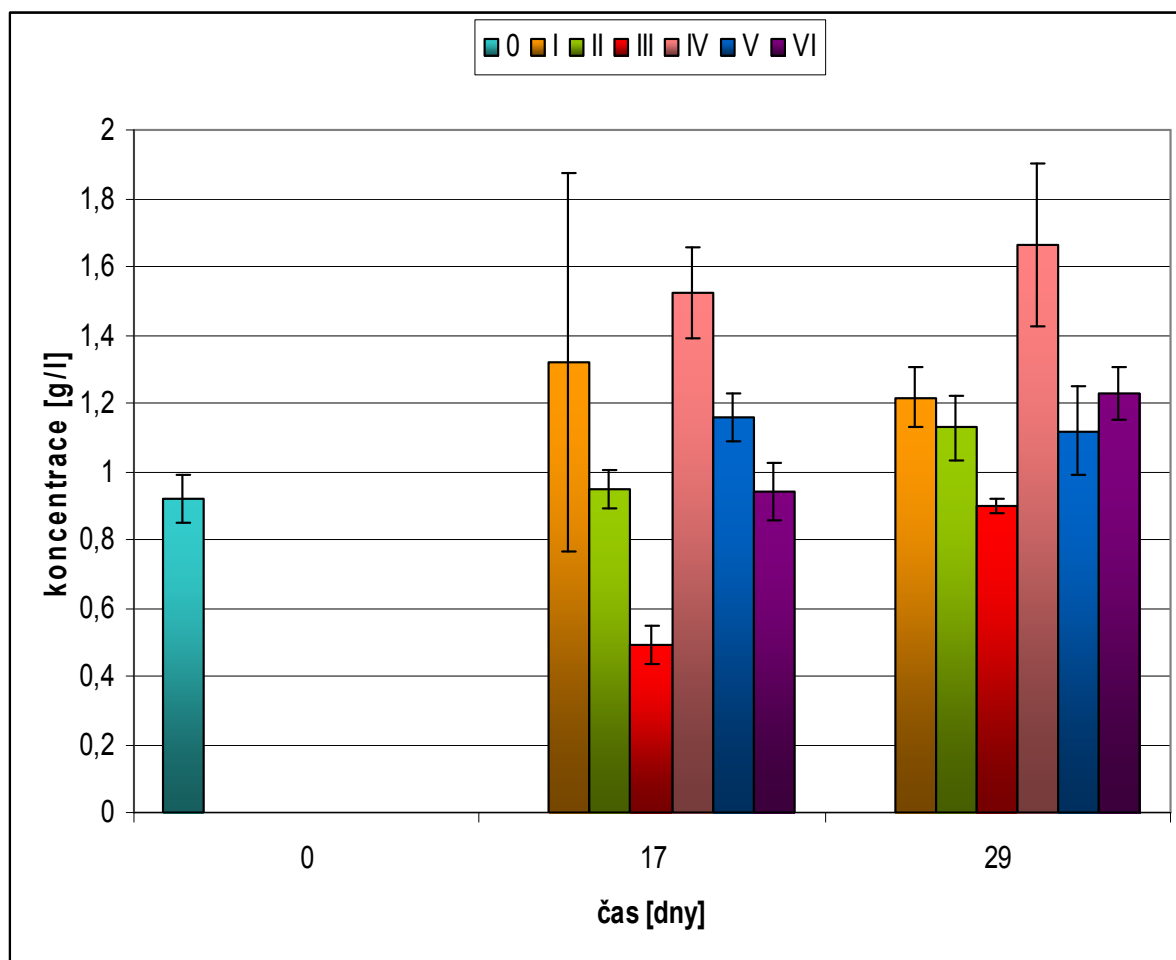
Vliv terapií na α -2M udává Obr. 8. Vysoké hladiny u proenzymové terapie jsou v souladu s jejím účinkem, který byl nejvyšší. Nicméně jen nevýrazně nižší hladiny u enzymové terapie nemohou být příčinou její nefunkčnosti, jak bude dále diskutováno.



OBR. 8: Vliv terapií na hladiny α -2-makroglobulinu (Skupina 0 (zdravé myši před pokusem), Skupina I (beta glukán), Skupina II (kombinovaná terapie - beta glukán + proenzymoterapie + enzymoterapie), Skupina III (kombinovaná terapie - proenzymoterapie + enzymoterapie), Skupina IV (proenzymoterapie), Skupina V (enzymoterapie), Skupina VI (kontrola)).

Vliv terapií na α 1AT

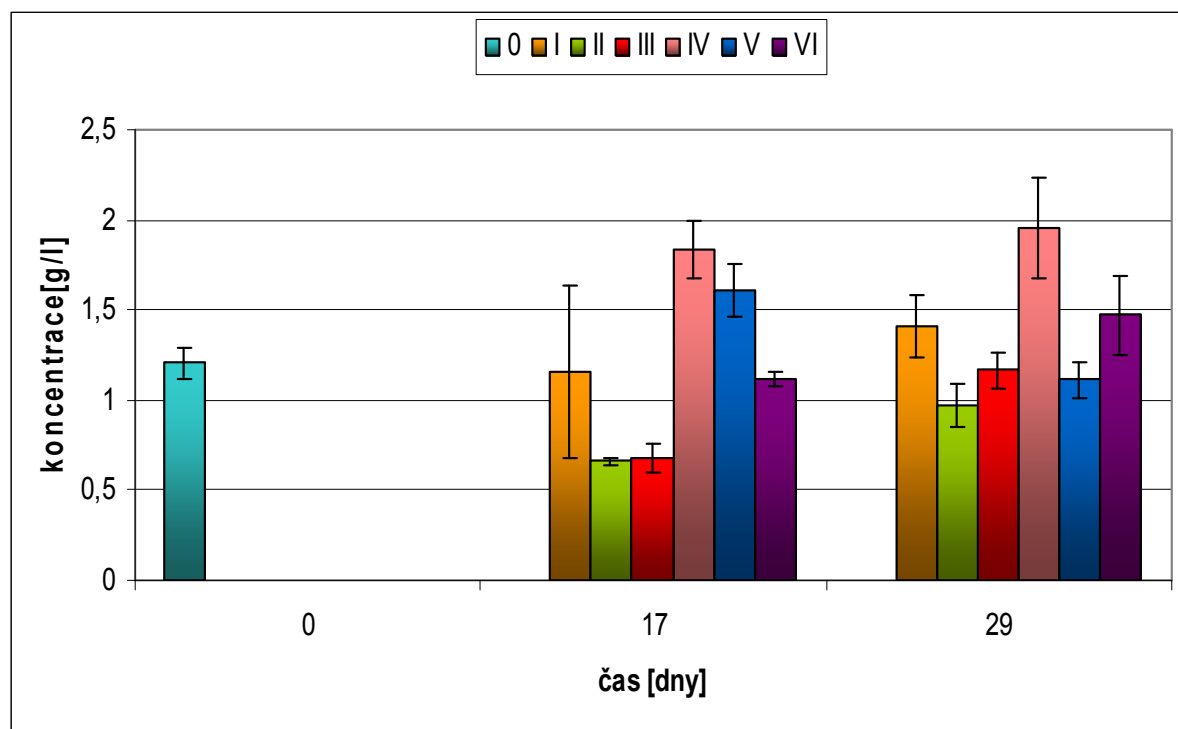
Stejně jako u dynamiky α 2M, můžeme stejné trendy pozorovat i u α 1AT. Avšak nárůst hodnot analytu oproti hodnotám ve zdravých myších nebyl tak výrazný (Obr. 9)



OBR. 9: VLIV TERAPIÍ NA HLADINY α -1-ANTITRYPSINU (SKUPINA 0 (ZDRAVÉ MYŠI PŘED POKUSEM), SKUPINA I (BETA GLUKAN), SKUPINA II (KOMBINOVANÁ TERAPIE - BETA GLUKAN + PROENZYMOTERAPIE + ENZYMOTERAPIE), SKUPINA III (KOMBINOVANÁ TERAPIE - PROENZYMOTERAPIE + ENZYMOTERAPIE), SKUPINA IV (PROENZYMOTERAPIE), SKUPINA V (ENZYMOTERAPIE), SKUPINA VI (KONTROLA)).

Vliv terapie na CONT

Stejně jako u dynamiky $\alpha 2M$ a $\alpha 1AT$ můžeme stejné trendy pozorovat i u CONT. Avšak nárůst hodnot analytu oproti hodnotám ve zdravých myších byl ještě méně výrazný než u $\alpha 1AT$ (Obr. 10).



OBR. 10: Vliv terapií na hladiny contrapsinu (Skupina 0 (zdravé myši před pokusem), Skupina I (beta glukán), Skupina II (kombinovaná terapie - beta glukán + proenzymoterapie + enzymoterapie), Skupina III (kombinovaná terapie - proenzymoterapie + enzymoterapie), Skupina IV (proenzymoterapie), Skupina V (enzymoterapie), Skupina VI (kontrola)).

V experimentu jsme zjistily, že relativní koncentrační vztahy jednotlivých analytů a to nejen $\alpha 2M$, $\alpha 1AT$ a CONT, ale i ALB, APO I, ceruloplasminu, hemopexinu a jiných odpovídají literatuře. Jejich absolutní zjištěné množství vykazovalo u všech analytů jednotlivých vzorků drobné charakteristické posuny vždy stejným směrem, závislým na vzorku, nikoli analytech. Tyto mírné posuny odrážely chyby preanalytické fáze a odstranily jsme je provedením korekce na albumin. Korekce provedené na jiné stabilní analyty (APO I, ceruloplasmin) vedly ke stejným výsledkům. Další možností, která se v těchto případech běžně provádí, je korekce na integrovaný signál.

Kromě sledování hladin proteázových inhibitorů a zejména jejich změn jsme provedli i kvalitativní analýzu výskytu sérových proteinů. Výsledky udává Tab. 6 a Tab. 7.

TAB. 6: PRŮMĚRNÝ POČET NALEZENÝCH PROTEINŮ V JEDNOM VZORKU.

Typ terapie	Dny od počátku terapie		
	0	17	29
Skupina I (beta glukan)		~30	~25
Skupina II (kombinovaná terapie – beta glukan + proenzymoterapie + enzymoterapie)		~39	~41
Skupina III (kombinovaná terapie - proenzymoterapie + enzymoterapie)		~27	~31
Skupina IV (proenzymoterapie)		~27	~37
Skupina V (enzymoterapie)		~36	~32
Skupina VI (kontrola)		~34	~34
Skupina 0 (zdravé myši před pokusem)	~27		

Z Tab. 6 vyplývá, že průměrně bylo nalezeno 32 proteinů v každém vzorku. Mezi jednotlivými vzorky nebyly zjištěny výraznější rozdíly, případně trendy.

Celkem 15 proteinů bylo konstantních. Tyto proteiny, vyskytující se ve všech vzorcích shrnuje Tab. 7.

TAB. 7: PŘEHLED PROTEINŮ, KTERÉ BYLY IDENTIFIKOVÁNY V KAŽDÉM VZORKU PŘI KAŽDÉM MĚŘENÍ.

Číslo v databázi UniProt	Zkratka	Název	Mw (Da)
P07724	ALBU_MOUSE	Serum albumin	68647
Q61838	A2MG_MOUSE	Alpha 2 macroglobulin	165722
Q00623	APA1_MOUSE	Apolipoprotein A I	30568
P01027	CO3_MOUSE	Complement C3	186364
P28665	A2M1_MOUSE	Murinoglobulin 1	165033
Q61147	CERU_MOUSE	Ceruloplasmin	121083
P07758	A1T1_MOUSE	Alpha 1 antitrypsin 1 1 Serine protease	45973
P22599	A1T2_MOUSE	Alpha 1 antitrypsin 1 2 Serine protease	45885
Q00896	A1T3_MOUSE	Alpha 1 antitrypsin 1 3 Serine protease	45825
Q00897	A1T4_MOUSE	Alpha 1 antitrypsin 1 4 Serine protease	45969
Q00898	A1T5_MOUSE	Alpha 1 antitrypsin 1 5 Serine protease	45862
P81105	A1T6_MOUSE	Alpha 1 antitrypsin 1 6 Serine protease	23730
P07759	COTR_MOUSE	Contrapsin	46850
P07309	TTHY_MOUSE	Transthyretin	15765
Q91X72	HEMO_MOUSE	Hemopexin	51341

Všechny výše uvedené proteiny jsou zcela rozdílné a vykonávají nejrůznější funkce. Ve vzorcích nevykazovaly zvláštní trendy ani výrazné změny. Na této úrovni můžeme konstatovat, že námi používané terapie zřejmě nemají účinky (hlavní ani vedlejší) na expresi hlavních sérových proteinů.

Ve vzorcích bylo identifikováno mnoho proteinů, které se vyskytovali náhodně a nemohly jsme tudíž sledovat jejich dynamiku. Tab. 8 udává přehled proteinů, které se vyskytovaly nepravidelně, nicméně byly detekovány alespoň 1x.

Jediným proteinem, který zřejmě exprimoval nádor byl Breast cancer type 2 susceptibility protein (P97929). Byl však identifikován pouze u vzorku z neléčených myší, který byl odebrán 29. den, tudíž nemá s naší prací souvislost.

TAB. 8: PŘEHLED PROTEINŮ, KTERÉ SE VE VZORCÍCH ALESPŮŇ JEDNOU VYSKYTLY.

Číslo v UniProt	Zkratka	Název	Mw (Da)
P02088	HBB1_MOUSE	Hemoglobin beta 1 chain B1 Major	15699
P23953	ESTN_MOUSE	Liver carboxylesterase	61102
P28666	A2M2_MOUSE	Murinoglobulin 2	162264
P06728	APA4_MOUSE	Apolipoprotein A IV	45001
O08677	KNG_MOUSE	Kininogen	73056
Q60590	A1AG_MOUSE	Alpha 1 acid glycoprotein 1	23880
P02089	HBB2_MOUSE	Hemoglobin beta 2 chain B2 Minor	15737
P08226	APE_MOUSE	Apolipoprotein E	35844
Q60590	A1AG_MOUSE	Alpha 1 acid glycoprotein 1	23880
P01872	MUC_MOUSE	Ig mu chain C region	50069
P01868	GC1_MOUSE	Ig gamma 1 chain C region	35681
P29699	A2HS_MOUSE	Alpha 2 HS glycoprotein	37301
P06330	HV51_MOUSE	Ig heavy chain V region AC38 205 12	12926
P21614	VTDB_MOUSE	Vitamin D binding protein	53050
P07361	A1AH_MOUSE	Alpha 1 acid glycoprotein 2	23828
P01898	HA10_MOUSE	H 2 class I histocompatibility antigen Q10 alpha	36942
Q9ESF1	OTOF_MOUSE	Otoferlin Fer 1 like protein 2	226888
P01868	GC1_MOUSE	Ig gamma 1 chain C region	35681
P08032	SPCA_MOUSE	Spectrin alpha chain erythrocyte Erythroid alpha	279820
P55194	3BP1_MOUSE	SH3 domain binding protein 1 3BP 1	65219
P29699	A2HS_MOUSE	Alpha 2 HS glycoprotein	37301
P08553	NFM_MOUSE	Neurofilament triplet M protein 160 kDa	95852
Q06890	CLUS_MOUSE	Clusterin Sulfated glycoprotein 2 SGP	51622
O35099	M3K5_MOUSE	Mitogen activated protein kinase kinase 5	154210
Q01065	CN1B_MOUSE	Calcium calmodulin dependent 3 5 cyclic nucleotid	61186
P97929	BRC2_MOUSE	Breast cancer type 2 susceptibility protein	370431
P32261	ANT3_MOUSE	Antithrombin III	51970

Kromě proteinu Breast cancer type 2 susceptibility protein jsme identifikovali i několik dalších proteinů běžně v séru přítomných. Jedná se o složky imunitního systému, signální molekuly, enzymy, transportní proteiny, sérové proteiny či protisrážlivé faktory (viz Tab. 8). Protože se však vyskytují v séru v hladinách o mnoho řádů nižších, jejich komplexní stanovení není možné v přítomnosti majoritních proteinů, na které jsme se zaměřili.

5. DISKUSE

Hlavním úkolem této práce bylo zavedení MS metody stanovení hlavních proteázových inhibitorů v myším séru ($\alpha 2M$, $\alpha 1AT$ a $CONT$). Pro požadované sledování jejich dynamiky během (pro)enzymové terapie nádorů bylo dostatečné zjištění relativních parametrů, nám se však podařilo dosáhnout absolutní kvantifikace. Zjištěné hodnoty odpovídají literárním údajům (Takahara a Sinohara, 1982; James, 1990; Abe a spol., 1989). Metoda stanovuje všechny uvedené analyty současně a zároveň podává informace o hladinách velké řady dalších sérových proteinů.

Metoda byla použita pro analýzu sér z již provedeného *in vivo* pokusu, jehož opakování by bylo zbytečným plýtváním biologickým materiálem. K nejdůležitějším poznatkům patří, že hladina $\alpha 2M$ během proenzymoterapie mírně stoupá a je tedy i v pokročilém stádiu rozvoje nádorového onemocnění dostatek tohoto základního agens, nutného pro fungování této terapie.

Hladina u enzymoterapie byla sice nižší, ale tento rozdíl nemůže vysvětlit nefunkčnost enzymoterapie při tomto uspořádání (zajímavé je, že enzymoterapie stejnými dávkami aplikovanými denně je částečně účinná). Rovněž tak relativně nízké hladiny $\alpha 2M$ u kombinace proenzymoterapie + enzymoterapie jsou ve skutečnosti dostatečné, aby vázaly bez problémů potřebné cytokiny (zejména $TGF-\beta$). Příčinu neúspěchů těchto dvou posledně jmenovaných terapií třeba spatřovat jinde. Proenzymoterapie má proti systémové enzymové terapii nespornou výhodu ve větší lokalizaci a zacílení (Novák a Trnka, 2005). Obtížná kombinovatelnost proenzymoterapie s jinými terapeutickými přístupy odpovídá našim dosavadním poznatkům, vysvětlení však nemáme.

Ostatní majoritní proteázové inhibitory ($\alpha 1AT$ a $CONT$) nevykazovaly během různých druhů terapie výraznější změny. To je z pohledu terapie založené na proteázách dobré, neboť aktivace $\alpha 2M$ není rušena odčerpáváním trypsinu. Zcela to však znemožňuje úvahy o tom, že by bylo možné založit nádorovou terapii na indukci proteázových inhibitorů, které by nádorům bránily v jejich invazivitě a agresivitě, založené na expresi celé řady proteáz.

Získané výsledky jsou v úzké shodě s připravovanou diplomovou prací L. Kalferstové. Ta měřila funkční projevy $\alpha 2M$ a celkovou inhibiční aktivitu ostatních

inhibitorů proteáz. Její závěry o aktivitách inhibitorů úzce korelují s předkládanými poznatky ze stanovení těchto inhibitorů jakožto proteinů.

Analýzy výskytu majoritních proteinů v séru ukázaly, že na této úrovni nedochází k žádným změnám, což zároveň naznačuje, že (pro)enzymoterapie nevykazuje vedlejší účinky. Nebyl však nalezen ani žádný analyt, který by sloužil jako biomarker průběhu terapie.

Hlavním cílem analýzy vzorků bylo sledování průběhu (pro)enzymoterapie, ale zajímala nás i situace u poměrně úspěšné terapie perorálně podávaným beta glukanem. Tato terapie je spojena s mohutnou aktivací systému vrozené imunity a její působení (např. uvolňování lytického obsahu granulí polymorfonukleárních buněk) mohlo přinést změny v obrazu sérových inhibitorů. Podstatné změny však pozorovány nebyly. Rovněž tak analýza majoritních sérových proteinů, případě proteinů sporadicky se vyskytujících, nepřinesla žádné využitelné závěry. Abychom mohli zanalyzovat proteiny o koncentracích nižších až velmi nízkých, bylo by nutné majoritní složky odstranit, protože v jejich prostředí jsou danou metodou a přístrojem nedetekovatelné.

6. SOUHRN

- Byla zavedena metodika umožňující zároveň kvalitativní i kvantitativní analýzu majoritních proteinů ve vzorcích krevního séra s použitím hmotnostní spektrometrie.
- Hodnoty hladin analytů získané touto metodou jsou v rozmezí publikovaných hodnot, tudíž můžeme tuto metodu považovat za spolehlivou.
- Pomocí zavedené metody jsme sledovali hladiny sérového α 2-makroglobulinu, α 1-antitrypsinu a contrapsinu v průběhu experimentální (pro)enzymoterapie melanomu B16-F10, dále u terapie založené na perorální aplikaci beta glukanu a při kombinovaných metodách.
- Bylo potvrzeno, že pro působení (pro)enzymoterapie jsou během celého vývoje maligního onemocnění vytvářeny příznivé podmínky (dostatek α 2-makroglobulinu, nevýrazné změny ostatních inhibitorů).
- Během (pro)enzymoterapie, terapie založené na beta glukanu, ani u kombinovaných terapií, nebyly v séru nalezeny žádné proteiny svědčící o vedlejších účincích terapie, ale nebyly ani detekovány žádné proteiny, které by mohly sloužit pro monitorování průběhu terapie.

7. LITERATURA

- Abe K., Yamamoto K., Sinahora 1989:** Proteinase inhibitory spectrum of mouse murinoglobulin and alpha-macroglobulin. *J.Biochem.*; 106: 564-568.
- Abrams W.R., Kimbel P., Weinbaum G. 1978:** Purification and characterization of canine a-l-antiproteinase. *Biochemistry*, 17: 3556-3561.
- Alberts B., Bray D., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. 1998:** *Základy buněčné biologie*, nakl. Espero Publishing, s. r. o.: 587-589.
- Aleksandrov M.L., Gall L.N., Krasnov V.N., Nikolaev V.I., Pavlenko V.A., Shkurov V.A. 1984:** Ion Extraction from Solutions at Atmospheric Pressures: A Mass Spectrometric Method of Analysis of Bioorganic Compounds. *Dokl. Akad. Nauk SSSR*, 277: 379–383.
- Asselin-Paturel C., Echcharkir H., Carayol G., Gay F., Opolon P., Grunenwald D., Chouaib S., Mami-Chouaib F. 1998:** Quantitative analysis of Th1, Th2 and TGF-beta 1 cytokine expression in tumor, TIL and PLB of non-small cell lung cancer patients. *Int J Cancer*; 77(1): 7-12.
- Bainbridge W.S. 1909:** *The Enzyme Treatment for Cancer*. Committee on Scientific Research. New York Skin and Cancer Hospital, pp.39.
- Beard J. 1906:** The action of 'trypsin' upon living cells of the Jensen sarcoma. *Brit Med J*; 1:140-141.
- Beard J. 1911:** *The Enzyme Treatment of Cancer and its Scientific Basis*. London, Chatto and Windus.
- Berninger R.W., Mathis R.K. 1976:** *Biochem. J.* 159: 95-104.
- Bhattachajree G., Gron H., Pizzo S.V. 1999:** Incorporation of non-proteolytic proteins by murine α 2-macroglobulin. *Biochemica et Biophysica Acta* 1432: 49-56.
- Bhattacharjee G., Asplin I.R., Wu S.M., Gawdi G., Pizzo S.V. 2000:** The conformationdependent interaction of alpha 2-macroglobulin with vascular endothelial growth factor. A novel mechanism of alpha 2-macroglobulin/growth factor binding. *J Biol Chem.*; 275: 26806- 26811.
- Birkenmeier G., Stigbrand T. 1993:** Production of conformation – specific monoclonal antibodies against alpha 2 macroglobulin and their use for quantitation of total and transformed alpha 2 macroglobulin in human blood. *J Immunul Methods* 162: 59-67.
- Birkenmeier G., Kampfer I., Kratzsch J., Schellenberger W. 1998:** Human leptin forms complexes with alpha 2-macroglobulin which are recognised by the alpha 2-macroglobulin receptor/low density lipoprotein receptor-related protein. *Eur J Endocrinol*; 139 (2):224-230.

- Borth W., Luger T.A. 1989:** Identification of alpha 2-macroglobulin as a cytokine binding plasma protein. Binding of interleukin-1 beta to "F" alpha 2-macroglobulin. *J.Biol.Chem.*; 264(10):5818-5825.
- Borth W., Teodorescu M. 1986:** Inactivation of human interleukin-2 (IL-2) by alpha-2-macroglobulintrypsin complexes. *Immunology*; 57 (3):367-371.
- Busch K.L. 2000:** Synergistic Developments in MS. A 50-year Journey from "art" to science. *Spectroscopy* 15: 30-39.
- Carrascal M., Schneider K., Calaf R.E., van Leeuwen S., Canosa D., Gelpi E., Abian J. 1998:** Quantitative Electrospray LC-MS and LC-MS/MS in Biomedicine. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 17: 1129–1138.
- Chandra T., Stackhouse R., Kidd V.J., Robson K.J., Woo S.L. 1983:** *Biochemistry* 22: 5055–5061.
- Cheng X., Hochlowski J. 2002:** Current application of mass spectrometry to combinatorial chemistry. *Anal. Chem.* 74: 2679-2690.
- Chouaib S., Asselin-Paturel C., Mami-Chouaib F., Caignard A., Blay J.Y. 1997:** The host-tumor immune conflict: from immunosuppression to resistance and destruction. *Immunol. Today*, 18(10):493-7.
- Chuaib S., Asselin-Paturel C., Mami-Chuaib F., Caignard A., Blay J.Y. 1997:** The host immune conflict: from immunosuppression to resistance and destruction. *Immunol Today*; 18: 493.
- Cichy J., Potempa, J., Chawla R.K., Travis J. 1995:** Stimulatory effect of inflammatory cytokines on α -1-antichymotrypsin expression in human lung-derived epithelial cells. *J. Clin. Invest.* 95: 2729–2733.
- Crookston K.P., Webb D.J., LaMarre J., Gonias S.L. 1993:** Binding of platelet-derived growth factor-BB and transforming growth factor-beta 1 to alpha 2-macroglobulin *in vitro* and *in vivo*: comparison of receptor-recognized and non-recognized alpha 2-macroglobulin conformations. *Biochem J* 293: 443-450.
- Crookston K.P., Webb D.J., Wolf B.B., Gonias S.L. 1994:** Classification of alpha 2-macroglobulin-cytokine interactions based on affinity of noncovalent association in solution under apparent equilibrium conditions. *J Biol Chem*; 269 (2):1533-40.
- da Silva G.C., Teixeira N., Bell S.C. 1996(1):** Major secretory product of the mesometrial decidua in the rat, a variant of alpha-2-macroglobulin, binds insulin-like growth factor I via a protease-dependent mechanism. *Mol-Reprod-Dev.* 103-10.

- Desser L., Holomanova D., Zavadová E., Pavelka K., Mohr T., Herbacek I. 2001:** Oral therapy with proteolytic enzymes decreases excessive TGF- β levels in human blood. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*; 47: S10-S15.
- Dickson I., Alper C. A. 1974:** *Clin. Chim. Acta* 54: 381–385.
- Dole M., Mack L.L., Hines R.L., Mobley R.C., Ferguson L.D., Alice M.B. 1968:** Molecular Beams of Macroions. *J. Chem. Phys.*, 49: 2240–2249.
- Ekman R., Silberring J., Westman-Brinkmalm A., Kraj A. 2009:** *Mass Spectrometry. Instrumentation, Interpretation, and Applications.* John Wiley & Sons, Inc.; ISBN 978-0-471-71395-1.
- Fearon E.C. 1997:** Human Cancer Syndromes: Clues to the Origin and Nature of Cancer. *SCIENCE*; 278: 1034 – 1050.
- Fenn J.B., Mann M., Meng C.K., Wong S.F., Whitehouse C.M. 1989:** Electrospray Ionization for Mass Spectrometry of Large Biomolecules. *Science*, 246: 64–71.
- Figarella C., Miszczuk-Jamska B., Barrett A.J. 1988:** Possible lysosomal activation of pancreatic zymogens. Activation of both human trypsinogen by cathepsin B and spontaneous acid activation of human trypsinogen 1. *Biol Chem Hoppe-Seyler*; 369: 293-298.
- Feige J.J., Negoescu A., Keramidias M., Souchelnitskiy M., Chambaz E.M. 1996:** Alpha 2-macroglobulin: a binding protein for transforming growth factor- beta and various cytokines. *Horm.Res.*; 45 (3-5): 227-232.
- Finke J. H., Bukowski R. M. 2004:** Cancer immunotherapy at the crossroads how tumors evade immunity and what can be done. *Neuro-oncol.* 2004 July; 6(3): 265–266.
- Garber T.R., Gonias S.L., Webb D.J. 2000:** Interleukin-4 and IL-10 bind covalently to activated human alpha(2)-Macroglobulin by a mechanism that requires Cys(949). *Journal Of Interferon And Cytosine Research*; 20 (2): 125-131.
- Gewert K., Holowachuk S. A., Rippe C., Gregory P. C., Erlanson-Albertson C., Olicecrona G., Kruszewska D., Piedra J. V., Westrom B., Pierzynowski S. G. 2004:** The enzyme preparation (Creon 10,000) in pankreas-insufficient pigs. *Pancreas* 28: 80-88.
- Gianazza E., Eberini I., Villa P., Fratelli M. a spol. 2002:** *J. Chromatogr.B*, 771: 107–130.
- Gouin-Charnett A., Laune D., Granier C., Mani J.C., Pau B., Mourad G., Argiles A. 2000:** Alpha-2-Macroglobulin, the main serum antiprotease, binds beta2-microglobulin, the light chain of the class I major histocompatibility complex, which is involved in human disease. *Clin-Sci-Colch.*; Apr; 98(4): 427-33.
- Hald P.T. 1907:** Comparative researches on the tryptic strength of different trypsin preparations and on their action on the human body. *The Lancet* 1907;2:1371-1375.

- Hall S.W., LaMarre J., Marshall L.B., Hayes M.A., Gonias L. 1992:** Binding of transforming growth factor- β 1 to methylamine-modified α 2-macroglobulin and to binary and ternary α 2-macroglobulin-proteinase complexes. *Biochem. J.* 281: 569-575.
- Haynes P., Miller I., Aebersold R., Gemeiner M. a spol. 1998:** *Electrophoresis*, 19: 1484–1492.
- Horvath A.J., Irving J.A., Rossjohn J., Law R.H., Bottomley S.P., Quinsey N.S., Pike R.N., Paul B. Coughlin P.B., Whisstock J.C. 2005:** The Murine Orthologue of Human Antichymotrypsin. A structural paradigm for clade A3 serpins. *The journal of biological chemistry*. 280: 43168–43178.
- Hovi T. Mosher D. a Vaheiri A. 1977:** Cultured human monocytes synthesize and secrete α 2-macroglobulin. *J. Exp. Med.* 145: 1580-1589.
- Howel J.B., Beck T., Bates B., Hunter M.J. 1982:** Interaction of α 2-macroglobulin with Trypsin, Chymotrypsin, Plasmin and papain. *Achieves of biochemistry and biophysics* 221: 261-270.
- Hwang S.R., Steineckert B., Kohn, A., Palkovits M., Hook V.Y. 1999:** *J. Biol. Chem.*; 274: 1821-1827.
- Ikehara Y., Miyasato M., Ogata S., Oda K. 1981:** *Eur. J. Biochem.* 115: 253-260.
- Inaba M., Tazuko T., Fujimoto S., Sakuraiy M. K., Ohnishi Y., Ueyama Y., Nomura T. 1986:** Evaluation of response rates to various antitumor agents of human gastric tumours implanted in nude mouse. *Jpn J Cancer Res* 77: 190-196.
- Iribarne J.V., Thomson B.A. 1976:** On the Evaporation of Small Ions from Charged Droplets. *J. Chem. Phys.*, 64: 2287–2294.
- James K. 1990:** Interactions between cytokines and alpha 2-macroglobulin. *Immunol Today*, 11: 163-165.
- James K., van den Haan J., Lens S., Farmer K. 1992:** Preliminary studies on the interaction of TNF alpha and IFN gamma with alpha 2-macroglobulin. *Immunol-Lett.*; 32(1): 49-57.
- Kaiserová P. 2008:** Proenzymová terapie sarkomu S-180. Bc. Thesis, Faculty of Science, The University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.
- Kalferstová L. 2008:** Proenzymoterapie melanomu B16-F10. Bc. Thesis, Faculty of Science, The University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.
- Kim J., Modlin R.L., Moy R.L., Dobinett S.M., Mc Hugh T., Nickoloff B.J., Ueyemura K. 1995:** IL-10 production in cutaneous basal and squamous cell carcinomas. A mechanism for evading the local T-cell immune response. *J Immunol*; 155: 2240-7.

- Koivunen E., Ristimäki A., Ikonen O., Osman S., Vuoto M., Stenman U.H. 1991:** Tumor-associated trypsin participates in cancer cell-mediated degradation of extracellular matrix. *Cancer Res*; 51(8): 2107-12.
- Kobayashi H., Mobuhiko N., Sugimura M., Shinohara H., Ohi H., Terao T. 1993:** Effect of membrane-associated cathepsin B on their activation of receptor-bound pro-urokinase and subsequent invasion of reconstituted basement membranes. *Biochem Biophys Acta* 1178: 55-62.
- Koj A., Hatton M.W.C., Wong K. L., Regoezi E. 1978:** *Biochem. J.* 169: 589-596.
- Krasagakis K., Krüger-Krasagakes S., Fimmel S., Eberle J., Thölke D., Von Der Ohe M., Mansmann U., Orfanos C.E. 1998:** Desensitization of melanoma cells to autocrine TGF- isoforms. *Journal of Cellular Physiology*; Volume 178 Issue 2, Pages 179-187.
- Kratzsch J., Selisko T., Birkenmeier G. 1996:** Transformed alpha 2-macroglobulin as a low-affinity growth hormone-binding protein. *Acta Paediatr.Suppl.*; 417: 108-110.
- Krebs E.T., Jr. Krebs E.T., Beard H.H. 1950:** The trophoblastic thesis of malignancy. *Medical Record*;163:148.
- Kurdowska A., Carr F.K., Stevens M.D., Baughman R.P., Martin T.R. 1997:** Studies on the interaction of IL-8 with human plasma alpha 2-macroglobulin: evidence for the presence of IL-8 complexed to alpha 2-macroglobulin in lung fluids of patients with adult respiratory distress syndrome. *J Immunol.*; 158 (4): 1930-1940.
- Lauer D., Müller R., Cott C., Otto A., Naumann M., Birkenmeier G. 2001:** Modulation of growth factor binding properties of α 2-macroglobulin by enzyme therapy. *Cancer Chemother Pharmacol*, 47: S4-S9.
- Laurell C.B., Jeppsson, J.O. 1975:** Protease inhibitors in plasma. *The Plasma Proteins*. 2nd ed., edited by F.W. Putnam, Academic Press Inc., New York, Vol. 1, pp. 229-264.
- Lee M.S., Kerns E.H. 1999:** LC/MS applications in drug development., *Mass. Spectrom. Rev.* 18: 187-279.
- Leipner J., Saller R. 2000:** Systemic enzyme therapy in oncology: effect and mode of action. *Drugs*; 59(4): 7697-80.
- Liebl D.J., Koo P.H. 1993:** Comparative binding of neurotrophins (NT-3, CNTF and NGF) and various cytokines to alpha 2-macroglobulin. *Biochem-Biophys-Res-Commun.*; 193(3): 1255-61.
- Lillis A.P., Mikhailenko I., Strickland D.K. 2005:** LRP fiction in cell migration, proliferation and vascular permeability. *J Thromb Haemost* 3: 1884-1893.
- Liu T., Qian W.J., Mottaz H.M., Gritsenko M.A., Norbeck A.D., Moore R.J., Purvine S.O., Camp D.G .2nd, Smith R.D. 2006:** Evaluation of multiprotein immunoaffinity subtraction for plasma proteomics and candidate biomarker discovery using mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics*, 5(11):2167-74.

- Matsuda T., Hirano T., Nagasawa S., Kishimoto T. 1989:** Identification of alpha 2-macroglobulin as a carrier protein for IL-6. *J Immunol.*; 142 (1): 148-152.
- Miller I., Haynes P., Gemeiner M., Aebersold R. a spol. 1998:** *Electrophoresi*, 19: 1493–1500.
- Miller I., Teinfal, M., Leschnik M., Wait R., Gemeiner M. 2004:** *Proteomics* 4: 257–260.
- Miyata S., Koshikawa N., Higashi S. 1999:** Expression of trypsin in human cancer cell lines and cancer tissues and its tight binding to soluble form of Alzheimer amyloid precursor protein in culture. *J Biochem* 125: 1067-1076.
- Mora J.F., Van Berkel G.J., Enke C.G., Cole R.B., Martinez-Sanchez M., Fenn J.B. 2000:** Electrochemical Processes in Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *J. Mass Spectrom.*, 35:939–952.
- Mosher F.R., Saksela O., Vaheri A. 1977:** A Synthesis and secretion of α 2-macroglobulin by cultured adherent lung cells. *J. Clin. Invest.* 60: 1036-1045.
- Myerowitz R.L., Chrambach A., Rodbard D., Robbins J. B. 1972:** *Anal. Biochem.* 48: 394-409.
- Niemuller C.A., Randall K.J., Webb D.J., Gonias S.L., LaMarre J. 1995:** Alpha 2-macroglobulin conformation determines binding affinity for activin A and plasma clearance of activin A/alpha 2-macroglobulin complex. *Endocrinology*; 136 (12): 5343-5349.
- Novák J.F., Trnka F. 2005:** Proenzyme therapy of cancer. *Anticancer Res.* ;25: 1157-1178.
- Nyberg P., Moilanen M., Paju A. 2002:** MMP-9 activation by tumor trypsin-2 enhances *in vivo* invasion of human tongue carcinoma cells. *J Dent Res* 81: 831-835.
- Nyberg P., Ylipalosaari M., Sorsa T., Salo T. 2006:** Trypsin and their role in carcinoma growth. *Exp Cell Res* 312: 1219-1228.
- Ohkubo K., Ogata S., Misumi Y., Takami N., Ikehara Y. 1991:** *J. Biochem*, 109, 243–250.
- Onishi T., Onishi Y., Imagava K., Ohmoto Y., Murata K. 1999:** An assessment of immunological environment based on intratumoral cytokine production in renal cell carcinoma. *British Journal of Urol Int.*; 83: 488.
- Panyutich A., Ganz T. 1991:** Activated alpha 2-macroglobulin is a principal defensin- binding protein. *Am-JRespir-Cell-Mol-Biol.*; (2): 101-6.
- Paul W., Steinwedel H. 1953:** Ein neues Massenspektrometer ohne Magnetfeld. *Z. Naturforsch.*, A8: 448–450.
- Paul W., Steinwedel H. 1960:** U. S. Patent 2939952.
- Pawelec G. 1999:** Tumor escape from the immune response: the last hurdle for successful immunotherapy of cancer? *Cancer Immunol Immunother* 48: 343-345.

- Pellegrini A., von Fellenberg R. 1980:** Fractionation and partial characterization of α -1-protease isoinhibitors of horse. *Biochim. biophys. Acta*, 616: 351-361.
- Pizzo S.V., Gonias S.L. 1984:** Receptor – mediated protease regulation. *The receptors* 1: 178-221.
- Saksela Olli, Wahlström Torsten, Meyer Bengt a Vaheri Antti 1984:** Presence of α -2-Macroglobulin in Normal but not in Malignant Cervical Epithelium. *Cancer research* 44: 2942-2946.
- Shurin M.R., Lu L., Kalinski P., Stewart-Akers A.M., Lotze M.T. 1999:** Th1/Th2 balance in cancer, transplantation and pregnancy. *Springer Semin Immunopathol.*; 21: 339-359.
- Smith R.D., Bruce J.E., Wu Q., Lei Q.P. 1997:** New mass spectrometric methods for study of noncovalent associations of biopolymers. *Chem. Soc. Rev.* 26: 191-202.
- Swenson R. P., Howard J. B. 1979:** Structural characterization of human alpha-2-macroglobulin subunits. *J. Biol. Chem.* 254: 4452-4456.
- Šťastný F., Pliss L., Höschl C. 2002:** Interakce mezi protézami a hematoencefalickou
- Takahara H., Nakayama H., Sinohara H. 1980:** Purification and characterization of rat plasma α -1-antitrypsin. *J. Biochem.*, 88: 417-424.
- Takahara, H., Sinohara, H. 1982a:** Mouse plasma trypsin inhibitors : Isolation and characterization of α -1-antitrypsin and contrapsin, a novel trypsin inhibitor. *J. Biol. Chem.*, 257: 2438-2446.
- Takahara, H., Sinohara, H. 1982b:** Mouse plasma trypsin inhibitors : Inhibitory spectrum of contrapsin and α -1-antitrypsin. *Thromb. Res*, 27: 45-50.
- Takahara, H., Sinohara, H. 1983:** Inhibitory spectrum of mouse contrapsin and α -1-antitrypsin against mouse serine proteases. *J. Biochem.*, 93: 1411-1419.
- Takahara H., Nakamura, Y., Yamamoto, K., Sinohara, H. 1983:** Comparative studies on the serum levels of α -1-antitrypsin and α -macroglobulin in several mammals. *Tohoku J. exp. Med.*, 139: 265-270.
- Takahara H., Sibata S., Sinohara H. 1984:** Conformational Differences between Mouse Contrapsin and α -1-Antitrypsin as Studied by Ultraviolet Absorption and Circular Dichroism Spectroscopy. *Tohoku J. exp. Med.*, 142 (3): 261-273.
- Travis J., Bowen J., Baugh R. 1978:** *Biochemistry* 17: 5651–5656.
- Uchima Y., Sawada T., Nishihara T., a spol. 2003:** Identification of a trypsinogen activity stimulating factor produced by pancreatic cancer cells : Its role in tumor invasion and metastasis. *Int J Mol Med*;12: 871-8.
- VanLeuven F., Torrekens S., Overbergh L., Lorent K., DeStrooper B., VanDenBerghe 1992:** The primary sequence and the subunit structure of mouse α -2-Macroglobulin deduced from protein sequencing of the isolated subunits and from molecular cloning of the cDNA. *Eur. J. Biochem.*

210: 319-327.

Vaughan J.M., Vale W.W. 1993: Alpha 2-macroglobulin is a binding protein of inhibin and activin. *Endocrinology*; 132 (5): 2038-2050.

Vetvica V., Vetvickova J. 2007: An Evaluation of the Immunological Activities of Commercially Available β 1, 3-Glucans. *Jana* 10: 25-31.

Wait R., Miller I., Eberini I., Cairoli F. a spol. 2002: *Electrophoresi*, 23: 3418–3427.

Wait R., Chiesa G., Parolini C., Miller I., Begum S., Brambilla D., Galluccio L., Ballerio R., Eberini I., Gianazza E. 2005: Reference maps of mouse serum acute-phase proteins: Changes with LPS-induced inflammation and apolipoprotein A-I and A-II transgenes. *Proteomics* 5: 4245–4253.

Wald M., Olejar T., Pouckova P., Zadinova M. 1998: Proteinases reduce metastatic dissemination and increase survival time in C57Bl6 mice with Lewis lung carcinoma *Life Sci* 63: 237-243.

Wald M., Olejar T., Sebkova V., Zadinova M., Boubelik M., Pouckova P. 2001: Mixture of trypsin, chymotrypsin and papain reduces formativ of metastases and extends survival time of C57Bl6 mice with syngenic melanoma B16. *Cancer Chemother Pharmacol* 47: 12-22.

Webb D.J., Atkins T.A., Crookston K.P., Burmester J.K., Quian S.W., Gonias S.L. 1994: Transforming growth factor beta isoform 2-specific high affinity binding to native alpha 2-macroglobulin. Chimeras identify a sequence that determines affinity for native but not activated alpha 2-macroglobulin. *J. Biol. Chem.* 269: 30402-30406.

Webb D.J., Weaver A.M., Atkins B.T.L., Gonias S.L. 1996: Proteinases are isoform-specific regulators of the binding of transforming growth factor beta to alpha 2-macroglobulin. *Biochem.J.*;320: 551-555.

Webb D.J., Wen J., Karns L. R., Kurilla M.G., Gonias S.L. 1998: Localization of the Binding Site for Transforming Growth Factor- β in Human α 2-macroglobulin to a 20-kDA Peptide That Also Contains the Bait Region. *The J.Biol. Chem.* 273: 13339-13346.

White R., Janoff A.,bGodfrey H.P. 1980: Secretion of α 2-macroglobulin by human alveolar macrophages. *Lung* 158: 9-14.

Wittmann C. 2007: Fluxome analysis using GC-MS. *Microbial Cell Factories*, 6:6.

Wiza J. 1979: Microchannel Plate Detectors. *Nucl. Instr. Meth.*, 162: 587–601.

Yamamoto K., Takahara H., Sinohara H. 1981: Developmental changes levels of alpha-1-antitrypsin and contrapsin in the mouse serum. *Biochem.* 617-620.

Yamamoto K., Tsujino Y., Saito A., Sinohara H. 1985: *Biochem. Int.*, 10: 463–469.

Yamamoto K., Suzuki Y., Sinohara H. 1988: *Biochem. Int.*, 16: 921–928.

Yamashita M., Fenn J.B. 1984: Electrospray Ion Source: Another Variation on the Free-Jet Theme. *J. Phys. Chem.*, 88: 4451–4459.

Ziv E., Lior O., Kidron M. 1987: Absorption of protein *via* the intestinal wall. A quantitative model.
Biochem Pharmacol 36: 1035-1039.

Monroe M., [online], [15.4.2010],

<http://www.alchemistmatt.com/MwtHelp/PeptideFragModelling.htm>