

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2020

Jana Vyroubalová

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Typizace amyloidních depozit
pomocí hmotnostní spektrometrie**

Bakalářská práce

Jana Vyroubalová

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2020

Vedoucí práce: Mgr. Dušan Holub, Ph.D.

BIBLIOGRAFICKÉ ÚDAJE

Jméno a příjmení autora	Jana Vyroubalová
Název práce	Typizace amyloidních depozit pomocí hmotnostní spektrometrie
Typ práce	bakalářská
Pracoviště	Katedra buněčné biologie a genetiky, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci
Vedoucí práce	Mgr. Dušan Holub, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2020
Klíčová slova	amyloid, amyloidóza, laserová mikrodisekce, hmotnostní spektrometrie
Počet stran	48
Počet příloh	0
Jazyk	český

SOUHRN

Tato bakalářská práce se zabývá amyloidózami, chorobami obecně spojovanými s ukládáním nerozpustných amyloidních fibril v extracelulárním prostoru tkání v lidském těle. V teoretické části je popsána charakteristika amyloidóz, zejména jejich dělení a nomenklatura. Dále se tato část soustředí na popis patogeneze, příznaků a léčby těchto onemocnění. Závěr teoretické části je věnován především diagnostice a typizaci amyloidóz různými metodami a přístupy. Experimentální část je zaměřena na typizaci amyloidních depozit v FFPE tkáňových vzorcích pomocí metod laserové mikrodisekce a hmotnostní spektrometrie.

BIBLIOGRAPHICAL IDENTIFICATION

Author's first name and surname	Jana Vyroubalová
Title	Subtyping of amyloid deposits by mass spectrometry
Type of thesis	bachelor
Department	Department of Cell Biology and Genetics, Faculty of Science, Palacký University, Olomouc
Supervisor	Mgr. Dušan Holub, Ph.D.
Year of presentation	2020
Keywords	amyloid, amyloidosis, laser microdissection, mass spectrometry
Number of pages	48
Number of appendices	0
Languages	Czech

SUMMARY

This bachelor thesis focuses on a group of diseases called amyloidosis and on methods of typing amyloidosis using different approaches. Theoretical part of this thesis deals with characterisation and nomenclature of amyloidosis. Furthermore pathogenesis, symptoms and treatment are described. Special attention is paid to the methods of typing amyloidosis, particularly immunohistochemistry and proteomics. Experimental part describes the process of typing amyloid deposits in formalin fixed paraffin embedded tissues using laser microdissection and mass spectrometry as well as data processing.

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně za použití uvedených literárních zdrojů pod odborným vedením Mgr. Dušana Holuba, Ph.D.

V Olomouci dne

Podpis

Chtěla bych poděkovat Mgr. Dušanu Holubovi, Ph.D., za odborné vedení mé bakalářské práce. Děkuji mu za pomoc v laboratoři a při vypracování práce, za jeho trpělivost a cenné rady. Dále bych ráda poděkovala mé rodině a přátelům za jejich podporu a pomoc.

OBSAH

1	ÚVOD.....	1
2	CÍLE PRÁCE	2
3	LITERÁRNÍ PŘEHLED	3
3.1	AMYLOIDÓZA.....	3
3.1.1	Charakteristika	3
3.1.2	Historie.....	4
3.1.3	Klasifikace a nomenklatura.....	4
3.1.4	Patogeneze	6
3.1.5	Symptomy	7
3.1.6	Léčba.....	8
3.2	METODY PRŮKAZU AMYLOIDU	9
3.2.1	Barvení kongo červení	9
3.2.2	Imunohistochemie.....	10
3.2.3	Elektronová mikroskopie	11
3.2.4	Proteomická analýza	12
4	MATERIÁL A METODY	14
4.1	Biologický materiál	14
4.2	Použité chemikálie, soupravy a roztoky.....	15
4.3	Seznam použitých přístrojů a zařízení	15
4.4	Použité experimentální metody a vyhodnocovací postupy	16
4.4.1	Zpracování tkáňových vzorků (FFPE).....	16
4.4.2	Laserová mikrodisekce	16
4.4.3	Postup zpracování mikrodisekovaného vzorku	17
4.4.4	Purifikace peptidů	17
4.4.5	LC-MS/MS analýza	17
4.4.6	Zpracování dat v programu MaxQuant.....	18
4.4.7	Vyhodnocení dat	19
5	VÝSLEDKY.....	21
6	DISKUZE	28
7	ZÁVĚR.....	31
8	LITERATURA	32

SEZNAM SYMBOLŮ A ZKRATEK

AA	sérový amyloid A
AFib	fibrinogen α
AFP	amyloidní fibrilární protein
AH	těžký řetězec imunoglobulinů
ALys	lysozym C
AL κ	lehký řetězec imunoglobulinů kappa
AL λ	lehký řetězec imunoglobulinů lambda
ApoA-IV	apolipoprotein A-IV
ApoE	apolipoprotein E
ATTR	transthyretin
A β 2M	β 2-mikroglobulin
CID	kolizně indukovaná disociace (collision-induced dissociation)
CJD	Creutzfeldt-Jakobova choroba
CNS	centrální nervová soustava
CR	kongo červen
Cryo-EM	kryogenní elektronová mikroskopie
EM	elektronová mikroskopie
FFPE	tkáň fixovaná ve formalínu a zalitá do parafínu
FDR	false discovery rate
GIT	gastrointestinální trakt
GSS	Gerstmann-Sträussler-Scheinker syndrom
iBAQ	intensity based absolute quantification
IHC	imunohistochemie
IL-6	interleukin 6
LFQ	label free kvantifikace
LMD	laserová mikrodisekce
LC	kapalinová chromatografie
MS	hmotnostní spektrometrie
MS/MS	tandemová hmotnostní spektrometrie
m/z	poměr hmotnosti a náboje
PNS	periferní nervová soustava
PrP _c	helikální izoforma prionového proteinu

PrP _{Sc}	infekční izoforma prionového proteinu
SAP	sérový amyloidový P protein
SEM	skenovací elektronová mikroskopie
TEM	transmisní elektronová mikroskopie
TNF	tumor nekrotizující faktor
UAS	universal amyloid signature

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Symptomy u pacientů s diagnostikovanou AL amyloidózou – modřiny v oblasti očí (vlevo), makroglosie (vpravo) (převzato z Falk et al., 2016)..... 8

Obrázek 2: (A) Barvení amyloidního depozita kongo červení, světelný mikroskop (Z = 400x). (B) Typický zelený dvojlom amyloidního depozita barveného kongo červení při pozorování v polarizovaném světle (Z = 400x) (převzato: Mollee et al., 2014)..... 10

Obrázek 3: AL amyloid vizualizovaný pomocí zlatých nanočástic (cryo-EM; měřítko 50 nm) (převzato: Cendrowska et al., 2020)..... 12

Obrázek 4: Řez tkáně z rekta s depozity amyloidu obarvenými do červena a označenými šipkami. Tkáň je podbarevna modře. Měřítko = 500 μ m. (Foto: Ing. Mgr. Ivo Überall, Ph.D.)..... 21

SEZNAM GRAFŮ

Graf 1: Relativní proteinová abundance získaná analýzou tkáně z rekta pacienta č. 1. Proteiny jsou rozděleny do tří skupin: všechny proteiny ve vzorku (100 %), neamyloidní proteiny (75,27 %) a amyloidní proteiny (24,73 %). Amyloidní proteiny jsou dále rozděleny do dvou podskupin: amyloidní fibrilární proteiny (modrá) a s amyloidem asociované proteiny (oranžová)..... 23

Graf 2: Relativní zastoupení pěti nejvíce abundantních amyloidních fibrilárních proteinů u pacienta č. 1 ve tkáňovém vzorku z rekta (biologický replikát č. 1). Nejvíce zastoupený amyloidní fibrilární protein tvoří 77 % relativní proteinové abundance ve skupině amyloidních fibrilárních proteinů, Ig lambda-1 chain C region je v tomto případě typizujícím proteinem pro AL amyloidózu..... 23

Graf 3: Proteiny vzestupně seřazené dle intenzity u vzorku z rekta pacienta č. 1. Amyloidní proteiny jsou značeny oranžově a neamyloidní jsou značeny šedě..... 24

Graf 4: Graf kumulativní četnosti proteinové abundance zobrazuje postupně nasčítanou četnost jednotlivých vzestupně uspořádaných hodnot relativních proteinových abundancí – zobrazuje míru příspěvku každého jednotlivého proteinu k celkové abundanci proteinů ve vzorku z rekta pacienta č. 1. Amyloidní proteiny jsou označeny oranžově a neamyloidní proteiny jsou označeny šedě..... 24

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Amyloidní fibrilární proteiny a jejich prekurzorové proteiny u člověka (Benson <i>et al.</i> , 2018).....	5
Tabulka 2: Seznam vyšetřovaných FFPE tkáňových vzorků.....	14
Tabulka 3: Informace o mikrodisekované FFPE tkáni odebrané z rekta u pacienta č. 1.	22
Tabulka 4: Výsledky typizace amyloidu u FFPE vzorků na základě proteomické analýzy.....	25
Tabulka 5: Porovnání parametrů P-skóre a D-skóre, AFP, UAS a celkového zatížení amyloidem u 3 skupin vzorků – typizovaných CR+, netylizovaných CR+ a CR– vzorků.	26
Tabulka 6: Porovnání vybraných parametrů u mikrodisekovaných CR+ tkání a CR– FFPE tkání.	27

1 ÚVOD

Amyloidózy tvoří skupinu onemocnění, jež je obecně spojovaná s ukládáním nerozpustných amyloidních fibrilárních proteinů (tzv. amyloidů) v extracelulárním prostoru tkání v lidském těle. Toto ukládání vede k postupným změnám mikroprostředí, k destrukci tkáně v okolí depozita, k poškození funkce zasaženého orgánu a v některých případech až k jeho selhání. Dnes je známo 36 amyloidních proteinů, které jsou zodpovědné za vznik různých typů amyloidóz. Protože je léčba velmi specifická, je nutné správně identifikovat prekurzorový amyloidní fibrilární protein způsobující onemocnění.

Diagnostika amyloidóz zahrnuje histologický průkaz amyloidu ve tkáni barvením tkáňového řezu kongo červení. V běžné klinické praxi se samotná typizace amyloidu provádí imunohistochemickou analýzou, která má ovšem několik nedostatků, týkajících se především citlivosti a specifity zvolených protilátek. Nejpokročilejší technikou je proteomická analýza, která jednak umožňuje přímou identifikaci amyloidního proteinu ve vzorku, jednak je citlivá a přesná. Typizace je pak založena na stanovení nejvíce abundantního amyloidního proteinu.

V rámci experimentální části této bakalářské práce byly typizovány amyloidní fibrilární proteiny z řezů formalínem fixovaných tkání zalitých do parafínu (FFPE) pomocí laserové mikrodisekce a tandemové hmotnostní spektrometrie (LMD-LC-MS/MS).

2 CÍLE PRÁCE

Cílem teoretické části bakalářské práce bylo vypracování literární rešerše o amyloidózách, amyloidních proteinech a metodách jejich prokazování.

Cílem praktické části bylo zpracování 24 FFPE tkáňových vzorků s amyloidními depozity pomocí laserové mikrodisekce a tandemové hmotnostní spektrometrie. A z takto získaných dat identifikovat a najít nejvíce abundantní amyloidní fibrilární protein, který určuje typ amyloidního depozita v daném vzorku.

3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1 AMYLOIDÓZA

3.1.1 Charakteristika

Amyloidózy jsou heterogenní skupinou onemocnění, která jsou obecně spojovaná s ukládáním nerozpustných amyloidních fibril v lidském těle a také v tělech různých obratlovců (Benson *et al.*, 2018). Extracelulární ukládání různých typů amyloidních proteinů do tkání vede k postupným změnám v okolí depozita a k destrukci tkání. Tímto dochází v průběhu času k poškození funkcí orgánů a v některých případech i k jejich selhání (Pepys, 2014). Mezi nejčastěji poškozené orgány patří srdce, ledviny, játra a periferní nervový systém (Brambilla *et al.*, 2013).

Proteinové komponenty depozit jsou specifické a jsou vytvářeny přirozeně rozpustnými monomerními proteiny, které jsou přeměňovány v patologické fibrilární formy, k čemuž dochází např. na základě genových mutací (Pepys *et al.*, 2014). Proteiny v depozitech polymerizují a vytvářejí nerozpustné amyloidní fibrily, které mají konformaci β -skládaného listu (Theis *et al.*, 2013). Samotné skládání, které vede k vytvoření těchto fibril, ale není doposud plně pochopeno (Merlini, 2011). Tyto amyloidní fibrily jsou pevné a nevětvené proteinové struktury s průměrem okolo 10 nm (Pepys, 2006; Eanes *et Glenner* 1968).

Amyloidózy se dle místa výskytu dělí na dvě formy, systémové a lokalizované. Depozita vytvářející se v jednom orgánu, která mají tedy pouze jedno místo výskytu, řadíme do formy lokalizované. Zatímco depozita v různých orgánech a tkáních, která se vyskytují na více místech současně, řadíme do formy systémové (Hazenberga, 2013). Klasifikace amyloidóz se opírá o prokázání prekurzorového amyloidního fibrilárního proteinu. Dosud bylo identifikováno 36 takových proteinů u lidí a dalších 10 u obratlovců (Benson *et al.*, 2018). Existuje mnoho druhů systémových amyloidóz, ale čtyři z nich se vyskytují častěji než ostatní – dohromady představují 90 % všech případů amyloidóz. Jedná se o AA, ATTR, AL κ a AL λ amyloidózu (Vrana *et al.*, 2009).

Depozita nejsou vytvářena pouze ze samotných amyloidních proteinů, ale obsahují další komponenty, především proteoglykany, glykosaminoglykany a lipoproteiny. Mezi ty s nejvyšším výskytem patří sérový amyloid P (SAP), apolipoprotein E (ApoE) a apolipoprotein A-IV (ApoA-IV) (Flodrová *et al.*, 2018).

3.1.2 Historie

Termín „amyloid“ byl poprvé představen v roce 1854 německým lékařem Rudolfem Virchowem. Tento název Virchow navrhl proto, že barvení amyloidní tkáně jódem mělo podobný výsledek jako barvení škrobu (Sipe *et* Cohen, 2000). Na základě této reakce pak pojmenoval strukturu jako amyloid, tedy „škrobu se podobající“ (z řeckého *amylon* a latinského *amylum*, v překladu znamenající škrob) (Benson *et al.*, 2018). V roce 1859 však bylo prokázáno, že se nejedná o škrob, nýbrž o proteinovou strukturu, název ovšem změněn nebyl (Sipe *et* Cohen, 2000).

Velmi důležitým krokem byl objev specifického barvení amyloidních proteinů kongo červení, jehož autorem byl Hans Bennhold v roce 1922 (Bennhold, 1922). Na jeho práci navázali v roce 1927 Paul Divry a Marcel Florkin objevem charakteristické zelené barvy amyloidní tkáně barvené kongo červení při ozáření polarizujícím světlem, což dále prohloubilo studium amyloidů (Divry *et* Florkin, 1927). V roce 1959 byla pomocí elektronové mikroskopie objevena fibrilární struktura amyloidů Alanem Cohenem a Evanem Calkinsem (Hazenberg, 2013; Kyle *et al.*, 2001). Dalším významným krokem byl popis struktury β -skládaného listu samotných amyloidních fibril Georgem Glennerem v roce 1968 (Eanes *et* Glenner, 1968).

Později došlo k rozvoji detekce amyloidů pomocí protilátek, což je v dnešní době nejběžnější způsob určení typu amyloidózy (Linke, 2012). Dnes však také dochází k implementaci proteomických metod – konkrétně se jedná o použití laserové mikrodisekce (LMD) následované analýzou pomocí tandemové hmotností spektrometrie (LC-MS/MS). Zmíněná metoda je schopná přesně identifikovat amyloidní prekurzorový protein za využití malého množství tkáně (Klein *et al.*, 2011).

3.1.3 Klasifikace a nomenklatura

Od roku 1974 jsou publikovány směrnice týkající se názvosloví amyloidů a amyloidóz. Tuto nomenklaturu zaštiťuje výbor z Mezinárodní společnosti pro amyloidózu (International Society of Amyloidosis, ISA), která vydává nové směrnice přibližně každé dva roky (Sipe *et al.*, 2016).

Nomenklatura amyloidóz je odvozena od amyloidních prekurzorových proteinů. Skutečnost, že se jedná o amyloidní protein, je v názvu značena písmenem A, za kterým následuje zkratka

konkrétního prekurzorového proteinu. Jako příklad je možné uvést amyloidózu odvozenou z lehkých řetězců imunoglobulinu, tedy AL amyloidózu, nebo ATTR amyloidózu způsobenou transthyretinem. Samotné označení AL a ATTR popisuje protein způsobující onemocnění (viz Tabulka 1) (Benson *et al.*, 2018).

Mutantní varianta amyloidního proteinu se značí na základě delece nebo substituce na proteinu, např. ATTRV30M nebo ALysI56T. Ačkoli se doporučuje použití třípísmenkového kódu pro aminokyseliny, jednopísmenkový kód je též akceptován (Sipe *et al.*, 2016).

Tabulka 1: Amyloidní fibrilární proteiny a jejich prekurzorové proteiny u člověka (Benson *et al.*, 2018).

Amyloidní protein	Prekurzorový protein	Systémová (S) /lokalizovaná (L)	Získaná (Z) /dědičná (D)	Cílové orgány
AL	Lehké řetězce imunoglobulinů	S, L	Z, D	Všechny orgány mimo CNS
AH	Těžké řetězce imunoglobulinů	S, L	Z	Všechny orgány mimo CNS
AA	Sérový amyloid A	S	Z	Všechny orgány mimo CNS
ATTR	Transthyretin, wt*	S	Z	Srdce hlavně u mužů, plíce, ligamenta
Aβ2M	Transthyretin, varianty	S	D	PNS, ANS, srdce, oči
	β2-mikroglobulin, wt	S	Z	Pohybový systém
AApoAI	β2-mikroglobulin, varianty	S	D	ANS
	Apolipoprotein A I, varianty	S	D	Srdce, játra, ledviny, PNS, varlata, hrtan, kůže
AApoAII	Apolipoprotein A II, varianty	S	D	Ledviny
AApoAIV	Apolipoprotein IV, wt	S	Z	Ledviny (dřeň)
AApoCII	Apolipoprotein C II, varianty	S	D	Ledviny
AApoCIII	Apolipoprotein C III, varianty	S	D	Ledviny
AGel	Gelsolin, varianty	S	D	PNS, rohovka
ALys	Lysozym, varianty	S	D	Ledviny
ALECT2	Leukocytární chemotaktický faktor-2	S	Z	Ledviny
AFib	Fibrinogen α, varianty	S	D	Ledviny
ACys	Cystatin C, varianty	S	D	PNS, kůže
ABri	ABri proteinový prekurzor, varianty	S	D	CNS
ADan	ADan proteinový prekurzor, varianty	L	D	CNS
Aβ	Aβ proteinový prekurzor, wt	L	Z	CNS
	Aβ proteinový prekurzor, varianty	L	D	CNS
AαSyn	α-Synuclein	L	Z	CNS
ATau	Tau	L	Z	CNS
APrP	Prionový protein, wt	L	Z	CJD, fatální insomnie
	Prionový protein, varianty	L	D	CJD, GSS syndrom, fatální insomnie

Tabulka 1: Amyloidní fibrilární proteiny a jejich prekurzorové proteiny u člověka (Benson *et al.*, 2018); pokračování

Amyloidní protein	Prekurzorový protein	Systémová (S) /lokalizovaná (L)	Získaná (Z) /dědičná (D)	Cílové orgány
ACal	(Pro)kalcitonin	L	Z	C buňky nádoru štítné žlázy
AIAPP	Ostrůvkový amyloidový polypeptid (amylin)	L	Z	Langerhansovy ostrůvky, Inzulinom
AANF	Atriální natriuretický faktor	L	Z	Srdeční síně
APro	Prolaktin	L	Z	Prolaktinom, stárnutí hypofýzy
AIns	Insulin	L	Z	Iatrogeně, v místě vpichu
ASPC	Plicní surfaktant	L	Z	Plíce
AGal7	Galektin 7	L	Z	Kůže
ACor	Corneodesmin	L	Z	Zrohovatělý epitel, vlasové folikuly
AMed	Lactahedrin	L	Z	Senilní aorta
AKer	Kerato-epitelin	L	Z	Rohovka
ALac	Lactoferin	L	Z	Rohovka
AOAAP	Odontogenní protein asociovaný s amyloblastem	L	Z	Odontogenní nádory
ASem1	Semenogelin 1	L	Z	Semenné vajíčky
AEnf	Enfurvitid	L	Z	Iatrogeně
ACatK	Cathepsin K	L	Z	Asociován s nádory

wt* – wild type; CNS – centrální nervová soustava; PNS – periferní nervová soustava; ANS – autonomní nervový systém; CJD – Creutzfeldtova-Jakobova choroba; GSS – Gerstmann-Sträussler-Scheinker syndrom

3.1.4 Patogeneze

Amyloidózu způsobují proteiny, u kterých dochází ke konformační změně. Z jejich původní, funkční a rozpustné formy přecházejí na fibrilární nerozpustnou formu. Jednotlivé amyloidózy se pak liší na základě prekurzorového proteinu, který vytváří agregát (Merlini *et al.*, 2011).

Mechanismů vytváření agregátů neboli amyloidogeneze je několik. Mezi ně patří genetické mutace, které způsobují většinu dědičných forem amyloidóz (např. AApoAI, ALys a ATTR amyloidózy) (Leung *et al.*, 2012). Bodová mutace genu, který kóduje prekurzorový protein, často vede k záměně aminokyseliny a v některých případech může delece vést k její ztrátě. V obou případech se vytváří aberantní amyloidogenní protein (Westermarck *et al.*, 2015).

Amyloid se může vytvářet z běžného proteinu. Příkladem může být tranthyretin a z něho odvozená senilní amyloidóza. Mezi další amyloidy tohoto typu pak patří prolaktin, kalcitonin nebo amylin (Leung *et al.*, 2012). Dalším mechanismem je dosažení kritické koncentrace prekurzorového proteinu. Jako příklad je možné uvést AL amyloidózu, u které vysoká koncentrace monoklonálních protilátek v plazmě v důsledku chronických infekcí nebo zánětů

způsobuje agregaci lehkých řetězců imunoglobulinů v depozita amyloidu (Westermarck *et al.*, 2015; Leung *et al.*, 2012).

Amyloidy mohou být taktéž indukovány priony. Priony se mohou podílet na tvorbě amyloidu jako infekční agens bez obsahu nukleové kyseliny. Chovají se jako templát pro konformační přeměnu prionového proteinu (PrP_C) v nerozpustnou infekční izoformu (PrP_{Sc}) (Leung *et al.*, 2012; Aguzzi, 2008).

3.1.5 Symptomy

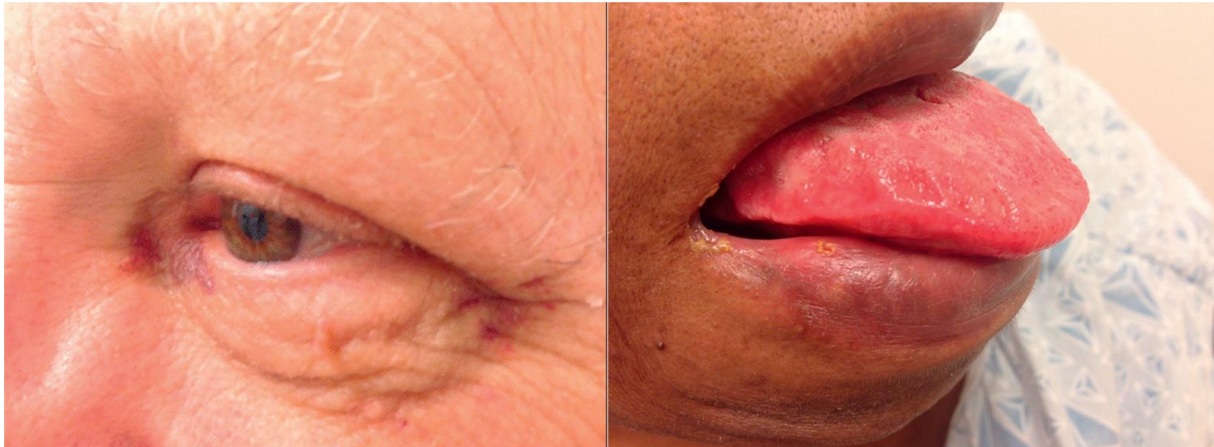
Amyloidózy se projevují velkou škálou symptomů v závislosti na typu a lokalizaci amyloidních depozit. Počáteční symptomy jsou často nespecifické, a proto je zachycení nemoci včas náročné. Mezi prvotní projevy nemoci patří závratě, otékání kotníků, tvorba modřin a průjem, ale také například ztráta na váze (Dubrey *et al.*, 2011). Postupně dochází k poškození funkce tkání a v některých případech i k selhání zasažených orgánů. Příznaky jsou pak spojeny se selháním daného orgánu (Mollee *et al.*, 2014). U mladých lidí je výskyt amyloidóz velmi vzácný, prevalence se zvyšuje po 40–50 roku života (Westermarck *et al.*, 2015).

Nejčastěji se vyskytující amyloidózou je AL amyloidóza, u které bývá postiženo více orgánů, proto je také množství příznaků u této nemoci velmi obsáhlé (Falk *et al.*, 1997). Mezi počáteční příznaky patří únava a ztráta na váze. Pozdější klinické příznaky se dále odvíjejí od zasaženého orgánu. AL amyloidóza zasahuje všechny orgány kromě mozku, nejčastěji pak srdce a ledviny (viz Tabulka 1).

Mezi symptomy spojené se zasažením srdce patří příznaky selhání srdce. Vytvářející se depozita v srdci ovlivňují stahování a relaxaci srdečních svalů, což může vést až k zástavě srdce (Dorbala *et al.* 2014). AL amyloidóza zasahující ledviny způsobuje albuminurii v 80 % případů (Kyle *et Griep*, 1983) a ve většině případů je v moči pacientů také nález lehkých řetězců imunoglobulinů, a to asi u 70 % pacientů (Ogg *et al.*, 1981).

Při zasažení gastrointestinálního traktu (GIT) mohou pacienti pociťovat předčasný pocit sytosti, zácpu nebo průjem. Zasažení GIT je také doprovázeno malabsorpcí, která vede ke ztrátě váhy u většiny pacientů (Tada *et al.*, 1994). Makroglosie neboli abnormální zduření jazyka se objevuje ve 20 % případů. Dalším symptomem může být také vytváření modřin (viz

Obrázek 1) v důsledku ukládání amyloidu do stěn kapilár, které se stávají křehčí, a zvyšuje se tak jejich krvácivost (Leung *et al.*, 2012).



Obrázek 1: Symptomy u pacientů s diagnostikovanou AL amyloidózou – modřiny v oblasti očí (vlevo), makroglosie (vpravo) (převzato z Falk *et al.*, 2016).

3.1.6 Léčba

V současnosti je léčba dostupná pro většinu hlavních typů amyloidóz, avšak léčba není univerzální, ale je typově specifická (Pepys, 2001). Lokální formy amyloidóz jsou léčeny pouze chirurgickými zákroky, které odstraní postiženou oblast. U systémových amyloidóz má léčba dvojí zaměření. Prvním je redukce zdroje amyloidních fibril způsobujících onemocnění a tím zabránění tvorbě depozita v těle. Druhým cílem je udržet pacienty při životě tak dlouho, aby se projevil výsledek cíle prvního, toho je dosaženo např. dialýzou nebo transplantací orgánu, který byl zasažen (Pepys, 2006).

Pro nejčastější typy systémových amyloidóz (AL a AA amyloidózy) je nejvhodnějším způsobem léčby redukce prekursorových fibril vytvářejících depozita. Léčba AA amyloidózy spočívá v potlačení infekce a zánětlivých onemocnění (Leung *et al.*, 2012). Cílem léčby je snížení produkce sérového amyloidu A (SAA) pomocí cytostatik nebo kortikosteroidů. K dalším metodám patří například léčba pomocí monoklonálních protilátek proti cytokininům, zejména TNF a IL-6 (Okuda *et al.*, 2013; Leung *et al.*, 2012). U AL amyloidózy, která je ve většině případů způsobována plazmocelulární dyskrázií, se ukázala efektivní antimyelomová terapie. Tato terapie spočívá v podávání cytostatik a transplantaci kostní dřeně (Westermarck *et al.*, 2015; Leung *et al.*, 2012).

Dědičné typy amyloidóz jsou léčeny převážně transplantací orgánů, které jsou zdrojem prekurzorových proteinů. Nejčastěji se tento postup provádí u pacientů s ATTR amyloidózou, u které je prekurzorový amyloid, transthyretin, syntetizován v játrech (Leung *et al.*, 2012; Yamashita *et al.*, 2012).

Stále se rozvíjející znalosti o vzniku a struktuře fibril posouvají možnosti léčby. Jejich zaměření je především na samotné fibrily (na jejich formu před agregací) a na molekuly, které s nimi asociují. Mezi takové molekuly patří heparan sulfát (HS) nebo sérový amyloidový P protein (SAP) (Westermarck *et al.*, 2015).

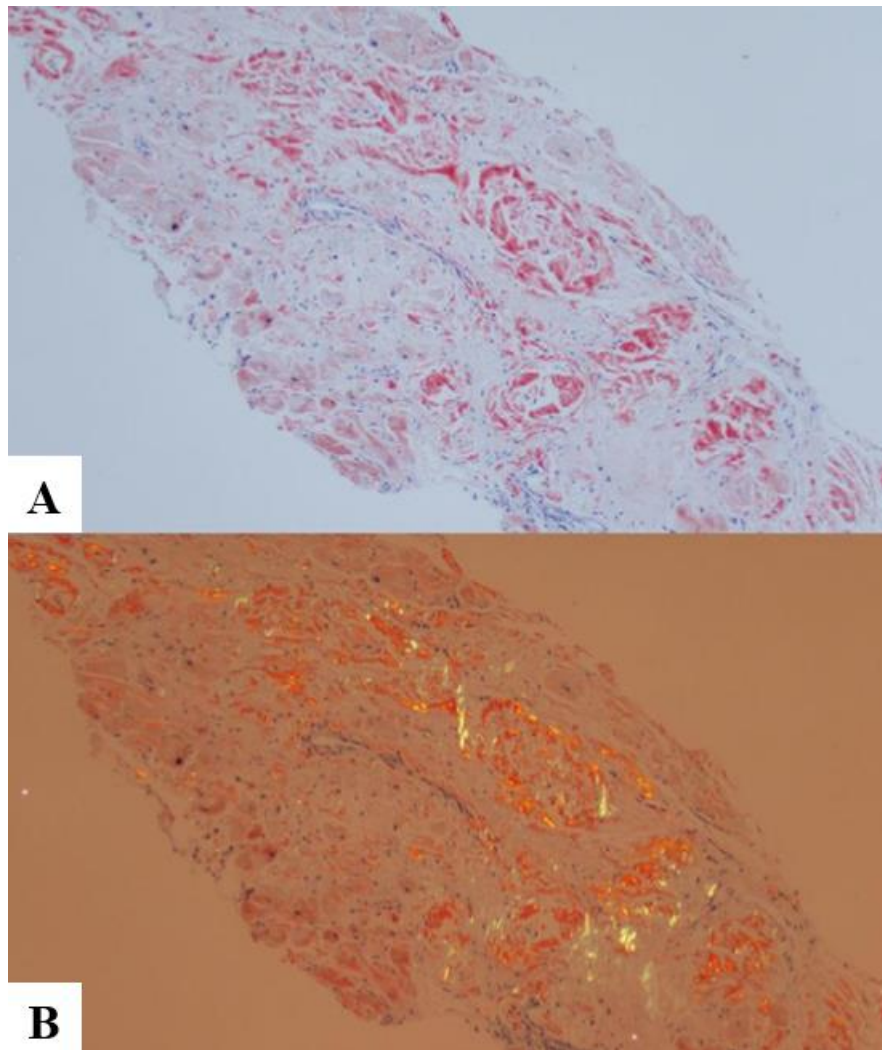
3.2 METODY PRŮKAZU AMYLOIDU

3.2.1 Barvení kongo červení

Kongo červen (CR, difenyl-bis-alfa-naftylaminsulfonan sodný) je azobarvivo původně zamýšlené na barvení papíru a textilií. Je to toxické, pravděpodobně karcinogenní a mutagenní barvivo (Jalandoni-Buan *et al.*, 2010; Cooksey, 2014). V roce 1922 Hermann Bennhold zavedl do klinické praxe barvení pomocí CR pro průkaz amyloidních depozit ve tkáních (Bennhold, 1922).

Barvení CR je dodnes základem histologického potvrzení amyloidního depozita ve spojení s mikroskopií v polarizovaném světle. Kongo červen barví amyloidní depozitum světle růžovou až oranžovo-červenou barvou a vydává typický zelený dvojlom při pozorování v polarizovaném světle (viz Obrázek 2) (Kyle, 2001; Howie *et al.* 2009). Jedná se o jednu z vlastností, která odlišuje amyloidní fibrily od ostatních nepatogenních fibril (Divry *et al.* 1927; Leung *et al.*, 2012).

Ačkoliv byly objeveny i určité nedostatky této metody, zejména nespecifické barvení CR (falešně pozitivní barvení u špatně provedené biopsie, závislost metody na pH atd.), je tato metoda stále základem průkazu amyloidózy. Jedná se o rychlou a jednoduchou metodu, která je prvním krokem u typizace amyloidózy (Yakupova, 2019).



Obrázek 2: (A) Barvení amyloidního depozita kongo červení, světelný mikroskop ($Z = 400\times$). (B) Typický zelený dvojlom amyloidního depozita barveného kongo červení při pozorování v polarizovaném světle ($Z = 400\times$) (převzato: Mollee *et al.*, 2014).

3.2.2 Imunohistochemie

Imunohistochemie (IHC) je standardní metodou pro typizaci amyloidu. Jedná se o finančně dostupnou a časově nenáročnou metodu, která je schopna ve většině případů velmi úspěšně určit typ prekurzorového proteinu ve vzorku. (Gilbertson *et al.*, 2015). Principem identifikace amyloidních proteinů pomocí IHC je navázání specifických protilátek na FFPE tkáňové řezy, následované mikroskopickým vyhodnocením. Běžně testovací sady obsahují čtyři protilátky proti $AL\kappa$, $AL\lambda$, AA a ATTR amyloidním proteinům. Rozšířená sada pak obsahuje deset protilátek (tzv. „amY-kit“), pomocí kterých je možné identifikovat až osm amyloidních proteinů (AA, $AL\lambda$, $AL\kappa$, AH, ATTR, $A\beta 2M$, AFib a AApoAI) (Linke, 2012).

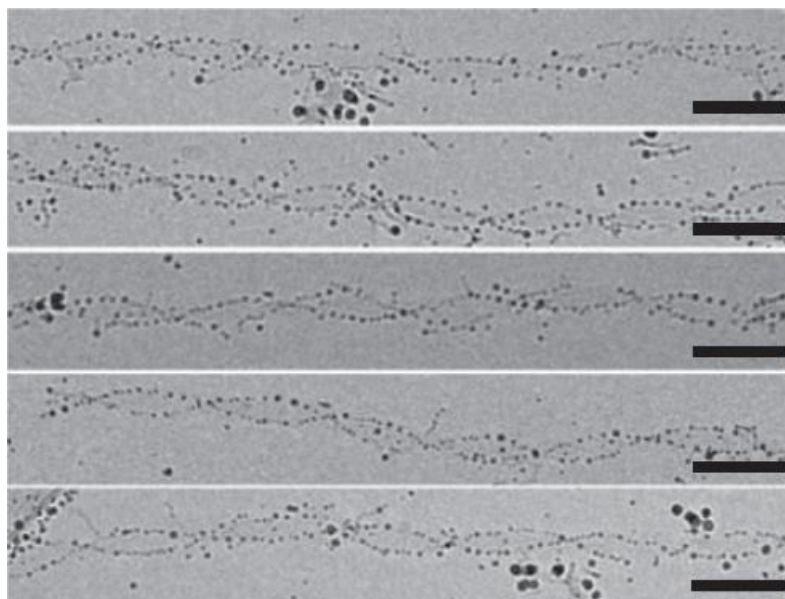
Identifikaci protilátek je také možné provádět pomocí fluorescenční mikroskopie. Protilátky navázané na amyloidu jsou značené fluoroforem, nejčastěji FITC, čehož se využívá hlavně u AL a AH amyloidózy. Alternativní metodou je využití protilátek značených pomocí peroxidáz (Leung *et al.*, 2012).

Metoda má ovšem několik nedostatků – hlavním z nich je nedostupnost protilátek proti méně častým typům amyloidózy. Citlivost a specifita protilátek jsou taktéž problémem, protože prekurzorové proteiny často nesou genetické mutace nebo jsou konformačně změněny tak, že se protilátka nenaváže. Protilátky jsou cílené proti nemutovaným formám proteinu, z tohoto důvodu mohou u mutovaných forem vykazovat nižší afinitu. To představuje komplikaci zejména u AL amyloidózy, jelikož se prekurzorový protein vyznačuje největší variabilitou (Leung *et al.*, 2012). Další komplikací může být také kontaminace proteiny z krve, která může vést k nespecifickému nasedání (Lavatelli *et Vrana*, 2011).

3.2.3 Elektronová mikroskopie

Další metodou typizace amyloidů je elektronová mikroskopie (EM), která je prozatím využívána především ve výzkumu. Mezi výhody EM patří zejména přesná lokalizace amyloidního proteinu v tkáni, neboť amyloidy mají velmi specifickou strukturu, kterou je málokdy možné zaměnit. Také jejich velikost, která se pohybuje mezi 7 a 12 nm, je velmi specifická (Leung *et al.*, 2012). K tomu se standardně využívá protilátek (např. anti-A β) z navázanými nanočásticemi zlata (tzv. „immunogold labelling“) (Reig *et al.*, 1995). I když se využívá jak skenovacích (SEM), tak transmisních (TEM) elektronových mikroskopů, častější je využití TEM (Goldberg *et Fišerová*, 2016).

Mezi nové způsoby analýzy amyloidů patří cryo-EM. Na rozdíl od klasických TEM a SEM není nutné vzorek sušit, barvit ani na něj deponovat materiál (pro zvýšení kontrastu) (Cendrowska *et al.*, 2020). Vzorek, v tomto případě tkáňový řez, je pouze zmrazen velmi rychlým ponořením do cryogenu (látky schopné vzorek zmrazit na teploty okolo -170 °C, aniž by se vytvořily krystaly ledu, které by buňky/tkáň poničily), nejčastěji tekutého ethanu (Dobro *et al.*, 2010). Samotný amyloid pak není lokalizován pomocí protilátek, ale pomocí zlatých nanočástic s navázanými ligandy, které se na amyloid navážou a je možné jej lokalizovat. Cryo-EM by mohla být v budoucnu využita ke studiu polymorfizmů amyloidních proteinů (Cendrowska *et al.*, 2020).



Obrázek 3: AL amyloid vizualizovaný pomocí zlatých nanočástic (cryo-EM; měřítko 50 nm) (převzato: Cendrowska *et al.*, 2020).

3.2.4 Proteomická analýza

Typizace amyloidu je nutná pro správnou diagnostiku a léčbu pacienta. Laserová mikrodisekce ve spojení s kapalinovou chromatografií a tandemovou hmotnostní spektrometrií (LMD-LC-MS/MS) představuje přímý a velmi specifický způsob typizace amyloidóz z FFPE tkáňových vzorků (Vrana *et al.*, 2009 a 2014).

Proces začíná barvením FFPE tkáňových řezů kongo červení, což obarví depozita amyloidu, které lze dále mikroskopicky identifikovat (Theis *et al.*, 2013). Laserová mikrodisekce umožňuje vyřezat a izolovat vybrané části tkáně. Speciálně upravený mikroskop umožňuje výběr oblasti zájmu, u FFPE tkáňových vzorků je to výběr amyloidního depozita barveného kongo červení (Dogan, 2012). Mikrodisekované oblasti jsou přeneseny do speciální zkumavky. Následuje extrakce a štěpení amyloidů trypsinem. Peptidy získané digescí jsou následně separovány pomocí kapalinové chromatografie a analyzovány pomocí hmotnostního spektrometru (Brambrilla *et al.*, 2015, Theis *et al.*, 2013).

Obdržená raw data jsou analyzována pomocí různých algoritmů (např. Mascot, Sequest a X!Tandem) a jsou prohledávána proti proteinových databázím (Vrana *et al.*, 2009 a 2014). Spolu s amyloidními proteiny je identifikována i řada dalších, mezi nimi i proteiny asociované s amyloidy, které se podílejí na tvorbě depozita (SAP, ApoE, ApoA-IV) (Brambilla *et al.*, 2013). Tyto proteiny dohromady tvoří tzv. „universal amyloid signature“ (UAS) (Vrana *et al.*,

2014). Pro každý vzorek je vytvořeno několik biologických replikátů, které jsou nezávisle na sobě zpracovány a zhodnoceny. Z dat je pak vybírán nejvíce abundantní amyloidní protein, který určuje typ amyloidózy (Theis *et al.*, 2013).

4 MATERIÁL A METODY

4.1 Biologický materiál

V rámci bakalářské práce bylo vyšetřováno celkem 24 vzorků (tkáňové řezy s depozity amyloidu). Tyto vzorky byly poskytnuty z archivu Fakultní nemocnice v Olomouci a Fakultní nemocnice v Brně. Vzorky byly odebrány z různých orgánů celkem 16 pacientů (9 žen a 7 mužů). Průměrný věk pacientů ve studii byl 68,5 roku v rozmezí 54–84 let. Vzorky byly odebírány buď u pacientů (biopsie) nebo v rámci pitvy (nekropsie). Vzorky pocházejí z různých tkání a orgánů: 5 vzorků pochází z ledviny, 4 ze sliznice průdušky, 3 z myokardu, 2 z močového měchýře, 2 z plic, 2 z tukové tkáně, 2 z rekta, 1 z lymfatické uzliny, 1 z tlustého střeva, 1 ze štítné žlázy a 1 z kosterního svalu (viz Tabulka 2).

Tabulka 2: Seznam vyšetřovaných FFPE tkáňových vzorků.

Pacient č.	Pohlaví	Věk	Typ tkáně/orgánu	Biopsie/nekropsie
1	žena	84	rektum	nekropsie
2	žena	59	lymfatická uzlina	nekropsie
3	žena	68	plíce	biopsie
4	žena	53	tuková tkáň – podkoží paže	nekropsie
5	žena	72	myokard ledvina	nekropsie
6	žena	69	plíce myokard ledvina	nekropsie
7	žena	54	myokard ledvina	nekropsie
8	žena	74	duodenum	biopsie
9	muž	74	tuková tkáň – břicho	biopsie
10	žena	59	rektum	nekropsie
11	muž	68	močový měchýř	biopsie
12	muž	74	ledvina	biopsie
13	muž	78	sliznice bronchu	biopsie
14	muž	79	kosterní sval	biopsie
15	muž	67	sliznice bronchu	nekropsie
16	muž	65	štítná žláza	biopsie

4.2 Použité chemikálie, soupravy a roztoky

Použité chemikálie a materiál

- 2-chloracetamid (Sigma-Aldrich, kat. č. 22790-250G-F)
- Acetonitril (Millipore, kat. č. 1.00029.2500)
- Deoxycholát sodný (Sigma-Aldrich, kat. č. 30970-100G)
- Ethylacetát (Fluka, kat. č. 34972-IL-R)
- Hydroxid amonný (Sigma-Aldrich, kat. č. A6899)
- Kyselina mravenčí pro LC-MS (Honeywell, kat. č. 56302)
- Kyselina trifluoroctová (Fluka, kat. č. 14264)
- Styrene Divinyl Benzene (SDB-RPS) extraction disks (3M, kat. č. 2241)
- Tris (2-karboxyethyl) fosfin hydrochlorid, TCEP (Sigma-Aldrich, kat. č. C4706-10G)
- Tris (hydroxymethyl) aminomethan (SERVA, kat. č. 37180.04)
- Trypsin/Lys-C Mix (PROMEGA, kat. č. V507A)

Použité roztoky a jejich příprava

100 mM Tris (pH 8,5): 484,4 mg Tris base rozpustit ve 40 ml dH₂O, upravit pH na hodnotu 8,5 přidavkem 1M HCl

SDC pufr: 50 mg SDC, 14,3 mg TCEP a 18,7 mg CAA rozpustit v 5 ml 100mM Tris base pufru (pH 8,5)

4.3 Seznam použitých přístrojů a zařízení

- Mikroskop IX71/TH4-200 (Olympus)
- Laserový mikrodisektor: MMI Cell Cut (Molecular Machines & Industries)
- Analytické váhy SBC21 (Scaltec)
- pH metr UltraBasic UB-10 (Denver Instruments)
- Magnetická míchačka s ohřevem MSH 300 (Biosan)
- Zásobník deionizované vody Mili-Q (Millipore)
- Vyhříváný termostat BIO TDB-100 (Biosan)
- Třepačka REAX control (Heidolph)
- Centrifuga Minispin (Eppendorf)
- Centrifuga 5810R (Eppendorf)

- Kapalinový chromatograf UltiMate 3000 RSLCnano System (Thermo Fisher Scientific)
- Hmotnostní spektrometr Orbitrap Fusion Tribrid (Thermo Fisher Scientific)
- Odparka Concentrator 5301 (Eppendorf)

4.4 Použité experimentální metody a vyhodnocovací postupy

4.4.1 Zpracování tkáňových vzorků (FFPE)

Všechny tkáňové vzorky byly fixovány ve formalínu a zality v parafínu. Tkáňe byly nařezány na mikrotomu na 4 μ m řezy. Tkáňové řezy byly přeneseny na speciální membránu a dále byly obarveny hematoxylinem a eosinem. Následně byly řezy barveny kongo červení pro vizualizaci depozit amyloidu.

Každý vzorek byl mikroskopicky vyšetřen na přítomnost depozit amyloidu. Zároveň byl pro každý vzorek vytvořen mikroskopický obrázek tkáňového řezu.

4.4.2 Laserová mikrodisekce

Cílem tohoto postupu bylo najít, označit a vyříznout depozita amyloidu a oddělit je od okolní nezasazené tkáňe. Pomocí mikroskopu byly nalezeny oblasti s depozity amyloidu. Laserový mikrodisektor umožňuje pomocí MMI Cell Tools softwaru specificky označit požadovanou oblast zájmu, která byla následně vyřezána pomocí laseru. Takto vyřezanou oblast je možné za použití speciálních mikroskopických nástrojů s lepivým víčkem oddělit od okolní tkáňe. Před samotným vyřezáním vzorků byl laserový mikrodisektor seřízen a otestován na tkáňovém řezu.

Z každého vzorku byly připraveny 1–3 biologické replikáty. Počet replikátů se lišil v závislosti na množství depozit amyloidu ve vzorku. V rámci jednoho replikátu byla vyříznuta a posbírána tkáň o ploše 300 000 μ m². U malého množství vzorků bylo odebráno menší množství tkáňe. Celkem bylo z 24 FFPE tkáňových řezů připraveno 65 vzorků – 57 vzorků s depozity amyloidu (CR+ tkáň) a 8 vzorků tkáňe bez depozit amyloidu (CR– tkáň, negativní kontrola).

4.4.3 Postup zpracování mikrodisekovaného vzorku

Do každé mikrozkušavky obsahující mikrodisekovanou tkáň na víčku bylo přidáno 50 μl SDC lyzačního pufru. Mikrozkušavky byly uzavřeny a následně byly převráceny víčkem dolů a vloženy na termoblok, kde byly inkubovány při 95 °C po dobu 1 h. Po odebrání vzorků z termobloku byly mikrozkušavky stočeny při 3 000 rpm po dobu 15 s a byly chlazeny na pokojovou teplotu. Ke každému vzorku bylo přidáno 50 μl Trypsin/LysC směsi o koncentraci 0,02 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$. Takto připravené vzorky byly inkubovány při 37 °C po dobu 3 h.

4.4.4 Purifikace peptidů

Purifikace peptidů byla provedena pomocí speciálně připravených špiček, obsahujících reverzní fáze SDB-RPS, tzv. StageTip (Kulak *et al.*, 2014). Pomocí jehly byly vyřezány malé disky SDB-RPS sorbentu, které byly nanášeny do 200 μl špiček. Každá špička obsahovala tři na sebe položené vrstvy SDB-RPS reverzní fáze. Takto připravené špičky byly zasunuty do upravených 2ml zkumavek a byly připraveny pro purifikaci peptidů.

Po štěpení byl každý vzorek smíchán se 75 μl 1% TFA a 75 μl 1% TFA v ethylacetátu. Veškerý vzorek byl nanášen na StageTip, který byl stočen na centrifuze při 2 000 rpm po dobu 3 min. Tyto podmínky pro stočení vzorku byly použity i v dalších krocích purifikace peptidů. Po stočení bylo přidáno dalších 100 μl 1% TFA v ethylacetátu a vzorky byly opět stočeny. Dalším krokem bylo přidání 100 μl 0,2% TFA, následovalo stočení. StageTip s promytými peptidy byl přenesen do nové 1,5ml zkumavky. Do StageTip bylo přidáno 100 μl 80% ACN s 1% NH_4OH a vzorky byly stočeny. Eluáty jednotlivých vzorků byly odpařeny v koncentrátoru při 45 °C po dobu 30–45 min. Vzorky s purifikovanými peptidy byly rozpuštěny ve 2% ACN a 0,5% TFA a byly přeneseny do označených vialek pro následnou LC-MS/MS analýzu.

4.4.5 LC-MS/MS analýza

Vzorky byly analyzovány na kapalinovém chromatografu UltiMate 3000 RSLCnano System ve spojení s hmotnostním spektrometrem Orbitrap Fusion Tribrid přes ionizační zdroj EASY-Spray. Směs peptidů byla nanášena na trap kolonu (C18, 5 μm , 100 μm x 20 mm) o průtoku 6 $\mu\text{l}/\text{min}$ pomocí nanášecí mobilní fáze o složení 1% ACN s 0,05% TFA v H_2O . Mobilní fáze

A byla složena z 0,1% FA v H₂O a mobilní fáze B byla složena z 0,1% FA v ACN. Po 5 min byl přepnut ventil a peptidy byly z trap kolony eluovány a separovány na nanokoloně (C18, 3 μm, 75 μm x 500 mm) pomocí lineárního gradientu z 2–35 % mobilní fáze B o průtoku 300 nl/min po dobu 60 min. Poté během 3 min bylo složení mobilní fáze zvýšeno z 35 % na 90 % B. Po dobu 5 min bylo složení udržováno při 90 % B. Po dobu 2 min složení kleslo na 2 % B a následně bylo při tomto složení udržováno dalších 20 min. Celková doba analýzy byla 95 min.

Eluované peptidy byly ionizovány v ionizačním zdroji EASY-Spray na hmotnostním spektrometru, který pracoval v data dependentním módu. MS1 sken byl analyzován v orbitrapu (m/z 400–1 500) s rozlišením 60 000. Orbitrap byl plněn na hodnotu $4,0 \cdot 10^5$ iontů. Deset nejvíce intenzivních iontů bylo postupně vybráno pro MS/MS sken v iontové pasti. Iontová past byla plněna na cílovou hodnotu $1,0 \cdot 10^4$ iontů, izolační šířka byla nastavena na hodnotu 1,6 m/z a fragmentace prekurzorů proběhla pomocí CID se 40% hodnotou normalizované kolizní energie. Q aktivace byla nastavena na hodnotu 0,25 a aktivační čas byl nastaven na hodnotu 10 ms. Maximální akumulací čas pro MS1 sken byl nastaven na 50 ms a pro MS/MS sken byl nastaven na 250 ms. Dynamické vyloučení bylo nastaveno na 60 s. Napětí na ionizačním zdroji bylo 2 kV a trubice pro transport iontů byla vyhřívána na 200 °C.

4.4.6 Zpracování dat v programu MaxQuant

Raw soubory byly zpracovány v programu MaxQuant (verze 1.6.7.0). Vyhledávání bylo provedeno proti lidské UniProt databázi (20180122_Uniprot_homo-sapiens_canonical_reviewed; 20 365 záznamů) pomocí vyhledávacího nástroje Andromeda. Jako enzym byl nastaven trypsin/P a bylo umožněno vynechání maximálně dvou štěpných míst. Karbamidometylace cysteinu byla nastavena jako fixní modifikace, oxidace methioninu a acetylace N-koncové části proteinu byly nastaveny jako variabilní modifikace. Pro první vyhledání peptidů byla nastavena tolerance 20 ppm a pro druhé 4,5 ppm. Proteinová kvantifikace byla provedena pomocí LFQ algoritmu v MaxQuant. Bylo umožněno spočítání iBAQ intenzit. „Match-between-runs“ algoritmus byl umožněn. Peptidové a proteinové hity byly filtrovány s 1 % FDR a minimální délka peptidu byla nastavena na 7 aminokyselin. Opačně čtená sekvence z původní databáze byla použita jako decoy databáze. Všechny ostatní parametry byly ponechány v původním nastavení.

4.4.7 Vyhodnocení dat

Analýza dat byla provedena v programu Perseus (verze 1.6.7.0). Soubor „proteinGroups.txt“ vytvořený v programu MaxQuant byl nahrán do programu Perseus a MS Excel.

Byla ověřena integrita dat, v případě chybějících informací pro název proteinu nebo genu byla tato informace doplněna na základě informace z UniProt kódu pro daný protein. Proteiny byly zařazeny do následujících kategorií a subkategorií:

Všechny proteiny:

- Ne-amyloidní proteiny
- Amyloidní proteiny
 - Amyloidní fibrilární proteiny
 - Proteiny podílející se na tvorbě depozit amyloidu

Proteiny z převrácené (decoy) databáze, kontaminanty a proteiny identifikované pouze modifikovaným peptidem byly odfiltrovány. U každého vzorku byl spočítán počet proteinů a také byl spočítán součet všech proteinových intenzit. Pro jednotlivé proteinové kategorie a podkategorie byly spočítány součty odpovídajících proteinových intenzit. Nakonec byl vypočítán relativní podíl jednotlivých proteinových kategorií ve vzorcích.

Byl sestaven graf, kde jsou proteiny řazeny vzestupně dle intenzity proteinů v závislosti na proteinovém pořadí. Byl sestaven graf kumulativní proteinové abundance na proteinovém pořadí pro každý vzorek. Tento graf ukazuje míru příspěvku každého proteinu k celkové abundanci proteinů ve vzorku.

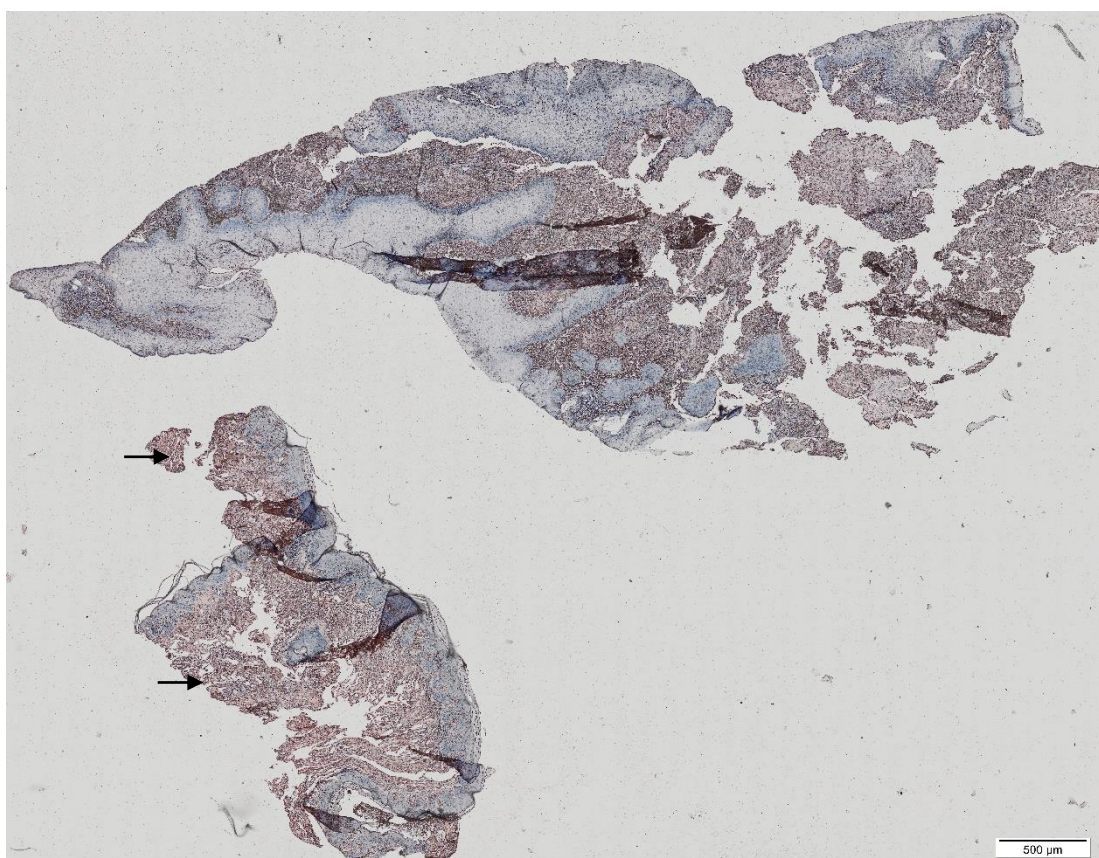
U amyloidních fibrilárních proteinů bylo spočítáno relativní zastoupení jednotlivých proteinů v této skupině. Prvních pět nejvíce abundantních proteinů spolu s jejich relativním zastoupením ve skupině bylo vyneseno do grafu. Nejvíce zastoupený protein v této skupině určuje typ amyloidu. Byly spočítány další pomocné parametry pro vyhodnocení amyloidu – P-skóre a D-skóre. P-skóre vyjadřuje míru zastoupení prvního nejvíce abundantního proteinu v amyloidních fibrilárních proteinech. D-skóre vyjadřuje podíl rozdílu mezi prvním a druhým proteinem vůči abundanci prvního proteinu ve skupině amyloidních fibrilárních proteinů.

Dále byly spočítány relativní hladiny abundance pro typizující amyloidní protein (AFP) a UAS („universal amyloid signature“, abundance pro SAP, ApoE a ApoA-IV) v jednotlivých vzorcích. Součet abundancí těchto proteinů odráží míru zatížení amyloidem ve tkáni po

odečtu abundancí těchto proteinů v normální zdravé tkáni. Součtem hodnot AFP a UAS byla získána míra celkového zatížení tkáně amyloidem.

5 VÝSLEDKY

Byla provedena typizace amyloidních depozit u 24 FFPE tkáňových vzorků. Nejprve byly vytvořeny mikroskopické obrázky vzorků. Každý vzorek byl vyšetřen na přítomnost amyloidních depozit. Na Obrázku 4 jsou vyznačena místa s depozity amyloidu, která byla následně mikrodisekována. U každého vzorku byly připraveny 1–3 biologické replikáty. Celkem bylo pomocí laserové mikrodisekce připraveno 65 vzorků.



Obrázek 4: Řez tkáně z rekta s depozity amyloidu obarvenými do červena a označenými šipkami. Tkáň je podbarevna modře. Měřítka = 500 μm. (Foto: Ing. Mgr. Ivo Überall, Ph.D.).

Informace o tloušťce řezu, sesbírané ploše a objemu tkáně pro každý vzorek byly zaznamenány. Záznamy pro reprezentativní vzorek č. 1 jsou uvedeny v Tabulce 3. V průměru bylo při každé mikrodisekci vyříznuto a posbíráno 1,42 nl FFPE tkáně. Jednotlivé vzorky byly zpracovány pro následnou LC-MS/MS analýzu. Naměřená data byla prohledána v programu MaxQuant a byl získán proteomický profil obsahující seznam identifikovaných proteinů spolu s jejich intenzitami.

Tabulka 3: Informace o mikrodisekované FFPE tkáni odebrané z rekta u pacienta č. 1.

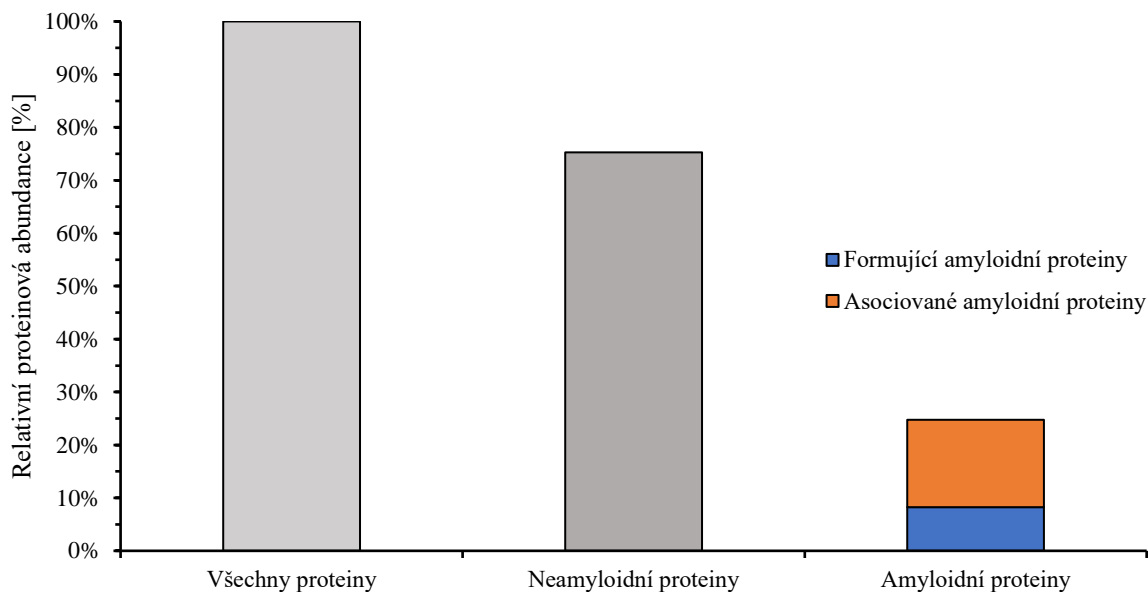
Pacient č.	Tloušťka řezu [μm]	Biologický replikát č.	Plocha [μm^2]	Objem tkáně [nl]
1	4	1	353 956	1,42
		2	335 974	1,34
		3	211 545	0,85

Vyhledaná data byla zpracována v programu MS Excel. Byly sestaveny grafy obsahující informace o proteinových abundancích pro jednotlivé vzorky (viz Graf 1, 2, 3 a 4).

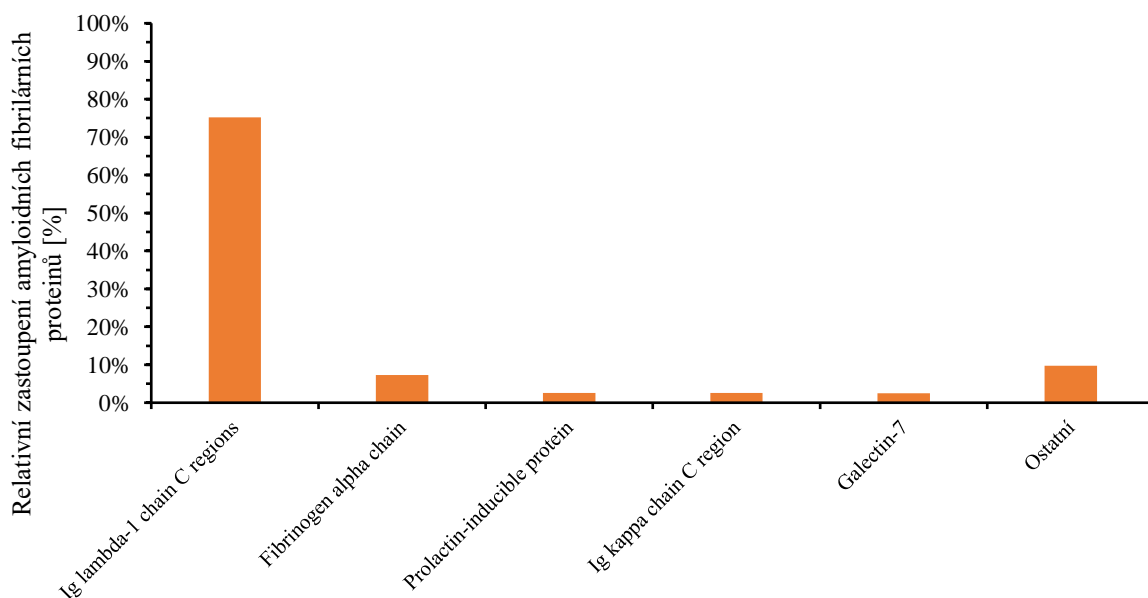
Vzorek č. 1 byl vybrán jako reprezentativní. V mikrodisekované CR+ FFPE tkáni z rekta bylo identifikováno 935 proteinů, z nichž 24,73 % tvořily amyloidní proteiny (viz Graf 1). V seznamu proteinů byly přítomny proteiny podílející se na tvorbě amyloidu (SAP, ApoE a ApoA-IV) v celkové míře 9,07 % (hodnota UAS). Nejvíce abundantním amyloidním fibrilárním proteinem ve vzorku byl Ig lambda-1 chain C region v míře 2,95 % (hodnota AFP). Dohromady s SAP, ApoE a ApoA-IV tvořila míra zatížení amyloidem tkáně 12,03 % z celkové relativní proteinové abundance. Nejvíce abundantní amyloidní fibrilární protein tvoří významnou část (P-skóre = 56,80 %, průměr ze 3 biologických replikátů) ve skupině amyloidních fibrilárních proteinů (viz Graf 2). Relativní rozdíl mezi prvním a druhým nejvíce abundantním amyloidním fibrilárním proteinem vůči prvnímu amyloidnímu fibrilárnímu proteinu byl velmi výrazný (D-skóre = 73,63 %). Ze získaných dat vyplývá, že protein Ig lambda-1 chain C region je typizujícím amyloidním fibrilárním proteinem a indikuje AL amyloidózu pro tento vzorek (viz Tabulka 4).

Dalším pomocným grafem pro vizualizaci a porovnání obsahu proteinů ve vzorku byl graf závislosti intenzity proteinů a proteinového pořadí (viz Graf 3). Graf kumulativní četnosti proteinové abundance zobrazuje postupně nasčítanou četnost jednotlivých vzestupně uspořádaných hodnot proteinových abundancí. Zobrazuje tak míru příspěvku každého proteinu k celkové abundanci proteinů ve vzorku (viz Graf 4).

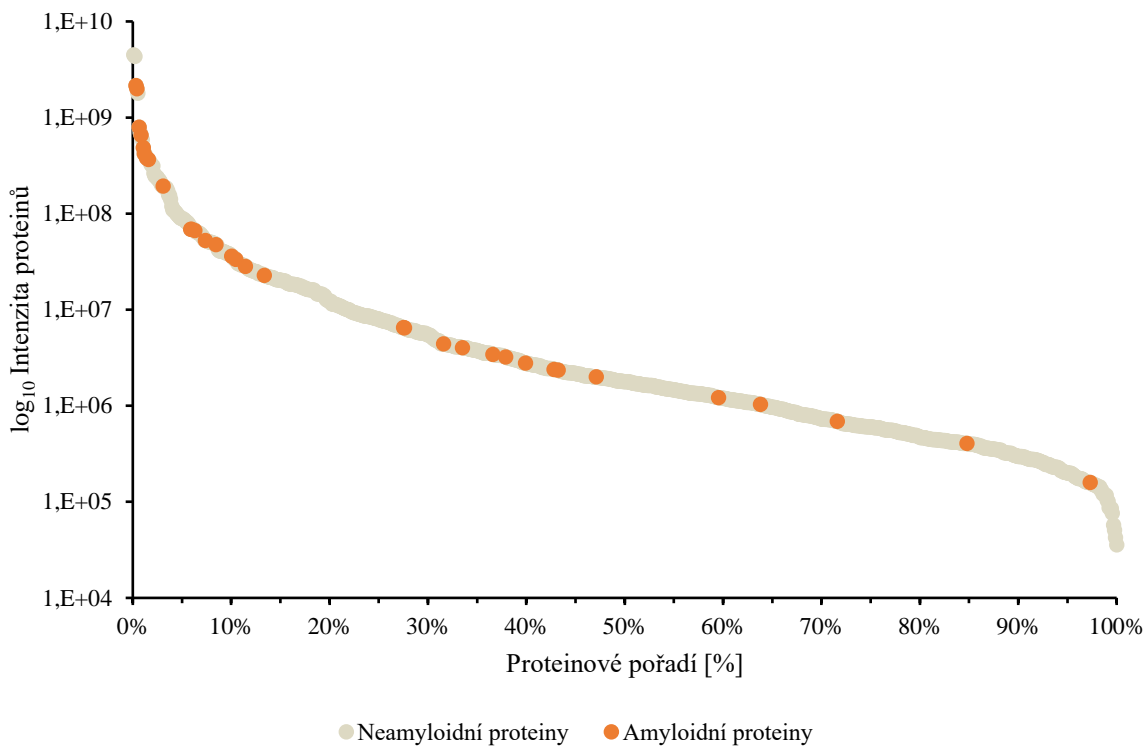
Z celkových 24 vzorků byla typizována AL amyloidóza u 11 z nich. Dále byla u 2 vzorků typizována AH amyloidóza a u 1 vzorku AA amyloidóza (viz Tabulka 4). U zbývajících 10 vzorků byly výsledky neprůkazné, hodnoty byly příliš nízké nebo různorodé na jednoznačnou typizaci. Hodnoty P-skóre, D-skóre, AFP, UAS a celkového zatížení byly vyšší u vzorků CR+ než u CR-. U vzorků s neprůkaznými výsledky byly hodnoty nižší než u typizovaných, ale vyšší než CR- kontrol (viz Tabulka 4).



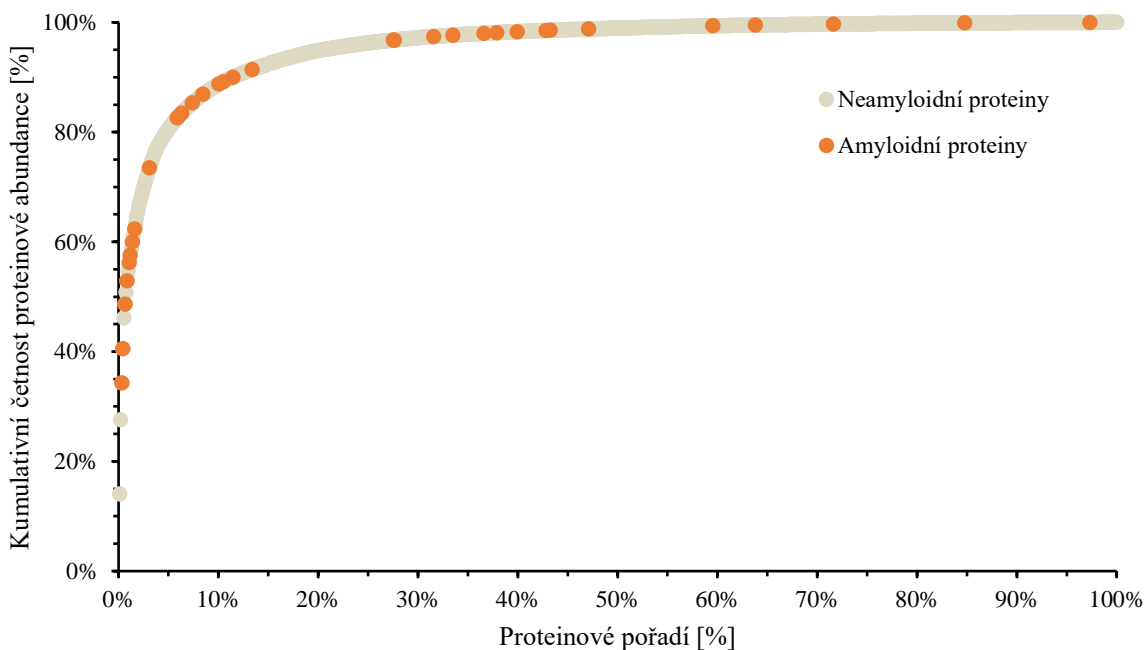
Graf 1: Relativní proteinová abundance získaná analýzou tkáně z rekta pacienta č. 1. Proteiny jsou rozděleny do tří skupin: všechny proteiny ve vzorku (100 %), neamyloidní proteiny (75,27 %) a amyloidní proteiny (24,73 %). Amyloidní proteiny jsou dále rozděleny do dvou podskupin: amyloidní fibrilární proteiny (modrá) a s amyloidem asociované proteiny (oranžová).



Graf 2: Relativní zastoupení pěti nejvíce abundantních amyloidních fibrilárních proteinů u pacienta č. 1 ve tkáňovém vzorku z rekta (biologický replikát č. 1). Nejvíce zastoupený amyloidní fibrilární protein tvoří 77 % relativní proteinové abundance ve skupině amyloidních fibrilárních proteinů, Ig lambda-1 chain C region je v tomto případě typizujícím proteinem pro AL amyloidózu.



Graf 3: Proteiny seřazené vzestupně dle intenzity u vzorku z rekta pacienta č. 1. Amyloidní proteiny jsou značeny oranžově a neamyloidní jsou značeny šedě.



Graf 4: Graf kumulativní četnosti proteinové abundance zobrazuje postupně nasčítanou četnost jednotlivých vzestupně uspořádaných hodnot relativních proteinových abundancí – zobrazuje míru příspěvku každého jednotlivého proteinu k celkové abundanci proteinů ve vzorku z rekta pacienta č. 1. Amyloidní proteiny jsou označeny oranžově a neamyloidní proteiny jsou označeny šedě.

Tabulka 4: Výsledky typizace amyloidu u FFPE vzorků na základě proteomické analýzy.

Pacient	FFPE vzorek	LMD BioRep	Tkáň/orgán	Typizující amyloidní protein	AFP [%]	P [%]	D [%]	UAS [%]	Zatížení [%]	Amyloidóza		
1	1	1	Rektum	Ig lambda-1 chain C region	6,22	25,53	96,55	9,40	15,62	AL		
		2		Ig lambda-1 chain C region	0,34	17,35	34,05	8,64	8,98			
		3		Ig lambda-1 chain C region	2,29	19,54	91,36	9,23	11,51			
2	2	1	Lymfatická uzlina	Ig gamma-1 chain C region	0,68	16,62	16,64	5,71	6,39	*		
		2		Apolipoprotein C-III	1,93	37,26	75,73	18,15	20,08			
		3		Ig kappa chain C region	0,34	11,18	39,64	5,59	5,93			
3	3	1	Plíce	Ig lambda variable 2-18	11,96	48,49	81,61	16,34	28,30	AL		
		2		Ig lambda variable 2-18	13,47	51,55	83,92	17,94	31,41			
		3		Ig lambda variable 2-18	13,32	51,47	78,04	14,25	27,57			
4	4	1	Tuková tkáň	Lysozyme C	0,26	16,66	32,29	4,28	4,54	*		
		2		Ig lambda-like polypeptide 1	1,25	20,87	66,19	3,78	5,03			
5	5	1	Myokard	Ig lambda-like polypeptide 5	0,20	5,91	42,37	3,66	3,86	*		
		6		1	Transthyretin	0,09	12,04	1,61	7,90		8,00	
		2		Ledvina	Transthyretin	0,21	17,46	17,70	10,46		10,67	
6	6	3	Myokard	Gelsolin	0,14	16,18	3,61	9,87	10,02	AL		
		7		1	Ig kappa chain C region	1,38	26,28	37,71	6,96		8,34	
		2		Ig kappa chain C region	2,33	37,19	44,74	9,10	11,43			
7	7	3	Ledvina	Ig kappa chain C region	1,90	34,99	44,43	9,70	11,59	AL		
		8		1	Ig kappa chain C region	0,60	10,69	60,07	1,78		2,38	
		2		Ig kappa chain C region	0,61	11,62	72,62	2,43	3,04			
8	8	1	Plíce	Ig kappa chain C region	1,46	13,77	76,53	4,01	5,47	AL		
		2		Ig kappa chain C region	5,05	29,98	49,68	7,26	12,30			
		3		Ig kappa chain C region	8,70	34,85	95,45	8,85	17,55			
9	9	1	Myokard	Ig kappa chain C region	0,44	10,15	53,33	5,86	6,30	*		
		2		Ig kappa chain C region	0,18	8,05	13,01	4,30	4,48			
		11		1	Ledvina	Ig kappa chain C region	1,12	10,32	42,98		3,70	4,82
10	10	2	Ledvina	Ig kappa chain C region	1,33	11,08	56,35	4,45	5,78	*		
		1		Ig lambda chain V-I region HA	13,72	56,47	95,61	35,74	49,45			
		2		Duodenum	Ig lambda chain V-I region HA	6,51	39,22	92,30	24,62		31,13	
11	11	3	Duodenum	Ig lambda chain V-I region HA	10,00	58,63	92,52	38,26	48,26	AL		
		13		1	Tuková tkáň	Gelsolin	0,22	18,88	38,36		10,09	10,32
		14		1	Gelsolin	0,23	5,92	70,54	2,67		2,90	
12	12	2	Rektum	Gelsolin	0,18	5,31	56,64	2,46	2,64	*		
		3		Gelsolin	0,19	5,43	78,41	2,40	2,58			
		15		1	Močový měchýř	Ig kappa chain C region	0,75	29,21	47,30		20,84	21,59
2	Ig kappa chain C region	0,77	21,42	30,13		15,29	16,05					
3	Ig kappa chain C region	0,77	20,91	72,67		15,40	16,16					

Tabulka 4: Výsledky typizace amyloidu u FFPE vzorků na základě proteomické analýzy; pokračování.

Pacient	FFPE vzorek	LMD BioRep	Tkáň/orgán	Typizující amyloidní protein	AFP [%]	P [%]	D [%]	UAS [%]	Zatížení [%]	Amyloidóza	
11	16	1	Močový měchýř	Ig kappa chain C region	0,88	31,52	23,51	23,24	24,12	AL	
		2		Ig kappa chain C region	1,09	33,57	37,86	23,29	24,38		
		3		Ig kappa chain C region	1,10	43,03	60,75	31,50	32,60		
12	17	1	Ledvina	Ig gamma-1 chain C region	0,21	18,79	39,59	8,50	8,71	*	
		18	Ledvina	Ig gamma-1 chain C region	0,29	8,90	62,32	3,74	4,02	*	
				Ig gamma-1 chain C region	0,45	12,80	66,76	6,29	6,74		
13	19	1	Sliznice bronchu	Ig alpha-1 chain C region	0,98	51,60	13,33	29,39	30,37	AH	
		2		Ig alpha-1 chain C region	1,03	59,16	6,46	33,54	34,57		
		3		Ig alpha-1 chain C region	0,86	52,18	3,36	29,52	30,38		
	20	2	Sliznice bronchu	Ig alpha-1 chain C region	0,94	60,11	3,81	35,79	36,73	AH	
				2	Ig alpha-1 chain C region	0,81	48,16	16,82	28,38		29,19
				3	Ig alpha-1 chain C region	1,01	61,32	4,68	36,64		37,65
14	21	2	Kosterní sval	Ig kappa chain C region	9,08	26,45	89,78	7,56	16,64	AL	
				2	Ig kappa chain C region	29,16	54,88	98,25	13,61		42,76
				3	Ig kappa chain C region	26,21	47,82	98,16	9,67		35,87
15	22	1	Sliznice bronchu	Ig lambda-1 chain C region	1,17	46,64	35,74	29,02	30,19	AL	
	23	1	Sliznice bronchu	Ig lambda-1 chain C region	0,77	52,86	38,59	33,03	33,80	AL	
16	24	1	Štítná žláza	Serum amyloid A-1 protein	22,04	50,68	95,96	18,79	40,84	AA	
		2		Serum amyloid A-1 protein	19,96	46,00	94,72	14,94	34,90		
		3		Serum amyloid A-1 protein	18,03	47,76	93,66	18,36	36,39		

* – výsledek není jednoznačný, hodnoty jsou příliš nízké a neprůkazné; AFP – relativní abundace prvního nejvíce abundantního fibrilárního amyloidního proteinu; LMD – laserová mikrodisekce; D-skóre [%] – vyjadřuje podíl rozdílu mezi prvním a druhým proteinem vůči abundanci prvního proteinu ve skupině amyloidních fibrilárních proteinů; P-skóre [%] – míra zastoupení prvního nejvíce abundantního proteinu v amyloidních fibrilárních proteinech; UAS – “universal amyloid signature”, součet relativních abundancí proteinů podílejících se na tvorbě amyloidu (SAP, ApoE, ApoA-IV); zatížení amyloidem [%] – celková míra zatížení amyloidem ve vzorku (AFP + UAS).

Tabulka 5: Porovnání parametrů P-skóre a D-skóre, AFP, UAS a celkového zatížení amyloidem u 3 skupin vzorků – typizovaných CR+, netypizovaných CR+ a CR- vzorků.

Parametr	Typizované CR+	Netypizované CR+	CR-
P-skóre [%]	38,21	13,49	2,32
D-skóre [%]	57,70	43,70	54,56
AFP [%]	6,24	0,50	0,73
UAS [%]	18,22	6,19	0,12
Zatížení [%]	24,46	6,69	0,85

U vybraných vzorků byla provedena mikrodisekce z oblasti CR⁻ tkáně (zdravá kontrolní tkáň). Jedná se o vzorky odebrané z myokardu, plic a ledviny u pacienta č. 6. Byla spočítána a porovnávána hodnota relativního zastoupení nejvíce abundantního amyloidního fibrilárního proteinu (AFP) v CR⁺ tkáni (obsahující amyloid) a v CR⁻ tkáni. Tímto způsobem bylo možné zhodnotit, zda je amyloid typizující i v případě, že je hodnota AFP nízká a množství zastoupení amyloidního fibrilárního proteinu by mohlo být pouze fyziologické. V CR⁺ tkáni odebrané z myokardu byly hodnoty AFP 10krát vyšší v porovnání s CR⁻ kontrolní tkáni. U vzorků odebraných z ledvin byly hodnoty vyšší 2,1krát a u vzorků odebraných z plic byly vyšší 59,8krát (viz Tabulka 6). Ze získaných dat vyplývá, že protein Ig kappa chain C region je typizujícím amyloidním fibrilárním proteinem a indikuje AL amyloidózu u tohoto pacienta (viz Tabulka 6).

Tabulka 6: Porovnání vybraných parametrů u mikrodisekovaných CR⁺ tkání a CR⁻ tkání.

Typ tkáně	CR+/CR-	AFP [%]	UAS [%]	Zatížení [%]	AFP (průměr) [%]	Násobná změna AFP CR+ vůči kontrole
Myokard		1,38	6,96	8,34		10,0
	CR+	2,33	9,10	11,43	1,87	
		1,90	9,70	11,59		
	CR-	0,18	0,13	0,31		
		0,32	0,09	0,41	0,19	
		0,06	0,07	0,13		
Ledvina		0,60	1,78	2,38		2,1
	CR+	0,61	2,43	3,04	0,61	
		0,28	0,03	0,31		
	CR-	0,28	0,15	0,43	0,28	
		1,46	4,01	5,47		
		5,05	7,26	12,30	5,07	
Plíce		8,70	8,85	17,55		59,8
	CR+	0,07	0,05	0,12		
		0,07	0,03	0,10	0,08	
	CR-	0,12	0,40	0,52		
		0,07	0,03	0,10	0,08	
		0,12	0,40	0,52		

CR⁺ – tkáň s kongo červeň pozitivním barvením; CR⁻ – tkáň s kongo červeň negativním barvením; AFP – relativní abundance nejvíce abundantního amyloidního fibrilárního proteinu; UAS – „universal amyloid signature“, součet relativních abundancí proteinů podílejících se na tvorbě amyloidu (SAP, ApoE, ApoA-IV); zatížení amyloidem (%) – celková míra zatížení amyloidem ve vzorku (AFP + UAS).

6 DISKUZE

Správná a spolehlivá typizace amyloidu je nezbytná pro výslednou léčbu, protože léčebné strategie se pro jednotlivé typy amyloidóz zásadně liší. Součástí diagnostiky je vyhodnocení jak klinického obrazu pacienta, tak doprovodné vyšetření tkáně pacienta pomocí imunohistochemické nebo proteomické analýzy.

V dnešní době je nejčastěji používanou metodou pro typizaci amyloidóz imunohistochemická analýza, mezi jejíž výhody patří především nízká cena a rychlost. Oproti proteomické analýze je provedení jednodušší a nejsou nutné drahé přístroje, které by vyžadovaly specificky proškolený personál. Metoda má ovšem i několik nevýhod – nejsou k dispozici protilátky proti všem typům amyloidních fibrilárních proteinů a taktéž je problém s jejich citlivostí a specifitou (Gilbertson *et al.*, 2015).

Proteomická analýza amyloidních depozit v FFPE tkáňových vzorcích, konkrétně laserová mikrodisekce s tandemovou hmotnostní spektrometrií (LMD-LC-MS/MS), byla poprvé popsána autorem Vrana *et al.* v roce 2009. V této studii spolehlivě typizovali amyloidní depozita u 40 případů ze 41 (s 98% úspěšností). Oproti imunohistochemické analýze se jedná o přímou analýzu složení depozita (nejsou nutné protilátky) a typizace je spolehlivější, protože překážkou nejsou ani mutantní typy proteinů. Mezi nevýhody této metody patří především špatná dostupnost a vysoká cena přístrojového vybavení a nutnost proškoleného personálu (Vrana *et al.*, 2009 a 2014).

Cílem experimentální části práce bylo typizovat amyloidní depozita u 24 FFPE tkáňových vzorků pomocí proteomické analýzy. Vzorky byly odebrány z různých orgánů 16 pacientů (9 žen a 7 mužů). Průměrný věk pacientů ve studii byl 68,5 roku v rozmezí 54–84 let (viz Tabulka 2), což potvrzuje, že prevalence pro amyloidózy se zvyšuje po 40–50 roku života (Westermarck *et al.*, 2015).

Pro správnou typizaci bylo nutné sledovat několik parametrů a komplexně propojovat jednotlivé informace. Samotná identifikace proteinu ve vzorku není nutně známkou přítomnosti amyloidózy u pacienta. Pro zvýšení spolehlivosti typizace amyloidu bylo využito výpočtu P-skóre a D-skóre (Sun *et al.*, 2015).

P-skóre vyjadřuje míru zastoupení prvního nejvíce abundantního proteinu v amyloidních fibrilárních proteinech. D-skóre vyjadřuje podíl rozdílu mezi prvním a druhým nejvíce abundantním proteinem vůči abundanci prvního proteinu ve skupině amyloidních fibrilárních

proteinů. Čím vyšší jsou hodnoty těchto dvou parametrů, tím je typizace na jejich základě spolehlivější. P-skóre u vzorků, kde byla úspěšně typizována amyloidóza, bylo v průměru 38,21 %. Vzorky, kde byly identifikovány proteiny, ale amyloidóza se kvůli neprůkazným výsledkům netylizovala, měla hodnota P-skóre průměrnou hodnotu nižší, 13,49 %. Kontrolní vzorky (CR-) měly podle předpokladů hodnoty P-skóre nejnižší, 2,32 % průměrně (viz Tabulka 5). Porovnávání vzorků pocházejících pouze z jednoho typu tkáně by bylo průkaznější, ale vyžadovalo by vyšší množství vzorků. U D-skóre byly výsledky u všech skupin srovnatelné, 57,70 %, 43,70 % a 54,56 % pro typizované CR+, netylizované CR+ a CR- vzorky (viz Tabulka 5). Důvodem srovnatelných hodnot je podstata parametru, rozdíl podílu mezi prvním a druhým proteinem vůči prvnímu proteinu ve skupině amyloidních fibrilárních proteinů je pouze relativní a nevystihuje přímo hodnoty intenzit, které i v případě nízkých hodnot mohou mít stejný relativní rozdíl. Jako samostatný parametr tedy není D-skóre vhodné, je pouze doprovodným parametrem.

Dalším parametrem byla relativní abundance prvního nejvíce abundantního fibrilárního proteinu (AFP). Tento parametr usnadňuje interpretaci, neboť hodnotíme na základě relativního, procentuálního zastoupení, ne na základě hodnot intenzit. Díky této hodnotě je taktéž možné porovnávat jednotlivé vzorky mezi sebou. Relativní abundance AFP u typizovaných CR+ vzorků byly vyšší než u ostatních vzorků, v průměru 6,24 %. U netylizovaných CR+ byla hodnota 0,50 % a u CR- byla hodnota 0,73 %. Je zde jasný rozdíl v množství nejvíce abundantního amyloidního fibrilárního proteinu (viz Tabulka 5).

„Universal amyloid signature“ (UAS), součet relativních abundancí proteinů podílejících se na tvorbě amyloidu – SAP, ApoE a ApoA-IV, je dalším použitým hodnotícím parametrem (Vrana *et al.*, 2014). Jeho hodnoty pomáhají odlišit fyziologické hodnoty u tkání bez amyloidu od hodnot patologických u tkání s amyloidem. Celkové zatížení amyloidem je součtem hodnot AFP a UAS. U UAS a celkového zatížení je tedy situace podobná. Pro typizované CR+ tkáně byla hodnota UAS průměrně 18,22 % a celkové zatížení 24,46 %, pro netylizované CR+ tkáně činily tyto hodnoty 6,19 % a 6,69 % a nakonec pro CR- tkáně 0,12 % a 0,85 % (viz Tabulka 5).

Pro správnou typizaci muselo být u každého vzorku bráno v potaz všech 5 parametrů a všechny musely mít průkazně vysoké hodnoty. U všech vzorků byly identifikovány amyloidní proteiny, ale typizováno bylo pouze 14 z 24 vzorků (viz Tabulka 4). Nejčastěji byla typizována AL amyloidóza, konkrétně u 11 vzorků, která se obecně vyskytuje v populaci

nejčastěji (Falk *et al.*, 1997). U 2 vzorků byla typizována AH amyloidóza a u 1 AA amyloidóza. U zbývajících 10 byly hodnoty neprůkazné, příliš nízké nebo různorodé na jednoznačnou typizaci. Pro potvrzení správné typizace amyloidóz by bylo vhodné výsledky porovnat s klinickým obrazem pacientů, popřípadě s výsledky imunohistochemické analýzy.

U porovnávání vzorků CR+ a CR- tkáně byl sledován násobek změny prvního nejvíce abundantního amyloidního fibrilárního proteinu (AFP). Tímto způsobem bylo možné zhodnotit, zda byl amyloid typizující i v případě, že hodnota AFP byla nízká a hladina AFP by mohla být pouze fyziologická. V CR+ tkáni odebrané z myokardu pacienta č. 6 byly hodnoty AFP 10krát vyšší v porovnání s CR- (kontrolní) tkání. U vzorků odebraných z ledvin byly hodnoty vyšší 2,1krát a u vzorků odebraných z plic byly vyšší 59,8krát (viz Tabulka 6). Zhodnocení typizace tímto způsobem bylo spolehlivější oproti vzorkům, kde se kontrolní CR- tkáňové vzorky neodebíraly. Toto porovnání umožnilo porovnat fyziologickou a patologickou hodnotu AFP v amyloidním depozitu specifickou pro daného pacienta a orgán.

7 ZÁVĚR

V bakalářské práci byla vypracována teoretická část obsahující rešerši o amyloidózách, amyloidních proteinech a metodách pro jejich typizování.

V experimentální části byla provedena proteomická analýza amyloidních depozit u 24 FFPE tkáňových vzorků. Bylo využito laserové mikrodisekce a kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií (LMD-LC-MS/MS) a provedeno následné vyhodnocení dat. Typizace amyloidů byla hodnocena na základě parametrů AFP, P-skóre a D-skóre, UAS a celkového zatížení tkáně amyloidem. U všech 24 FFPE vzorků byly identifikovány amyloidní proteiny, ale amyloid byl typizován pouze u 14 z nich. U 11 vzorků byla typizována AL amyloidóza, u 2 AH amyloidóza a u 1 AA amyloidóza. U zbývajících 10 vzorků byly hodnoty parametrů neprůkazné, příliš nízké či různorodé na jednoznačnou typizaci.

Dále byla porovnávána tkáň s amyloidem (CR+) a bez amyloidu (CR-), kde byl sledován násobek změny hodnoty AFP, který ve svém důsledku umožnil spolehlivěji typizovat amyloid oproti vzorkům, kde se kontrolní vzorky tkáně bez amyloidu neodebíraly.

Výše zmíněná metoda spolu se sledovanými parametry umožnila spolehlivě typizovat amyloidní depozita v FFPE tkáňových vzorcích. Cíle bakalářské práce v teoretické i praktické části byly splněny.

8 LITERATURA

- Aguzzi A. (2008): Unravelling prion strains with cell biology and organic chemistry. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105(1): 11–12.
- Benson M. D., Buxbaum J. N., Eisenberg D. S., Merlini G., Saraiva M. J. M., Sekijima Y., Sipe J. D., Westermarck P. (2018): Amyloid nomenclature 2018: recommendations by the International Society of Amyloidosis (ISA) nomenclature committee. *Amyloid* 25(4): 215–219.
- Brambilla F., Lavatelli F., Merlini G., Mauri P. (2013): Clinical proteomics for diagnosis and typing of amyloidosis. *Proteomics Clinical Applications* 7: 136–143.
- Bennhold H. (1922) Specific staining of amyloid by Congo red (in German). *MuEnchener Medizinische Wochenschrift* 69, 1537–1538.
- Cendrowska U., Silva P. J., Ait-Bouziad N., Müller M., Guven Z. P., Vieweg S., Chiki A., Radamaker L., Kumar S. T., Fändrich M., Tavanti F., Menziani M. C., Alexander-Katz A., Stellacci F., Lashuel H. A. (2020): Unravelling the complexity of amyloid polymorphism using gold nanoparticle and cryo-EM. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 117(12): 6866–6874.
- Cooksey C. J. (2014): Quirks of dye nomenclature. 2. Congo red. *Biotechnic & Histochemistry* 89(5): 384–387.
- Divry P., Florin M. (1927): Sur les propriétés optiques de l'amyloïde. *Comptes Rendus des Séances de la Société de Biologie et de ses Filiales*. 97: 1808–1810.
- Dobro M. J., Melanson L. A., Jensen G. J., McDowall A. W. (2010): Plunge freezing for electron cryomicroscopy. *Methods in Enzymology* 481: 63–82.
- Dogan A. (2012): Classification of amyloidosis by mass spectrometry-based proteomics. In *Amyloid and Related Disorders: Surgical Pathology and Clinical Correlations*. Picken M. M., Dogan A., Herrera G. A. (eds.). Springer: 261–262.
- Dorbala S., Vangala D., Bruyere J., Quarta C., Kruger J., Padera R., Foster C., Hanley M., Di Carli M. F., Falk R. (2014): Coronar microvascular dysfunction is related to abnormalities in myocardial structure and function in cardiac amyloidosis. *Journal*

- of the American College of Cardiology: *Heart Failure* 2(4): 358–367.
- Dubrey S. W., Hawkins P. N., Falk R. H. (2011): Amyloid diseases of the heart: assessment, diagnosis, and referral. *Heart* 97: 75–84.
- Eanes E. D., Glenner G. G. (1968): X-ray diffraction studies of amyloid filaments. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 16(11): 673–677.
- Falk R. H., Comenzo R. L., Skinner M. (1997): The systemic amyloidosis. *The New England Journal of Medicine* 337: 898–909.
- Falk R. H., Alexander K. M., Liao R., Dorbala S. (2016): AL (light-chain) cardiac amyloidosis. *Journal of the American College of Cardiology* 68: 1323–1341.
- Flodrova P., Flodr P., Pika T., Vymetal J., Holub D., Dzubak P., Hajduch M., Scudla V. (2018): Cardiac amyloidosis: from clinical suspicion to morphological diagnosis. *Pathology* 50(3): 261–268.
- Gilbertson J. A., Theis J. D., Vrana J. A., Lachmann H., Wechalekar A., Whelan C., Hawkins P. N., Dogan A., Gillmore J. D. (2015): A comparison of immunohistochemistry and mass spectrometry for determining the amyloid fibril protein from formalin-fixed biopsy tissue. *Journal of Clinical Pathology* 68(4): 314–317.
- Goldberg M. W., Fišerová J. (2016): Immunigold labelling for scanning electron microscopy. *Methods in Molecular Biology* 1474: 309–325.
- Hazenberg B. P. C. (2013): Amyloidosis: A clinical overview. *Rheumatic Disease Clinics of North America* 39: 323–345.
- Howie A. J., Brewer D. B. (2009): Optical properties of amyloid stained by Congo red: History and mechanisms. *Micron* 40: 285–301.
- Jalandoni-Buan A. C., Decena-Soliven A. L. A., Cao E. P., Barraquio V. L., Barraquio W. L. (2010): Characterization and identification of congo red decolorizing bacteria from monocultures and consortia. *Philippine Journal of Science* 139: 71–78.
- Klein C. J., Vrana J. A., Theis J. D., Dyck P. J., Dyck P. J. B., Spinner R. J., Mauermann M. L., Bergen III H. R. B., Zeldenrust S. R., Dogan A. (2011): Mass spectrometry-based proteomic analysis of amyloid neuropathy type in nerve tissue. *Archives of Neurology*

68: 195–199.

Kulak N. A., Pichler G., Paron I., Nagaraj N., Mann M. (2014): Minimal, encapsulated proteomic-sample processing applied to copy-number estimation in eukaryotic cells. *Nature Methods* 11: 319–324.

Kyle R. A., Greipp P. R. (1983): Amyloidosis (AL). Clinical and laboratory features in 229 cases. *Mayo Clinical Proceedings* 58: 665–683.

Kyle R. A. (2001): Amyloidosis: A convoluted story. *British Journal of Haematology* 114: 529–538.

Lavatelli F., Vrana J. A. (2011): Proteomic typing of amyloid deposits in systemic amyloidosis. *Amyloid* 18(4): 177–182.

Leung N., Nasr S. H., Sethi S. (2012): How I treat amyloidosis: the importance of accurate diagnosis and amyloid typing. *Blood* 120(16): 3206–3213.

Linke R. P. (2012): On typing amyloidosis using immunohistochemistry, detailed illustrations, review and a note on mass spectrometry. *Progress in Histochemistry and Cytochemistry* 47: 61–132.

Merlini G., Seldin D. C., Gertz M. A. (2011): Amyloidosis: Pathogenesis and new therapeutic options. *Journal of Clinical Oncology* 29: 1924–1933.

Mollee P., Renaut P., Gottlieb D., Goodman H. (2014): How to diagnose amyloidosis. *Internal Medicine Journal* 44: 7–17.

Ogg C. S., Cameron J. S., Williams D. G., Turner D. R. (1981): Presentation and course of primary amyloidosis of the kidney. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology* 15: 9–13.

Okuda Y., Ohnishi M., Matoba K., Jouyama K., Yamada A., Sawada N., Mokuda S., Murata Y., Takasugi K. (2013): Comparison of the clinical utility of tocilizumab and anti-TNF therapy in AA amyloidosis complicating rheumatic diseases. *Modern Rheumatology* 24(1): 137–143.

Pepys M. B. (2001): Pathogenesis, diagnosis and treatment of systemic amyloidosis. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*

356(1406): 203–2011.

Pepys M. B. (2006): Amyloidosis. *Annual Review of Medicine* 57: 223–241.

Pepys-Vered M. E., Pepys M. B. (2014): Targeted treatment amyloidosis. *Israel Medical Association Journal* 16: 277–280.

Reig S., Buée-Scherrer V., Mourton-Gilles C., Defossez A., Delacourte A., Beauvillain J. C., Mazzuca M. (1995): Immunigold labelling of paired helical filaments and amyloid fibrils by specific monoclonal and polyclonal antibodies. *Acta Neuropathologica* 90: 441–447.

Sethi S., Vrana J. A., Theis J. D., Leung N., Sethi A., Nasr S. H., Fervenza F. C., Cornell L. D., Fidler M. E., Dogan A. (2012): Laser microdissection and mass spectrometry-based proteomics aids the diagnosis and typing of renal amyloidosis. *Kidney International* 82: 226–234.

Sipe J. D., Cohen A. S. (2000): Review: History of the amyloid fibril. *Journal of Structural Biology* 130: 88–98.

Sipe J. D., Benson M. D., Buxbaum J. N., Ikeda S., Merlini G., Saraiva M. J. M., Westmark P. (2016): Amyloid fibril proteins and amyloidosis: chemical identification and clinical classification International Society of Amyloidosis 2016 Nomenclature Guidelines. *Amyloid* 23(4): 209-2013.

Sun W., Sun J., Zou L., Shen K., Zhong D., Zhou D., Sun W., Li J. (2015): The successful diagnosis and typing of systemic amyloidosis using a microwave-assisted filter-aided fast sample preparation. *Public Library of Science* 10(5): e0127180.

Tada S., Iida M, Yao T., Kawakubo K., Yao T., Okada M., Fujishima M. (1994): Endoscopic features in amyloidosis of the small intestine: Clinical and morphologic differences between chemical types of amyloid protein. *Gastrointestinal Endoscopy* 40(1): 45–50.

Theis J. D., Dasari S., Vrana J. A., Kurtin P. J., Dogan A. (2013): Shotgun-proteomics-based clinical testing for diagnosis and classification of amyloidosis. *Journal of Mass Spectrometry* 48: 1067–1077.

Vrana J. A., Gamez J. D., Maddan B. J., Theis J. D., Bergen III R., Dogan A. (2009): Classification of amyloidosis by laser microdissection and mass spectrometry-based

proteomic analysis in clinical biopsy specimens. *Blood* 114(24): 4957–4959.

Vrana J. A., Theis J. D., Dasari S., Mereuta O. M., Dispenzieri A., Zeldenrust S. R., Gertz M. A., Kurtin P. J., Grogg K. L., Dogan A. (2014): Clinical diagnosis and typing of systemic amyloidosis in subcutaneous fat aspirates by mass spectrometry-based proteomics. *Haematologica* 99(7): 1239–1247.

Westermarck G. T., Fändrich M., Westermarck P. (2015): AA amyloidosis: Pathogenesis and targeted therapy. *Annual Reviews* 10: 321–344.

Yakupova E. I., Bobyleva L. G., Vikhlyantsey I. M., Bobylev A. G. (2018): Congo red and amyloids: history and relationship. *Bioscience Reports* 39(1).

Yamashita T., Ando Y., Okamoto S., Misumi Y., Hirahara T., Ueda M., Obayashi K., Nakamura M., Jono H., Shono M., Asonuma K., Inomata Y., Uchino M. (2012): Long-term survival after liver transplantation in patients with familial amyloid polyneuropathy. *Neurology* 78(9): 637–643.