Univerzita Karlova v Praze

1. lékařská fakulta

Studijní obor: Fyziologie a patofyziologie člověka

Mgr. Kristýna Pimková

Proteomická analýza vybraných onkohematologických onemocnění

Proteomic analysis of selected oncohematological diseases

Disertační práce

Školitel: Prof. Ing. Jan Evangelista Dyr, DrSc.

Praha, 2013

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 17.9.2013

Kristýna Pimková

Podpis

Identifikační záznam:

PIMKOVÁ, Kristýna. *Proteomická analýza vybraných onkohematologických onemocnění. [Proteomic analysis of selected oncohematological diseases]*. Praha, 2013. 176 s, 6 příl. Disertační práce. Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta, Ústav Hematologie a krevní transfuze. Školitel Dyr, Jan E.

Ráda bych poděkovala Prof. Ing. Janu E. Dyrovi, DrSc., svému školiteli, za profesionální vedení a ochotu, s níž mi vycházel vždy vstříc. Chtěla bych vyjádřit svůj velký dík Ing. Jiřímu Suttnarovi, CSc. a Ing. Leoně Chrastinové, PhD. za cenné konzultace a celému kolektivu pracovníků oddělení biochemie Ústavu hematologie a krevní transfuze za příjemné pracovní prostředí, rady a pomoc při vypracovávání mé disertační práce. Nemenší dík patří doc. Ing. Jiřímu Homolovi, DrSc. a celému kolektivu pracovníků oddělení optických senzorů Ústavu fotoniky a elektroniky Akademie věd ČR za zasvěcení do problematiky SPR, příjemnou atmosféru a rady při měření mé disertační práce. Dále bych chtěla poděkovat Ing. Pavlu Šáchovi, PhD. z Ústavu organické chemie a biochemie Akademie věd ČR za pomoc při měření pomocí hmotnostní spektrometrie TripleTOF a Dr. Janine Roy za pomoc při zpracování proteinových map. Děkuji své rodině a přátelům za trpělivost a podporu.

OBSAH

1. ÚVOD 11

2. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY 13

2.1. REDOXNÍ PROTEOMIKA 13

2.1.1. Mediátory redoxní signalizace a oxidačního stresu 13

2.1.1.1. Reaktivní formy kyslíku 13

2.1.1.2. Reaktivní formy dusíku 16

2.1.1.3. Produkty lipidové peroxidace 19

2.1.2. Molekuly antioxidační obrany 21

2.1.2.1. Enzymové systémy 21

2.1.2.2. Neenzymové antioxidanty 22

2.1.3. Studované posttranslační modifikace 26

2.1.3.1. Karbonylace 27

2.1.3.2. S-nitrosylace 28

2.1.3.3. Methylace argininů 30

2.1.4. Vliv oxidačního stresu na proteom krevní plazmy 32

2.2. MYELODYSPLASTICKÝ SYNDROM (MDS) 33

2.2.1. Definice MDS a etiologie 34

2.2.2. Klinický obraz 34

2.2.3. Patogeneze 35

2.2.4. Diagnostika 35

2.2.5. Oxidační stres u MDS 36

2.2.6. Změny proteomu u MDS 38

2.3. PROTEIN-PROTEIN INTERAKCE 39

2.3.1. Přehled vybraných protein-protein interakcí 41

2.3.1.1. Vaskulární endoteliální růstový faktor a jeho receptory 41

2.3.1.2. Intercelulární a vaskulární adhezní molekuly a jejich ligandy 42

2.3.1.3. Aktivační antigeny T-lymfocytu a jejich receptory 43

2.4. METODY STANOVENÍ OXIDAČNÍHO STATUSU V KREVNÍ PLAZMĚ 44

2.5. METODY STUDIA PROTEIN-PROTEIN INTERAKCÍ 50

3. HYPOTÉZY A CÍLE PRÁCE 55

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST 57

4.1. MATERIÁLY 57

4.1.1. Plazma MDS pacientů 57

4.1.2. Rekombinantní proteiny 57

4.1.3. Chemikálie 57

4.2. PŘÍSTROJE 59

4.3. METODY 60

4.3.1. Deplece 60

4.3.2. Izolace krevních destiček 60

4.3.3. Stanovení dusitanů 61

4.3.3.1. Příprava vzorků 61

4.3.3.2. Chromatografické podmínky 61

4.3.4. Stanovení dusičnanů 62

4.3.5. Stanovení malondialdehydu 62

4.3.5.1. Příprava 2 mM standardu MDA 62

4.3.5.2. Příprava vzorků 62

4.3.5.3. Chromatografické podmínky 63

4.3.6. Stanovení aminothiolů 63

4.3.6.1. Příprava standardu aminothiolů 63

4.3.6.2. Příprava vzorků *63*

4.3.6.3. Chromatografické podmínky *64*

4.3.7. Stanovení železa, feritinu, gama-glutamytranferasy **64**

4.3.8. Stanovení derivátů methylargininu **64**

4.3.8.1. Příprava vzorků *64*

4.3.8.2. Chromatografické podmínky a MS *64*

4.3.9. Stanovení karbonylovaných proteinů **65**

4.3.10. Příprava vzorku pro detekci karbonylovaných proteinů **65**

4.3.11. Detekce S-nitrosylovaných proteinů (Biotin Switch Technique - BST) **66**

4.3.11.1. Příprava roztoků *66*

4.3.11.2. Postup BST *66*

4.3.12. SDS PAGE **68**

4.3.12.1. Příprava roztoků a gelů *68*

4.3.12.2. Podmínky SDS-PAGE *69*

4.3.12.3. Barvení gelů koloidní Coomassie Blue *69*

4.3.13. Western blotting **70**

4.3.13.1. Blotovací pufr *70*

4.3.13.2. Postup Western blottingu *70*

4.3.14. Imunochemická detekce karbonylovaných proteinů **70**

4.3.15. Proteolytické štěpení proteinů **71**

4.3.15.1. Trypsinizace v gelu *71*

4.3.15.2. Trypsinizace v roztoku *72*

4.3.16. Identifikace proteinů **72**

4.3.16.1. HCT ultra ion trap *72*

4.3.16.1.1. NanoLC/MS/MS analýza 72

4.3.16.1.2. Analýza dat 72

4.3.16.2. TripleTOF 5600 73

4.3.16.2.1. NanoLC/MS/MS analýza 73

4.3.16.2.2. Analýza dat 73

4.3.17. SPR 73

4.3.17.1. Roztoky 73

4.3.17.2. SPR spektrometrie 74

4.3.17.3. SPR zobrazování 75

4.3.17.4. Funkcionalizace čipu 76

4.3.17.5. Imobilizace VEGF-A 77

4.3.17.6. Detekce VEGFR-1 v pufru 77

4.3.17.7. Detekce VEGFR-1 v plazmě 77

4.3.17.8. SPR detekce VEGFR-1 v plné a depletované plazmě 78

4.3.17.9. Proteinový čip 78

4.3.17.10. Detekce proteinových komplexů 80

4.3.17.11. Identifikace komplexů 80

4.3.17.12. Vyhodnocení dat 81

4.3.18. Statistické metody 81

5. VÝSLEDKY 82

5.1. OXIDAČNÍ STATUS MDS 82

5.1.1. Oxidační parametry u MDS pacientů 82

5.1.2. Oxidační parametry u MDS v souvislosti s diagnózami a klinickými projevy 85

5.1.3. Oxidační parametry v souvislostech s přetížením železem u MDS 90

5.1.4. Vliv asymetrického dimethylargininu na oxidační status MDS 92

5.2. OXIDAČNÍ MODIFIKACE PROTEINŮ 94

5.2.1. Karbonylace 94

5.2.2. S-nitrosylace 97

5.3. PROTEIN-PROTEIN INTERAKCE U MDS 100

5.3.1. SPR biosenzor pro detekci VEGFR-1 100

5.3.2. Detekce VEGFR-1 v depletované plazmě 106

5.3.3. MDS proteinový čip 109

5.3.4. Identifikace - pilotní výsledky 113

6. DISKUSE 121

6.1. OXIDAČNÍ STATUS U MDS 121

6.2. OXIDAČNÍ MODIFIKACE PROTEINŮ U MDS 126

6.2.1. Karbonylace 126

6.2.2. S-nitrosylace 129

6.3. VÝVOJ PROTEINOVÉHO ČIPU 131

6.3.1. SPR biosenzor pro detekci VEGFR-1 131

6.3.2. Příprava komplexního vzorku 133

6.3.3. Proteinový čip 133

6.3.4. MDS signalizace – pilotní výsledky 136

7. ZÁVĚR 139

8. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK 141

9. ABSTRAKT 145

10. ABSTRACT 146

11. LITERATURA 147

12. PUBLIKACE 167

12.1. PUBLIKACE K TÉMATU DIZERTAČNÍ PRÁCE 167

12.2. PUBLIKACE BEZ VZTAHU K TÉMATU DIZERTAČNÍ PRÁCE 168

12.3. ABSTRAKTA.....168

12.4. PREZENTACE NA KONGRESECH A SYMPOSIÍCH 171

13. SEZNAM PŘÍLOH 175

1. ÚVOD

Hlavním cílem současného lékařského výzkumu je porozumění molekulárním mechanizmům odehrávajícím se v patogenezi komplexních onemocnění, jako jsou onkologická onemocnění. Cenné informace, nezbytné pro chápání buněčné povahy a lidského bytí jako takového, nám poskytlo rozluštění lidského genomu. Je však třeba si uvědomit, že práci buněk nevykonávají geny, ale proteiny. Tudíž znalost identity proteinů a jejich funkce je nezbytná k hlubšímu chápání buněčné fyziologie a patofyziologie. Tímto problémem se zabývá věda zvaná „proteomika“ (Dalle-Donne I. et al., 2006). Proteomika je definována jako obor, který usiluje o odhalení identity, množství, struktury a biochemických a buněčných funkcí všech proteinů v organizmu, tkáních nebo buňkách, a objasnění, jak se tyto vlastnosti mění v prostoru, čase a fyziologickém stavu (Steering Committee for Defining the Mandate of Proteomics in the Post-Genomics Era U.S.N.C.f.t.I.U.o.B.a.M.B., Policy and Global Affairs Division, National Research Council 2002). Proteomické techniky zaznamenaly v poslední době velký pokrok a staly se hlavním nástrojem pro studium fyziologických a patofyziologických procesů v organizmu (Thongboonkerd V., 2007).

Jedním z faktorů, které ovlivňují funkci proteinů, jsou oxidační procesy. Oxidační stres, který je definován jako stav, při kterém dochází k poruše dynamické rovnováhy mezi oxidačními a antioxidačními procesy v organizmu (Sies H., 1993), hraje významnou roli v patogenezi mnohých onemocnění včetně karcinogeneze (Imbesi S. et al., 2013). Je důležitým regulátorem buněčné proliferace a signalizačních procesů (Gopalakrishna R. and Jaken S., 2000), indukuje expresi stovek genů, zároveň poškozuje DNA a vede k hromadění mutací (Dizdaroglu M., 2012). Detekce markerů oxidačního stresu v souvislosti s onemocněním je velmi náročná díky vysoké reaktivitě produkovaných nízkomolekulárních látek: volných radikálů jako hydroxylového, superoxidového, oxidu dusnatého, neradikálových látek jako peroxidu vodíku, peroxodusitanu a jejich oxidačních produktů jako malondialdehyd, 4-hydroxynonenal a dalších. Proto je v poslední době věnována pozornost novým markerům oxidačního stresu, jako jsou oxidační modifikace proteinů (karbonylace, S-nitrosylace), které jsou stabilnější (Lee R. et al., 2012).

Oxidačně posttranslační modifikace vedou ke změně struktury proteinů, jejich vlastností a funkce (Wall S.B. et al., 2012). Jednou ze základních vlastností proteinů je tvorba

specifických nekovalentních komplexů (Wildová M. and Rumlová M., 2008). Předpokládá se, že všechny proteiny v buňce jsou součástí obrovské proteinové sítě (interaktom), ve které vzájemné vazby proteinů přechodně vznikají a zanikají (Piehler J., 2005). Změna struktury proteinu v důsledku modifikace tak může vést k vytvoření nového nebo zániku starého vazebného místa a tak významně pozměnit signální procesy zprostředkované proteinovou sítí (Jacob C. et al., 2003; Walsh C.T., 2006). K porozumění dějů probíhajících v organizmu na molekulární úrovni je tedy třeba studovat kromě izolovaných proteinů i proteinové komplexy a faktory, které jejich tvorbu ovlivňují.

Tato práce se zabývá studiem oxidačních procesů u onkohematologického onemocnění – myelodysplastického syndromu (MDS) a jejich vlivu na modifikace proteinů. Dále pak studuje proteiny exprimované vlivem oxidačního stresu, jejich protein-protein interakce a tvorbu komplexů u MDS. Cílem této práce bylo objasnit některé změny proteomu typické pro MDS a tak přispět k porozumění biologickým procesům v patofyziologii MDS. Objasnění patofyziologických procesů u MDS je klíčové pro přesnější diagnostiku a efektivnější léčbu onemocnění.

2. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1. REDOXNÍ PROTEOMIKA

Redoxní proteomika je proteomické odvětví, které se zabývá studiem oxidačních procesů v organizmu a jejich vlivem na proteom v rámci redoxní signalizace i podmínek oxidačního stresu. Redoxní děje hrají významnou roli v biologii organizmu ve zdraví i nemoci. Účastní se signalizačních procesů a regulace, ale také energetického metabolizmu nebo obrany organizmu. Redoxní signalizace účinkuje skrze reaktivní formy kyslíku a dusíku (reactive oxygen species, reactive nitrogen species, ROS, RNS), jejich produkty a molekuly antioxidační obrany. Hranice mezi signalizací a poškozením v důsledku oxidačního stresu je velmi tenká a závisí na mnoha faktorech jako je např. typ reaktivní látky, typ buňky, antioxidační obrana, okolní prostředí a mnoho dalších (Finkel T., 2000; Thannickal V.J. and Fanburg B.L., 2000; Jones D.P. and Go Y.M., 2010). ROS, RNS a jejich produkty modifikují své cílové molekuly (proteiny, lipidy, nukleové kyseliny). Důsledek modifikace může být pouze stimulační, ale v některých případech vede k poškození buněk a až k buněčné smrti (Martindale J.L. and Holbrook N.J., 2002). Oxidační modifikace proteinů často provází mnohá onemocnění (především onkologická), ale také stárnutí organizmu (Dalle-Donne I. et al., 2006; Jacob C. and Winyard P.G., 2009).

2.1.1. Mediátory redoxní signalizace a oxidačního stresu

Molekuly, které zprostředkovávají redoxní děje, mohou být rozděleny do 3 kategorií: reaktivní formy kyslíku, reaktivní formy dusíku a produkty lipidové peroxidace.

2.1.1.1. Reaktivní formy kyslíku

Reaktivní formy kyslíku jsou radikálové[1] např. superoxidový radikál ($O_2^{\bullet -}$)[2], hydroxylový radikál ($HO^{\bullet}$) a peroxylový radikál ($ROO^{\bullet}$) nebo neradikálové molekuly např.

[1] Radikály jsou chemické látky, které obsahují jeden nebo více nepárových elektronů. Vznikají buď reakcí s jinými radikály, anebo homolytickým štěpením slabých kovalentních vazeb [(Jacob C. and Winyard

molekulární kyslík (O_2), peroxid vodíku (H_2O_2), singletový kyslík ($^1O_2$) a peroxodusitan ($ONOO^-$). Jednou z nejvýznamnějších reaktivních forem kyslíku je H_2O_2 (Gutteridge J.M. and Halliwell B., 1992).

Zdrojem peroxidu vodíku v organizmu je dismutace superoxidového radikálu a některé metabolické reakce a fyziologické pochody (fagocytóza, fotosyntéza). Superoxidový radikál vzniká především při elektronovém transportu v dýchacím řetězci. Elektrony jsou hnány řetězcem membránových proteinů za účelem tvorby protonové hnací síly a v případě jejich uvolnění z aktivních center enzymů dochází k redukci kyslíku za vzniku superoxidového radikálu (Raha S. and Robinson B.H., 2000).

$$\ddot{O}_2 + e^- \rightarrow O_2^{\bullet -}$$

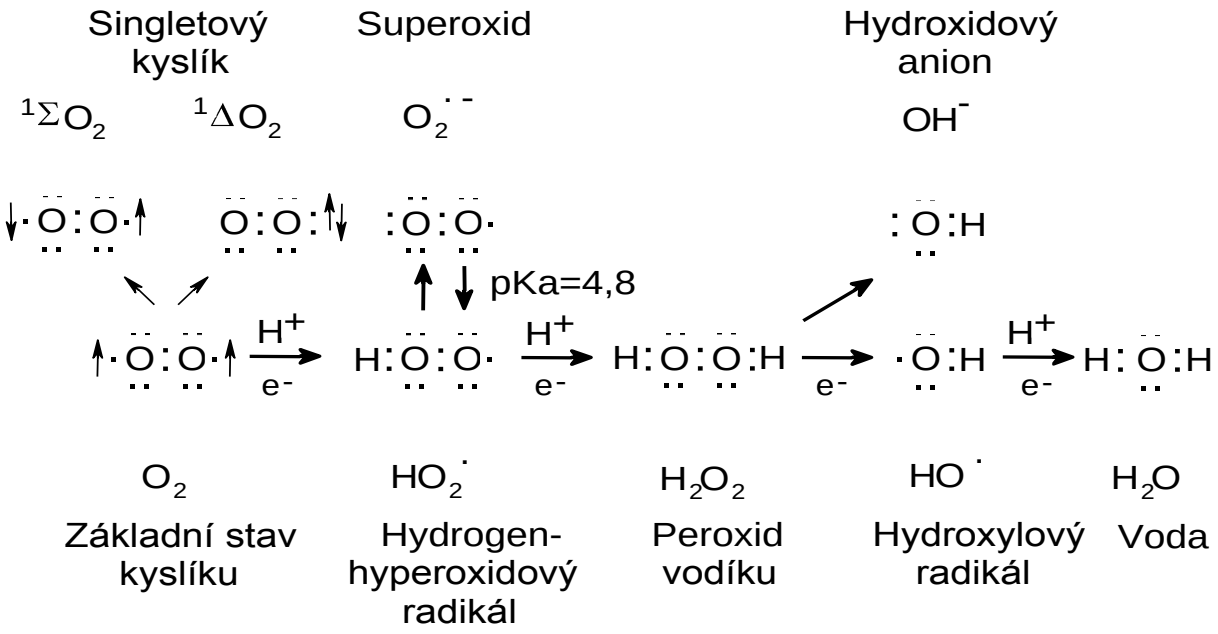
Faktory, které vedou k tvorbě superoxidového radikálu, se liší mezi organizmy, ale i mezi jednotlivými tkáněmi. Kromě dýchacího řetězce mohou být zdrojem superoxidového radikálu např. aktivované fagocytující buňky, které pomocí enzymu nikotinamidadenindinukleotidfosfátoxidasy (NAD(P)H-oxidasy) (EC 1.6.5.3), xantinoxidasy (EC 1.17.3.2) a dalších redukují molekulární kyslík a produkují superoxidový radikál na vnější straně membrány (van Loon A.P. et al., 1986; Henderson L.M. and Chappel J.B., 1996). NAD(P)H-oxidasa byla objevena i u nefagocytujících buněk, které ji využívají v odpovědi na cytokiny a růstové faktory, a jsou proto také zdrojem superoxidového radikálu (Bedard K. and Krause K.H., 2007). Ze superoxidového radikálu vzniká převážně peroxid vodíku; tak organizmy předcházejí vzniku mnohem škodlivějších ROS, např. singletového kyslíku, hydroxylového radikálu, peroxodusitanu či kyseliny chlorné. Zbylý superoxidový radikál je degradován antioxidačním systémem, anebo reaguje s oxidem dusnatým na peroxodusitan, případně vytváří Haber-Weissovou reakcí s přechodnými kovy hydroxylový

P.G., 2009). Jsou velmi reaktivní, v důsledku tendence doplnit si elektronový pár do stabilní konfigurace reagují nejen s ostatními volnými radikály, ale i s intaktními molekulami, čímž vytvářejí další volný radikál (Racek J. and Holeček V., 1999). Látky dříve označované jako „volné radikály" jsou nyní zahrnuty ve skupině ROS, a proto jim v této práci není věnována zvláštní kapitola.

[2] Superoxidový radikál je pojmenování převzaté z angličtiny a dle českého názvosloví je správně nazýván hyperoxid anionradikál. V této práci je používán název superoxidový radikál.

radikál. Superoxidový radikál není sám o sobě příliš reaktivní vůči ostatním biomolekulám (lipidy, proteiny, nukleové kyseliny) (Jacob C. and Winyard P.G., 2009).

Jak bylo již zmíněno, peroxid vodíku vzniká enzymatickou reakcí katalyzovanou superoxiddismutasou (SOD) (EC 1.15.1.1) nebo neenzymatickou dismutací superoxidového radikálu (Jacob C. and Winyard P.G., 2009). Peroxid vodíku je nejlépe prozkoumanou ROS molekulou. Organizmus si může množství H_2O_2 do určité míry regulovat, tudíž je ideální signální molekulou. Jeho signalizační účinek spočívá v modifikaci proteinů, především jejich thiolových skupin a tím ovlivňuje jejich funkce (Chen K. et al., 2003). Protože se většina cílových proteinů nachází v cytoplazmě, je nezbytné, aby byl peroxid vodíku přenesen přes membránu, ať už organel nebo cytoplazmatickou, do cytoplazmy. Ačkoliv může peroxid vodíku difundovat přes lipidovou dvojvrstvu volně, předpokládá se, že přítomnost akvaporinů nebo pozměněných lipidů a membránových proteinů je jedním ze způsobů regulace vstupu této signální molekuly do buňky. Tímto je řízeno dosažení jejich cílových proteinů (Bienert G.P. et al., 2007). Přenos signálu je také regulován antioxidačními systémy buňky (katalasy, peroxiredoxiny, glutathionperoxidasy (viz níže)). Schéma vzniku ROS je na obrázku (Obr. 1).



Obr. 1: ***Schéma vzniku reaktivních forem kyslíku.*** *Redukce kyslíku na vodu v dýchacím řetězci katalyzována komplexem IV cytochrom-c-oxidasou* (*EC 1.9.3.1).*

2.1.1.2. Reaktivní formy dusíku

Reaktivní formy dusíku jsou primárně odvozené od oxidu dusnatého ($^{\bullet}$NO nebo NO) (Patel R.P. et al., 1999; Jacob C. and Winyard P.G., 2009). Účast oxidu dusnatého v buněčných signalizačních procesech byla popsána v pozdních osmdesátých letech. Oxid dusnatý je tvořen enzymy – NO synthasami (NOSs) (EC 1.14.13.39) z L-argininu.

$$2\text{L-arginin} + 4O_2 + 3\text{NADPH} + 3H^+ \rightarrow 2\text{L-citrulin} + 2^{\bullet}\text{NO} + 3\text{NADP}^+ + 4H_2O$$

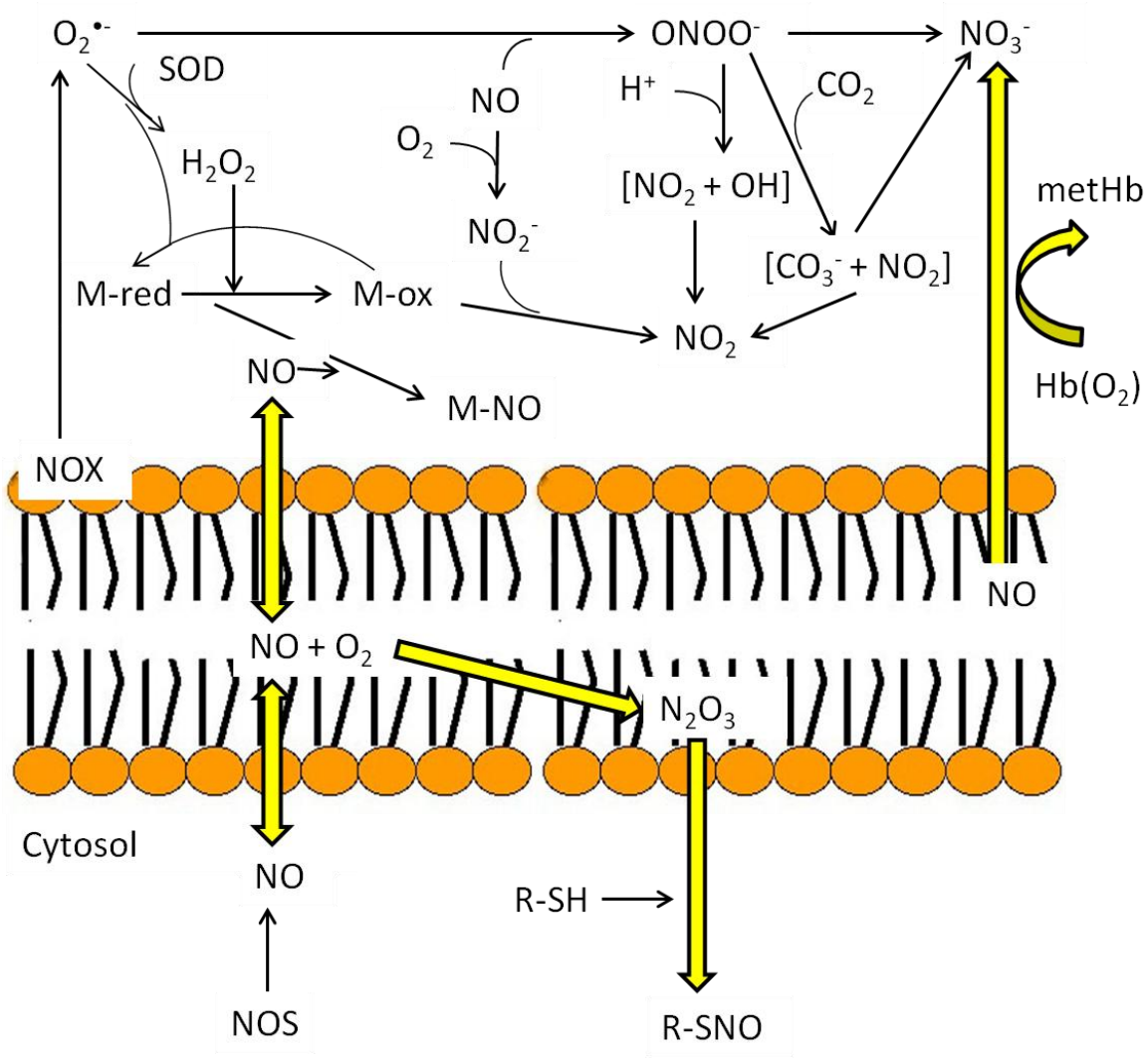
Jsou známy tři typy NO synthas nazvané podle místa, kde byly objeveny: endoteliální NOS (eNOS), neuronální NOS a inducibilní NOS (iNOS). Hlavním přímým mechanizmem účinku NO je reverzibilní vazba na ionty kovů, jako např. Fe^{2+} v prostetické skupině hemu. V rozpustné guanylátcyklase způsobuje vazba NO konformační změny vedoucí ke zvýšení enzymové aktivity a následně zvýšení hladiny cyklického GMP (cGMP), jehož cílovými efektory jsou fosfodiesterasy, iontové kanály a cGMP-dependentní proteinkinasy. NO tak ovlivňuje relaxaci hladkého svalu, agregaci destiček, neurotransmisi a další procesy (Kupková Z. and Beneš L., 2004). Dále pak existují nepřímé cesty působení NO, které jsou na cGMP nezávislé, jako modifikace proteinů zejména jejich S-nitrosylace, nitrace nebo oxidace (Jacob

C. and Winyard P.G., 2009). NO ve fyziologické koncentraci není sám o sobě příliš reaktivní s jinými než radikálovými molekulami, nicméně za jistých okolností je schopen modifikovat thiolové skupiny proteinů za vzniku S-nitrosothiolů (Beckman J.S. and Koppenol W.H., 1996). Molekula NO má velice krátký poločas rozpadu v krevní plazmě i jiných fyziologických tekutinách, je rychle oxidována na dusitan a dále pak v přítomnosti oxidačních činidel na dusičnan (superoxidový radikál, oxyhemoglobin). Bylo zjištěno, že dusitany i dusičnany mohou být redukovány zpět na NO (Lundberg J.O. et al., 2008).

V přítomnosti superoxidového radikálu reaguje oxid dusnatý velice rychle za vzniku vysoce reaktivní molekuly – peroxodusitanu.

$$^{\bullet}NO + O_2^{\bullet -} \rightarrow ONOO^-$$

Jedná se o fyziologicky významnou reakci, neboť některé buňky jsou neustále vystavovány přítomnosti NO a $O_2^{\bullet -}$ a v této reakci soutěží NO se superoxidismutasou (SOD) o superoxidový radikál. Peroxodusitan je za fyziologického pH protonován za vzniku kyseliny peroxodusité. Tyto produkty NO obsahující dusík ve vyšším oxidačním stavu jsou vysoce reaktivní a jsou hlavními mediátory nepřímého působení NO. Obrázek (Obr. 2) znázorňuje reakce NO v organizmu.

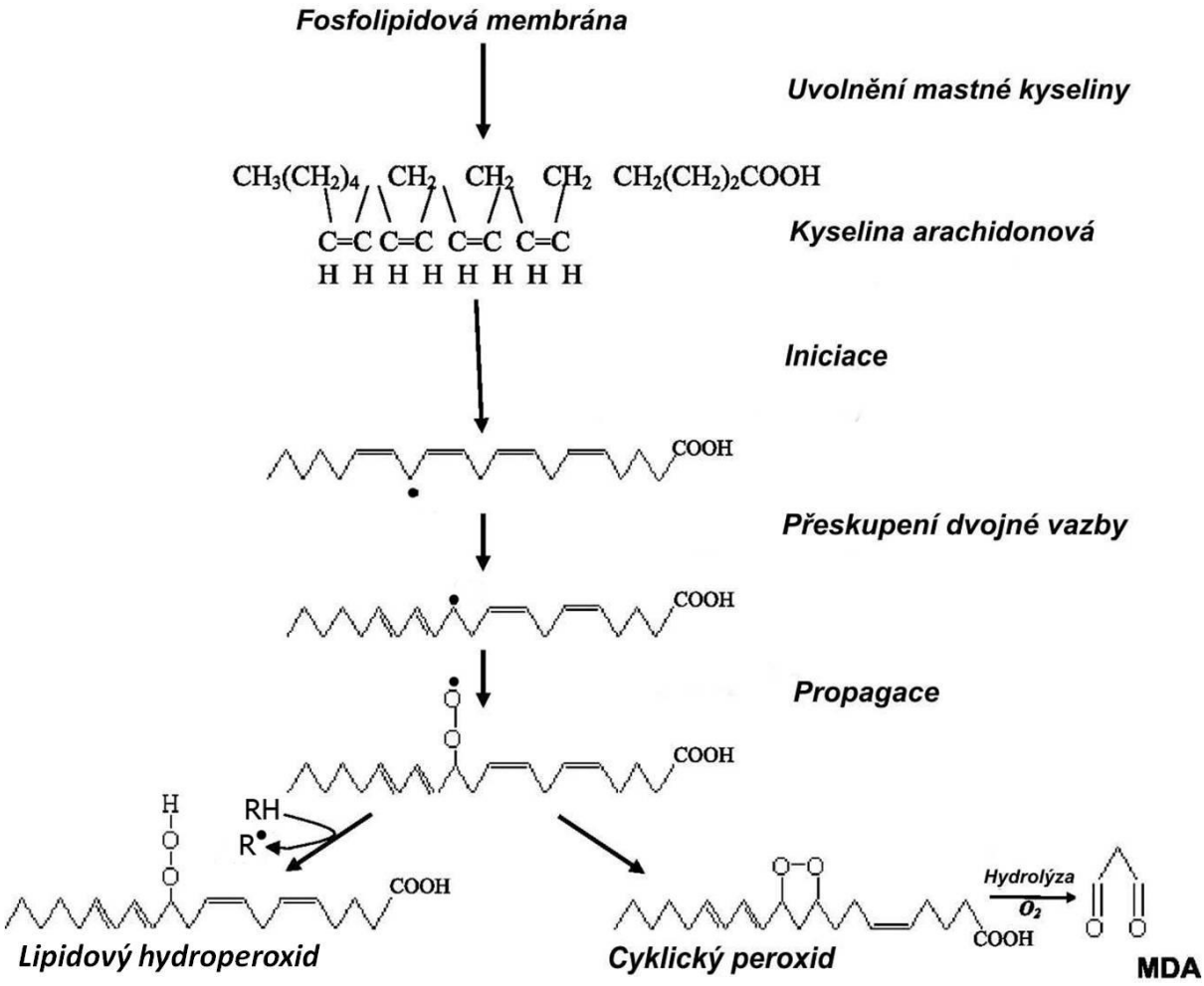


Obr. 2: ***Oxid dusnatý v organizmu.*** *Upraveno dle Donne et al. (Dalle-Donne I. et al., 2006). Oxid dusnatý (NO) vzniká v organizmu působením NO synhtasy (NOS). V hydrofobním prostředí je NO přítomným kyslíkem autooxidován za vzniku oxidu dusitého (N_2O_3). N_2O_3 je silným nitrosylačním činidlem a v přítomnosti volných thiolových skupin reaguje za vzniku S-nitrosothiolů (R-SNO). V mezibuněčné hmotě reaguje NO s oxyhemoglobinem ($Hb(O_2)$) za vzniku methemoglobinu (metHb). Membránový enzymový komplex NADPH oxidasa (NOX) je zdrojem superoxidového radikálu ($O_2^{\bullet-}$), z nějž působením enzymu superoxidismutasy (SOD) vzniká peroxid vodíku (H_2O_2). NO v přítomnosti kyslíku podléhá autooxidaci za vzniku dusitanů (NO_2^-), které v přítomnosti iontů kovů (M-ox) přecházejí na oxid dusičitý (NO_2). Působením H_2O_2 dochází k přechodu iontů kovů (M-red) do vyšších oxidačních stavů (M-ox). Naopak superoxidový radikál vede k redukci iontů kovů. Reakce NO s ionty kovů (M-red) vedou ke vzniku M-nitrosylových komplexů (M-NO). Reakcí $O_2^{\bullet-}$ s oxidem dusnatým vzniká*

peroxodusitan ($ONOO^-$). Peroxodusitan je za fyziologického pH protonován za vzniku kyseliny peroxodusité, z níž vzniká NO_2. $ONOO^-$ také reaguje s oxidem uhličitým (CO_2) za vzniku uhličitanových iontů (CO_3^-) a NO_2 nebo dusičnanů (NO_3^-).

2.1.1.3. Produkty lipidové peroxidace

Reakcí ROS a RNS s nenasycenými mastnými kyselinami fosfolipidů dochází k zahájení kaskády peroxidačních reakcí lipidů a ta vede ke vzniku škály štěpných produktů. Fosfolipidy jsou hlavní složkou buněčných membrán a jejich oxidace vede k narušení membrán a navíc ke vzniku štěpných produktů, které spouští redoxní signály. Peroxidaci rozlišujeme enzymatickou a neenzymatickou. Průběh neenzymatické peroxidace je zahájen atakem volného radikálu na mastnou kyselinu (fáze iniciace). Největší význam se připisuje hydroxylovému radikálu, iniciaci však mohou vyvolat i radikály jiné. Nejcitlivějším místem pro atak radikálu v molekule mastné kyseliny je methylenová ($-CH_2-$) skupina obklopená z obou stran dvojnou vazbou (Sevanian A. et al., 1990). Následuje odtržení atomu vodíku z této skupiny a z mastné kyseliny se stává radikál $L^{\bullet}$. Dochází k přeskupení dvojné vazby a následné spontánní reakci s molekulou kyslíku za vzniku lipoperoxylového radikálu ($LOO^{\bullet}$). Tento radikál je rovněž velmi reaktivní a je schopen atakovat jinou molekulu nenasycené mastné kyseliny. Odštěpí z ní atom vodíku a sám se přemění na hydroperoxid LOOH (fáze propagace). Tato řetězová reakce pokračuje, dokud nedojde k ukončení setkáním radikálu $L^{\bullet}$ s jiným radikálem nebo antioxidantem (fáze terminace). Schéma peroxidace lipidů je znázorněno na obrázku (Obr. 3). Během procesu peroxidace vzniká celá škála vysoce reaktivních vedlejších produktů (epoxidy, aldehydy, hydrokarbony). Ty často atakují nukleofilní skupiny proteinů, čímž je modifikují. Jejich účinky mohou být pouze stimulační, ale i cytotoxické. Vysoké koncentrace mohou mít akutní toxické účinky a vést k inhibici buněčné proliferace. Nízké koncentrace mohou stimulovat aktivitu některých enzymů (adenylátcyklasu, guanylátcyklasu, fosfolipasu C) a regulovat transkripci některých genů zahrnutých v metabolizmu glutathionu (GSH) nebo hemoxygenasy I (Spiteller P. and Spiteller G., 1998; Ceaser E.K. et al., 2004).



Obr. 3: ***Peroxidace lipidů.*** *Upraveno dle Powers et al. (Powers S.K. and Jackson M.J., 2008). Proces lipoperoxidace probíhá mechanismem řetězové reakce. Methylenové skupiny (-CH_2-) polynenasycených mastných kyselin reagují s volnými radikály (iniciace). Dochází k přeskupení dvojné vazby a vzniká lipidový radikál, který není příliš stabilní molekulou, proto snadno a rychle reaguje s molekulárním kyslíkem a tvoří peroxyradikál mastné kyseliny (propagace). Ten může reagovat s další molekulou polynenasycené mastné kyseliny. Z původního radikálu vzniká lipidový hydroperoxid, z nově napadené molekuly polynenasycené mastné kyseliny vzniká nový lipidový radikál a cyklus se opakuje. Z peroxyradikálu mastné kyseliny může vznikat také cyklický peroxid, z nějž hydrolýzou vzniká vedlejší produkt lipoperoxidace - malondialdehyd (MDA).*

2.1.2. Molekuly antioxidační obrany

Udržování redoxní rovnováhy v buňce je nezbytné pro zachování normálních buněčných funkcí, a proto je přísně regulováno. Organizmus vyvinul několik obranných systémů, které zabraňují poškození organizmu toxickými produkty oxidačního stresu. Zahrnují antioxidační enzymové systémy a vysokomolekulární i nízkomolekulární neenzymové antioxidanty.

2.1.2.1. Enzymové systémy

Antioxidačních enzymů je celá škála a jejich zastoupení v buňkách stejně jako jednotlivé izoformy se liší podle typu buněk. Zde je uveden přehled nejběžnějších antioxidačních enzymů.

Superoxiddismutasa (EC 1.15.1.1) katalyzuje disproporcionaci superoxidového radikálu na peroxid vodíku a molekulární kyslík.

$$2O_2^{\bullet-} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$$

U lidí se vyskytuje ve dvou formách lišících se umístěním a kofaktorem, kterým je vždy atom kovu. Cu^{2+}/Zn^{2+}/ SOD1 je dimer o molekulové hmotnosti 32 kDa, jejíž katalytické podjednotky obsahují atom mědi a zinku. Nachází se v cytosolu hepatocytů, erytrocytů a nervových buněk. Mn^{2+} SOD2 se vyskytuje v podobě dimeru nebo tetrameru, jejíž podjednotky (23 kDa) obsahují atom manganu. Vyskytují se v mitochondriích. Snížená aktivita SOD byla popsána např. u některých hemodialyzovaných nemocných. Pokles aktivity tohoto enzymu ve stáří je součástí celkového oslabení antioxidační ochrany (Hasanoglu E. et al., 1994; Jacob C. and Winyard P.G., 2009).

Katalasa (EC 1.11.1.6) je hemoprotein obsahující čtyři hemové skupiny. Vyskytuje se v krvi, kostní dřeni, slizničních membránách, ledvinách a játrech. Její biologická úloha spočívá v disproporcionaci peroxidu vodíku na vodu a molekulární kyslík.

$$2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$$

Glutathionperoxidasa (EC 1.11.1.9) katalyzuje redukci peroxidu vodíku glutathionem, čímž chrání lipidy biologických membrán a hemoglobin (Hb) před oxidací peroxidy. Díky její závislosti na GSH je její aktivita ukazatelem hladiny GSH.

$$H_2O_2 + 2GSH \rightarrow 2H_2O + GSSG$$

Glutathionreduktasa (EC 1.8.1.7) je flavoproteinový enzym obsahující flavinadenindinukleotid, který rychle redukuje oxidovaný glutathion (GSSG) v buňkách za vzniku redukovaného glutathionu.

$$GSSG + NADPH + H^+ \rightarrow 2GSH + NADP^+$$

Peroxiredoxiny (EC 1.11.1.15) katalyzují reakci podobnou glutathionperoxidase. Redukují peroxid vodíku, organické hydroperoxidy a peroxodusitan za využití buněčných thiolů, např. thioredoxinu (Trx). Obsahují jedno nebo dvě cysteinová aktivní místa, díky nimž jsou peroxiredoxiny schopny reagovat na zvýšené hladiny oxidačního stresu v buňce.

$$H_2O_2 + Trx\text{-}(SH)_2 \rightarrow 2H_2O + Trx\text{-}(SS)$$

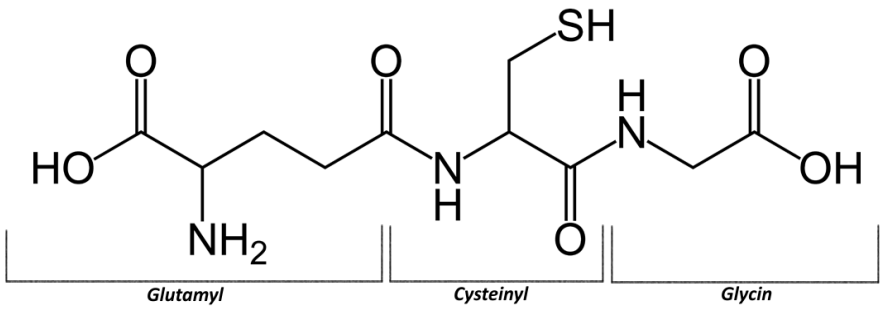
Mezi enzymové antioxidanty se také řadí methioninsulfoxidreduktasy (EC 1.8.4.11), které jsou schopny redukovat oxidovaný methionin na proteinech a jsou tak důležitou součástí opravných procesů buňky při působení oxidačního stresu, regulují funkci proteinů a zpomalují stárnutí. Detoxifikační enzymy jako je systém cytochromu P450 (EC 1.14.14.1) nebo glutathiontransferasa (EC 2.5.1.18) jsou též neopomenutelnou součástí antioxidačních enzymových systémů.

2.1.2.2. Neenzymové antioxidanty

Neenzymové antioxidanty mohou být rozděleny na vysokomolekulární a nízkomolekulární. Nejznámějšími vysokomolekulárními neenzymovými antioxidanty jsou ceruloplasmin, albumin a feritin. Mezi nízkomolekulární neenzymové antioxidanty patří aminothioly, vitaminy (kyselina askorbová, tokoferoly), karotenoidy, ubichinol, bilirubin a další.

Jedním z nejvýznamnějších nízkomolekulárních neenzymových antioxidantů je glutathionu a jeho metabolity. Následující odstavce jsou proto věnovány sirným nízkomolekulárním neenzymovým antioxidantům – aminothiolům. Aminothioly využívají svých thiolových skupin k udržování redoxní rovnováhy v buňkách i v extracelulárním prostředí.

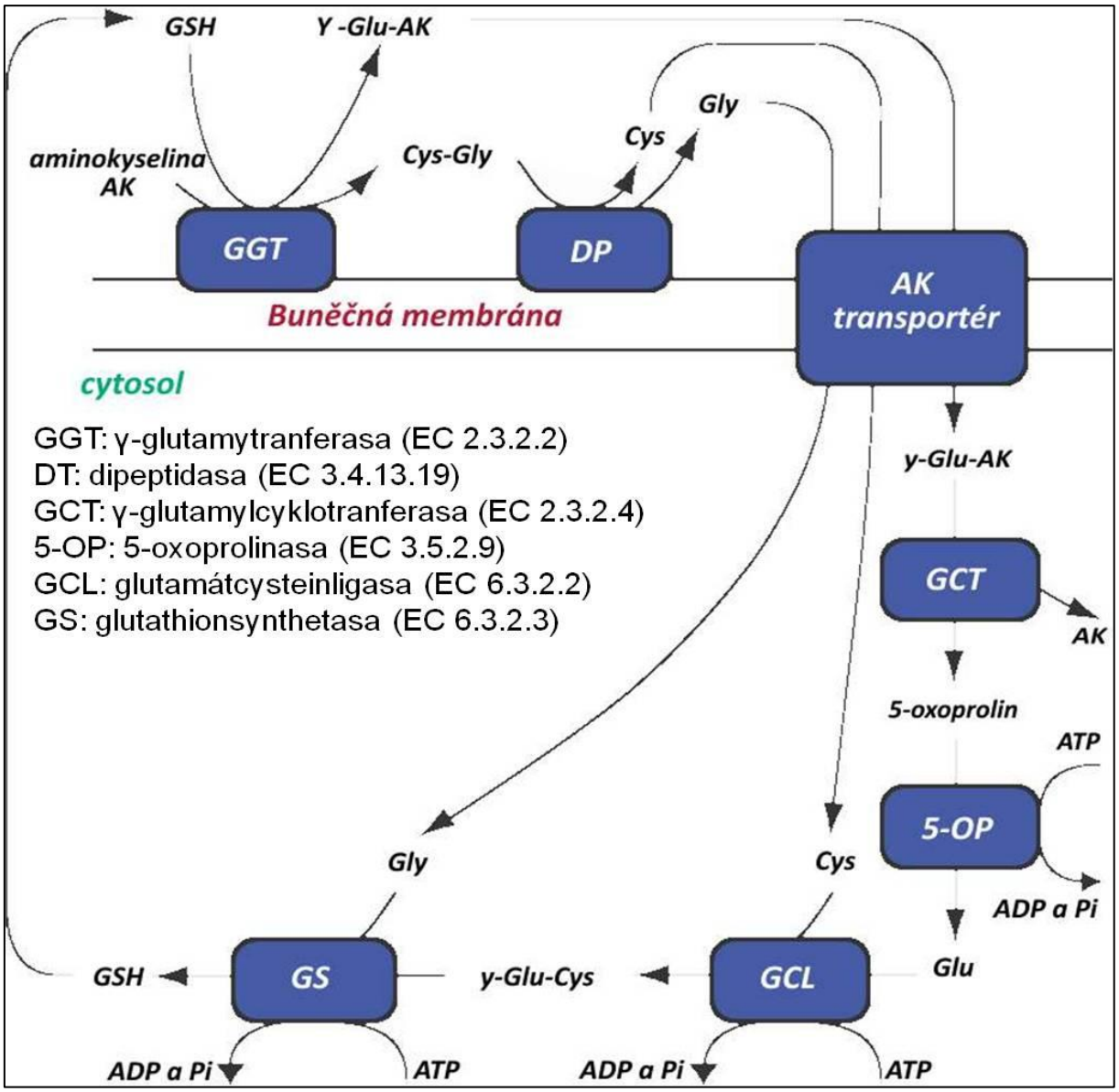
Glutathion je hlavním neproteinovým redoxním pufrem v buňce (Banerjee R., 2008). Je to tripeptid složený z glutamátu, cysteinu a glycinu (γ -glutamylcysteinylglycin) (Obr. 4).



Obr. 4: ***Molekula glutathionu.*** *Tripeptid složený z glutamylu, cysteinylu a glycinu.*

GSH je syntetizován v cytosolu, v němž se nachází především v redukované formě a jeho intracelulární koncentrace je 0,5-10 mM. Poměr redukované a oxidované formy je ukazatelem redoxního statusu v buňce a zpravidla bývá větší než 10:1. GSH je zahrnut v mnoha biologických procesech jako je skladování a transport cysteinu, biosyntéza leukotrienů a prostaglandinů, udržování proteinové struktury a funkce. Nicméně jeho primární a nejdůležitější funkcí je udržování intracelulární redoxní homeostázy zajišťováním ochrany proti ROS, RNS a cizorodým látkám. GSH reaguje s volnými radikály a cizorodými látkami, jejichž produkty jsou následně exportovány ven z buňky a degradovány. Buňka se snaží udržet správný poměr redukované a oxidované formy glutathionu (GSH:GSSG), takže v situaci velkého oxidačního stresu vylučuje GSSG ven. Extracelulární GSSG a jeho metabolity mohou tak sloužit jako marker oxidačního stresu v buňkách (Dickinson D.A. and Forman H.J., 2002).

Dalšími aminokyselinami (AK) a významnými extracelulárními antioxidanty jsou **cystein (C) a cysteinylglycin (CG),** které jsou hlavními složkami metabolizmu glutathionu. Glutathion je v prvním kroku odbouráván enzymem γ-glutamyltranferasou (GGT) (EC 2.3.2.2), který štěpí γ-glutamylovou amidovou vazbu za vzniku cysteinylglycinu a γ-glutamylového zbytku. Dále je pak CG štěpen membránovou peptidasou na aminokyseliny cystein a glycin, které mohou být aminokyselinovými transportéry přeneseny do buněk. Extracelulární koncentrace cysteinylglycinu tedy může odrážet množství exportovaného glutathionu z buněk a tudíž oxidační stres v buňce (Banerjee R., 2008). Cystein je limitujícím faktorem v regulaci syntézy glutathionu. Tyto aminothioly se podílejí na antioxidační obraně vně buněk (Muller T. and Muhlack S., 2011). Metabolizmus glutathionu je znázorněn na obrázku (Obr. 5).



Obr. 5: ***Metabolizmus glutathionu.*** *Upraveno dle Banerjee (Banerjee R., 2008). Z glutathionu (GSH), který je přenesen přes buněčnou membránu vně buňky je γ-glytamyltransferasou (GGT) přenesen γ-glutamylový zbytek na jinou aminokyselinu (γ-Glu-AK). Cysteinylglycin (Cys-Gly) je dipeptidasou (DP) rozštěpen na cystein (Cys) a glycin (Gly), které jsou aminokyselinovými (AK) transportéry přeneseny do buňky. V buňce dochází k uvolnění γ-glutamylového zbytku z AK. Působením γ-glutamylcyklotranferasy (GCT) vzniká z γ-glutamylového zbytku 5-oxoprolin a následně 5-oxoprolinasou (5-OP) za účasti ATP L-glutamát (Glu). Glutamátcysteinligasa (GCL) katalyzuje reakci cysteinu s L-glutamátem za účasti ATP a vzniku γ-glutamylcysteinu (γ-Glu-Cys). Z γ-Glu-Cys a glycinu je za účasti ATP enzymem glutathionsynthetasou syntetizován glutathion.*

Zvláštní aminokyselinou je **homocystein (H)**. Homocystein je odbouráván na cystein a tím se také nepřímo účastní metabolizmu glutathionu a anitoxidační obrany. Na druhou stranu může být ve vysokých koncentracích toxický v důsledku svého reaktivního metabolitu – homocysteinu thiolaktonu, který způsobuje peroxidaci lipidů a modifikaci proteinů (Chwatko G. and Jakubowski H., 2005).

2.1.3. Studované posttranslační modifikace

Celkový fond proteinů produkovaný organizmem se nazývá „proteom“, analogicky podle kompletního souboru genů nazývaného „genom“. Ačkoliv je proteom kódován genomem tvořeným přibližně 20 000 – 25 000 geny, existuje 10-100x více různých forem proteinů. Tato diverzita proteinů může být organizována na úrovni mRNA a/nebo po translaci mRNA do proteinů kovalentními modifikacemi specifických proteinů procesem zvaným „posttranslační modifikace“. Takové úpravy proteinů umožňují vytvoření nových vazebných míst pro jiné proteiny, regulují aktivitu enzymů a lokalizaci proteinů v buňce (Walsh C.T., 2006; Jacob C. and Winyard P.G., 2009).

Posttranslační modifikace mohou být klasifikovány do několika skupin. Patří sem modifikace proteinů hydrolytickým štěpením jedné nebo více peptidových vazeb, modifikace postranních řetězců aminokyselin v proteinu a modifikace, v nichž dochází k zesíťování za vzniku produktů s vyšší molekulovou hmotností, než výchozí protein. Také je možné dělit modifikace na specifické, což se týká jak oxidovaných zbytků, tak jejich produktů pouze u některých aminokyselin a reakce nespecifické, které mohou napadat nejrůznější aminokyselinové zbytky a dát tak vznik více různým produktům (Levine R.L. and Stadtman E.R., 2001).

Postranní řetězce aminokyselin proteinů jsou velmi vnímavé k reaktivním formám kyslíku a dusíku a jejich produktům. Bylo zjištěno, že redoxní modifikace proteinů je jedním z důležitých signalizačních mechanizmů v buňce a je také zahrnuta v základních buněčných procesech jako proliferace, diferenciace a apoptóza. Mnoho posttranslačních modifikací může být zahrnuto jak ve fyziologických tak v patofyziologických procesech v buňce. Mezi fyziologickými signalizačními účinky ROS/RNS a poškozením buňky v důsledku oxidačního stresu zůstává stále tenká hranice (Finkel T., 2000; Thannickal V.J.

and Fanburg B.L., 2000; Jones D.P. and Go Y.M., 2010). Dnes již víme, že oxidační stres a oxidační modifikace jsou důsledkem mnoha změn, ke kterým dochází během stárnutí organizmu a mnohých onemocnění, jako jsou ateroskleróza, neurodegenerativní onemocnění a v neposlední řadě také nádorová onemocnění (Aksenov M.Y. et al., 2001; Baraibar M.A. et al., 2011; Madamanchi N.R. and Runge M.S., 2013). Tabulka (Tab. 1) uvádí přehled oxidačních modifikací proteinů.

Tab. 1
Přehled oxidačních modifikací aminokyselin.

aminokyselina	**Produkt modifikace**	**aminokyselina**	**Produkt modifikace**
arginin	semialdehyd glutamátu	methionin	methionin sulfoxid
cystein	disulfidy (Cys-S-S-Cys)	prolin	semialdehyd glutamátu
	sulfonová kyselina		pyroglutamová kyselina
fenylalanin	*2*-, *3*-, *4*- hydroxyfenylalanin		*4*-hydroxyprolin
histidin	2-oxohistidin		pyrolidon
	asparagin	threonin	*2*-amino-*3*-oxo-butanová kyselina
	kyselina asparagová	tryptofan	*N*-formylkynurenin
leucin	*3*-, *4*-hydroxyleucin		*2*-, *4*-, *5*-hydroxytryptofan
lysin	semialdehyd kyseliny *2*-aminoadipové		kynurenin
methionin	methionin sulfonyl	valin	*3*-hydroxyvalin

2.1.3.1. Karbonylace

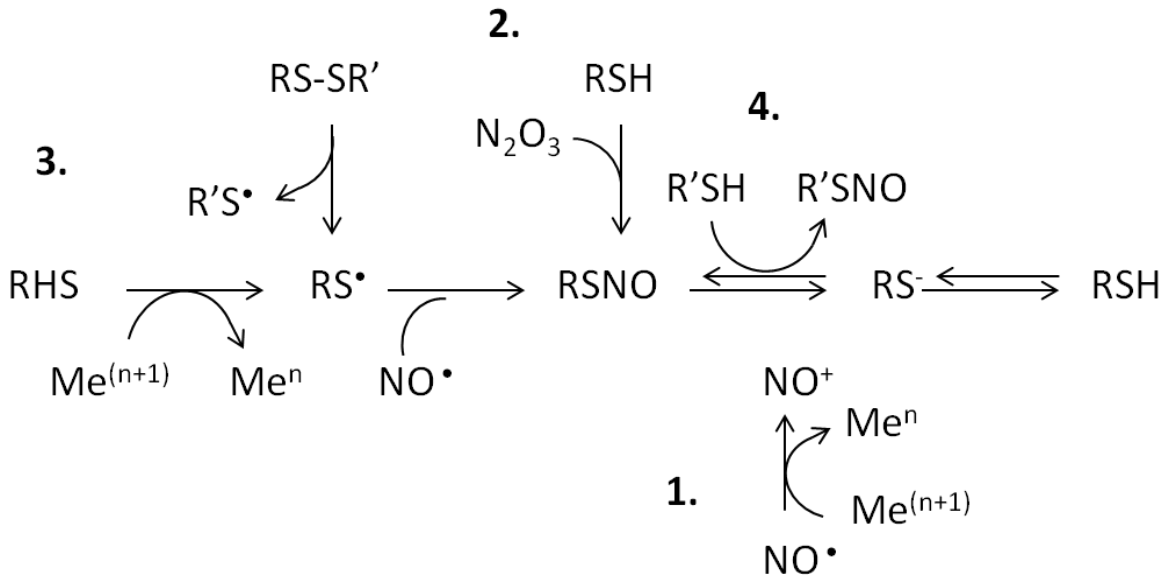
Karbonylace je nespecifická modifikace postranních řetězců aminokyselin. Je to nevratná neenzymatická změna postranních aminokyselinových řetězců (Grimsrud P.A. et al., 2008). Rozlišujeme přímý a nepřímý mechanizmus karbonylace. V přímé reakci reagují ionty kovů nebo peroxid vodíku přímo s aminokyselinovými zbytky lysinu, argininu a prolinu za vzniku semialdehydů. Nepřímý mechanizmus začíná peroxidací lipidů (arachidonová kyselina, linoleová kyselina) za vzniku reaktivních aldehydů a ketonů, které pak kovalentně modifikují proteiny (Yoo B.S. and Regnier F.E., 2004; Meany D.L. et al., 2007).

Karbonylace proteinů může způsobovat trvalou ztrátu funkce proteinu a tím následnou buněčnou dysfunkci a poškození tkáně. Cysteinylové, histidylové a lysylové zbytky bývají přítomny v katalytických centrech enzymů, tudíž karbonylace často zasahuje enzymatický systém (Mark R.J. et al., 1997; Miyake H. et al., 2003). Karbonylované proteiny

jsou degradovány proteolytickým systémem, anebo se akumulují jako rozložené proteiny. Karbonylace je zastoupena řádově více než ostatní oxidační modifikace a počet karbonylových skupin proteinů koreluje s mírou poškození proteinů oxidačním stresem (Requena J.R. et al., 2001; Dalle-Donne I. et al., 2006; Grimsrud P.A. et al., 2008). Zvýšená hladina karbonylovaných proteinů byla popsána v souvislosti s revmatoidním onemocněním, expozicí organizmu vysokým hladinám volného železa, hypertenzí, cystickou fibrózou, karcinogenezí a spoustou dalších (Chen X. et al., 2000; Renke J. et al., 2000; Kettle A.J. et al., 2004; Stroh A. et al., 2004; Tanito M. et al., 2004). Předpokládá se, že by karbonylace mohla být příčinou mnohých onemocnění, případně hrát roli v jejich progresi (Ahmad R. et al., 2008; Battisti V. et al., 2008; Musolino C. et al., 2011; Pavone B. et al., 2011).

2.1.3.2. S-nitrosylace

S-nitrosylace je pomalá reakce, při které dochází k modifikaci sulfhydrylových skupin na cysteinových zbytcích peptidů nebo proteinů (Obr. 6) (Lopez-Sanchez L.M. et al., 2009). Není znám její přesný mechanizmus v organizmu, ale je jisté, že neprobíhá přímým atakem NO na thiolovou skupinu. V biologickém systému vzniká S-nitrosylace čtyřmi možnými způsoby. Prvním způsobem je reakce s nitrosoniovým kationtem (NO^+), který vzniká oxidací NO. Druhou možností je přímá reakce s N_2O_3, který vzniká oxidací oxidu dusnatého kyslíkem. Tato reakce je za normálních podmínek velmi pomalá, ale může být urychlena v hydrofobním prostředí, což je příznačné pro membránové kompartmenty, např. v mitochondriích (Liu X. et al., 1998; Shiva S. et al., 2001; Hogg N., 2002). Třetí možnost zahrnuje oxidaci thiolových skupin za vzniku thiolových radikálů a jejich následnou reakcí s NO. K modifikaci může docházet také transnitrosylační reakcí, tj. přesunem S-nitroso-skupiny z S-nitrosothiolu na cysteinový zbytek proteinu (Obr. 6, reakce 4.) (Hogg N., 2002).



Obr. 6: ***S-nitrosylační reakce (1-4).*** *Upraveno dle Di Giacomo et al. (Di Giacomo G. et al., 2012). S-nitrosylaci mohou podléhat nízkomolekulární thioly a sulfhydrylové skupiny proteinů (obojí označeno RSH) za vzniku S-nitrosothiolů (RSNO). NO reaguje s thiolovým radikálem ($RS^{\bullet}$), který vzniká po předchozí oxidaci katalyzované kovy (Me) nebo homolytickým štěpením disulfidických můstků (RS-SR') (rce 3). Nicméně thiolový radikál vzniká poměrně vzácně a je nestálý, tudíž většina buněčného RSNO vzniká reakcí s RS^- skupinou cysteinu po deprotonizaci. RS^- i RSH podléhají S-nitrosylaci reakcí s oxidem dusitým (N_2O_3)(rce 2) nebo přímo s nitrosoniovým iontem (NO^+), který vzniká oxidací katalyzovanou ionty kovů (rce 1). K modifikaci může také docházet transnitrosylační reakcí přenosem NO^+ z RSNO (rce 4).*

S-nitrosylace je vratná modifikace, která může vést ke změněné aktivitě nebo struktuře proteinu (Stamler J.S. et al., 1992). S-nitrosothioly jsou nezbytnou součástí redoxní signalizace. Předpokládá se existence několika mechanizmů zajišťujících transport S-nitrosothiolů, případně pouze S-nitroso- skupiny přes membrány.

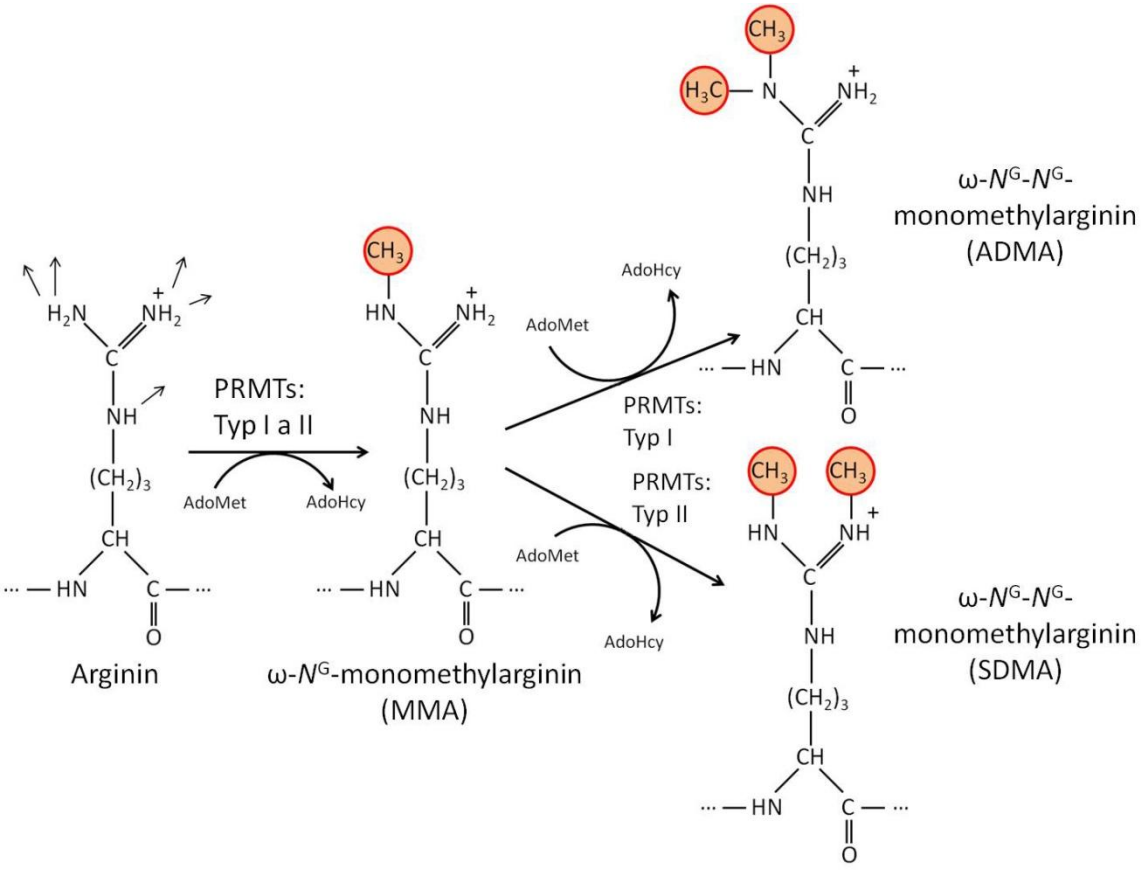
S-nitrosothioly slouží také jako „zásobárna“ nestabilního NO a podle mnoha prací je jejich účinek roven účinkům NO (např. vasodilatace). Poslední studie ukazují, že efekt exogenních S-nitrosothiolů na intracelulární S-nitrosylaci nemá s biologií NO příliš společného. Míra S-nitrosylace v buněčném prostředí a stabilita posttranslační modifikace závisí na mnoha buněčných procesech jako je produkce NO, metabolizmus glutathionu,

antioxidační status a homeostáza S-nitrosothiolů (Lopez-Sanchez L.M. et al., 2009). Byla popsána více než stovka proteinů, které podléhají S-nitrosylaci. Popsané proteiny se v buňce účastní mnoha rozličných úloh. Jsou to transkripční faktory, iontové kanály, membránové receptory a enzymy (Stamler J.S. et al., 2001; Hess D.T. et al., 2005).

2.1.3.3. Methylace argininů

Methylace argininů je posttranslační modifikace, při které dochází k připojení methylového zbytku na guanidinové atomy dusíku v argininu za účasti protein arginin methyltranferas (PRMTs) (EC 2.1.1.125). Proteolýza methylovaných proteinů vede ke zvýšeným hladinám třech uvedených forem methylovaného argininu (MMA, SDMA, ADMA) v krvi, které jsou tudíž významnými markery modifikace proteinů. Methylargininy jsou také přirozenými inhibitory eNOS. Bylo zjištěno, že odpojení eNOS od tetrahydrobiopterinu oxidovaného za přítomnosti oxidačního stresu vede k produkci superoxidového radikálu signifikantně zesilované působením dimethylargininu. Uvedená skutečnost působí jako pozitivní zpětná vazba při dalším vývoji oxidačního stresu (Leiper J. and Vallance P., 1999; Druhan L.J. et al., 2008).

Doposud bylo identifikováno 8 typů savčích methyltranferas, přičemž šest z nich katalyzuje přenos methylových skupin z S-adenosylmethioninu (AdoMet) na guanidinový dusík argininu za vzniku S-adenosylhomocysteinu (AdoHcy) a methylargininu (Bedford M.T. and Richard S., 2005). Rozlišujeme dva typy methyltranferas (I a II). Oba typy katalyzují vznik monomethylargininu (MMA), typ I dále katalyzuje vznik asymetrického dimethylargininu (ADMA), zatímco typ II katalyzuje reakci za vzniku symetrického dimethylargininu (SDMA) (Obr. 7).



Obr. 7: ***Methylace argininu.*** *Upraveno dle Esse et al. (Esse R. et al., 2012). V přítomnosti adenosylmethioninu (AdoMet) je L-arginin methylován pomocí methyltranferas I i II (PRMTs: typ I a II) za vzniku monomethylargininu (MMA). MMA může být dále methylován na tomtéž dusíku v přítomnosti AdoMet enzymem PRMT I za vzniku asymetrického dimethylargininu (ADMA) nebo na jiném dusíku v přítomnosti AdoMet enzymem PRMT II za vzniku symetrického dimethylargininu (SDMA).*

Methylace argininů je důležitým regulátorem mnoha biologických procesů, jako je regulace transkripce methylací histonů, RNA procesů methylací proteinů vážících RNA a oprava DNA. Bylo zjištěno, že methylované proteinové arginylové zbytky blokují některé protein-protein interakce nebo naopak zprostředkovávají nové interakce (Bedford M.T. and Richard S., 2005). Methylace argininů je tak nedílnou součástí regulace signálních procesů (McBride A.E. and Silver P.A., 2001). Nedávno bylo popsáno, že PRMTs jsou zvýšeně exprimovány u nádorových onemocnění včetně onkohematologických (Hayette S. et al., 2012; Takahashi S., 2013).

2.1.4. Vliv oxidačního stresu na proteom krevní plazmy

Dnes je již známo, že redoxní signalizace je jedním z důležitých mechanizmů, který prostřednictvím posttranslačních modifikací dodává buňkám informace a koordinuje buněčné procesy. Ovšem mnohá místa v buňce, která jsou rozpoznávána redoxními molekulami, zůstávají stále ještě neobjasněná a tím pádem i porozumění role redox-indukovaných změn v signalizačních procesech v buňce. Nicméně několik proteinů a genů, které podléhají redoxní kontrole v buňce, již objasněno bylo. Takové proteiny vyžadují místo na své molekule, které může reagovat s molekulami ROS a RNS, jako jsou např. thiolové skupiny cysteinů a methioninů. Již výše zmíněná modifikace thiolových zbytků je příkladem redoxní signalizace analogické k fosforylaci/defosforylaci serinových nebo threoninových zbytků v fosfokinasové signální kaskádě (Finkel T., 2000; Thannickal V.J. and Fanburg B.L., 2000).

Pomocí techniky „gene arrays“ byla studována genová exprese jako odpověď buňky na zvýšenou koncentraci ROS (Weigel A.L. et al., 2002), RNS (Turpaev K. et al., 2005) nebo na změny koncentrace antioxidantů jako jsou enzym SOD (Li Z. et al., 2001) a nízkomolekulární aminothiol GSH (Fratelli M. et al., 2005). Li *et al.* zjistili, že MnSOD reguluje 16 genů, přičemž u 5 genů dochází ke zvýšené regulaci a u 11 genů ke snížené regulaci. Jedná se o onkogeny, geny nezbytné pro buněčnou adhezi, mezibuněčnou komunikaci, regulátory buněčného cyklu, růstové faktory, cytokiny, regulátory angiogeneze, apoptotické geny a geny zahrnuté v odpovědi buňky na poškození DNA. Mezi geny se zvýšenou expresí byli protooncogene c-MET, DNA damage inducible trancript, CD9 gene, pro alpha-catenin gene a gen kódující plakoglobin, signifikantně sníženou expresi měly geny kódující receptor pro vaskulární endoteliální růstový faktor 1 (Vascular endothelial growth factor receptor 1, VEGFR-1), Tumor necrosis factor-alpha converting enzyme a interleukin-1β (Li Z. et al., 2001). Weigel et al. sledovali vliv peroxidu vodíku, hydroxynonenalu a tert-butylhydroxyperoxidu na genovou expresi a nalezli 35 genů, jež byly rozdílně regulovány vlivem tří uvedených oxidačních agens. Nalezené geny byly zahrnuty podobně jako ve dříve zmíněné studii v procesu apoptózy, regulace buněčného cyklu, mezibuněčné komunikace, transdukce signálu a regulace transkripce (Weigel A.L. et al., 2002). Bylo zjištěno, že také oxid dusnatý ovlivňuje expresi některých genů. V práci Tupaeva et al. identifikovali 17 NO citlivých genů, jednalo se opět o geny pro cytokiny, transkripční faktory, signální molekuly mezi nimiž byl i vaskulární endoteliální růstový faktor (Vascular endothelial growth factor A,

VEGF nebo VEGF-A) a interleukin-8 (Turpaev K. et al., 2005). Podobně bylo v práci Fratelli et al. identifikováno 215 genů regulovaných antioxidantem glutathionem (Fratelli M. et al., 2005).

Z výše uvedených studií vyplývá, že mediátory oxidačního stresu a molekuly antioxidační obrany významně ovlivňují expresi genů zapojených do základních buněčných funkcí jako je růst, buněčná smrt, signalizace, mezibuněčná komunikace a další a mají tedy zásadní signalizační funkci v buňce. Redoxní změny a oxidační stres, tak můžou významně měnit zastoupení proteinů v buňce i v extracelulárním prostoru.

2.2. MYELODYSPLASTICKÝ SYNDROM (MDS)

Onkohematologická onemocnění jsou nádorová onemocnění krvetvorné tkáně, která jsou odvozená od krvetvorných buněk pocházejících z různých vývojových řad. Vývoj nádorové buňky je komplexní proces, jehož výsledkem je mutace kritických genů regulujících růstový cyklus buňky. Procesy buněčné proliferace, zrání, diferenciace a buněčné smrti jsou v nenádorové buňce striktně řízené mechanizmy. Jejich koordinace je zprostředkována mnoha signálními procesy. Deregulace těchto procesů vede k poškození DNA a u buněk neschopných opravovat poškozenou DNA a replikační chyby tak dochází k hromadění mutací. Takové buňky také často selhávají v udržování počtu chromozomů a vedou k akumulaci abnormalit v karyotypu. Tyto změny pak mohou vést k vývoji nádorové buňky. Onkohematologická onemocnění se rozdělují na leukémie charakterizované difúzní infiltrací orgánů bez tvorby nádorových ložisek a na maligní lymfomy. Jsou zde zahrnuty akutní leukémie, myeloproliferativní onemocnění a myelodysplastický syndrom, chronická lymfatická a chronická myeloidní leukémie, vlasatobuněčná leukémie, Hodgkinova choroba, nehodgkinské lymfomy, lymfoproliferativní onemocnění s tvorbou paraproteinu imunoglobulinu M a histiocytární malignity (Klener P., 2002; Alberts B., 2008). Tato práce se zabývá studiem myelodysplastického syndromu, což je klonální onemocnění krvetvorby, které často prograduje do akutní myeloidní leukémie (acute myeloid leukemia, AML) a díky tomu slouží jako výborný model pro studium jednotlivých kroků leukomogeneze (Nolte F. and Hofmann W.K., 2010).

2.2.1. Definice MDS a etiologie

MDS zahrnuje soubor onemocnění postihujících pluripotentní kmenovou krvetvornou buňku, která se vyvíjí defektně. Porucha může postihnout kteroukoliv z vývojové větve myeloidní řady, tudíž je tento soubor onemocnění a jeho projevy velmi heterogenní. MDS může přejít do akutní myeoloidní leukémie. K vývoji onemocnění dochází *de novo* nebo sekundárně po předchozí expozici průmyslovým rozpouštědlům, alkylujícím látkám, záření (Shadduck R.K. et al., 2007). Myelodysplastickým syndromem trpí nejčastěji starší lidé, ale může paradoxně postihnout i děti. Dětský MDS je poměrně vzácný s incidencí 0,5 až 4 případů na milion lidí, zatímco MDS dospělých se vyskytuje u 20 až 40 případů na milion lidí ve světě (Heaney M.L. and Golde D.W., 1999).

2.2.2. Klinický obraz

Onemocnění je charakterizováno různými stádii, která se od sebe liší zdravotními problémy a klinickými projevy. Příznaky choroby se odvíjejí od toho, která z hematopoetických řad je v převážné míře postižena. Nejčastěji se nemoc manifestuje jako únava, dušnost při těžké anémii, sklon k recidivujícím infekcím při granulocytopenii nebo krvácivé stavy v důsledku trombocytopenie. Fyzikální nález bývá často chudý, nebývá přítomno zvětšení lymfatických uzlin a zvětšení jater a sleziny bývá nalezeno většinou jen u smíšených forem (MDS s myeloproliferací či myelofibrózou). U méně pokročilých forem je průběh často chronický, ale i tito nemocní mohou být ohroženi na životě těžkým krvácením či sepsí při hluboké cytopenii. U pokročilých forem s přítomností blastů v obvodové krvi je průběh často rychlý, ústící v rozvinutou akutní leukémii. Tito nemocní rovněž vyžadují od počátku péči hematologa a eventuelní hospitalizaci na interním oddělení, či ve specializovaném hematologickém centru, zabývajícím se intenzivní chemoterapií a transplantací krvetvorných buněk (Čermák J., 2002).

2.2.3. Patogeneze

MDS je klinicky a biologicky velmi variabilní. Předpokládá se, že dochází k hromadění somaticky získaných genetických změn u krvetvorné progenitorové buňky nebo u buňky kmenové (HPCs/HSCs), popřípadě u obou, a k abnormální expresi některých onkogenů, či poruše tumor supresorových genů. Kmenová krvetvorná buňka je buňka, ze které se vyvíjejí všechny buněčné krevní elementy. Má velkou schopnost sebeobnovy na rozdíl od již více diferencovaných buněk. K neoplastické transformaci může dojít v různém stádiu vývoje kmenové buňky. Tyto změny spolu s abnormální imunologickou odpovědí vedou k poruše regulace apoptózy, buněčného dělení a diferenciace kmenové buňky. Typickým obrazem MDS v časné fázi je vystupňovaná apoptóza, která je korelovaná s hyperplastickou a dysplastickou krvetvorbou v kostní dřeni a cytopenií v obvodové krvi (Heaney M.L. and Golde D.W., 1999; Čermák J., 2002; Greenberg P.L., 2006). Neoplastické krvetvorné buňky se vyvíjejí a diferencují defektně. Genetická nestabilita vzniklého patologického klonu vytváří terén pro vznik dalších mutací, přispívajících ke ztrátě regulace proliferace a diferenciace krvetvorných buněk. To vede nakonec k selhání kostní dřeně a přechodu do akutní leukémie. Patogeneze selhání kostní dřeně a poruchy vývoje kmenové buňky je multifaktoriální. Týká se jednak změn prostředí kostní dřeně a jeho vlivu na hematopoetickou buňku, a zároveň také změn u hematopoetické buňky jako takové (Greenberg P.L., 2006).

2.2.4. Diagnostika

K diagnostice se dnes nejvíce používá klasifikace dle světové zdravotnické organizace (world health organisation, WHO), která rozděluje pacienty do 10 skupin na základě nálezů v kostní dřeni a periferní krvi (Tab. 2) (Greenberg P.L., 2006). Dle WHO patří mezi podskupiny s nízkým rizikem 5q- syndrom a podtypy s refrakterní anémií (refractory anemia, RA). Zatímco za vysoce rizikové podskupiny se považují RA s excesí blastů I (refractory anemia with excess blasts, RAEB-I) (5 % až 9 % blastů) a RAEB-II (12 % až 19 % blastů), RA s excesí blastů v transformaci (refractory anemia with excess blasts in transfomation, RAEB-T) a AML. Mezinárodní prognostický skórovací systém (international prognostic scoring system, IPSS) se využívá v prognóze a léčbě. Ten kromě nálezů v kostní dřeni a

periferní krvi hodnotí také cytogenetické riziko a věk a rozděluje pacienty na nízko-, středně-I, středně- II a vysoce rizikové skupiny (Greenberg P. et al., 1997; Greenberg P.L., 2006).

Tab. 2

Klasifikace myelodysplastického syndromu (MDS) dle světové zdravotnické organizace (WHO) z roku 2008.

RA	refrakterní anémie (refractory anemia)
RARS	refrakterní anémie s prstenčitými sideroblasty (refractory anemia with ringed sideroblasts)
5q-syndrom	
RCMD	RA s multilineární dysplázií (refractory anemia with multilineage dysplasia)
RCMD(w/RS)	RCMD s prstenčitými sideroblasty (RCMD with ringed sideroblasty)
RAEB-I	refrakterní anémie s přebytkem blastů 1 (refractory anemia with excess blasts)
RAEB-II	refrakterní anémie s přebytkem blastů 2
AML	akutní myeloidní leukémie (acute myeloid leukemia)
MDS/MPD	MDS/myeloproliferativní onemocnění
MDS neklasifikovaný	

2.2.5. Oxidační stres u MDS

Myelodysplastický syndrom je často zmiňován v souvislosti s oxidačním stresem a zvýšenou koncentrací volného železa u pacientů léčených transfuzemi (Kang J.H. et al., 2001). Železo cirkuluje v plazmě vázáno na transferin, když je ovšem vazebná kapacita transferinu překročena, vzniká takzvané volné železo nebo také železo nevázané na transferin (non-tranferin bound iron, NTBI). Část NTBI, která se neváže na plazmatické biomolekuly, se nazývá labilní plazmatické železo. Labilní železo je redox aktivní, snadno proniká orgány a katalyzuje vznik ROS Haber-Weissovou reakcí (Hershko C. et al., 1998). Saigo et al. popsali vyšší koncentrace metabolitů reaktivních forem kyslíku v séru MDS pacientů, které pozitivně korelovaly s hladinou feritinu (Saigo K. et al., 2011). Práce skupiny Ghoti et al. popisuje signifikantně zvýšené hladiny ROS v červených krvinkách a destičkách MDS pacientů a jejich pozitivní korelaci s hladinou feritinu v séru a negativní korelaci s koncentrací glutathionu (Pereira-Leal J.B. et al., 2006). Nicméně poslední studie ukazují, že se tyto komplikace nemusí týkat pouze pacientů, kteří dostávají transfuze (Cortelezzi A. et al., 2000). Cortelezzi et al. popsali zvýšené extracelulární koncentrace homocysteinu, které korelovaly se zvýšenými hladinami malondialdehydu u MDS pacientů (Powers S.K. and Jackson M.J.). U

MDS pacientů bylo charakterizováno několik dalších markerů oxidačního stresu (Cortelezzi A. et al., 2001; Farquhar M.J. and Bowen D.T., 2003; Pereira-Leal J.B. et al., 2006). U MDS byla nalezena také zvýšená hladina reaktivních forem dusíku a předpokládá se jejich souvislost s apoptózou a neefektivní erytropoézou v raných stádiích MDS (Kitagawa M. et al., 1999). V několika studiích byly demonstrovány funkční mitochondriální abnormality u MDS pacientů (Bowen D. and Peddie C., 2002; Tehranchi R. et al., 2003). Mitochondriální DNA chybí histony a opravné mechanizmy, a je tudíž více náchylná k oxidaci a jiným poškozením (Gattermann N., 2000). Dále se předpokládá role pro-oxidačních toxických látek ve vývoji myelodysplastického klonu. Tyto etiologické agens jako chemoterapie, ionizační záření, benzen a jiné způsobují poškození buněk v důsledku oxidačního stresu (Farquhar M.J. and Bowen D.T., 2003). Několik studií popsalo u MDS polymorfizmus genů kódujících enzymy (NQO1 a glutathion S-transferase P1), které jsou nezbytné pro antioxidační obranu organizmu a zodpovědné za metabolizmus karcinogenů z vnějšího prostředí (Seedhouse C. et al., 2002). Nefunkčnost těchto genů tudíž může vést ke zvýšené náchylnosti k oxidačnímu stresu u MDS.

V důsledku výše popsané převahy prooxidačním látek nad antioxidačními u MDS onemocnění se předpokládá výskyt oxidačně modifikovaných proteinů a jiných makromolekul u MDS pacientů. Doposud byl popsán oxidační efekt na CD34+ buňkách vedoucí k jejich genetické nestabilitě a následně k defektní hematopoéze (Droge W., 2002; Pereira-Leal J.B. et al., 2006; Novotna B. et al., 2009). Peddie et al. nalezli oxidované pyrimidinové báze u CD34+ buněk MDS pacientů. Tato oxidace byla ve spojitosti se zvýšenou hladinou tumor nekrotizujícího faktoru (tumor necrosis factor) a sníženou intracelulární koncentrací GSH (Peddie C.M. et al., 1997). Jiné oxidační modifikace nebyly zatím u MDS popsány. U ostatních onkohematologických onemocnění byla popsána signifikantně zvýšená hladina karbonylových skupin, produktů pokročilé glykace, produktů pokročilé oxidace proteinů a S-nitrosylovaných proteinů v séru pacientů s B-chronickou lymfocytární leukémií (Musolino C. et al., 2011; Gangemi S. et al., 2012). Podobně v séru pacientů s akutní lymfoblastickou leukémií byla nalezena signifikantně zvýšená hladina karbonylovaných proteinů spolu se zvýšenou hladinou oxidačních látek a sníženou hladinou antioxidantů (Battisti V. et al., 2008). Ahmad et al. popsali signifikantně zvýšenou hladinu karbonylovaných proteinů a malondialdehydu v plazmě pacientů s chronickou myeloidní leukémií (Ahmad R. et al., 2008).

Je zřejmé, že oxidační stres je součástí onemocnění myelodysplastického syndromu, nicméně přesná příčina vzniku oxidačního stresu u MDS stejně jako jeho důsledky a role v patofyziologii onemocnění zůstávají neobjasněny.

2.2.6. Změny proteomu u MDS

Ačkoliv bylo identifikováno mnoho genových lokusů a genů se zvýšenou či sníženou expresí asociovanou s MDS, specifických biomarkerů (tj. charakteristik, které jsou objektivně měřeny a vyhodnoceny jako ukazatelé normálních biologických procesů, patogenních procesů nebo farmakologických odezev na léčbu (Biomarkers definition working group, 2001)) bylo nalezeno jen velmi málo (Gondek L.P. et al., 2008; Nimer S.D., 2008; Huang W.T. et al., 2009). Pomocí proteomických studií bylo nalezeno několik proteinů, jejichž koncentrace se signifikantně liší u pacientů s MDS v porovnání se zdravými dárci. Zhong et al. nalezli 4 proteiny se signifikantně rozdílnou expresí u MDS. Jednalo se o dipeptilpeptidase (DPP/CD26), polymerase kappa, human serum albumin a albumin-like protein (Zhong L.Y. et al., 2009). V práci Májka et al. bylo nalezeno 57 lišících se proteinů u MDS pacientů s podtypem refrakterní anémií s multilineární dysplázií (refractory anemia with multilineage dysplasia, RCMD). Z toho byly identifikovány complement C4-A, complement C4-B, inter-alfa-trypsin inhibitor heavy chain H4 a endorepelin (Májek P. et al., 2011). Dle Issaq et al. by mohly být potenciálními markery pro 5q-syndrom MDS inter-α trypsin inhibitor heavy chain H4 (fragment), serum transferrin, transthyretin a haemoglobin. Platelet factor 4 a protein odpovídající píku s m/z 8559 by mohl být marker asociovaný s terapií a sloužit pro monitorování léčby lenalidomidem (Issaq H.J. et al., 2002). Dále bylo pomocí ELISA metod nalezeno několik proteinů, jejichž koncentrace byla signifikantně snížená (Aivado M. et al., 2007) nebo zvýšená v plazmě pacientů s MDS (Ito Y. et al., 2002; Passam F.H. et al., 2004; Hu Q. et al., 2004 ; Salih H.R. et al., 2004). Hu et al. nalezli zvýšenou hladinu rozpustné formy receptoru 1 pro vaskulární endoteliální růstový faktor (soluble vascular endothelial growth factor receptor 1, sVEGFR-1) (Hu Q. et al., 2004). U pacientů s MDS byly nalezeny vyšší hladiny rozpustné formy intracelulární adhesní molekuly 1 (soluble intercellular adhesion molecule 1, sICAM-1) a rozpustné formy vaskulárního adhesního proteinu 1 (soluble vascular cell adhesion protein 1, sVCAM-1), hladiny těchto proteinů byly signifikantně zvýšené u podskupin MDS řazených dle IPSS do vysoce rizikových (RAEB I i

II, RAEB-T, a CMML) (Passam F.H. et al., 2004). Dále Hock et al. ukázali, že rozpustná forma T-lymfocyt aktivačního antigenu CD86 (T-lymphocyte activation antigen CD86, CD86) byla zvýšená u 25 % pacientů s AML a 27 % pacientů s MDS a souvisela s kratší dobou přežití (Hock B.D. et al., 2003). Aivado et al. identifikovali 2 proteiny (platelet factor 4, platelet basic protein 7), jejichž hladina v plazmě MDS pacientů byla výrazně snížená (Aivado M. et al., 2007). Jiné dva proteiny korelovaly s progresí MDS onemocnění. Vysoké hladiny rozpustné formy Tumor necrosis factor ligand superfamily member 9 a nízké hladiny rozpustné formy Tumor necrosis factor ligand superfamily member 6 v séru MDS pacientů by mohly představovat nové indikátory léčby a progrese onemocnění (Salih H.R. et al., 2004). Není zanedbatelné, že většina nalezených proteinů je součástí imunitních procesů v organizmu. Předpokládá se, že imunitní systém hraje roli v patogenezi časného MDS. Klonální expanze cytotoxických a pomocných T-lymfocytů může vést k potlačení normální hematopoézy. Bylo zjištěno, že imunosupresivní terapie vede u některých pacientů k pozitivní hematologické odpovědi, zvyšuje dobu přežití a pozastavuje progresi do AML (Olnes M.J. and Sloand E.M., 2011; Warlick E.D. and Miller J.S., 2011). Podobný charakter nalezených proteinů napovídá o možném mechanizmu hrajícím roli v patofyziologii MDS (Hock B.D. et al., 2003; Passam F.H. et al., 2004; Hu Q. et al., 2004 ; Salih H.R. et al., 2004 ; Aivado M. et al., 2007; Azimi-Nezhad M. et al., 2013).

2.3. PROTEIN-PROTEIN INTERAKCE

Protein-protein interakce jsou chápány jako fyzický a specifický kontakt mezi proteiny, který se vyskytuje v buňce nebo v živém organizmu (De Las Rivas J. and Fontanillo C., 2010). Jednotlivé proteiny v proteinovém komplexu spolu mohou být ve fyzickém kontaktu i přesto, že spolu přímo neinteragují. Tato funkční spojení by neměla být s fyzickými proteinovými interakcemi zaměňována. Protein-protein interakce rovněž nezahrnují spojení poškozených nebo částečně degradovaných proteinů. Proteinové interakce mohou být párové, např. interakce ligandu s jeho receptorem bez účasti jiných proteinů, ale také mohou vytvářet makromolekulární proteinové komplexy, jako je tomu např. u RNA polymerázových komplexů (Sardiu M.E. and Washburn M.P., 2011). Proteinové komplexy jsou definované jako soubor proteinů, které vytvářejí mnoho interakcí mezi sebou (Pereira-Leal J.B. et al., 2006). Některé proteinové interakce mohou být stabilní, např. u

makromolekulárních komplexů, které obsahují buněčné stroje (ATP synthasa, cytochromoxidasa). Jiné vznikají pouze dočasně k zajištění přechodných akcí, jako je např. vazba transkripčních faktorů u genové exprese.

Protein-protein interakce hrají klíčovou roli ve zprostředkovávání přenosu signálu, regulují aktivitu metabolických a signálních enzymů, přeměňují energii v pohyb a udržují buněčnou organizaci (Dress A. and Vingron M., 2008; Braun P. and Gingras A.C., 2012). Extracelulární signály jsou do buňky přenášeny několika možnými způsoby v závislosti na tom, jestli se jedná o rozpustné molekuly (cytokiny, hormony), buněčné interakce nebo interakce buněk s mezibuněčnou hmotou. Přenos signálu je zajišťován buď na úrovni interakce dvou proteinů (tzv. binární proteinové komplexy) nebo tvorbou složitých stabilních strukturálních a funkčních jednotek zvaných proteinové komplexy. Přenos signálu je kritický pro správné fungování buňky a porucha v signálních drahách se může stát příčinou k vývoji maligního klonu. To se týká především signálních kaskád vedoucích k přežití a proliferaci buněk (Frank D.A., 2003). Nedávno bylo poukázáno na to, že nejen vlastnosti jednotlivých proteinů, ale vztahy mezi proteiny v proteinovém komplexu jsou základními složkami biologických funkcí. Proteiny fungují v komplexu jako celek a porucha některého z proteinů v tomtéž komplexu vede k podobnému onemocnění (Zhao J. et al., 2013). U komplexních onemocnění, jako jsou nádorová, dochází k poruše regulace celé skupiny genů, tzv. funkčních modulů, které tvoří sítě s proteinovými komplexy a řídí chování nádoru (Liu K.Q. et al., 2012). Takové sítě jsou schopné se přeorganizovat a umožnit tak vývoj nového rezistentního klonu. Experimentální a teoretická data navrhují existenci takzvaných uzlů obsahujících klíčové proteiny (onkoproteiny a jiné), které jsou sdílené různými komplexními moduly a interakčními sítěmi. Jejich vzájemná komunikace, pak vede k reorganizaci modulu a tím regulaci nádorového bujení. Ovšem, jak nádorově specifické moduly a jejich sítě rozpoznají chování nádoru a jakým způsobem dochází k reorganizaci proteinů, není doposud známo (Papanikolaou N.A. and Papavassiliou A.G., 2008).

Proteinové komplexy mohou být podobně jako geny tkáňově specifické, ačkoliv proteomických dat z této oblasti stále není mnoho (Zhao J. et al., 2013). Je známo několik hlavních drah, které jsou v karcinogenezi zapojeny. Jedná se o tyrosinkinasové, WNT a RAS signální dráhy, dále pak beta signalizaci tumor růstového faktoru a signalizaci s cyklickým adenosinmonofosfátem, dráhy, v nichž jsou zapojeny růstové faktory a další. Hlavní dráhy by

mohly být rozděleny do čtyř fyziologických skupin: receptory na buněčném povrchu (např. adhezní molekuly), intracelulární signální kaskády, transkripční faktory a dráhy vedoucí ke spuštění programované buněčné smrti (Frank D.A., 2003).

Znalost funkce a vlastnosti alespoň jedné ze složek, se kterou protein interaguje, by nám mohl umožnit přiřazení funkce, příp. dráhy, které se účastní. Předpokládaná interakce v čase a místě závisí na několika parametrech, jako je typ buňky, fáze buněčného cyklu, vývojové stádium, modifikace proteinů (např. fosforylace), přítomnost kofaktorů a vazebných partnerů (De Las Rivas J. and Fontanillo C., 2010). Mapování proteinových interakcí tedy vyžaduje vytvoření proteinové interakční sítě, která popisuje jednak interakce daného proteinu s podskupinou jeho nejbližších interakčních partnerů v rámci proteinového komplexu nebo za různých biologických podmínek, ale také zachycuje všechny globální proteinové interakce v měřítku celého organizmu (Sardiu M.E. and Washburn M.P., 2011). Kompletní mapa proteinových interakcí se nazývá „interaktom“ (analogicky genom, proteom) (Cusick M.E. et al., 2005).

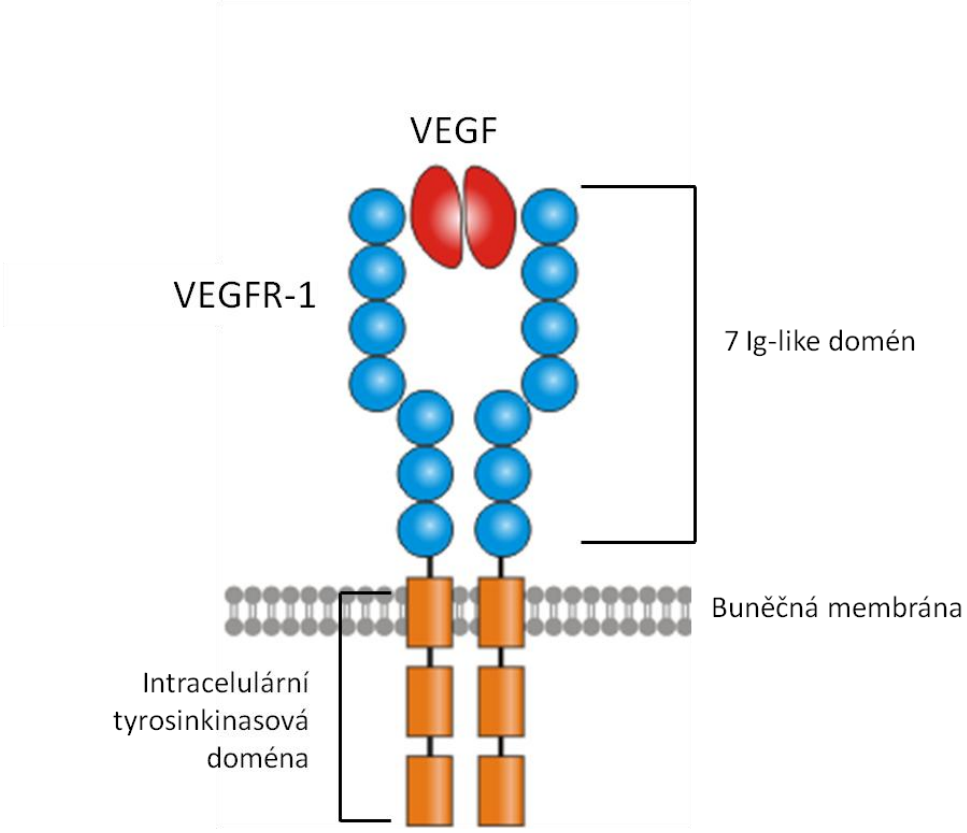
2.3.1. Přehled vybraných protein-protein interakcí

2.3.1.1. Vaskulární endoteliální růstový faktor a jeho receptory

Rodina vaskulárních endoteliálních růstových faktorů a jejich receptorů má roli ve vývoji, udržování a remodelaci cévní stěny (Mac Gabhann F. and Popel A.S., 2008). VEGF je exprimován jako odpověď na hypoxii a jiné podněty mnoha různými buňkami. Je kódován jedním genem, který má čtyři izoformy (121, 165, 189, 206 aminokyselin). První dvě formy (121 a 165 AK) jsou rozpustné faktory, zatímco druhé dvě (189 a 206 AK) jsou sice sekretované, ale zůstávají navázané na extracelulární povrch (Keyt B.A. et al., 1996).

VEGF interaguje s endotelem prostřednictvím dvou vysoce afinitních receptorů: VEGFR-1 - tyrosinkinasa (EC 2.7.10.1) (Obr. 8) a VEGFR-2 - receptor s kinasovou doménou (EC 2.7.10.1). VEGFR-1 obsahuje sedm extracelulárních imunoglobulinových (Ig) domén a jednu intracelulární tyrosinkinasovou doménu (Keyt B.A. et al., 1996). Tento transmembránový glykoprotein (125 kDa) je exprimován různými tkáněmi, ale nejvíce na endoteliálních buňkách. Exprese je zde podobně jako u VEGF indukována hypoxií (Neufeld

G. et al., 1999). Alternativní sestřih genu pro VEGFR-1 umožnil vznik rozpustné formy VEGFR-1 (Belgore F.M. et al., 2001). Vazba VEGF na jeho receptory indukuje dimerizaci receptorů a aktivuje tak intracelulární tyrosinkinasu. Zatímco vazba VEGF na VEGFR-2 spouští buněčnou proliferaci, vazba VEGF na VEGFR-1 bez účasti VEGFR-2 buněčnou proliferaci nespouští a to pravděpodobně v důsledku toho, že nedochází k aktivaci mitogenem aktivované proteinkinasy (Neufeld G. et al., 1999). Přenos signálu spuštěný vazbou VEGF na jeho receptory není zcela objasněn a předpokládá se, že VEGFR-1 a VEGFR-2 hrají rozdílnou roli v endoteliální buněčné migraci a proliferaci (Hu Q. et al., 2004).



Obr. 8: ***Interakce VEGF a VEGFR-1.***

2.3.1.2. Intercelulární a vaskulární adhezní molekuly a jejich ligandy

Buněčná vaskulární adhezní molekula (vascular cell adhesion protein 1, VCAM-1) a intercelulární adhezní molekula (Intercellular adhesion molecule 1, ICAM-1) patří do skupiny

imunoglobulinových adhezních molekul. Molekula ICAM-1 je transmembránový glykoprotein (90 kDa). Má pět extracelulárních Ig domén, přičemž doména 1 je kritická pro interakci proteinu ICAM-1 s jeho ligandem leukocytárním funkčním antigenem 1 (Leukocyte adhesion glykoprotein LFA-1, LFA-1). ICAM-1 je exprimována na endoteliálních, epiteliálních, fibroblastických, leukocytárních a mnoha nádorových buňkách. Exprese je indukována zánětlivými cytokiny (tkáňový faktor α, interleukin 1, interferon γ). LFA-1 je integrin, který se skládá ze dvou podjednotek: alfa (129 kDa), beta (85 kDa) a nachází se na povrchu leukocytů. Interakce ICAM-1/LFA-1 zprostředkovává migraci T-lymfocytů a také funguje jako kostimulační signál při aktivaci T-lymfocytů (Gearing A.J. and Newman W., 1993; Gomperts B.D. et al., 2002; Anderson M.E. and Siahaan T.J., 2003).

VCAM-1 je podobně jako ICAM-1 transmembránový glykoprotein (asi 100 kDa), který obsahuje sedm extracelulárních Ig domén. Je exprimován na endoteliálních, epiteliálních, dendritických buňkách a makrofázích po indukci zánětlivými cytokiny. Jeho ligandem je velmi pozdní antigen 4 (very late antigen, VLA-4). Jedná se o integrin o dvou podjednotkách: alfa 4 (155 kDa) a beta 1 (150 kDa), který je exprimován na mononukleárních buňkách. Interakce VCAM-1 s VLA-4 zprostředkovává migraci leukocytů (Gomperts B.D. et al., 2002; Yusuf-Makagiansar H. et al., 2002; Cook-Mills J.M. et al., 2011).

2.3.1.3. Aktivační antigeny T-lymfocytu a jejich receptory

Kostimulační signál pro aktivaci T-lymfocytů je zajišťován také interakcí specifického glykoproteinu CD28 (T-cell-specific surface glycoprotein CD28) (44 kDa) na povrchu T-lymfocytů s molekulou CD80 (T-lymphocyte activation antigen CD80) a CD86 (T-lymphocyte activation antigen CD86) na povrchu antigen prezentujících buněk. T-lymfocyt aktivační antigen CD86 je transmembránový glykoprotein (37 kDa) exprimovaný na povrchu antigen prezentujících buněk (B-lymfocyty, monocyty) a obsahuje dvě Ig domény. CD86 je ligandem jednak pro aktivační receptor CD28, který je nepřetržitě exprimován na plazmatické membráně, ale také je ligandem pro inhibiční receptor cytotoxický T-lymfocytární protein 4 (Cytotoxic T-lymphocyte protein 4, CTLA-4 nebo CD152). Výskyt CTLA-4 na T-lymfocytech je mnohem složitější, je exprimován pouze v dělících se buňkách a na povrch T-lymfocytu je vystaveno jen malé procento exprimovaného receptoru. Nicméně CTLA-4 má

asi stokrát vyšší afinitu k CD86 než CD28 (Sansom D.M. et al., 2003). Interakce CD86 a CTLA-4 zprostředkovává negativní signál pro T-lymfocyty a slouží tak jako regulátor imunitní odpovědi (Schwartz J.C. et al., 2001; Sorensen P. et al., 2004).

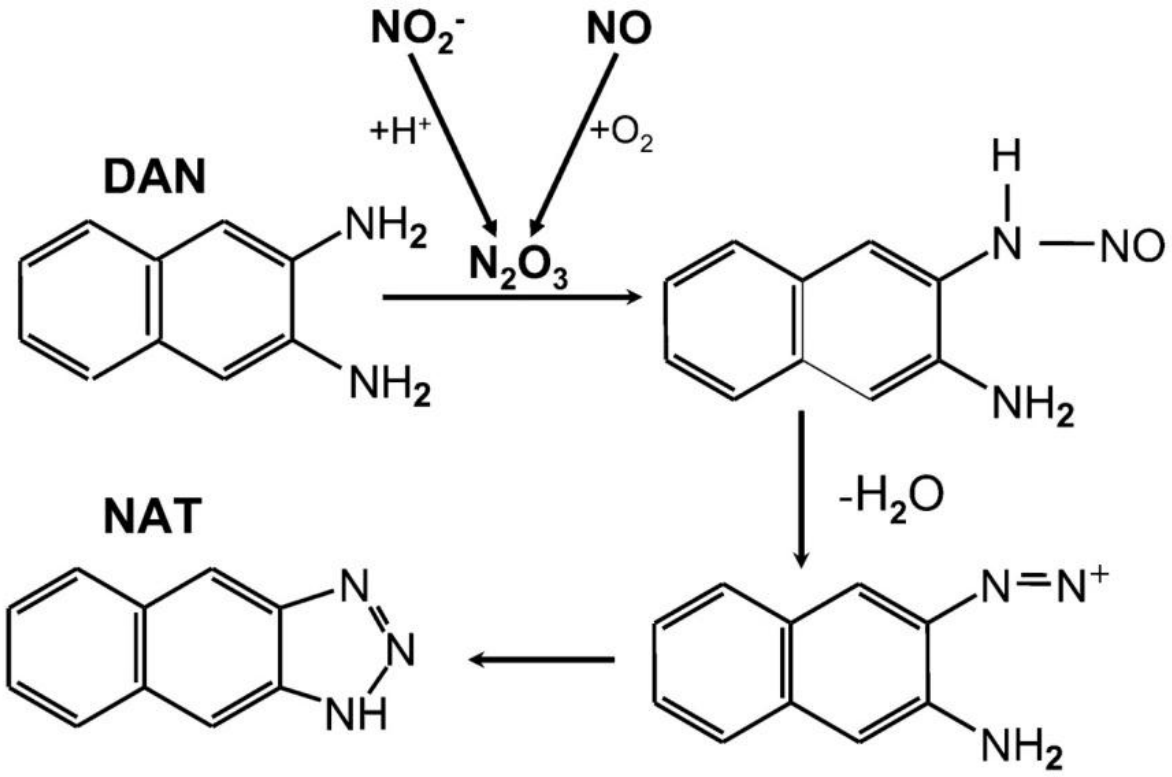
2.4. METODY STANOVENÍ OXIDAČNÍHO STATUSU V KREVNÍ PLAZMĚ

Pro stanovení oxidačního statusu v organizmu můžeme kvantifikovat volné radikály a ostatní ROS/RNS, stanovit markery oxidačního poškození (modifikace proteinů, vedlejší produkty lipidové peroxidace), anebo určit koncentraci látek antioxidačního obranného systému. Pro stanovení jednotlivých oxidačních produktů existuje mnoho metod, které se liší specifičností, citlivostí, přípravou vzorku atd. Práce představuje nejčastěji používané metody pro stanovení daných oxidačních produktů v krevní plazmě.

Pro stanovení volných radikálů je hojně využívána metoda spektroskopie elektronové paramagnetické rezonance (EPR) (Mrakic-Sposta S. et al., 2012). EPR spektroskopie je založena na absorpci mikrovlnného záření nepárovými elektrony za přítomnosti silných magnetických polí. Tím je umožněno studovat volné radikály, např. hydroxylové, superoxidové, nitroxidové. V případě, že se jedná o relativně stabilní radikály, je možné jejich přímé měření (Vasquez-Vivar J. et al., 1996; Mrakic-Sposta S. et al., 2012). U nestabilních radikálů s krátkou dobou života se používá metoda spinového záchytu („Spin Trapping“). Radikály reagují s nitrososloučeninami a tím se převedou na stabilní radikály (Vasquez-Vivar J. et al., 1999). Pro stanovení superoxidového radikálu, peroxidu vodíku, hydroxylového radikálu, oxidu dusnatého a dalších je hojně využívána také metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie (high-performance liquid chromatography, HPLC) s elektrochemickou detekcí (HPLC-ECD) (Glód B.K. and Kowalski C., 2004). Jiné metody využívají reakci oxidačních látek s různými molekulami a k detekci se využijí jejich barevné nebo fluoreskující produkty. Např. superoxidový radikál redukuje cytochrom *c*, superoxidový radikál oxiduje hydroxyethidin nebo inhibuje akonitasovou aktivitu (Kuthan H. et al., 1982). Peroxid vodíku redukuje dihydrodichlorofluorescein nebo reaguje za vzniku chemiluminiscenčních produktů (Rhee S.G. et al., 2010). Hydroxylový radikál reaguje s aromatickými sloučeninami nebo s kyselinou salicylovou za vzniku 2,3- a 2,5-

dihydroxybenzoové kyseliny, která může být snadno stanovena pomocí HPLC-ECD (Kohen R. and Nyska A., 2002; Banerjee R., 2008).

Oxid dusnatý může být stanoven přímo chemiluminiscenční metodou, elektrochemicky, pomocí EPR nebo nepřímo Griessovou metodou, fluorescenční detekcí, chemiluminiscenční reakcí NO s luminolem, oxidací hemoglobinu a dalšími metodami (Bryan N.S. and Grisham M.B., 2007). Oxid dusnatý je nestálým radikálem s krátkým poločasem rozpadu. Podléhá snadno oxidaci, reaguje se železem hemoglobinu, případně se superoxidovým radikálem za vzniku peroxodusitanu. Peroxodusitan se může stanovit přímo spektrofotometricky (302 nm), ačkoliv tato metoda není příliš citlivá a specifická, anebo nepřímo detekcí 3-nitrotyrosinů (Acworth I.N., 2003). Peroxodusitan se rozkládá na hydroxylový radikál a oxid dusičitý, který je rychle přeměněn na dusičnan. Stanovení dusitanů i dusičnanů tudíž také odráží koncentraci oxidu dusnatého v organizmu (Glód B.K. and Kowalski C., 2004; Kupková Z. and Beneš L., 2004). Dusitany mohou být detegovány fluorescenčně po derivatizaci různými aromatickými diaminy, např. 2,3-diaminonaftalenem (DAN) (Obr. 9) či 4,5-diaminofluoresceinem (DAF-2), které v přítomnosti kyslíku reagují s NO za vzniku triazolů (Kupková Z. and Beneš L., 2004) a dále spektroskopicky, elektrochemicky nebo po separaci pomocí kapilární elektroforézy UV detekcí (Davies C.A. et al., 1999).



Obr. 9: ***Schéma derivatizace dusitanů 2,3 – diaminonaftalenem.*** *Obrázek byl upraven dle Tarpey et al. (Tarpey M.M. et al., 2004).*

Antioxidační status organizmu charakterizuje aktivita antioxidačních enzymů a koncentrace neenzymových antioxidačních látek. Aktivitu antioxidačních enzymů je možno stanovit pomocí spektroskopických metod nebo imunohistochemických metod. Aktivita enzymů vypovídá o předchozí expozici oxidačním látkám jen částečně, neboť ji na jednu stranu stimulují, ale na druhou můžou enzymy poškozovat a tak inaktivovat, navíc aktivita enzymů je v těle regulována. Tudíž stanovení nízkomolekulárních antioxidačních látek (NAL) lépe odráží stav ROS a RNS v organizmu. Pro detekci NAL se používají metody biochemické, imunohistologické, spektroskopické a elektrochemické. Velmi účinné je stanovení celkového statusu NAL, protože NAL pracují jako celek. Existuje mnoho metod pro měření NAL. Přímé metody jsou takové, které využívají externích sond k měření redukční nebo oxidační kapacity systému. Jsou to metody chemické a elektrochemické (např. voltametrie) (Kohen R. and Nyska A., 2002; Pohanka M. et al., 2012). Nepřímé metody měří redoxní kapacitu, tj. oxidační produkty nebo koncentraci hlavních redoxních párů (GSH/GSSG, NADH/NAD^+, askorbová kyselina/askorbát) za využití fluorescenčních nebo

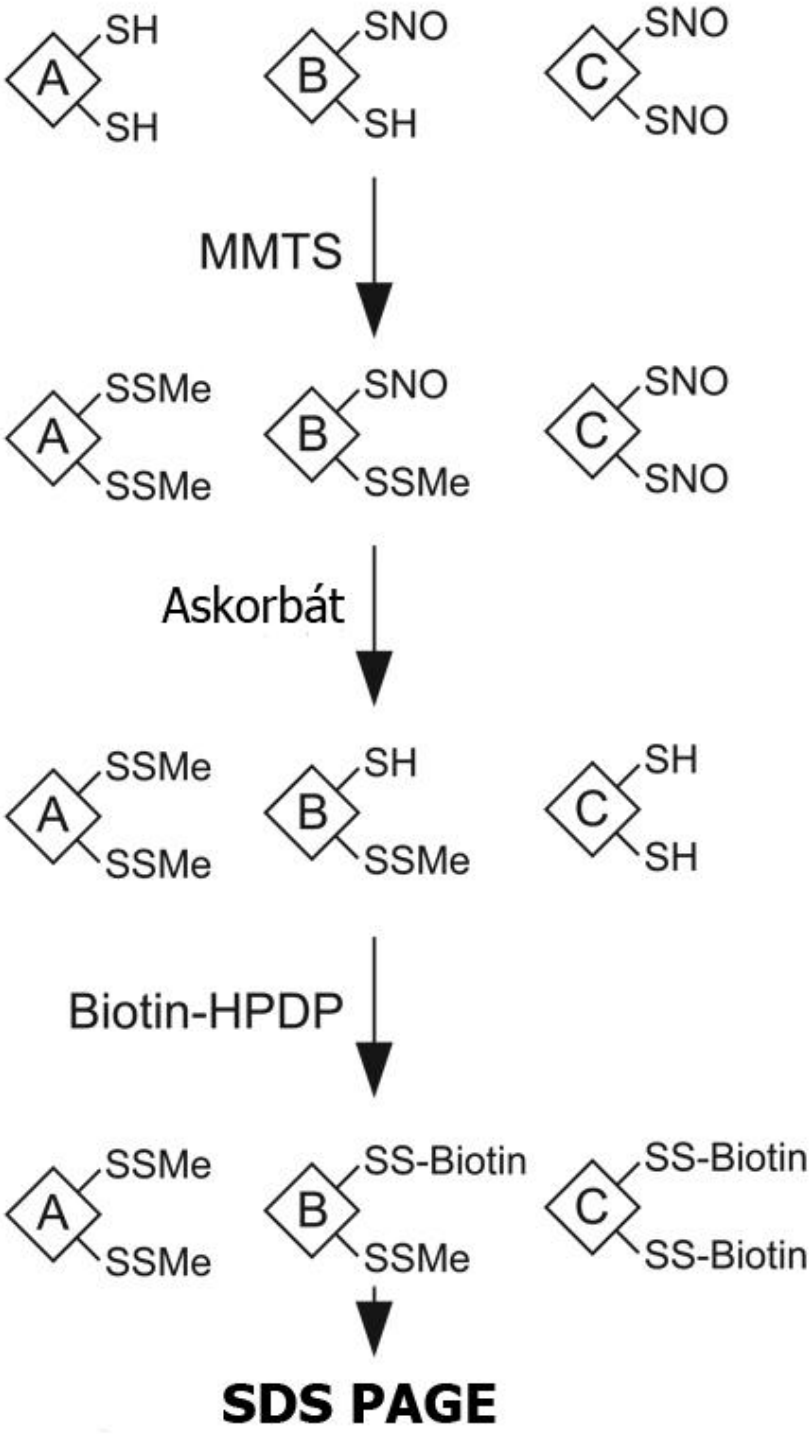
spektrofotometrických metod. Thioly a disulfidy mohou být stanoveny spektrofotometricky, kolorimetricky, enzymaticky a za použití HPLC technik (Nolin T.D. et al., 2007).

Malondialdehyd a 4-hydroxynonenal jsou nejvíce studovanými markery lipidové peroxidace a bylo vyvinuto mnoho technik pro jejich stanovení. Nejčastěji je využívaná nepřímá metoda s předchozí derivatizací malondialdehydu thiobarbiturovou kyselinou s následnou HPLC-UV detekcí (Suttnar J. et al., 2001).

Koncentrace karbonylovaných sloučenin v organizmu odráží míru oxidačního poškození proteinů. Obecně techniky navržené pro detekci oxidačně modifikovaných molekul využívají přímé imunologické detekce (nitrotyrosiny) nebo detekce po derivatizaci (karbonyly). Nejběžněji používanou metodou pro identifikaci karbonylovaných proteinů je metoda využívající hydrazidovou chemii. Hydrazidy specificky reagují s karbonyly za vzniku kovalentní Schiffovy báze, která může být dále stabilizována redukcí kyanoborohydridem. Takto označené proteiny mohou být následně detegovány spektrofotometricky, imunochemickými metodami nebo po separaci s následnou detekcí pomocí UV detektoru nebo hmotnostní spektrometrie (mass spectrometry, MS) (HPLC-UV, HPLC-MS) (Harris M.E. et al., 1994; Levine R.L. et al., 1994; Winterbourn C.C. and Buss I.H., 1999). Pro identifikaci karbonylovaných proteinů jsou hojně využívané elektroforetické separační techniky s následnou detekcí pomocí hmotnostní spektrometrie (Yan L.J. et al., 1998; Oh-Ishi M. et al., 2003; Mirzaei H. and Regnier F., 2005). Také je vhodné využití purifikačních a deplečních technik na odstranění velkých a nejhojněji zastoupených proteinů, které by mohly zastínit detekci méně zastoupených proteinů.

Existuje několik metod pro stanovení S-nitrosothiolů, jako jsou přímá spektroskopie, infračervená spektroskopie, chemiluminiscence, voltametrie, EPR uvolněného oxidu dusnatého, dále pak separační techniky s následnou detekcí: kapilární zónová elektroforéza (CZE) s UV detekcí, HPLC-UV po derivatizaci, HPLC-ECD, plynová chromatografie, kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií (liquid chromatography – mass spektrometry, LC-MS) a další. Většina vyvinutých technik využívá přeměny S-nitroso-skupiny na dusitany (např. účinkem $HgCl_2$) s následnou kvantifikací dusitanů (Gow A.J. et al., 2002; Hoffmann J. et al., 2003; Ramachandran A. et al., 2004). Obecně je detekce a identifikace S-nitrosylovaných proteinů v organizmu díky nestabilitě -S-NO vazby velmi náročná. S-nitroso- vazba se rozkládá na světle, v přítomnosti kovů a antioxidantů (Singh R.J.

et al., 1996; Smith J.N. and Dasgupta T.P., 2000). Přelomem pro subproteomiku RSNO byla metoda vyvinutá Jaffrey et al. zvaná „Biotin Switch Technique“ (BST) (Jaffrey S.R. et al., 2001). Metoda je založená na selektivním označení S-nitrosoproteinů pomocí biotinu, má 3 hlavní kroky: zablokování volných thiolových skupin, redukce -S-N vazby, označení nově vzniklých thiolových skupin biotinylačním činidlem. Spojení BST metody s proteomickými metodami (dvourozměrná elektroforéza, kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií) umožňuje identifikaci S-nitrosylovaných proteinů. Nicméně tato metoda vyžaduje souběžné provádění negativní kontroly pro specifickou identifikaci pouze S-nitrosylovaných proteinů. Princip metody je znázorněn na obrázku (Obr. 10).



Obr. 10: ***Princip biotin switch metody.*** *Volné –SH skupiny jsou nejprve zablokovány methylmethanthiosulfonátem (MMTS), S-nitrosylované skupiny jsou redukovány askorbátem a označeny biotinem-HPDP. Označené proteiny jsou izolovány pomocí avidinových agarózových kuliček a rozděleny pomocí SDS-polyakrylamidové gelové elektroforézy (SDS PAGE). Upraveno dle Forrester et al. (Forrester M.T. et al., 2009).*

2.5. METODY STUDIA PROTEIN-PROTEIN INTERAKCÍ

Protein-protein interakce mohou být studovány množstvím fyzikálních, biochemických, genetických metod. Některé jsou vhodné pro detekci binárních komplexů, jiné jsou schopné studovat multikomplexy, dále se liší aplikací, specifičností, citlivostí, množstvím analyzovaných vzorků, typem charakterizace (identifikace, strukturální a biologická identifikace, kinetika – vazebné a afinitní konstanty) a dalšími. Tabulka (Tab. 3) uvádí přehled nejčastěji používaných metod pro detekci protein-protein interakcí včetně některých jejich vlastností a výhod/nevýhod. Mnohé z nich, které byly dříve využívány pouze ke studiu charakteristik a kinetiky interakcí, mohou dnes díky hmotnostní spektrometrii sloužit také k identifikaci interagujících proteinů (např. metoda rezonance povrchového plazmonu (surface plasmon resonance, SPR)) (Phizicky E.M. and Fields S., 1995; Berggard T. et al., 2007; Shoemaker B.A. and Panchenko A.R., 2007).

Tab. 3
Přehled nejpoužívanějších metod pro detekci protein-protein interakcí (Shoemaker B.A. and Panchenko A.R., 2007).

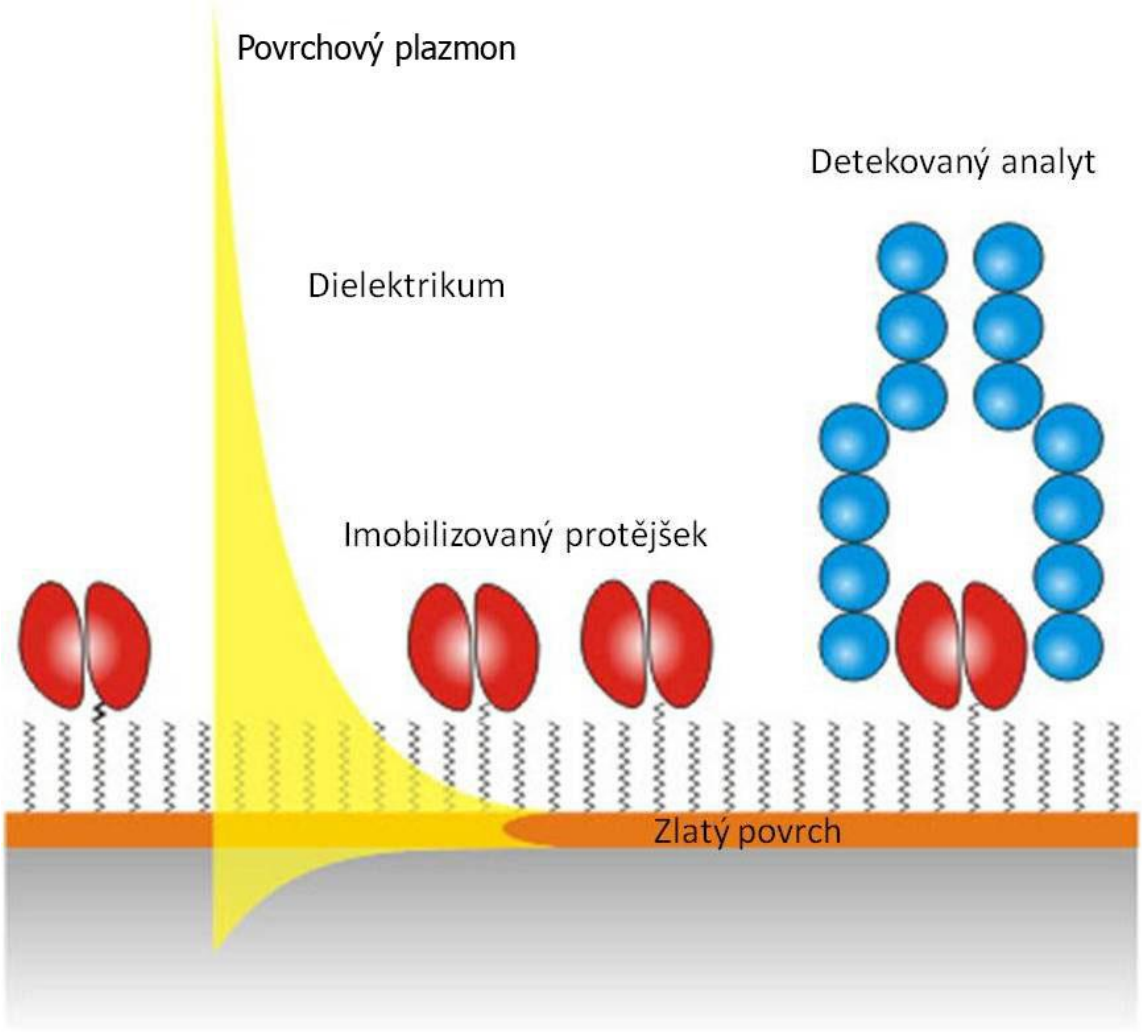
Metoda	Typ interakce	Využití
Y2H	fyzické interakce - binární	identifikace
Afinitní purifikace	fyzické interakce - komplex	identifikace
Genová koexprese	funkční asociace	identifikace
Proteinové čipy	fyzické interakce - komplex	identifikace
Fágový displej	fyzické interakce - komplex	identifikace
Rentgenová krystalografie	fyzické interakce - komplex	strukturální a biologická charakterizace
NMR spektroskopie	fyzické interakce - komplex	strukturální a biologická charakterizace
FRET	fyzické interakce - binární	biologická charakterizace
SPR	fyzické interakce - komplex	dynamická charakterizace
Elektronová mikroskopie	fyzické interakce - komplex	strukturální a biologická charakterizace
AFM	fyzické interakce - binární	mechanická, dynamická charakterizace

Y2H – kvasničný dvojhybridní systém, NMR - nukleární magnetická rezonance, FRET - přenos rezonance fluorescenční energie, SPR - rezonance povrchového plazmonu, AFM - mikroskopie atomárních sil.

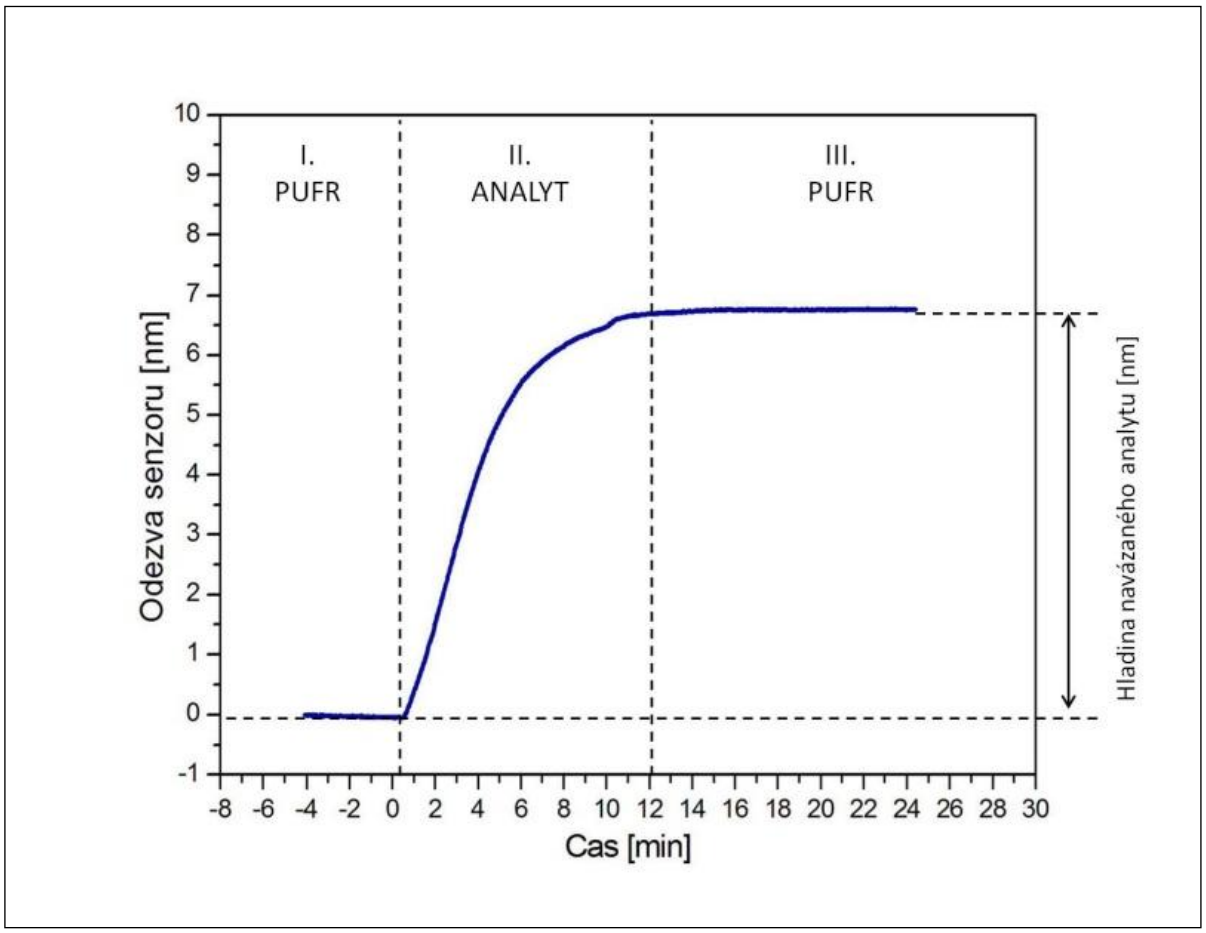
Rezonance povrchového plazmonu (surface plasmon resonance, SPR)

Metoda rezonance povrchového plazmonu přitáhla během posledních dvou dekád mnoho pozornosti a dnes je to jeden z hlavních nástrojů pro charakterizaci a kvantifikaci biomolekulárních interakcí. SPR biosenzory jsou optické senzory využívající speciálních elektromagnetických vln (povrchových plazmonů) ke studiu interakcí mezi analytem v roztoku a rozpoznaným biomolekulárním prvkem imobilizovaným na povrchu SPR senzoru. Povrchový plazmon poprvé pozoroval Wood v roce 1902. Později v 70. letech to byly práce Otta, Kretschmanna a Raethera, díky nimž se stala metoda excitace povrchového plazmonu součástí moderní optiky (Homola J., 2003; Homola J., 2008).

Princip SPR metody je založen na měření malých změn indexu lomu média v těsné blízkosti vhodného kovového (nejčastěji Au) povrchu senzoru. Tyto změny mohou být způsobeny navázáním analytu na jeho biospecifického partnera ukotveného na povrchu senzoru. Povrchový plazmon je excitován na rozhraní mezi tenkou vrstvou kovu a dielektrikem a je šířen podél tohoto rozhraní. Jednou z charakteristik povrchového plazmonu je konstanta šíření, kterou ovlivňují změny indexu lomu vznikající mimo jiné vazbou analytu na jeho specifické protějšky na povrchu (princip detekce je znázorněn na obrázku (Obr. 11)) (Homola J., 2003). Typický SPR senzogram znázorňuje obrázek (Obr. 12).



Obr. 11: ***Princip SPR.*** *Povrchový plazmon excitovaný na rozhraní mezi dielektrikem a tenkou vrstvou kovu funkcionalizovaného alkenthioly s imobilizovaným protějškem (VEGF-A), na nějž se váže detekovaný analyt - receptor (VEGFR-1).*



Obr. 12: ***Typický SPR senzogram****. Křivka na obrázku znázorňující odezvu senzoru má tři části: stabilizovaný signál pozadí po injekci pufru (I.), II. část křivky odpovídá monitorování tvorby komplexu vloženého analytu s imobilizovaným protějškem, část III. opět injekce pufru pro detekci případné disociace komplexu a hladiny stabilně navázaného analytu.*

SPR senzory, ve kterých dochází k excitaci povrchového plazmonu oslabeným totálním odrazem (atenuated total refraction, ATR) na hranolu, nejčastěji využívají modulaci úhlu, vlnové délky nebo intenzity. U senzorů s modulací vlnové délky, kdy je povrchový plazmon excitován svazkem polychromatického světla. Konstanta šíření a její změny je určena měřením intenzity odraženého světla o různých vlnových délkách spektrometrem. Pro detekci více analytů souběžně je senzor uspořádán do paralelních kanálů, v nichž je možno sledovat SPR změny v každém kanále zvlášť za využití více spektrografů (Piliarik M. et al., 2009). Velkým přínosem pro detekci více analytů souběžně pomocí SPR je SPR zobrazování (SPR imaging). Tato SPR metoda je založena na modulaci intenzity, kdy monochromatické

polarizované světlo prochází přes hranol a excituje povrchový plazmon na kovové vrstvě. Prostorově rozmístěnou intenzitu odraženého světla je možné určit CCD (z angl. charged-coupled device) kamerou jako 2D pole (Thirstrup C. et al., 2004). Takové uspořádání je pak možné využít pro tvorbu čipu (2D pole receptorů) umožňující detekci až stovek analytů v jediném experimentu (Piliarik M. et al., 2005).

Detekce pomocí SPR metody využívá několik formátů měření. Nejběžněji používané jsou přímá detekce, sandwichová esej a inhibiční esej. Při přímé detekci interaguje analyt přímo se svým protějškem (např. protilátka, receptor) imobilizovaným na povrchu (Homola J., 2003). Existuje několik imobilizačních technik pro ukotvení požadovaného protějšku na povrch čipu. Využívá se fyzikálně-chemických interakcí (chemisorpce) (Nuzzo R.G. and Allara D.L., 1983), kovalentních vazeb (Lahiri J. et al., 1999; Wang H. et al., 2005), hydrofobních a elektrostatických interakcí a vysoce afinitních biomolekulárních systémů (např. streptavidin-biotin, proteiny A a G) (Busse S. et al., 2002; Lee J.M. et al., 2007). Nejčastěji je využívaná samoskladná monovrstva alkenthiolů zakončených funkčními skupinami (např. karboxylovými), které reagují s funkčními skupinami imobilizovaných molekul za vzniku kovalentních vazeb (Jung L.S. et al., 2000).

SPR metoda má mnoho výhod pro detekci protein-protein interakcí. Jednou z nich je, že je to metoda přímá a nepotřebuje k detekci jakékoliv značení (radioaktivní, fluorescenční). Je tedy možno přímo sledovat interakci proteinů, množství vázajícího se proteinu, a jeho stabilitu. Další výhodou je univerzálnost. Analyt nemusí vykazovat nějaké specifické vlastnosti (fluorescence). Je možné sledovat binární interakce, ale i tvorbu složitých komplexů. Metoda je rychlá a tvorbu komplexu je možno sledovat v reálném čase. To pak umožňuje charakterizovat interakci pomocí kinetických křivek a afinitních konstant. Je zde také několik nevýhod, jako jsou nespecifické interakce zkříženě reaktivních molekul s imobilizovaným protějškem a interferující pozadí vznikající nespecifickou interakcí s povrchem (Homola J., 2003).

3. HYPOTÉZY A CÍLE PRÁCE

Hypotéza 1:

Oxidační stres u MDS pacientů nevzniká pouze v důsledku zvýšené hladiny volného železa v plazmě MDS pacientů.

Cíle práce:

Stanovit parametry oxidačního stresu u MDS a posoudit jejich souvislost s léčbou a hladinami železa a feritinu.

Stanovit mediátory a produkty oxidačního stresu (NO, MDA, ADMA) a molekuly účastnící se antioxidační obrany (GSH, cystein, homocystein, cysteinylglycin) u souboru pacientů rozdělených dle WHO za použití HPLC a kapilární elektroforézy a posoudit jejich souvislost s léčbou a hladinami železa a feritinu.

Hypotéza 2:

Oxidační stres je důležitou příčinou změn proteomu u MDS.

Cíle práce:

1. Charakterizovat posttranslační modifikace proteinů u MDS pacientů.

Stanovit produkty proteolýzy proteinů obsahujících methylované arginylové zbytky (methylované deriváty argininu) a posoudit jejich vztah k oxidačnímu stresu a jejich korelaci s hladinami železa a feritinu. Sledovat S-nitrosylace proteinů v plazmě MDS pacientů a navrhnout možné karbonylace proteinů v souvislosti s MDS onemocněním. Spektrofotometricky stanovit koncentraci modifikovaných proteinů u MDS pacientů. Porovnat modifikované proteiny v plazmě MDS a zdravých dárců za použití metod SDS

PAGE a Western blottingu a nalezené rozdílné proteiny identifikovat pomocí nanoHPLC-MS/MS.

2. Popsat plazmatické proteiny účastnící se patofyziologických procesů u MDS.

Na základě publikovaných dat vytipovat proteiny, které se nacházejí ve zvýšené koncentraci v plazmě MDS pacientů a jejichž exprese může být indukována oxidačním stresem. Pomocí optických metod (SPR) sledovat případnou tvorbu/rozpad komplexů těchto proteinů u MDS a identifikovat proteiny v nově vznikajících komplexech pomocí nanoHPLC-MS/MS.

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1. MATERIÁLY

4.1.1. Plazma MDS pacientů

Krev MDS pacientů a zdravých dárců byla odebrána venepunkcí do zkumavek EDTA K_2 (Sarstedt, Praha, ČR). Plazma byla získána centrifugací takto odebrané krve (4 000 g, 10 min, 4 °C). Sérum MDS pacientů a zdravých dárců bylo získáno z krve odebrané do zkumavek bez antikoagulačního činidla, která byla po 30 minutách stočena (2 000 g, 20 min, 4 °C). Vzorky krve byly sbírány během několika let od pacientů s MDS diagnostikovaných na Ústavu hematologie a krevní transfuze v Praze. Všechny vzorky byly získány v souladu s etickou komisí na Ústavu hematologie a krevní transfuze. Vzorky MDS pacientů byly získány vždy v době stanovení diagnózy.

4.1.2. Rekombinantní proteiny

V práci byly použity následující lidské rekombinantní proteiny: VEGF-A a VEGF Recptor-1/Fc chimera Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), ICAM-1, VCAM-1 a CD86 Novoprotein Scientific (Summit, NJ, USA), VLA-4 a LFA-1 BIOMEDICA CS, s.r.o (Praha, ČR), CD152 byl dodán firmou GenWay Biotech. Inc (San Diego, CA, USA).

4.1.3. Chemikálie

Chemikálie dodané firmou Biacore (Uppsala, Švédsko): Amine Coupling Kit: Ethanolamin hydrochlorid (EA), 3-(ethyliminomethylideneamino)-N,N-dimethylpropan-1-amin (EDC) a 1-hydroxypyrolidin-2,5-dion (NHS).

Chemikálie dodané firmou Fluka (Buchs, Švýcarsko): kyselina mravenčí, dusitan draselný, dusičnan draselný, octan amonný, S-methylmethanthiosulfonát (MMTS), tris-(hydroxymethyl)-aminomethan-hydrochlorid (Tris-HCl).

Chemikálie dodané firmou Kulich (Hradec Králové, Česká republika): aceton, glycin, hydroxid sodný.

Chemikálie dodané firmou Lach-ner (Brno, Česká republika): dihydrogenfosforečnan draselný, ethylendiamintetraacetát disodný (EDTA), hydrogenfosforečnan disodný dodekahydrát, hydrogenuhličitan sodný, chlorid sodný, kyselina chlorovodíková, síran amonný, síran železnatý heptahydrát.

Chemikálie dodané firmou Prochimia (Gdansk, Polsko): 11-merkapto-tetra(ethyleneglykol) undekanol ($HSC_{11}(EG)_4OH$), 16-merkapto-hexa(ethyleneglykol)hexa-dekanová kyselina ($HSC_{11}(EG)_6OCH_2COOH$).

Chemikálie dodané firmou Penta (Praha, Česká republika): hydrogenuhličitan amonný, kyselina fosforečná, kyselina octová, tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS-base).

Chemikálie dodané firmou Promega (Madison, USA): trypsin.

Chemikálie dodané firmou Serva (New York, USA): akrylamid, Serva Blue G, dodecylsulfát sodný (SDS), *N*-(2-hydroxyethyl)piperazin-*N*′-2-ethansulfonová kyselina (HEPES), kyselina trichloroctová (TCA), *N*,*N*,*N*′,*N*′-tetramethyl-ethylendiamin (TEMED), Serva Unstained SDS PAGE Protein Marker (6,5-200 kDa), Tween 20.

Chemikálie dodané firmou Sigma-Aldrich (Praha, Česká republika): acetonitril (ACN), arginin, 2,6-bis-(*terc*.butyl)-4-methylfenol (BHT), amonium persulfát, amonium-7-fluorobenzofurazan-4-sulfonát (SBDF), 5-brom-4-chlor-3-indolylfosfát (draselná sůl) (BCIP), 2,3-diaminonaftalen (DAN), 2,9-dimethyl-1,10-fenantrolin hydrochloridu (neokuproin), *N*,*N*-dimethylformamid (DMF), 2,4-dinitrofenylhydrazin (DNPH), 1,4-dithiothreitol (DTT), chlorid hořečnatý, ethanol, ethanolamin (EA), ethylester kyseliny octové, glycerol, guanidin hydrochlorid, hovězí sérový albumin (bovine serum albumin, BSA), hydroxid amonný, chlorid draselný, jodacetamid (IAA), kyselina boritá, kyselina L-askorbová (vitamin C), kyselina 2-thiobarbiturová (TBA), methanol, L-citrulin, L-homoarginin hydrochlorid, monoklonální anti-DNP protilátka konjugovaná s alkalickou fosfatasou, N^G,N^G-dimethylarginin dihydrochlorid (ADMA), sůl N^G,$N^{G\prime}$-dimethyl-L-arginin-di(p-hydroxyazobenzene-p′-sulfonátu) (SDMA), N^G-methyl-L-arginin acetátová sůl (MMA), *N*,*N*′-methylen-bis(akrylamid), nitro blue tetrazolium chlorid (NBT), salicylát sodný,

tetradecyltrimethylammonium bromid, 1,1,3,3-tetraethoxypropan (TEP), triethylamin, Triton X-100, tris(2-karboxyethylfosfin), trypsin TPCK.

Ve všech experimentech byla používána dvakrát destilovaná a deionizovaná voda Milli-Q50 (Millipore, Prague, Czech Republic), dále označována jako „voda“. Všechny ostatní chemikálie byly analyticky čisté.

4.2. PŘÍSTROJE

Analyzátor krevních částic: Coulter Counter Onyx, Coultronix (Montpellier, Francie).

Spektrofotometr: UV-2401 PC Schimadzu (Praha, ČR).

Imunodepleční kolony: Kolona MARS Human 14 (Hu-14) a kolona MARS Human 6 (Hu-6) Agilent (Praha, ČR).

Hmotnostní spektrometrie: Hmotnostní spektrometr HCT ultra, ESI Nano Sprayer, Bruker Daltonics (Brémy, Německo), NanoLC systém UltiMate 3000, Dionex (Sunnyvale, CA, USA), kolony: 300 μm ID/0,5 cm C18 PepMap 100 předkolona a 75 μm ID/15 cm C18 PepMap 100 analytická kolona, Dionex (Sunnyvale, CA, USA).

Hmotnostní spektrometr TripleTOF 5600, nanoSpray III, AB Sciex (Framingham, MA, USA), ULTIMATE 3000 RSLCnano systems, Thermo Scientific (Waltham, MA, USA), kolony: Acclaim PepMan 100 kolona (5 μm, 2 cm x 100 μm) a Acclaim PepMan 100 analytická kolona (3 μm, 15 cm x 75 μm), Thermo Scientific (Waltham, MA, USA).

Hmotnostní spektrometr QTRAP 4000, elektrosprej (ESI), AB Sciex (Framingham, MA, USA), kolony: Phenomenex 100 x 2 mm Luna 3 μm Silica (2) 100 A (Torrance, CA, USA).

HPLC aparatura: HPLC aparatura, Shimadzu (Kyoto, Japan), kolony: LUNA C18 (150 x 3 mm, 5 μm) a 5 μm reversed-phase C18 Gemini NX column (150 x 2 mm), Phenomenex (Torrance, CA, USA).

Western blotting: Zdroj MP-3500-250P, Major Science (Pan-Chiao City, Tchaj-wan), Aparatura Thermo Scientific Owl HEP-1, OWL Separation Systems (Portmouth, USA).

Kapilární elektroforéza: Kapilární elektroforéza, Beckman Coulter (Fullerton, CA, USA), Kazeta na výměnu silných aniontů, Phenomenex (Torrance, CA, USA).

SPR senzory: SPR spektroskopie a SPR zobrazování byly vyvinuty na Oddělení optických senzorů, Ústav fotoniky a elektroniky, Akademie věd.

Zařízení pro kontaktní depozici: Microarrayer OmniGrid, Digilab, Inc. (Marlborough, MA, USA).

4.3. METODY

4.3.1. Deplece

Pro depleci plazmy byla použita kolona Mars Hu-14 4,6 x 100 mm odstraňující 14 nejhojněji zastoupených proteinů v lidské krevní plazmě o kapacitě 40 µl krevní plazmy pro analýzu. Byl použit protokol od firmy Agilent. Byly získány dvě frakce: frakce 1 vytékala v pufru A (pH 7,4) a obsahovala málo zastoupené proteiny krevní plazmy, zatímco frakce 2 obsahovala vysoce zastoupené proteiny uvolněné z kolony kyselým pufrem B (pH 2,5). První frakce byla převedena do fosfátového pufru PBS (phosphate buffer saline) (138 mM NaCl, 1,5 mM KH_2PO_4, 2,7 mM KCl, 8,1 mM $Na_2HPO_4.12H_2O$, pH 7,4) pufru, zahuštěna na centrifugačních Amicon filtrech s póry (3 kDa) (Millipore, Praha, Česká republika) na koncentraci odpovídající neředěné plazmě a skladována při -80 °C do doby použití.

4.3.2. Izolace krevních destiček

Po odběru krve do EDTA byla krev odstředěna (250 g, 15 min, 37 ºC). Horní vrstva, plazma bohatá na destičky (plasma rich platelets, PRP), byla stažena do nové zkumavky. Všechny roztoky pro izolaci destiček byly vytemperovány na 37 ºC. Z PRP bylo po řádném promíchání odebráno 400 µl pro stanovení počtu krevních destiček. PRP byla odstředěna (1 000 g, 10 min, 37 ºC). Po stažení plazmy chudé na destičky (plasma poor platelets, PPP)

byla peleta destiček opatrně resuspendována v roztoku PBS s 4 mM EDTA (PBS-E). Objem PBS-E odpovídal objemu před odebráním PPP. Po promytí byly destičky odstředěny (600 g, 10 min, 37 ºC). Peleta destiček byla resuspendována opět v PBS-E, na konečnou koncentraci 200 000/µl.

4.3.3. Stanovení dusitanů

Dusitany byly stanoveny po derivatizaci 2,3-diaminonaftalenem pomocí HPLC s fluorescenční detekcí podle Woitzik et al. a Jobgen et al. (Woitzik J. et al., 2001; Jobgen W.S. et al., 2007).

4.3.3.1. Příprava vzorků

EDTA plazma nebo sérum MDS pacientů byla 10x naředěna (á 50 µl plazmy/séra + 450 µl Q-vody), zcentrifugována (17 000 g, 4 min). 200 µl supernatantu bylo inkubováno při 25 °C s 20 µl 316 mM DAN (v 0,62 M HCl) po dobu 10 min ve tmě. Reakce byla zastavena přidáním 8 µl triethylaminu. Kalibrační řada připravená ředěním 10 µM vodného roztoku KNO_2 v rozsahu (0 – 625 nM) byla derivatizována stejně. Reakční směs byla deproteinizována smícháním s acetonitrilem (1:1) a centrifugována (17 000 g, 4 min). Supernatant byl přefiltrován přes 0,2 µm celulózové filtry National Scientific (Rockwood, TN, USA).

4.3.3.2. Chromatografické podmínky

Mobilní fáze byla 30% ACN v 30 mM H_3PO_4 (pH upraveno triethylaminem na hodnotu 8) smícháno v poměru 3:7 (v/v). Mobilní fáze byla přefiltrována přes nylonový filtr. 10 µl vzorku bylo aplikováno na kolonu Luna C18 (150 x 3 mm, 5 µm). Analýza probíhala izokraticky při 45 °C za průtoku 0,5 ml/min po dobu 5 min. Fluorescence byla monitorována při 375 nm pro excitační a 415 nm pro emisní spektrum.

4.3.4. Stanovení dusičnanů

Dusičnany byly stanoveny pomocí kapilární elektroforézy s UV detekcí při 214 nm podle Davies et al. (Davies C.A. et al., 1999). Nejprve byl připraven 2 mM tetradecyltrimethylamonium hydroxid (TTAH) z tetradecyltrimethylammonium bromidu průchodem přes kolonu silného anexu v OH formě, kde dochází k výměně bromidových aniontů za hydroxylové ionty (Phenomenex, Cheshire, UK).

Plazma MDS pacientů byla centrifugována (17 000 g, 4 min), filtrována přes 0,2 μm celulózové filtry a sonikována. Separace dusitanů probíhala za pokojové teploty při napětí -10 kV a použití reverzního elektroosmotického průtoku. Vzorky byly děleny v silikonové kapiláře o rozměrech 50 μm x 40 cm v separačním pufru (150 mM NaCl/5 mM Tris-HCl, pH 7,4 a 2 mM TTAH). Kapilára byla před každým nástřikem promyta 0,1 M NaOH a separačním pufrem po dobu 1 min nebo 2 min. Jako kalibrace byl použit vodný roztok KNO_3 (0,39 μM - 500 μM).

4.3.5. Stanovení malondialdehydu

4.3.5.1. Příprava 2 mM standardu MDA

0,05% TEP v 1% kyselině sírové (v/v) byl inkubován 2 hodiny ve tmě při laboratorní teplotě. Koncentrace MDA byla stanovena spektrofotometricky při 245 nm ($\varepsilon_{245\ nm}$ = 13 700 $l.mol^{-1}.cm^{-1}$).

4.3.5.2. Příprava vzorků

MDA byl stanoven po derivatizaci 2-TBA. 100 μl vzorku nebo kontrolní plazmy/séra (0-10 μM) bylo smícháno s 12,5 μl 100 mM EDTA v 2% NaOH (w/v), 12,5 μl vody nebo MDA standardu (0-10 μM) a 125 μl 10 mM 2,6-ditert-butyl-4-methylfenol v acetonitrilu. Obsah zkumavek byl řádně promíchán, inkubován 30 min ve vodní lázni (60 °C) a poté odstředěn (40 000 g, 10 min). 75 μl supernatantu přeneseno do polypropylenové zkumavky, bylo přidáno 300 μl TBA v acetátovém pufru (25 mM). Takto připravený vzorek byl řádně

promíchán a povařen 60 min ve vodní lázni. Po ochlazení byl vzorek odstředěn (40 000 g, 10 min) a supernatant přefiltrován přes 0,2 μm celulózové filtry.

4.3.5.3. Chromatografické podmínky

Chromatografické podmínky stanovení malondialdehydu byly již dříve popsány v naší práci (Suttnar J. et al., 2001). 75 μl filtrátu bylo naneseno na kolonu (phase C18 Gemini NX column 150x2 mm). Mobilní fázi tvořila směs 35% methanolu v 50 mM NH_4HCO_3 pufru o pH 9,3 upravené NH_4OH. Analýza probíhala izokraticky při průtoku 0,25 ml/min za laboratorní teploty. TBA-MDA sloučenina byla detegována pomocí UV-VIS detektoru při 532 nm.

4.3.6. Stanovení aminothiolů

4.3.6.1. Příprava standardu aminothiolů

120 μM homocystein (v 10% MeOH), 80 μM glutathion (v 0,1 M HCl), 600 μM L-cystein (v 0,01 M HCl) a 240 μM cysteinylglycin (v 0,1 M HCl) byly smíchány v poměru 1:1:1:1. Kalibrační směs byla připravena ředěním směsí 10% MeOH:0,1 M HCl:0,01 M HCl smíchanou v poměru 1:2:1.

4.3.6.2. Příprava vzorků

60 μl plazmy MDS pacientů nebo standardu bylo smícháno s 60 μl PBS a 15 μl 10% tris(2-karboxyethyl)fosfinu (w/v). Směs byla inkubována 30 min při teplotě 25 °C a deproteinizována přidáním 135 μl 10% trichloroctové kyseliny s 2 mM EDTA, centrifugována (15 000 g, 15 min, 10 °C). K 50 μl supernatantu bylo přidáno 125 μl 125 mM borátového pufru (pH 9,5) s 4 mM EDTA, 15 μl 1,5 M NaOH a 50 μl 0,1% SBDF v 125 mM borátovém pufru s 4 mM EDTA (w/v). Reakční směs byla inkubována 60 min při 60 °C a následně přefiltrována přes 0,2 μm celulózové filtry.

4.3.6.3. Chromatografické podmínky

Chromatografické podmínky pro stanovení aminothiolů byly použity dle práce Garcia et al. (Garcia A.J. and Apitz-Castro R., 2002). 20 µl filtrátu bylo naneseno na kolonu LUNA C18 (2) (150x3 mm, 5 µm). Separace derivátů thiolbenzofurazan-4-sulfonátu probíhala při 40 °C a průtoku 1 ml/min v gradientovém systému (t (min)/% B: 0/0, 7/0, 7,1/100, 10/100, 10,1/0). Mobilní fázi A tvořili 0,1 M H_3PO_4 pH 2,1 upraveno KOH a mobilní fáze B byla 10% MeOH v pufru A (v/v). Fluorescence byla monitorována při 385 nm pro excitační a 515 nm pro emisní spektrum.

4.3.7. Stanovení železa, feritinu, gama-glutamytranferasy

Koncentrace železa, feritinu a gama-glutamyltranferasy (GGT) byly měřeny v akreditované biochemické laboratoři dle akreditovaných metod.

4.3.8. Stanovení derivátů methylargininu

4.3.8.1. Příprava vzorků

Kalibrace byla připravena přidáním standardů ke vzorkům kontrolního séra: 0–100 µmol/l argininu (Arg), 0-100 µM citrulinu, 0–3 µM ADMA, 0-4 µM SDMA, 0-2 µM MMA a 0–12 µM homoargininu. 55 µl vzorků séra MDS pacientů a vzorků kalibrační řady bylo smícháno s 500 µl mobilní fáze B (0,025% TCA/1% kyselina propionová/ACN (v/v/v)). Precipitované proteiny byly odděleny centrifugací (10 000 g, 5 min).

4.3.8.2. Chromatografické podmínky a MS

HPLC separace argininových derivátů byla prováděna dle Martens-Lobenhoffer et al. s mírnými úpravami (Martens-Lobenhoffer J. and Bode-Boger S.M., 2006). 10 µl vzorku bylo rozděleno na analytické koloně Phenomenex 100 x 2 mm Luna 3 µm Silica (2) 100 A izokraticky v 10% mobilní fázi A a 90% mobilní fázi B při průtoku 250 µl/min a teplotě 30 °C. Mobilní fázi A tvořila směs 0,025% TCA a 1% kyseliny propionové ve vodě (v/v/v).

Analyty byly detegovány pomocí QTRAP 4000 hmotnostní spektrometrie s elektrosprejem (ESI) (AB Sciex). Ovládání přístroje, sběr dat a analýza dat byly prováděny pomocí softwaru Analyst 1.5.1. Nastavení ESI zdroje bylo následující: napětí iontového spreje +1300 V, teplota 600 °C. $[MH]^+$ ionty byly analyzovány za použití SRM (selected reactions monitoring) módu hmotnostní spektrometrie. Pozorované SRM přechody byly m/z 175,0→69,9 pro Arg, m/z 203,1→46,0 pro ADMA, m/z 203,1→172,1 pro SDMA, m/z 189,0→70,0 pro MMA, m/z 176,0→112,9 pro citrulin, a m/z 189,0→84,0 pro homoarginin.

4.3.9. Stanovení karbonylovaných proteinů

Metoda pro stanovení karbonylovaných proteinů byla použita stejně v práci Stikarova et al. s mírnými modifikacemi (Štikarová J. et al., 2013). Peleta proteinů depletované krevní plazmy po přesrážení TCA (1:1) (v/v) byla resuspendována v roztoku derivatizačního činidla 10 mM DNPH v 2 M HCl. Souběžně byly zpracovávány slepé vzorky, kdy peleta byla resuspendována v 2 M HCl a dále se pracovalo stejně. Reakce probíhala 60 min ve tmě. Následně byla reakce zastavena přídavkem 20% TCA (v/v) v poměru 1:1 a peleta byla třikrát promyta směsí ethanol/ethylacetát (1:1) (v/v). Nakonec byla peleta resuspendována v 600 μl 6 M guanidinhydrochloridu. Koncentrace karbonylovaných skupin byla vypočítána z hodnot absorpčních koeficientů (22 000 $l.mol^{-1}.cm^{-1}$ při 360 nm a 9 460 $l.mol^{-1}.cm^{-1}$ při 278 nm) po odečtení slepých vzorků.

4.3.10. Příprava vzorku pro detekci karbonylovaných proteinů

Plazmatické proteiny byly precipitovány kyselinou trichloroctovou (10% v/v, finální koncentrace) a resuspendovány v přibližně 20 μl 35% SDS. Ke vzorku bylo přidáno 20 μl derivatizačního činidla DNPH (10 mM). Reakce probíhala 60 min ve tmě. Následně byla reakce zastavena přídavkem 15 μl TRIS-base (2 M) v 30% glycerolu. Derivatizované proteiny byly rozděleny pomocí SDS PAGE (5-15% polyakrylamidové gely) a obarveny koloidní Coomassie blue nebo použity k Western blot analýze.

4.3.11. Detekce S-nitrosylovaných proteinů (Biotin Switch Technique - BST)

4.3.11.1. Příprava roztoků

Blokovací pufr: 100 ml roztoku bylo připraveno rozpuštěním 5,96 g HEPES (250 mM), 0,0372 g EDTA (1 mM), 0,00245 g neokuproinu (0,1 mM), 2,6 g SDS (2,6%; w/v) a 200 µl MMTS (20 mM) ve vodě, pH bylo upraveno na hodnotu 7,7.

Resuspendační pufr: 100 ml roztoku bylo připraveno rozpuštěním 5,96 g HEPES (250 mM), 0,0372 g EDTA (1 mM), 0,00245 g neokuproinu (0,1 mM) a 1,1 g SDS (1,1%; w/v) ve vodě, pH bylo upraveno na hodnotu 6,8.

Neutralizační pufr: 100 ml roztoku bylo připraveno rozpuštěním 0,596 g HEPES (25 mM), 3,51 g NaCl (100 mM), 0,0372 g EDTA (1 mM) a 1 ml Triton X-100 (1%; v/v) ve vodě, pH bylo upraveno hodnotu 7,7.

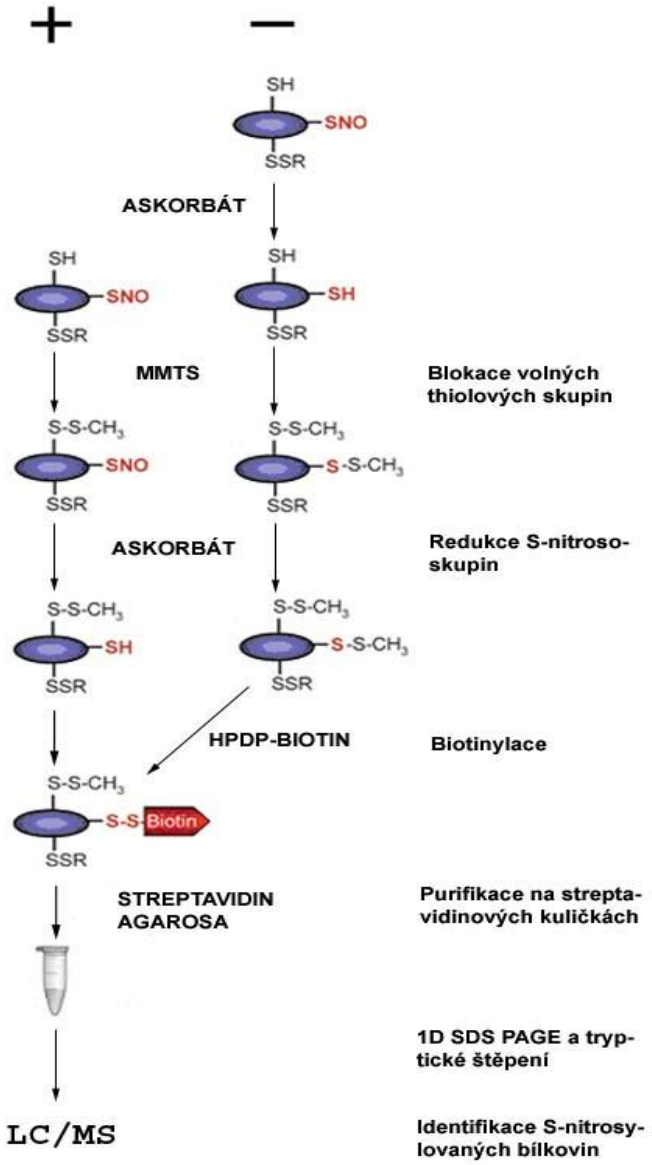
Promývací pufr: 100 ml roztoku bylo připraveno rozpuštěním 0,596 g HEPES (25 mM), 0,585 g NaCl (600 mM), 0,0372 g EDTA (1 mM) a 1 ml Triton X-100 (1%; v/v) ve vodě. pH bylo upraveno na hodnotu 7,7.

HEN/SDS pufr: 1 000 ml roztoku bylo připraveno rozpuštěním 5,96 g HEPES (250 mM), 0,0372 g EDTA (1 mM), 0,00245 g neokuproinu (0,1 mM) a 12,6 g SDS (12,6%; w/v) ve vodě. pH bylo upraveno na hodnotu 7,7.

4.3.11.2. Postup BST

Suspenze krevních destiček byla centrifugována (6 370 g, 30 min, 25 °C). Pelety krevních destiček byly resuspendovány ve 100 µl blokačního pufru. Vzorky byly inkubovány za tmy ve vodní lázni při 50 °C po dobu 30 min za častého vortexování. Poté byly přidány 2 ml acetonu vychlazeného na -20 °C a suspenze byla ponechána 3 hod při -20 °C. Souběžně byly zpracovávány tytéž vzorky pro negativní kontrolu. Vzorky negativní kontroly byly po resuspendování ve 180 µl resuspendačního pufru nejprve zredukovány 20 µl 100 mM askorbátu sodného (f.c. = 10 mM) o pH 6,8 (upraveno pomocí NaOH) po dobu 1 h na světle a

vyprecipitovány acetonem. Dále byly zpracovávány oba soubory vzorků stejně. Postup metody včetně zpracování negativní kontroly je znázorněn na obrázku (Obr. 13).



Obr. 13: ***Princip metody Biotin Switch Technique (BST).*** *Volné SH- skupiny destičkových proteinů byly zablokovány methylmethanthiosulfonátem (MMTS), následně byly S-nitrosylované skupiny zredukovány askorbátem, označeny biotinem-HPDP a vyizolovány pomocí agarózových kuliček s navázaným streptavidinem. U negativní kontroly byly nejprve všechny S-nitroso- skupiny zredukovány askorbátem na světle a dále se postupovalo stejně.*

Po precipitaci acetonem byla suspenze odstředěna (5 000 g, 5 min, 4 °C). Pelety byly vysušeny dusíkem a resuspendovány ve 180 µl resuspendačního pufru, byly přidány 2 µl 100 mM askorbátu sodného (f.c.=1 mM) a 20 µl biotinu-HPDP (4 mM v dimethylformamidu). Redukce a biotinylace probíhaly současně ve tmě za pokojové teploty po dobu 30 min. K odstranění přebytku askorbátu a biotinylačního činidla byla použita precipitace acetonem. Peleta byla resuspendována ve 125 µl HEN/SDS pufru, bylo přidáno 325 µl neutralizačního pufru a 40 µl promytých a zablokovaných streptavidinových kuliček. 40 µl streptavidinu imobilizovaného na agarózové matrici bylo blokováno při 4 °C za stálého míchání ve 400 µl roztoku 3% BSA/PBS (w/v). Před nanesením vzorků byla streptavidin agaróza promyta třikrát neutralizačním pufrem. Vzorky byly inkubovány se streptavidin agarózou přes noc při 4 °C. Navázané proteiny byly promyty čtyřikrát promývacím a třikrát neutralizačním pufrem. K promytým vzorkům byl přidán vzorkový redukující pufr (o objemu nanášeného vzorku) a vzorky byly vařeny po dobu 3 min. Roztok byl centrifugován (10 600 g, 1 min, 20 °C). Supernatant obsahoval izolované S-nitroso- proteiny, které byly dále rozděleny na SDS PAGE a identifikovány pomocí MS.

4.3.12. SDS PAGE

4.3.12.1. Příprava roztoků a gelů

Redukující vzorkový pufr: 20 ml pufru bylo připraveno rozpuštěním 0,8 g SDS, 0,62 g DTT, 4 ml glycerolu, 2,5 ml zaostřovacího pufru pH 6,8 a 0,05 ml bromfenolové modři ve vodě.

Roztok akrylamid/bis-akrylamid: 100 ml roztoku bylo připraveno rozpuštěním 29,2 g akrylamidu (30%; w/v), 0,8 g *N*,*N´*-methylen-bis(akrylamidu) (0,8%; w/v) a 25 ml 87% glycerolu (21%; v/v).

Zaostřovací pufr pH 6,8: 100 ml roztoku bylo připraveno rozpuštěním 0,4 g SDS (0,5%; w/v) a 6,04 g TRIS-base (0,5 mM). pH bylo upraveno pomocí HCl na hodnotu 6,8.

Rozdělovací pufr pH 8,8: 100 ml roztoku bylo připraveno rozpuštěním 0,4 g SDS (0,5%; w/v) a 18,17 g TRIS-base (1,5 mM). pH bylo upraveno pomocí HCl na hodnotu 8,8.

Elektrodový pufr pH 8,3: 1 000 ml pufru bylo připraveno rozpuštěním 30,28 g TRIS-base (25 mM), 144 g glycinu (1,92 M) a 10 g SDS (35 mM) ve vodě.

3,75% zaostřovací gel: Gel byl připraven smícháním 2,5 ml roztoku akrylamidu/bis-akrylamidu, 5 ml zaostřovacího pufru pH 6,8, 12,5 ml vody, 10 µl TEMEDu a 40 µl 40% (w/v) persíranu amonného.

5% rozdělovací gel: Gel byl připraven smícháním 2 ml roztoku akrylamidu/bis-akrylamidu, 3 ml rozdělovacího pufru pH 8,8, 7 ml redestilované vody, 12 µl TEMEDu a 15 µl 40% (w/v) persíranu amonného.

15% rozdělovací gel: Gel byl připraven smícháním 15 ml roztoku akrylamidu/bis-akrylamidu, 7,5 ml rozdělovacího pufru (pH 8,8), 7,5 ml redestilované vody, 25 µl TEMEDu a 20 µl 40% (w/v) persíranu amonného.

4.3.12.2. Podmínky SDS-PAGE

Pro SDS-PAGE byly připraveny 5-15% gradientové polyakrylamidové gely s 3,75% zaostřovacím gelem. Elektroforéza probíhala za konstantního proudu (25 mA/elektroforetická deska) a napětí 500 V. Po proběhnutí SDS-PAGE byly gely ihned barveny koloidní Coomassie Blue nebo blotovány.

4.3.12.3. Barvení gelů koloidní Coomassie Blue

400 ml roztoku koloidní Coomassie Blue bylo připraveno pozvolným přidáváním roztoku II do intenzivně míchaného roztoku I. 240 ml roztok I bylo připraveno rozpuštěním 68 g síranu amonného v 3% kyselině fosforečné (v/v). Roztok II byl připraven rozpuštěním 0,4 g Serva Blue G ve 140 ml methanolu. Gely byly barveny koloidní Coomassie Blue přes noc. Pozadí gelů bylo odbarveno 1% kyselinou octovou (v/v). Poté byly gely uchovávány v 5% kyselině octové (v/v) při 4°C.

4.3.13. Western blotting

4.3.13.1. Blotovací pufr

1 000 ml pufru bylo připraveno rozpuštěním 3,05 g TRIS-base (25 mM), 14,4 g glycinu (190 mM) a 200 ml methanolu (20%; v/v) ve vodě.

4.3.13.2. Postup Western blottingu

Proteiny rozdělené metodou SDS-PAGE byly přeneseny z polyakrylamidového gelu na polyvinylfluoridovou (PVDF) membránu (Imobilon-P, Merck Milipore, Billerica, MA) pomocí „semi-dry" blotovací aparatury. PVDF membrána byla před blotováním ekvilibrována v methanolu 5 min. Poté byla PVDF membrána, gely a filtrační papíry smočeny v blotovacím pufru. Byla sestavena blotovací aparatura v pořadí anoda, filtrační papíry, PVDF membrána, gel, filtrační papíry a katoda. Western blotting probíhal za podmínek 80 mA, 10 V, 30 min a 200 mA, 10 V, 90 min.

4.3.14. Imunochemická detekce karbonylovaných proteinů

Nejprve byl připraven chromogenní substrát tak, že 100 ml roztoku bylo připraveno smícháním 50 ml 150 mM TRIS-acetátového pufru (pH 9,6), 50 ml redestilované vody, 250 µl 5% NBT (w/v) v 70% *N*, *N*-dimethylformamidu (v/v), 400 µl $MgCl_2$ (2 M) a 1 000 µl 0,5% BCIP (w/v).

PVDF membrána s přenesenými proteiny byla inkubována v roztoku 3% BSA (v/v)/0,1% Tween/PBS při 4 °C přes noc. Po blokování byla membrána promyta roztokem 0,02% Tweenu/PBS (3x, 15 min). Promytá membrána byla inkubována s monoklonální anti-DNP protilátkou značenou alkalickou fosfatasou (1:10 000) po dobu 3 hodin při pokojové teplotě. Po interakci s protilátkou byla membrána promyta roztokem 0,02% Tweenu/PBS (3x, 15 min). Následně byla membrána inkubována ve tmě s chromogenním substrátem (přibližně 5-15 min). Po dostatečné vizualizaci zón

karbonylovaných proteinů byla reakce zastavena důkladným promytím membrány destilovanou vodou.

4.3.15. Proteolytické štěpení proteinů

4.3.15.1. Trypsinizace v gelu

Gely po SDS-PAGE s rozdělenými proteiny byly důkladně promyty vodou (2x, 10 min). Zóny pro identifikaci byly vyříznuty a rozkrájeny na kostky o velikosti cca 0,5-1 mm^3. Kostky gelu byly opět promyty vodou (5 min) a následně byly promývány do odbarvení gelu 0,1 M NH_4HCO_3/acetonitril v poměru 1:1 (v/v). Po odstranění promývacího roztoku byly kostky gelu dehydratovány acetonitrilem, po zbělání kostek gelu byl acetonitril odstraněn. Kostky gelu byly rehydratovány 0,1 M NH_4HCO_3 (5 min) a překryty acetonitrilem. Po zbělání kostek gelu byl acetonitril odstraněn a kostky gelu byly vysušeny ve vakuovém lyofilizátoru (cca 30 min). Vysušené kostky gelu byly redukovány 10 mM DTT/0,1 M NH_4HCO_3 (60 min, při 60 °C) a opět dehydratovány acetonitrilem. Po odstranění acetonitrilu byly kostky gelu překryty a inkubovány s čerstvě připraveným 55 mM jodacetamidem/0,1 M NH_4HCO_3 ve tmě (60 min). Po odstranění roztoku byly kostky gelu omyty 0,1 M NH_4HCO_3/acetonitril v poměru 1:1 (v/v), dehydratovány acetonitrilem a vysušeny ve vakuovém lyofilizátoru. K vysušeným kostkám gelu bylo přidáno 20 µl čerstvě připraveného roztoku trypsinu (12,5 ng/µl trypsinu v 25 mM NH_4HCO_3) a části gelu byly inkubovány s roztokem trypsinu (přes noc, při 37 ºC). Vzorky byly stočeny a supernatant byl stažen do nových, označených zkumavek – první podíl. Pro extrakci proteinů bylo ke kostkám gelu přidáno 30 µl 50% acetonitrilu v 0,1% kyselině mravenčí (v/v) (15 min), tekutina byla stažena a přidána k prvnímu podílu. Extrakce byla opakována. Po ukončení extrakce byly vzorky (spojené podíly) vysušeny ve vakuovém centrifugačním koncentrátoru a šokově zamraženy. Před identifikací hmotnostní spektrometrií byly vzorky rozpuštěny v 0,1% kyselině mravenčí/2% acetonitril.

4.3.15.2. Trypsinizace v roztoku

Peleta proteinů byla resuspendována ve 40 µl 8 M močoviny/0,4 M NH_4HCO_3. pH bylo upraveno na 7,5 – 8,5, bylo přidáno 10 µl 45 mM DTT a inkubováno 15 min při 50 °C. K ochlazenému vzorku bylo přidáno 10 µl 100 mM IAA a vzorek byl inkubován 15 min při 25 °C. Ke vzorku bylo přidáno 100 µl H_2O a trypsin TPCK (1 mg/ml) v poměru k proteinu 1/25 (w/w). Vzorek byl hydrolyzován 12-14 h při 37 °C, vysušen ve vakuovém centrifugačním koncentrátoru a šokově zamražen. Před identifikací hmotnostní spektrometrií byly vzorky rozpuštěny v 0,1% kyselině mravenčí.

4.3.16. Identifikace proteinů

4.3.16.1. HCT ultra ion trap

4.3.16.1.1. NanoLC/MS/MS analýza

Analýza vzorků trypsinizovaných z gelu probíhala na UltiMate 300 RSLCnano systému (Dionex) s hmotnostní spektrometrií HCT ultra s iontovou pastí a ESI Nano Sprayer (Bruker Daltonics). Přístroj byl ovládán programem esquireControl v6.2 (Bruker Daltonics). Proteiny byly po odsolení na předkoloně 300 µm ID/5 mm C18 PepMap 100 separovány na analytické koloně 75 µm ID/15 cm C18 PepMap 100. Byl použit gradient acetonitrilu (A: 0,1% kyselina mravenčí/2% acetonitril, B: 0,1% kyselina mravenčí/100% acetonitril) o délce 22 min při průtoku 300 nl/min. Skenovací rozmezí pro MS bylo 300 – 1500 m/z a pro MS/MS byla fragmentační spektra v rozmezí 100 – 2500 m/z.

4.3.16.1.2. Analýza dat

Pro vyhodnocení a identifikaci „raw“ spekter byly použity programy DataAnalysis 4.0, BioTools 3.2 (Bruker Daltonics) a MASCOT (Matrix Science, UK). K vyhledávání byly použity následující parametry: druh *Homo Sapiens*, karbamoylmethylace cysteinu jako fixní modifikace, oxidace methioninu jako variabilní modifikace, štěpení trypsinem, odchylka hmotnosti pro prekurzorové ionty MS ± 0,1 % a 0,5 Da pro MS/MS. Náboj fragmentů byl

mezi +2 a +5. Pro identifikaci proteinu bylo zapotřebí alespoň dvou unikátních peptidů splňujících minimální hodnotu skóre (MASCOT) pro identitu (P<0,05).

4.3.16.2. TripleTOF 5600

4.3.16.2.1. NanoLC/MS/MS analýza

Analýza vzorků trypsinizovaných v roztoku probíhala na UltiMate 3 000 RSLCnano systému (Dionex) s hmotnostní spektrometrií TripleTOF 5600 s NanoSpray III zdrojem (AB Sciex). Přístroj byl ovládán programem Analyst TF 1.6 (AB Sciex). Po nástřiku byl vzorek odsolen 2% acetonitrilem v 0,1% kyselině mravenčí na koloně Acclaim PepMap 100 (5 μm, 2 cm x 100 μm) za průtoku 5 μl/min. Eluované peptidy byly rozděleny na analytické koloně Acclaim PepMap 100 (3 μm, 15 cm x 75 μm). Byl použit gradient acetonitrilu (A: 0,1% kyselina mravenčí, B: 0,1% kyselina mravenčí/100% acetonitril) o délce 180 min za průtoku 300 nl/min. Skenovací rozmezí pro TOF MS bylo 350 – 1500 m/z a pro MS/MS byla fragmentační spektra v rozmezí 100 – 2 000 m/z.

4.3.16.2.2. Analýza dat

Pro vyhodnocení a identifikaci „raw" spekter byl použit program Protein Pilot 4.0 (AB Sciex). K vyhledávání byly použity následující parametry: druh *Homo Sapiens*, alkylace iodacetamidem, štěpení trypsinem, přístroj TripleTOF 5600. Všechny vzorky byly hodnoceny Paragon algoritmem v režimu Thorough s odchylkou pro prekurzorové ionty MS do ± 0,05 Da a 0,1 Da pro MS2. Náboj fragmentů byl mezi +2 a +5.

4.3.17. SPR

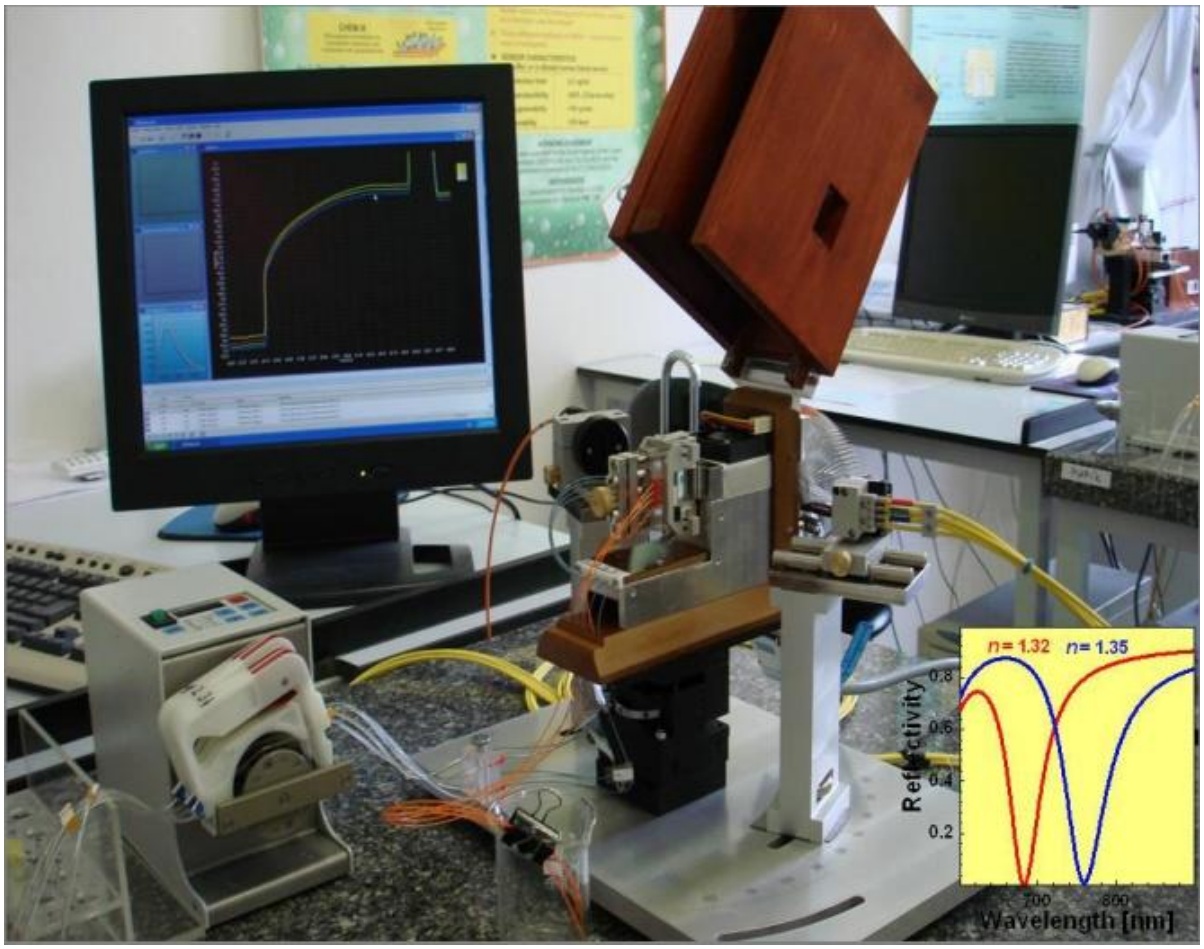
4.3.17.1. Roztoky

SA: 0,01 M CH_3COONa, pH 5,0; **PBNa**: 1,5 mM KH_2PO_4, 8,1 mM $Na_2HPO_4.12H_2O$, 0,75 M NaCl, 0,009 M KCl, pH 7,4; **2% BSA/PBNa:** 2% BSA (w/v) v PBNa; **2% BSA/PBS:** 2% BSA (w/v) v PBS; **10% BSA/PBS:** 10% BSA (w/v) v PBS.

4.3.17.2. SPR spektrometrie

V této práci byly používány dva typy SPR senzorů: **SPR spektrometrie** (Obr. 14) a **SPR zobrazování** (Obr. 15).

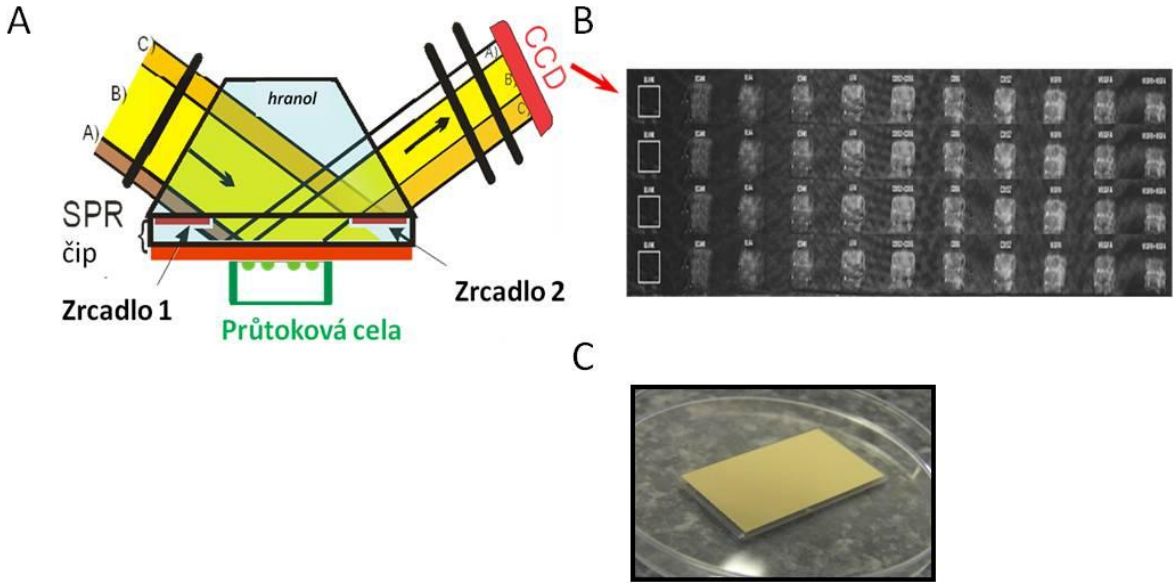
Pro detekci interakce VEGF-A a VEGFR-1 a depletovaných vzorků byl používán 4-kanálový laboratorní SPR senzor založený na Kretchmannově geometrii tlumeného totálního odrazu a spektrální modulaci vyvinutý na Oddělení optických senzorů Ústavu fotoniky a elektroniky Akademie věd. Princip SPR metody je založen na měření malých změn indexu lomu média v těsné blízkosti kovového povrchu senzoru. Tyto změny mohou být způsobeny navázáním analytu na jeho biospecifického partnera ukotveného na zlatém povrchu senzoru. U použitého SPR biosenzoru dopadá polychromatické záření z halogenové lampy, které bylo zkolimované a polarizované, na vlastní senzorovou část skládající se z optického hranolu a skleněného čipu pokrytého tenkým titanovým filmem (~2 nm) a vrstvou zlata (~55 nm). Po dopadu světlo excituje povrchový plazmon na zlatém čipu na čtyřech různých místech (tj. 4 oddělené kanály). Odražené světlo je odvedeno čtyřmi optickými vlákny do 4-kanálového spektrografu. Spektra jsou analyzována v reálném čase s pomocí speciálního softwaru s vyhodnocováním rezonanční vlnové délky nezávisle pro každý kanál. Pro přivedení vzorků k povrchu senzoru je použita peristaltická pumpa (Ismatech, Švýcarsko). Pro detekci v plazmě byl použit nedávno vyvinutý fluidický systém přivádění vzorků k povrchu, který má dva oddělené vstupy do jednotlivých kanálů na povrchu čipu. Umožňuje přepínat mezi analyzovaným komplexním vzorkem (plazma) a protékajícím pufrem a účinně tak průběžně snižuje nespecifickou odezvu senzoru a umožňuje detekci vzorku o nižších koncentracích, navíc zabraňuje rozmývání vzorku a jejich vzájemnému míchání ve fluidním systému (Homola J., 2008). Všechny experimenty byly prováděny při teplotě 25 °C a průtoku 30 µl/min nebo 20 µl/min (pokud není uvedeno jinak).



Obr. 14: ***SPR senzor.*** *4-kanálový laboratorní SPR senzor vyvinutý v Ústavu fotoniky a elektroniky Akademie věd ČR.*

4.3.17.3. SPR zobrazování

Pro detekci interakcí pomocí proteinového čipu byl využíván laboratorní SPR senzor založený na Kretchmannově geometrii oslabeného totálního odrazu a prostorové modulaci intenzity světla vyvinutý na Oddělení optických senzorů Ústavu fotoniky a elektroniky Akademie věd (SPR zobrazování). K excitaci povrchového plazmonu dochází podobně jako v předchozím uspořádání, tj. po průchodu monochromatického světla přes hranol a jeho dopadu na tenkou kovovou vrstvu. Intenzita odraženého světla závisí na indexu lomu média v blízkosti kovového povrchu (Piliarik M. et al., 2005).



Obr. 15: ***SPR zobrazování.*** *Princip detekce pomocí SPR zobrazování (A), kamerový snímek detailu čipu obsahujícího 11 bodů s imobilizovanými proteiny v každé řadě, které jsou oddělené a tvoří čtyři paralelní kanály (B), fotografie zlatého čipu (C).*

4.3.17.4. Funkcionalizace čipu

Před přichycením VEGF-A byl povrch čipu funkcionalizován směsí alkylthiolů pro vytvoření samoskladné monovrstvy. Nejprve byl čip se zlatým povrchem opláchnut deionizovanou vodou a vysušen proudem dusíku. Organické nečistoty byly odstraněny z čipu ozónem po dobu 10 min. Poté byl čip opláchnut deionizovanou vodou a ethanolem a vysušen proudem dusíku. Takto připravený čip byl inkubován se směsí alkylthiolů: $HSC_{11}(EG)_4OH$ a $HSC_{11}(EG)_6OCH_2COOH$ (7:3) o finální koncentraci 200 μM. N-alkylthioly s dlouhými řetězci (n=12 a výše) zakončenými funkčními skupinami sloužily k ukotvení biomolekuly a n-alkylthioly s kratšími řetězci zakončenými ethylenglykolem nebo hydroxylovými skupinami redukovaly nespecifické interakce s povrchem. Čip v roztoku se směsí alkylthiolů byl inkubován při teplotě 40 °C po dobu 10 min a následně skladován do druhého dne ve tmě za pokojové teploty. $HSC_{11}(EG)_6OCH_2COOH$ thioly sloužily k ukotvení VEGF-A a $HSC_{11}(EG)_4OH$ vytvářely pozadí pro snížení nespecifické interakce s povrchem.

4.3.17.5. Imobilizace VEGF-A

Očištěný zlatý SPR čip pokrytý vrstvou alkylthiolů zakončených karboxylovou skupinou byl vložen do SPR senzoru. Pro aktivaci karboxylových skupin byl povrch čipu inkubován nejprve s deionizovanou vodou při průtoku 20 µl/min a následně se směsí NHS a EDC (1:1) po dobu 5 min, při průtoku 20 µl/min. Po aktivaci byl čip inkubován s PBS pufrem. VEGF-A (o koncentraci 2 µg/ml v PBS) byl ukotven na povrchu senzoru pomocí kovalentní amidové vazby s aktivovanými karboxylovými skupinami alkylthiolů. Před dovysycením BSA byla testována stabilita ukotveného VEGF-A střídavou injekcí PBS, SA a PBS pufru. Místa neobsazená proteinem VEGF-A byla dovysycena BSA (0,5 mg/ml) v SA pufru po dobu 15 min. PBNa pufr o vysoké iontové síle byl použit na odmytí nekovalentně vázaného VEGF-A a BSA (inkubace 5 min). Zbylé karboxylové skupiny byly deaktivovány 1 M EA (inkubace 5 min).

4.3.17.6. Detekce VEGFR-1 v pufru

Po imobilizaci VEGF-A byla testována interakce s VEGFR-1. Nejprve byl čip inkubován s PBS do dosažení stabilního signálu pozadí. Následně byl čip inkubován s VEGFR-1 v koncentračním rozmezí od 25 do 500 ng/ml po dobu 5 min a poté byl povrch opět omýván PBS pufrem. Pro ověření specifičnosti interakce byl roztok s VEGFR-1 o koncentracích 50-500 ng/mL inkubován s referenčním povrchem pokrytým pouze BSA.

4.3.17.7. Detekce VEGFR-1 v plazmě

Do 50x naředěné plazmy (2% (v/v)) BSA/PBS byl přidán VEGFR-1, tak aby finální koncentrace byla 25, 50 nebo 100 ng/ml. Vzorek byl přiváděn k povrchu v 10x 30-ti vteřinových cyklech prokládaných 10x 30-ti vteřinovými cykly s protékajícím pufrem (2% BSA/PBNa). Celkový čas kontaktu plazmy s povrchem byl 5 min. Nakonec byl povrch omýván promývacím pufrem, dokud nebylo dosaženo rovnovážného stavu. Jako reference sloužila 2% plazma ředěná 2% BSA/PBS bez přidaného VEGFR-1, která protékala jedním z detekčních kanálů.

4.3.17.8. SPR detekce VEGFR-1 v plné a depletované plazmě

Plná plazma byla naředěna 10x 2% BSA/PBS, což odpovídá 10% koncentraci (w/w) proteinů vzhledem k plazmě plné. Plazma depletovaná byla po zahuštění doplněna na takový objem, aby koncentrace málo zastoupených proteinů ve frakci 1 i hojně zastoupených proteinů ve frakci 2 odpovídala 10% koncentraci u každé skupiny proteinů vzhledem k jejich původní koncentraci v plné plazmě. Plazma byla podobně jako v předchozím experimentu přiváděna k povrchu v 10x 30-ti vteřinových cyklech prokládaných 10x 30-ti vteřinovými cykly s protékajícím pufrem (2% BSA/PBNa) pro odstranění nespecificky navázaných proteinů. Celkový čas kontaktu plazmy s povrchem byl tedy 5 min.

4.3.17.9. Proteinový čip

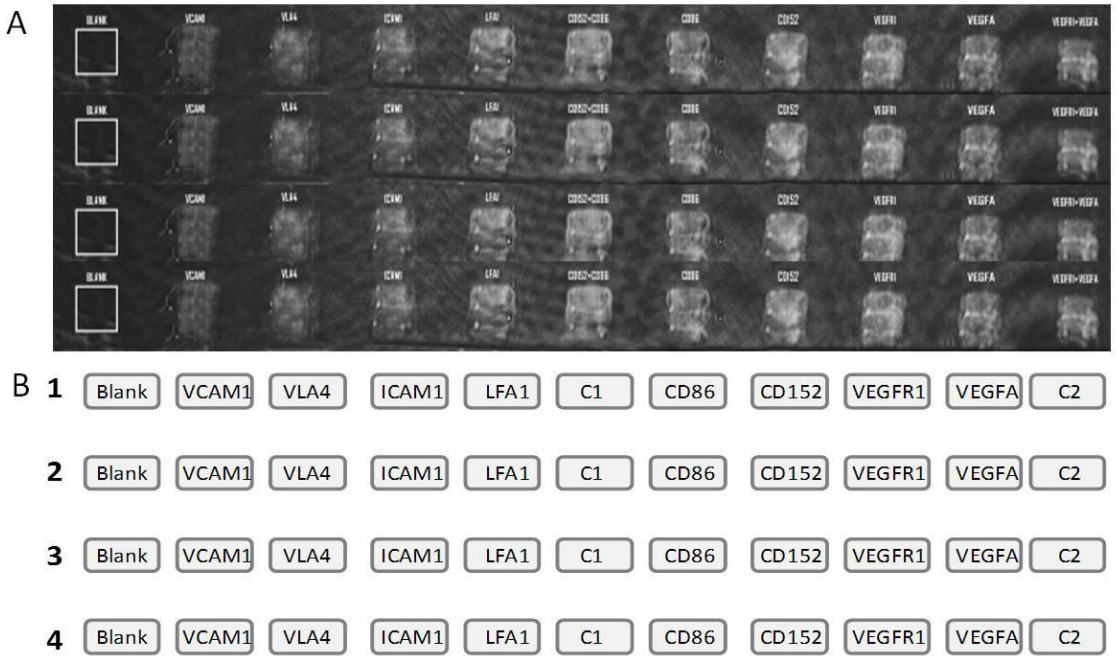
Proteinový čip byl vytvořen kontaktní depozicí (Microspotter Omnigrid) proteinů v roztoku na povrch zlatého čipu funkcionalizovaného samoskladnou vrstvou alkythiolů s aktivovanými karboxylovými skupinami. Funkcionalizovaný zlatý čip (viz výše) byl po opláchnutí ethanolem, deionizovanou vodou a osušení proudem dusíku inkubován s kapkou směsi NHS/EDC 200 µl (2/0,4 M) po dobu 20 min. Čip s aktivovanými karboxylovými skupinami byl osušen proudem dusíku a vložen do zařízení pro kontaktní depozici.

Koncentrace imobilizovaných proteinů uvádí tabulka (Tab. 4) a uspořádání čipu představuje obrázek (Obr. 16).

Tab. 4

Přehled imobilizačních podmínek pro jednotlivé proteiny

Proteiny	**Koncentrace proteinu [µg/ml]**	**Imobilizační pufr**	**Odezva senzoru na množství imobilizovaného proteinu [nm]**
LFA-1	10	SA pH 4/2mM $MgCl_2$	12,8
ICAM-1	10	SA pH 4/2mM $MgCl_3$	5,7
VLA-4	10	SA pH 4/2mM $MgCl_4$	14,0
VCAM-1	10	SA pH 4/2mM $MgCl_5$	8,3
CD86	10	SA pH 5	13,6
CD152	10	SA pH 4	13,0
VEGF-A	10	PBS	9,5
VEGFR-1	10	PBS	14,8



Obr. 16: ***Proteinový čip.*** *A: Kamerový snímek zlatého čipu s proteiny imobilizovanými kontaktní depozicí. Jeden bod odpovídá jednomu proteinu a prázdný bod s bílým rámečkem odpovídá referenčnímu bodu (blank). B: Schéma čipu, v němž každá řada představuje jeden oddělený kanál (1-4), který obsahuje 8 různých proteinů (VCAM-1, VLA-4, ICAM-1, LFA-1, CD86, CD152, VEGFR-1, VEGF-A) a 2 proteinové komplexy (C1 – CD86/CD152, C2 – VEGF-A/VEGFR1).*

Takto připravený čip byl inkubován s 10% plazmou zdravých dárců (kanál 1 a 2) a s plazmou MDS pacientů subtypem RCMD nebo RAEB II (kanál 3 a 4). Proteiny byly imobilizovány v 80% vlhkosti v humidifikační komoře dutou jehličkou tvořící body o velikosti 300 μm. Čip byl inkubován v humidifikační komoře po dobu 40 min za pokojové teploty. Poté byl čip vyjmut ze zařízení pro kontaktní depozici a vložen do senzoru SPR zobrazování.

Optický kontakt mezi čipem a hranolem byl vytvořen pomocí imerzního oleje. Po 5 minutovém omývání čipu SA pufrem, byl povrch inkubován s BSA (50 μg/ml) v SA pufru po dobu 15-20 min při průtoku 20 μl/min. PBNa pufr o vysoké iontové síle byl použit na odmytí nekovalentně vázaného BSA (inkubace 5 min). Zbylé karboxylové skupiny byly deaktivovány 1 M EA (inkubace 5 min).

4.3.17.10. Detekce proteinových komplexů

Čip byl inkubován s 2% BSA/PBS dokud nebyl ustálen signál pozadí. Následně byla k povrchu přivedena 10x ředěná plazma (10% (v/v)) (10% BSA/PBS) zdravých dárců nebo MDS pacientů po dobu 10 min při průtoku 20 μl/min. Po následné 10 minutové inkubaci čipu s 2% BSA/PBS byl povrch inkubován s PBNa po dobu 10 min, aby byly odmyty nestabilní interakce. Jako reference byl použit povrch bez ukotveného proteinu, vysycený BSA. Pro detekci proteinových komplexů byl opět využit přepínací systém, aby při detekci nedocházelo ke zkreslení kinetických křivek případným zadržováním analytu ve fluidickém systému.

4.3.17.11. Identifikace komplexů

Vybrané komplexy, které byly nalezeny pomocí proteinového čipu, byly připraveny k identifikaci hmotnostní spektrometrií. Na povrch čipu byl imobilizován protein, který tvořil základ komplexu. Protein o stejné koncentraci jako v případě použití na proteinový čip byl pomocí kovalentní amidové vazby ukotven na povrch, který byl kovalentně dovysycen BSA o koncentraci 50 μg/ml, jinak se postupovalo stejně jako v případě imobilizace VEGF-A. Při přípravě negativní kontroly byl povrch inkubován pouze s BSA. Po ustálení signálu pozadí byl povrch inkubován s 10% plazmou MDS, v níž byl detegován vznikající komplex. Stejně

jako při detekci komplexů byl povrch odmyt pufrem o vyšší iontové síle PBNa. Takto připravený povrch byl následně omýván 10-100 mM NaOH po dobu 5 min a odmývající se komplexy byly chyceny do zkumavek. Obsah zkumavek byl přesrážen pomocí vymraženého acetonu v poměru 1:4 po dobu 2 h při -20 °C. Vyprecipitované proteiny byly centrifugovány (7 000 g, 5 min, 5 °C), peleta vysušena a připravena k trypsinizaci.

4.3.17.12. Vyhodnocení dat

Pro identifikaci byly použity dvě proteinové databáze: Swissprot a její doplňující databáze TrEMBL. Ze seznamu identifikovaných proteinů byla nejprve od každého vzorku odečtena kontrola. Ze seznamu byly odstraněny všechny proteiny, které se opakovaly, dále všechny proteiny idetifikované na základě reverzní sekvence, fragmenty proteinů, které se v seznamu nacházely také jako celé molekuly a všechny cDNA. Z každého z uvedených seznamů byly všechny přístupové kódy proteinů z databáze UniProt převedeny na přístupové kódy jejich kódujících genů (EntrezIDs). Všechny EntrezIDs pak byly vloženy do databáze String Networks a byla vytvořena proteinová síť znázorňující interakce mezi námi nalezenými proteiny s proteiny na povrchu. Pomocí databáze String Network byly na základě již ověřených interakcí z identifikovaných proteinů dle svých EntrezIDs vyhledány proteiny, které přímo interagovaly s proteinem imobilizovaným na povrchu, a které s ním tvořily komplex.

4.3.18. Statistické metody

Statistická analýza byla prováděna za použití následujících metod programem IBM SPSS Statistics 19.0 (Armonk, NY, USA). Oboustranný *t*-test, jednorozměrná ANOVA, *post hoc* analýza Duncanův test, Pearsonův korelační test. Použití uvedených testů je uvedeno u výsledků. Všechny testy byly hodnoceny na hladině významnosti $P<0,05$.

5. VÝSLEDKY

5.1. OXIDAČNÍ STATUS MDS

5.1.1. Oxidační parametry u MDS pacientů

Pacienti zařazení do všech studií v této práci byli diagnostikováni na základě WHO 2008 na Ústavu hematologie a krevní transfuze. Vzorek byl odebrán v době stanovení diagnózy. Do studií byly zahrnuty následující subtypy MDS: RA, RA-5q, refrakterní anémie s prstenčitými sideroblasty (refractory anemia with ringed sideroblasty, RARS), RCMD, RCMD s prstenčitými sideroblasty (RCMD with ringed sideroblasty, RCMD(w/RS)), RCMD s 5q delecí, RCMD s reaktivními monocyty, RAEB-I, RAEB-II, RA s excesí blastů v transformaci (RAEB-T), MDS/myeloproliferativní onemocnění (MDS/MPD), MDS/MPD s 5q delecí, AML M2, MDS-RAEB-I s SC-non-Hodgkin lymfomem (SC-NHL) a jiné MDS. Přehled pacientů pro studii oxidačních parametrů je uveden v tabulce (Tab. 5).

Tab. 5

Přehled analyzovaných skupin (0-4), počet MDS pacientů a zdravých dárců, pohlaví a věkové rozmezí analyzovaných skupin.

Skupina	Počet pacientů a zdravých dárců (muži/ženy)	Věkové rozmezí	Diagnózy
0	23 (10/13)	25-57	Zdraví dárci
1	14 (10/4)	52-91	RA, RA-5q, RARS
2	29 (15/14)	28-90	RCMD, RCMD(w/RS), RCMD-5q, RCMD s reaktivními monocyty
3	9 (4/5)	36-85	RAEB-I, MDS/MPD, MDS/MPD s 5q delecí, MDS-RAEB-I + SC-NHL
4	9 (5/4)	55-80	RAEB-II, RAEB-T, AML M2

Do studie bylo zařazeno 61 MDS pacientů (1-4) a 23 zdravých dárců (0). Parametry oxidačního stresu byly porovnávány u MDS pacientů vůči zdravým dárcům. Data byla hodnocena na základě oboustranného *t*-testu. Přehled dat je uveden v tabulce (Tab. 6).

Tab. 6

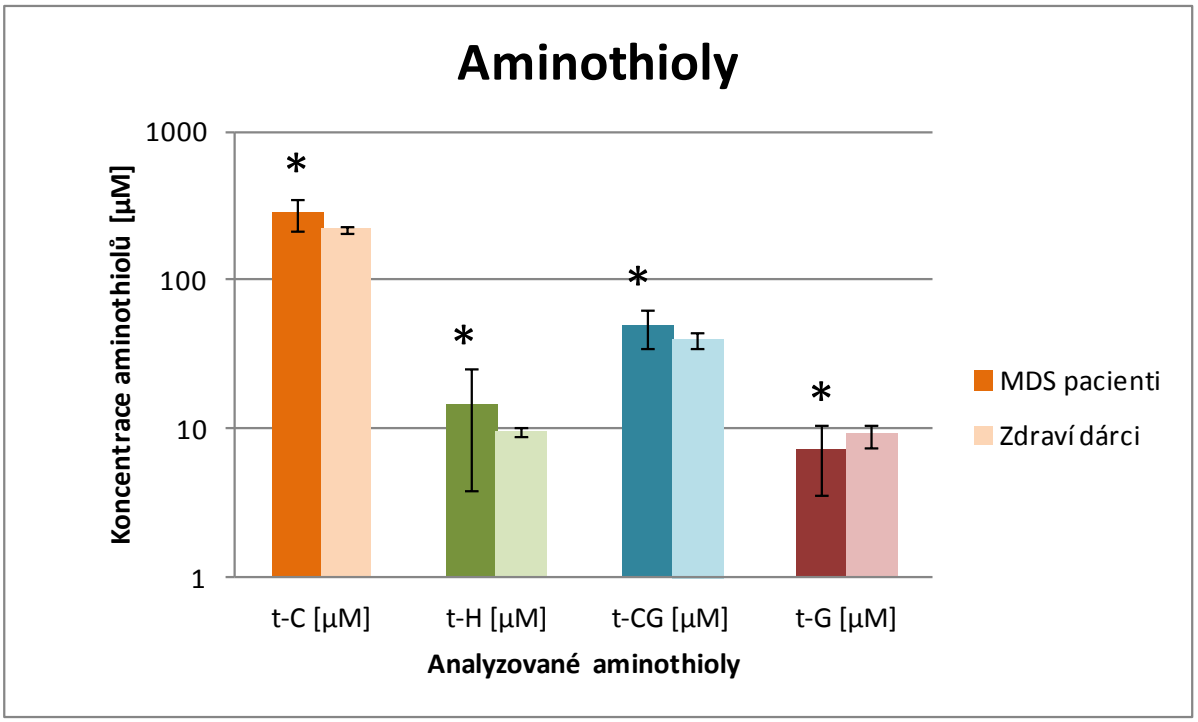
Plazmatické hladiny mediátorů oxidačního stresu, molekul antioxidační obrany, železa, feritinu a GGT u zdravých dárců a MDS pacientů. Data jsou uvedena jako průměry ± směrodatná odchylka (standard deviation, SD). Signifikantní rozdíly mezi MDS pacienty a zdravými dárci jsou označeny *. Data byla analyzována oboustranným *t*-testem.

Analyzované sloučeniny	**Zdraví dárci (n=23)**	**MDS pacienti (n=61)**
t-C [μM]	235,10 ± 12,80	284,00 ± 67,64***
t-H [μM]	9,69 ± 0,58	13,4 ± 6,39***
t-CG [μM]	41,72 ± 4,50	48,8 ± 14,00**
t-GSH [μM]	8,7 ± 1,43	7,16 ± 3,56*
MDA [μM]	0,69 ± 0,11	0,82 ± 0,34
NO_2^- [nM]	1149,08 ± 84,55	903,34 ± 215,34***
NO_3^- [μM]	32,78 ± 10,33	32,8 ± 17,87
Feritin [μg/l]	Ref. R.: 22-322	557,18 (24,10-8602,20)
Fe [μM]	Ref. R.: 7,2-29	26,15 (6,60-48,30)
GGT [μkat/l]	Ref. R.: 0,14-0,8	0,60 (0,1-2,84)

****P < 0.001, **P < 0.005, *P < 0.05*

Celkový cystein (total cysteine, t-C), celkový cysteinylglycin (total cysteinylglycine, t-CG), celkový homocystein (total homocysteine, t-H), celkový glutathion (total glutathione, t-GSH), malodialdehyd (MDA), γ-glutamyltranferasa (GGT).

Koncentrace homocysteinu (P<0,001), cysteinu (P<0,001) a cysteinylglycinu (P<0,005) byla signifikantně zvýšená u pacientů s MDS vzhledem ke zdravým dárcům, zatímco hladina glutathionu (P<0,05) byla signifikantně nižší u MDS pacientů ve srovnání se zdravými dárci (Obr. 17).



Obr. 17: ***Koncentrace analyzovaných aminothiolů v plazmě MDS pacientů a zdravých dárců.*** *Koncentrace celkového cysteinu (total cysteine, t-C), homocysteinu (total homocysteine, t-H), cysteinylglycinu (total cysteinylglycine, t-CG) a celkového glutathionu (total glutathione, t-G) v plazmě MDS pacientů (syté sloupce) a zdravých dárců (světlé sloupce) se signifikantně lišila u všech analyzovaných aminothiolů. Data jsou vyjádřena jako průměr ± SD a byla hodnocena oboustranným t-testem, P<0,05.*

V plazmě pacientů s MDS byla nalezena signifikantně snížená koncentrace dusitanů (P<0,001). Hladiny dusičnanů a malondialdehydu se v plazmě pacientů MDS a zdravých dárců signifikantně nelišily. Hladiny feritinu převyšovaly horní hranici referenčního intervalu. Koncentrace železa a GGT spadaly do referenčního intervalu.

5.1.2. Oxidační parametry u MDS v souvislosti s diagnózami a klinickými projevy

Vzorky MDS pacientů byly rozděleny na základě diagnóz a společných klinických projevů do čtyř skupin (1-4). Přehled analyzovaných skupin je uveden v tabulce (Tab. 5). Jednotlivé skupiny (1-4) včetně skupiny kontrolní (0) byly mezi sebou vzájemně porovnány pomocí statistické metody ANOVA. Jak znázorňuje tabulka (Tab. 7), byly ve sledovaných skupinách nalezeny signifikantní rozdíly v hladinách celkového cysteinylglycinu (P=0,03) a dusitanů (P=0,02).

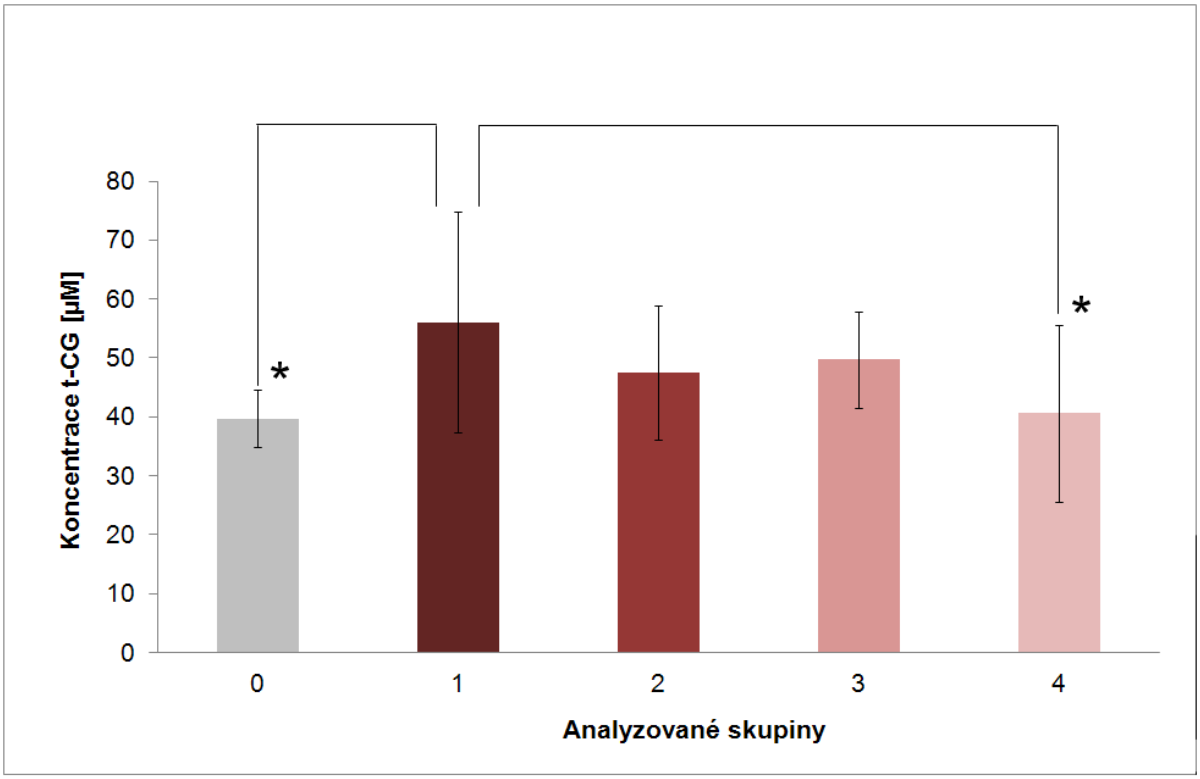
Tab. 7

Parametry oxidačního stresu v kontrolní skupině (0) a čtyřech MDS podskupinách (1-4). Jsou ukázány průměrné hodnoty ± SD, Data byla analyzována ANOVA testem a pro nalezené signifikantní rozdíly jsou ukázány hodnoty *P*.

	Analyzované skupiny					***P* hodnota**
Analyzované sloučeniny	**0**	**1**	**2**	**3**	**4**	
t-C [µM]	219,49 ± 13,83	300,49 ± 57,48	283,96 ± 70,58	274,30 ± 56,29	268,18 ± 89,73	
t-H [µM]	9,45 ± 0,63	11,73 ± 4,87	17,12 ± 14,51	13,50 ± 3,17	11,38 ± 4,75	
t-CG [µM]	39,71 ± 4,86	56,09 ± 18,81	47,54 ± 11,41	49,70 ± 8,15	40,59 ± 14,95	* 0,032
t-GSH [µM]	9,07 ± 1,55	8,36 ± 4,27	6,83 ± 2,88	7,25 ± 4,89	6,26 ± 3,22	
MDA [µM]	0,70 ± 0,12	0,99 ± 0,51	0,74 ± 0,25	0,92 ± 0,31	0,71 ± 0,15	
NO_2^- [nM]	1185,00 ± 92,62	960,00 ± 275,20	890,00 ± 225,33	827,00 ± 108,05	945,78 ± 173,65	* 0,021
NO_3^- [µM]	34,80 ± 11,16	33,14 ± 13,87	37,47 ± 20,32	29,29 ± 18,91	20,78 ± 6,91	
Feritin [µg/l]	Ref, R,: 22-322	1569,7 (49,9-8602,0)	330,02 (24,1-1875,9)	1681,03 (51,6-2776,4)	249,98 (101,0-2163,7)	
Fe [µM]	Ref, R,: 7,2-29	38,19 (15,0-40,8)	25,23 (6,6-45,5)	29,44 (6,9-48,3)	19,51 (14,3-39,0)	
GGT [µkat/l]	Ref, R,: 0,14-0,8	0,75 (0,14-1,54)	0,70 (0,15-2,84)	0,60 (0,38-0,82)	0,42 (0,1-0,91)	

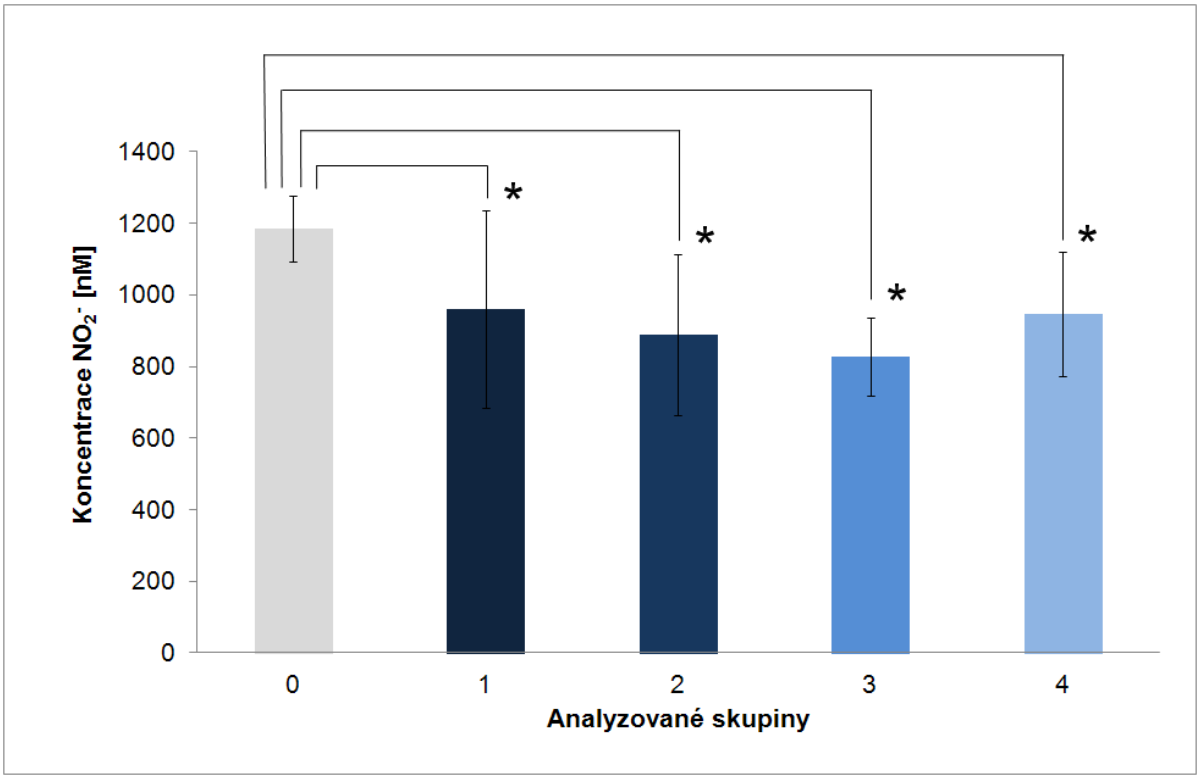
Celkový cystein (total cysteine, t-C), celkový cysteinylglycin (total cysteinylglycine, t-CG), celkový homocystein (total homocysteine, t-H), celkový glutathion (total glutathione, t-GSH),malodialdehyd (MDA), γ-glutamyltranferasa (GGT).

Post hoc analýzou (Duncan test) jsme zjistili, že hladiny t-CG byly signifikantně zvýšené u MDS podskupiny 1 vzhledem ke skupině 4 a skupině zdravých dárců (Obr. 18). Hladiny ostatních aminothiolů: celkového cysteinu (total cysteine, t-C) a celkového homocysteinu (total homocystein, t-H) byly také zvýšené ve všech MDS podskupinách vzhledem ke zdravým dárcům. Nejvyšší hladiny byly nalezeny u podskupiny 1, případně 2. Nicméně tato data nebyla signifikantní.



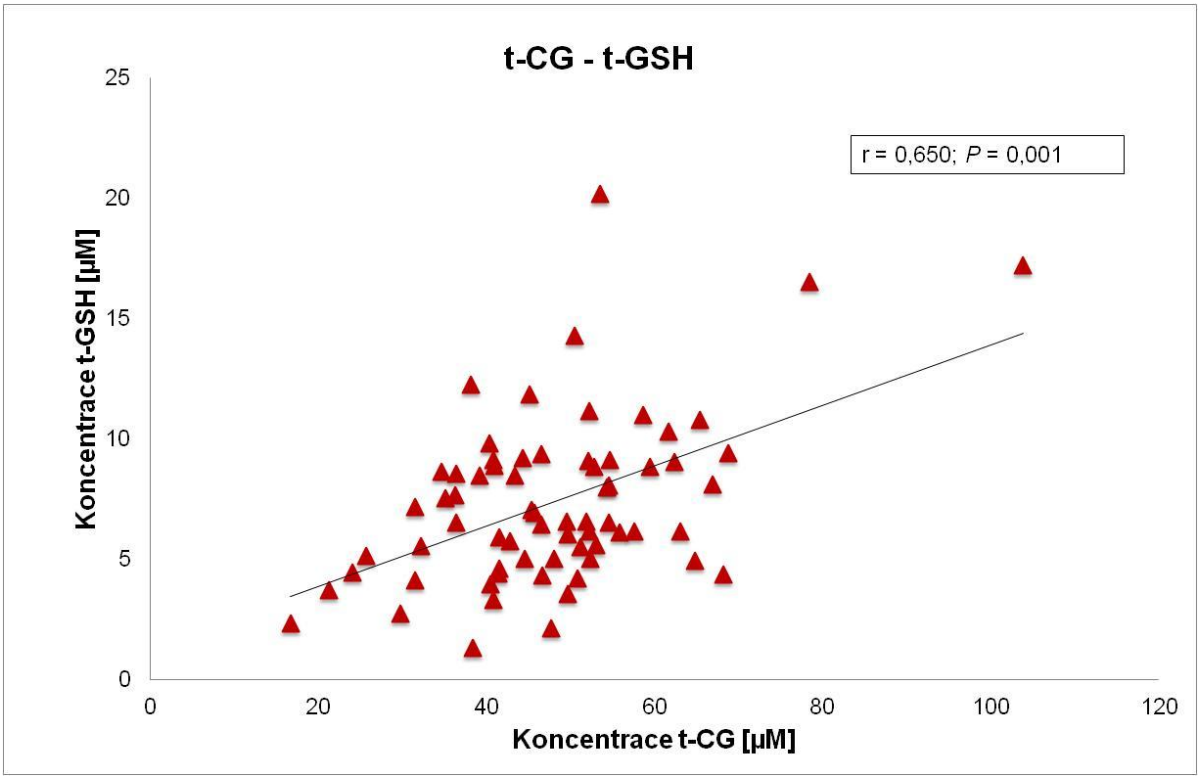
Obr. 18: ***Koncentrace celkového cysteinylglycinu v plazmě MDS pacientů a zdravých dárců.*** *Data jsou znázorněna jako průměry ± SD. Hladina cysteinylglycinu se signifikantně (P=0,03) lišila mezi skupinami (ANOVA test). * Statistická signifikance rozdílů mezi skupinou 1 a skupinami 0 a 4 (post hoc ANOVA testy, Duncan, P<0,05).*

Stejnou *post hoc* analýzou se ukázalo, že hladiny dusitanů byly signifikantně snížené u všech podskupin MDS vzhledem ke zdravým dárcům (Obr. 19). Koncentrace dusičnanů se významně nelišila mezi skupinami. Hladiny malondialdehydu byly mírně zvýšené v podskupinách 1 a 3, ale ne signifikantně. Plazmatické koncentrace železa a feritinu se také signifikantně nelišily mezi skupinami.

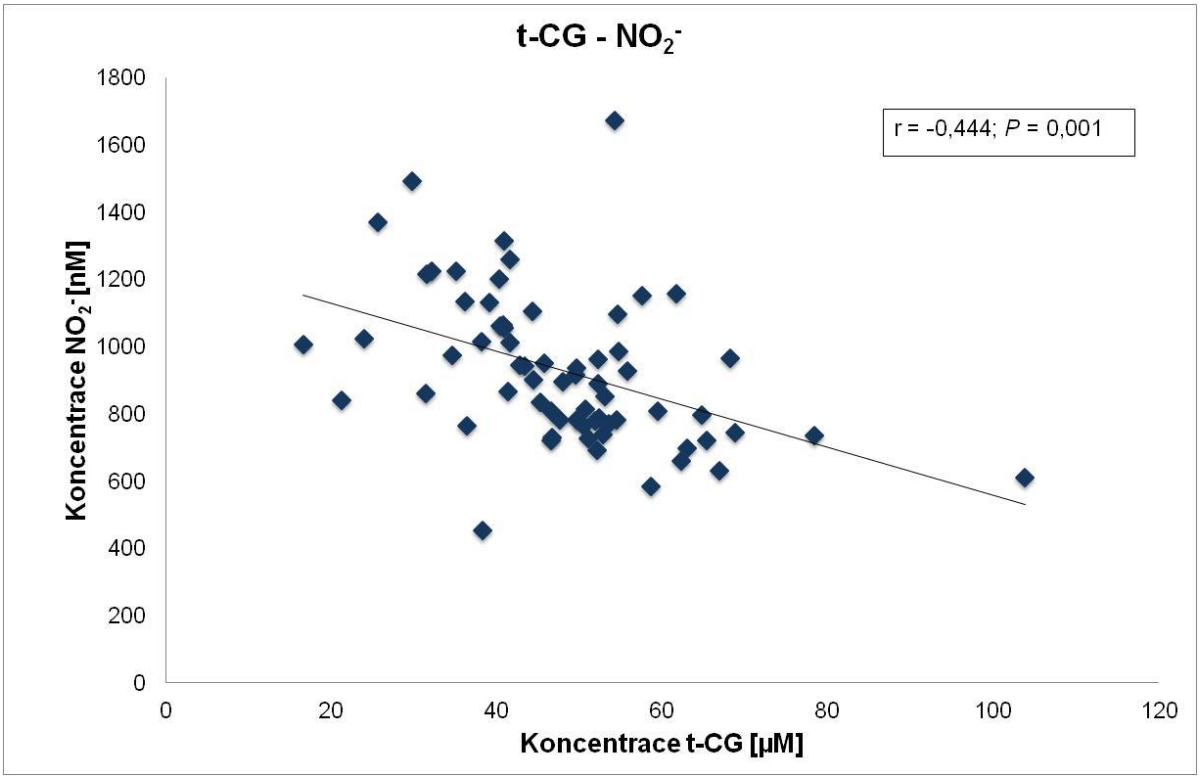


Obr. 19: ***Koncentrace dusitanů v plazmě MDS pacientů a zdravých dárců.*** *Data jsou znázorněna jako průměry ± SD. Hladina dusitanů se signifikantně (P=0,02) lišila mezi skupinami (ANOVA test). *Statistická signifikance mezi skupinami 1-4 a skupinou zdravých dárců (post hoc ANOVA testy, Duncan, P<0,05).*

Za použití Pearsonova korelačního testu jsme nalezli silnou pozitivní korelaci mezi hladinami celkového cysteinylglycinu (total cysteinylglycine, t-CG) a celkového glutathionu (total glutathione, t-GSH) (r=0,65, *P*=0,001) (Obr. 20). Navíc jsme zjistili, že hladiny t-CG korelovaly středně silně s dusitany (r=-0,41, *P*=0,005) (Obr. 21).



Obr. 20: ***Korelace cysteinyglycinu (t-CG) s glutathionem (t-GSH).*** *Hladina celkového cysteinylglycinu v plazmě signifikantně (P=0,001) silně korelovala (r=0,650) s hladinou celkového glutathionu (Pearsonův korelační test).*

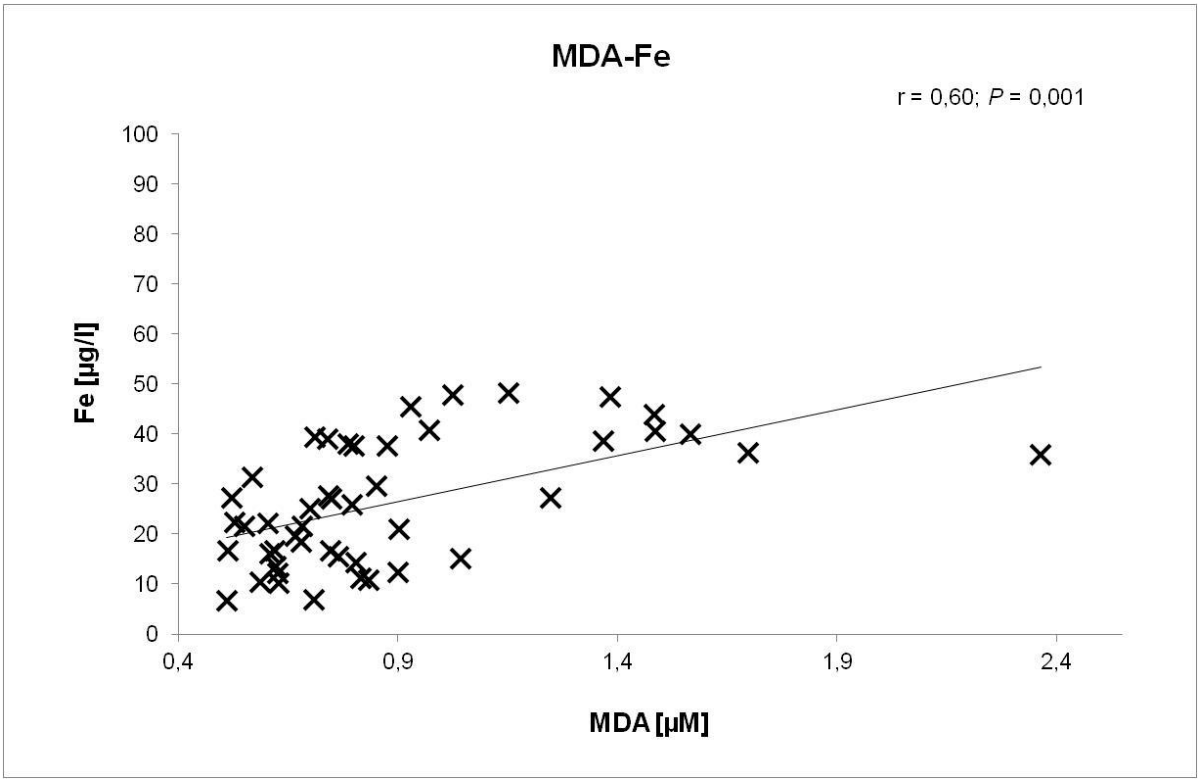


Obr. 21: ***Korelace cysteinyglycinu (t-CG) s dusitany (NO_2^-).*** *Hladina cysteinylglycinu v plazmě signifikantně (P=0,001) středně negativně korelovala (r=-0,444) s hladinou dusitanů (Pearsonův korelační test).*

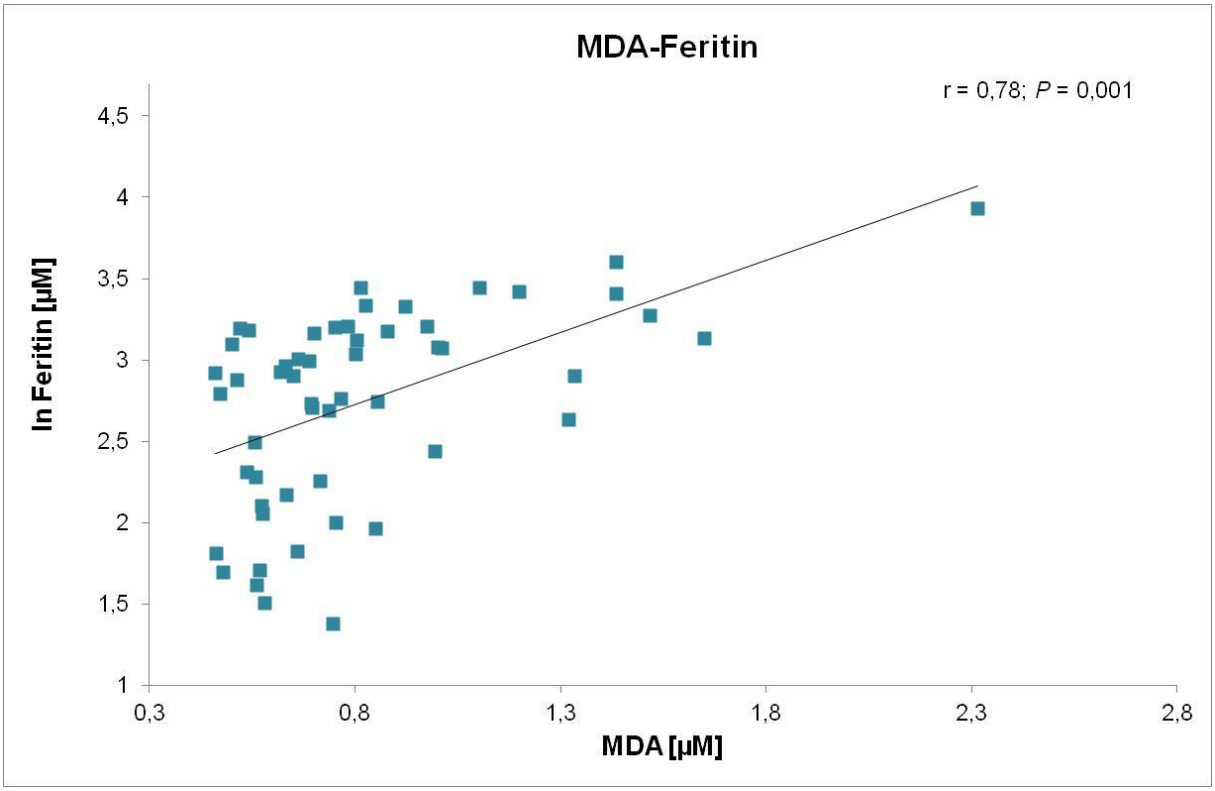
5.1.3. Oxidační parametry v souvislostech s přetížením železem u MDS

Průměrná hladina železa u pacientů s MDS 26,15 (6,60 – 48,30) µM spadala do referenční meze, která je 7,2 – 29 µM. Zatímco průměrná hladina feritinu 557,18 (24,10 – 8602,20) µg/l u MDS pacientů převyšovala referenční mez 22 – 322 µg/l. Hladiny železa a feritinu se signifikantně nelišily mezi skupinami 1-4 (Tab. 7). Pacienty jsme rozdělili vzhledem k možnému riziku přetížení železem na pacienty, kteří vyžadovali chelatační terapii (CH) (16) (Exjade nebo Ferriprox) a skupinu pacientů, kteří chelatační léčbu nepotřebovali (non-CH) (30). Aplikací oboustranného *t*-testu jsme zjistili, že hladiny železa (*P*=0,001) i feritinu (*P*=0,006) byly signifikantně zvýšené ve skupině CH v porovnání se skupinou non-CH. Navíc jsme nalezli signifikantně (*P*=0,001) zvýšené hladiny malondialdehydu u skupiny CH ve srovnání se skupinou non-CH. Nicméně nenašli jsme žádné signifikantní rozdíly

v hladinách aminothiolů a NOx mezi skupinami. Dále pak byli pacienti rozděleni do dvou skupin na pacienty, kteří dostávali pravidelně krevní transfuze (T) (19), a netransfundované pacienty (non-T) (30) a pomocí oboustranného *t*-testu jsme hledali rozdíly v parametrech oxidačního stresu. Nalezli jsme signifikantně zvýšené hladiny železa (*P*=0,004) a malondialdehydu (*P*=0,013) u pacientů T vzhledem ke skupině pacientů non-T. Nicméně v ostatních parametrech se skupiny T a non-T nelišily. Použitím Pearsonova korelačního testu jsme zjistili, že zatímco aminothioly ani NOx nekorelovaly s hladinami plazmatického železa/feritinu, hladiny malondialdehydu silně korelovaly s hladinami železa (r=0,60; *P*=0,001) (Obr. 22) i feritinu (r=0,78; *P*=0,001) (Obr. 23).



Obr. 22: ***Korelace malondialdehydu (MDA) s hladinami železa (Fe).*** *Hladina malondialdehydu signifikantně (P=0,001) silně korelovala s hladinami železa (r=0,60) v plazmě MDS pacientů a zdravých dárců. (Pearsonův korelační test).*



Obr. 23: ***Korelace malondialdehydu (MDA) s feritinem.*** *Hladina malondialdehydu signifikantně (P=0,001) silně korelovala (r=0,78) s hladinami feritinu v plazmě MDS pacientů a zdravých dárců. (Pearsonův korelační test).*

5.1.4. Vliv asymetrického dimethylargininu na oxidační status MDS

Do studie byli zařazeni pacienti s MDS a zdraví dárci ve středním věku (průměr 44 let). Přehled analyzovaných subjektů uvádí tabulka (Tab. 8).

Tab. 8

Přehled pacientů pro detekci derivátů argininu.

Vzorky (počet)	**Věk**	**Pohlaví (M/Z)**
MDS (20)	33-59	(11/9)
Zdraví (16)	37-67	(8/8)

Z – žena

M – muž

Hladiny sérového železa a feritinu byly mírně zvýšené u MDS pacientů v porovnání se zdravými dárci. Přehled hodnot derivátů argininu, MDA a dusitanů je uveden v tabulce (Tab. 9).

Tab. 9

Sérové hladiny derivátů argininu, železa a feritinu u zdravých dárců a MDS pacientů. Data jsou uvedena jako průměry ± směrodatná odchylka (SD). Signifikantní rozdíly mezi MDS pacienty a zdravými dárci jsou označeny *. Data byla analyzována oboustranným *t*-testem.

Analyzované sloučeniny	**Zdraví dárci (n=16)**	**MDS pacienti (n=20)**
ADMA [μM]	0,56 ± 0,16	0,84 ± 0,32**
SDMA [μM]	0,42 ± 0,14	0,54 ± 0,18*
MMA [μM]	0,10 ± 0,03	0,14 ± 0,05*
Homoarginin [μM]	2,32 ± 1,26	1,77 ± 1,06*
Citrulin [μM]	42,19 ± 12,31	46,68 ±14,96
MDA [μM]	0,52 ± 0,07	0,77 ± 0,11***
NO_2^- [mM]	2,16 ± 0,32	1,71 ± 0,46**
Feritin [μg/l]	Ref. R.: 22-322	641,2 (8,9-1907,3)
Fe [μM]	Ref. R.: 7,2-29	22,3 (11,4-43,3)

****P < 0,001*

***P < 0,005*

**P < 0,05*

Nalezli jsme signifikantně zvýšenou hladinu ADMA, SDMA, MMA a MDA v séru MDS pacientů. Hladina dusitanů byla signifikantně snížená u MDS pacientů v porovnání se zdravými dárci. Koncentrace ADMA silně pozitivně korelovala s koncentrací MMA (r=0,87;

P<0,001) a SDMA (r=0,7; *P*<0,001). Koncentrace ADMA mírně pozitivně korelovala s hladinami MDA (r=0,50; *P*=0,006).

5.2. OXIDAČNÍ MODIFIKACE PROTEINŮ

5.2.1. Karbonylace

Koncentrace karbonylovaných proteinů byla měřena v depletované plazmě šesti pacientů s MDS (1-6) a šesti zdravých dárců (7-12). Přehled pacientů a zdravých dárců použitých ve studii je uveden v tabulce (Tab. 10). V plazmě pacientů s MDS byla celková karbonylace proteinů o 20% vyšší než u zdravých dárců. Použitím oboustranného *t*-testu byl nalezený rozdíl vyhodnocen jako signifikantní (*P*<0,01).

Tab. 10

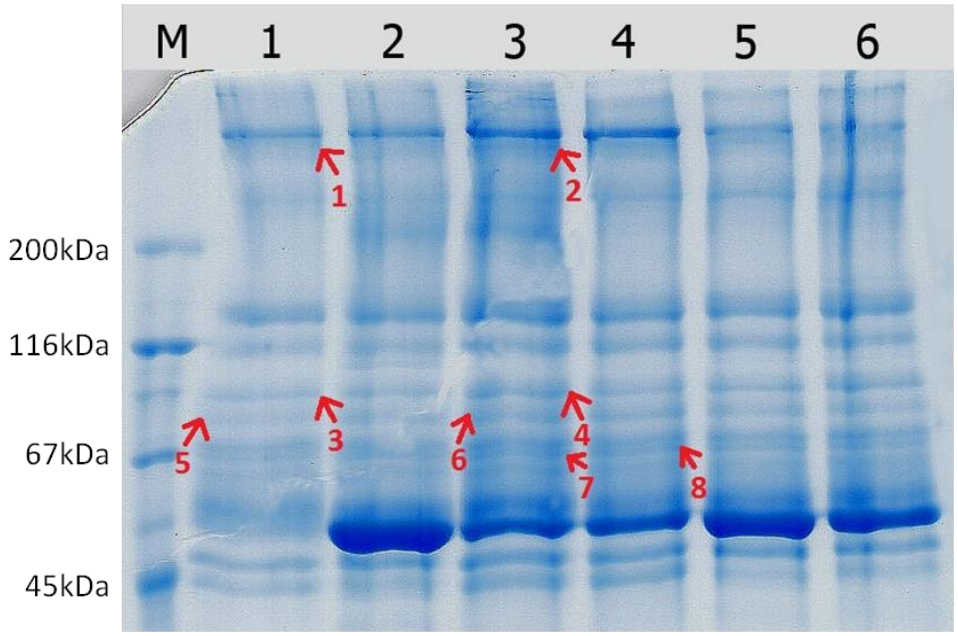
Přehled pacientů pro detekci karbonylovaných proteinů.

Vzorky (č. pacienta)	**Věk**	**Pohlaví (M/Z)**	**Diagnózy**
MDS (1-6)	51-78	(2/4)	RARS, RAEB-I, RAEB-II
Zdraví (7-12)	25-57	(3/3)	

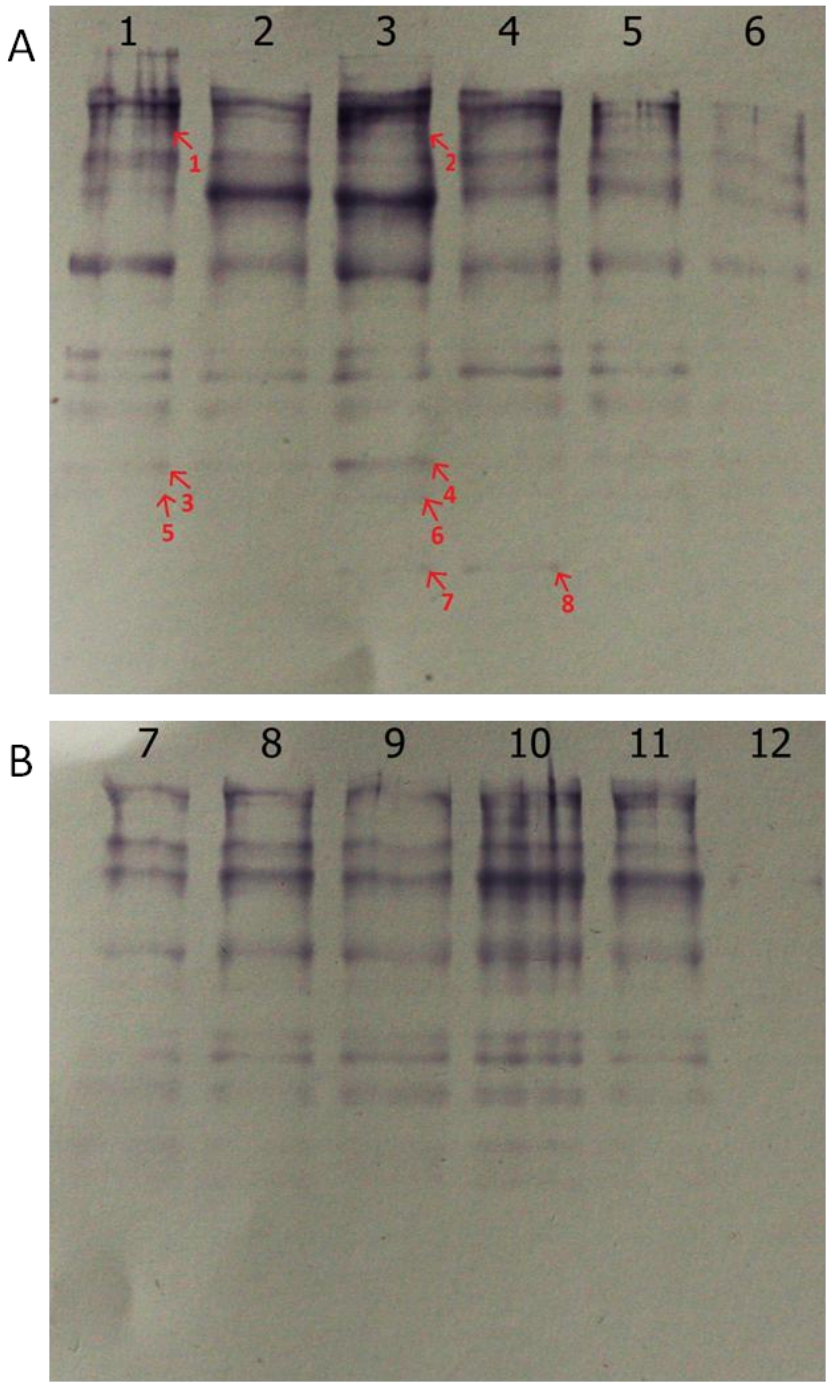
Z – žena

M – muž

Na obrázku (Obr. 24) jsou šipkami znázorněny proteiny rozdělené metodou SDS PAGE. Po imunochemické detekci byly u MDS pacientů nalezeny zóny obsahující karbonylované proteiny, které byly u kontrolních vzorků méně intenzivní nebo se u nich nenacházely (Obr. 25). Nalezené zóny obsahovaly směs proteinů s podobnou migrací, mezi nimiž byly i karbonylované proteiny. Směs těchto proteinů v zónách, které se nacházely pouze u MDS pacientů nebo u nich byly intenzivnější (Obr. 25: A zóna 1-8), byla identifikována. Bylo identifikováno 16 různých proteinů (Tab. 11).



Obr. 24: ***Plazmatické proteiny MDS pacientů.*** *Proteiny v depletované plazmě MDS pacientů (1-6) byly rozděleny pomocí SDS PAGE na gradientových gelech (5-15%) a vizualizovány pomocí koloidní Coomasie Blue. Červené šipky označují zóny proteinů určených k identifikaci.*



Obr. 25: ***Imunochemická detekce karbonylovaných proteinů u MDS pacientů (A) a zdravých dárců (B).*** *Po rozdělení proteinů na SDS PAGE byly proteiny přeneseny na PVDF membránu. Karbonylované proteiny byly detegovány imunochemicky (anti-DNP protilátkou a chromogenním substrátem). Zóny obsahující směs proteinů s podobnou migrací, mezi nimiž se nacházely i karbonylované proteiny, u MDS pacientů (A), které se u zdravých dárců (B) nenacházely nebo byly méně intenzivní, jsou označeny červenými šipkami (A: 1-8). Tento soubor proteinů byl identifikován.*

Tab. 11

Přehled identifikovaných proteinů v plazmě MDS pacientů. Minimální skóre peptidů pro úspěšnou identifikaci byly 2 jednotlivé peptidy.

Číslo vzorku	**Protein**	**AC**	**Počet peptidů**	**SC %**
1, 2	Apolipoprotein B-100	P04114	29	9
	Alpha-2-macroglobulin	P01023	14	13
	Fibrinogen beta chain	P02675	6	19
3, 4	Complement factor B	P00751	7	9
	Complement component C6	P13671	5	6
	Complement C2	P06681	4	7
5, 6	Gelsolin	P06396	5	10
	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H1	P19827	3	5
	Plasma protease C1 inhibitor	P05155	2	6
7, 8	Alpha-1-antichymotrypsin	P01011	6	20
	Afamin	P43652	5	11
	histidine rich glycoprotein	P04196	4	10
	Ceruloplasmin	P00450	5	6
	hemopexin	P02790	2	6
	N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase	Q96PD5	5	14
	vitronectin	P04004	4	12

AC – identifikační číslo proteinu dle databáze Swiss-Prot

SC % – procentuální pokrytí sekvence

Počet peptidů – počet jednotlivých peptidů splňujících minimální hodnotu skóre pro identitu

5.2.2. S-nitrosylace

S-nitrosylace byla studována na krevních destičkách pacientů s MDS a zdravých dárců. Vzorky plné krve byly získány od pěti MDS pacientů ve věku (56-72 let a pěti zdravých dárců (27-57 let) (Tab. 12).

Tab. 12

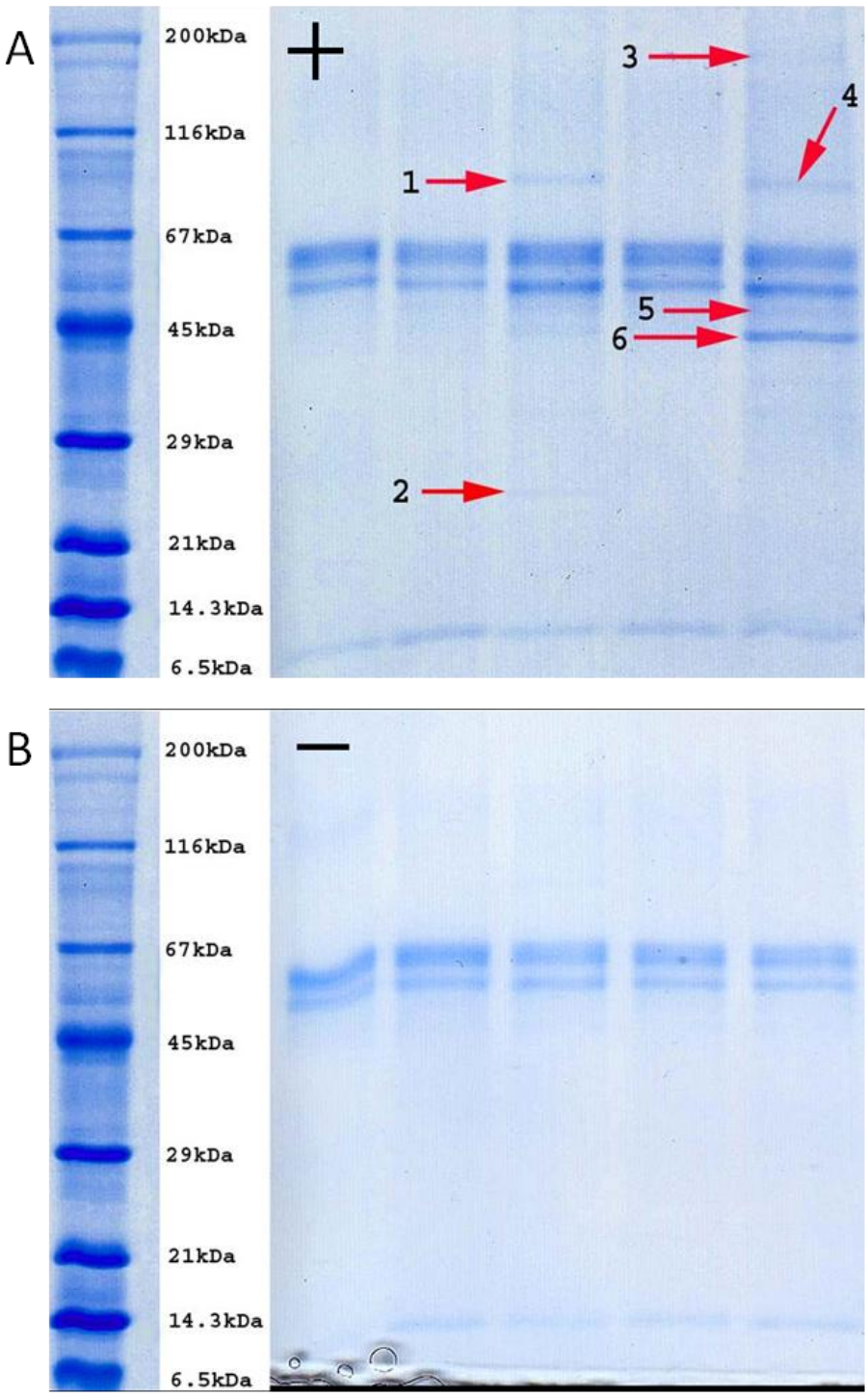
Přehled MDS pacientů a počet destiček pro detekci S-nitrosylovaných proteinů.

Č. pacienta	Věk	Pohlaví	Diagnóza	Počet destiček [tis/µl]
1	60	M	Jiné MDS	110
2	65	M	MDS/MPD	neměřeno
3	56	Z	RCMD	225
4	72	M	RAEB-I	42
5	65	M	RCMD	291

Z – žena

M – muž

Bylo identifikováno 5 různých S-nitrosylovaných proteinů (Obr. 26) (Tab. 13).



Obr. 26: ***S-nitrosylované proteiny krevních destiček MDS pacientů a zdravých dárců.*** *Po vyizolování byly S-nitrosylované proteiny krevních destiček u MDS pacientů (1-5) rozděleny pomocí SDS PAGE na gradientových gelech (5-15%). Byla provedena negativní kontrola (B). Červené šipky (A: 1-6) označují zóny S-nitrosylovaných proteinů, které byly identifikovány.*

Tab. 13

Přehled identifikovaných S-nitrosylovaných proteinů v krevních destičkách MDS pacientů. Minimální skóre peptidů pro úspěšnou identifikaci byly 2 jednotlivé peptidy.

Č. vzorku	Protein	AC	Počet peptidů	SC %
1	Fibrinogen gamma chain	P02679	5	10
2	o			
3	o			
4	Desmoglein-1	Q02413	6	3
	Serum albumin	P02768	4	7
5	Actin, cytoplasmic 1	P60709	7	21
	Actin, cytoplasmic 2	P63261	7	21
6	o			

AC – identifikační číslo proteinu dle databáze Swiss-Prot

SC % – procentuální pokrytí sekvence

Počet peptidů – počet jednotlivých peptidů splňujících minimální hodnotu skóre pro identitu

5.3. PROTEIN-PROTEIN INTERAKCE U MDS

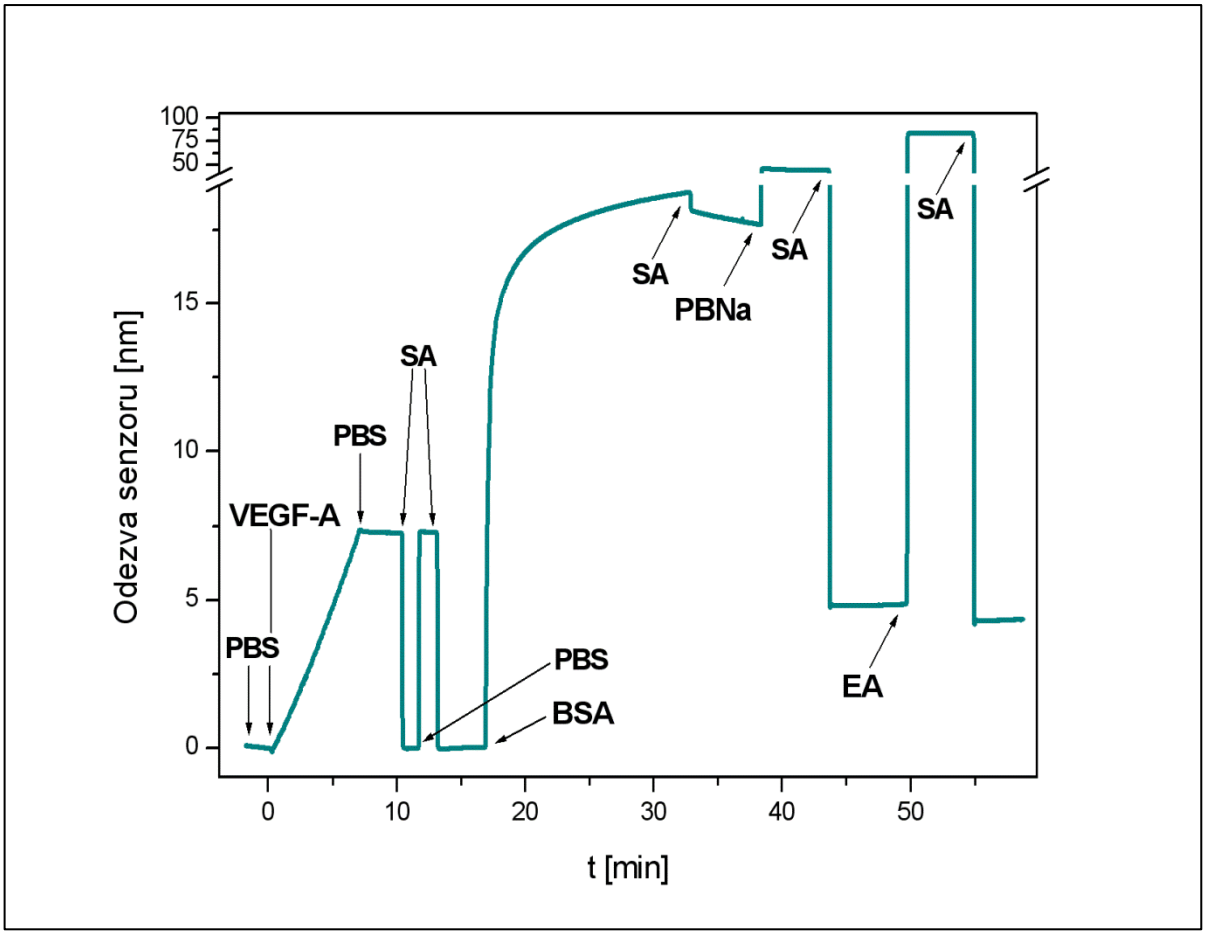
Druhá část práce se zabývala studiem protein-protein interakcí v plazmě MDS pacientů pomocí metody SPR.

5.3.1. SPR biosenzor pro detekci VEGFR-1

Byla vyvinuta metoda pro specifickou a citlivou detekci požadovaného proteinu (MDS markeru – VEGFR-1) pomocí jeho fyziologického interakčního partnera (VEGF-A) za použití SPR.

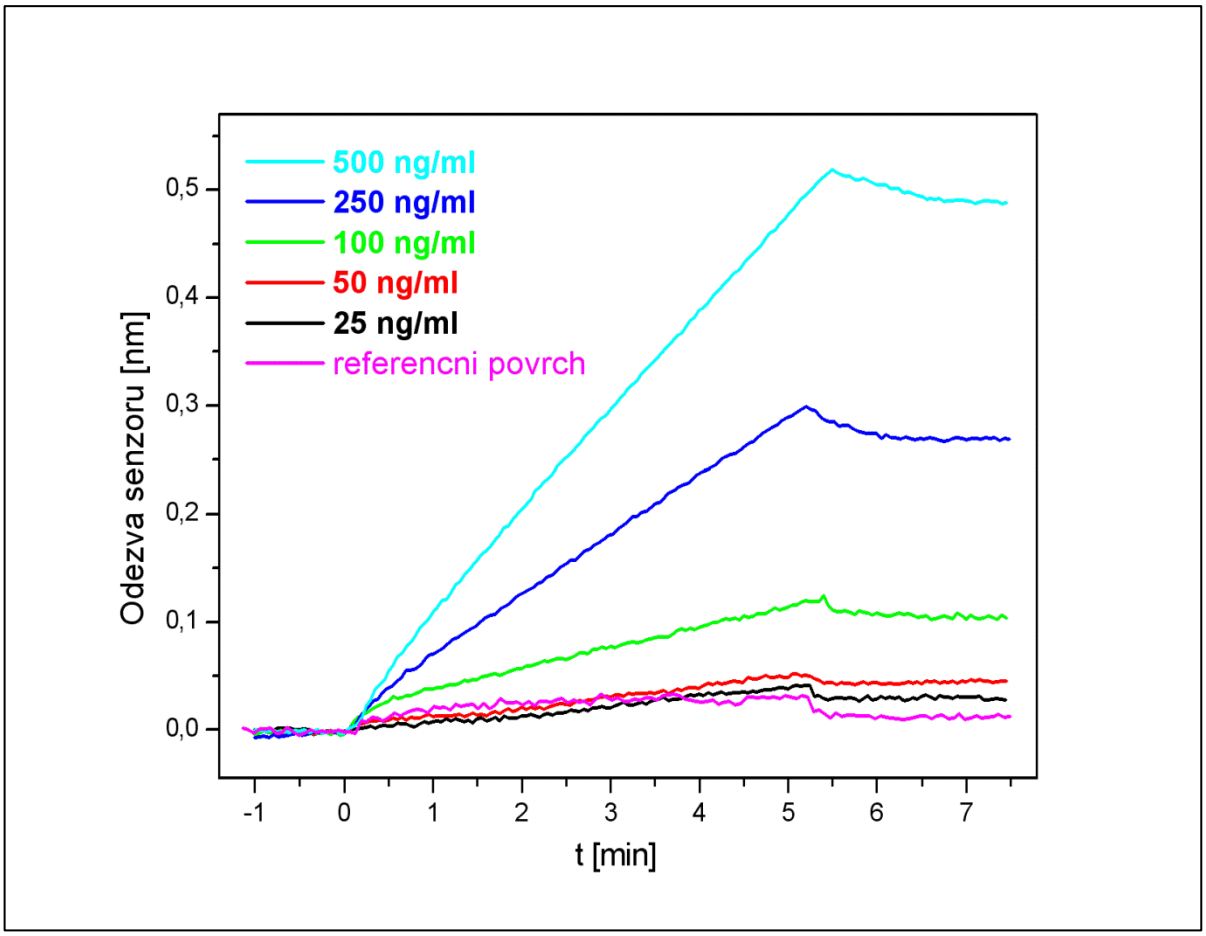
Odpověď senzoru na imobilizovaný VEGF-A byla 7 nm, což odpovídá ~119 ng/cm^2 proteinu na povrchu. Odezva senzoru na kovalentně navázaný BSA byla 3,5 nm, což odpovídá ~60 ng/cm^2. Tudíž výsledné pokrytí povrchu VEGF-A a BSA bylo v poměru 2:1 (Obr. 27). Stabilita ukotveného VEGF-A byla ověřována omytím senzoru PBNa pufrem.

Nepozorovali jsme změnu v odezvě senzoru, z čehož vyplývá, že ukotvení VEGF-A na povrch bylo stabilní.



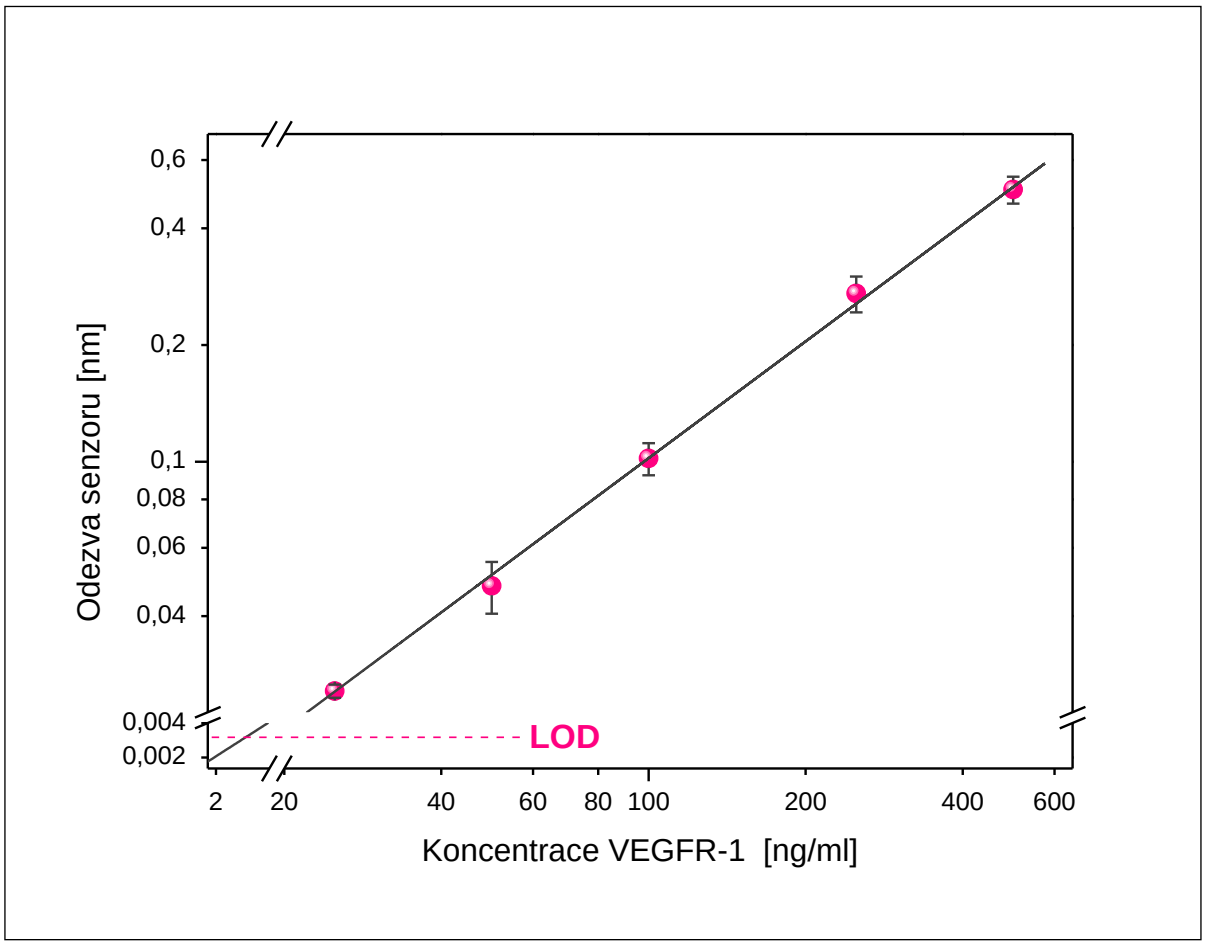
Obr. 27: ***Imobilizace VEGF-A.*** *Odezva senzoru na imobilizaci vaskulárního endoteliálního růstového faktoru (VEGF-A) ve fosfátovém pufru (PBS) na povrch čipu funcionalizovaného samoskladnou monovrstvou alkylthiolů a následné dovysycení hovězím albuminem (BSA) v acetátovém pufru (sodium acetate, SA), odmytí nekovalentně navázaných molekul pomocí PBNa a deaktivací povrchu ethanolaminem (EA).*

Interakce mezi VEGFR-1 a VEGF-A imobilizovaném na povrchu byla ověřena inkubací senzoru s různými koncentracemi VEGFR-1 v PBS pufru (v rozmezí 25 – 500 ng/ml). Jak je vidět na obrázku (Obr. 28), vazba VEGFR-1 na VEGF-A byla stabilní, specifická a koncentračně závislá.



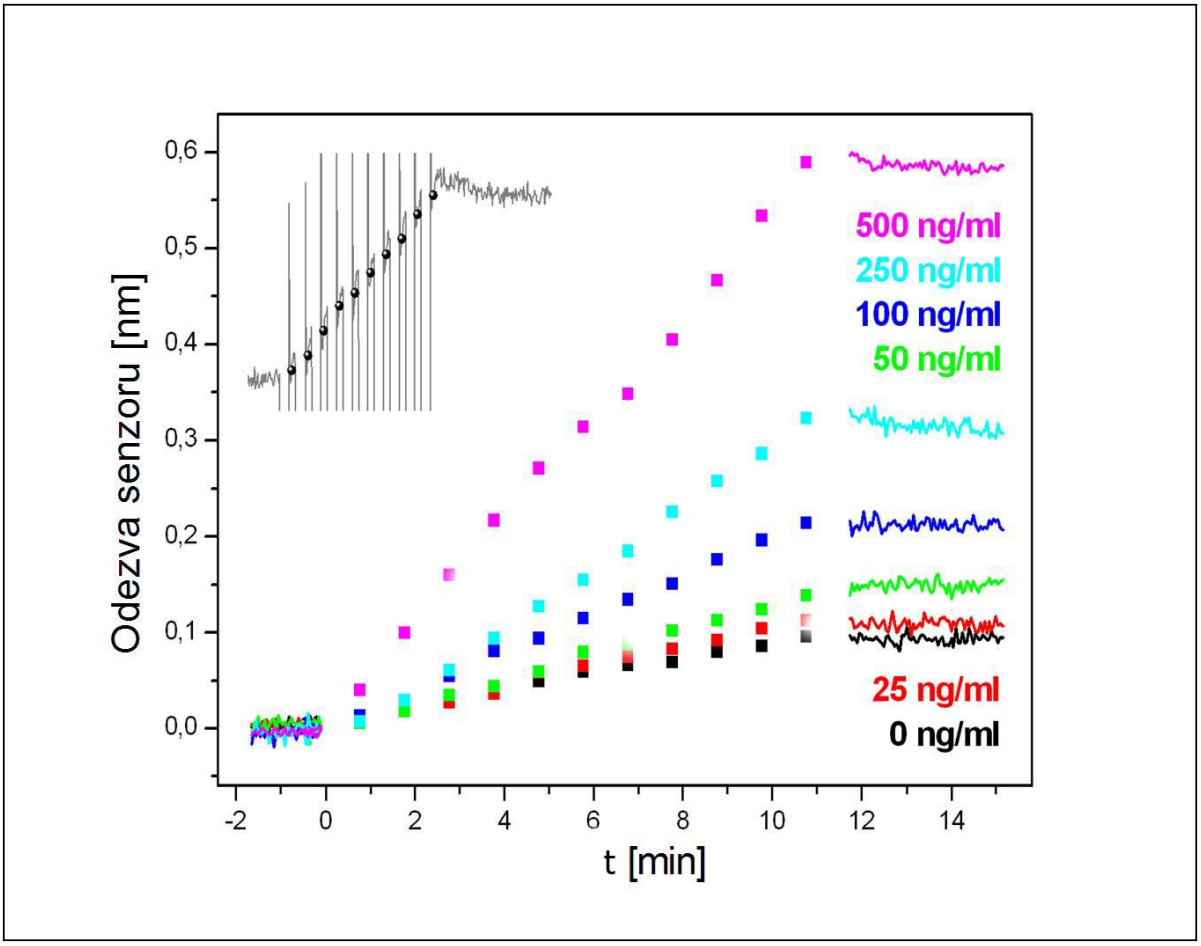
Obr. 28: ***Detekce VEGFR-1 v pufru.*** *Odezva senzoru na pět různých koncentrací VEGFR-1 interagujícího s VEGF-A imobilizovaným na povrch v detekčních kanálech a s povrchem pokrytým pouze BSA v referenčním kanále.*

Experiment byl opakován pro každou koncentraci ve 3 kanálech, reprodukovatelnost na čipu byla 85 % - 95 %. Reprodukovatelnost jednotlivých měření byla 88 % - 95 %. Byla sestavena kalibrační křivka pro detekci VEGFR-1 pomocí VEGF-A v pufru s limitem detekce 3 ng/ml (Obr. 29). Limit detekce byl definován jako koncentrace VEGFR-1, která vyvolá odpověď senzoru rovnou trojnásobku standartní chyby šumu signálu (3 x 0,9 pm).



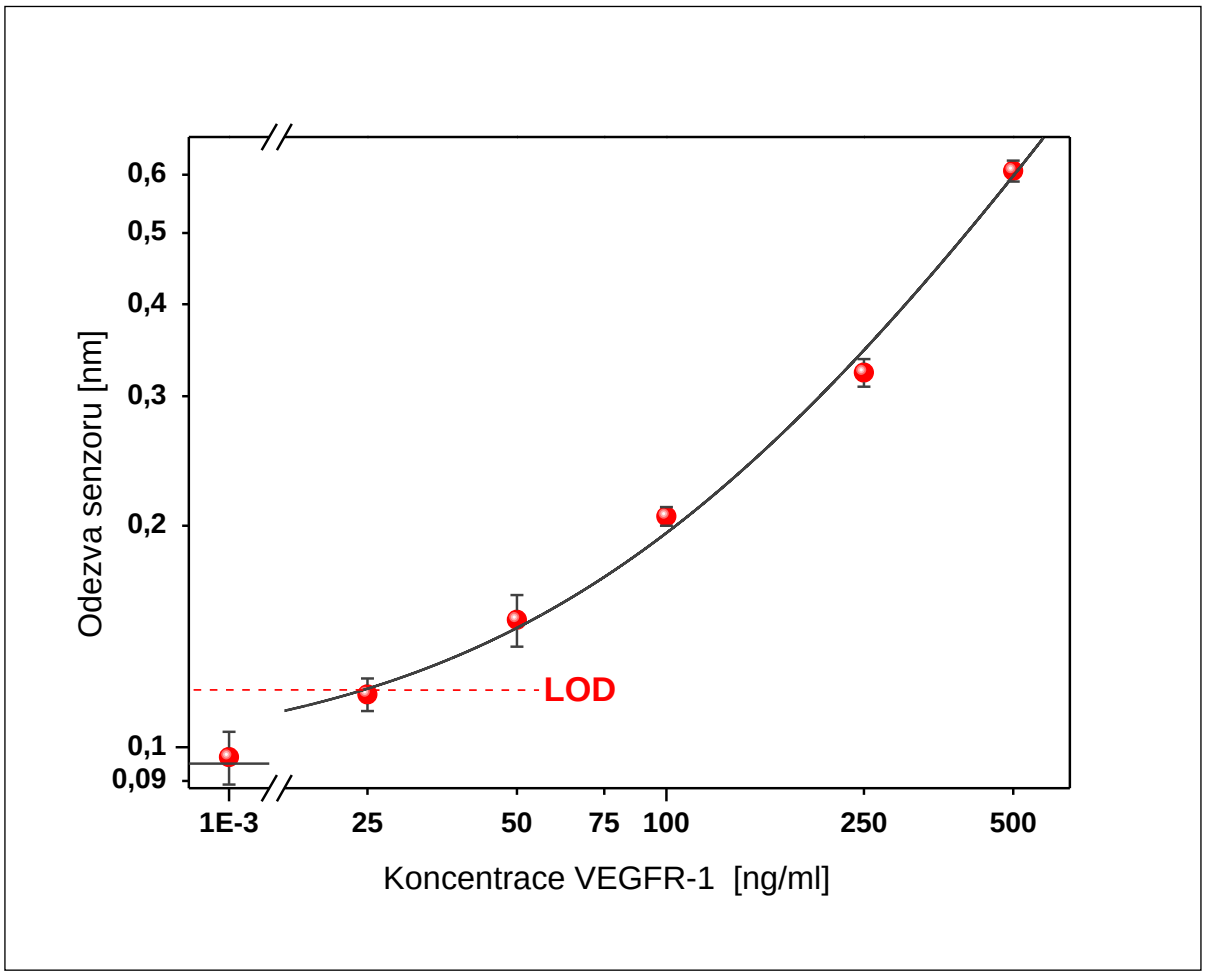
Obr. 29: ***Kalibrační křivka pro detekci VEGFR-1 v pufru.*** *Odezva senzoru korespondující s limitem detekce je znázorněna horizontální křivkou (LOD).*

Dále byla interakce VEGFR-1 s VEGF-A testována v krevní plazmě. K 10% krevní plazmě chudé na destičky získané od zdravých dárců byl přidán VEGFR-1 v koncentracích 50 – 500 ng/ml a takto připravená plazma byla inkubována s povrchem senzoru s imobilizovaným VEGF-A. Bylo zjištěno, že BSA v pufru umožňoval redukovat nespecifickou interakci plazmatických proteinů s povrchem. BSA/PBNa pufr s vyšší iontovou silou zajišťoval odstranění nespecificky navázaných proteinů, ale zároveň nedocházelo k narušení vazby VEGFR-1 k imobilizovanému VEGF-A. Jako referenční kanál byl použit kanál s imobilizovaným VEGF-A, který byl inkubován s plazmou bez přidaného VEGFR-1 (Obr. 30).



Obr. 30: ***Detekce VEGFR-1 v plazmě.*** *Odezvy senzoru na různé koncentrace VEGFR-1 v 10% krevní plazmě. Malý vložený obrázek znázorňuje detekci pomocí metody přepínání mezi pufrem a vzorkem ve třiceti vteřinových intervalech (= jeden cyklus). Tečky kinetických křivek reprezentují hodnoty získané na konci každého cyklu.*

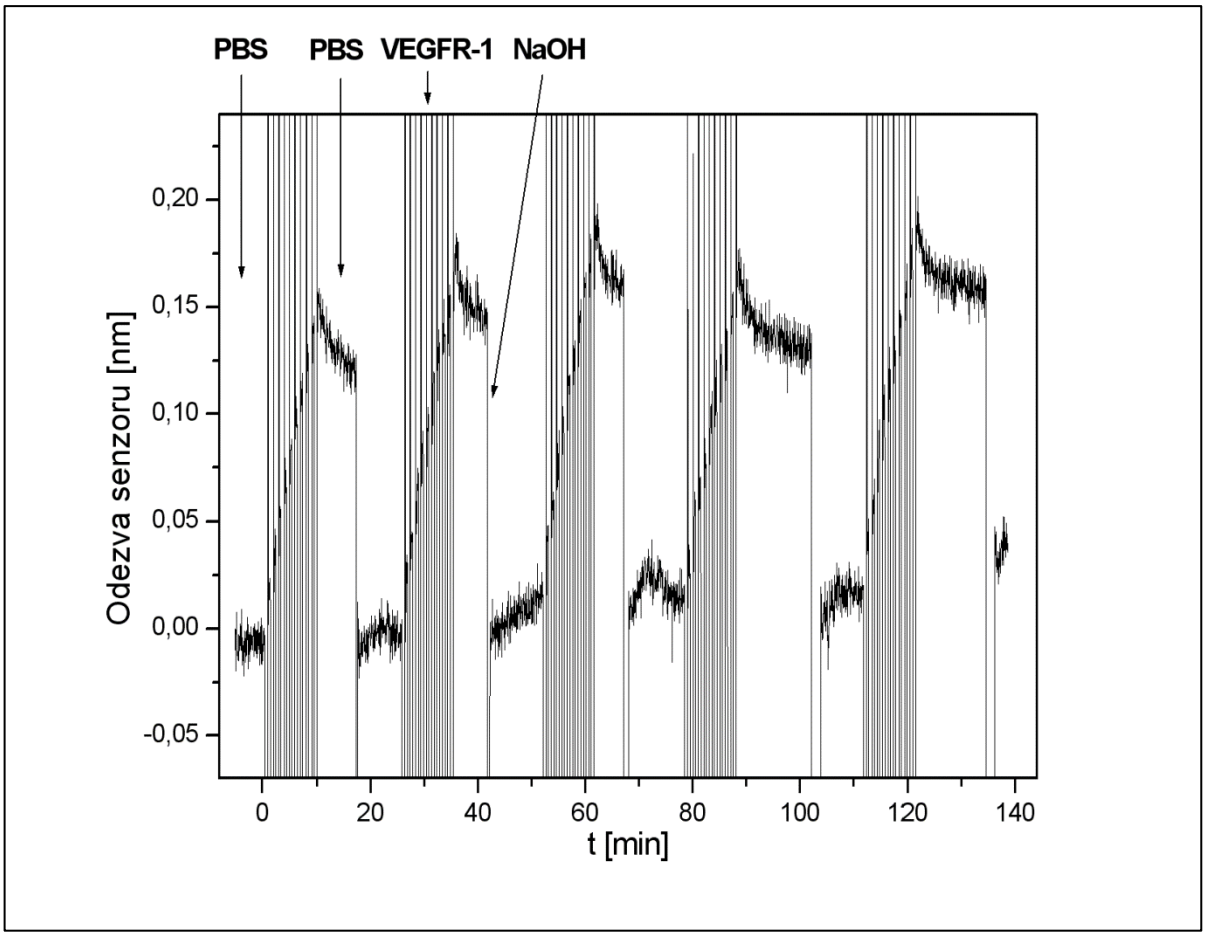
Pro detekci v plazmě byla použita metoda, při které byl povrch ve třiceti vteřinových intervalech střídavě inkubován s pufrem a plazmatickým vzorkem (= jeden cyklus). Proto jsou kinetické křivky znázorněny tečkami, čili hodnotami získanými na konci každého cyklu. Na obrázku (Obr. 30) je vidět, že získané křivky korespondovaly s těmi získanými při měření v pufru (Obr. 28) a odezvy odpovídaly různým koncentracím VEGFR-1 v plazmě. Kalibrační závislost detekce VEGFR-1 v 10% plazmě získaná z nejméně tří měření pro každou koncentraci je znázorněna na obrázku (Obr. 31) s limitem detekce 25 ng/ml.



Obr. 31: ***Kalibrační křivka pro detekci VEGFR-1 v plazmě.*** *Kalibrační závislost detekce VEGFR-1 v 10% krevní plazmě se znázorněným limitem detekce pomocí horizontální linky.*

Průměrná odezva v referenčním kanále (odezva 10% plazmy s BSA/PBS bez VEGFR-1 na povrch s imobilizovaným VEGF-A a BSA) byla 0,097 ± 0,008 nm, což odpovídalo velmi nízké koncentraci (1,7 ng/cm^2) nespecificky navázaných proteinů krevní plazmy na povrch.

Dále jsme testovali opakovanou použitelnost čipu. VEGFR-1 byl odmýván z povrchu 10 mM NaOH a seznor byl použit pro další detekční cyklus. Experimenty ukázaly, že po odmytí je vazebná kapacita VEGF-A zachována a reprodukovatelnost po pěti detekčních cyklech byla vyšší než 92 % (Obr. 32).



Obr. 32: ***Regenerace čipu.*** *Regenerace čipu pomocí 10mM NaOH a následná detekce VEGFR-1 v 10% krevní plazmě o koncentraci 50 ng/ml v pěti cyklech.*

5.3.2. Detekce VEGFR-1 v depletované plazmě

Zjistili jsme, že z testovaných deplečních technik, nejvíce snížila nespecifickou odezvu povrchu ke krevní plazmě deplece pomocí kolony Hu14. Tabulka (Tab. 14) uvádí přehled identifikovaných proteinů, jejichž vazba na povrch tvořila nespecifickou odezvu senzoru.

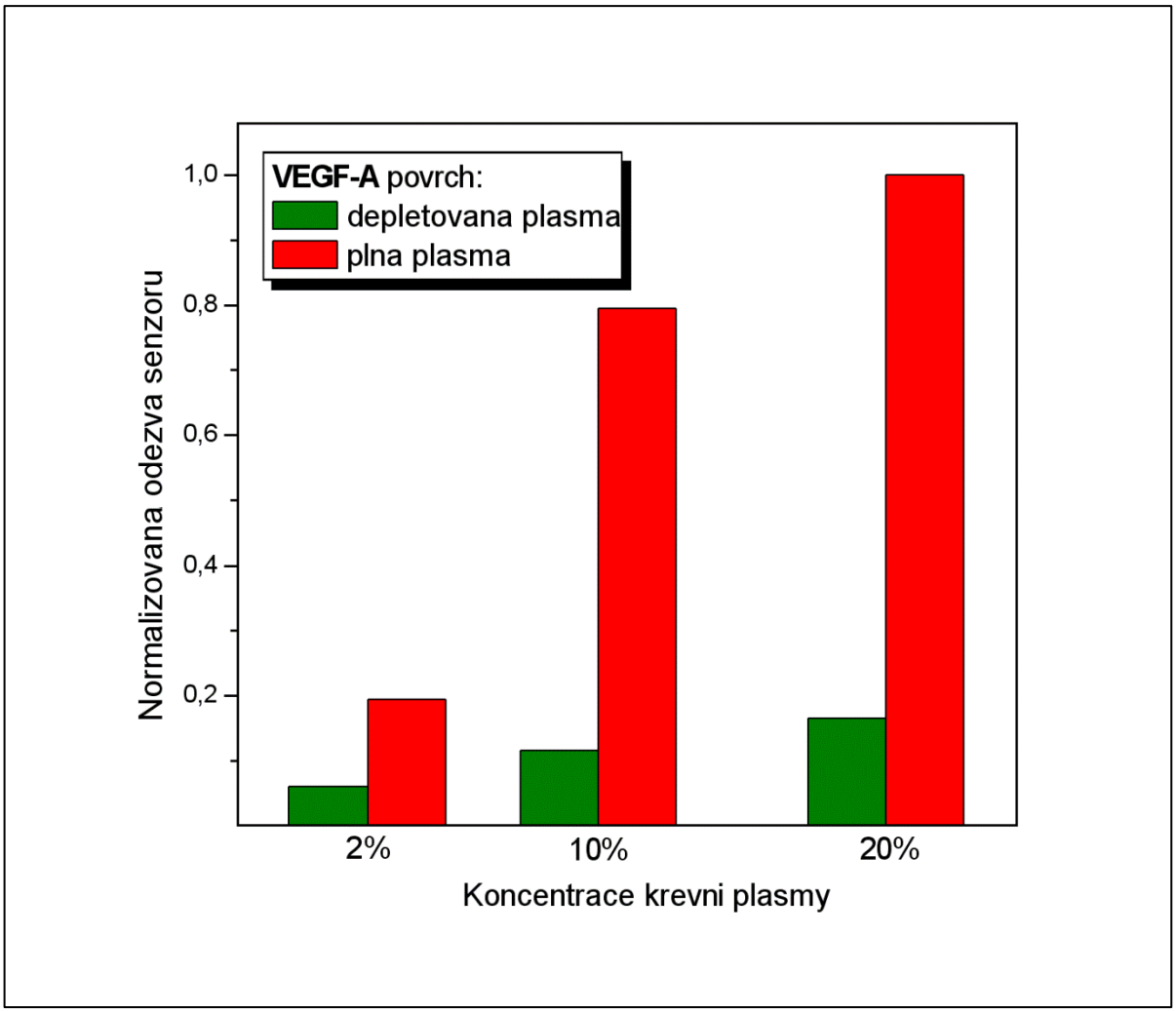
Tab. 14

Přehled plazmatických proteinů vázajících se na povrch SPR čipu. Minimální skóre peptidů pro úspěšnou identifikaci byly 2 jednotlivé peptidy.

Protein	**AC**
serum albumin	P02768
apolipoprotein A-1	P02647
complement C3	P01024
fibrinogen alfa chain	P02671
Ig gamma-1 chain C region	P01857
Ig lambda-2 chain C regions (3,6,7)	P0CG05
Ig kappa chain C region	P01834
Alpha-2-macroglobulin	P01023

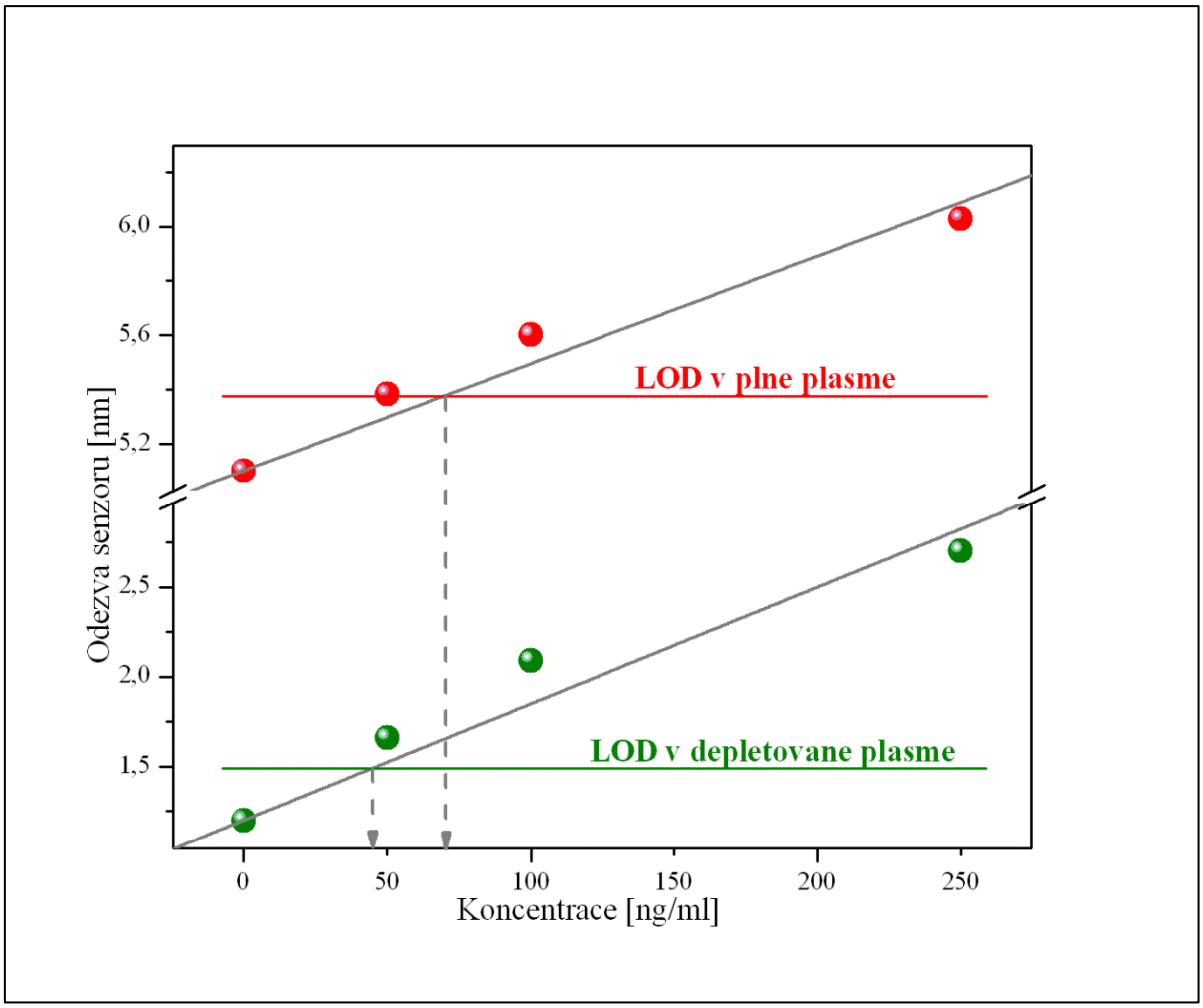
AC – identifikační číslo proteinu dle databáze Swiss-Prot

Všechny z identifikovaných proteinů byly odstraněny deplecí pomocí kolony Hu14. Porovnání odezvy senzoru s imobilizovaným VEGF-A dovysyceného BSA na povrchu na různé koncentrace depletované a plné plazmy ukazuje obrázek (Obr. 33).



Obr. 33: ***Odezva depletované a plné plazmy k povrchu s VEGF-A.*** *Normalizovaná odezva senzoru na tři různé koncentrace (2%, 10% a 20% (v/v)) plné plazmě a plazmě depletované pomocí kolony Hu14.*

Snížení nespecifické odezvy umožnilo dosažení 1,6x nižšího limitu detekce VEGFR-1 na povrch s imobilizovaným VEGF-A v 10% depletované plazmě (Obr. 34).



Obr. 34: ***Kalibrační křivka pro detekci VEGFR-1 v plné a depletované plazmě.*** *Kalibrační závislost detekce VEGFR-1 v 10% ředěné plné krevní plazmě a 10% ředěné depletované plazmě se znázorněným limitem detekce pomocí horizontální linky.*

5.3.3. MDS proteinový čip

Podle literatury byly vybrány proteiny, které se nachází ve zvýšené koncentraci v plazmě MDS pacientů a zároveň regulace jejich exprese podléhá redoxním vlivům v organizmu (dále označované jako „markery“). Dále byl ke každému z vybraných markerů nalezen protein, o němž je známo, že s markerem MDS interaguje a tato protein-protein interakce je podstatou známých (pato)fyziologických procesů v organizmu. Bylo testováno, zda bylo možné interakci vybraných párů sledovat pomocí SPR. Tabulka (Tab. 15) uvádí

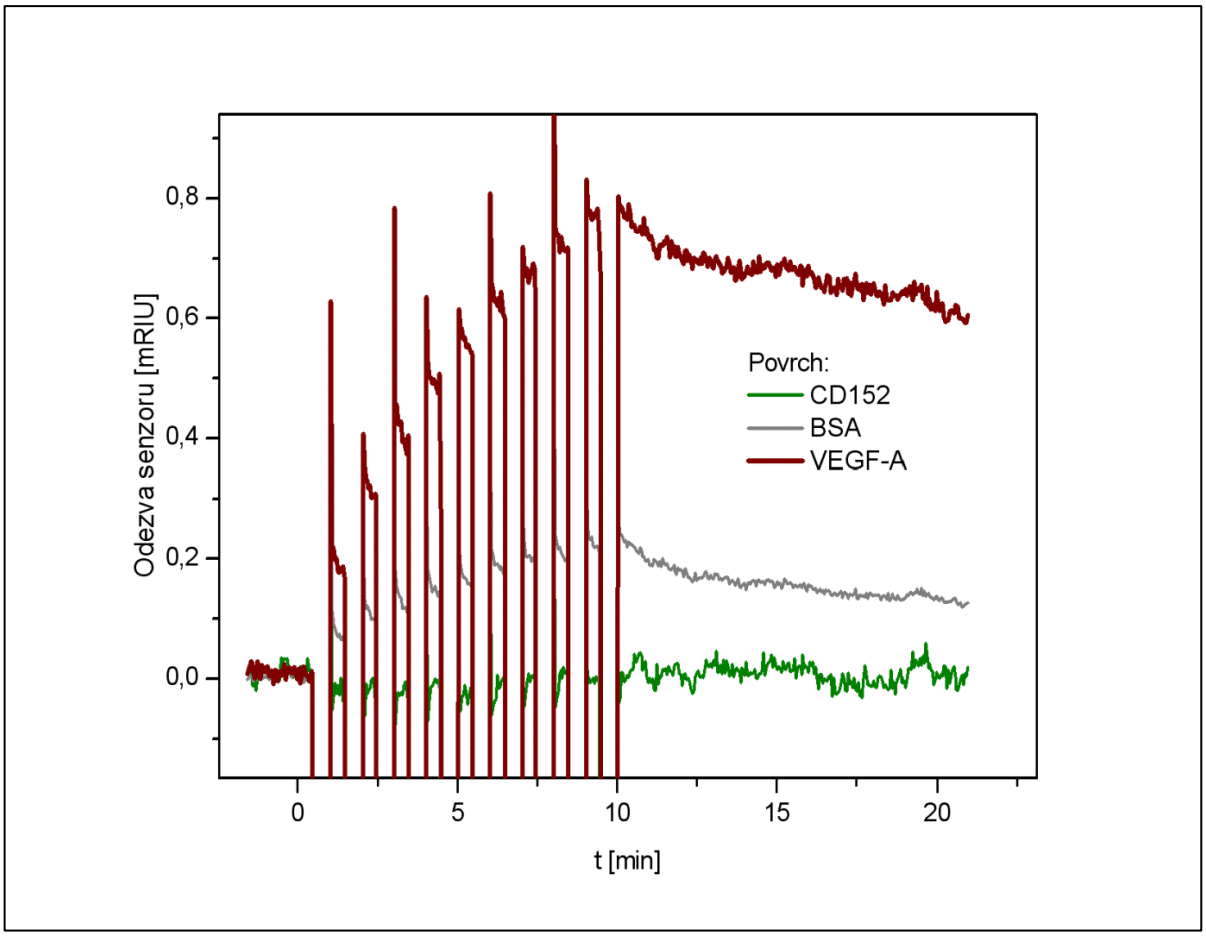
přehled párů proteinů, které spolu vzájemně interagovaly a tvořily stabilní komplex, který jsme sledovali pomocí SPR a byly tudíž vybrány pro proteinový čip.

Tab. 15

Proteiny tvořící body na čipu a jejich vlastnosti (velikost, izoelektrický bod, identifikační záznam v databázi Uniprot). 4 proteiny jsou markery MDS a 4 jsou jejich interakčními partnery.

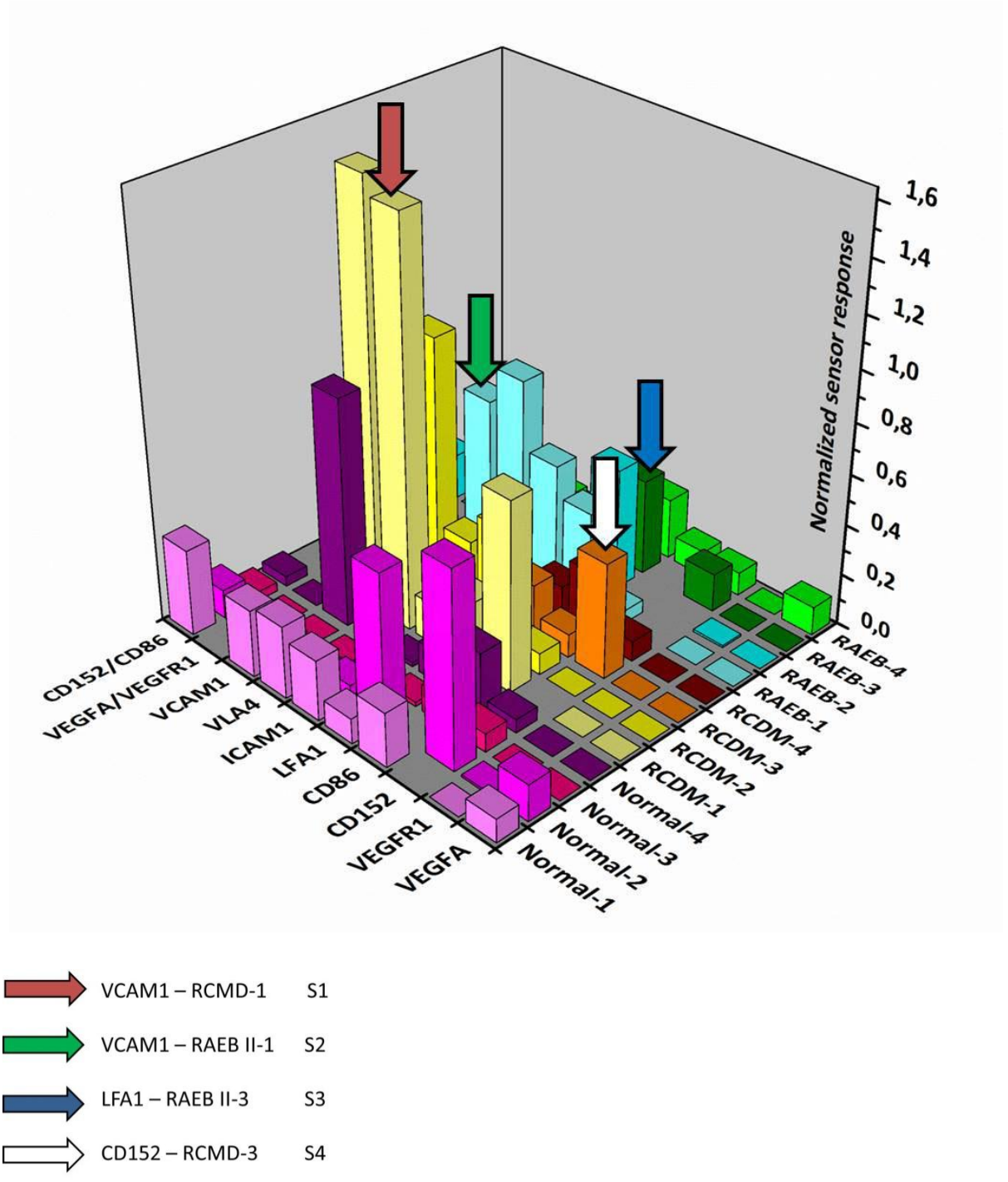
Markery MDS		**Molekulová hmotnost**	**pI**	**Uniprot**
VEGFR-1	Vascular endothelial growth factor receptor 1	151 kDa	8,66	P17948
CD86	T-lymphocyte activation antigen CD86	35 kDa	6,46	P42081
VCAM-1	Vascular cell adhesion protein 1	81 kDa	5,14	P19320
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule 1	58 kDa	8,21	P05362
Interakční partner				
VEGF-A	Vascular endothelial growth factor A	27 kDa	9,21	P15692
CD152	Cytotoxic T-lymphocyte protein 4	25 kDa	6,7	P16410
VLA-4	Very late antigen 4	203 kDa		
	- Integrin alfa podjednotka	115 kDa	6,05	P13612
	- Integrin beta podjednotka	88 kDa	5,27	P05556
LFA-1	Leukocyte adhesion glycoprotein LFA-1	214 kDa		
	- Integrin alfa podjednotka	129 kDa	5,4	P20701
	- Integrin beta podjednotka	85 kDa	6,66	P05017

Obrázek (Obr. 35) znázorňuje specifickou interakci VEGFR-1 s jeho protějškem VEGF-A pomocí SPR zobrazování. Na vedlejším bodě byl imobilizován CD152, s nímž VEGFR-1 neinteragoval.



Obr. 35: ***Detekce VEGFR-1 v 10% plazmě.*** *Odezva senzoru na vazbu VEGFR-1 o koncentraci (1 µg/ml) k různým proteinům imobilizovaným na povrchu (VEGF-A, CD152, BSA).*

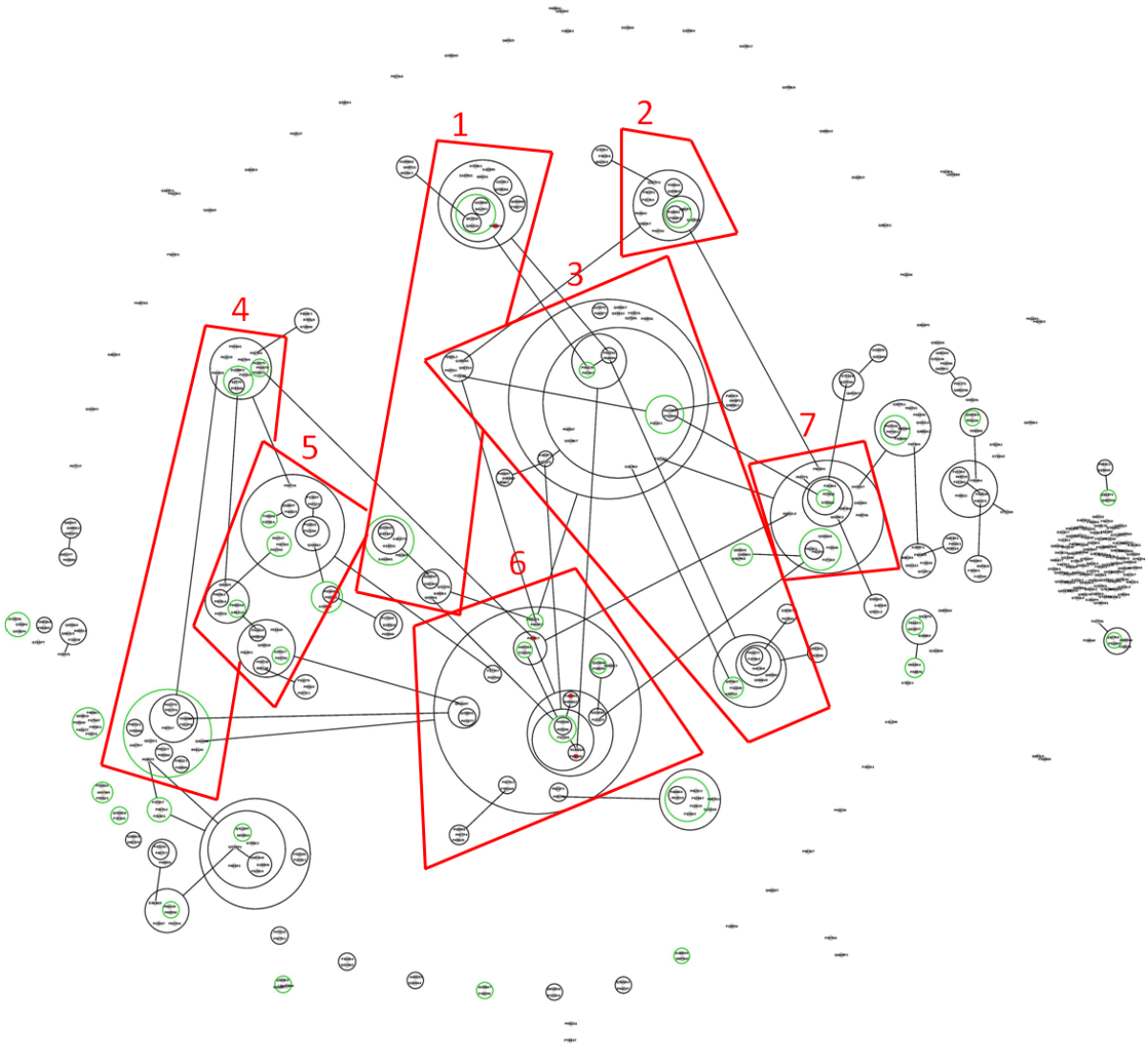
Obrázek (Obr. 36) znázorňuje normalizované odezvy senzoru na deseti různých bodech k ředěné plazmě zdravých dárců (1-4), MDS RCMD pacientů (1-4) a MDS RAEB II pacientů (1-4). Pro identifikaci byly vybrány 4 body, které se nejvíce lišily od kontrolních pacientů a zároveň se jednalo o různé proteiny, případně různé podskupiny MDS pacientů.



Obr. 36: ***Odezvy senzoru k MDS pacientům a zdravým dárcům.*** *Normalizované odezvy senzoru na deseti různých bodech k 10% plazmě zdravých dárců, MDS RCMD pacientů a MDS RAEB II pacientů. Osa* x *představuje jednotlivé body s proteiny, osa* y *normalizované průměrné odezvy senzoru ze 2 měření a osa* z *4 vzorky zdravých dárců (Normal 1-4), 4 vzorky pacientů MDS s RCMD subtypem (RCMD 1-4) a 4 vzorky MDS pacientů se subtypem RAEB II (RAEB 1-4). Šipky představují vzorky vybrané pro identifikaci (S1 – S4).*

5.3.4. Identifikace - pilotní výsledky

Ve vzorku S1 bylo identifikováno 227 proteinů, ve vzorku S2 1552 proteinů, ve vzorku S3 759 proteinů a ve vzorku S4 669 proteinů. Data jsou vyjádřena pomocí tzv. „powergraph“ grafů (Obr. 37). Zelené kroužky zde představují skupinu proteinů, které jsou vzájemně spojeny, tj. každý protein v zeleném kroužku interagoval se všemi ostatními proteiny v zeleném kroužku. Černé kroužky sdružují proteiny, které sdílí spojení s jiným proteinem. Mapa byla rozdělena do 7 klastrů, v nichž proteiny sdílely podobné funkční vlastnosti nebo biologickou úlohu. Oblast č. 1 sdružuje proteiny regulující buněčný imunitní systém (T-signalizace) a reorganizaci cytoskeletonu, do oblasti číslo 2 spadají proteiny účastnící se ubikvitinylace a degradace enzymů, v oblasti č. 3 se nacházejí proteiny nezbytné pro buněčnou signalizaci, G proteiny a proteiny transmembránové signalizace, ve 4. klastru se nacházejí proteiny účastnící se hemostázy, oblast č. 5 zahrnuje proteiny nezbytné pro syntézu proteinů, proteiny zajišťující transport do buněk a zpracování železa a složky komplementu, v klastru č. 6 se nachází integriny a proteiny účastnící se buněčné adheze a integrinem zprostředkované signalizace a metastázování tumorů, do oblasti č. 7 spadají proteiny regulující tonus hladké svaloviny a inhibice koagulace. Příloha č. 1 obsahuje mapu proteinů v kvalitě pdf pro detailní prohlížení mapy. Příloha č. 2 obsahuje přehled identifikovaných proteinů, které jsou v mapě obsaženy a rozděleny do klastrů.



Obr. 37: ***Proteinová síť – powergraph.*** *Schéma interakční sítě identifikovaných proteinů (EntrezIDs). Schéma znázorňuje ověřená proteinová spojení (databáze String Networks) námi identifikovaných proteinů s proteiny na povrchu a mezi sebou navzájem. V příloze č. 1 je možno nalézt detailní obrázek mapy v kvalitě pdf (pouze elektronická verze). Příloha č. 2 dává detailní přehled o identifikovaných proteinech v jednotlivých klastrech. Zelené kroužky ve schématu sdružují proteiny, které jsou vzájemně spojeny, tj. každý protein v zeleném kroužku interagoval se všemi ostatními proteiny v zeleném kroužku. Černé kroužky sdružují proteiny, které sdílí spojení s jiným proteinem. Mapa je rozdělena do 7 klastrů sdružujících identifikované proteiny s podobnými funkčními vlastnostmi nebo biologickou úlohou (označeno červeně).*

Následující obrázky (Obr. 38-40) a tabulky (Tab. 16 – 18) uvádí přehled proteinů vybraných dle ověřené interakční databáze ze souboru proteinů identifikovaných ve vzorcích S1-S4 a jejich možná interakční spojení.

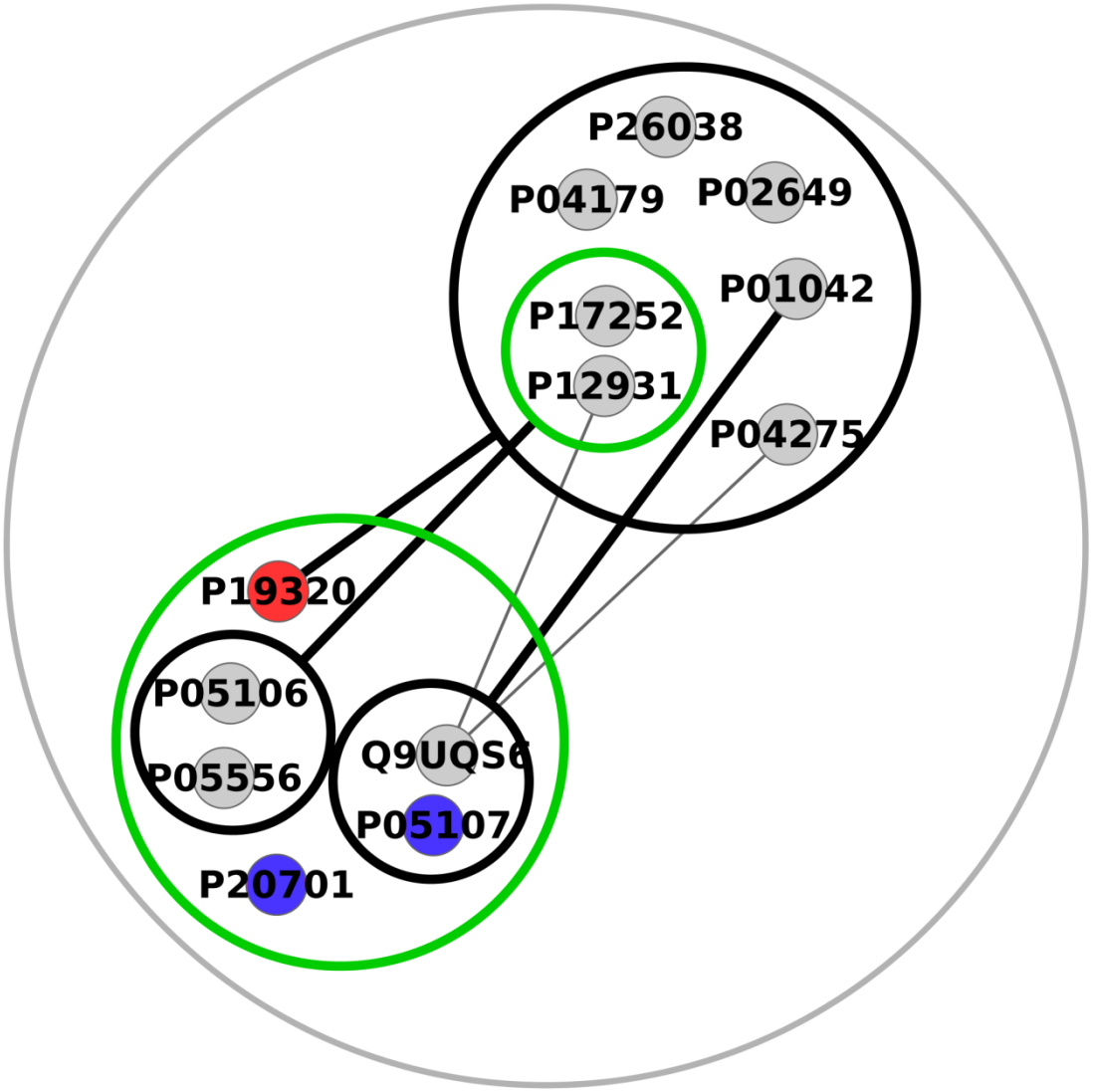
Přehled proteinů přímo interagujících s VCAM-1 (Tab. 16 a Obr. 38)

Tab. 16

Přehled proteinů přímo interagujících s proteinem VCAM-1.

AC	**Proteiny**
P02649	Apolipoprotein E
Q9UQS6	Fibronectin
P20701	Integrin alpha L
P05556	Integrin beta-1
P05107	Integrin beta-2
P05106	Integrin beta-3
P01042	Kininogen-1
P26038	Moesin
P17252	Protein kinase C alpha type (EC 2.7.11.13)
P12931	Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src (EC=2.7.10.2)
P04179	Superoxide dismutase [Mn], mitochondrial (EC=1.15.1.1)
P04275	von Willebrand factor

AC– identifikační číslo proteinu dle databáze Swiss-Prot



Obr. 38: ***Interakční síť VCAM-1 (P19320) (vzorek S2 a S3).*** *Přehled proteinů vybraných dle ověřené interakční databáze ze souboru proteinů identifikovaných ve vzorcích RCMD-1 a RAEB II-1, které pravděpodobně přímo interagovaly s proteinem VCAM-1. VCAM-1 vytvořil komplex s integrinem alfa L (P20701), integrinem beta 1 (P05556), intergrinem beta 2 (P05107), integrinem beta-3 (P05106), a beta řetězcem glykoproteinu na povrchu T-buněk CD8 (Q9UQ56). VCAM-1 mohl interagovat s komplexem proteinkinasou C typ alfa (P17252) a proto-onkogenní tyrosinkinasou Src (P12931). Protein VCAM-1 na povrchu je znázorněn červeně, modře zvýrazněné proteiny jsou proteiny, které tvořily body na proteinovém čipu.*

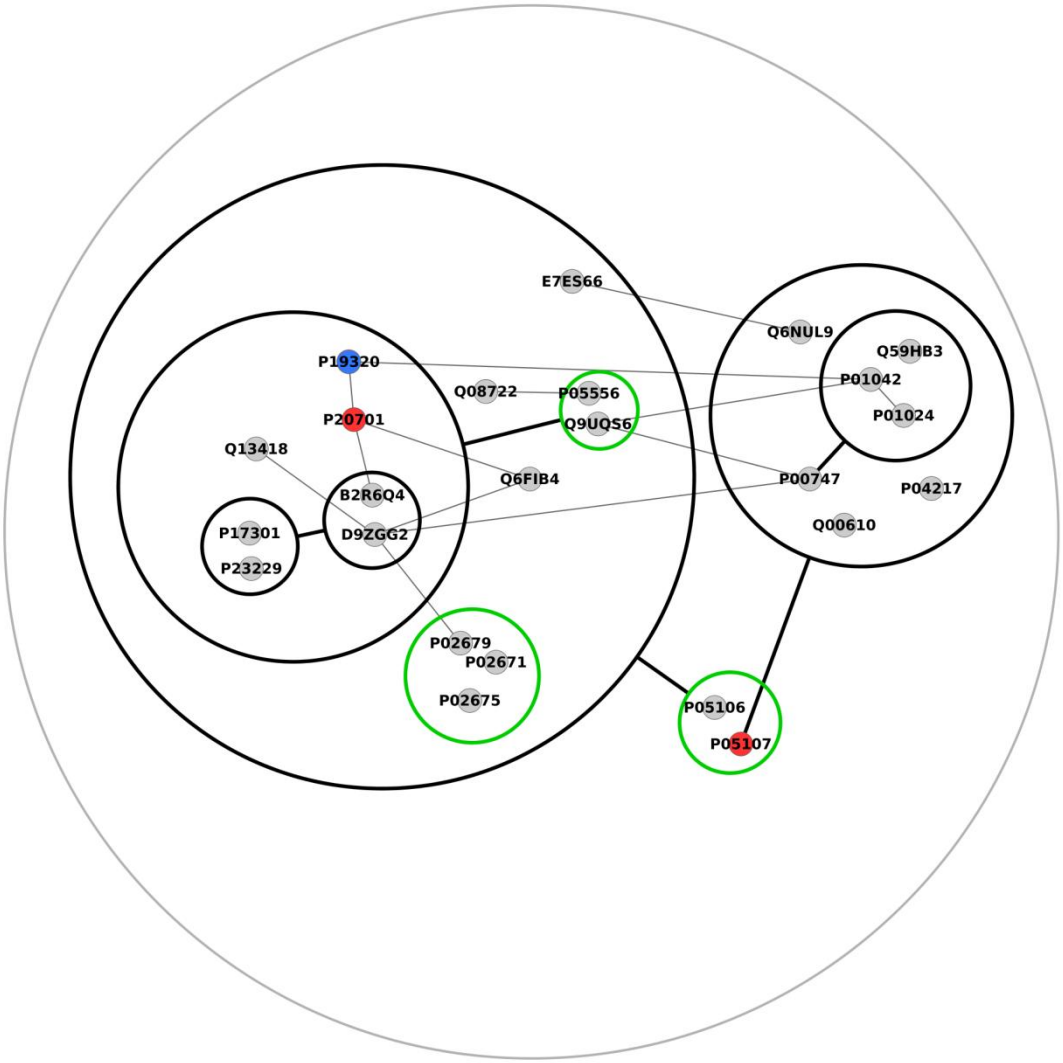
Přehled proteinů interagujících s LFA-1 (Tab. 17 a Obr. 39).

Tab. 17

Přehled proteinů interagujících s proteinem LFA-1.

AC	Proteiny
P04217	Alpha-1B-glycoprotein
Q59HB3	Apolipoprotein B
P01024	Complement C3
B2R6Q4	C-src tyrosine kinase, isoform CRA_a
Q00616	Cytochrome P450 55A2
Q6FIB4	F11 receptor
Q9UQS6	Fibronectin
E7ES66	Glycocalicin
P17301	Integrin alpha-2
P23229	Integrin alpha-6
P05556	Integrin beta-1
P05107	Integrin beta-2
P05106	Integrin beta-3
Q13418	Integrin-linked protein kinase (EC 2.7.11.1)
P01042	Kininogen-1
Q08722	Leukocyte surface antigen CD47
P00747	Plasminogen
Q6NUL9	Selectin P
D9ZGG2	Vitronectin

AC– identifikační číslo proteinu dle databáze Swiss-Prot



Obr. 39: ***Interakční síť LFA-1 (P20701, P05107) (vzorek S4).*** *Přehled proteinů vybraných dle ověřené interakční databáze ze souboru proteinů identifikovaných ve vzorku RAEB II-3, které přímo interagovaly s proteinem LFA-1 imobilizovaným na povrchu čipu. Protein LFA-1 obsahuje dvě podjednotky (P20701, P05107). Podjednotka integrin alfa L (P20701) interagovala s podjednotkou intergrin beta 2 (P05107), která se nacházela v komplexu s integrinem beta-3 (P05106), integrinem beta 1 (P05556) a fibronektinem (Q9UQS6). Celý komplex interagoval s molekulou VCAM-1, vitronektinem, integriny alfa 2 a 6 a kinasami (tyrosinkinasou c-Src a proteinkinasou spojenou s integriny). Podjednotka integrin beta 2 pak dále interagovala s komplexem řetězců fibrinogenu α, β, γ (P02671, P02675, P02679) (B). Protein LFA-1 na povrchu je znázorněn červeně, modře zvýrazněné proteiny jsou proteiny, které tvořily body na proteinovém čipu.*

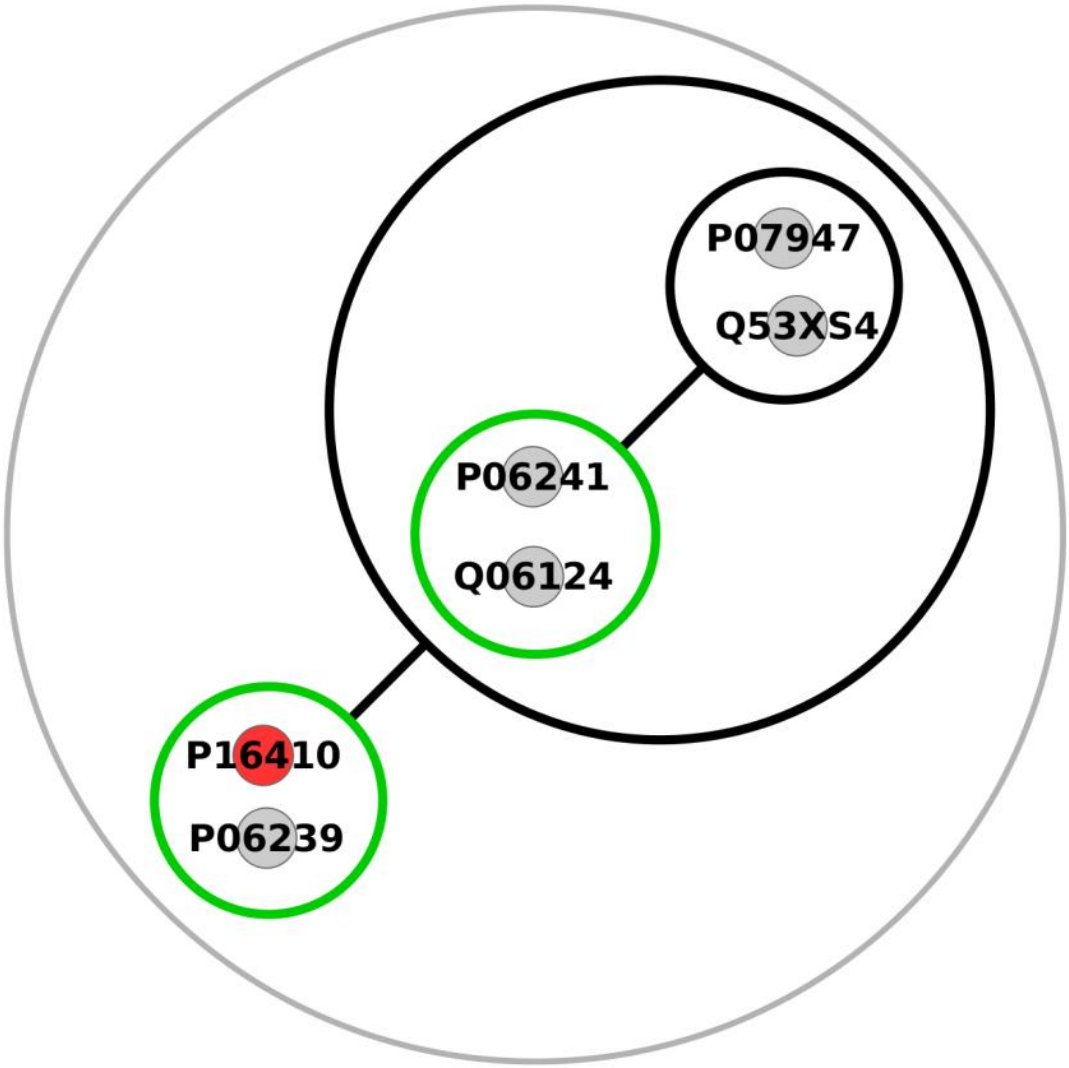
Přehled proteinů interagujících s CD152 (Tab. 18 a Obr. 40)

Tab. 18

Přehled proteinů interagujících s proteinem CD152.

AC	Proteiny
P06239	Tyrosine-protein kinase Lck (EC 2.7.10.2)
P06241	Tyrosine-protein kinase Fyn (EC 2.7.10.2)
Q06124	Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 11 (EC 3.1.3.48)
P07947	Tyrosine-protein kinase Yes (EC 2.7.10.2)
Q53XS4	Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type (EC 3.1.3.48)

AC– identifikační číslo proteinu dle databáze Swiss-Prot



Obr. 40: ***Interakční síť CD152 (P16410) (vzorek S5).*** *Přehled proteinů vybraných dle ověřené interakční databáze ze souboru proteinů identifikovaných ve vzorku RCMD-3, které přímo interagovaly s proteinem CD152 imobilizovaným na povrchu čipu. Protein CD152 tvořil komplex s tyrosinkinasou Lck (P06239), který interagoval s komplexem obsahujícím tyrosinkinasu Fyn (P06241) a tyrosinproteinfosfatasu nereceptorového typu 11 (Q06124). Protein CD152 na povrchu je znázorněn červeně.*

6. DISKUSE

6.1. OXIDAČNÍ STATUS U MDS

V naší práci jsme nalezli signifikantně zvýšené hladiny homocysteinu v plazmě MDS pacientů v porovnání se skupinou zdravých dárců. Tato data jsou v souladu s výsledky Cortelezzi et al., kteří popsali hyperhomocysteinémii u MDS pacientů (Cortelezzi A. et al., 2001). Autoři také nalezli zvýšené hladiny MDA u 6 pacientů s hyperhomocysteinémií a předpokládali, že hyperhomocysteinémie a oxidační stres přispívají k myelodysplázii kostní dřeně u MDS společně (Cortelezzi A. et al., 2001). Nicméně podle našich dat homocystein s malondialdehydem nekoreloval. V naší studii bylo použito 61 pacientů zahrnujících 14 MDS subtypů, Cortelezzi et al. stanovili MDA pouze u 17 pacientů, z nichž u šesti byla nalezena hyperhomocysteinémie. Je tedy možné předpokládat, že stanovení u většího souboru dat vedlo k odlišným výsledkům. Plazmatické hladiny homocysteinu jsou řízeny remethylací homocysteinu na methionin a transsulfurací homocysteinu na cystein. Tyto transmethylační a transsulfurační reakce jsou klíčové v syntéze glutathionu a jsou nezbytné pro normální růst, diferenciaci a funkci buněk (Eldibany M.M. and Caprini J.A., 2007). Korelace homocysteinu s glutathionem nebyla v naší práci nalezena. K hyperhomocysteinémii může také docházet v důsledku poruchy exkrece homocysteinu ledvinami nebo metabolickými defekty, to souvisí s nedostatkem vitamínů, věkem i genetickými defekty (Schalinske K.L. and Smazal A.L., 2012). Vzhledem k tomu, že MDS pacienti zařazení do studie měli průměrný věk 63 let, mohly tyto faktory hrát roli ve zvýšené hladině homocysteinu. Bylo zjištěno, že S-adenosylmethionin, meziprodukt metabolizmu homocysteinu, je zdrojem methylových skupin při tvorbě methylovaných arginylových zbytků v proteinech. Z takto modifikovaných proteinů se může působením proteolýzy uvolňovat asymetrický dimethylarginin (Stuhlinger M.C. et al., 2001). Naše výsledky ukázaly, že koncentrace ADMA byla signifikantně zvýšená v séru MDS pacientů v porovnání se zdravými dárci (Stikarova J. et al., 2013).

Dále naše práce prezentovala signifikantně zvýšené hadiny celkového cysteinu. Zvýšené hladiny cysteinu nebyly doposud v souvislosti s MDS popsány. Cystein je hlavním plazmatickým antioxidantem a jeho koncentrace odráží oxidační procesy v organizmu (De Chiara B. et al., 2012). Nalezená zvýšená koncentrace cysteinu by mohla přispívat k oxidačnímu stresu u MDS pacientů. Cystein je také hlavním metabolitem a limitujícím

faktorem v regulaci syntézy glutathionu (Dickinson D.A. and Forman H.J., 2002). Zvýšená koncentrace cysteinu u MDS by mohla souviset s poruchou metabolizmu glutathionu. Nicméně bylo popsáno, že koncentrace cysteinu podobně jako homocysteinu vzrůstají s věkem (Bates C.J. et al., 2002).

Zjistili jsme, že hladiny cysteinylglycinu byly signifikantně zvýšené u MDS pacientů v porovnání se zdravými dárci. Hladiny cysteinylglycinu se významně lišily i mezi jednotlivými podskupinami MDS, signifikantně nejvyšší hladiny byly v podskupině 1 v porovnání se skupinou zdravých dárců a skupinou 4. Jedná se o podskupinu, v níž jsou zařazeni pacienti s nízkým rizikem dle WHO diagnóz, kteří často trpí přetížením železem (souvislost t-CG s železem je diskutována níže). Ačkoliv tento dipeptid nebyl tak intenzivně studován jako glutathion nebo homocystein bylo popsáno, že hraje důležitou roli v patofyziologii některých onemocnění (Sergueeva A.I. et al., 2008; De Donatis G.M. et al., 2010). V souvislosti s MDS doposud studován nebyl. Cysteinylglycin se na rozdíl od cysteinu a homocysteinu s věkem signifikantně nemění (Bates C.J. et al., 2002).

Cysteinylglycin je jednou z hlavních složek metabolizmu glutathionu a nezbytným substrátem pro jeho syntézu. Naše výsledky ukazují, že hladiny glutathionu byly signifikantně snížené v plazmě MDS pacientů v porovnání se zdravými dárci. Snížené hladiny glutathionu v buňkách u MDS pacientů byly popsány také skupinou Ghoti et al. (Biomarkers definition working group, 2001; Pereira-Leal J.B. et al., 2006). Ghoti et al. popsali snížené hladiny redukovaného GSH v červených krvinkách, destičkách a neutrofilech u MDS pacientů a jejich korelaci se sérovým feritinem (Pereira-Leal J.B. et al., 2006). Naše výsledky ukázaly snížené hladiny celkového plazmatického GSH, který nekoreloval se železem ani feritinem. Tento konflikt by bylo možno vysvětlit odlišnými experimentálními podmínkami. V naší práci jsme jednak analyzovali hladinu celkového glutathionu (redukovaného i oxidovaného) a navíc jsme zjišťovali jeho hladinu v plazmě, na rozdíl od Ghoti et al., kteří stanovili GSH v buňkách. Bylo také zjištěno, že hladina GSH v endoteliálních buňkách negativně koreluje s hladinou ICAM-1. Zvýšení koncentrace GSH v cytosolu vede k potlačení produkce ICAM-1 (Kevil C.G. et al., 2004). Práce Passam et al. popsala zvýšenou koncentraci rozpustné formy ICAM-1 u pacientů s MDS onemocněním (Passam F.H. et al., 2004). Jeho zvýšená koncentrace v plazmě by tedy mohla souviset se sníženou hladinou GSH.

Významně snížené hladiny glutathionu spolu se signifikantně zvýšenými hladinami cysteinu a cysteinylglycinu, které jsme naměřili u MDS pacientů, by mohly souviset s metabolizmem glutathionu. V naší práci jsme sledovali aktivitu gama-glutamyltransferasy, klíčového enzymu v metabolizmu GSH, a její korelaci s GSH. Průměrná aktivita GGT u MDS pacientů byla 0,60 μkat/l, což se blížilo horní hranici referenčního intervalu pro GGT (0,16 – 0,8 μkat/l). Navíc hladiny GGT mírně negativně korelovaly s hladinami glutathionu u MDS pacientů (r=-0,30, *P*=0,05). Bylo zjištěno, že inhibice GGT vedla k blokaci metabolizmu glutathionu a k jeho hromadění vně buněk a bylo možné tomu zabránit dodávkou CG (De Donatis G.M. et al., 2010). V naší práci byla aktivita GGT spíše zvýšená a hladina GSH nízká, což vypovídalo o možné zvýšené aktivitě GGT. Enzym GGT byl popsán jako marker oxidačního stresu (Hanigan M.H. et al., 1999; Niccoli G. et al., 2013; Ravuri C. et al., 2013) a předpokládá se, že zvýšená exprese GGT je důležitým faktorem ve vývoji agresivnějšího a rezistentnějšího fenotypu rakovinných buněk (Hanigan M.H. et al., 1999; Yin X. et al., 2013). Na základě těchto výsledků předpokládáme, že k uvedené zvýšené koncentraci cysteinu a cysteinylglycinu a snížené koncentraci glutathionu by mohlo docházet v důsledku zvýšené aktivity GGT u MDS pacientů.

Naše výsledky poprvé ukázaly signifikantně snížené hladiny dusitanů u MDS pacientů v porovnání se zdravými dárci. Navíc jsme zjistili, že dusitany byly signifikantně snížené u všech MDS podskupin ve srovnání se zdravou skupinou. Hladiny dusičnanů se mezi těmito skupinami nelišily. Jediná práce, která se zabývala produkcí oxidu dusnatého v souvislosti s MDS je studie Choi et al. Autoři sledovali korelaci mezi produkcí NO (koncentrace NOx a exprese inducibilní NO synthasy (iNOS)) a apotózou a zjistili, že hladiny NOx byly významně zvýšené v séru MDS pacientů a nekorelovaly s apoptózou buněk MDS pacientů (Choi J.W., 2003). Tento nesoulad s našimi výsledky v hladinách NOx může být vysvětlen tím, že Choi et al. měřili celkovou sumu NOx (hladinu dusitanů i dusičnanů), zatímco my jsme sledovali zvlášť hladiny dusitanů a zvlášť hladiny dusičnanů. Je známo, že koncentrace dusičnanů může být ovlivněna jinými faktory, jako je jejich příjem v potravě, tvorba ve slinách, inhalace, funkce ledvin a další. Detekce NO v organizmu je poměrně náročná, kvůli krátkému poločasu rozpadu (<0,1 s). NO je rychle oxidován na dusitan (NO_2^-), případně dusičnan, proto se pro jeho stanovení NO produkce (aktivity eNOS) nejčastěji využívala suma dusitanů a dusičnanů (Moorcroft M.J. et al., 2001; Bryan N.S. and Grisham M.B., 2007). Ukázalo se ovšem, že aktivitu NO synthasy v cévách mnohem lépe odráží hladina dusitanů

(Lauer T. et al., 2001; Kleinbongard P. et al., 2003). Tudíž produkci NO a její souvislost s apoptózou a aktivitou NOS by bylo vhodnější sledovat pomocí hladiny dusitanů.

Koncentrace NO produktů v plazmě může být ovlivněna také věkem (Kawakatsu M. et al., 2002; Alusik S. et al., 2008). Alusik et al. zjistili, že hladina dusitanů u starších pacientů (nad 80) byla mírně snížená vhledem ke kontrolní skupině (věk 30), naopak hladina dusičnanů byla zvýšená u skupiny starších vzhledem ke kontrolní skupině, nicméně ani v jednom případě nebyly nalezené rozdíly signifikantní (Alusik S. et al., 2008). Podobně v práci Kawatsu et al. popsali nevýznamně zvýšené hladiny NOx u žen i mužů v souvislosti s věkem (Kawakatsu M. et al., 2002).

Oxid dusnatý v plazmě je rychle vychytáván červenými krvinkami, v nichž reaguje s oxyhemoglobinem za vzniku methemoglobinu a dusičnanů (Lee J.M. et al., 2007). V naší studii jsme měli 19 pacientů, kteří v rámci léčby dostávali pravidelně krevní transfuze. U takových pacientů je riziko zvýšené koncentrace volného hemoglobinu v krvi v důsledku rozpadu erytrocytů, volný Hb by mohl NO vychytávat (Vermeulen Windsant I.C. et al., 2012). Rozdělili jsme tedy pacienty na skupinu, která dostávala pravidelně krevní transfuze a na skupinu netransfundovaných pacientů a testovali hypotézu, zda pravidelně transfundovaní pacienti měli nižší koncentraci dusitanů než druhá skupina. Pomocí oboustranného *t*-testu jsme zjistili, že transfundovaní pacienti se významně nelišili od netransfundovaných pacientů (P=0,137), nicméně hladina dusitanů byla u transfundovaných pacientů nižší ve srovnání s druhou skupinou.

Bylo zjištěno, že v důsledku oxidačního stresu dochází k reakci oxidu dusnatého reakcí s ROS za vzniku peroxodusitanu (Dalle-Donne I. et al., 2006). Oxidační stres také vede k odpojení endoteliální NO synthasy v důsledku oxidace kofaktoru eNOS tetrahydrobiopterinu (Li H. and Forstermann U., 2013). Použitím korelačního testu jsme zjistili, že koncentrace dusitanů negativně mírně korelovaly s hladinami malondialdehydu (r=-0,339, P=0,006). K odpojení eNOS může docházet také v důsledku zvýšených hladin asymetrického dimethylargininu.

V naší skupině jsme zjistili, že koncentrace ADMA byla signifikantně zvýšená v séru MDS pacientů ve středním věku v porovnání se zdravými dárci (Stikarova J. et al., 2013). U této skupiny jsme také nalezli signifikantně zvýšenou hladinu MDA a významně sníženou

hladinu dusitanů v porovnání se zdravými dárci, zatímco hladina železa spadala do referenčních mezí a hladina feritinu byla zvýšená. Na základě těchto výsledků předpokládáme, že oxidační stres (MDA) spolu se zvýšenou hladinou ADMA u MDS pacientů vede k přepnutí eNOS a následné produkci superoxidového radikálu. Tento předpoklad je podpořen nalezenou sníženou hladinou dusitanů u MDS pacientů, ke které nejspíš dochází inhibicí aktivity enzymu eNOS. Ke zvýšené methylaci arginylových zbytků proteinů a jejich následné proteolýze, což má za následek zvýšenou koncentraci methylovaných derivátů argininu v krvi, vede pravděpodobně zvýšená exprese PRMTs, která byla v souvislosti s onkohematologickými onemocněními již popsána (Cheung N. et al., 2007; Liu F. et al., 2011).

Předpokládáme tedy, že ke snížené hladině dusitanů u MDS pacientů v porovnání se zdravou skupinou docházelo jednak sníženou produkcí oxidu dusnatého NO synthasou odpojením eNOS v důsledku oxidačního stresu a také částečně reakcí dusitanů s volným hemoglobinem, jehož koncentrace byla zvýšená u často transfundovaných pacientů. Jak již bylo řečeno, oxid dusnatý hraje roli v mnoha fyziologických procesech a jeho snížená koncentrace v plazmě může souviset s dysfunkcí cév, poruchou imunity, poruchami koagulace a další (Beckman J.S. and Koppenol W.H., 1996). Bylo také zjištěno, že oxid dusnatý reguluje expresi VEGF, na druhou stranu zase VEGF reguluje produkci NO endoteliální NOS (Dulak J. and Jozkowicz A., 2002; Kimura H. and Esumi H., 2003). Oxid dusnatý proto může hrát také významnou roli v angiogenezi[3] MDS.

V naší práci jsme nalezli zvýšené hladiny aminothiolů (cystein, cysteinylglycin, homocystein) u podskupiny 1 případně 2, tyto podskupiny zahrnovaly časná stádia MDS, která jsou obecně charakterizována zvýšenou apoptózou a častou transfuzní léčbou (Leitch H.A., 2011). Bylo popsáno, že u těchto stádií dochází ke vzniku oxidačního stresu v důsledku zvýšené koncentrace volného železa (Biomarkers definition working group, 2001; Gattermann N. and Rachmilewitz E.A., 2011; Leitch H.A., 2011). V našich výsledcích se hladiny železa ani feritinu u podskupin s časnými stádii MDS (1, 2) signifikantně nelišily od ostatních podskupin. Po přerozdělení pacientů do dvou skupin na pacienty, kteří měli zvýšené hladiny železa a vyžadovali chelatační terapii (CH) a pacienty nevyžadující chelatační terapii

[3] Novotvorba cév typická pro nádorová onemocnění včetně MDS (Pruneri G. et al., 1999)

(non-CH) jsme zjistili, že skupina CH měla signifikantně zvýšené hladiny železa a feritinu ve srovnání s non-CH, ale hladiny aminothiolů ani dusitanů se mezi nimi významně nelišily. Hladiny malondialdehydu byly signifikantně zvýšené u skupiny CH vs. non-CH. Stejně tomu bylo u skupiny MDS pacientů, kteří byli léčeni transfuzní terapií v porovnání se skupinou pacientů neléčených transfuzní terapií. Z uvedeného vyplývá, že oxidační stres u MDS prezentovaný zvýšenou koncentrací aminothiolů a sníženou koncentrací dusitanů v porovnání se zdravými dárci nemusí přímo souviset s přetížením železem.

Jak bylo již zmíněno, stanovení cysteinu a homocysteinu může být ovlivněno věkem, zatímco pro stanovení koncentrace oxidu dusnatého a cysteinylglycin byl ukázán vliv věku jako nesignifikantní, jak je diskutováno u jednotlivých parametrů (Bates C.J. et al., 2002; Kawakatsu M. et al., 2002). Optimálně by měla kontrolní skupina věkově odpovídat skupině pacientů s MDS onemocněním, ale to se nachází převážně u starší populace. Nicméně sběr kontrolní skupiny u starších osob je problematický vzhledem k jiným onemocněním, které se u starší populace často vyskytuje (diabetes, hypertenze a jiné) a mohly by tudíž významně ovlivnit získané výsledky. Navíc MDS se nevyskytuje pouze u starších osob. Po zvážení těchto faktů jsme se rozhodli porovnat naši skupinu pacientů s mladší zdravou kontrolní skupinou, abychom mohli pozorovat všechny změny, které se mezi nimi vyskytovaly.

6.2. OXIDAČNÍ MODIFIKACE PROTEINŮ U MDS

6.2.1. Karbonylace

Zjistili jsme, že v plazmě pacientů s MDS byla celková karbonylace proteinů o 20 % vyšší než u zdravých dárců. Karbonylace byla popsána v souvislosti s mnoha (Chen X. et al., 2000; Kettle A.J. et al., 2004; Battisti V. et al., 2008; Musolino C. et al., 2011). V práci Ahmad et al. nalezli signifikantně zvýšenou hladinu karbonylovaných proteinů a malondialdehydu v séru pacientů s chronickou myeloidní leukémií (Ahmad R. et al., 2008). Musolino et al. popsal zvýšené hladiny karbonylů u mnohočetného myelomu (Musolino C. et al., 2011). Nicméně doposud nebyla provedena studie, která by se zabývala studiem karbonylovaných proteinů u MDS. Naše výsledky ukazovaly na přítomnost oxidačního stresu v plazmě MDS pacientů, zvláště pak zvýšenou hladinu MDA u pacientů s přetížením

železem, která je klíčovou pro vznik karbonylovaných skupin. Opět je třeba brát v úvahu možnou souvislost karbonylace s věkem. Ačkoliv bylo popsáno, že obsah karbonylovaných skupin v proteinech některých tkání vzrůstá se stárnutím (Levine R.L. and Stadtman E.R., 2001), studie Garibaldiho et al. ukázala, že obsah karbonylovaných proteinů v plazmě je stejný u mladší populace stejně jako u starších lidí a nesouvisí ani s pohlavím (Garibaldi S. et al., 2001).

Identifikovali jsme 16 různých proteinů, z nichž některé mohly podléhat karbonylaci v souvislosti s MDS. Použitím metody jednorozměrné SDS PAGE s následnou imunodetekcí jsme vizualizovali zóny, které obsahovaly směs proteinů s podobnou migrací, z nichž některé byly karbonylované. Tyto experimenty vedly k získání souboru potenciálně karbonylovaných proteinů, které by mohly karbonylacím podléhat v souvislosti s MDS onemocněním a mohly by sloužit jako dobré východisko pro další experimenty. Některé proteiny mohou být ke karbonylaci citlivější díky přítomnosti vazebných míst pro ionty kovů nebo jejich strukturním vlastnostem, ale i díky přítomností patogenních faktorů v daném prostředí (Madian A.G. et al., 2011). My jsme nejprve odstranili 14 nejhojněji zastoupených proteinů, které jsou hlavními vychytávači karbonylů a mohly by zastínit ostatní „zajímavější“ proteiny. V následujících odstavcích je uveden přehled nalezených proteinů, z nichž některé mohou podléhat karbonylaci v souvislosti s MDS, a diskutován vliv této modifikace na vlastnosti a chování proteinu a jejich možná role v patofyziologii MDS.

Jedním z největších nalezených proteinů byl ceruloplazmin. Jedná se o glykoprotein (111 kDa) obsahující 6-7 atomů mědi, jenž je významným transportérem železa přes buněčné membrány. Bylo zjištěno, že karbonylace tohoto proteinu vede ke ztrátě jeho antioxidačních schopností (Kang J.H. et al., 2001). Podobné důsledky by mohla mít i karbonylace dalšího identifikovaného proteinu – afaminu. Tento protein (69 kDa) zajišťuje transport a reguluje hladinu vitaminu E v krvi (Jackson D. et al., 2007; Tolek A. et al., 2012). Tento protein nebyl v souvislosti s MDS doposud popsán. Vitamin E je významným antioxidantem a porucha jeho transportu v důsledku karbonylace afaminu by mohla hrát roli v patogenezi oxidačního stresu u MDS. Dalším z identifikovaných proteinů byl glykoprotein bohatý na histidin (histidine rich glycoprotein - HRG). Jedná se o glykoprotein (60 kDa), exprimovaný v makrofázích a v nádorových buňkách a sekretovaný do plazmy. Tento protein je zahrnutý v mnoha fyziologických i patofyziologických procesech jako je imunitní odpověď, chemotaxe,

buněčná adheze, angiogeneze, koagulace a fibrinolýza (Donate F. et al., 2004; Dixelius J. et al., 2006; Ohta T. et al., 2009). Jednou z jeho funkcí je regulace VEGF signální dráhy a regulace nádorové angiogeneze. Účastní se také nádorové imunity regulací tumor-asociovaných makrofágů, což vede k potlačení nádorového růstu a tvorby metastáz (Rolny C. et al., 2011). Karbonylace v souvislosti s HRG nebyla doposud popsána, dokonce ani jeho souvislost s MDS. Nicméně již vyšly studie, které poukazovaly na roli angiogeneze a VEGF u MDS (Pruneri G. et al., 1999; Lundberg L.G. et al., 2006; Wimazal F. et al., 2006). Předpokládáme, že možná karbonylace HRG u MDS pacientů by mohla hrát roli v angiogenních procesech a patologii MDS. Ovšem tyto předpoklady vyžadují ještě další studie. Gelsolin je protein (86 kDa) závislý na přítomnosti Ca^{2+} iontů. Jedna ze dvou exprimovaných izoforem je sekretovaná do plazmy. Gelsolin je nezbytný pro reorganizaci cytoskeletonu během růstu a apoptózy buněk (Shirkoohi R. et al., 2012). Bylo zjištěno, že gelsolin má sníženou expresi v několika typech nádorových onemocnění včetně myelomonocytární leukémie (Ullmannova V. et al., 2003; Tanaka H. et al., 2006) a může fungovat jako tumor supresor (Sagawa N. et al., 2003). Tudíž možná ztráta funkce gelsolinu karbonylací by mohla mít podobný efekt jako jeho snížená exprese. Možná karbonylace gelsolinu by tak mohla hrát roli v defektním vývoji monocytární větve myeloidní linie a být tak součástí patogeneze chronické myelomonocytární leukémie (CMML). Některé z identifikovaných proteinů byly složkami komplementu (komplement faktor B, komponenta C2, komponenta komplementu C6) nebo jeho inhibitory (plazmatický inhibitor C1, vitronektin). Poruchy komplementu u MDS popsala skupina Willaescusa et al., která naměřila pokles koncentrace komplementu C3 a pozměněnou hemolytickou aktivitu faktoru B u MDS pacientů se špatnou prognózou (Villaescusa Blanco R. et al., 1998). V práci Morreti et al. byly poruchy komplementu u MDS také asociovány se špatnou prognózou. V naší studii byli zahrnuti pacienti s příznivou prognózou (RARS) i s nepříznivými prognózami (RAEB-I, RAEB-II), nicméně výše zmíněné proteiny se našly především u pacientů s RARS. Mezi nalezenými proteiny byly beta řetězce fibrinogenu. Studovali jsme vliv modifikací na vlastnosti fibrinogenu a zjistili jsme, že ze třech testovaných modifikačních činidel (malondialdehyd, hypochlorid, peroxodusitan) způsoboval malodiladehyd vznik nejvíce karbonylovaných skupin v molekule fibrinogenu. Jak již bylo zmíněno, MDA se u MDS pacientů nacházel ve zvýšené koncentraci (Stikarova J. et al., 2013). Modifikace fibrinogenu ovlivnila agregaci, adhezi krevních destiček a tvorbu fibrinové sítě (Štikarová J. et al., 2013). Tudíž nalezené řetězce fibrinogenu, které by mohly

být karbonylované u MDS pacientů, by mohly hrát roli v poruchách hemostázy, která onemocnění MDS často provází. Apolipoproteiny, alfa-makroglobuliny a hemopexin jsou proteiny často podléhající oxidaci a byly asociovány i s jinými onemocněními (nefrotický syndrom, diabetes, cévní onemocnění), proto jim v souvislosti s MDS nebyla věnována větší pozornost (Madian A.G. et al., 2011).

Je důležité poznamenat, že karbonylace může být také součástí signalizačních procesů. Interakce reaktivních karbonylových sloučenin (vázaných na proteiny i volných) s povrchovými membránovými receptory vyvolává buněčnou odpověď spuštěním signálních drah zahrnujících P21 ras, mitogen aktivované proteinkinasy a jaderný faktor-κB (Yan S.D. et al., 1994; Akhand A.A. et al., 1999). Karbonylací by tak mohlo docházet tedy nejen ke ztrátě funkce proteinu oxidační modifikaci, ale i k pozměněné expresi jiných proteinů hrajících roli v patofyziologii MDS (např. VEGFR-1, ICAM-1, VCAM-1)

6.2.2. S-nitrosylace

Detekce a identifikace S-nitrosylovaných proteinů v organizmu je díky nestabilitě S-NO vazby velmi náročná. V metodě BST bylo nejprve potřeba optimalizovat jednotlivé kroky (délka redukce a koncentrace askorbátu) tak, abychom spolehlivě a zároveň specificky redukovali -S-NO vazbu. Pro specifickou detekci byla navíc prováděna negativní kontrola. Jednotlivé kroky a spolehlivost metody byly nejprve ověřeny na proteinech aktivovaných krevních destiček zdravých dárců, ve kterých byla přítomnost S-nitrosylovaných proteinů již prokázána (Morrell C.N. et al., 2005; Essex D.W., 2009).

V naší práci jsme našli tyto S-nitrosylované proteiny v krevních destičkách MDS pacientů: cytoplazmatický aktin 1 a 2, γ řetězec fibrinogenu, sérový albumin a desmoglein. U destiček zdravých dárců byla popsána S-nitrosylace N-ethylmaleiimid senzitivního faktoru, proteindisulfidisomerasy, integrinu αIIbβ3 (Zai A. et al., 1999; Yan B. and Smith J.W., 2000; Morrell C.N. et al., 2005), zatímco S-nitrosylace destičkových proteinů u MDS doposud studována nebyla. V následujících odstavcích je uveden přehled nalezených S-nitrosylovaných destičkových proteinů u MDS pacientů a diskutován vliv této modifikace na vlastnosti a chování proteinu a jejich možná role v patofyziologii hemostázy u MDS pacientů.

Fibrinogen je důležitým aktivátorem destiček prostřednictvím integrinového receptoru αIIbβ3 nezbytný pro tvorbu primární hemostatické zátky. Vazebné místo pro destičkový integrin je na gama řetězci fibrinogenu. K zabránění této aktivace může dojít jednak konformačními změnami receptoru, ale také jeho ligandu. Zjistili jsme, že modifikace fibrinogenu testovanými činidly vedla k pozměněné tvorbě fibrinové sítě a způsobovala sníženou aktivaci krevních destiček (Štikarová J. et al., 2013). Bylo zjištěno, že S-nitrosylovaný glutathion dokázal také pozměnit strukturu fibrinogenu (Akhter S. et al., 2002). S-nitrosylace fibrinogenu mohla tedy podobně vést ke konformačním změnám a způsobovat tak omezenou aktivaci destiček přes integrinový receptor u MDS pacientů. Dalším nalezeným S-nitrosylovaným proteinem byl aktin. Aktin obsahuje 6 thiolových skupin na C- konci. Tento úsek molekuly aktinu je nezbytný k jeho polymerizaci a cytoskeletární reorganizaci při aktivaci destiček (Fiaschi T. et al., 2006). Zároveň je tento úsek velice dobře dostupný jiným molekulám a modifikačním činidlům. S-nitrosylace cysteinových zbytků aktinu byla nalezena v buňkách neutrofilů, kde způsobovala pozměněnou polymerizaci aktinu a tvorbu sítě s následnou inhibicí integrinového receptoru (Schoenenberger C.A. et al., 1999). Předpokládáme, že S-nitrosylace aktinu v destičkách by mohla mít podobné důsledky jako ve zmiňovaných neutrofilech. Zajímavým identifikovaným S-nitrosylovaným proteinem byl desmoglein. Jednalo se o membránový glykoprotein protein (113 kDa), který je ze skupiny kadherinů. Tento protein je součástí desmozomálních spojení a zprostředkovává mezibuněčnou adhezi buněk zprostředkovanou filamenty. Nedávno byl identifikován jako cytoplazmatický proteinový fragment v supernatantu aktivovaných destiček, nicméně předpokládá se, že nebyl součástí krevních destiček, ale intaktním proteinovým kontaminantem přenášeným zbytkovými mikročásticemi nebo destičkovými fragmenty (Fong K.P. et al., 2011). V naší práci byl také nalezen v krevních destičkách. Ovšem v naší dřívější studii S-nitrosylovaných proteinů u krevních destiček zdravých dárců nalezen nebyl (Pecankova K., 2010). Je tedy možné, že jeho přítomnost v krevních destičkách souvisela s MDS onemocněním, ale je také možné, že byl pouhým kontaminantem.

Předpokládáme, že S-nitrosylace proteinů krevních destiček u MDS vedla k poškození jejich funkce a tak může být příčinou krvácivých stavů komplikujících MDS onemocnění. Tendence ke krvácení typická pro MDS je často přisuzována trombocytopenii, nicméně dle posledních studií docházelo k poškození destiček u MDS a jejich následné dysfunkci (Frobel J. et al., 2013; Martin M. et al., 2013). Bylo zjištěno, že krevní destičky u MDS měly

sníženou schopnost aktivace a vykazovaly apoptotické znaky v porovnání s destičkami zdravých dárců (Martin M. et al., 2013). Předpokládá se, že docházelo k poruše signální dráhy přes integrin αIIbβ3 vedoucí ke snížené aktivaci, sekreci a agregaci (Frobel J. et al., 2013). V práci Ghoti et al. bylo zjištěno, že v krevních destičkách u MDS pacientů byla zvýšená koncentrace ROS a snížená koncentrace redukovaného GSH (Pereira-Leal J.B. et al., 2006), což vypovídá a oxidačním stresu v krevních destičkách MDS pacientů.

Domníváme se, že zvýšená koncentrace prooxidačních látek v plazmě MDS pacientů vedla k oxidačním modifikacím proteinů krevních destiček a tím poškozovala jejich funkci. Oxidační stres a S-nitrosylace jsou tak pravděpodobně jednou z příčin krvácivých stavů u MDS pacientů.

6.3. VÝVOJ PROTEINOVÉHO ČIPU

6.3.1. SPR biosenzor pro detekci VEGFR-1

Při vývoji biosenzoru pro detekci VEGFR-1 bylo třeba nalézt vhodnou imobilizaci interakčního partnera (VEGF-A) daného analytu. Proteiny musely být imobilizovány na povrch tak, aby byla zachována jejich biologická aktivita a přístupnost cílového místa pro interakci s jejich protějšky. Zároveň bylo třeba dosáhnout dostatečného pokrytí povrchu čipu a předejít nespecifické interakci analytů a jiných molekul biologického materiálu na povrch čipu. Dle práce Keyt et al. jsou pro interakci VEGF-A s VEGFR-1 kritickými negativně nabité aminokyselinové zbytky (Asp^{63}, Glu^{64}, a Glu^{67}) v aktivním místě VEGF-A (Keyt B.A. et al., 1996). Proto byl v naší práci VEGF-A imobilizován kovalentně vznikem amidové vazby mezi amino- skupinami na molekule VEGF-A a aktivovanými karboxylovými skupinami alkylthiolů. Negativně nabité skupiny VEGF-A tak zůstaly přístupné pro fyziologickou interakci s VEGFR-1. Pro zabránění nespecifické adsorpce VEGFR-1 na povrch byl povrch vysycen BSA. Je známo, že molekuly albuminu mají tendenci se vázat jedna k druhé a vytvářet tak multivrstvu. V našich předchozích experimentech jsme zjistili, že odezva senzoru na monovrstvu BSA byla 11 nm. Proto po imobilizaci VEGF-A byl povrch dovysycen tak, aby celková odezva senzoru na imobilizované molekuly na povrchu dosáhla 11 nm. Delší inkubace povrchu s BSA vedla ke snížení odezvy senzoru na vazbu VEGFR-1

s VEGF-A, pravděpodobně v důsledku toho, že BSA tvořil mutlivrstvu a redukoval tak vazebná místa ligandu VEGF-A pro VEGFR-1.

Dále bylo nutné ověřit, zda pozorovaná odezva odpovídá specifické interakci VEGF-A s VEGFR-1. Pro ověření specifické interakce VEGFR-1 s VEGF-A v pufru jsme porovnávali odezvu senzoru na povrch pokrytý VEGF-A a BSA, povrch pouze s VEGF-A a povrch pouze s BSA. Na povrch pokrytý pouze s VEGF-A byla nespecifická adsorpce 1,8x vyšší a na povrch pokrytý pouze BSA byla odezva 50x nižší. Stanovili jsme detekční limit pro detekci VEGFR-1 v pufru, který byl 3 ng/ml. Při detekci VEGFR-1 v ředěné plazmě docházelo k nespecifickým interakcím plazmatických proteinů s povrchem. BSA v pufru umožňoval redukovat nespecifickou interakci plazmatických proteinů s povrchem. 2% BSA/PBNa pufr s vyšší iontovou silou zajišťoval odstranění nespecificky navázaných proteinů, ale zároveň nedocházelo k narušení vazby VEGFR-1 k imobilizovanému VEGF-A. Interakce VEGF-A/VEGFR-1 byla specifická a stabilní, dosáhli jsme limitu detekce 25 ng/ml. Ověřili jsme, že interakce VEGF-A s VEGFR-1 byla stabilní, specifická a koncentračně závislá. Jako první jsme vyvinuli metodu pro detekci VEGFR-1 pomocí SPR. Bylo popsáno, že plazmatická koncentrace VEGFR-1 v plazmě pacientů dosahuje koncentrace 0,5 ng/mL, zatímco u zdravých dárců je asi 0,02 ng/ml. Současné metody používané k detekci VEGFR-1 jsou imunologické techniky (např. enzymatická imunoanalýza (ELISA)) založené na použití protilátek k uchycení proteinu a fluorescenčních značek nebo enzymatické amplifikace k vizualizaci vazby protilátka-protein. Hlavními nevýhodami uvedených metod je používání vysoce specifických protilátek, jejichž výroba je obtížná a drahá. Použití protilátek také omezuje možnost detekce VEGFR-1 v komplexech s jinými molekulami v důsledku stochiometrických a sterických omezení (Belgore F.M. et al., 2001; Vaisocherova H. et al., 2009). Interakce protilátka-protein navíc nepředstavuje fyziologickou interakci a biologickou aktivitu proteinu. Ačkoliv námi vyvinutý senzor nedosahoval takové citlivosti, jako např. ELISA, vyžadovala detekce pouze jeden rozpoznávací element a mohla tak umožnit detekci VEGFR-1 v komplexech s jinými proteiny. Vzhledem k tomu, že přesná role rozpustného VEGFR-1 u MDS není zcela objasněná, má SPR metoda pro detekci VEGFR-1, případně komplexu proteinů s VEGFR-1, pomocí jeho fyziologického protějšku VEGF-A velký potenciál. Tato práce představuje model pro tvorbu proteinového čipu pro studium protein-protein interakcí v patofyziologii MDS.

6.3.2. Příprava komplexního vzorku

Plazma je komplexní vzorek, a ačkoliv vývoj nových povrchů s minimální nespecifickou odezvou jde rychle vpřed, citlivá detekce málo zastoupených proteinů v plazmě je stále obtížná. Testovali jsme různé metody přípravy vzorku, které by snížili nespecifickou odezvu senzoru a zvýšily tak citlivost čipu k proteinům, které se mohou nacházet v plazmě MDS pacientů ve velmi malé koncentraci. Depleční techniky jsou hojně využívány v proteomice při identifikačních i kvantifikačních metodách (Polaskova V. et al., 2010). Pro studium protein-protein interakcí a detekci pomocí SPR ještě využity nebyly. Pomocí hmotnostní spektrometrie jsme zjistili, že nespecifickou odezvu tvořily především albumin, komplement, fibrinogen, imunoglobuliny, apolipoprotein a alfa-1-antitrypsin, a potvrdilo se, že odezva senzoru na plazmu depletovanou kolonou Hu14, která všechny uvedené proteiny depletuje, byla skutečně nejnižší a umožnila tak dosažení až 1,6x nižšího limitu detekce pro VEGFR-1 v 10% plazmě. Je ovšem třeba brát zřetel na možnost odstranění některých proteinů vázaných na depletované proteiny. Tento krok byl ověřen přidáním VEGFR-1 do plazmy před deplecí a zjistili jsme, že VEGFR-1 se eluuje ve druhé frakci spolu s depletovanými proteiny. Dlouhý proces deplece za pokojové teploty také může vést k poškození a ztrátě funkce analytů. Bylo tedy třeba nejprve ověřit, zda nedochází k eluci proteinu v komplexu s odstraněnými hojně zastoupenými proteiny ve 2. frakci a jestli je cílový protein dostatečně stabilní. Pro studium interakcí pomocí proteinového čipu byla tedy z tohoto důvodu použita plazma plná.

6.3.3. Proteinový čip

Nejpoužívanější metody pro studium protein-protein interakcí jsou kvasničný dvojhybridní systém (Y2H), afinitní purifikace (AP) s následnou hmotnostní spektrometrií (Ito T. et al., 2001; Berggard T. et al., 2007) a proteinové čipy, tzv. „high-throughput“ metody umožňující analýzu velkého počtu interakcí v jediném experimentu (Schena M., 2006). Metoda Y2H slouží ke studiu párových interakcí a je limitována na proteiny, které mohou být transportovány do jádra a zachovávají si strukturu a aktivitu ve formě fúzního proteinu (Gentleman R. and Huber W., 2007; Wildová M. and Rumlová M., 2008). Afinitní purifikace jsou hojně využívány ke studiu proteinových komplexů v buněčném lyzátu nebo jiném

biologickém materiálu a v kombinaci s hmotnostní spektrometrií je metoda vhodná ke studiu interakce známého proteinu s neznámými (Gavin A.C. et al., 2002; Wildová M. and Rumlová M., 2008). Ovšem ani jedna z výše uvedených metod neumožňuje „high-throughput" detekci. Proteinové čipy jsou výborným nástrojem pro hledání biomarkerů, pro diagnostiku a především jednou z hlavních metod systémové biologie zabývající se vztahy a chováním všech prvků v biologickém systému (Yang L. et al., 2011). Naše práce se zabývala přípravou SPR proteinového čipu, který využíval fyziologických interakcí ke studiu patofyziologických procesů myelodysplastického syndromu. Předpokládali jsme, že nalezené rozdíly pomocí SPR čipu a jejich následná identifikace povede k odhalení oblasti subproteomu u MDS pacientů, jejíž následné studium přispěje k objasnění některých signálních procesů v patofyziologii MDS.

Rozdíly byly hledány pomocí osmi ukotvených proteinů (4 párů), přičemž čtyři z nich jsou biomarkery MDS onemocnění a zároveň jejich exprese podléhá redoxním vlivům, zbývající čtyři jsou jejich fyziologickými partnery (receptory/ligandy) a jejich interakce s MDS markery je součástí známé signální dráhy. V naší práci byly receptory a jejich ligandy imobilizovány kontaktní depozicí pomocí kovalentní amidové vazby. Nebylo tedy nutné protein fúzovat nebo modifikovat různými značkami (rozdíl od AP). Zachování struktury a aktivity studovaného proteinu během imobilizace na povrch čipu jsme ověřili sledováním interakce se známým proteinem. Zároveň bylo ověřeno, že vybrané proteiny měly vysokou afinitu ke svým partnerům, nízkou disociační konstantu a tvořily stabilní komplexy vyvolávající odezvu, kterou bylo možné určit pomocí SPR.

Zatímco metoda Y2H umožňuje studovat pouze párové interakce, metoda SPR je vhodná ke studiu jak párových interakcí, tak ke studiu tvorby proteinových komplexů. Metodou SPR je možné sledovat permanentní fyzické interakce[4] i přechodné fyzické inerakce[4]. V našem experimentu jsme rozlišovali pravé pozitivní interakce[5] a pravé negativní

[4] Permanentní fyzické interakce jsou takové, které vytvářejí stabilní komplex vykonávající nějakou biomolekulární (strukturní nebo funkční) úlohu, zatímco přechodné fyzické interakce vznikají pouze za určitých podmínek k vykonání specifické biomolekulární funkce (De Las Rivas J. and de Luis A., 2004).

[5] Pravé pozitivní interakce jsou interakce, které jsou testovány a pozorovány. Jako pravé negativní interakce jsou označovány interakce, které neexistují a v experimentu nejsou pozorovány. Falešně negativní

interakce[5]. K falešně negativním interakcím[5] mohlo docházet v důsledku velmi nízké koncentrace proteinu ve vzorku, nízké afinity proteinů, případně špatné dostupnosti interakčních míst na imobilizovaném proteinu. Zkreslení výsledků falešně pozitivními interakcemi[5] jsme předcházeli vyhodnocením dat pomocí databáze experimentálně ověřených interakcí String Networks.

Častým problémem metod pro studium protein-protein interakcí je nespecifičnost. V naší studii jsme se potýkali s nespecifickou interakcí plazmy s povrchem. Ta byla sledována jednak pomocí kontrolního bodu (blank) a případná odezva senzoru na nespecifickou interakci s povrchem pak byla odečtena od průměrných specifických interakcí. Navíc při identifikaci interagujících proteinů byla prováděna negativní kontrola. Identifikované proteiny tvořící nespecifickou interakci s povrchem byly odečteny od souboru proteinů identifikovaných po interakci se studovaným proteinem.

Specifičnost interakce mezi proteiny jsme řešili třemi způsoby: 1. ověřili jsme ji detekcí interakce mezi známými dvojicemi proteinů, 2. při detekci interakcí v plazmě byl čip po interakci plazmy s cílovými proteiny inkubován 10 min s pufrem o vyšší iontové síle, kdy docházelo k přerušení nestabilních a nekovalentních vazeb a tudíž k odmytí nespecificky interagujících proteinů, 3. z identifikovaných proteinů pak byly popsány pouze ty, jejichž interakce s našimi cílovými proteiny byla experimentálně potvrzena a popsána v databázi String Networks. Je zřejmé, že pro studování jednotlivých interakcí, jejich konkrétních úloh v komplexech a hledání nových interakcí by bylo potřeba jednotlivé interakce ověřovat a hodnotit také jinými technikami. Nicméně cílem této práce bylo identifikovat proteiny zajímavé pro studium MDS, jejichž odhalení bude následováno ověřováním vztahů mezi proteiny v jednotlivých komplexech a hledáním neznámých interakcí. Tato práce navrhuje nový model proteinového čipu pro studium MDS a představuje pilotní data identifikovaných proteinů.

interakce jsou interakce, které existují, ale v experimentu nejsou pozorovány. Falešně pozitivní interakce jsou interakce, které neexistují, ale v experimentu jsou pozorovány (Gentleman R. and Huber W., 2007).

6.3.4. MDS signalizace – pilotní výsledky

Myelodysplastický syndrom byl doposud intenzivně studován pomocí DNA mikročipů, čipů pro karyotypizaci jednonukleotidového polymorfizmu a proteinových čipů reverzní fáze (Vasikova A. et al., 2009; Peng H. et al., 2012; Shaffer L.G. et al., 2013). Dle našeho nejlepšího vědomí dosud nevyšla studie zabývající se protein-protein interakcemi u myelodysplastického syndromu. V naší práci jsme navrhli SPR proteinový čip, na jehož povrchu se nacházely proteiny, které hrají roli v MDS onemocnění. Pomocí čipu jsme pak vybraly 4 body, které se nejvíce lišily od kontrolních pacientů a zároveň se jednalo o různé proteiny, případně různé podskupiny MDS pacientů a pomocí hmotnostní spektrometrie jsme identifikovali proteiny, které rozdíly tvořily.

K identifikaci nalezených proteinů byly v naší práci použity dvě proteinové databáze dostupné na internetu: Swissprot a TrEMBL. Swissprot je rozsáhlou databází obsahující informace o funkčních vlastnostech proteinu, posttranslačních modifikacích, struktuře, doménách a dalších. TrEMBL představuje databázi translatovaných všech kódujících nukleotidových sekvencí v databázi EMBL, které ještě nebyly zahrnuty do databáze Swissprot. V TrEMBLu jsou zahrnuty T-buněčné receptory, syntetické sekvence, fragmenty kratší než 8 aminokyselin a kódující sekvence, které s velkou pravděpodobností nekódují skutečný protein (O'Donovan C. et al., 2002).

Ke zpracování velkého množství dat jsme využili grafické znázornění. Existuje mnoho typů grafického znázornění, které nabízí přehled přímých a nepřímých binárních interakcí, znázornění komplexů - graf typu „bipartite“, asymetrických interakcí - „directed-graph“ (pomocí proteinu B nalezneme protein A, ale pomocí proteinu A nenalezneme protein B) a další (Gentleman R. and Huber W., 2007). V naší práci byly použity tzv. „powergraph“ grafy. Jedná se o poměrně novou formu znázornění interakční sítě, která umožňuje přehledné znázornění binárních interakcí a zároveň komplexů včetně zachování informace o jejich vnitřní organizaci (Royer L. et al., 2008).

Na základě identifikovaných souborů jsme vytvořili proteinovou mapu ze všech identifikovaných proteinů, které interagovaly s vybranými proteiny na povrchu. Interakční proteinová síť navrhla soubor proteinů interagujících s proteiny na povrchu, dále skupinu proteinů, které pravděpodobně tvoří proteinové komplexy s imobilizovanými proteiny a

možné komplexy, se kterými by mohly imobilizované proteiny interagovat. Znázornění pomocí powergrafů také umožnilo lépe zachytit topologii sítě. Černé kroužky shlukovaly proteiny, o kterých je známo, že spolu interagují a zároveň proteiny s podobnou funkcí nebo biologickou úlohou. Naše studie zahrnovala plazmatické proteiny, rozpustné formy membránových proteinů nebo buněčné proteiny sekretované do plazmy. Jednalo se o soubory proteinů zapojených v hemostáze, aktivaci T-lymfocytů a imunitní odpovědi organizmu, proteinů zajišťujících přenos signálu do buňky, proteinů zahrnutých v buněčném transportu a metabolizmu železa a souboru sdružujícím proteiny účastnící se regulace růstu, metastázování tumorů, buněčné adheze, degradace a syntézy proteinů. Na základě této sítě navrhujeme uvedené oblasti proteomu k dalšímu studiu v souvislosti s MDS onemocněním.

Dále jsme se zabývali proteiny z identifikovaného souboru proteinů, které mohly dle databáze String Networks přímo interagovat s jednotlivými proteiny na povrchu. Na základě ”in silico” analýzy předpokládáme, že komponenta v plazmě pacientů s RAEB II-3 interagujicí s proteinem LFA-1 navázaným na SPR čipu je komplex dalších integrinů, především podjednotek proteinu VLA-4. Integriny alfa a beta jsou receptory na povrchu lymfocytů, monocytů a eozinofilů, které zprostředkovávají migraci buněk imunitního systému přes cévní stěnu do extravaskulární matrix během imunitní odpovědi organizmu (Yusuf-Makagiansar H. et al., 2002). Interakce těchto integrinů s fibronektinem, který se v komplexu také nacházel je součástí procesů u chronických zánětlivých onemocnění, jako jsou revmatoidní artritida, alergie, lupenka a astma. Dalšími z nalezených možných interagujících proteinů byl protein VCAM-1 a tyrosinkinasa c-Src a proteinkinasa spojená s integriny. Aktivací integrinů v průběhu buněčné adheze dochází k aktivaci c-Src tyrosinkinasy a spuštění signální dráhy regulující buněčnou adhezi, migraci a morfologické změny včetně neoplastické transformace (Thomas S.M. and Brugge J.S., 1997; Goldberg G.S. et al., 2003). Src signální dráha je klíčová pro buněčnou migraci a invazi spojenou s nádorovou progresí a metastázováním (Aleshin A. and Finn R.S., 2010; Sen B. and Johnson F.M., 2011).

Podobně v plazmě pacientů s RCMD-1 a RAEB II-1 mohl protein VCAM-1 vytvořit opět komplex s integriny a fibronektinem. Celý komplex by mohl interagovat s komplexem, který tvořily proteinkinasa C typ alfa (Serine/threonine-protein kinase N1, PCKα) a protoonkogenní tyrosinkinasa Src. Tyto výsledky ukazují, že podobně jako u pacienta RAEB II-3 by mohla hrát u pacientů s RCMD-1 a RAEB II-1 roli Src tyrosinkinasa.

Studium interakční sítě ukázalo, že v plazmě MDS pacientů RCMD-3 existovala možnost tvorby komplexu proteinu CD152 a tyrosinkinasy Lck, který by mohl dále interagovat s komplexem obsahujícím tyrosinkinasu Fyn a tyrosinproteinfosfatasu nereceptorového typu 11 a s proteiny tyrosinkinasou Yes a tyrosinproteinfosfatasou nereceptorového typu 11 (Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 11, SHP-2). CD152 je negativním regulátorem T-lymfocytární aktivace. Tyrosinproteinfosfatasy a tyrosinkinasy jsou důležitými regulátory exprese CD152 na buněčném povrchu a CD152 zprostředkované inhibice T-lymfocytů, nicméně přesný mechanizmus a role CD152 v imunitních odpovědích organizmu není zcela objasněna (Walker L.S. and Sansom D.M., 2011).

Skupina Src tyrosinkinas (protoonkogenní c-Src) má 9 členů, přičemž tyrosinkinasy Src, Fyn, Yes jsou na všech buňkách, zatímco ostatní jsou pouze na buňkách hematopoetických. Src tyrosinkinasy jsou důležitými regulátory signálních drah zahrnutých v buněčné proliferaci, adhezi a migraci (Ostman A. et al., 2006). Bylo popsáno, že některé ze Src tyrosinkinas byly zvýšeně exprimované u AML (Boehrer S. et al., 2011), chronické myeloidní leukémie (Doki N. et al., 2012) a B buněčné chronické lymfocytární leukémie (Hussein K. et al., 2009). U AML vedla blokace c-Src tyrosinkinas k inhibici fosforylace a indukovala apoptózu leukemických buněk (Boehrer S. et al., 2011). U MDS byla výrazně exprimovaná pouze HCK Scr tyrosinkinasa, zatímco exprese Lyn tyrosinkinasy u AML vyvinuté z MDS byla významně snížená (Hussein K. et al., 2009). PCKα se účastní mnoha biologických procesů jako jsou proliferace, apoptóza, diferenciace, pohyb a zánět. Je aktivována přes tyrosinkinasové receptory a efekt její aktivace záleží na tom kde, kdy a jakými substráty byla PCKα aktivována (Nakashima S., 2002). Tyrosinkinasy Src a proteinkinasy C byly také nedávno popsány jako nové cíle terapie MDS (Gore S.D., 2004). Je zřejmé, že tyrosinkinasy Src a proteinkinasy C by mohly hrát důležitou roli ve vývoji myeloidních malignit, ovšem jejich funkce v patologii MDS nebyla ještě objasněna.

Proteinový čip umožnil získání velkého množství cenných dat, která nám pomohla vytipovat oblasti proteomu zajímavé pro další studium MDS. Prezentovaná interakční síť je užitečným nástrojem, který přehledně ukazuje část lidského proteomu, experimentálně získaného ve studovaném systému, v souvislosti s již známými interakcemi proteinů a pomáhá tak najít cíle pro analýzu nových sdružení a signalizačních drah.

7. ZÁVĚR

Stanovili jsme parametry oxidačního stresu u MDS pacientů a zdravých dárců a zjistili jsme, že u MDS pacientů dochází k oxidačnímu stresu. Jako první jsme popsali zvýšenou koncentraci celkového cysteinu a cysteinylglycinu a sníženou koncentraci celkového glutathionu a oxidu dusnatého v plazmě MDS pacientů v porovnání se zdravými dárci. Uvedené parametry nekorelovaly s hladinami volného železa nebo feritinu v plazmě MDS pacientů. Zjistili jsme, že pacienti přetížení železem měly signifikantně zvýšené hladiny malondialdehydu, ale ostatní parametry se mezi nimi významně nelišily. Poprvé jsme nalezli signifikantně zvýšené hladiny derivátů argininu a MDA u MDS pacientů s normální hladinou železa (Stikarova J. et al., 2013). Tyto výsledky podporují hypotézu, že oxidační stres nesouvisí pouze se zvýšenými hladinami železa u MDS pacientů.

Získali jsme soubor proteinů, který by mohl obsahovat karbonylované proteiny a charakterizovali jsme S-nitrosylace proteinů u MDS pacientů, které nebyly v souvislosti s MDS doposud studovány. Stanovili jsme rozkladné produkty methylovaných proteinů (ADMA, MMA, SDMA) a zjistili jsme, že jejich koncentrace byla signifikantně zvýšená u MDS pacientů, což vypovídalo o zvýšené methylaci proteinů u MDS pacientů (Stikarova J. et al., 2013). V plazmě MDS pacientů jsme nalezli signifikantně zvýšenou koncentraci karbonylovaných proteinů ve srovnání se zdravými dárci a identifikovali jsme 16 různých proteinů, z nichž některé by mohly být karbonylované v souvislosti s MDS onemocněním. V krevních destičkách MDS pacientů jsme nalezli 5 proteinů, které podléhají S-nitrosylaci u MDS pacientů. Předpokládáme, že možná karbonylace, u některých z nalezených proteinů, by mohla být nejen důsledkem, ale i jednou z příčin oxidačního stresu u MDS pacientů. Dále pak by mohla souviset s angiogenezí, defektním vývojem monocytární větve myeloidní linie u CMML, poruchami hemostázy a poruchami komplementu popsaných u MDS (Štikarová J. et al., 2013). Vzhledem k tomu, že karbonylace je také součástí signalizačních procesů, mohlo docházet tedy nejen ke ztrátě funkce proteinu oxidační modifikací, ale také k pozměněné expresi jiných proteinů hrajících roli v patofyziologii MDS (VEFGR-1, ICAM-1, VCAM-1). Předpokládáme, že S-nitrosylace destičkových proteinů vede k omezené aktivaci destiček a poškození jejich funkce. Domníváme se, že oxidační stres v plazmě MDS pacientů je tak pravděpodobně jednou z příčin krvácivých stavů u MDS pacientů.

Popsali jsme plazmatické proteiny účastnící se patofyziologických procesů u MDS pomocí metody SPR a hmotnostní spektrometrie. Byl vyvinut SPR biosenzor pro detekci markeru MDS VEGFR-1 pomocí jeho fyziologického protějšku VEGF-A (Pimkova K. et al., 2012). Optimalizovali jsme podmínky imobilizace a interakce s VEGFR-1 v 2% plazmě na SPR na čipu. VEGF-A na povrchu tvořil stabilní vrstvu s dostatečným počtem vazebných míst pro VEGFR-1 a zachováním jeho biologické aktivity. Byl navrhnut SPR proteinový čip, pomocí nějž jsme nalezli rozdíly mezi zdravými dárci a pacienty s MDS. Identifikovali jsme soubor proteinů, z nějž některé tvořily komplex s klíčovými molekulami MDS onemocnění a vytipovali jsme tak oblasti subproteomu, které by mohli hrát roli v patofyziologii MDS. Navrhujeme možnou roli Src tyrosinkinas v patogenezi MDS.

Naše výsledky byly v souladu s hypotézou č. 1, která tvrdila, že oxidační stres, ke kterému dochází v plazmě MDS pacientů, nevzniká pouze v důsledku přetížení železem, ale i z jiných příčin. Předpokládáme, že k uvedené zvýšené koncentraci cysteinu a cysteinylglycinu a snížené koncentraci glutathionu by mohlo docházet v důsledku zvýšené aktivity GGT u MDS pacientů. Zatímco snížená koncentrace oxidu dusnatého byla pravděpodobně způsobena sníženou produkcí oxidu dusnatého endoteliální NO synthasou odpojením eNOS v důsledku oxidačního stresu a případně vazby dusitanů na volný hemoglobin. Na základě uvedených dat předpokládáme, že oxidační stres u MDS pacientů by mohl vznikat poškozením eNOS s následnou produkcí superoxidového radikálu v důsledku zvýšené koncentrace methylovaných argininů.

Naše data byla v souladu s hypotézou č. 2, jejímž tvrzením bylo, že oxidační stres u MDS je důležitou příčinou změn proteomu u MDS. Práce navrhuje možnou roli Src tyrosinkinas v patofyziologii MDS a jeho progresi do AML. Naše výsledky ukázaly, že proteinový čip umožnil získání velkého množství cenných dat, která poskytují náhled do patologických procesů MDS a nabízí formulace nových hypotéz. Prezentovaná interakční síť je užitečným nástrojem, který přehledně ukazuje část lidského proteomu, experimentálně získaného ve studovaném systému, v souvislosti s již známými interakcemi proteinů. Takto nalezené předpokládané interakce lze testovat nezávislými metodami a tak nacházet nová sdružení a signalizační dráhy proteinů. Verifikované výsledky pak poslouží jako výchozí odrazový můstek pro další experimenty a terapeutické cíle.

8. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ACN	acetonitril
ADMA	asymetrický dimethylarginin
AdoHcy	S-adenosylhomocystein
AdoMet	S-adenosylmethionin
AK	aminokyselina
AML	akutní myeloidní leukémie
ANOVA	analýza rozptylu
AP	afinitní purifikace
ATP	adenosintrifosfát
ATR	oslabený totální odraz (atenuated total refraction)
BCIP	5-brom-4-chlor-3-indolylfosfát (draselná sůl)
BHT	2,6-bis-(terc.butyl)-4-methylfenol
BSA	hovězí sérový albumin (bovine serum albumin)
BST	biotin swich technique
C	cystein
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
CCD	z angl. charged-coupled device
CD152	cytotoxický T-lymfocytární protein 4 (Cytotoxic T-lymphocyte protein 4, CTLA-4)
CD28	T-cell-specific surface glycoprotein CD28
CD80	T-lymphocyte activation antigen CD80
CD86	T-lymfocyt aktivační antigen (T-lymphocyte activation antigen CD86)
CG	cysteinylglycin
cGMP	cyklický guanosinmonofosfát
CMML	chronická myelomonocytární leukémie
CTLA-4	viz CD152
CZE	kapilární zónová elektroforéza
DAF-2	4,5-diaminofluorescein
DAN	2,3-diaminonaftalen
DMF	N,N-dimethylformamid

DNPH	dinitrofenylhydrazin
DTT	1,4-dithiothreitol
EA	ethanolamin
EDC	3-(ethyliminomethylideneamino)-N,N-dimethylpropan-1-amin
eNOS	endoteliální NO synthasa
EPR	elektronová paramagnetická rezonance
f.c.	finální koncentrace
GGT	gama-glutamyltranferasa
GMP	guanosinmonofosfát
GSH	glutathion
GSSG	glutathiondisulfid
Hb	hemoglobin
HEPES	N-(2-hydroxyethyl)piperazin-N´-2-ethansulfonová kyselina
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie (high-performance liquid chromatogramy)
HPLC-ECD	HPLC s elektrochemickou detekcí
CH	pacienti vyžadující chelatační terapii
IAA	iodacetamin
ICAM-1	intracelulární adhezní molekula (Intercellular adhesion molecule 1)
IPSS	mezinárnodní prognostický skórovací systém (international prognostic scoring system)
LC	kapalinová chromatografie (liquid chromatography)
LFA-1	leukocytární funkční antigen – 1 (Leukocyte adhesion glycoprotein LFA-1)
$LOO^{\bullet}$	lipoperoxylový radikál
MDA	malondialdehyd
MDS	myelodysplastický syndrom
MDS/MPD	MDS/myeloproliferativní onemocnění
MMA	monomethylarginin
MMTS	S-methylmethanthiosulfonát
MS	hmotnostní spektrometrie (mass spectrometry)
NADP(H)	nikotinamidadenindinukleotidfosfát
NAL	nízkomolekulární antioxidační látky

NBT	nitro blue tetrazolium chlorid
NHS	1-hydroxypyrrolidin-2,5-dion
non-CH	pacienti nevyžadující chelatační terapii
NOS	NO synthasa
NTBI	železo navázané na transferin (non-tranferin bound iron)
PBS	fosfátový pufr (phosphate buffer saline)
PCKα	proteinkinasa C typ alfa (Serine/threonine-protein kinase N1)
PPP	plazma chudá na destičky (plasma poor platelets)
PRMTs	proteinargininmethyltransferasy
PRP	plazma bohatá na destičky (plasma rich platelets)
PVDF	polyvinyldifluorid
RA	refrakterní anémie (refractory anemia)
RAEB	refrakterní anémie s excesí blastů
RAEB-T	refrakterní anémie s excesí blastů v transformaci
RARS	refrakterní anémie s prstenčitými sideroblasty
RCMD	refrakterní anémie s multilineární dysplázií
RCMD-5q	RCMD s 5q syndromem
RCMD-RS	RCMD s prstenčitými sideroblasty
RNS	reaktivní formy dusíku (reactive nitrogen species)
ROS	reaktivní formy kyslíku (reactive oxygen species)
SA	acetát sodný (sodium acetate)
SBDF	amonium-7-fluorobenzofurazan-4-sulfonát
SC-NHL	SC-non-Hodkin lymfom
SD	směrodatná odchylka (standard deviation)
SDMA	symetrický dimethylarginin
SDS	sodiumdodecylsulfát sodný
SDS PAGE	SDS polyakrylamidová gelová elektroforéza
SHP-2	tyrosinproteinfostatasa nereceptorového typu 11 (Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 11)
sICAM	rozpustná forma intracelulární adhezní molekuly 1 (soluble intercellular adhesion molecule 1)
SOD	superoxiddismutasa

SPR	rezonance povrchového plazmonu (surface plasmon resonance)
sVCAM-1	rozpustná forma vaskulárního buněčného adhezního proteinu 1 (soluble vascular cell adhesion protein 1)
sVEGFR-1	rozpustná forma receptoru pro vaskulární endoteliální růstový faktor (soluble vascular endothelial growth factor receptor 1)
TBA	kyselina thiobarbiturová
t-C	celkový cystein (total cysteine)
TCA	kyselina trichloroctová
t-CG	celkový cysteinylglycin (total cysteinylglycine)
TEMED	N,N,N´,N´-tetramethyl-ethylendiamin
t-GSH	celkový glutathion
t-H	celkový homocystein
Trx	thioredoxin
TTAH	tetradecyltrimethylamonium hydroxid
VCAM-1	vaskulární buněčný adhezní protein 1
VEGF	vaskulární endoteliální růstový faktor A (Vascular endothelial growth factor A), také VEGF-A
VEGFR-1	receptor pro vaskulární endoteliální růstový faktor 1 (Vascular endothelial growth factor receptor 1)
VEGFR-2	receptor pro vaskulární endoteliální růstový faktor 2 (Vascular endothelial growth factor receptor 2)
VLA-4	velmi pozdní antigen 4 (Very late antigen 4)
WHO	světová zdravotnická organizace (world health organisation)
Y2H	kvasničný dvojhybridní systém

9. ABSTRAKT

Oxidační stres je významným faktorem v karcinogenezi onkohematologických onemocnění, ovšem jeho role v patogenezi myelodysplastického syndromu (MDS) nebyla doposud objasněna. V této práci jsme stanovili oxidační status v plazmě MDS pacientů a sledovali změny proteomu (oxidační modifikace proteinů, interakce a vznik komplexů), ke kterým v plazmě MDS pacientů v důsledku oxidačního stresu dochází.

Pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie jsme stanovili hladiny celkového cysteinu, homocysteinu, cysteinylglycinu, glutathionu, dusitanů a dusičnanů v plazmě 61 MDS pacientů a 23 zdravých dárců. Oxidační stres u MDS pacientů prezentovaný signifikantně sníženými hladinami glutathionu a dusitanů a signifikantně zvýšenými hladinami ostatních aminothiolů nekoreloval s přetížením železem. Dále jsme naměřili zvýšené hladiny asymetrického dimethylargininu v séru pacientů středního věku s MDS, které souvisí s posttranslační modifikací arginylových zbytků proteinů. Nalezli jsme signifikantně zvýšenou hladinu karbonylovaných proteinů v plazmě MDS v porovnání se zdravými dárci. Pomocí hmotnostní spektrometrie jsme identifikovali pět S-nitrosylovaných proteinů krevních destiček u MDS pacientů a navrhli jsme soubor šestnácti plazmatických proteinů, z nichž některé mohou být s velkou pravděpodobností karbonylované v souvislosti s MDS. Vyvinuli jsme biosenzor pro detekci proteinového markeru MDS receptoru pro vaskulární endoteliální růstový faktor 1 (soluble vascular endothelial growth factor receptor 1, sVEGFR-1), který využívá přirozené interakce VEGFR-1 s jeho ligandem vaskulárním endoteliálním růstovým faktorem A. Byl navrhnut SPR proteinový čip, pomocí nějž jsme identifikovali proteiny tvořící komplex s klíčovými molekulami MDS onemocnění. Vytipovali jsme tak soubor proteinů hrajících roli v patofyziologii MDS, který by mohl být cílem dalších studií.

Práce předkládá oxidační procesy jako důležitou příčinu změn proteomu u MDS, které hrají významnou roli v patofyziologii MDS.

Klíčová slova: myelodysplastický syndrom, oxidační stres, SPR, posttranslační modifikace, protein-protein interakce.

10. ABSTRACT

Oxidative stress is an important factor in carcinogenesis of oncohematological diseases. However its role in the pathogenesis of myelodysplastic syndromes (MDS) remains unclear. In this study, we have determined the oxidative status and evaluated proteomic changes in plasma of MDS patients as a consequence of oxidative dysbalance (oxidative modifications, protein-protein interaction and complex forming).

We measured the levels of total cysteine, homocysteine, cysteinyglycine, glutathione, nitrites and nitrates in the plasma from 61 MDS patients and 23 healthy donors using high performance liquid chromatography. Glutathione and nitrites levels reduced significantly while other aminothiols levels increased significantly in plasma of MDS patients. This association with oxidative stress did not correlate with iron overload. We also found enhanced levels of asymmetric dimethylarginine in serums of middle aged patients with MDS that correlate to posttranslational modifications of proteins arginyl residues. Furthermore, carbonylated proteins level was significantly elevated in MDS patients compared to healthy donors. Using mass spectrometry, 5 S-nitrosylated blood platelets proteins were identified in plasma and blood platelets of MDS patients and set of 16 plasma proteins with high probability of carbonylation has been suggested. The surface plasmon resonance (SPR) biosensor system for the direct and label-free detection of a soluble vascular endothelial growth factor receptor (sVEGFR-1) which takes advantage of a high affinity interaction between VEGFR-1 and its ligand vascular endothelial growth factor A has been developed. We designed a SPR protein chip allowing us to identify proteins forming complex with key molecules of MDS disease. We identified possible key proteins in MDS pathophysiology, which could be elucidated by further studies.

This study presents oxidative processes in MDS as an important cause proteomic changes and its significant role in the pathophysiology of MDS.

Key words: myelodysplastic syndromes, oxidative stress, SPR, posttranslational modification, protein-protein interaction.

11. LITERATURA

Acworth I.N. (2003). The Handbook of Redox Biochemistry. Chelmsford, MA, USA, ESA, Inc.

Ahmad R., et al. (2008). "Malondialdehyde and protein carbonyl as biomarkers for oxidative stress and disease progression in patients with chronic myeloid leukemia." In Vivo **22**(4): 525-528.

Aivado M., et al. (2007). "Serum proteome profiling detects myelodysplastic syndromes and identifies CXC chemokine ligands 4 and 7 as markers for advanced disease." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(4): 1307-1312. .

Akhand A.A., et al. (1999). "Carbonyl compounds cross-link cellular proteins and activate protein-tyrosine kinase p60c-Src." J Cell Biochem **72**(1): 1-7.

Akhter S., et al. (2002). "Evidence for S-nitrosothiol-dependent changes in fibrinogen that do not involve transnitrosation or thiolation." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(14): 9172-9177.

Aksenov M.Y., et al. (2001). "Protein oxidation in the brain in Alzheimer's disease." Neuroscience **103**(2): 373-383.

Alberts B. (2008). Molecular Biology of the Cell. New York, Garland Science.

Aleshin A. and Finn R.S. (2010). "SRC: a century of science brought to the clinic." Neoplasia **12**(8): 599-607.

Alusik S., et al. (2008). "Plasma levels of nitrite/nitrate and inflammation markers in elderly individuals." Bratisl Lek Listy **109**(7): 289-292.

Anderson M.E. and Siahaan T.J. (2003). "Targeting ICAM-1/LFA-1 interaction for controlling autoimmune diseases: designing peptide and small molecule inhibitors." Peptides **24**(3): 487-501.

Azimi-Nezhad M., et al. (2013). "Associations of vascular endothelial growth factor (VEGF) with adhesion and inflammation molecules in a healthy population." Cytokine **61**(2): 602-607.

Banerjee R., Ed. (2008). Redox Biochemistry. Hoboken, New Jersey, John Wiley & Sons, Inc.

Baraibar M.A., et al. (2011). "Oxidative stress-induced proteome alterations target different cellular pathways in human myoblasts." Free Radic Biol Med **51**(8): 1522-1532.

Bates C.J., et al. (2002). "Correlates of plasma homocysteine, cysteine and cysteinyl-glycine in respondents in the British National Diet and Nutrition Survey of young people aged 4-18 years, and a comparison with the survey of people aged 65 years and over." Br J Nutr **87**(1): 71-79.

Battisti V., et al. (2008). "Measurement of oxidative stress and antioxidant status in acute lymphoblastic leukemia patients." Clin Biochem **41**(7-8): 511-518.

Beckman J.S. and Koppenol W.H. (1996). "Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly." Am J Physiol **271**(5 Pt 1): C1424-1437.

Bedard K. and Krause K.H. (2007). "The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology." Physiol Rev **87**(1): 245-313.

Bedford M.T. and Richard S. (2005). "Arginine methylation an emerging regulator of protein function." Mol Cell **18**(3): 263-272.

Belgore F.M., et al. (2001). "Measurement of free and complexed soluble vascular endothelial growth factor receptor, Flt-1, in fluid samples: development and application of two new immunoassays." Clin Sci (Lond) **100**(5): 567-575.

Berggard T., et al. (2007). "Methods for the detection and analysis of protein-protein interactions." Proteomics **7**(16): 2833-2842.

Bienert G.P., et al. (2007). "Specific aquaporins facilitate the diffusion of hydrogen peroxide across membranes." J Biol Chem **282**(2): 1183-1192.

Biomarkers definition working group (2001). Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. Clin Pharmacol Therapeutics. **69:** 89-95.

Boehrer S., et al. (2011). "Erlotinib antagonizes constitutive activation of SRC family kinases and mTOR in acute myeloid leukemia." Cell Cycle **10**(18): 3168-3175.

Bowen D. and Peddie C. (2002). "Mitochondrial oxygen consumption and ineffective haematopoiesis in patients with myelodysplastic syndromes." Br J Haematol **118**(1): 345-346; author reply 346.

Braun P. and Gingras A.C. (2012). "History of protein-protein interactions: from egg-white to complex networks." Proteomics **12**(10): 1478-1498.

Bryan N.S. and Grisham M.B. (2007). "Methods to detect nitric oxide and its metabolites in biological samples." Free Radic Biol Med **43**(5): 645-657.

Busse S., et al. (2002). "Sensitivity studies for specific binding reactions using the biotin/streptavidin system by evanescent optical methods." Biosensors & Bioelectronics **17**(8): 704-710.

Ceaser E.K., et al. (2004). "Mechanisms of signal transduction mediated by oxidized lipids: the role of the electrophile-responsive proteome." Biochem Soc Trans **32**(Pt 1): 151-155.

Čermák J. (2002). Myelodysplastický syndrom. Praha, Česká lékařská společnost Jana Evangelisty Purkyně**:** 1-7.

Chen K., et al. (2003). "Beyond LDL oxidation: ROS in vascular signal transduction." Free Radic Biol Med **35**(2): 117-132.

Chen X., et al. (2000). "Oxidative damage in an esophageal adenocarcinoma model with rats." Carcinogenesis **21**(2): 257-263.

Cheung N., et al. (2007). "Protein arginine-methyltransferase-dependent oncogenesis." Nat Cell Biol **9**(10): 1208-1215.

Choi J.W. (2003). "No significant correlation exists between nitric oxide production and apoptosis in myelodysplastic syndromes." Acta Haematol **109**(1): 50-52.

Chwatko G. and Jakubowski H. (2005). "The determination of homocysteine-thiolactone in human plasma." Anal Biochem **337**(2): 271-277.

Cook-Mills J.M., et al. (2011). "Vascular cell adhesion molecule-1 expression and signaling during disease: regulation by reactive oxygen species and antioxidants." Antioxid Redox Signal **15**(6): 1607-1638.

Cortelezzi A., et al. (2000). "Non-transferrin-bound iron in myelodysplastic syndromes: a marker of ineffective erythropoiesis?" Hematology Journal **1**(3): 153-158.

Cortelezzi A., et al. (2001). "Hyperhomocysteinemia in myelodysplastic syndromes: specific association with autoimmunity and cardiovascular disease." Leuk Lymphoma **41**(1-2): 147-150.

Cusick M.E., et al. (2005). "Interactome: gateway into systems biology." Hum Mol Genet **14 Spec No. 2**: R171-181.

Dalle-Donne I., et al., Eds. (2006). Redox proteomics. From Protein Modifications to Cellular Dysfuncion and Disease Hoboken, New Jersey, John Wiley & Sons, Inc.

Davies C.A., et al. (1999). "Simultaneous analysis of nitrite, nitrate and the nicotinamide nucleotides by capillary electrophoresis: application to biochemical studies and human extracellular fluids." Electrophoresis **20**(10): 2111-2117.

De Chiara B., et al. (2012). "Plasma total cysteine and cardiovascular risk burden: action and interaction." ScientificWorldJournal **2012**: 303654.

De Donatis G.M., et al. (2010). "Cysteinyl-glycine in the control of glutathione homeostasis in bovine lenses." Mol Vis **16**: 1025-1033.

De Las Rivas J. and de Luis A. (2004). "Interactome data and databases: different types of protein interaction." Comp Funct Genomics **5**(2): 173-178.

De Las Rivas J. and Fontanillo C. (2010). "Protein-protein interactions essentials: key concepts to building and analyzing interactome networks." PLoS Comput Biol **6**(6): e1000807.

Di Giacomo G., et al. (2012). "Established Principles and Emerging Concepts on the Interplay between Mitochondrial Physiology and S-(De)nitrosylation: Implications in Cancer and Neurodegeneration." Int J Cell Biol **2012**: 361872.

Dickinson D.A. and Forman H.J. (2002). "Cellular glutathione and thiols metabolism." Biochem Pharmacol **64**(5-6): 1019-1026.

Dickinson D.A. and Forman H.J. (2002). "Glutathione in defense and signaling: lessons from a small thiol." Ann N Y Acad Sci **973**: 488-504.

Dixelius J., et al. (2006). "Minimal active domain and mechanism of action of the angiogenesis inhibitor histidine-rich glycoprotein." Cancer Res **66**(4): 2089-2097.

Dizdaroglu M. (2012). "Oxidatively induced DNA damage: mechanisms, repair and disease." Cancer Lett **327**(1-2): 26-47.

Doki N., et al. (2012). "Fyn is not essential for Bcr-Abl-induced leukemogenesis in mouse bone marrow transplantation models." Int J Hematol **95**(2): 167-175.

Donate F., et al. (2004). "Peptides derived from the histidine-proline domain of the histidine-proline-rich glycoprotein bind to tropomyosin and have antiangiogenic and antitumor activities." Cancer Res **64**(16): 5812-5817.

Dress A. and Vingron M., Eds. (2008). Protein-protein Interactions and Networks. Identification, Computer Analysis, and Prediction. London, United Kingdom, Springer-Verlag.

Droge W. (2002). "Free radicals in the physiological control of cell function." Physiol Rev **82**: 47–95.

Druhan L.J., et al. (2008). "Regulation of eNOS-derived superoxide by endogenous methylarginines." Biochemistry **47**(27): 7256-7263.

Dulak J. and Jozkowicz A. (2002). "Nitric oxide and angiogenic activity of endothelial cells: direct or VEGF-dependent effect?" Cardiovasc Res **56**(3): 487-488; author reply 489-491.

Eldibany M.M. and Caprini J.A. (2007). "Hyperhomocysteinemia and thrombosis: an overview." Arch Pathol Lab Med **131**(6): 872-884.

Esse R., et al. (2012). Methylation - From DNA, RNA and Histones to Diseases and Treatment. Dricu A., InTech, Chapters

Essex D.W. (2009). "Redox control of platelet function." Antioxid Redox Signal **11**(5): 1191-1225.

Farquhar M.J. and Bowen D.T. (2003). "Oxidative Stress and the Myelodysplastic Syndromes." Int J Hematol. **77**(4): 342-350.

Fiaschi T., et al. (2006). "Redox regulation of beta-actin during integrin-mediated cell adhesion." J Biol Chem **281**(32): 22983-22991.

Finkel T. (2000). "Redox-dependent signal transduction." FEBS Lett **476**(1-2): 52-54.

Fong K.P., et al. (2011). "Deciphering the human platelet sheddome." Blood **117**(1): e15-26.

Forrester M.T., et al. (2009). "Detection of protein S-nitrosylation with the biotin-switch technique." Free Radic Biol Med **46**(2): 119-126.

Frank D.A., Ed. (2003). Signal Transduction in Cancer. Cancer Treatment and Research. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers.

Fratelli M., et al. (2005). "Gene expression profiling reveals a signaling role of glutathione in redox regulation." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(39): 13998-14003.

Frobel J., et al. (2013). "Platelet proteome analysis reveals integrin-dependent aggregation defects in patients with myelodysplastic syndromes." Mol Cell Proteomics **12**(5): 1272-1280.

Gangemi S., et al. (2012). "Relationship between advanced oxidation protein products, advanced glycation end products, and S-nitrosylated proteins with biological risk and MDR-1 polymorphisms in patients affected by B-chronic lymphocytic leukemia." Cancer Invest **30**(1): 20-26.

Garcia A.J. and Apitz-Castro R. (2002). "Plasma total homocysteine quantification: an improvement of the classical high-performance liquid chromatographic method with fluorescence detection of the thiol-SBD derivatives." J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci **779**(2): 359-363.

Garibaldi S., et al. (2001). "Plasma protein oxidation and antioxidant defense during aging." Int J Vitam Nutr Res **71**(6): 332-338.

Gattermann N. (2000). "From sideroblastic anemia to the role of mitochondrial DNA mutations in myelodysplastic syndromes." Leuk Res **24**(2): 141-151.

Gattermann N. and Rachmilewitz E.A. (2011). "Iron overload in MDS-pathophysiology, diagnosis, and complications." Ann Hematol **90**(1): 1-10.

Gavin A.C., et al. (2002). "Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes." Nature **415**(6868): 141-147.

Gearing A.J. and Newman W. (1993). "Circulating adhesion molecules in disease." Immunol Today **14**(10): 506-512.

Gentleman R. and Huber W. (2007). "Making the most of high-throughput protein-interaction data." Genome Biology **8**(10).

Glód B.K. and Kowalski C. (2004). "Free radicals and their analysis using high perfomance liquid chromatography." Polish Journal of Food and Nutrition Sciences **13/54**: 23–28.

Goldberg G.S., et al. (2003). "Src phosphorylates Cas on tyrosine 253 to promote migration of transformed cells." J Biol Chem **278**(47): 46533-46540.

Gomperts B.D., et al. (2002). Signal Transduction, Elsevier Inc.

Gondek L.P., et al. (2008). "Chromosomal lesions and uniparental disomy detected by SNP arrays in MDS, MDS/MPD, and MDS-derived AML." Blood **111**(3): 1534-1542.

Gopalakrishna R. and Jaken S. (2000). "Protein kinase C signaling and oxidative stress." Free Radic Biol Med **28**(9): 1349-1361.

Gore S.D. (2004). "Inhibitors of signaling in myelodysplastic syndrome." Best Pract Res Clin Haematol **17**(4): 613-622.

Gow A.J., et al. (2002). "Basal and stimulated protein S-nitrosylation in multiple cell types and tissues." J Biol Chem **277**(12): 9637-9640.

Greenberg P., et al. (1997). "International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes." Blood **89**(6): 2079-2088.

Greenberg P.L. (2006). Myelodysplastic Syndromes: Clinical and Biological Advances. Cambridge, Cambridge University Press.

Grimsrud P.A., et al. (2008). "Oxidative stress and covalent modification of protein with bioactive aldehydes." J Biol Chem **283**(32): 21837-21841.

Gutteridge J.M. and Halliwell B. (1992). "Comments on review of Free Radicals in Biology and Medicine, second edition, by Barry Halliwell and John M. C. Gutteridge." Free Radic Biol Med **12**(1): 93-95.

Hanigan M.H., et al. (1999). "Altered expression of gamma-glutamyl transpeptidase in human tumors." Hum Pathol **30**(3): 300-305.

Harris M.E., et al. (1994). "Detection of oxidation products in individual neurons by fluorescence microscopy." Exp Neurol **129**(1): 95-102.

Hasanoglu E., et al. (1994). "The relationship between erythrocyte superoxide dismutase activity and plasma levels of some trace elements (Al, Cu, Zn) of dialysis patients." Gen Pharmacol **25**(1): 107-110.

Hayette S., et al. (2012). "High DNA methyltransferase DNMT3B levels: a poor prognostic marker in acute myeloid leukemia." Plos One **7**(12): e51527.

Heaney M.L. and Golde D.W. (1999). "Myelodysplasia." N Engl J Med **340**(21): 1649-1660.

Henderson L.M. and Chappel J.B. (1996). "NADPH oxidase of neutrophils." Biochim Biophys Acta **1273**(2): 87-107.

Hershko C., et al. (1998). "Pathophysiology of iron overload." Ann N Y Acad Sci **850**: 191-201.

Hess D.T., et al. (2005). "Protein S-nitrosylation: purview and parameters." Nat Rev Mol Cell Biol **6**(2): 150-166.

Hock B.D., et al. (2003). "The clinical significance of soluble CD86 levels in patients with acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome." Cancer **98**(8): 1681-1688.

Hoffmann J., et al. (2003). "Shear stress increases the amount of S-nitrosylated molecules in endothelial cells: important role for signal transduction." FEBS Lett **551**(1-3): 153-158.

Hogg N. (2002). "The biochemistry and physiology of S-nitrosothiols." Annu Rev Pharmacol Toxicol **42**: 585-600.

Homola J. (2003). "Present and future of surface plasmon resonance biosensors." Anal Bioanal Chem **377**(3): 528-539.

Homola J. (2008). "Surface plasmon resonance sensors for detection of chemical and biological species." Chemical Reviews **108**(2): 462-493.

Hu Q., et al. (2004). "Soluble vascular endothelial growth factor receptor 1, and not receptor 2, is an independent prognostic factor in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes." Cancer **100**(9): 1884-1891.

Huang W.T., et al. (2009). "Multiple distinct clones may co-exist in different lineages in myelodysplastic syndromes." Leuk Res **33**(6): 847-853.

Hussein K., et al. (2009). "Opposite expression pattern of Src kinase Lyn in acute and chronic haematological malignancies." Ann Hematol **88**(11): 1059-1067.

Imbesi S., et al. (2013). "Oxidative stress in oncohematologic diseases: an update." Expert Rev Hematol **6**(3): 317-325.

Issaq H.J., et al. (2002). "The SELDI-TOF MS approach to proteomics: protein profiling and biomarker identification." Biochem Biophys Res Commun **292**: 587–592.

Ito T., et al. (2001). "A comprehensive two-hybrid analysis to explore the yeast protein interactome." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(8): 4569-4574.

Ito Y., et al. (2002). "Elevated plasma level of differentiation inhibitory factor nm23-H1 protein correlates with risk factors for myelodysplastic syndrome." Leukemia **16**: 165-169.

Jackson D., et al. (2007). "Proteomic profiling identifies afamin as a potential biomarker for ovarian cancer." Clin Cancer Res **13**(24): 7370-7379.

Jacob C., et al. (2003). "Sulfur and selenium: the role of oxidation state in protein structure and function." Angew Chem Int Ed Engl **42**(39): 4742-4758.

Jacob C. and Winyard P.G., Eds. (2009). Redox Signaling and Regulation in Biology and Medicine. Weinheim, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.

Jaffrey S.R., et al. (2001). "Protein S-nitrosylation: a physiological signal for neuronal nitric oxide." Nat Cell Biol **3**(2): 193-197.

Jobgen W.S., et al. (2007). "Analysis of nitrite and nitrate in biological samples using high-performance liquid chromatography." J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci **851**(1-2): 71-82.

Jones D.P. and Go Y.M. (2010). "Redox compartmentalization and cellular stress." Diabetes Obes Metab **12 Suppl 2**: 116-125.

Jung L.S., et al. (2000). "Binding and dissociation kinetics of wild-type and mutant streptavidins on mixed biotin-containing alkylthiolate monolayers." Langmuir **16**(24): 9421-9432.

Kang J.H., et al. (2001). "Oxidative modification of human ceruloplasmin by peroxyl radicals." Biochim Biophys Acta **1568**(1): 30-36.

Kawakatsu M., et al. (2002). "Plasma Nitrate/Nitrite Concentration in Healthy Population and Patients with Diabetes Mellitus - Relationships with Gender, Aging and Diabetic Complications." Bulletin of the Osaka Medical College **48**: 1-6.

Kettle A.J., et al. (2004). "Myeloperoxidase and protein oxidation in the airways of young children with cystic fibrosis." Am J Respir Crit Care Med **170**(12): 1317-1323.

Kevil C.G., et al. (2004). "Regulation of endothelial glutathione by ICAM-1: implications for inflammation." FASEB J **18**(11): 1321-1323.

Keyt B.A., et al. (1996). "Identification of vascular endothelial growth factor determinants for binding KDR and FLT-1 receptors. Generation of receptor-selective VEGF variants by site-directed mutagenesis." J Biol Chem **271**(10): 5638-5646.

Kimura H. and Esumi H. (2003). "Reciprocal regulation between nitric oxide and vascular endothelial growth factor in angiogenesis." Acta Biochim Pol **50**(1): 49-59.

Kitagawa M., et al. (1999). "Expression of inducible nitric oxide synthase (NOS) in bone marrow cells of myelodysplastic syndromes." Leukemia **13**(5): 699-703.

Kleinbongard P., et al. (2003). "Plasma nitrite reflects constitutive nitric oxide synthase activity in mammals." Free Radic Biol Med **35**(7): 790-796.

Klener P. (2002). Klinická onkologie. Praha, Galén.

Kohen R. and Nyska A. (2002). "Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification." Toxicol Pathol **30**(6): 620-650.

Kupková Z. and Beneš L. (2004). "CHemické vlastnosti, biologické účinky a metody detekce biologického oxidu dusnatého." Chemické listy **98**: 116 - 122.

Kupková Z. and Beneš L. (2004). "Chemické vlastnosti, biologické účinky a metody detekce biologického oxidu dusnatého." Chemické Listy **98**: 116 – 122.

Kuthan H., et al. (1982). "A quantitative test for superoxide radicals produced in biological systems." Biochem J **203**(3): 551-558.

Lahiri J., et al. (1999). "A strategy for the generation of surfaces presenting ligands for studies of binding based on an active ester as a common reactive intermediate: A surface plasmon resonance study." Anal Chem **71**(4): 777-790.

Lauer T., et al. (2001). "Plasma nitrite rather than nitrate reflects regional endothelial nitric oxide synthase activity but lacks intrinsic vasodilator action." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(22): 12814-12819.

Lee J.M., et al. (2007). "Direct immobilization of protein G variants with various numbers of cysteine residues on a gold surface." Anal Chem **79**(7): 2680-2687.

Lee R., et al. (2012). "Evaluating oxidative stress in human cardiovascular disease: methodological aspects and considerations." Curr Med Chem **19**(16): 2504-2520.

Leiper J. and Vallance P. (1999). "Biological significance of endogenous methylarginines that inhibit nitric oxide synthases." Cardiovasc Res **43**(3): 542-548.

Leitch H.A. (2011). "Controversies surrounding iron chelation therapy for MDS." Blood Rev **25**(1): 17-31.

Levine R.L. and Stadtman E.R. (2001). "Oxidative modification of proteins during aging." Exp Gerontol **36**(9): 1495-1502.

Levine R.L., et al. (1994). "Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins." Methods Enzymol **233**: 346-357.

Li H. and Forstermann U. (2013). "Uncoupling of endothelial NO synthase in atherosclerosis and vascular disease." Curr Opin Pharmacol **13**(2): 161-167.

Li Z., et al. (2001). "Genes regulated in human breast cancer cells overexpressing manganese-containing superoxide dismutase." Free Radic Biol Med **30**(3): 260-267.

Liu F., et al. (2011). "JAK2V617F-mediated phosphorylation of PRMT5 downregulates its methyltransferase activity and promotes myeloproliferation." Cancer Cell **19**(2): 283-294.

Liu K.Q., et al. (2012). "Identifying dysregulated pathways in cancers from pathway interaction networks." BMC Bioinformatics **13**: 126.

Liu X., et al. (1998). "Accelerated reaction of nitric oxide with O2 within the hydrophobic interior of biological membranes." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(5): 2175-2179.

Lopez-Sanchez L.M., et al. (2009). "Unraveling the S-nitrosoproteome: tools and strategies." Proteomics **9**(4): 808-818.

Lundberg J.O., et al. (2008). "The nitrate-nitrite-nitric oxide pathway in physiology and therapeutics." Nat Rev Drug Discov **7**(2): 156-167.

Lundberg L.G., et al. (2006). "Angiogenesis in relation to clinical stage, apoptosis and prognostic score in myelodysplastic syndromes." Leuk Res **30**(3): 247-253.

Mac Gabhann F. and Popel A.S. (2008). "Systems biology of vascular endothelial growth factors." Microcirculation **15**(8): 715-738.

Madamanchi N.R. and Runge M.S. (2013). "Redox signaling in cardiovascular health and disease." Free Radic Biol Med.

Madian A.G., et al. (2011). "Differential carbonylation of proteins as a function of in vivo oxidative stress." J Proteome Res **10**(9): 3959-3972.

Májek P., et al. (2011). "Plasma proteome changes associated with refractory cytopenia with multilineage dysplasia." Proteome Sci **9**.

Mark R.J., et al. (1997). "Amyloid beta-peptide impairs glucose transport in hippocampal and cortical neurons: involvement of membrane lipid peroxidation." J Neurosci **17**(3): 1046-1054.

Martens-Lobenhoffer J. and Bode-Boger S.M. (2006). "Fast and efficient determination of arginine, symmetric dimethylarginine, and asymmetric dimethylarginine in biological fluids by hydrophilic-interaction liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry." Clin Chem **52**(3): 488-493.

Martin M., et al. (2013). "Platelet apoptosis and agonist-mediated activation in myelodysplastic syndromes." Thromb Haemost **109**(5): 909-919.

Martindale J.L. and Holbrook N.J. (2002). "Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival." J Cell Physiol **192**(1): 1-15.

McBride A.E. and Silver P.A. (2001). "State of the Arg: Protein methylation at arginine comes of age." Cell **106**(1): 5-8.

Meany D.L., et al. (2007). "Identification of carbonylated proteins from enriched rat skeletal muscle mitochondria using affinity chromatography-stable isotope labeling and tandem mass spectrometry." Proteomics **7**(7): 1150-1163.

Mirzaei H. and Regnier F. (2005). "Affinity chromatographic selection of carbonylated proteins followed by identification of oxidation sites using tandem mass spectrometry." Anal Chem **77**(8): 2386-2392.

Miyake H., et al. (2003). "Increase in molecular rigidity of the protein conformation of brain Na+-K+-ATPase by modification with 4-hydroxy-2-nonenal." Biol Pharm Bull **26**(12): 1652-1656.

Moorcroft M.J., et al. (2001). "Detection and determination of nitrate and nitrite: a review." Talanta **54**(5): 785-803.

Morrell C.N., et al. (2005). "Regulation of platelet granule exocytosis by S-nitrosylation." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(10): 3782-3787.

Mrakic-Sposta S., et al. (2012). "Assessment of a standardized ROS production profile in humans by electron paramagnetic resonance." Oxid Med Cell Longev **2012**: 973927.

Muller T. and Muhlack S. (2011). "Cysteinyl-glycine reduction as marker for levodopa-induced oxidative stress in Parkinson's disease patients." Mov Disord **26**(3): 543-546.

Musolino C., et al. (2011). "Carbonyl group serum levels are associated with CD38 expression in patients with B chronic lymphocytic leukemia." Clin Biochem **44**(17-18): 1487-1490.

Nakashima S. (2002). "Protein kinase C alpha (PKC alpha): regulation and biological function." J Biochem **132**(5): 669-675.

Neufeld G., et al. (1999). "Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors." FASEB J **13**(1): 9-22.

Niccoli G., et al. (2013). "Serum levels of gamma-glutamyltransferase and progression of coronary atherosclerosis." Coron Artery Dis **24**(1): 40-47.

Nimer S.D. (2008). "Myelodysplastic syndromes." Blood **111**(10): 4841-4851.

Nolin T.D., et al. (2007). "Simultaneous determination of total homocysteine, cysteine, cysteinylglycine, and glutathione in human plasma by high-performance liquid chromatography: application to studies of oxidative stress." J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci **852**(1-2): 554-561.

Nolte F. and Hofmann W.K. (2010). "Molecular mechanisms involved in the progression of myelodysplastic syndrome." Future Oncol **6**(3): 445-455.

Novotna B., et al. (2009). "Oxidative damage in bone marrow cells of patients with low-risk myelodysplastic syndrome." Leuk Res **33**: 340–343.

Nuzzo R.G. and Allara D.L. (1983). "Adsorption of Bifunctional Organic Disulfides on Gold Surfaces." J Am Chem Soc **105**(13): 4481-4483.

O'Donovan C., et al. (2002). "High-quality protein knowledge resource: SWISS-PROT and TrEMBL." Brief Bioinform **3**(3): 275-284.

Oh-Ishi M., et al. (2003). "Proteomic method detects oxidatively induced protein carbonyls in muscles of a diabetes model Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) rat." Free Radic Biol Med **34**(1): 11-22.

Ohta T., et al. (2009). "Histidine-rich glycoprotein and concanavalin A synergistically stimulate the phosphatidylinositol 3-kinase-independent signaling pathway in leukocytes leading to increased cell adhesion and changes in cell morphology." Cell Immunol **259**(1): 5-12.

Olnes M.J. and Sloand E.M. (2011). "Targeting immune dysregulation in myelodysplastic syndromes." JAMA **305**(8): 814-819.

Ostman A., et al. (2006). "Protein-tyrosine phosphatases and cancer." Nat Rev Cancer **6**(4): 307-320.

Papanikolaou N.A. and Papavassiliou A.G. (2008). "Protein complex, gene, and regulatory modules in cancer heterogeneity." Mol Med **14**(9-10): 543-545.

Passam F.H., et al. (2004). "Levels of soluble forms of ICAM and VCAM in patients with myelodysplastic syndromes and their prognostic significance." Clin Lab Haematol. **26**(6): 391-395.

Passam F.H., et al. (2004). "Levels of soluble forms of ICAM and VCAM in patients with myelodysplastic syndromes and their prognostic significance." Clin Lab Haematol **26**(6): 391-395.

Patel R.P., et al. (1999). "Biological aspects of reactive nitrogen species." Biochim Biophys Acta **1411**(2-3): 385-400.

Pavone B., et al. (2011). "Plasma protein carbonylation in chronic uremia." J Nephrol **24**(4): 453-464.

Pecankova K. (2010). Role of nitric oxide during blood platelets activation. Bachelor, Institute of Chemical Technology.

Peddie C.M., et al. (1997). "Oxidative DNA damage in CD34+ myelodysplastic cells is associated with intracellular redox changes and elevated plasma tumour necrosis factor-alpha concentration." Br J Haematol **99**(3): 625-631.

Peng H., et al. (2012). "A systematic modeling study on the pathogenic role of p38 MAPK activation in myelodysplastic syndromes." Mol Biosyst **8**(4): 1366-1374.

Pereira-Leal J.B., et al. (2006). "The origins and evolution of functional modules: lessons from protein complexes." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **361**(1467): 507-517.

Phizicky E.M. and Fields S. (1995). "Protein-protein interactions: methods for detection and analysis." Microbiol Rev **59**(1): 94-123.

Piehler J. (2005). "New methodologies for measuring protein interactions in vivo and in vitro." Curr Opin Struct Biol **15**(1): 4-14.

Piliarik M., et al. (2005). "A new surface plasmon resonance sensor for high-throughput screening applications." Biosens Bioelectron **20**(10): 2104-2110.

Piliarik M., et al. (2009). "Surface plasmon resonance biosensing." Methods Mol Biol **503**: 65-88.

Pimkova K., et al. (2012). "Surface plasmon resonance biosensor for the detection of VEGFR-1--a protein marker of myelodysplastic syndromes." Anal Bioanal Chem **402**(1): 381-387.

Pohanka M., et al. (2012). "Voltammetry Assay for Assessment of Oxidative Stress linked Pathologies in Brain Tumor suffered Childhood Patients." Int J Electrochem Sci **7**: 11978 - 11992.

Polaskova V., et al. (2010). "High-abundance protein depletion: comparison of methods for human plasma biomarker discovery." Electrophoresis **31**(3): 471-482.

Powers S.K. and Jackson M.J. (2008). "Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production." Physiol Rev **88**(4): 1243-1276.

Pruneri G., et al. (1999). "Angiogenesis in myelodysplastic syndromes." Br J Cancer **81**(8): 1398-1401.

Racek J. and Holeček V. (1999). "Enzymy a volné radikály." Chemické Listy **93**: 774-780.

Raha S. and Robinson B.H. (2000). "Mitochondria, oxygen free radicals, disease and ageing." Trends Biochem Sci **25**(10): 502-508.

Ramachandran A., et al. (2004). "Chronic exposure to nitric oxide alters the free iron pool in endothelial cells: role of mitochondrial respiratory complexes and heat shock proteins." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(1): 384-389.

Ravuri C., et al. (2013). "Differential regulation of gamma-glutamyltransferase and glutamate cysteine ligase expression after mitochondrial uncoupling: gamma-glutamyltransferase is regulated in an Nrf2- and NFkappaB-independent manner." Free Radic Res **47**(5): 394-403.

Renke J., et al. (2000). "Protein carbonyl groups' content as a useful clinical marker of antioxidant barrier impairment in plasma of children with juvenile chronic arthritis." Free Radic Biol Med **29**(2): 101-104.

Requena J.R., et al. (2001). "Glutamic and aminoadipic semialdehydes are the main carbonyl products of metal-catalyzed oxidation of proteins." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(1): 69-74.

Rhee S.G., et al. (2010). "Methods for detection and measurement of hydrogen peroxide inside and outside of cells." Mol Cells **29**(6): 539-549.

Rolny C., et al. (2011). "HRG inhibits tumor growth and metastasis by inducing macrophage polarization and vessel normalization through downregulation of PlGF." Cancer Cell **19**(1): 31-44.

Royer L., et al. (2008). "Unraveling protein networks with power graph analysis." PLoS Comput Biol **4**(7): e1000108.

Sagawa N., et al. (2003). "Gelsolin suppresses tumorigenicity through inhibiting PKC activation in a human lung cancer cell line, PC10." Br J Cancer **88**(4): 606-612.

Saigo K., et al. (2011). "Oxidative Stress Levels in Myelodysplastic Syndrome Patients: their Relationship to Serum Ferritin and Haemoglobin Values." Journal of International Medical Research **39**(5): 1941-1945.

Salih H.R., et al. (2004). "Serum levels of CD137 ligand and CD178 are prognostic factors for progression of myelodysplastic syndrome." Leuk Lymphoma **45**(2): 301-308.

Sansom D.M., et al. (2003). "What's the difference between CD80 and CD86?" Trends Immunol **24**(6): 314-319.

Sardiu M.E. and Washburn M.P. (2011). "Building protein-protein interaction networks with proteomics and informatics tools." J Biol Chem **286**(27): 23645-23651.

Schalinske K.L. and Smazal A.L. (2012). "Homocysteine imbalance: a pathological metabolic marker." Adv Nutr **3**(6): 755-762.

Schena M., Ed. (2006). Protein Microarrays. Sudbury, Jones and Bartlett Publisher International.

Schoenenberger C.A., et al. (1999). "Structure, assembly, and dynamics of actin filaments in situ and in vitro." Microsc Res Tech **47**(1): 38-50.

Schwartz J.C., et al. (2001). "Structural basis for co-stimulation by the human CTLA-4/B7-2 complex." Nature **410**(6828): 604-608.

Seedhouse C., et al. (2002). "The genotype distribution of the XRCC1 gene indicates a role for base excision repair in the development of therapy-related acute myeloblastic leukemia." Blood **100**(10): 3761-3766.

Sen B. and Johnson F.M. (2011). "Regulation of SRC family kinases in human cancers." J Signal Transduct **2011**: 865819.

Sergueeva A.I., et al. (2008). "Elevated homocysteine, glutathione and cysteinylglycine concentrations in patients homozygous for the Chuvash polycythemia VHL mutation." Haematologica **93**(2): 279-282.

Sevanian A., et al. (1990). "Microsomal lipid peroxidation: the role of NADPH--cytochrome P450 reductase and cytochrome P450." Free Radic Biol Med **8**(2): 145-152.

Shadduck R.K., et al. (2007). "Recent advances in myelodysplastic syndromes." Exp Hematol **35**(4 Suppl 1): 137-143.

Shaffer L.G., et al. (2013). "The use of cytogenetic microarrays in myelodysplastic syndrome characterization." Methods Mol Biol **973**: 69-85.

Shirkoohi R., et al. (2012). "Gelsolin induces promonocytic leukemia differentiation accompanied by upregulation of p21CIP1." Asian Pac J Cancer Prev **13**(9): 4827-4834.

Shiva S., et al. (2001). "Nitric oxide partitioning into mitochondrial membranes and the control of respiration at cytochrome c oxidase." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(13): 7212-7217.

Shoemaker B.A. and Panchenko A.R. (2007). "Deciphering protein-protein interactions. Part I. Experimental techniques and databases." PLoS Comput Biol **3**(3): e42.

Sies H. (1993). "Strategies of antioxidant defense." Eur J Biochem **215**(2): 213-219.

Singh R.J., et al. (1996). "Mechanism of nitric oxide release from S-nitrosothiols." J Biol Chem **271**(31): 18596-18603.

Smith J.N. and Dasgupta T.P. (2000). "Kinetics and mechanism of the decomposition of S-nitrosoglutathione by l-ascorbic acid and copper ions in aqueous solution to produce nitric oxide." Nitric Oxide **4**(1): 57-66.

Sorensen P., et al. (2004). "Identification of protein-protein interfaces implicated in CD80-CD28 costimulatory signaling." J Immunol **172**(11): 6803-6809.

Spiteller P. and Spiteller G. (1998). "Strong dependence of the lipid peroxidation product spectrum whether Fe2+/O2 or Fe3+/O2 is used as oxidant." Biochim Biophys Acta **1392**(1): 23-40.

Stamler J.S., et al. (2001). "Nitrosylation. the prototypic redox-based signaling mechanism." Cell **106**(6): 675-683.

Stamler J.S., et al. (1992). "S-nitrosylation of proteins with nitric oxide: synthesis and characterization of biologically active compounds." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(1): 444-448.

Steering Committee for Defining the Mandate of Proteomics in the Post-Genomics Era U.S.N.C.f.t.I.U.o.B.a.M.B., Policy and Global Affairs Division, National Research Council (2002). Defining the mandate of proteomics in the post-genomics era. Washington, D.C., United States of America.

Štikarová J., et al. (2013). "The effect of reagents mimicking oxidative stress on fibrinogen function." ScientificWorldJournal **2013**: 359621.

Stikarova J., et al. (2013). "Enhanced levels of asymmetric dimethylarginine in a serum of middle age patients with myelodysplastic syndrome." J Hematol Oncol **6**(1): 58.

Stroh A., et al. (2004). "Iron oxide particles for molecular magnetic resonance imaging cause transient oxidative stress in rat macrophages." Free Radic Biol Med **36**(8): 976-984.

Stuhlinger M.C., et al. (2001). "Homocysteine impairs the nitric oxide synthase pathway: role of asymmetric dimethylarginine." Circulation **104**(21): 2569-2575.

Suttnar J., et al. (2001). "Influence of citrate and EDTA anticoagulants on plasma malondialdehyde concentrations estimated by high-performance liquid chromatography." J Chromatogr B Biomed Sci Appl **751**(1): 193-197.

Takahashi S. (2013). "Epigenetic aberrations in myeloid malignancies (Review)." Int J Mol Med **32**(3): 532-538.

Tanaka H., et al. (2006). "siRNA gelsolin knockdown induces epithelial-mesenchymal transition with a cadherin switch in human mammary epithelial cells." Int J Cancer **118**(7): 1680-1691.

Tanito M., et al. (2004). "Enhanced oxidative stress and impaired thioredoxin expression in spontaneously hypertensive rats." Antioxid Redox Signal **6**(1): 89-97.

Tarpey M.M., et al. (2004). "Methods for detection of reactive metabolites of oxygen and nitrogen: in vitro and in vivo considerations." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **286**(3): R431-444.

Tehranchi R., et al. (2003). "Granulocyte colony-stimulating factor inhibits spontaneous cytochrome c release and mitochondria-dependent apoptosis of myelodysplastic syndrome hematopoietic progenitors." Blood **101**(3): 1080-1086.

Thannickal V.J. and Fanburg B.L. (2000). "Reactive oxygen species in cell signaling." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **279**(6): L1005-1028.

Thirstrup C., et al. (2004). "Diffractive optical coupling element for surface plasmon resonance sensors." Sens. Actuators, B. **100**(3): 298-308.

Thomas S.M. and Brugge J.S. (1997). "Cellular functions regulated by Src family kinases." Annu Rev Cell Dev Biol **13**: 513-609.

Thongboonkerd V., Ed. (2007). Proteomics of Human Body Fluids. Totowa, New Jersey, Humana Press Inc.

Tolek A., et al. (2012). "Serum alpha1beta-glycoprotein and afamin ratio as potential diagnostic and prognostic markers in cholangiocarcinoma." Exp Biol Med (Maywood) **237**(10): 1142-1149.

Turpaev K., et al. (2005). "Analysis of differentially expressed genes in nitric oxide-exposed human monocytic cells." Free Radic Biol Med **38**(10): 1392-1400.

Ullmannova V., et al. (2003). "Relationship between cyclin D1 and p21(Waf1/Cip1) during differentiation of human myeloid leukemia cell lines." Leuk Res **27**(12): 1115-1123.

Vaisocherova H., et al. (2009). "Comparative study of SPR and ELISA methods based on analysis of CD166/ALCAM levels in cancer and control human sera." Biosens Bioelectron **24**(7): 2143-2148.

van Loon A.P., et al. (1986). "A yeast mutant lacking mitochondrial manganese-superoxide dismutase is hypersensitive to oxygen." Proc Natl Acad Sci U S A **83**(11): 3820-3824.

Vasikova A., et al. (2009). "Differential gene expression of bone marrow CD34+ cells in early and advanced myelodysplastic syndrome." Neoplasma **56**(4): 335-342.

Vasquez-Vivar J., et al. (1999). "Electron spin resonance spin-trapping detection of superoxide generated by neuronal nitric oxide synthase." Methods Enzymol **301**: 169-177.

Vasquez-Vivar J., et al. (1996). "Peroxynitrite-mediated formation of free radicals in human plasma: EPR detection of ascorbyl, albumin-thiyl and uric acid-derived free radicals." Biochem J **314 (Pt 3)**: 869-876.

Vermeulen Windsant I.C., et al. (2012). "Blood transfusions increase circulating plasma free hemoglobin levels and plasma nitric oxide consumption: a prospective observational pilot study." Crit Care **16**(3): R95.

Villaescusa Blanco R., et al. (1998). "Changes of the complement system in myelodysplastic syndromes." Sangre (Barc) **43**(3): 210-212.

Walker L.S. and Sansom D.M. (2011). "The emerging role of CTLA4 as a cell-extrinsic regulator of T cell responses." Nat Rev Immunol **11**(12): 852-863.

Wall S.B., et al. (2012). "Oxidative modification of proteins: an emerging mechanism of cell signaling." Front Physiol **3**: 369.

Walsh C.T. (2006). Posttranslational Modification of Proteins. Greenwood Village, Colorado, USA, Roberts and Company Publishers.

Wang H., et al. (2005). "Improved method for the preparation of carboxylic acid and amine terminated self-assembled monolayers of alkanethiolates." Langmuir **21**(7): 2633-2636.

Warlick E.D. and Miller J.S. (2011). "Myelodysplastic syndromes: the role of the immune system in pathogenesis." Leuk Lymphoma **52**(11): 2045-2049.

Weigel A.L., et al. (2002). "Microarray analysis of H2O2-, HNE-, or tBH-treated ARPE-19 cells." Free Radic Biol Med **33**(10): 1419-1432.

Wildová M. and Rumlová M. (2008). "Metody studia vzájemných interakcí proteinů." Chemické Listy **102**: 28-34.

Wimazal F., et al. (2006). "Immunohistochemical detection of vascular endothelial growth factor (VEGF) in the bone marrow in patients with myelodysplastic syndromes: correlation between VEGF expression and the FAB category." Leuk Lymphoma **47**(3): 451-460.

Winterbourn C.C. and Buss I.H. (1999). "Protein carbonyl measurement by enzyme-linked immunosorbent assay." Methods Enzymol **300**: 106-111.

Woitzik J., et al. (2001). "Measurement of nitric oxide metabolites in brain microdialysates by a sensitive fluorometric high-performance liquid chromatography assay." Anal Biochem **289**(1): 10-17.

Yan B. and Smith J.W. (2000). "A redox site involved in integrin activation." J Biol Chem **275**(51): 39964-39972.

Yan L.J., et al. (1998). "Identification of oxidized proteins based on sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, immunochemical detection, isoelectric focusing, and microsequencing." Anal Biochem **263**(1): 67-71.

Yan S.D., et al. (1994). "Enhanced cellular oxidant stress by the interaction of advanced glycation end products with their receptors/binding proteins." J Biol Chem **269**(13): 9889-9897.

Yang L., et al. (2011). "Protein microarrays for systems biology." Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai) **43**(3): 161-171.

Yin X., et al. (2013). "Elevation of serum gamma-glutamyltransferase as a predictor of aggressive tumor behaviors and unfavorable prognosis in patients with intrahepatic cholangiocarcinoma: analysis of a large monocenter study." Eur J Gastroenterol Hepatol.

Yoo B.S. and Regnier F.E. (2004). "Proteomic analysis of carbonylated proteins in two-dimensional gel electrophoresis using avidin-fluorescein affinity staining." Electrophoresis **25**(9): 1334-1341.

Yusuf-Makagiansar H., et al. (2002). "Inhibition of LFA-1/ICAM-1 and VLA-4/VCAM-1 as a therapeutic approach to inflammation and autoimmune diseases." Med Res Rev **22**(2): 146-167.

Zai A., et al. (1999). "Cell-surface protein disulfide isomerase catalyzes transnitrosation and regulates intracellular transfer of nitric oxide." J Clin Invest **103**(3): 393-399.

Zhao J., et al. (2013). "The Network Organization of Cancer-associated Protein Complexes in Human Tissues." Sci Rep **3**: 1583.

Zhong L.Y., et al. (2009). "Serum proteomics in patients with RAEB myelodysplastic syndromes." Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao. **29**(9): 1799-1801.

12. PUBLIKACE

12.1. PUBLIKACE K TÉMATU DIZERTAČNÍ PRÁCE

A) S IF

Pimková K., Hegnerová K., Suttnar J., Čermák J., Homola J., Dyr J. E.: Surface Plasmon resonance biosensor for the detection of VEGFR-1—a protein marker of myelodysplastic syndromes, Anal Bioanal Chem (2012) 402:381–387. IF(2013) = 3,659.

Stikarová J., Kotlin R., Riedel T., Suttnar J., Pimkova K., Chrastinova L., Dyr J. E.: The effect of reagents mimicking oxidative stress on fibrinogen function, ScientificWorldJournal. 2013 Oct 21;2013:359621. IF(2013) = 1,73.

Štikarová J., Suttnar J., Pimková K., Mášová-Chrastinová L., Čermák J., Dyr J. E.: Enhanced levels of asymmetric dimethylarginine in a serum of middle age patients with myelodysplastic syndrome, J Hematol Oncol. 2013 Aug 19;6(1):58. [Epub ahead of print]. IF(2013) = 4,46.

Pimková K., Chrastinová L., Suttnar J., Štikarová J., Kotlín R., Čermák J., Dyr J. E.: Plasma oxidative status in myelodysplastic syndromes in the context of clinical outcomes, and as a consequence of iron overload, odesláno k revizi.

B) Bez IF

Pimková K., Suttnar J., Bocková M., Homola J., Dyr J. E.: Využití „label-free“ proteinových čipů pro proteomiku onkohematologických onemocnění, Vnitř Lék 2012; 58(Suppl 2): 84-89.

Pimková K., Hegnerová K., Suttnar J., Homola J., Dyr J. E.: Protein markers of MDS for SPR chip analysis, Sborník 11. Studentská vědecká konference 1. lékařské fakulty (2010).

Pimková K., Balounová R., Sobotková A., Štikarová J., Suttnar J., Dyr J. E.: Vliv S-nitrosoderivátů nízkomolekulárních látek a proteinů na aktivaci lidských krevních destiček, Sborník 10. Studentská vědecká konference 1. lékařské fakulty (2009).

12.2. PUBLIKACE BEZ VZTAHU K TÉMATU DIZERTAČNÍ PRÁCE

A) S IF

Stikarová J, Blatny J, Kotlin R, Suttnar J, Zapletal O, Pimkova K, Majek P, Hrachovinova I, Dyr JE. Novel homozygous fibrinogen Alpha chain truncation causes severe afibrinogenemia with life threatening complications in a two-year-old boy. Thrombosis Research, přijato k publikaci. IF(2013) = 3,133.

12.3. ABSTRAKTA

Suttnar J., Pimková K., Másová-Chrastinová L., Kotlín R., Homola J., Dyr J. E.: Reactive nitrogen species and myelodysplastic syndromes, Leukemia Research 37, S116 (2013).

Suttnar J., Pimkova K., Chrastinova L., Cermak J., Dyr J. E.: Enhanced levels of asymmetric dimethylarginine in serum of myelodysplastic patients overloaded with iron, The FEBS Journal 280, SW04.S17-51 (2013).

Pimková K., Bocková M., Ševců V., Suttnar J., Homola J., Dyr J. E.: Detection of T-lymphocyte activation antigen CD86 – a protein marker of myelodysplastic syndromes – using a surface plasmon resonance, Book of abstracts EUROPT(R)ODE XI 122 (2012).

Suttnar J., Pimková K., Kotlín R., Májek P., Dyr J. E.: Plasma pretreatment for proteomic studies using albumin precipitation, Book of abstracts of XXXIII Nordic Congress in Clinical Chemistry, 54 (2012).

Kotlín R., Suttnar J., Pimková K., Geierová V., Dyr J. E.: Mutation in fibrinogen polymerization pocket associated with thrombosis, Thrombosis research 130, 106 (2012).

Pimková K., Suttnar J., Bocková M., Kotlín R., Májek P., J. Homola J., Dyr J. E.: Plasma sample pre-treatment for SPR protein chip for MDS diagnosis, Cancer Proteomics, 61 (2011).

Pimková K., Bocková M., Kotlín R., Suttnar J., Homola J., Dyr J. E.: SPR chip for MDS diagnosis based on protein-protein interaction, Leukemia Research 35 (2011) S50.

Pimková K., Suttnar J., Májek P., Dyr J. E.: Modifikace destičkových bílkovin za podmínek oxidačního stresu, Transfuze a hematologie dnes 17, 72 (2011).

Kotlin R., Zichova K., Suttnar J., Pimkova K., Salaj P. and Dyr J.E.: Two cases of dysfibrinogenemia associated with thrombosis, Book of abstracts ComBio 2011, 122 (2011).

Suttnar J., Pimkova K., Štikarová J., Dyr J.E.: Fibrinogen modification by shear stress activated platelets, Hematologica 96, 264 (2011).

Pimková K., Hegnerová K., Májek P., Kotlín R., Suttnar J., Homola J., Dyr J. E.: Protein markers of myelodysplastic syndrome for SPR chip analysis, Book of abstracts EUROPT(R)ODE X 230 (2010).

Pimková K., Hegnerová K., Suttnar J., Homola J., Dyr J. E.: Proteinové markery myelodysplastického syndromu pro analýzu na SPR čipu, Sborník 11. Studentská vědecká konference 1. lékařské fakulty, Univerzita Karlova (2010).

Pimková K., Májek P., Sobotková A., Chrastinová L., Čermák J., Suttnar J., Dyr J. E.: Oxidační stres a jeho vliv na krevní destičky u myelodysplastického syndromu, Vaskulárna medicína 2 (S3), 47 (2010).

Pimková K., Bocková M., Hegnerová K., Suttnar J., Homola J., Dyr J. E.: Detection of VEGF-R1 – protein marker of MDS in blood plasma using SPR, Transuze a hematologie dnes (S4), 16 (2010).

Pimková K., Bocková M., Suttnar J., Homola J., Dyr J. E.: SPR detekce plasmatického markeru myelodysplastického syndromu VEGF-R1, Sborník abstrakt „Pražský hematologický den 14.10.2010“ (2010).

Suttnar J., Mášová L., Pimková K., Májek P., Malý M., Dyr J. E.: Oxidative stress in blood plasma of patients with coronary disease and platelet responses to S-nitroso compounds, Vaskulárna medicína 2 (S3), 47 (2010).

Suttnar J., Pimková K., Bocková M., Májek P., Kotlín R., Homola J., Dyr J. E.: Human depletion techniques for label-free detection of low-abundance plasma proteins, Book of abstracts EUROPT(R)ODE X 238 (2010).

Suttnar J., Chrastinova L., Pimkova K., Majek P., Dyr J.E.: Oxidative stress in blood plasma with myelodysplastic syndromes, Hematologica 95 (s2), 566 (2010).

Májek P., Reicheltová Z., Štikarová J., Pimková K., Suttnar J., Dyr J. E.: Změny proteomu aktivovaných krevních destiček, Sborník abstrakt „Pražský hematologický den 14.10.2010“ (2010).

Pimková K., Balounová R., Sobotková A., Suttnar J., Dyr J. E.: Detekce S-nitrosothiolů v lidských krevních destičkách pomocí HPLC, Transfuze a hematologie dnes 15, 92 (2009).

Pimková K., Balounová R., Sobotková A., Štikarová J., Suttnar J., Dyr J. E.: Vliv S-nitrosoderivátů nízkomolekulárních látek a bílkovin na aktivaci lidských krevních destiček, Sborník 10. Studentská vědecká konference 1. lékařské fakulty 107 (2009).

Sobotková A., Pimková K., Májek P., Malý M., Suttnar J., Dyr J. E.: Analýza karbonylovaných proteinů lidských krevních destiček, Transfuze a hematologie dnes 15, 98 (2009).

Sobotková A., Pimková K., Májek P., Malý M., Suttnar J., Dyr J. E.: Analysis of carbonylated proteins in human blood platelets, Haematologica 94, 317 (2009).

Pimková K., Štikarová J., Sobotková A., Reicheltová Z., Kestlerová A., Schönfeldová E., Suttnar J., Dyr J. E.: Vliv nitrosoderivátů nízkomolekulárních látek a bílkovin na aktivaci krevních destiček, Transfuziologie a hematologie dnes 14, 83 (2008).

Štikarová J., Pimková K., Májek P., Kestlerová A., Schönfeldová E., Suttnar J., Dyr J. E.: The Vliv S-nitrosoglutathionu na vlastnosti fibrinogenu, Vnitřní lékařství 54, 67 (2008).

Májek P., Sobotková A., Pimková K., Balounová R., Suttnar J., Dyr J. E.: Změny proteomu lidských krevních destiček při jejich aktivaci, Vnitřní lékařství 54, 69 (2008).

12.4. PREZENTACE NA KONGRESECH A SYMPOSIÍCH

Pimková K., Bocková M., Suttnar J., Majek P., Homola J., Dyr J. E.: Searching for protein team players in MDS, 3rd International Conference on Bio-Sensing Technology, Sitges, Spain, 2013.

Suttnar J., Pimkova K., Chrastinova L., Cermak J., Dyr J. E.: Enhanced levels of asymmetric dimethylarginine in serum of myelodysplastic patients overloaded with iron, 38th FEBS Congress, Saint Petersburg, Russia, July 6–11, 2013.

Suttnar J., Pimková K., Másová-Chrastinová L., Kotlín R., Homola J., Dyr J. E.: Reactive nitrogen species and myelodysplastic syndromes, 12th International Symposium on Myelodysplastic Syndromes, Berlin, Germany, 2013.

Pimková K., Bocková M., Ševců V., Suttnar J., Homola J., Dyr J. E.: Detection of T-lymphocyte activation antigen CD86 – a protein marker of myelodysplastic syndromes – using a surface plasmon resonance, EUROPT(R)ODE XI 2012, Barcelona, Spain.

Bocková M., Pimková K., Ševců V., Šípová H., Dyr J. E., Homola J.: Protein chip for diagnosis of myelodysplastic syndromes using SPR imaging, Biosensors 2012, Cancun, Mexico.

Bocková M., Pimková K., Homola J.: Blood Plasma Depletion For The Sensitive Detection Of Cancer Biomarkers Using An SPR Biosensor, Label-Free Technologies Conference in Amsterdam, The Netherlands, 2012.

Suttnar J., Pimková K., Kotlín R., Májek P., Dyr J. E.: Plasma pretreatment for proteomic studies using albumin precipitation, XXXIII Nordic Congress in Clinical Chemistry, Reykjavik, Iceland, 2012.

Kotlín R., Suttnar J., Pimková K., Geierová V., Dyr J. E.: Mutation in fibrinogen polymerization pocket associated with thrombosis, 22nd International Congress on Thrombosis, Nice, France, 2012.

Pimková K., Suttnar J., Bocková M., Kotlín R., Májek P., J. Homola J., Dyr J. E.: Plasma sample pre-treatment for SPR protein chip for MDS diagnosis, Cancer Proteomics, Dublin, Ireland, 2011.

Pimková K., Bocková M., Kotlín R., Suttnar J., Homola J., Dyr J. E.: SPR chip for MDS diagnosis based on protein-protein interaction, The 11th International Symposium on Myelodysplastic Syndromes, Edinburgh, UK, 2011.

Pimková K., Suttnar J., Májek P., Dyr J. E.: Modifikace destičkových bílkovin za podmínek oxidačního stresu, XXV. Olomoucké hematologické dny s mezinárodní účastí 2011, Olomouc, Česká Republika.

Kotlin R., Zichova K., Suttnar J., Pimkova K., Salaj P. and Dyr J.E.: Two cases of dysfibrinogenemia associated with thrombosis, ComBio 2011, Queensland, Australia.

Suttnar J., Pimkova K., Štikarová J., Dyr J.E.: Fibrinogen modification by shear stress activated platelets, 16h Congress of the European Haematology Association, 2011, London, UK.

Pimková K., Hegnerová K., Májek P., Kotlín R., Suttnar J., Homola J., Dyr J. E.: Protein markers of myelodysplastic syndrome for SPR chip analysis, Xth European conference on optical chemical sensors and biosensors-EUROPT(R)ODE X, 2010, Prague, Czech Republic.

Pimková K., Bocková M., Suttnar J., Homola J., Dyr J. E.: SPR detekce plasmatického markeru myelodysplastického syndromu VEGF-R1, Pražský hematologický den 14.10.2010, Praha, Česká republika.

Pimková K., Bocková M., Hegnerová K., Suttnar J., Homola J., Dyr J. E.: Detection of VEGF-R1 – protein marker of MDS in blood plasma using SPR, X. a XI. Česko – slovenská konference laboratorní hematologie s mezinárodní účastí, Hradec Králové, Česká republika, 2010.

Pimková K., Májek P., Sobotková A., Chrastinová L., Čermák J., Suttnar J., Dyr J. E.: Oxidační stres a jeho vliv na krevní destičky u myelodysplastického syndromu, XVIIth Slovensko-česká konferencia o hemostáze a trombóze s mezinárodnou účasťou, 2010, Martin, Slovenská republika.

Pimková K., Hegnerová K., Suttnar J., Homola J., Dyr J. E.: Proteinové markery myelodysplastického syndromu pro analýzu na SPR čipu, 11th Studentská vědecká konference 1. lékařské fakulty 2010, Univerzita Karolva v Praze, Česká republika.

Suttnar J., Pimková K., Bocková M., Májek P., Kotlín R., Homola J., Dyr J. E.: Human depletion techniques for label-free detection of low-abundance plasma proteins, Xth European conference on optical chemical sensors and biosensors-EUROPT(R)ODE X, 2010, Prague, Czech Republic.

Suttnar J., Mášová L., Pimková K., Májek P., Malý M., Dyr J. E.: Oxidative stress in blood plasma of patients with coronary disease and platelet responses to S-nitroso compounds, XVIIth Slovensko-česká konferencia o hemostáze a trombóze s mezinárodnou účasťou, 2010, Martin, Slovenská republika.

Suttnar J., Chrastinova L., Pimkova K., Majek P., Dyr J.E.: Oxidative stress in blood plasma with myelodysplastic syndromes, 15th Congress of the European Haematology Association, Barcelona, Spain, 2010.

Májek P., Reicheltová Z., Štikarová J., Pimková K., Suttnar J., Dyr J. E.: Změny proteomu aktivovaných krevních destiček, Pražský hematologický den 14.10.2010, Praha, Česká republika.

Pimková K., Balounová R., Sobotková A., Suttnar J., Dyr J. E.: Detekce S-nitrosothiolů v lidských krevních destičkách pomocí HPLC, XXIII. Olomoucké hematologické dny 2009, Olomouc, Česká republika.

Pimková K., Balounová R., Sobotková A., Štikarová J., Suttnar J., Dyr J. E.: Vliv S-nitrosoderivátů nízkomolekulárních látek a bílkovin na aktivaci lidských krevních destiček, 10th Studentská vědecká konference 1. lékařské fakulty 2009, Univerzita Karolva v Praze, Česká republika.

Pimková K., Štikarová J., Sobotková A., Reicheltová Z., Kestlerová A., Schönfeldová E., Suttnar J., Dyr J. E.: Vliv nitrosoderivátů nízkomolekulárních látek a bílkovin na aktivaci krevních destiček, XV. Česko-slovenský hematologický a transfuziologický kongres s mezinárodní účastí 2008, Špindlerův Mlýn, Česká Republika.

Sobotková A., Pimková K., Májek P., Malý M., Suttnar J., Dyr J. E.: Analýza karbonylovaných proteinů lidských krevních destiček, XXIII. Olomoucké hematologické dny 2009, Olomouc, Česká republika.

Sobotková A., Pimková K., Májek P., Malý M., Suttnar J., Dyr J. E.: Analysis of carbonylated proteins in human blood platelets, 14th Congress of European Haematology Association Berlin 2009, Germany.

Štikarová J., Pimková K., Májek P., Kestlerová A., Schönfeldová E., Suttnar J., Dyr J. E. : Vliv S-nitrosoglutathionu na vlastnosti fibrinogenu, XXII. Olomoucké hematologické dny s mezinárodní účastí 2008, Olomouc, Česká Republika.

Májek P., Sobotková A., Pimková K., Balounová R., Suttnar J., Dyr J. E.: Změny proteomu lidských krevních destiček při jejich aktivaci, XXII. Olomoucké hematologické dny s mezinárodní účastí 2008, Olomouc, Česká Republika.

13. SEZNAM PŘÍLOH

Příloha 1

Proteinová mapa.

Příloha 2

Přehled identifikovaných proteinů znázorněných v proteinové mapě a rozdělených do sedmi klastrů.

Příloha 3

Pimková K., Hegnerová K., Suttnar J., Čermák J., Homola J., Dyr J. E.: Surface Plasmon resonance biosensor for the detection of VEGFR-1 - a protein marker of myelodysplastic syndromes, Anal Bioanal Chem (2012) 402:381–387. IF(2013) = 3,659.

Příloha 4

Stikarová J., Kotlin R., Riedel T., Suttnar J., Pimkova K., Chrastinova L., Dyr J. E.: The effect of reagents mimicking oxidative stress on fibrinogen function, ScientificWorldJournal. 2013 Oct 21;2013:359621. IF(2013) = 1,73.

Příloha 5

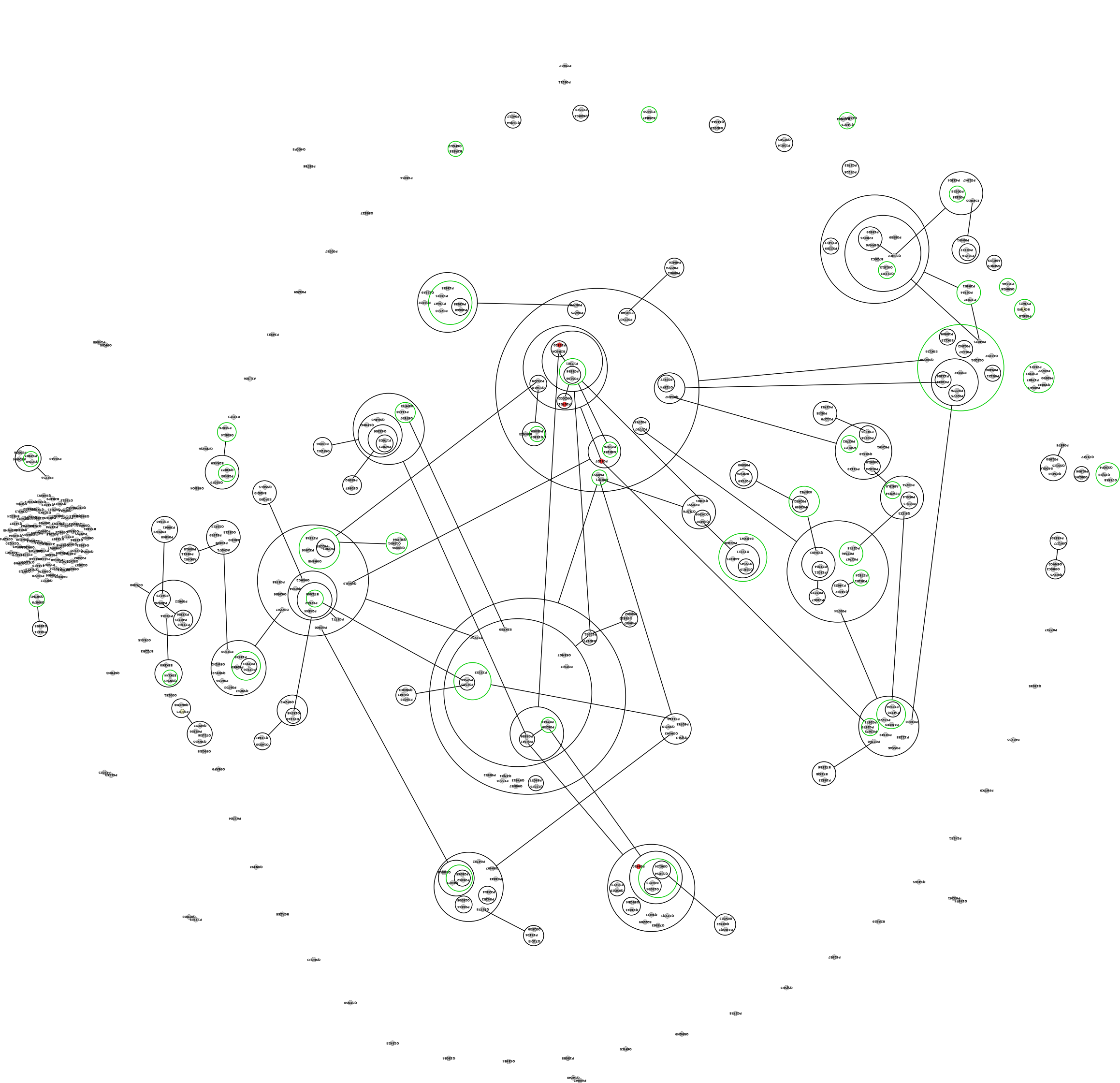
Štikarová J., Suttnar J., Pimková K., Mášová-Chrastinová L., Čermák J., Dyr J. E.: Enhanced levels of asymmetric dimethylarginine in a serum of middle age patients with myelodysplastic syndrome, J Hematol Oncol. 2013 Aug 19;6(1):58. [Epub ahead of print]. IF(2013) = 4,46.

Příloha 6

Pimková K., Chrastinová L., Suttnar J., Štikarová J., Kotlín R., Čermák J., Dyr J. E.: Plasma oxidative status in myelodysplastic syndromes in the context of clinical outcomes, and as a consequence of iron overload, odesláno k revizi.

Příloha 1

Proteinová mapa.



Příloha 2

Přehled identifikovaných proteinů znázorněných ve schématu interakční sítě.

Oblast	AC	Protein
1	A4D275	Actin related protein 2/3 complex, subunit 1B, 41kDa
	Q53R19	Actin related protein 2/3 complex, subunit 2, 34kDa, isoform CRA_a
	P61160	Actin-related protein 2
	O15145	Actin-related protein 2/3 complex subunit 3
	O15511	Actin-related protein 2/3 complex subunit 5
	B4DXW1	Actin-related protein 3
	Q9HBI1	Beta-parvin
	Q96I11	CRMP1 protein
	Q7L576	Cytoplasmic FMR1-interacting protein 1
	Q96F07	Cytoplasmic FMR1-interacting protein 2
	Q59GB4	Dihydropyrimidinase-like 2 variant
	Q05DE9	FYB protein
	B0LPF3	Growth factor receptor-bound protein 2
	Q14344	Guanine nucleotide-binding protein subunit alpha-13
	P30273	High affinity immunoglobulin epsilon receptor subunit gamma
	Q13094	Lymphocyte cytosolic protein 2
	Q13813	Spectrin alpha chain, non-erythrocytic 1
	B2ZZ89	Spectrin beta non-erythrocytic 1
	O75563	Src kinase-associated phosphoprotein 2
	Q1ZYQ1	Tubulin, alpha 2
	Q53XS4	Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type
	Q06124	Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 11
2	P54252	Ataxin-3
	P04844	Dolichyl-diphosphooligosaccharide protein glycosyltransferase subunit 2
	P04843	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit 1
	P04792	Heat shock protein beta-1
	Q16778	Histone H2B type 2-E
	P28062	Proteasome subunit beta type-8
	P28065	Proteasome subunit beta type-9
	Q99497	Protein DJ-1
	Q15005	Signal peptidase complex subunit 2
	Q5U5U6	Ubiquitin B
	P22314	Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 1
	Q96IF9	VCP protein
3	O43306	Adenylate cyclase type 6
	P84077	ADP-ribosylation factor 1
	A4D1F7	Cerebral cavernous malformations 1
	Q53HG7	Cortactin isoform a variant
	Q96N67	Dedicator of cytokinesis protein 7
	Q9Y613	FH1/FH2 domain-containing protein 1
	Q6FHM2	GNB2 protein
	Q5T697	Guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha transducing activity polypeptide 2
	F1T0G5	Guanine nucleotide binding protein (G protein), beta polypeptide 3
	P04899	Guanine nucleotide-binding protein G(i) subunit alpha-2

	P62873	Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) subunit beta-1
	P11488	Guanine nucleotide-binding protein G(t) subunit alpha-1
	Q9HAV0	Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-4
	Q27J81	Inverted formin-2
	P15531	Nucleoside diphosphate kinase A
	P08567	Pleckstrin
	P17252	Protein kinase C alpha type
	P12931	Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src
	Q13576	Ras GTPase-activating-like protein IQGAP2
	P15153	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 2
	P52565	Rho GDP-dissociation inhibitor 1
	P52566	Rho GDP-dissociation inhibitor 2
	P06241	Tyrosine-protein kinase Fyn
	P06239	Tyrosine-protein kinase Lck
	P07947	Tyrosine-protein kinase Yes
	P50552	Vasodilator-stimulated phosphoprotein
4	P12235	ADP/ATP translocase 1
	P01023	Alpha-2-macroglobulin
	O43707	Alpha-actinin-4
	P01008	Antithrombin-III
	P02749	Beta-2-glycoprotein 1
	P10909	Clusterin
	P12259	Coagulation factor V
	E9KL23	Epididymis secretory sperm binding protein Li 44a
	E9KL26	Epididymis tissue protein Li 173
	P02671	Fibrinogen alpha chain
	P02675	Fibrinogen beta chain
	P02679	Fibrinogen gamma chain
	Q9UQS6	Fibronectin
	P04075	Fructose-bisphosphate aldolase A
	E7ES66	Glycocalicin
	D1MER9	Glycoprotein V (Platelet)
	P05546	Heparin cofactor 2
	P01042	Kininogen-1
	Q13201	Multimerin-1
	P00747	Plasminogen
	P05121	Plasminogen activator inhibitor 1
	P02775	Platelet basic protein
	P02776	Platelet factor 4
	P13224	Platelet glycoprotein Ib beta chain
	P14770	Platelet glycoprotein IX
	P02760	Protein AMBP
	P09486	SPARC
	P01137	Transforming growth factor beta-1
5	P11021	78 kDa glucose-regulated protein
	Q59HB3	Apolipoprotein B variant

	P27824	Calnexin
	Q00610	Clathrin heavy chain 1
	Q8IZZ5	Coagulation factor XII-Mie
	P02745	Complement C1q subcomponent subunit A
	P02746	Complement C1q subcomponent subunit B
	P02747	Complement C1q subcomponent subunit C
	P01024	Complement C3
	P0C0L4	Complement C4-A
	P0C0L5	Complement C4-B
	P00751	Complement factor B
	F8WDX4	Complement factor H
	A5PL27	CP protein
	P14625	Endoplasmin
	E9KL36	Epididymis tissue sperm binding protein Li 4a
	P02792	Ferritin light chain
	P00738	Haptoglobin
	Q9BS19	HPX protein
	Q14697	Neutral alpha-glucosidase AB
	P23284	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B
	P07237	Protein disulfide-isomerase
	P30101	Protein disulfide-isomerase A3
	P13667	Protein disulfide-isomerase A4
	P00734	Prothrombin
	P62491	Ras-related protein Rab-11A
	P51149	Ras-related protein Rab-7a
6	P02765	Alpha-2-HS-glycoprotein
	P27797	Calreticulin
	A4D1B1	CD36 antigen (Collagen type I receptor, thrombospondin receptor)
	P21926	CD9 antigen
	P60953	Cell division control protein 42 homolog
	F5H1A8	Gelsolin
	P17301	Integrin alpha-2
	P23229	Integrin alpha-6
	P05556	Integrin beta-1
	P05106	Integrin beta-3
	Q13418	Integrin-linked protein kinase
	P08779	Keratin, type I cytoskeletal 16
	P48059	LIM and senescent cell antigen-like-containing domain protein 1
	Q7Z5F4	Protease serine 4 isoform B
	Q15404	Ras suppressor protein 1
	A4D2P1	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 (Rho family, small GTP binding protein Rac1)
	P02743	Serum amyloid P-component
	Q06AH7	Transferrin
	P07477	Trypsin-1
	P04275	von Willebrand factor

7	P31946	14-3-3 protein beta/alpha
	P62258	14-3-3 protein epsilon
	P61981	14-3-3 protein gamma
	P27348	14-3-3 protein theta
	P08758	Annexin A5
	P17612	cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit alpha
	Q6FIB4	F11 receptor
	Q95HC2	HLA-C protein
	Q9H4N8	Homo sapiens clone CDABP0046 mRNA sequence
	P24844	Myosin regulatory light polypeptide 9
	Q92686	Neurogranin
	P60900	Proteasome subunit alpha type-6
	P05771	Protein kinase C beta type
	Q6NUL9	Selectin P (Granule membrane protein 140kDa, antigen CD62)
	D9YZV7	Tropomyosin 1 (Alpha) isoform 6

AC - identifikační číslo proteinu dle databáze Swiss-Prot

Příloha 3

Pimková K., Hegnerová K., Suttnar J., Čermák J., Homola J., Dyr J.E.

Surface plasmon resonance biosensor for the detection of VEGFR-1 – a protein marker of myelodysplastic syndromes

Anal Bioanal Chem (2012) 402: 381-387

Anal Bioanal Chem (2012) 402:381–387
DOI 10.1007/s00216-011-5395-3

ORIGINAL PAPER

Surface plasmon resonance biosensor for the detection of VEGFR-1—a protein marker of myelodysplastic syndromes

Kristýna Pimková · Markéta Bocková · Kateřina Hegnerová · Jiří Suttnar · Jaroslav Čermák · Jiří Homola · Jan E. Dyr

Received: 1 July 2011 / Revised: 4 September 2011 / Accepted: 5 September 2011 / Published online: 20 September 2011
© Springer-Verlag 2011

Abstract The surface plasmon resonance (SPR) biosensor system with dispersionless microfluidics for the direct and label-free detection of a soluble vascular endothelial growth factor receptor (sVEGFR-1) is described. The detection approach takes advantage of an affinity interaction between sVEGFR-1 and its ligand, vascular endothelial growth factor (VEGF-A), which is covalently immobilized on the surface of the SPR sensor. The ability of the immobilized VEGF-A to specifically bind the sVEGFR-1 receptor is demonstrated in a buffer. The detection of sVEGFR-1 in 2% human blood plasma is carried out by using the sequential injection approach. The detection limit of 25 ng/mL is achieved. In addition, we demonstrate that the functional surface of the sensor can be regenerated for repeated use.

Keywords Surface plasmon resonance · Myelodysplastic syndromes · Vascular endothelial growth factor · Protein markers

Published in the *10th Anniversary Issue*.

K. Pimková · J. Suttnar · J. Čermák · J. E. Dyr (✉)
Institute of Hematology and Blood Transfusion,
U Nemocnice 1,
128 20 Prague, Czech Republic
e-mail: jan.dyr@uhkt.cz

M. Bocková · K. Hegnerová · J. Homola (✉)
Institute of Photonics and Electronics,
Chaberská 57,
182 51 Prague, Czech Republic
e-mail: homola@ufe.cz

Introduction

Myelodysplastic syndromes (MDS) are a diverse group of clonal disorders of the hematopoietic stem cell. They are characterized by ineffective hematopoiesis, peripheral blood cytopenias, and a propensity to transform to acute myeloid leukemia (AML) and are manifested by a wide variety of clinical symptoms [1]. Therefore, a diagnosis of MDS presents a rather complex diagnostic task and a challenge for the current diagnostic methods. Thus, research toward gaining deeper understanding of MDS and the development of new diagnostic approaches is stimulated.

In the last decade, several protein markers of MDS have been identified. An increased expression of the soluble form of vascular endothelial growth factor receptor 1 (sVEGFR-1) was reported in patients with MDS and AML [2, 3]. VEGFR-1 is a transmembrane protein of 150 kDa, with tyrosine kinase activity existing in two forms—membrane-bound and soluble [4]. It has been suggested that the signaling pathways mediated by the VEGFR-1 receptor are triggered by a binding of their high-affinity ligand—vascular endothelial growth factor A (VEGF-A). VEGF-A (a homodimeric glycoprotein with a molecular mass of 46 kDa) is a member of the VEGF family, referred to as cytokines. The binding of VEGF-A to transmembrane VEGFR-1 gives rise to endothelial mitogenesis, proliferation, and the initiation of angiogenesis and vasculogenesis [5, 6]. In contrast, soluble VEGFR-1 inhibits angiogenesis. However, angiogenesis is a rather complex process, and the exact molecular

mechanism of sVEGFR-1's involvement has not been fully understood yet [7]. Moreover, plasmatic sVEGFR-1 may exist in complexes with other molecules, for example, with the soluble form of transmembrane protein neuropilin-1 [8].

The current diagnosis of MDS is mainly based on WHO/FAB (World Health Organization/French–American–British) assigned scores of heterogeneous groups, according to marrow blast cell percentage, karyotype, and degree of cytopenia. These parameters are found through invasive procedures such as bone marrow puncture and peripheral blood count [9]. It is expected that in future diagnosis of heterogeneous diseases such as MDS, methods based on high-throughput screening of molecular markers will play a crucial role. Although the microarray-based gene expression profiling of MDS has advanced substantially, the mRNA expression fails to consistently correlate with protein expression levels and does not characterize resulting protein functions influenced by such critical parameters as posttranslational modifications and splice variants. Therefore, characterization of MDS phenotypes by proteomic analysis presents an important step toward understanding the biological processes related to MDS [10].

Current approaches to the detection of sVEGFR-1 are based on immunological methods, such as enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), and use antibodies to capture the protein and fluorescent labels or enzymatic amplification to visualize the antibody–protein binding. The main drawbacks of these methods are the need for high-affinity antibodies, which are difficult and expensive to produce, as well as the limited ability to detect complexes of sVEGFR-1 with other molecules due to stochiometric and steric reasons [11, 12]. In addition, the detection of sVEGFR-1 via an antibody does not necessarily provide an accurate representation of the biological activity of the protein. Label-free biosensors allow for a direct real-time observation of molecular interactions, without the use of labels, and thus provide a promising alternative to conventional methods. Surface plasmon resonance (SPR) biosensors present a powerful optical label-free biosensor technology that has been widely applied to the investigation of biomolecular interactions and the detection of chemical and biological analytes [13]. In recent years, SPR biosensors were used to investigate interactions involving molecular biomarkers [14, 15] and measure their concentrations in bodily fluids [12, 16]. In addition, multichannel SPR biosensors [17] make it possible to observe large numbers of biomolecular interactions and identify and simultaneously quantify multiple biomarkers.

In this paper, we demonstrate label-free detection of protein biomarker of MDS disease, sVEGFR-1, via its physiological ligand VEGF-A, using a surface plasmon resonance biosensor and dispersionless microfluidics. VEGF-A molecules are immobilized on the sensing surface via amide coupling of the amino groups of VEGF-A protein and negatively charged carboxylic groups of alkanethiols. The negatively charged residues of VEGF-A, which are critical for the interaction of VEGF-A with the sVEGFR-1 receptor, do not participate in amide coupling and thus remain available for the binding of sVEGFR-1 via the physiological pathway. The ability of the immobilized VEGF-A to interact with the sVEGFR-1 receptor contained in the buffer is investigated. Finally, detection of sVEGFR-1 in diluted blood plasma is accomplished using the dispersionless microfluidics and sequential injection approach.

Materials and methods

Reagents

Human recombinant protein VEGF-A and VEGF receptor-1/Fc chimera were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). 11-Mercapto-tetra(ethyleneglycol)undecanol ($HSC_{11}(EG)_4OH$) and 16-mercapto-hexa(ethyleneglycol) hexadecanoid acid ($HSC_{11}(EG)_6OCH_2COOH$) were purchased from Prochimia (Gdansk, Poland). Bovine serum albumin (BSA) and sodium hydroxide (NaOH) were purchased from Sigma-Aldrich. Ethanolamine hydrochloride (EA), 3-(ethyliminomethylideneamino)-*N*,*N*-dimethylpropan-1-amine (EDC), and 1-hydroxypyrrolidine-2,5-dione (NHS), all included in the Amine Coupling Kit, were purchased from Biacore (Uppsala, Sweden). All other chemicals were of analytical grade. The buffers used were: PBS (0.01 M phosphate, 0.138 M sodium chloride, 0.0027 M potassium chloride, pH 7.4); SA (0.01 M sodium acetate, pH 5.0); PBNa (0.01 M phosphate, 0.75 M sodium chloride, 0.009 M potassium chloride, pH 7.4); 10% BSA/PBS (*w*/*w*); 0.2% BSA/PBNa (*w*/*w*); and ACD (0.08 M trisodium citrate dihydrate, 0.06 M acidum citricum monohydricum, 0.1 M glucose). All buffers were prepared using double glass-distilled and deionized water on Milli-Q50 (Millipore, Prague, Czech Republic).

Plasma samples

Human blood was drawn from healthy volunteers by venipuncture into polypropylene tubes containing 1.9% ACD (*w*/*v*). Plasma was obtained by centrifugation at 250×*g* at 37 °C for 15 min and subsequent centrifugation of the supernatant at 1,000×*g* at 37 °C for 10 min. All samples were obtained in accordance with the Regulations of the Ethical Committee of the Institute of Hematology and Blood Transfusion (Prague).

SPR biosensor platform

In this work, a four-channel laboratory SPR sensor platform (PLASMON IV) was used, developed at the Institute of Photonics and Electronics (Prague). The sensor is based on the Kretschmann geometry of the attenuated total reflection method and spectral modulation. In this SPR sensor, a polychromatic light beam passes through an optical prism interfaced with a chip with a thin metal layer and excites surface plasmons at the interface between the metal layer and a liquid sample. The excitation of surface plasmons gives rise to a narrow dip in the spectrum of reflected light. The wavelength at which the dip occurs (i.e., the resonant wavelength) depends on the refractive index in the proximity of the SPR metal layer surface. If a biomolecular recognition element is immobilized on the sensor surface, the binding of the analyte molecule to the biomolecular recognition element gives rise to a change in the local refractive index. The amount of captured analyte can be quantified by measuring the change in the resonant wavelength. The SPR sensor platform used in this work consists of a polychromatic light source, an optical setup for excitation and modulation of surface plasmons (sensor head), and a four-channel spectrograph. Light from the light source (halogen lamp, HL-2000-HP, Ocean Optics, USA) is brought to the sensor head via an optical fiber (BFL22-365, Thorlabs, USA). The sensor head comprised an input collimator (custom built, consisting of two cylindrical lenses with 20- and 50-mm effective focal lengths) producing a large-diameter parallel beam of polychromatic light, a BK7 glass prism with an attached SPR chip, a dichroic polarizer (Polarcor 800-HC from Corning, USA), and an output four-channel collimator. The output collimator incorporates four graded-index lenses (GT-LFRL-180-024-20-NC, Grintech, Germany) which receive light reflected from four areas of the sensor surface and couple the light into four optical fibers (BFL22-365, Thorlabs) which are connected to the inputs of a four-channel spectrograph unit (consisting of four spectrometer boards S2000, Ocean Optics, and custom-made electronics). In our experiments, we used replaceable SPR sensor chips produced by coating a BK7 glass substrate with an adhesion-promoting titanium layer (thickness, ~2 nm) and a gold layer (thickness, 50 nm) by e-beam evaporation in vacuum. The optical contact between the SPR chip and the prism was established using refractive index matching fluid (Cargille Laboratories, USA). A flow cell with four separate flow chambers was interfaced with the chip. Each flow chamber was aligned to cover one sensing channel. A multichannel peristaltic pump was used to deliver liquid samples to the flow cell. All the experiments were performed using a recently developed dispersionless microfluidics [18]. This microfluidics allows for a fast switching between the analyzed sample (e.g., blood plasma) and the running buffer, nearly eliminating dispersion and intermixing before the sample reaches the sensing area. The SPR system exhibits a baseline noise of 0.9 pm, which corresponds to a refractive index resolution of 1.3×10^{-7} refractive index unit. All experiments were performed at a temperature of 25 °C and a flow rate of 30 μL/min (unless otherwise stated).

Immobilization of VEGF-A on SPR chip

The immobilization method is expected to provide robust attachment of VEGF-A molecules to the surface while preserving their structure and biological activity. As described by Keyt et al. [5], negatively charged acidic residues (Asp^{63}, Glu^{64}, and Glu^{67}) in the active site of VEGF-A are critical for the binding of sVEGFR-1 receptors. Therefore, in our work, VEGF-A was immobilized via amide coupling of the amino groups of VEGF-A protein with the negatively charged carboxylic groups of alkanethiols, leaving the negatively charged residues of VEGF-A accessible for binding sVEGFR-1 via the physiological pathway. The blocking of residual carboxylic groups of alkanethiols on the surface with EA is essential for lowering nonspecific interactions with sVEGFR-1.

Prior to the attachment of VEGF-A, the surface of the SPR chip was functionalized with a mixed self-assembled monolayer (SAM) of alkanethiols, following the procedure given in [19]. Initially, the surface of the gold-coated SPR chip was washed by deionized water and dried by a stream of nitrogen. Then, the chip was put into an UV ozone cleaner (UVO-cleaner 42–220, Jelight Company, USA) for 10 min to remove organic contaminants. Subsequently, the chip surface was washed with deionized water and absolute ethanol and dried by a stream of pure nitrogen. Then, the surface was functionalized with a mixed SAM, with a mixture (7:3) of $HSC_{11}(EG)_4OH$ and $HSC_{11}(EG)_6OCH_2$-COOH alkanethiols (total concentration, 200 μM). After immersing the chip in a mixed thiol solution and heating it to a temperature of 40 °C for 10 min, the chip was stored in darkness at room temperature for up to 1 day. $HSC_{11}(EG)_6OCH_2COOH$ alkanethiols were used to anchor ligand (VEGF-A) by amino coupling, while $HSC_{11}(EG)_4OH$ alkanethiols were used to form a nonfouling background. The activation of the carboxylic terminal groups on the sensor surface was accomplished in situ in the SPR sensor by injecting deionized water followed by a (1:1) mixture of NHS and EDC for 5 min and deionized water again (flow rate, 20 μL/min). After the activation, the surface of the chip was incubated with PBS buffer. Immobilization of VEGF-A to the activated surface was carried out in PBS (VEGF-A concentration, 2 μg/mL) for 10 min. Then, buffers were injected in the

following order—PBS, SA buffer, PBS, and SA buffer—to test the effect of the buffers on the stability of the immobilized VEGF-A. In order to increase the resistance of the surface to the nonspecific adsorption, BSA was covalently immobilized to the areas of the surface not coated with VEGF-A. For that purpose, the sensor surface was incubated with 0.5 mg/mL BSA in SA for 15 min. The non-covalently bound VEGF-A and BSA were removed through the use of a high ionic strength PBNa buffer, which coursed through the flow cell for 5 min. Finally, the sensor surface was treated with 1 M EA for 5 min to deactivate the carboxylic groups of alkanethiols. Reference surfaces only coated with BSA were used to check the specificity of the VEGF-A-coated surface.

After immobilization of VEGF-A on the surface of the sensor, the interaction of VEGF-A and sVEGFR-1 proteins in buffer was investigated. Prior to the injection of sVEGFR-1, PBS buffer was flowed across the sensor surface until a stable baseline was established. Then, sVEGFR-1 at a concentration ranging from 25 to 500 ng/mL was flowed across the sensing surface for 5 min. Following that, the surface was flushed with PBS buffer. In order to evaluate the specificity of the VEGF-A-coated surface, a control experiment was performed in which a solution containing sVEGFR-1 at concentrations ranging from 50 to 500 ng/mL was flowed over the reference surface (only coated with BSA).

Detection of sVEGFR-1

For the detection of sVEGFR-1 in diluted blood plasma, the sequential injection approach was used [18]. The sequential injection approach is based on a sequential injection of the sample and a special buffer, which removes the nonspecifically adsorbed molecules from the surface while not affecting analyte molecules bound to the immobilized ligand. This minimizes the nonspecific sensor response and allows for the detection of low concentrations of analyte, even in complex samples. In our experiments, a series of blood plasma samples (2% in BSA/PBS) spiked with different concentrations of sVEGFR-1 (25–500 ng/mL) were used. The addition of BSA molecules to blood plasma samples was found to reduce the nonspecific interaction of plasma proteins with the sensing surface in each experiment. Therefore, the detection experiments were carried out in the BSA/PBNa running buffer, which was designed in such a way as to remove nonspecifically adsorbed proteins while not disrupting the binding of sVEGFR-1 to VEGF-A immobilized on the sensor surface (data not shown). Blood plasma sample and the running buffer were introduced to the sensing surface sequentially. A total of ten 30-s cycles of blood plasma sample and running buffer were carried out. Therefore, the total time during which the blood plasma sample was in contact with the sensor surface was 5 min. Finally, the running buffer was flowed through the flow cell until equilibrium was reached. To provide a reference, 2% blood plasma, diluted with BSA/PBS and no addition of sVEGFR-1 (blank sample), was flowed through one of the sensing channels.

Results and discussion

Immobilization of VEGF-A on SPR chip

A sensorgram illustrating the immobilization of VEGF-A and BSA is shown in Fig. 1. The SPR sensor response to the immobilized VEGF-A is about 7 nm (the shift in the resonant wavelength), which corresponds to the surface concentration of VEGF-A of ~119 ng/cm^2. The difference between the refractive index of the PBS and SA buffer caused a change in the resonant wavelength of about 7 nm. After the sensor response to the immobilization of VEGF-A (in PBS buffer) reached 7 nm (~119 ng/cm^2), the surface was incubated with BSA (in SA buffer) to minimize nonspecific adsorption to the sensing surface. It is known that BSA molecules tend to bind to each other and form a multilayer. Our previous experiments indicate that the formation of a full BSA monolayer produces a resonant wavelength shift of 11 nm. We allowed adsorption of BSA to the areas of the surface not coated with VEGF-A to proceed until the total resonant wavelength shift (for VEGF-A and BSA combined) reached 11 nm to avoid the formation of a multilayer. Longer incubations with BSA have been found to result in a lower sensor response to the subsequent binding of sVEGFR-1 to VEGF-A. We suppose

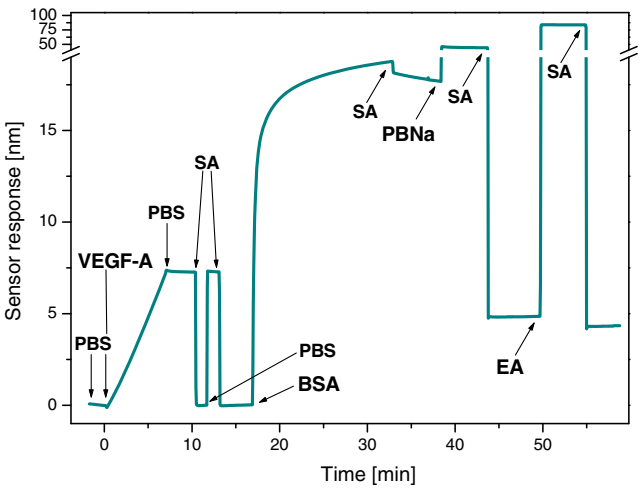


Fig. 1 SPR sensor response to the immobilization of vascular endothelial growth factor A (*VEGF-A*) and BSA on the SPR sensor surface

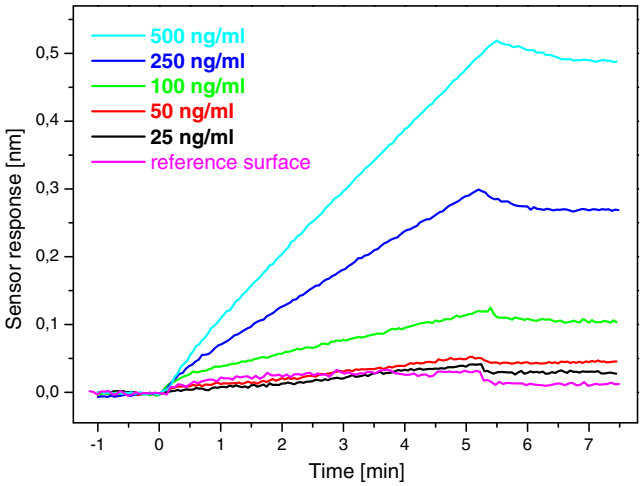


Fig. 2 Detection of sVEGFR-1 in buffer. Response of the sensor to five different concentrations of sVEGFR-1 interacting with VEGF-A, immobilized on the surface of the sensing channel and to reference surface coated only with BSA

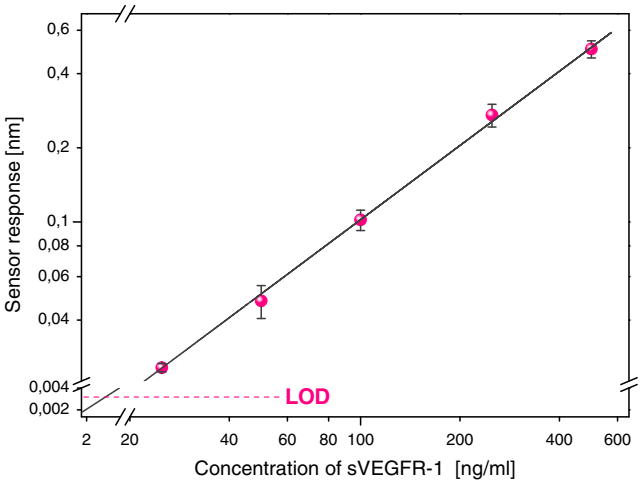


Fig. 3 Calibration curve for the detection of sVEGFR-1 in buffer. The sensor response corresponding to the limit of detection is noted by a *horizontal line*

that it is because the BSA multilayer reduced the access of sVEGFR-1 to the binding sites of VEGF-A. The covalently bound BSA (not removed with PBNa buffer) provided a sensor response of 3.5 nm, which corresponds to ~60 ng/cm^2. Therefore, the resulting surface coverage ratio of VEGF-A and BSA was approximately 2:1. In addition, the stability of the immobilization of VEGF-A in PBNa was tested. No decrease in sensor response was observed when PBNa was injected (data not shown), which indicates that the attachment of VEGF-A is stable in PBNa.

Development of assay

In order to evaluate the interaction between sVEGFR-1 and VEGF-A immobilized on the sensor surface, different concentrations of sVEGFR-1 in PBS buffer (in the range of 25–500 ng/mL) were introduced to the sensor. The resulting sensor response to sVEGFR-1 was normalized to the amount of VEGF-A immobilized on the sensor surface. As follows from Fig. 2, the binding of sVEGFR-1 to VEGF-A is concentration-dependent, stable, and specific—the nonspecific binding to the BSA-coated surface (reference surface) gave rise to a rather minor sensor response (within 5 standard deviations of the baseline noise). The largest nonspecific sensor response was observed for the concentration of sVEGFR-1 of 500 ng/mL and is shown in Fig. 2. The detection experiment was repeated using three sensing channels of a single chip for each concentration of sVEGFR-1, and on-chip reproducibility was determined to be between 85% and 96%. Sensor responses determined for different concentrations of sVEGFR-1 in buffer, collected in the form of a calibration curve, are shown in Fig. 3. The limit of detection (LOD) for sVEGFR-1 in buffer, defined as a concentration of sVEGFR-1 that corresponds to the sensor response equal to 3 standard deviations of the baseline noise (3×0.9 pm), was estimated to be 3 ng/mL.

Subsequently, the reusability of the sensor and the reproducibility of the measurements in blood plasma were studied. To investigate the reusability of the sensor, the captured sVEGFR-1 was removed from the sensor surface with 10 mM NaOH and the sensor was used for another detection cycle. The experiments (Fig. 4) revealed that even after five detection–regeneration cycles, the binding capacity was maintained and that the reproducibility of the sensor response was better than 92%. Chip-to-chip reproducibility was examined using three independent chips for each concentration in the concentration range 25–100 ng/mL and was determined to be between 88% and 96%.

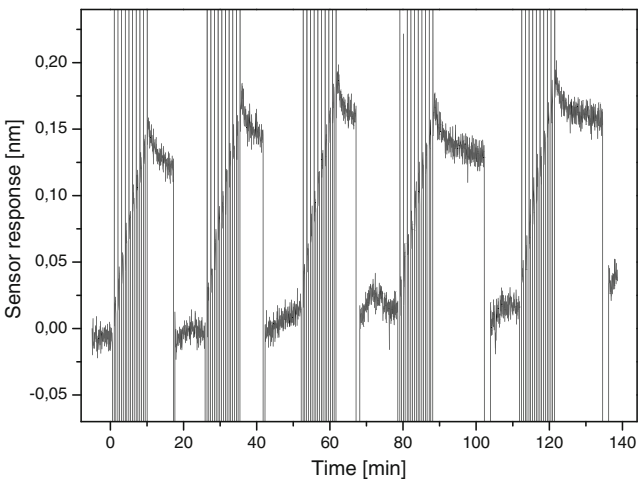


Fig. 4 Regeneration of sensor with NaOH and subsequent detection of blood plasma sample, spiked with 50 ng/mL of sVEGFR-1, in five cycles

Detection of sVEGFR-1

The binding data for sVEGFR-1 in diluted blood plasma obtained using the sampling method are shown in Fig. 5. As illustrated in the inset of Fig. 5, switching between the running buffer and the blood plasma sample (injection cycle) results in a great change in the sensor response (caused mainly by changes in the bulk refractive index). Therefore, the kinetic curves provided in Fig. 5 only contain the values obtained at the end of each injection cycle. As follows from Fig. 5, for each concentration of VEGFR-1, the sensor response to diluted blood plasma spiked with sVEGFR-1 increased nearly linearly over time. The total amount of the captured sVEGFR-1 is proportional to the concentration of sVEGFR-1. The specific sensor responses to the tested concentrations of sVEGFR-1 in blood plasma (obtained by subtracting the blank sample response) agree well with those measured in buffer. Using the sensor responses obtained for different concentrations of sVEGFR-1, the calibration curve for the detection of sVEGFR-1 in 50× diluted blood plasma was established (Fig. 6). As the sensor surface is regenerable, the sensor response to each concentration was determined from at least three measurements on different chips. The average sensor response to the blank sample (2% blood plasma diluted with BSA/PBS with no sVEGFR-1 added) was 0.097± 0.008 nm, which corresponds to the surface concentration as low as 1.7 ng/cm^2. This ultimate level of nonspecific adsorption from the blank sample, using the sequential injection approach, is comparable with the nonspecific adsorption levels achieved using advanced non-fouling surfaces (e.g., zwitterionic polymers). The low nonspecific

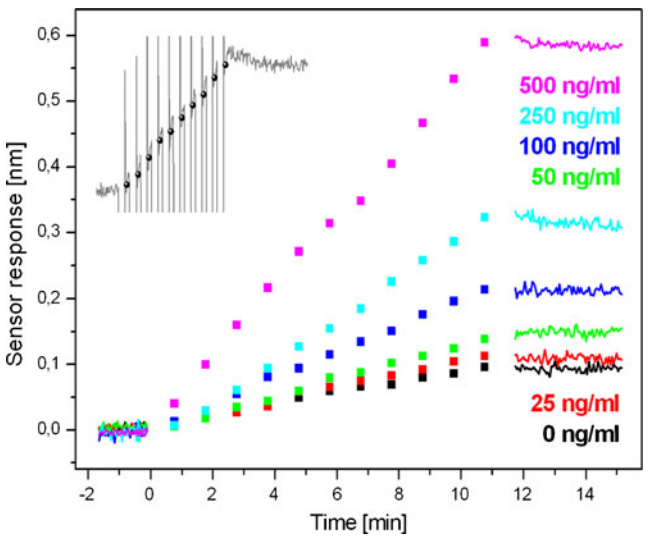


Fig. 5 Sensor response to plasma samples spiked with different concentrations of sVEGFR-1. The *inset* illustrates the sequential injection of plasma sample and running buffer

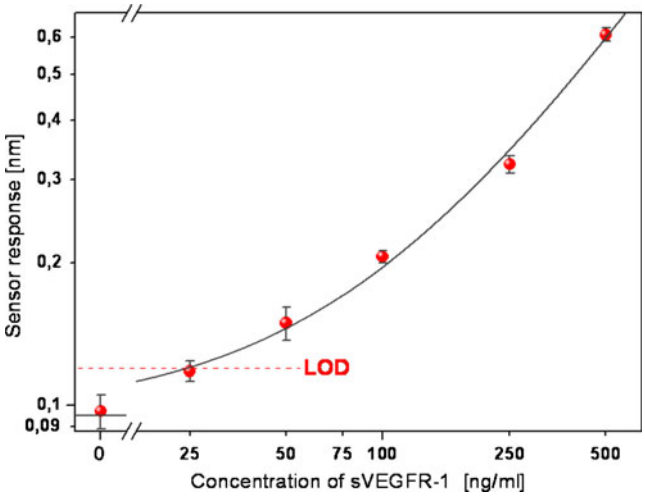


Fig. 6 Calibration curve for the detection of sVEGFR-1 in blood plasma. The sensor response corresponding to the limit of detection is noted by a *horizontal line*

adsorption observed is probably due to the fact that high ionic strength running buffer removes the nonspecifically adsorbed molecules during each sampling cycle before they can form a solid layer to enable secondary nonspecific adsorption on previously adsorbed biomolecules. Different types of surfaces were compared with respect to the nonspecific adsorption from blood plasma (blank sample). It was found that in comparison with the VEGF-A surface coated with covalently attached BSA, the surface coated only with VEGF-A and the surface coated only with BSA exhibited a nonspecific adsorption which was higher by a factor of 1.8 and lower by a factor of 50, respectively (data not shown). The LOD was determined as the concentration corresponding to the sensor response to a blank sample, increased by 3 standard deviations of the sensor response to a blank sample (0.097+3×0.008 nm). Using the calibration curve (Fig. 6), the LOD for the reported sVEGFR-1 biosensor was found to be 25 ng/mL.

To our knowledge, this is the first attempt to measure sVEGFR-1 levels using an SPR biosensor. Moreover, there is no commercial method for the diagnosis of MDS via the detection of sVEGFR-1. Conventional approaches for the detection of sVEGFR-1 are based on ELISA [20–25]. For instance, Hu et al. [2] measured the plasmatic levels of sVEGFR-1 using ELISA and found them to be about 0.02 ng/mL and up to 0.5 ng/mL for healthy individuals and MDS patients, respectively. While the reported SPR biosensor does not yet reach this level of sensitivity, it only requires one biorecognition element to carry out the measurement and thus may be better able to detect sVEGFR-1 in complexes with other proteins. As the molecular mechanisms involving sVEGFR-1 are not yet fully understood, the potential to detect sVEGFR-1 in complex with other (possibly unknown) proteins may be an

important feature both in terms of unveiling the complex role of sVEGFR-1 and in the diagnosis of MDS.

Conclusions

We demonstrated the SPR biosensor-based detection of sVEGFR-1, the plasmatic protein marker of myelodysplastic syndromes (MDS), via interaction with its high-affinity counterpart VEGF-A, immobilized on the sensor surface. The conditions for the immobilization of VEGF-A and interaction with sVEGFR-1 were optimized in buffer using an SPR sensor system with special dispersionless microfluidics. The attached VEGF-A was found to form a stable layer, with a sufficient number of binding sites demonstrating preserved biological activity. Subsequently, the detection of sVEGFR-1 in 2% human blood plasma was performed. Using the improved surface functionalization with reduced nonspecific adsorption and the sequential injection approach, we achieved the detection limit of 25 ng/mL for sVEGFR-1. This study suggests a model for future protein microarray for MDS diagnosis based on protein–protein interactions under physiological conditions, which could help clarify the molecular pathogenesis of the disease.

Acknowledgments This study was supported by research grants NS10633-3/2009 and MZ 02373601 from the Ministry of Health, Czech Republic, by research grant KAN200670701 and Praemium Academiae from the Academy of Sciences, Czech Republic, and by Baxter, Czech Republic.

References

1. Greenberg PL (2006) Myelodysplastic syndromes: clinical and biological advances. Cambridge University Press, New York
2. Hu Q, Dey AL, Yang Y, Shen Y, Jilani IB, Estey EH, Kantarjian HM, Giles FJ, Albitar M (2004) Soluble vascular endothelial growth factor receptor 1, and not receptor 2, is an independent prognostic factor in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes. Cancer 100(9):1884–1891
3. Schuch G, Machluf M, Bartsch G, Nomi M, Richard H, Atala A, Soker S (2002) In vivo administration of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its antagonist, soluble neuropilin-1, predicts a role of VEGF in the progression of acute myeloid leukemia in vivo. Blood 100(13):4622–4628
4. Shibuya M (2006) Differential roles of vascular endothelial growth factor receptor-1 and receptor-2 in angiogenesis. J Biochem Mol Biol 39(5):469–478
5. Keyt BA, Nguyen HV, Berleau LT, Duarte CM, Park J, Chen H, Ferrara N (1996) Identification of vascular endothelial growth factor determinants for binding KDR and FLT-1 receptors—generation of receptor-selective VEGF variants by site-directed mutagenesis. J Biol Chem 271(10):5638–5646
6. Senger DR (2010) Vascular endothelial growth factor: much more than an angiogenesis factor. Mol Biol Cell 21(3):377–379
7. Mac Gabhann F, Popel AS (2008) Systems biology of vascular endothelial growth factors. Microcirculation 15(8):715–738
8. Fuh G, Garcia KC, de Vos AM (2000) The interaction of neuropilin-1 with vascular endothelial growth factor and its receptor Flt-1. J Biol Chem 275(35):26690–26695
9. Salih HR, Nuessler V, Denzlinger C, Starling GC, Kiener PA, Schmetzer HM (2004) Serum levels of CD137 ligand and CD178 are prognostic factors for progression of myelodysplastic syndrome. Leukemia Lymphoma 45(2):301–308
10. Theilgaard-Mönch K, Boultwood J, Ferrari S, Giannopoulos K, Hernandez-Rivas JM, Kohlmann A, Morgan M, Porse B, Tagliafico E, Zwaan CM, Wainscoat J, Van den Heuvel-Eibrink MM, Mills K, Bullinger L (2011) Gene expression profiling in MDS and AML: potential and future avenues. Leukemia 25(6):909–920
11. Belgore FM, Blann AD, Lip GY (2001) Measurement of free and complexed soluble vascular endothelial growth factor receptor, Flt-I, in fluid samples: development and application of two new immunoassays. Clin Sci 100(5):567–575
12. Vaisocherova H, Faca VM, Taylor AD, Hanash S, Jiang S (2009) Comparative study of SPR and ELISA methods based on analysis of CD166/ALCAM levels in cancer and control human sera. Biosens Bioelectron 24(7):2143–2148
13. Homola J (2008) Surface plasmon resonance sensors for detection of chemical and biological species. Chem Rev 108(2):462–493
14. Cunningham SA, Tran TM, Arrate MP, Brock TA (1999) Characterization of vascular endothelial cell growth factor interactions with the kinase insert domain-containing receptor tyrosine kinase—a real time kinetic study. J Biol Chem 274(26):18421–18427
15. Huang X, Gottstein C, Brekken RA, Thorpe PE (1998) Expression of soluble VEGF receptor 2 and characterization of its binding by surface plasmon resonance. Biochem Bioph Res Co 252(3):643–648
16. Piliarik M, Bockova M, Homola J (2010) Surface plasmon resonance biosensor for parallelized detection of protein biomarkers in diluted blood plasma. Biosens Bioelectron 26(4):1656–1661
17. Scarano S, Mascini M, Turner APF, Minunni M (2010) Surface plasmon resonance imaging for affinity-based biosensors. Biosens Bioelectron 25(5):957–966
18. Springer T, Piliarik M, Homola J (2010) Real-time monitoring of biomolecular interactions in blood plasma using a surface plasmon resonance biosensor. Anal Bioanal Chem 398(5):1955–1961
19. Herranz S, Bockova M, Marazuela MD, Homola J, Moreno-Bondi MC (2010) An SPR biosensor for the detection of microcystins in drinking water. Anal Bioanal Chem 398(6):2625–2634
20. Jeevaratnam K, Nadarajah VD, Judson JP, Nalliah S, Abdullah F, Ramnan M, Krishnan R (2008) Periodic assessment of plasma Sflt-1 and Plgf concentrations and its association with structural and vascular changes of the placenta in pregnancy induced hypertension. Hypertens Pregnancy 27(4):657
21. Nagaoka S, Yoshida T, Akiyoshi J, Akiba J, Hisamoto T, Yoshida Y, Abe M, Koga H, Toirimura T, Ueno T, Sata M (2010) The ratio of serum placenta growth factor to soluble vascular endothelial growth factor receptor-1 predicts the prognosis of hepatocellular carcinoma. Oncol Rep 23(6):1647–1654
22. Przewratil P, Sitkiewicz A, Andrzejewska E (2010) Soluble receptors for vascular endothelial growth factor (sVEGFR1/sVEGFR2) in infantile hemangioma. Growth Factors 28(6):417–425
23. Sunderji S, Gaziano E, Wothe D, Rogers LC, Sibai B, Karumanchi SA, Hodges-Savola C (2010) Automated assays for sVEGF R1 and PlGF as an aid in the diagnosis of preterm preeclampsia: a prospective clinical study. Am J Obstet Gynecol 202(1)
24. Wu FT, Stefanini MO, Mac Gabhann F, Kontos CD, Annex BH, Popel AS (2010) A systems biology perspective on sVEGFR1: its biological function, pathogenic role and therapeutic use. J Cell Mol Med 14(3):528–552
25. Yang KY, Liu KT, Chen YC, Chen CS, Lee YC, Perng RP, Feng JY (2011) Plasma soluble vascular endothelial growth factor receptor-1 levels predict outcomes of pneumonia-related septic shock patients: a prospective observational study. Crit Care 15(1)

Příloha 4

Stikarova J., Kotlin R., Riedel T., Suttnar J., Pimkova K., Chrastinova L., Dyr J. E.

The effect of reagents mimicking oxidative stress on fibrinogen function

ScientificWorldJournal. 2013 Oct 21. 2013:359621.

Hindawi Publishing Corporation
The Scientific World Journal
Volume 2013, Article ID 359621, 8 pages
http://dx.doi.org/10.1155/2013/359621

Research Article

The Effect of Reagents Mimicking Oxidative Stress on Fibrinogen Function

Jana Štikarová, Roman Kotlín, Tomáš Riedel, Jiří Suttnar, Kristýna Pimková, Leona Chrastinová, and Jan E. Dyr

Institute of Hematology and Blood Transfusion, U Nemocnice 1, 128 00 Prague 2, Czech Republic

Correspondence should be addressed to Jan E. Dyr; jan.dyr@uhkt.cz

Received 6 August 2013; Accepted 2 September 2013

Academic Editors: A. Saudemont and F. Traina

Copyright © 2013 Jana Štikarová et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Fibrinogen is one of the plasma proteins most susceptible to oxidative modification. It has been suggested that modification of fibrinogen may cause thrombotic/bleeding complications associated with many pathophysiological states of organism. We exposed fibrinogen molecules to three different modification reagents—malondialdehyde, sodium hypochlorite, and peroxynitrite—that are presented to various degrees in different stages of oxidative stress. We studied the changes in fibrin network formation and platelet interactions with modified fibrinogens under flow conditions. The fastest modification of fibrinogen was caused by hypochlorite. Fibers from fibrinogen modified with either reagent were thinner in comparison with control fibers. We found that platelet dynamic adhesion was significantly lower on fibrinogen modified with malondialdehyde and significantly higher on fibrinogen modified either with hypochlorite or peroxynitrite reflecting different prothrombotic/antithrombotic properties of oxidatively modified fibrinogens. It seems that, in the complex reactions ongoing in living organisms at conditions of oxidation stress, hypochlorite modifies proteins (e.g., fibrinogen) faster and more preferentially than malondialdehyde. It suggests that the prothrombotic effects of prior fibrinogen modifications may outweigh the antithrombotic effect of malondialdehyde-modified fibrinogen in real living systems.

1. Introduction

The development of many pathological states and diseases is associated with activation and intensification of free-radical processes when reactive oxygen and nitrogen species (ROS, RNS, together abbreviated as RONS) are produced [1–3]. It was found that plasma fibrinogen was much more susceptible to oxidative modification compared to the other major plasma proteins, albumin, immunoglobulins, and transferrin [4].

Fibrinogen is an adhesive plasma protein, which plays a central role in haemostasis. It is a 340 kDa glycoprotein composed of three nonidentical peptide chains Aα, Bβ, and γ connected with 29 disulfide bonds. Activation of the coagulation cascade converts soluble fibrinogen to insoluble fibrin, which produces together with platelets the haemostatic clot. Plasma fibrinogen is an important component of the coagulation cascade as well as a major determinant of blood viscosity and blood flow. Whereas the normal activation of the coagulation cascade is essential for life, inappropriate activation may result in thrombosis [5–7].

Modification of fibrinogen molecule affects haemostasis by changes in formation and architecture of fibrin network and by changes of fibrin(ogen) interactions with platelets, endothelial, and other cells via cell-membrane fibrin(ogen) receptors [8–15]. Fibrin(ogen) receptors can transduce intracellular signals upon fibrin(ogen) binding, whereas fibrin(ogen) binding proteins are either soluble or anchored molecules that bind fibrin(ogen) but have no documented ability to directly transduce intracellular signals upon fibrin(ogen) binding. The functional consequences of these protein-fibrin(ogen) interactions range from blood coagulation and initiation of angiogenesis to inflammation and propagation of infection.

Various methods are used to generate respective RONS for modeling the oxidative stress in *in vitro* systems.

Thus, induced changes of proteins molecules mimic the results of oxidative and/or nitrative (patho)physiological reactions *in vivo*.

In the present study, we selected malondialdehyde (MDA), sodium hypochlorite (NaOCl), and peroxynitrite (PN) as oxidative/nitrative reagents frequently used in protein chemistry. These reagents are (patho)physiologically present during oxidative stress. Fenton reaction (Haber-Weiss reaction) and myeloperoxidase production of hypochlorite are other *in vitro*-used systems that mimic oxidative stress.

MDA is an indicator of lipid peroxidation [16], and it is associated with a number of pathological processes, for example, atherosclerosis and inflammatory joint diseases. Reaction of MDA with proteins may result in inter-/intracross-linking of proteins or formation of carbonyl groups in proteins.

Hypochlorous acid (HOCl) is produced physiologically during activation of phagocytes. Reaction of HOCl with proteins can result in the alteration of amino acid side chains, protein fragmentation [17], and cross-linking. HOCl-modified proteins were found in human atherosclerotic plaque tissue. Sodium hypochlorite simulates the reaction of HOCl with proteins [18].

Peroxynitrite formation was shown in chronic inflammation, and it is linked with development of atherosclerosis [8, 19]. Spontaneous reaction of PN with proteins leads to nitration of tyrosyls, oxidation of cysteinyl, methionyl, and tryptophanyl amino acid residues, formation of dityrosine and carbonyl groups, and protein fragmentation [19–21]. Peroxynitrite can be produced *in vitro* by decomposition of 3-morpholinosydnonimine (SIN-1) [2, 8].

The aim of the present study was to determine the influence of fibrinogen oxidative modifications (newly also including the effect of malondialdehyde) on platelet dynamic adhesion and fibrin network architecture. The study of the dynamic adhesiveness of platelets in the presence of oxidatively modified fibrinogen can help to assess the influence of platelet adhesion on the postischemic vessel wall.

2. Methods

2.1. Fibrinogen Modification. Lyophilized human fibrinogen (Sigma-Aldrich, Prague, Czech Republic) (4 mg/mL) was dissolved in phosphate buffer saline (PBS; 137 M NaCl, 2.7 mM KCl, 8 mM $Na_2HPO_4{\cdot}12H_2O$, 1.5 mM KH_2PO_4, and pH 7.4). Its concentration was determined spectrometrically at 278 nm using an extinction coefficient 15.1 for 10 mg/mL solution.

Fibrinogen was modified by three different systems: treatment of fibrinogen (a) by malondialdehyde (MDA; 10 mM; incubation times 30, 60, and 120 minutes; dark), (b) by sodium hypochlorite (NaOCl; 1.25 mM; incubation times 5, 10, and 20 minutes) [22], and (c) by 3-morpholinosydnonimine (SIN-1; 100 μM; incubation times 30 and 60 minutes; vortexing every 10 min) [8]. All samples were incubated at 37°C. Control samples were exposed to conditions of modification but without modification species.

After incubation with modification species fibrinogen was purified by centrifugal gel filtration (Sephadex G-25 superfine; Pharmacia, Uppsala, Sweden). Protein concentration in eluate was estimated by Bradford protein assay.

2.2. Preparation of Modification Species. Malondialdehyde was prepared by acid hydrolysis of 1,1,3,3-tetra methoxypropane (Sigma-Aldrich, Prague, Czech Republic). MDA concentration was determined spectrometrically (ε_{245} = 13 700 $M^{-1}\,cm^{-1}$) [23].

Sodium hypochlorite (Sigma-Aldrich, Prague, Czech Republic) was prepared by dilution with PBS, pH 7.4. Concentration of NaOCl was determined spectrometrically (ε_{290} = 350 $M^{-1}\,cm^{-1}$) [24].

3-Morpholinosydnonimine (Sigma-Aldrich, Prague, Czech Republic) was dissolved in 50 mM potassium phosphate buffer, pH 5.0 [8].

2.3. Carbonyl Quantification. Content of carbonyls was determined using essentially the method of Belisario et al. [12]. Briefly, control or oxidized fibrinogen was precipitated by trichloroacetic acid (TCA; Sigma-Aldrich, Prague, Czech Republic) (10% w/v, final concentration) and consequently derivatized by 10 mM dinitrophenylhydrazine (DNPH; Sigma-Aldrich, Prague, Czech Republic). After the DNPH reaction, the protein was reprecipitated with ice-cold TCA (10% w/v, final concentration), and the pellet was washed three times with TCA (5%) and then with ethanol : ethyl acetate mixture (1 : 1). The protein pellet was dissolved in 6 M guanidine-HCl (Sigma-Aldrich, Prague, Czech Republic), and absorbance was monitored between 250 and 500 nm (Shimadzu UV-2401, Shimadzu Corp., Prague, Czech Republic). Extinction coefficients for the wavelengths 278 nm for hydrazone and fibrinogen are 9 460 $l{\cdot}mol^{-1}{\cdot}cm^{-1}$ and 57 000 $l{\cdot}mol^{-1}{\cdot}cm^{-1}$, respectively. Hydrazone extinction coefficient for 370 nm is 22 000 $l{\cdot}mol^{-1}{\cdot}cm^{-1}$ [12].

2.4. Fibrin Polymerization Curves Measurement. Thrombin-catalyzed fibrin polymerization was monitored at 350 nm in microplates at 37°C for 40 min (Synergy HT, BioTek AS, Prague, Czech Republic). 200 μL of modified or control fibrinogen (1.25 mg/mL) in PBS was added to each well. Reaction was initiated by thrombin (EC 3.4.21.5; Sigma-Aldrich, Prague, Czech Republic) (50 μL, final concentration 0.5 NIH U/mL). Samples were mixed automatically within instrument (5 s) immediately after the reaction start. Turbidity was measured every 20 s for 40 min [9].

2.5. Scanning Electron Microscopy. Fibrin networks were prepared in a polystyrene shallow well. Fibrinogen, modified and control, was mixed with thrombin (final concentration 2 NIH U/mL) and incubated in atmosphere of saturated water vapor pressure at room temperature for 3 hours. The networks were washed with PBS and water and subsequently dehydrated with a series of water-ethanol solutions with increasing ethanol concentration (0%, 25%, 50%, 75%, and 100%). Finally, the samples were dried using the CO_2 critical point method (Balzers CPD 010) and coated with 4 nm thick platinum by sputtering (Balzers SCD 050). A TESCAN

Vega Plus TS 5135 (Tescan, s.r.o., Brno, Czech Republic) electron microscope was used for the scanning observations. Images were evaluated using ImageJ data analysis software (http://rsbweb.nih.gov/ij/) [25].

2.6. Measurement of Platelet's Dynamic Adhesion by Cone and Plate Analyzer. Blood was drawn from healthy volunteers, who had not ingested any drug for at least two weeks, in accordance with the Ethical Committee regulations of our institute.

Washed blood platelets were isolated by differential centrifugation of blood collected into ACD (citric acid/citrate/dextrose) solution 8.1 : 1.9 (v/v). Platelet rich plasma (PRP) was prepared from blood by centrifugation at 250 ×g at 37°C for 15 min. PRP containing prostaglandin E1 (1 μM, final concentration; Sigma-Aldrich, Prague, Czech Republic) was incubated in a water bath at 37°C for 10 min and centrifuged at 1000 ×g at 37°C for 10 min. The resulting platelet pellet was resuspended in modified (Ca^{2+}-free) Tyrode's buffer pH 6.2 (140 mM NaCl, 3 Mm KCl, 12 mM $NaHCO_3$, 0.4 mM $NaH_2PO_4{\cdot}H_2O$, 2 mM $MgCl_2$, and 5.55 mM glucose; pH was adjusted by H_3PO_4) in the presence of 1 μM prostaglandin E1 and centrifuged at 600 ×g at 37°C for 10 min. The platelets were finally resuspended in a Tyrode's buffer pH 7.4 (140 mM NaCl, 3 mM KCl, 12 mM $NaHCO_3$, 0.4 mM $NaH_2PO_4{\cdot}H_2O$, 1 mM $MgCl_2{\cdot}6\,H_2O$, 2 mM $CaCl_2{\cdot}2\,H_2O$ and 5.55 mM glucose; pH was adjusted by Hepes) to a required concentration of platelets, equilibrated 30 min at 37°C and used for experiments within 1 h [26, 27].

Red blood cells were prepared from the same person's blood. Briefly, the whole blood was first centrifuged (250 ×g at 37°C for 15 min), and PRP was removed. The remaining blood sample was diluted in PBS (final volume of the whole blood sample) and centrifuged (220 ×g at 25°C for 10 min), and the supernatant was consequently removed. This step was repeated three times. The conditions of the last centrifugation were altered (2000 ×g at 25°C for 10 min), and red blood cells were resuspended in PBS [28].

After mixing a suspension of washed platelets and washed red blood cells (1 : 1) (final count of platelets and red blood cells was 200 000/μL and 4 000 000/μL, resp.), modified or control fibrinogen was added (final concentration 1 mg/mL).

High shear was applied with a cone and plate analyzer, the Impact-R (DiaMed; Eurex Medica, Ostrava, Czech Republic) in accordance with manufacturer's manual. Sample (washed platelets, red blood cells, and fibrinogen) was placed onto a polystyrene plate onto which a Teflon cone was perfectly fitted. After incubation (10 s) shear was applied (shear rate 1800 s^{-1}) for 2 minutes. Plates were then washed with deionized water and stained with May-Grűnwald (Merck, Prague, Czech Republic).

Samples were analyzed using an image analyzing system that is a part of Cone and Platelet analyzer software. The images obtained by built-in camera were processed by the software that calculates surface coverage (SC), number (OB), and size of surface-bound objects (AS). Seven images were collected from each run, and the medians of the respective values were calculated by the analyzing system. The influence of fibrinogen modification on platelet adhesion was expressed as a percentage of surface coverage by adhered platelets in the presence of modified fibrinogen versus surface coverage by adhered platelets in the presence of control fibrinogen.

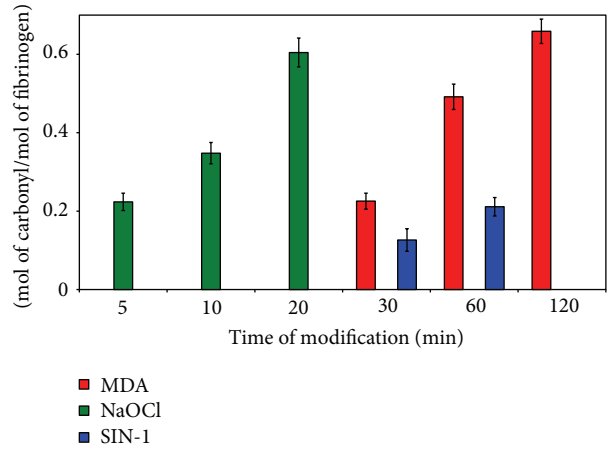


Figure 1: Evaluation of carbonyl groups in modified fibrinogen. Fibrinogen was treated with MDA, NaOCl, and SIN-1. Content of carbonyls was determined by DNPH derivatization [15]. Data are represented as mean ± SD from five independent experiments.

2.7. Statistical Analysis. Results are presented as mean ± SD and were performed in triplicate unless stated otherwise. The significance of differences was evaluated using Student's t-test. P values less than 0.05 (two-sided) were considered statistically significant.

3. Results

3.1. Carbonyl Quantification. The ratio of carbonyl groups per fibrinogen molecule was counted. The amount of carbonyl groups in modified fibrinogen increased with time of modification in all three modification systems (Figure 1). Native fibrinogen contains approximately 0.03 mol carbonyl/mol fibrinogen. Carbonyl groups were also detected in control fibrinogens but their amount was significantly lower than in modified fibrinogens. These data suggest that the most effective modification was done by NaOCl (0.60 ± 0.04 mol carbonyl/mol fibrinogen). The highest content of carbonyl groups in molecule of fibrinogen was created by MDA modification (0.66 ± 0.03 mol carbonyl/mol fibrinogen), but longer reaction time was necessary.

3.2. Fibrin Polymerization Curves Measurement. Polymerization of fibrin was monitored at 350 nm for 40 min (Figure 2). Maximal absorption and reaction rate were calculated from five independent experiments and then the t-test was used.

The significantly lower final optical density was obtained using NaOCl-modified fibrinogen as compared with control. The maximal velocity of fibrin network formation was also significantly lower as compared with control. We also found

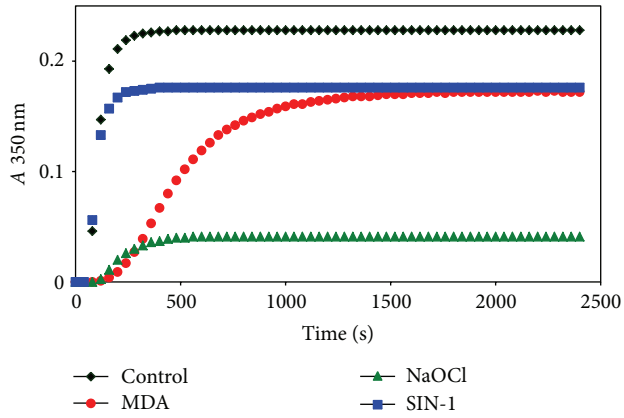


FIGURE 2: Representative curves of thrombin-catalyzed fibrin polymerization. Fibrin clot formation from modified (modification times: MDA 30 min, NaOCl 5 min, and SIN-1 30 min) or control fibrinogen (1 mg/mL) was monitored at 350 nm after the addition of thrombin (0.5 U/mL).

lower final optical density in polymerization of fibrin modified by MDA and SIN-1, but these differences did not reach significance (data not shown).

3.3. Scanning Electron Microscopy. The architecture of the fibrin clots was examined by scanning electron microscopy (SEM; Figure 3). Multiple images were taken throughout a fibrin net produced from fibrinogen modified by respective reagents. One of them mostly representing the modification with respective reagent was chosen for further examination. The significant changes between modified and control network architecture were found in clots from fibrinogen modified by all modification systems. Fibers from modified fibrinogen were significantly ($P < 0.05$) thinner in comparison with control fibers. The network from NaOCl treated fibrinogen was composed of thin fibers with bundles and with many pores, while clots formed by fibrin exposed to both SIN-1 and MDA were denser than control (Table 1).

3.4. Platelet's Dynamic Adhesion. Samples were analyzed with the image analyzing system. Platelet adhesion and aggregation were recorded by examination of the percentage of total area covered with platelets. All fibrinogen modification systems induced significant ($P < 0.05$) differences in platelet dynamic adhesion between modified and control fibrinogen. Fibrinogen modified by MDA greatly inhibited dynamic adhesion. This inhibition was increased with the time of modification (Figure 4(a)). The surface coverage in the presence of modified fibrinogen (120 min) reached 53.7 ± 17.3% of surface coverage of platelets in the presence of control fibrinogen. NaOCl treatment stimulated dynamic adhesion of platelets (Figure 4(b)). Modified fibrinogen stimulated dynamic adhesion to almost double values (172.0 ± 24.0%) in comparison with control fibrinogen. Significant increase was found between dynamic adhesion in the presence of modified fibrinogen by SIN-1 and control fibrinogen after 60 min of fibrinogen treatment (Figure 4(c); 133.8 ± 15.1%).

4. Discussion

The literary data of prothrombotic/antithrombotic (beneficial or harmful?) properties of oxidized fibrinogen are not straightforward. Vadseth et al. [8], Paton et al. [1], and Upchurch et al. [29] proposed prothrombotic state induced by oxidative posttranslational modification of fibrinogen while Shacter et al. [9] or Tetik et al. [13, 30] argued the opposite.

Experimental conditions (concentration of added reagent and reactions time) were chosen to reflect real (patho)physiological (possible) situations in organism. MDA is a long-lived reagent, and its concentration in plasma from control is between 1 and 2 μM [31]. Activation of platelets close to atherosclerotic plates, however, may lead to the production of a large amount of MDA, and thus, fibrin(ogen) located in these lesions could be exposed to extended modification [32]. Hypochlorite concentration was higher than that used in Vadseth et al. [8] (1.25 mM and 0.1 mM, resp.) but within limit set for real system. Concentration of hypochlorite in sites of inflammation might be 0.34 mM or greater [33]. Decomposition of SIN-1 leads to nitric oxide and superoxide production. These two molecules immediately form peroxynitrite (rate constant 10^{10} M^{-1} s^{-1}) [8]. The concentration of peroxynitrite is estimated to be in nanomolar range concentration [34]. Peroxynitrite is produced by several cells as vascular endothelial cells or activated neutrophils, thus, fibrinogen in lesions could be exposed to a higher local concentration (up to 100 μM) [35]. We used modification conditions as in Vadseth et al. [8].

All modification systems we employed initiated the increase of carbonyl groups content in fibrinogen. The highest content of carbonyl groups was reached using MDA, but the modification induced by NaOCl proceeded more rapidly. The range of fibrinogen carbonylation was within limit values found in posterior myocardial infarct patients, thus reflecting the real fibrinogen modifications in cardiovascular diseases [1].

The singlet oxygen ($^1O_2$) is formed from hypochlorite either in the presence of hydrogen peroxide or upon its simple acidification onset at pH 8 [36] and plays a significant role in oxidative stress. $^1O_2$ production by the spontaneous dismutation of $O_2^{\bullet-}$ does have also physiological relevance. Singlet oxygen then inactivates fibrinogen, factor V, factor VIII, factor X, and platelet aggregation of human blood [37]. Moreover, thrombin converts oxidized fibrinogen into a soluble stimulator of tissue-type plasminogen activator [38]. Changes in functional activities of plasma fibrinogen after treatment with methylene blue and red light *in vitro*, where singlet oxygen is formed, were observed by Suontaka et al. [39].

Lupidi states that also peroxynitrite-mediated oxidation of fibrinogen inhibits clot formation [21]. However, it was proved that peroxynitrite does not decompose to singlet oxygen and nitroxyl (NO_2) [40].

Taking all these facts together, the singlet oxygen plays a complex role in blood haemostasis, modifies many coagulation factors, and affects platelet aggregation. The oxidative modification of fibrinogen with reagents used in our study

Table 1: Fibers thickness and average number of fibrin fibers per 1 μm^2 of fibrin clot.

	MDA		NaOCl		SIN-1	
	Control fibrinogen	Modified fibrinogen	Control fibrinogen	Modified fibrinogen	Control fibrinogen	Modified fibrinogen
Fibers thickness (nm)	115.2 ± 30.8	102.0 ± 21.8	136.7 ± 48.8	107.4 ± 23.7	130.3 ± 43.0	102.1 ± 34.0
Average no. of fibers strands per field (1 μm^2)	12.9 ± 1.0	20.5 ± 3.3	13.1 ± 1.8	2.0 ± 1.2	14.1 ± 1.1	20.4 ± 2.2

Quantity and thickness of fibrin fibers were obtained from three experiments. Thickness of fibers is presented as mean of 45 values (15 values per experiment) with SD. Count of fibers was acquired as mean value from 6 areas (2 areas per experiment). Differences between control and modified fibrinogen were significant in both thickness and quantity parameters (paired Student's t-test) with probability $P < 0.05$.

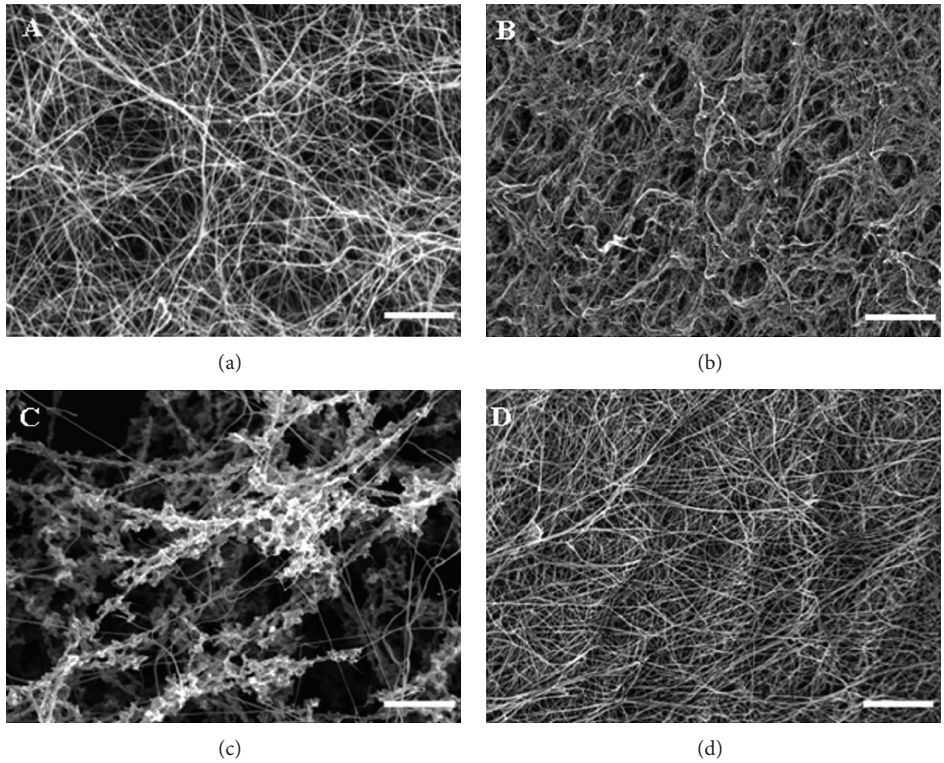


Figure 3: Representative SEM images of fibrin clots formed by modified and control fibrinogens. Control fibrinogen (a) and fibrinogen modified by (b) MDA, (c) NaOCl, and (d) SIN-1. Images were obtained from the clots formed by fibrinogen in the final time of modification (MDA 120 min, NaOCl 20 min, and SIN-1 60 min). The scale bar is 5 μm.

could be also partly caused by singlet oxygen, since at pH 7.4, we used in our experiments, the hypochlorite decomposes partly to it. Neither peroxynitrite nor malondialdehyde produces singlet oxygen; however, they modify fibrinogen and other proteins by different mechanisms. The platelet interaction with modified fibrinogen was studied at conditions, where modification reagents were entirely removed and thus their influence on platelets was excluded.

We found that fibers from fibrinogen modified with all used reagents were markedly thinner in comparison with control fibers. The finding was supported by measurements of modified fibrin polymerization curves that showed lower turbidity as compared with control samples. Only fibrin clot made from fibrinogen modified with hypochlorite was composed of large bundles of thin fibrin fibers.

In a previous work, we studied the thrombin kinetics of fibrinopeptides release from fibrinogen modified with the same set of reagents and found significantly decreased rate of both fibrinopeptides A and B release as compared with control sample [41]. It is well known that fibrinopeptide B cleavage occurs primarily from fibrin oligomers and fibrinogen/fibrin complexes [42] and enhances lateral aggregation. It seems that fibrin oligomer formation from modified fibrinogen molecules is hindered due to reagents action and therefore the resulting clots are made up of thinner fibers as compared with control samples.

We have found significantly decreased platelet adhesion on fibrinogen modified with MDA and significantly higher platelet adhesion on fibrinogen modified either with hypochlorite or with SIN-1. The variety of obtained

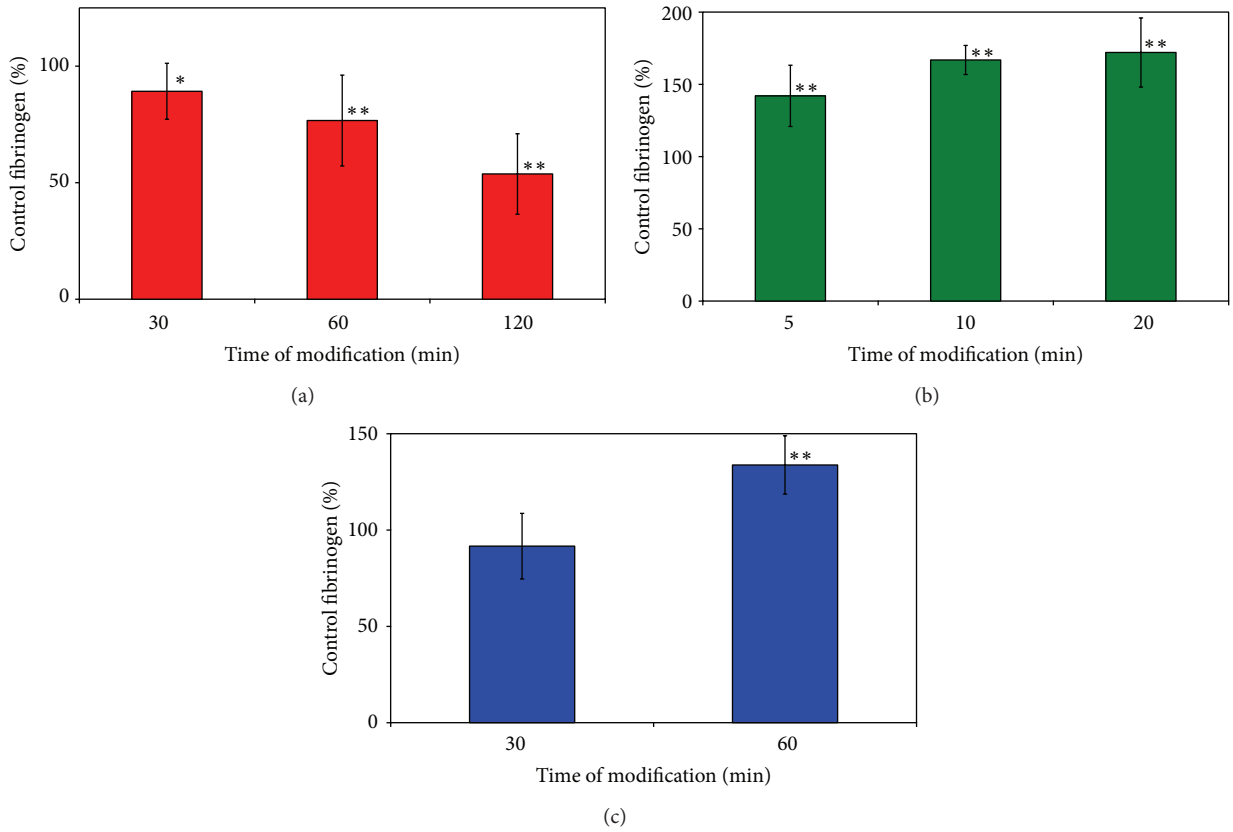


FIGURE 4: Dynamic adhesions (relative surface coverage) in the presence of control and modified fibrinogen. Fibrinogen (Fbg) modified by (a) MDA, (b) NaOCl, and (c) SIN-1. Data are expressed as a percentage of surface coverage in the presence of modified fibrinogens relatively to surface coverage in the presence of control fibrinogen. Results are represented as mean ± SD of nine values from three independent experiments (three values per experiment). Student's t-test probability: $^{*}P < 0.05$; $^{**}P < 0.01$.

adhesion results reflects differences in published prothrombotic/antithrombotic properties of oxidatively modified fibrinogen [1, 8, 9, 29] and suggests that the respective reagents differ in their effect on fibrin(ogen) properties. Reaction of fibrinogen with malondialdehyde results mainly in modification of ε-amino groups of lysyl residues. The cross-linking of fibrinogen by bifunctional malondialdehyde can involve not only reaction with monomer MDA molecules, but also reaction of MDA oligomers [43]. On the other hand, hypochlorite reactions with proteins form wide spectra of compounds: lysine chloramines from lysine residues, oxidation products of cystine/cysteine residues, methionine residues, tryptophan residues, and production of chlorotyrosine and dityrosine; fragmentation of proteins can also take place [44]. N-Chloramine derivatives can subsequently break down to form reactive aldehydes that can cause cross-linking of even partially fragmented fibrinogen. Therefore, the modification of fibrinogen with hypochlorite is much more complex as compared with MDA and due to nonspecific charge and hydrophobicity effects can enhance platelet adhesion. Importantly, the reaction of fibrinogen with hypochlorite was in our experiments much faster as compared with malondialdehyde. It seems that, in the complex reactions ongoing in living organisms at conditions of oxidation stress, the strong reagents (e.g., hypochlorite formed by myeloperoxidase) modify proteins (e.g. fibrinogen) faster and preferentially as compared with weaker reagents (e.g. MDA). Thus, the prothrombotic effects of prior fibrinogen modifications can make the antithrombotic effect of malondialdehyde-modified fibrinogen in real living systems prevail. Furthermore, MDA and other reactive aldehydes are formed as a consequence of lipid peroxidation mediated with hydroxyl radical formed, for example, by Haber-Weiss reaction. The ROS, like superoxide, peroxynitrite, and hypochlorite (strong reagents), have short half-life time and react immediately after their formation in the site of oxidative stress (e.g. inflammation) with proteins. In contrast, the aldehydes covalently modify proteins localized throughout the cell at a later time and relatively far away from the initial site of primary ROS formation. The observed decreased and slower production of fibrin network from modified fibrinogen molecules seems to cause antithrombotic effects as at first proposed by Shacter et al. [9]. Nevertheless, the changes in fibrin network properties produced by respective reagents can either support or weaken fibrin(ogen) interaction with platelets. Resulting effects not only depend on the changes in fibrinogen molecule but also vary with flow conditions in the experiment. Our experiments with SIN-1 modification of fibrinogen revealed that, at physiological shear rate ($1800\,s^{-1}$), the relatively small extent of carbonylation (as compared with both other

reagents) leads to the significant enhancement of dynamic platelet adhesion as compared with control sample. Thus, at physiological shear stress conditions, the SIN-1 fibrinogen modification had prothrombotic potential—in agreement with the results of Vadseth et al. [8].

As these experiments were performed in a matrix different from plasma, the results may not correspond to the *in vivo* conditions. Pieters et al. [45] stated in their work that plasma may buffer the negative effect of oxidative stress on fibrinogen molecule. Nevertheless, extended changes in the structure of fibrinogen molecule might be far beyond the plasma buffer capacity.

In conclusion, the oxidative modification of fibrinogen molecule has significant influence on its properties and depends on the intensity and time of the oxidative stress. Since the oxidative modification of proteins including fibrinogen depends on a complex of oxidative stress reactions, the *in vitro* modification with respective reagents is only an approximation of the real conditions. However, our results clearly stress the importance of oxidative fibrinogen changes in thrombotic episodes.

Abbreviations

ROS: Reactive oxygen species
RNS: Reactive nitrogen species
RONS: Reactive oxygen and nitrogen species
MDA: Malondialdehyde
NaOCl: Sodium hypochlorite
HOCl: Hypochlorous acid
PN: Peroxynitrite
SIN-1: 3-Morpholinosydnonimine
PBS: Phosphate buffer saline
TCA: Trichloroacetic acid
DNPH: Dinitrophenylhydrazine
ACD: Citric acid/citrate/dextrose
PRP: Platelet rich plasma
SEM: Scanning electron microscopy.

Conflict of Interests

The authors certify that there is no conflict of interests and that they have no affiliation with or financial involvement in any organization or entity with a direct financial interest in the subject matter or materials discussed in the paper.

Acknowledgments

This work was supported by the project of the Ministry of Health, Czech Republic, for conceptual development of research organization 00023736, by Grants from the Academy of Sciences, Czech Republic (P205/12/G118 and KAN200670701), and by ERDF OPPK CZ.2.16/3.1.00/24001.

References

[1] L. N. Paton, T. J. Mocatta, A. M. Richards, and C. C. Winterbourn, "Increased thrombin-induced polymerization of fibrinogen associated with high protein carbonyl levels in plasma from patients post myocardial infarction," *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 48, no. 2, pp. 223–229, 2010.

[2] N. Ashki, K. C. Hayes, and F. Bao, "The peroxynitrite donor 3-morpholinosydnonimine induces reversible changes in electrophysiological properties of neurons of the guinea-pig spinal cord," *Neuroscience*, vol. 156, no. 1, pp. 107–117, 2008.

[3] S. P. Heffron, I. Parastatidis, M. Cuchel et al., "Inflammation induces fibrinogen nitration in experimental human endotoxemia," *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 47, no. 8, pp. 1140–1146, 2009.

[4] E. Shacter, J. A. Williams, M. Lim, and R. L. Levine, "Differential susceptibility of plasma proteins to oxidative modification: examination by western blot immunoassay," *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 17, no. 5, pp. 429–437, 1994.

[5] J. W. Weisel, "Fibrinogen and fibrin," *Advances in Protein Chemistry*, vol. 70, pp. 247–299, 2005.

[6] M. W. Mosesson, "Fibrinogen and fibrin structure and functions," *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, vol. 3, no. 8, pp. 1894–1904, 2005.

[7] E. A. Ryan, L. F. Mockros, J. W. Weisel, and L. Lorand, "Structural origins of fibrin clot rheology," *Biophysical Journal*, vol. 77, no. 5, pp. 2813–2826, 1999.

[8] C. Vadseth, J. M. Souza, L. Thomson et al., "Pro-thrombotic state induced by post-translational modification of fibrinogen by reactive nitrogen species," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 279, no. 10, pp. 8820–8826, 2004.

[9] E. Shacter, J. A. Williams, and R. L. Levine, "Oxidative modification of fibrinogen inhibits thrombin-catalyzed clot formation," *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 18, no. 4, pp. 815–821, 1995.

[10] O. A. Azizova, A. P. Piryazev, A. V. Aseychev, and A. G. Shvachko, "Oxidative modification of fibrinogen inhibits its transformation into fibrin under the effect of thrombin," *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, vol. 147, no. 2, pp. 201–203, 2009.

[11] P. Nowak and B. Wachowicz, "Peroxynitrite-mediated modification of fibrinogen affects platelet aggregation and adhesion," *Platelets*, vol. 13, no. 5-6, pp. 293–299, 2002.

[12] M. A. Belisario, C. Di Domenico, A. Pelagalli, R. Della Morte, and N. Staiano, "Metal-ion catalyzed oxidation affects fibrinogen activity on platelet aggregation and adhesion," *Biochimie*, vol. 79, no. 7, pp. 449–455, 1997.

[13] S. Tetik, K. Kaya, M. Demir, E. Eksioglu-Demiralp, and T. Yardimci, "Oxidative modification of fibrinogen affects its binding activity to glycoprotein (GP) IIb/IIIa," *Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis*, vol. 16, no. 1, pp. 51–59, 2010.

[14] A. V. Aseychev, O. A. Azizova, L. V. Shulenina, and A. P. Piryazev, "Effect of oxidized fibrinogen on aggregation of activated platelets and neutrophils," *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, vol. 147, no. 3, pp. 312–318, 2009.

[15] O. A. Azizova, A. V. Aseichev, A. P. Piryazev, E. V. Roitman, and O. N. Shcheglovitova, "Effects of oxidized fibrinogen on the functions of blood cells, blood clotting, and rheology," *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, vol. 144, no. 3, pp. 397–407, 2007.

[16] F. Nielsen, B. B. Mikkelsen, J. B. Nielsen, H. R. Andersen, and P. Grandjean, "Plasma malondialdehyde as biomarker for oxidative stress: reference interval and effects of life-style factors," *Clinical Chemistry*, vol. 43, no. 7, pp. 1209–1214, 1997.

[17] C. L. Hawkins and M. J. Davies, "Hypochlorite-induced damage to proteins: formation of nitrogen-centred radicals from lysine

residues and their role in protein fragmentation," *Biochemical Journal*, vol. 332, no. 3, pp. 617–625, 1998.

[18] L. J. Hazell and R. Stocker, "Oxidation of low-density lipoprotein with hypochlorite causes transformation of the lipoprotein into a high-uptake form for macrophages," *Biochemical Journal*, vol. 290, no. 1, pp. 165–172, 1993.

[19] P. Nowak, H. M. Zbikowska, M. Ponczek, J. Kolodziejczyk, and B. Wachowicz, "Different vulnerability of fibrinogen subunits to oxidative/nitrative modifications induced by peroxynitrite: functional consequences," *Thrombosis Research*, vol. 121, no. 2, pp. 163–174, 2007.

[20] H. Ischiropoulos and A. B. Al-Mehdi, "Peroxynitrite-mediated oxidative protein modifications," *FEBS Letters*, vol. 364, no. 3, pp. 279–282, 1995.

[21] G. Lupidi, M. Angeletti, A. M. Eleuteri, L. Tacconi, M. Coletta, and E. Fioretti, "Peroxynitrite-mediated oxidation of fibrinogen inhibits clot formation," *FEBS Letters*, vol. 462, no. 3, pp. 236–240, 1999.

[22] H. A. Headlam and M. J. Davies, "Markers of protein oxidation: different oxidants give rise to variable yields of bound and released carbonyl products," *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 36, no. 9, pp. 1175–1184, 2004.

[23] T. Libondi, R. Ragone, D. Vincenti, P. Stiuso, G. Auricchio, and G. Colonna, "In vitro cross-linking of calf lens α-crystallin by malondialdehyde," *International Journal of Peptide and Protein Research*, vol. 44, no. 4, pp. 342–347, 1994.

[24] J. Carrell Morris, "The acid ionization constant of HOCl from 5 to 35°," *Journal of Physical Chemistry*, vol. 70, no. 12, pp. 3798–3805, 1966.

[25] T. Riedel, E. Brynda, J. E. Dyr, and M. Houska, "Controlled preparation of thin fibrin films immobilized at solid surfaces," *Journal of Biomedical Materials Research A*, vol. 88, no. 2, pp. 437–447, 2009.

[26] P. Bellavite, G. Andrioli, P. Guzzo et al., "A colorimetric method for the measurement of platelet adhesion in microtiter plates," *Analytical Biochemistry*, vol. 216, no. 2, pp. 444–450, 1994.

[27] M. Vaníčková, J. Suttnar, and J. E. Dyr, "The adhesion of blood platelets on fibrinogen surface: comparison of two biochemical microplate assays," *Platelets*, vol. 17, no. 7, pp. 470–476, 2006.

[28] A. Sobotková, L. Mášová-Chrastinová, J. Suttnar et al., "Antioxidant change platelet responses to various stimulating events," *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 47, no. 12, pp. 1707–1714, 2009.

[29] G. R. Upchurch Jr., N. Ramdev, M. T. Walsh, and J. Loscalzo, "Prothrombotic consequences of the oxidation of fibrinogen and their inhibition by aspirin," *Journal of Thrombosis and Thrombolysis*, vol. 5, no. 1, pp. 9–14, 1998.

[30] S. Tetik, K. Kaya, and T. Yardimci, "Effect of oxidized fibrinogen on hemostatic system: in vitro study," *Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis*, vol. 17, no. 3, pp. 259–263, 2011.

[31] J. Templar, S. P. Kon, T. P. Milligan, D. J. Newman, and M. J. Raftery, "Increased plasma malondialdehyde levels in glomerular disease as determined by a fully validated HPLC method," *Nephrology Dialysis Transplantation*, vol. 14, no. 4, pp. 946–951, 1999.

[32] S. Massberg, G. Enders, F. C. M. de Matos et al., "Fibrinogen deposition at the postischemic vessel wall promotes platelet adhesion during ischemia-reperfusion in vivo," *Blood*, vol. 94, no. 11, pp. 3829–3838, 1999.

[33] U. Panzenboeck, S. Raitmayer, H. Reicher et al., "Effects of reagent and enzymatically generated hypochlorite on physicochemical and metabolic properties of high density lipoproteins," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 272, no. 47, pp. 29711–29720, 1997.

[34] C. Szabó, H. Ischiropoulos, and R. Radi, "Peroxynitrite: biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics," *Nature Reviews Drug Discovery*, vol. 6, no. 8, pp. 662–680, 2007.

[35] C. Mallozzi, A. M. M. Di Stasi, and M. Minetti, "Peroxynitrite modulates tyrosine-dependent signal transduction pathway of human erythrocyte band 3," *FASEB Journal*, vol. 11, no. 14, pp. 1281–1290, 1997.

[36] A. U. Khan and M. Kasha, "Singlet molecular oxygen evolution upon simple acidification of aqueous hypochlorite: application to studies on the deleterious health effects of chlorinated drinking water," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 91, no. 26, pp. 12362–12364, 1994.

[37] T. W. Stief, J. Kurz, M. O. Doss, and J. Fareed, "Singlet oxygen inactivates fibrinogen, factor V, factor VIII, factor X, and platelet aggregation of human blood," *Thrombosis Research*, vol. 97, no. 6, pp. 473–480, 2000.

[38] T. W. Stief, V. Kretschmer, B. Kosche, M. O. Doss, and H. Renz, "Thrombin converts singlet oxygen ($1O_2$)-oxidized fibrinogen into a soluble t-PA cofactor. A new method for preparing a stimulator for functional t-PA assays," *Annals of Hematology*, vol. 80, no. 4, pp. 189–194, 2001.

[39] A. Suontaka, M. Blombäck, and J. Chapman, "Changes in functional activities of plasma fibrinogen after treatment with methylene blue and red light," *Transfusion*, vol. 43, no. 5, pp. 568–575, 2003.

[40] G. R. Martinez, P. Di Mascio, M. G. Bonini et al., "Peroxynitrite does not decompose to singlet oxygen ($1DgO_2$) and nitroxyl (NO_2)," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 97, no. 19, pp. 10307–10312, 2000.

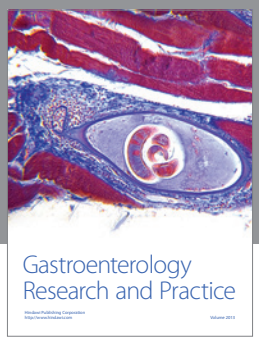
[41] J. Stikarova, J. Suttnar, Z. Reicheltova et al., "The effect of oxidative stress on fibrinogen and its physiological functions," *FEBS Journal*, vol. 276, supplement 1, p. S166, 2009.

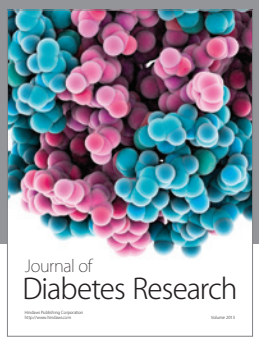
[42] T. Riedel, J. Suttnar, E. Brynda, M. Houska, L. Medved, and J. E. Dyr, "Fibrinopeptides A and B release in the process of surface fibrin formation," *Blood*, vol. 117, no. 5, pp. 1700–1706, 2011.

[43] J. M. C. Gutteridge, "The use of standards for malonyldialdehyde," *Analytical Biochemistry*, vol. 69, no. 2, pp. 518–526, 1975.

[44] R. T. Dean, S. Fu, R. Stocker, and M. J. Davies, "Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation," *Biochemical Journal*, vol. 324, no. 1, pp. 1–18, 1997.

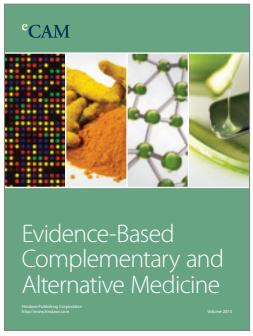
[45] M. Pieters, N. Covic, F. H. van der Westhuizen et al., "Glycaemic control improves fibrin network characteristics in type 2 diabetes—a purified fibrinogen model," *Thrombosis and Haemostasis*, vol. 99, no. 4, pp. 691–700, 2008.

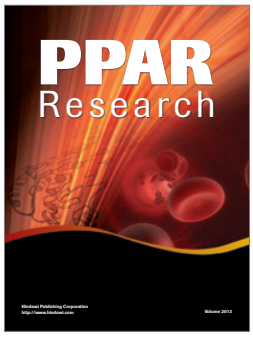


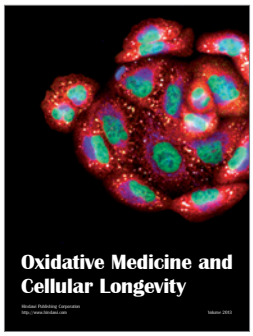


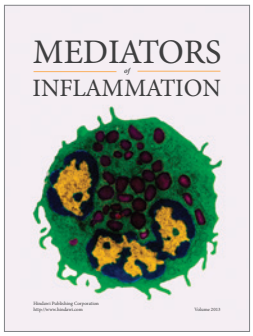
Hindawi

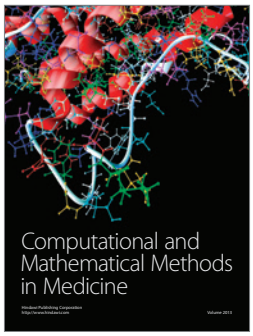
Submit your manuscripts at
http://www.hindawi.com

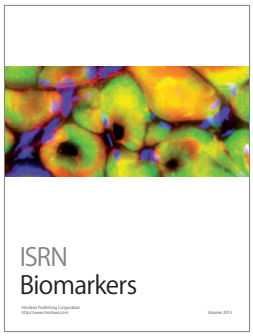


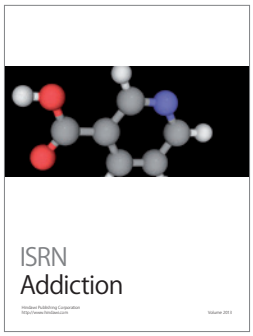


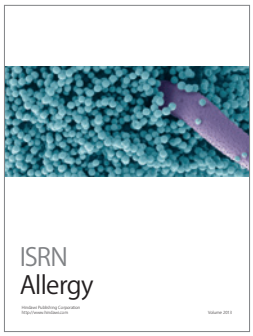












Příloha 5

Štikarová J., Suttnar J., Pimková K., Mášová-Chrastinová L., Čermák J., Dyr J. E.

Enhanced levels of asymmetric dimethylarginine in a serum of middle age patients with myelodysplastic syndrome

J Hematol Oncol. 2013 Aug 19;6(1):58..

JOURNAL OF HEMATOLOGY & ONCOLOGY

LETTER TO THE EDITOR Open Access

Enhanced levels of asymmetric dimethylarginine in a serum of middle age patients with myelodysplastic syndrome

Jana Štikarová, Jiří Suttnar*, Kristýna Pimková, Leona Chrastinová-Mášová, Jaroslav Čermák and Jan E Dyr

Abstract

Myelodysplastic syndromes (MDS) are hematological malignancies of unclear etiology where oxidative stress may contribute to the pathogenesis. Methylarginines, naturally occurring inhibitors of NO synthase, can increase superoxide generation from uncoupled NO synthase. We found significant increase in concentrations of asymmetric dimethylarginine (0.84 ± 0.32 μmol/L, $p = 0.0022$) and malondialdehyde (0.77 ± 0.11 μmol/L, $p < 0.001$) in sera of MDS patients vs controls (asymmetric dimethylarginine: 0.56 ± 0.16 μmol/L, malondialdehyde: 0.52 ± 0.07 μmol/L). On the contrary, nitrites concentrations were significantly decreased in MDS patients (1.71 ± 0.46 μmol/L, $p = 0.0028$) vs controls (2.16 ± 0.38 μmol/L). We suppose that the oxidative stress in MDS is enhanced due to methylated arginines influence on NO synthase activity impairment.

To the editor

Myelodysplastic syndromes (MDS) are a heterogeneous group of clonal hematological disorders, characterized by ineffective hematopoiesis and a high risk of transformation into acute myeloid leukemia. It has been determined that oxidative stress plays a role in the initialization and disease progression [1]. The reactive oxygen species may oxidize tetrahydrobiopterin resulting into nitric oxide synthase (NOS) uncoupling and preferential formation to superoxide anion radical. It was found that methylarginines (asymmetric dimethylarginine - ADMA, N^G-monomethyl-L-arginine - MMA and symmetric dimethylarginine - SDMA), naturally occurring inhibitors of NOS [2], can profoundly increase superoxide generation from uncoupled NOS [3]. Free methylated arginines, capable of inhibiting NOS [4], are formed exclusively by the sequence of methylation of arginine residues of proteins, followed by proteolysis of these proteins. Protein arginine methylation is in mammalian cells carried out by protein arginine methyltransferases (PRMTs); many of them show links to cancer [5].

The subjects of the study are characterized in Table 1. Ethics approval (Ethics Committee of the Institute of Hematology and Blood Transfusion) and informed consent from all subjects were obtained. Serum concentration of oxidative stress marker malondialdehyde (MDA) was estimated using liquid chromatography (Shimadzu, Tokyo, Japan) of its thiobarbituric acid derivative [6]. Methylated arginines were analyzed using HILIC chromatography with MS/MS detection (ABSciex, Framingham, USA) [7]. Nitrites were assayed by chromatography using the fluorescent reaction product with 2,3-diaminonaphthalene [8].

The concentrations of methylated arginine derivatives, malondialdehyde and nitrites are summarized in the Table 2. We found significantly increased serum concentrations of ADMA, SDMA, MMA, and MDA in sera of MDS patients as compared with healthy donors. The nitrites concentrations were significantly decreased in sera

* Correspondence: Jiri.Suttnar@uhkt.cz
Institute of Hematology and Blood Transfusion, U Nemocnice 1, 128 20, Prague, Czech Republic

BioMed Central

© 2013 Štikarová et al.; licensee BioMed Central Ltd. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/by/2.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Table 1 Baseline characteristics of MDS patients and healthy controls

	MDS	Controls
[a]Age (years)	43.7 (33–59)	44.3 (37–67)
Male/Female	11/9	8/8
[a]Serum iron [μmol/L]	22.3 (11.4-43.3)	[b]8.5-28
[a]Serum ferritin [μg/L]	641.2 (8.9-1907.3)	[b]15-150

[a]The data are depicted as averages with ranges. [b]Reference interval.

Table 2 Concentrations of methylated arginines in sera of MDS patients and healthy controls

	MDS	Controls	[a]p
ADMA [μmol/L]	0.84 ± 0.32	0.56 ± 0.16	0.0022**
SDMA [μmol/L]	0.54 ± 0.18	0.42 ± 0.14	0.0361*
MMA [μmol/L]	0.14 ± 0.05	0.10 ± 0.03	0.033*
Homoarginine [μmol/L]	1.77 ± 1.06	2.32 ± 1.26	0.1777
Citrulline [μmol/L]	46.68 ± 14.96	42.19 ± 12.31	0.3298
MDA [μmol/L]	0.77 ± 0.11	0.52 ± 0.07	<0.001***
Nitrites [μmol/L]	1.71 ± 0.46	2.16 ± 0.38	0.0028**

The data are represented as averages ± SD. ADMA, N^G, N^G-dimethyl-L-arginine; MMA, N^G-monomethyl-L-arginine; SDMA, N^G,$N^{G'}$-dimethyl-L-arginine; MDA, malondialdehyde. [a]Two-tailed *t*-test was used to compare measured concentrations of analytes in MDS patients with healthy donors. Statistical significance coding: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$.

of MDS patients as compared with controls. The concentration of ADMA strongly positively correlated with concentration of MMA ($r = 0.87$, $p < 0.001$) and SDMA ($r = 0.70$, $p < 0.001$). ADMA concentration moderately positively correlated with MDA concentration ($r = 0.50$, $p = 0.006$).

Our results showed significantly increased oxidative stress even in MDS patients characterized by moderately enhanced iron and serum transferrin concentrations. Resulting shift of overexpressed [9] NO synthase activity in favour of superoxide production at the expense of nitric oxide synthesis (reflected by nitrites concentrations [10]) was further augmented at the presence of methylated arginines. Therefore, oxidative stress in MDS patients could be explained by a positive feedback of both superoxide and methylated arginines on original NOS activity impairment. Moreover, recently proposed PRMT-specific inhibitors [11] might have a therapeutic effect on leukemia also by oxidative stress reduction.

Abbreviations

MDS: Myelodysplastic syndromes; NOS: Nitric oxide synthase; ADMA: N^G, N^G-dimethyl-L-arginine; MMA: N^G-monomethyl-L-arginine; SDMA: N^G, $N^{G'}$-dimethyl-L-arginine; MDA: Malondialdehyde; PRMT: protein arginine methyltransferase.

Competing interest

The authors indicated no potential conflicts of interest.

Authors' contributions

JŠ performed LC-MS/MS analysis of methylated derivatives of arginine. JS participated on LC-MS/MS analysis of methylated derivatives of arginine, carried out data analysis and interpretation and wrote the manuscript. KP and LCM performed malondialdehyde and nitrite analysis. JČ provided clinical data and patient samples. JED conceived of the study and wrote the manuscript. Final approval of the manuscript: All the co-authors. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgement

This work was supported by Grant CZ.2.16/3.1.00/24001 of the EU ERDF OPPK, by P205/12/G118 of Centrum Excellence, by Grant KAN200670701 from the Academy of Sciences, Czech Republic and by the Ministry of Health, Czech Republic project for the conceptual development of research organization, VZ MZ 00002373601 IHBT.

Received: 17 July 2013 Accepted: 17 August 2013
Published: 19 August 2013

References

1. Farquhar MJ, Bowen DT: **Oxidative stress and the myelodysplastic syndromes.** *Int J Hematol* 2003, **77:**342–350.
2. Leiper J, Vallance P: **Biological significance of endogenous methylarginines that inhibit nitric oxide synthases.** *Cardiovasc Res* 1999, **43:**542–548.
3. Druhan LJ, Forbes SP, Pope AJ, Chen CA, Zweier JL, Cardounel AJ: **Regulation of eNOS-derived superoxide by endogenous methylarginines.** *Biochemistry* 2008, **47:**7256–7263.
4. Teerlink T: **ADMA metabolism and clearance.** *Vasc Med* 2005, **10:**S73–S81.
5. Yang Y, Bedford MT: **Protein arginine methyltransferases and cancer.** *Nat Rev Cancer* 2013, **13:**37–50.
6. Suttnar J, Masova L, Dyr JE: **Influence of citrate and EDTA anticoagulants on plasma malondialdehyde concentrations estimated by high-performance liquid chromatography.** *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 2001, **751:**193–197.
7. Martens-Lobenhoffer J, Bode-Boger SM: **Fast and Efficient Determination of Arginine, Symmetric Dimethylarginine, and Asymmetric Dimethylarginine in Biological Fluids by Hydrophilic-Interaction Liquid Chromatography– Electrospray Tandem Mass Spectrometry.** *Clin Chem* 2006, **52:**3488–3493.
8. Li H, Meininger CJ, Wu G: **Rapid determination of nitrite by reversed-phase high-performance liquid chromatography with fluorescence detection.** *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 2000, **746:**199–207.
9. Kitagawa M, Takahashi M, Yamaguchi S, Inoue M, Ogawa S, Hirokawa K, Kamiyama R: **Expression of inducible nitric oxide synthase (NOS) in bone marrow cells of myelodysplastic syndromes.** *Leukemia* 1999, **13:**699–703.
10. Lauer T, Preik M, Rassaf T, Strauer BE, Deussen A, Feelisch M, Kelm M: **Plasma nitrite rather than nitrate reflects regional endothelial nitric oxide synthase activity but lacks intrinsic vasodilator action.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001, **98:**12814–12819.
11. Copeland RA, Solomon ME, Richon VM: **Protein methyltransferases as a target class for drug discovery.** *Nat Rev Drug Discov* 2009, **8:**724–732.

doi:10.1186/1756-8722-6-58
Cite this article as: Štikarová *et al.*: Enhanced levels of asymmetric dimethylarginine in a serum of middle age patients with myelodysplastic syndrome. *Journal of Hematology & Oncology* 2013 **6**:58.

Příloha 6

Pimková K., Chrastinová L., Suttnar J., Štikarová J., Kotlín R., Čermák J., Dyr J. E.

Plasma oxidative status in myelodysplastic syndromes in the context of clinical outcomes, and as a consequence of iron overload

Plasma oxidative status in myelodysplastic syndromes in the context of clinical outcomes, and as a consequence of iron overload

Short title: Oxidative stress and iron overload in MDS

Kristýna Pimková [1], Dr. Leona Chrastinová [1], Dr. Jiří Suttnar [1], Jana Štikarová [1], Roman Kotlín [1], Dr. Jaroslav Čermák [2], Prof. Jan Evangelista Dyr [1]

[1] *Department of Biochemistry, Institute of Hematology and Blood Transfusion, U Nemocnice 1, 128 00 Prague 2, Czech Republic*

[2] *Clinical Department, Institute of Hematology and Blood Transfusion, U Nemocnice 1, 128 00 Prague 2, Czech Republic*

Corresponding author:

Mgr. Kristyna Pimkova, Institute of Hematology and Blood Transfusion, U Nemocnice 1, 128 20 Prague 2, Czech Republic, jan.dyr@uhkt.cz, phone number +420221977208, fax number +420221977208

Abstract

The role of oxidative stress in the initiation and progression of myelodysplastic syndromes (MDS) as a consequence of iron overload remains unclear. In this study we have simultaneously quantified plasma low-molecular-weight aminothiols, malondialdehyde (MDA), nitrite, and nitrate; and have studied their correlation with iron/ferritin levels, patient treatment (chelatation therapy) and clinical outcomes.

We found significantly elevated plasma levels of total and oxidized form of cysteine ($P<0.001$), homocysteine ($P<0.001$), and cysteinylglycine ($P<0.006$) and significantly depressed levels of total, oxidized and oxidized glutathione ($P<0.03$) and nitrite ($P<0.001$) in MDS patients compared to healthy donors. Moreover total ($P=0.032$) and oxidized cysteinylglycine ($P=0.029$) and nitrite ($P=0.021$) differed significantly between the analyzed MDS subgroups with different clinical classifications. MDA levels correlated strongly with both ferritin levels (r=0.78, p=0.001) and free iron levels (r=0.60, $P=0.001$) and were significantly higher in patients with iron overload. The other analyzed compounds lacked correlation with iron overload (represented by iron/ferritin levels).

For the first time our results have revealed significant differences in the concentrations of plasma aminothiols in MDS patients, when compared to healthy donors. We found no correlation of these parameters with iron overload and suggest the role of oxidative stress in the development of MDS disease.

Keywords

Myelodysplastic Syndromes, Nitrite, Cysteinylglycine, Oxidative Stress, Gamma-Glutamyl transferase, Iron Overload

Introduction

Myelodysplastic syndromes (MDS) are a heterogeneous group of clonal hematological disorders, characterized by ineffective hematopoiesis and a high risk of transformation into acute myeloid leukemia (AML). Although the origin of MDS development is not fully understood, it has been determined that oxidative stress plays an important role in the initialization and disease progression of MDS [1].

One of the suggested mechanisms causing oxidative stress in MDS is attributed to a non-transferrin-bound iron (NTBI or free iron), which has been found in higher levels in the early stages of MDS patients receiving frequent red blood cell (RBC) transfusions [2]. Several studies have found elevated levels of oxidative stress markers in MDS patients and their correlation with serum ferritin levels [3, 4]. However, increased oxidative stress was revealed, even in the patients not receiving transfusions [5]. The presence of several other oxidative stress markers has been described in patients with established MDS, independent of iron or ferritin levels [6-8].

Oxidative stress – the imbalance in pro-oxidative and anti-oxidative processes, in favour of the first – acts through reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS). Oxidative status is reflected in blood plasma by actors of oxidative stress (free radicals and its metabolites), their products such as modified biomacromolecules, products of lipid peroxidation (malondialdehyde, 4-hydroxynonenal), and by changes in the concentration of compounds involved in antioxidant defense (enzymes, macromolecular and low molecular weight antioxidants, e.g. aminothiols).

Simultaneous determination is necessary of plasma oxidative stress actors, their products, and antioxidant defense molecules to investigate their role in the pathogenesis of human diseases associated with oxidative stress, such as MDS. The only work simultaneously evaluating oxidative stress markers and antioxidant defense molecules was done by Ghoti et al. in blood cells, however to the best of our knowledge we have not found any work evaluating oxidative stress markers and antioxidant defense molecules in plasma of MDS patients, and their relationships with each other and with iron and ferritin levels.

The aim of this study has been to assess the oxidative status of MDS patients and healthy donors by the evaluation of levels of plasma total, oxidized and reduced forms of aminothiols: glutathione (GSH), cysteine (Cys), cysteinylglycine (CG), and homocysteine (Hcys); malondialdehyde (MDA), nitrite (NO_2^-), and nitrate (NO_3^-; and to estimate their relationship with serum iron/ferritin levels and clinical outcomes in MDS patients.

Materials and methods

Materials and reagents

All chemicals were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) unless otherwise specified. All reagents employed were of analytical grade or higher purity, and all aqueous solutions were prepared using HPLC-grade water.

Blood plasma samples

Blood samples were retrospectively collected from 61 patients with MDS, diagnosed at the Institute of Hematology and Blood Transfusion, Prague, Czech Republic, and from 23 healthy volunteers. None of the patients had received any specific therapeutic agents prior to the study. All individuals tested agreed to the study at the time of blood collection. All samples were obtained in accordance with the Ethical Committee regulations of the Institute of Hematology and Blood Transfusion, Prague; and with a release of informed consent. Blood samples were drawn from patients and controls in a vacutainer tube containing EDTA for plasma, or containing beads coated with a clotting activator for serum; the tubes were immediately cooled on an ice bag and centrifuged as soon as possible at 4000 g, 5 min, 4 °C. Serum and plasma samples were stored in the dark at -70 °C until the analysis.

Diagnoses were made according to the 2008 WHO classification system. Patients with unclassified MDS, Fanconi anemia, chronic myeloid leukemia, autoimmune thrombocytopenia, and congenital anemia have been excluded from the analysis. Thus, the following categories were considered: refractory anemia (RA), MDS with isolated del(5q) (RA-5q), refractory anemia with ringed sideroblasts (RARS), refractory

cytopenia with multilineage dysplasia (RCMD), RCMD with ringed sideroblasts (RCMD-RS), RCMD with 5q deletion (RCMD-5q), RCMD with reactive monocytes, RA with an excess of blasts-1 (RAEB-1), RA with an excess of blasts-2 (RAEB-2), RA with an excess of blasts in transformation (RAEB-T), myelodysplastic/myeloproliferative syndromes (MDS/MPS), MDS/MPS with 5q deletion, acute myeloid leukemia (AML M2), and MDS-RAEB1 plus SC-non-Hodgkin lymphoma. In our study there were 19 patients with cardiovascular event and 28 patients with hypertension.

All the healthy subjects enrolled in this study were asymptomatic and none of them had any abnormality on physical examination and routine blood laboratory tests. No one was taking medication, smoked or drank alcohol, and all gave informed written consent before participating in this study.

Ferritin, iron, and gamma-glutamyltransferase

Ferritin, iron (Fe), and gamma-glutamyltransferase (GGT) plasma levels were estimated in healthy controls and MDS patients in the central national biochemical laboratory in the Institute of Hematology and Blood Transfusion. Values of ferritin, iron, and GGT in healthy donors fall within the limits of the reference interval.

Measurement of total and reduced forms of thiols (cysteine, homocysteine, glutathione, cysteinylglycine)

60 µl of plasma sample or standards was mixed with 60 µl of PBS and 15µl of 10 % tris(2-carboxyethyl)phosphine (w/v) for total levels of thiols (sum of their reduced and oxidized forms in plasma, including thiols covalently bound to plasma proteins) and 75 µl of PBS for reduced forms of thiols. Both mixtures were incubated at 25 °C for 30 min and deproteinized by the addition of 135 µL of 10 % trichloracetic acid with 2 mM EDTA, followed by centrifugation (15 000 x g, 15 min, 10 °C). To 50 µL of supernatant, 125 µL of 125 mM borate buffer (pH 9.5) with 4 mM EDTA was added, followed by the addition of 15 µL of 1.5 M NaOH and 50 µL of 0.1 % ammonium 7-fluorobenzofurazan-4-sulfonate (w/v). The reaction mixture was incubated at 60 °C in darkness for 60 min and filtered through 0.2 µm cellulose filters (National Scientific, Rockwood, TN, USA). Chromatographic conditions were used according to Garcia [9],

with several modifications using a High Performance Liquid Chromatographic system (HPLC) (Shimadzu, Tokyo, Japan). A 20 µL aliquot was injected onto a LUNA C18 (2) column (150x3 mm, 5 µm) (Phenomenex, Torrance, CA, USA) and separated at 40 °C. The mobile phase was composed of 0.1 M H_3PO_4 adjusted to pH 2.1 with KOH (A) and 10 % methanol buffer A (B). Elution of the thiol- benzofurazan-4-sulfonate derivatives was performed with a gradient system (t (min) / % B: 0/0, 7/0, 7.1/100, 10/100, 10.1/0) at a flow rate of 1 mL/min. The fluorescence signal of excitation was measured at 385 nm and of emission at 515 nm.

Measurement of nitrite

Nitrite standards and samples were prepared as previously described by Li et al. [10]. Briefly, 200 µL of nitrite standard KNO2 (0-625 nM) or a patient sample (10x diluted and ultrafiltered plasma sample) were incubated at 25 °C with 20 µL 316 mM 2,3-diaminonaphtalene (in 0.62 M HCl) for 10 min, followed by the addition of 8 µL of triethylamine. This reaction mixture was deproteinized with acetonitrile 1:1, centrifuged (17 000 x g, 4 min), and filtered through a 0.2 µm cellulose filter (National Scientific). 150 µL of the filtered solution was used directly for the chromatographic separation of reaction product 2, 3-naphtotriazole. Chromatographic conditions were used as described by Woitzik et al. [11] with minor changes using a HPLC system (Shimadzu). A 10 µL aliquot of the sample was injected onto a Luna C18 (2) column (150x3 mm, 5 µm) (Phenomenex). The mobile phase consisted of 30 % acetonitrile in 30 mM of phosphate buffer, adjusted to pH 8 with triethylamine. Fluorescence was monitored with excitation at 375 nm and emission at 415 nm, with separations performed at 45 °C.

Measurement of nitrate

Nitrate were determined according to Davies *et al.* [12] by capillary electrophoresis with UV detection at 214 nm (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA), performed at 25 °C with small changes. The components were separated using a -10 kV voltage; reverse electroosmotic flow was used. The separation of samples took place in a fused silica capillary tube (50 µm diameter by 40 cm to the detector), in a buffer consisting of 150 mM NaCl/5 mM Tris-HCl, pH 7.4 and 2 mM tetradecyltrimethylammonium hydroxide (TTAH). TTAH was prepared from a tetradecyltrimethylammonium

bromide solution by passing it through a strong anion exchange cartridge (Phenomenex), which replaced the bromide ions with hydroxide ions. The capillary tube was rinsed before each injection with 0.1 M NaOH and a separation buffer for 1 min and 2 min, respectively. Plasma samples were centrifuged (17 000 x g, 4 min, 25 °C), filtered through a 0.2 µm cellulose filter (National Scientific), and sonicated. The linearity of the assay was determined by preparing aqueous solutions containing 0.39 µM - 500 µM KNO_3.

Measurement of malondialdehyde

Standard and plasma samples were prepared as in our previous study [13]. 100 µL of a plasma or standard sample (0-10 µM) was mixed with 12.5 µL of 100 mM EDTA in 2 % NaOH (w/v), 12.5 µl of H_2O or MDA standards, and 125 µL of 10 mM 2,6-ditert-butyl-4-methylphenol in acetonitrile. The mixture was incubated at 60 °C for 30 min. Samples were centrifuged (17 000 x g, 10 min). To 75 µL of the supernatant, a total of 300 µL of 25 mM 2-thiobarbituric acid in 2 M CH_3COOH was added (pH 3) and incubated at 100 °C for 60 min. Separations were carried out on a 5 µm reversed-phase C18 Gemini NX column (150x2 mm) (Phenomenex) at 25 °C using a HPLC system (Shimadzu), as was described in our previous work [13]. Elution of the MDA derivative with 2-thiobarbituric acid was performed isocratically with 35 % MeOH in 50 mM of NH_4HCO_3 buffer, adjusted to pH 9.3 with NH_4OH at a flow rate of 0.25 mL/min, with UV-Vis detection at 532 nm.

Statistical analysis

Data are presented as means ± standard deviation (SD) and as a range. A two-tail, two sample student t-test was used to compare MDS patients with healthy donors. One-way ANOVA was computed to examine the differences across all groups (MDS, healthy controls). *Post hoc* analyses using Duncan homogeneous subsets were performed for cases in which the main effect was significant. A Pearson correlation test was used for the normally distributed data, and a Spearson rank correlation test for nonparametric data. All tests for statistical significance were standardized at an alpha level of $P<0.05$.

All methods used were performed according standard operating procedures (SOP) validated and verified. The methods have been optimized and validated for selectivity,

precision, and recovery using an internal quality control. All of the tested compounds analyzed by chromatography methods had linearity of >98%, with relative standard deviation <10% in terms of variation of retention time. Interday and intraday variability was <5%.

Results

Oxidative stress parameters in MDS patients vs. healthy donors

Plasma levels of total, oxidized and reduced forms of aminothiols – cysteine, homocysteine and cysteinylglycine – were elevated in the plasma of all MDS patients, when compared with healthy controls using a two-tailed, two sample student t-test. Conversely, plasma levels of total (t-GSH) and oxidized (ox-GSH) form of glutathione and nitrite were significantly depressed in all MDS patients, comparing with healthy donors. We did not observe any significant differences between MDS patients and healthy donors in plasma levels of malondialdehyde and nitrate. Ferritin levels exceeded the upper limit of the reference interval. The means of free iron levels were in the reference interval and levels of gamma-glutamyltransferase were at the upper limit edge of the reference interval in all MDS patients. Data are shown in Table 1 (data of thiols are shown for total forms, other forms of thiols are presented in supplement table).

Oxidative stress parameters in MDS patients in the context of clinical outcomes

Subsequently, MDS patients were divided into four study groups (1-4) according to their common clinical and diagnostic outcomes (Table 2). The groups were compared with each other and with a group of healthy donors (0). Table 2 provides an overview of the groups analyzed in the presented study. ANOVA was used to test for significant differences in the means of measured compound concentrations between the analyzed groups. As shown in Table 3, significant differences were observed between the analyzed groups for total CG (t-CG) (P=0.032) and for nitrite (P=0.021). Oxidized CG (ox-CG) also significantly differed between groups (P=0.029). Using *post hoc* ANOVA tests (Duncan) we ascertained that the levels of t-CG (Fig. 1) and ox-CG were significantly higher in group 1 of MDS patients, with respect to healthy donors

and group 4. The same *post hoc* test showed the levels of nitrite significantly lower in all MDS subgroups as compared to the healthy controls (Fig. 2).

Plasma levels of all forms of cysteine were also higher in all MDS subgroups, as compared to the healthy donors. The highest plasma levels were found mostly in groups 1 and 2, respectively. Total, oxidized and reduced glutathione concentration tended to be lower in all MDS patients, as compared to the healthy donors; however, there was not a statistical significance between the groups. The levels of malondialdehyde were higher in groups 1 and 3, as compared with healthy donors; but these data differences were also not statistically significant. Plasma levels of nitrate in groups 0, 1, and 2 were approximately the same; lower values were observed in groups 3 and 4, with the lowest value in group 4; yet they still did not differ significantly. Levels of free iron and plasma ferritin did not differ significantly between the MDS groups.

Using a Pearson correlation test, a strong positive correlation was found between all forms of evaluated thiols. Moreover reduced Cys (red-Cys) correlated moderately with t-CG (r=0.40, *P*=0.001) and strongly with reduced CG (red-CG) (r=0.77, *P*=0.001). A strong correlation between the levels of t-CG and t-GSH (r=0.65, *P*=0.001) (Fig. 3) and moderate correlation between both ox-CG (r=0.48, *P*=0,001) and red-CG (r=0.39, *P*=0,001) and t-GSH was found. Moreover, a moderate negative correlation was found between the concentrations of all forms of CG: t-CG (r=-0.41, *P*=0.005), ox-CG (r=-0.40, *P*=0,001), red-CG (r=-0.49, *P*=0,001); and nitrite (Fig. 4).

Oxidative stress parameters in MDS patients in the context of iron overload

Patients were divided according to the possible risk of iron overload (high iron and ferritin levels) into a group of patients requiring chelation therapy (CH) (16) and a group of patients not requiring chelation therapy (non-CH) (30). Applying a two-tailed, two sample student t-test, we estimated that the levels of free iron (*P*=0.001) and ferritin (*P*=0.006) were significantly higher in the CH group. However, no significant differences in aminothiol and NOx compound levels were found between these two groups. MDA concentrations were significantly higher in the group requiring chelation therapy (*P*=0.001). Furthermore, we compared analyzed compounds in

patients regularly receiving blood transfusions (T) with patients who were not receiving blood transfusions (non-T). We found significantly higher levels of free iron (p=0.004) and malondialdehyde (*P*=0.013) in group T of patients. No significant differences were found between the groups for the other analyzed compounds.

Our data showed that while a lack of correlation was found between plasma oxidative stress parameters (aminothiols, NOx compounds) and plasma iron levels/ferritin levels, malondialdehyde correlated strongly with both free iron levels (r=0.60, *P*=0.001) (Fig. 5) and ferritin levels (r=0.78, *P*=0.001) (Fig.6).

Discussion

Our results originally revealed that plasma concentrations of total, oxidized and reduced forms of cysteine, homocysteine, and cysteinylglycine were significantly elevated in MDS patients vs. healthy donors; conversely, plasma levels of total and oxidized glutathione and nitrite were significantly depressed in MDS patients compared to the control group. Moreover, significant concentration differences of nitrite, t-CG and ox-CG were found between the clinical subgroups of MDS patients and the controls. We also found that patients requiring chelation therapy and those receiving transfusions had significantly higher levels of both malondialdehyde and free iron, whereas aminothiols and NOx compounds did not differ between these groups and the compared patient groups not requiring chelation treatment or the non-transfused patients. The question arises of what is the cause and significance of these newly elucidated findings.

We found significantly depressed levels of nitrite in all groups of MDS patients versus controls. These results were in accordance with our previous study of middle age patients with MDS [14]. However the age of subjects in our study group, were in the range 25-91 years. The relation of plasma levels of nitric oxide to patient age depends on the substances (NO_2^-, NO_3^-, NOx) measured to assess NO [15-17]. Alusik *et al.* found, that nitrite levels in elderly patients (over eighty) were slightly, non-significantly lower than in a younger control group in their thirties; whereas nitrate concentrations were non-significantly higher in elderly patients then in these controls [18]. Kawakatsu *et al.* found that together, both males and females showed a non-

significant enhancement of NOx with age [19]. Even the levels of aminothiols are believed to vary with age. Bates *et al.* found in a study of young people aged 4-18 years, compared with people aged 65 years and over, that both Hcys and Cys exhibit progressive increases with age throughout the age range; whereas CG plasma concentration does not change significantly with age [20]. According to our previous discussions a correct assessment of the importance of nitric oxide and cysteinylglycine levels estimated in our MDS patients should not be influenced by age, because these relations were referred to as non-significant, as shown above. Collecting a control group of healthy individuals of older age is rather problematic, due to other diseases typical for the elderly population (hypertension, diabetes, etc.). Optimally, the control group should match for as many parameters as possible. As MDS usually occurs in elderly patients, the control group should be of similar age range. However, this matching may face to other limitations – the primary difficulty is to find healthy individuals of older age who do not suffer from other **above** mentioned diseases which may significantly affect the obtained results. Further, MDS is not limited to elderly patients only. Considering that, we decided to compare our patient group with a healthy control group of lower age range to possibly observe all the changes that would occur.

The significantly lowered levels of nitrite in studied group of MDS patients versus the controls were probably induced by a combination two factors. In our work, nitrite concentrations moderately negatively correlated with MDA levels ($r=-0.339$, $p=0.006$), using a Spearsman rank correlation test for non-parametrically distributed data. We suppose that NO synthase was probably uncoupled due to the enhanced oxidative stress and subsequent oxidation of tetrahydrobiopterin. Furthermore eNOS could be inhibited by enhanced levels of asymmetric dimethylarginine which has been described in plasma of MDS patients [14]. The other consideration is the possible consumption of NO by an elevation of plasma free hemoglobin levels [21]. Thus, we further sorted the patients into transfused and non-transfused groups. Consequently, we tested the hypothesis that transfusion lowered patient nitrite levels, as a consequence of NO consumption by free hemoglobin. In the samples of patients who received transfusions, we did not find significantly lowered levels of nitrite compared to

patients without transfusions (p=0.137; two-tail, two sample student t-test), although they tended to be lower.

Significantly higher levels of cysteine, cysteinylglycine, and homocysteine in MDS patients were found in our study. Aminothiols, especially homocysteine are a common cardiovascular risk factor. In our study there were 19 patients with cardiovascular event and 28 patients with hypertension. We tested hypotheses that patients with cardiovascular event or hypertension had higher levels of cysteine, cysteinylglycine and homocysteine. Using two-tail, two sample student t-test we have found significant differences neither in homocysteine levels, nor in levels of CG among groups of patients with cardiovascular event and hypertension comparing to group of patients without mentioned comorbidities. Only levels of total cysteine were significantly higher in patients with hypertension ($P<0.03$). The higher levels of total homocysteine in MDS have been described earlier and were in accordance with Cortelezzi *et al.* [6]. Elevated levels of cysteine had not yet been described in relation with myelodysplastic syndromes. De Chiara *et al.* studied cysteine in cardiovascular disease, and they have suggested that cysteine is the main plasma antioxidant compound; its concentration reflecting increased oxidative processes [22]. However, an association has been described between cysteine and older age [23]. As mentioned, cysteinylglycine was described to have a lack in correlation with age [20]. This dipeptide has not been as widely studied as glutathione and homocysteine; however, its role in the pathophysiology of several diseases has been described previously [24]. We found that levels of all forms of CG were significantly higher in MDS patients; and moreover, levels of t-CG differed significantly between each of the MDS clinical subgroups and levels of ox-CG were significantly higher in subgroup 1 of MDS compared to group 4 and healthy donors. Cysteinylglycine together with cysteine are the main components of glutathione metabolism and essential substrates for GSH synthesis.

Reduced levels of plasma glutathione as a consequence of oxidative stress have been described in several works [25-27]. Glutathione is a key antioxidant involved in the protection of the cell against oxidative radicals forming glutathione disulfide, and in the metabolism of endogenous and xenobiotic compounds to yield mixed disulfides. Glutathione has also been described to play a critical role in determining apoptosis

sensitivity and resistance in leukemia cells [28, 29]. Once GSH is oxidized, it is exported out of the cell and degraded [30]. GSH is catabolized through the action of gamma-glutamyltransferase to γ-glutamyl moiety, coupled to another amino acid and cysteinylglycine, which can be further catabolised to cysteine and glycine. Significantly reduced levels of total and oxidized glutathione, together with enhanced levels of cysteine and cysteinylglycine, suggest a possible imbalance in glutathione metabolism in MDS. In our study, the activity of GGT, a crucial enzyme in the metabolism of glutathione in MDS patients, was 0.60 µkat/L, which is mostly at the upper limit of the standard reference interval of GGT (0.16 – 0.8 µkat/L). Moreover, levels of GGT were moderately negatively correlated with total glutathione concentrations. GGT has been described as a marker of oxidative stress [26-28], and several studies support the view that the enhanced expression of GGT may represent an important factor in the development of a more aggressive and resistant phenotype of cancer cells [31-33]. In addition, De Donatis *et al.* showed that the blocking of glutathione metabolism through GGT-inhibition elicited an extra-lenticular accumulation of glutathione and the ability of CG to abolish this effect [34]. In our study, the significantly elevated levels of CG as a consequence of enhanced GGT activity could be considered.

Ghoti *et al.* described lower levels of reduced glutathione in the red blood cells, platelets, and neutrophils of MDS patients with RARS and RCMD. These data correlated with serum ferritin levels, and were attributed to oxidative stress due to iron overload [4]. In our study, MDS patients had significantly depressed plasma levels of total glutathione and oxidized glutathione as compared with healthy donors. In several works, oxidative stress in MDS was attributed to the early stages of MDS, characterized by enhanced apoptosis and transfusion therapy [2, 35] . These patients suffer from iron overload and consequently oxidative stress development [36]. We found enhanced plasma levels of aminothiols (cysteine, cysteinylglycine, homocysteine) in groups 1 and 2, respectively. These groups involve MDS subtypes designated as early stages of MDS. However, serum ferritin levels and free iron did not differ significantly between each of the MDS subgroups (1-4) in our study. Meanwhile, the oxidative stress represented by MDA concentrations was significantly higher in patients with iron overloads (meaning patients requiring chelation therapy

and transfused patients). MDA had a strong correlation with iron and ferritin levels. However, other analyzed compounds lacked correlation with oxidative stress as a consequence of iron overload. This conflict with Ghoti *et al.* may be explained by experimental conditions. We evaluated levels of glutathione in plasma and Ghoti did so in cells. We suggest possibility that there is an oxidative stress as a result of iron overload; however the imbalance in plasma aminothiols and the NOx compound could be probably influenced by other factors.

Conclusions

In conclusion, we simultaneously determined NOx compounds and plasma aminothiols in 61 MDS patients in the context of clinical outcomes and as a consequence of iron overload, and compared both with 23 healthy donors. Our results reveal for the first time the significant differences in the concentrations of total plasma aminothiols in MDS patients, and no correlation of these parameters with iron overload represented by iron/ferritin levels. We suggest that oxidative stress could participate in the development of MDS disease, not 'only' to be consequence of iron overload. This work brings new insight into the problematic nature of myelodysplastic syndromes and oxidative stress. However, further studies are needed to clarify this subject more concretely.

Acknowledgement

This study was supported by grant CZ.2.16/3.1.00/24001 of the EU ERDF OPPK; by P205/12/G118 of the Center for Excellence; by grant KAN200670701 and by the Ministry of Health, Czech Republic project for the conceptual development of the research organization, VZ MZ 00002373601 IHBT. We thank Dr. Procházka for the statistical analysis of our data.

Contribution of authors

KP performed HPLC analysis of nitrite and malondialdehyde and wrote the manuscript, JS participated carried out data analysis and interpretation and wrote the manuscript, LCH performed analysis of aminohiols, RK performed analysis of nitrate,

JC provided clinical data and patient samples, JED conceived of the study and wrote the manuscript.

Conflicts of interest

Any significant amount of data reported in our manuscript has not been published elsewhere, nor is it under consideration for publication elsewhere. The authors certify that there is no conflict of interest, and that they have no affiliation with or financial involvement in any organization or entity with a direct financial interest in the subject matter or materials discussed in the manuscript. Any research or project support is identified in the "Acknowledgement" section of the manuscript.

References

1. Farquhar, M.J. and D.T. Bowen, *Oxidative stress and the myelodysplastic syndromes.* Int J Hematol, 2003. **77**(4): p. 342-50.
2. Gattermann, N. and E.A. Rachmilewitz, *Iron overload in MDS-pathophysiology, diagnosis, and complications.* Ann Hematol, 2011. **90**(1): p. 1-10.
3. Saigo, K., et al., *Oxidative Stress Levels in Myelodysplastic Syndrome Patients: their Relationship to Serum Ferritin and Haemoglobin Values.* J Int Med Res, 2011. **39**(5): p. 1941-1945.
4. Ghoti, H., et al., *Oxidative stress in red blood cells, platelets and polymorphonuclear leukocytes from patients with myelodysplastic syndrome.* Eur J Haematol, 2007. **79**(6): p. 463-7.
5. Cortelezzi, A., et al., *Non-transferrin-bound iron in myelodysplastic syndromes: a marker of ineffective erythropoiesis?* Hematol J, 2000. **1**(3): p. 153-8.
6. Cortelezzi, A., et al., *Hyperhomocysteinemia in myelodysplastic syndromes: specific association with autoimmunity and cardiovascular disease.* Leuk Lymphoma, 2001. **41**(1-2): p. 147-50.
7. Peddie, C.M., et al., *Oxidative DNA damage in CD34+ myelodysplastic cells is associated with intracellular redox changes and elevated plasma tumour necrosis factor-alpha concentration.* Br J Haematol, 1997. **99**(3): p. 625-31.
8. Choi, J.W., *No significant correlation exists between nitric oxide production and apoptosis in myelodysplastic syndromes.* Acta Haematol, 2003. **109**(1): p. 50-52.

9. Garcia, A.J. and R. Apitz-Castro, *Plasma total homocysteine quantification: an improvement of the classical high-performance liquid chromatographic method with fluorescence detection of the thiol-SBD derivatives.* J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2002. **779**(2): p. 359-63.
10. Li, H., C.J. Meininger, and G. Wu, *Rapid determination of nitrite by reversed-phase high-performance liquid chromatography with fluorescence detection.* J Chromatogr B Biomed Sci Appl, 2000. **746**(2): p. 199-207.
11. Woitzik, J., N. Abromeit, and F. Schaefer, *Measurement of nitric oxide metabolites in brain microdialysates by a sensitive fluorometric high-performance liquid chromatography assay.* Anal Biochem, 2001. **289**(1): p. 10-7.
12. Davies, C.A., et al., *Simultaneous analysis of nitrite, nitrate and the nicotinamide nucleotides by capillary electrophoresis: application to biochemical studies and human extracellular fluids.* Electrophoresis, 1999. **20**(10): p. 2111-7.
13. Suttnar, J., L. Masova, and J.E. Dyr, *Influence of citrate and EDTA anticoagulants on plasma malondialdehyde concentrations estimated by high-performance liquid chromatography.* J Chromatogr B Biomed Sci Appl, 2001. **751**(1): p. 193-7.
14. Stikarova, J., et al., *Enhanced levels of asymmetric dimethylarginine in a serum of middle age patients with myelodysplastic syndrome.* J Hematol Oncol, 2013. **6**(1): p. 58.
15. Moshage, H., et al., *Nitrite and nitrate determinations in plasma: a critical evaluation.* Clin Chem, 1995. **41**(6 Pt 1): p. 892-6.

16. Kleinbongard, P., et al., *Plasma nitrite reflects constitutive nitric oxide synthase activity in mammals.* Free Radic Biol Med, 2003. **35**(7): p. 790-6.
17. Lauer, T., et al., *Plasma nitrite rather than nitrate reflects regional endothelial nitric oxide synthase activity but lacks intrinsic vasodilator action.* PNAS, 2001. **98**(22): p. 12814-12819.
18. Alusik, S., et al., *Plasma levels of nitrite/nitrate and inflammation markers in elderly individuals.* Bratisl Lek Listy, 2008. **109**(7): p. 289-92.
19. Kawakatsu, M., et al., *Plasma Nitrate/Nitrite Concentration in Healthy Population and Patients with Diabetes Mellitus - Relationships with Gender, Aging and Diabetic Complications.* Bulletin of the Osaka Medical College, 2002. **48**: p. 1-6.
20. Bates, C.J., et al., *Correlates of plasma homocysteine, cysteine and cysteinyl-glycine in respondents in the British National Diet and Nutrition Survey of Young People Aged 4-18 Years, and a comparison with the Survey of People Aged 65 Years and Over.* Brit J Nutr, 2002. **87**(1): p. 71-79.
21. Vermeulen Windsant, I.C., et al., *Blood transfusions increase circulating plasma free hemoglobin levels and plasma nitric oxide consumption: a prospective observational pilot study.* Crit Care, 2012. **16**(3): p. R95.
22. De Chiara, B., et al., *Plasma total cysteine and cardiovascular risk burden: action and interaction.* ScientificWorldJournal, 2012. **2012**: p. 303654.
23. Jacob, N., et al., *Cysteine is a cardiovascular risk factor in hyperlipidemic patients.* Atherosclerosis, 1999. **146**(1): p. 53-9.
24. Muller, T. and S. Muhlack, *Cysteinyl-glycine reduction as marker for levodopa-induced oxidative stress in Parkinson's disease patients.* Mov Disord, 2011. **26**(3): p. 543-6.

25. Passi, S., et al., *Epidermal oxidative stress in vitiligo.* Pigment Cell Res, 1998. **11**(2): p. 81-5.
26. De Chiara, B., et al., *Low plasma glutathione levels after reperfused acute myocardial infarction are associated with late cardiac events.* Coron Artery Dis, 2007. **18**(2): p. 77-82.
27. Shimizu, H., et al., *Relationship between plasma glutathione levels and cardiovascular disease in a defined population: the Hisayama study.* Stroke, 2004. **35**(9): p. 2072-7.
28. Hanigan, M.H., et al., *Altered expression of gamma-glutamyl transpeptidase in human tumors.* Human Pathology, 1999. **30**(3): p. 300-305.
29. Raza, A., et al., *Phase 1 multicenter dose-escalation study of ezatiostat hydrochloride (TLK199 tablets), a novel glutathione analog prodrug, in patients with myelodysplastic syndrome.* Blood, 2009. **113**(26): p. 6533-40.
30. Dickinson, D.A. and H.J. Forman, *Glutathione in Defense and Signaling.* Ann NY Acad Sci, 2002. **973**(1): p. 488-504.
31. Tager, M., et al., *Gamma-Glutamyl Transpeptidase-Cellular Expression in Populations of Normal Human Mononuclear-Cells and Patients Suffering from Leukemias.* Ann Hematol, 1995. **70**(5): p. 237-242.
32. Proctor, M.J., et al., *The relationship between the presence and site of cancer, an inflammation-based prognostic score and biochemical parameters. Initial results of the Glasgow Inflammation Outcome Study.* Br J Cancer, 2010. **103**(6): p. 870-6.
33. Diergaarde, B., et al., *Pooling-based genome-wide association study implicates gamma-glutamyltransferase 1 (GGT1) gene in pancreatic carcinogenesis.* Pancreatology, 2010. **10**(2-3): p. 194-200.

34. De Donatis, G.M., et al., *Cysteinyl-glycine in the control of glutathione homeostasis in bovine lenses.* Mol Vis, 2010. **16**: p. 1025-33.
35. Vasikova, A., et al., *A distinct expression of various gene subsets in CD34+ cells from patients with early and advanced myelodysplastic syndrome.* Leuk Res, 2010. **34**(12): p. 1566-72.
36. Valent, P., et al., *Iron overload in myelodysplastic syndromes (MDS) - diagnosis, management, and response criteria: a proposal of the Austrian MDS platform*. Eur J Clin Invest, 2008. **38**(3): p. 143-9.

1

Table 1

Plasma levels of oxidative stress compounds in healthy donors and myelodysplastic patients (MDS). Data are expressed as means ± SD. Significant differences between MDS patients and healthy donors are marked with *. Data were analyzed using a two-tailed, two sample student t-test.

Analyzed compounds	Healthy donors (n=23)	MDS patients (n=61)
t-Cys [µM]	219.49 ± 13.83	284.00 ± 68.20***
t-Hcys [µM]	9.45 ± 0.63	14.50 ± 10.70***
t-CG [µM]	39.71 ± 4.86	48.8 ± 14.30**
t-GSH [µM]	9.07 ± 1.55	7.16 ± 3.59*
MDA [µM]	0.69 ± 0.11	0.82 ± 0.34
NO_2^- [nM]	1149.08 ± 84.55	903.34 ± 215.34***
NO_3^- [µM]	32.78 ± 10.33	32.8 ± 17.87
Ferritin [µg/L]	Ref. R.: 22-322	557.18 ± 3.98
Fe [µM]	Ref. R.: 7.2-29	26.15 ± 12.28
GGT [µkat/L]	Ref. R.: 0.14-0.8	0.60 ± 0.56

****P < 0.001, **P < 0.005, *P < 0.05, total cysteine (t-Cys), total homocysteine (t-Hcys), total cysteinylglycine (t-CG), total glutathione (t-GSH), malodialdehyde (MDA), gamma-glutamyltranferase (GGT).*

2

3

Table 2

Overview of the analyzed study groups (0-4), the number of myelodysplastic patients, gender ratio, and the age of analyzed patients and controls.

Group	Number of patients (male/female)	Age range	Diagnoses
0	23 (10/13)	25-57	healthy donors
1	14 (10/4)	52-91	RA, RA-5q, RARS
2	29 (15/14)	28-90	RCMD, RCMD-RS, RCMD-5q, RCMD with reactive monocytes
3	9 (4/5)	36-85	RAEB-1, MDS/MPS, MDS/MPS with 5q deletion, MDS-RAEB1 + SC-NHL
4	9 (5/4)	55-80	RAEB-2, RAEB-T, AML M2

Refractory anemia (RA), MDS with isolated del(5q) (RA-5q), refractory anemia with ringed sideroblasts (RARS), refractory cytopenia with multilineage dysplasia (RCMD), RCMD with ringed sideroblasts (RCMD-RS), RCMD with 5q deletion (RCMD-5q), RCMD with reactive monocytes, RA with an excess of blasts-1 (RAEB-1), RA with an excess of blasts-2 (RAEB-2), RA with an excess of blasts in transformation (RAEB-T), myelodysplastic/myeloproliferative syndromes (MDS/MPS), MDS/MPS with 5q deletion, acute myeloid leukemia (AML M2), and MDS-RAEB1 plus SC-non-Hodgkin lymphoma.

1

2

Table 3

Oxidative stress parameters in the control group (0) and four myelodysplastic syndromes subgroups (1-4). Values are shown as means ± SD. Data were analyzed by ANOVA, and *P* values are shown for significantly differing parameters.

Analyzed compounds	Analyzed groups					*P* value
	0	1	2	3	4	
t-Cys[µM]	219.49 ± 13.83	300.49 ± 57.48	283.96 ± 70.58	274.30 ± 56.29	268.18 ± 89.73	
t-Hcys [µM]	9.45 ± 0.63	11.73 ± 4.87	17.12 ± 14.51	13.50 ± 3.17	11.38 ± 4.75	
t-CG [µM]	39.71 ± 4.86	56.09 ± 18.81	47.54 ± 11.41	49.70 ± 8.15	40.59 ± 14.95	* 0.032
t-GSH [µM]	9.07 ± 1.55	8.36 ± 4.27	6.83 ± 2.88	7.25 ± 4.89	6.26 ± 3.22	
MDA [µM]	0.70 ± 0.12	0.99 ± 0.51	0.74 ± 0.25	0.92 ± 0.31	0.71 ± 0.15	
NO_2^- [nM]	1185.00 ± 92.62	960.00 ± 275.20	890.00 ± 225.33	827.00 ± 108.05	945.78 ± 173.65	* 0.021
NO_3^-[µM]	34.80 ± 11.16	33.14 ± 13.87	37.47 ± 20.32	29.29 ± 18.91	20.78 ± 6.91	
Ferritin [µg/L]	Ref. R.: 22-322	1569.7 ± 2.25	330.02 ± 6.12	1681.03 ± 2.10	249.98 ± 3.11	
Fe [µM]	Ref. R.: 7.2-29	38.19 ± 9.13	25.23 ± 13.15	29.44 ± 7.20	19.51 ± 10.1	
GGT [µkat/L]	Ref. R.: 0.14-0.8	0.75 ± 0.77	0.70 ± 0.71	0.60 ± 0.17	0.42 ± 0.27	

Total cysteine (t-Cys), total homocysteine (t-Hcys), total cysteinylglycine (t-CG), total glutathione (t-GSH), malodialdehyde (MDA), gamma-glutamyltranferase (GGT).

Figure legends

Figure 1: **Concentration of total cysteinylglycine (CG)**. Plasma levels of total cysteinylglycine (reduced form and form bound to proteins) in healthy donors (0) and MDS subgroups (1-4). Data are expressed as means ± SD. Using ANOVA, total cysteinylglycine was found to differ significantly between groups (p=0.032). *Statistical significance of the difference between group 1 and both groups 0 and 4 (*post hoc* ANOVA tests, Duncan, $P<0.05$).

Figure 2: **Concentration of nitrite (NO_2^-).** Plasma levels of nitrite in healthy donors (0) and MDS subgroups (1-4). Data are expressed as means ± SD. Using ANOVA, nitrite were found to differ significantly between groups ($P=0.021$). *Statistical significance of the difference between groups1-4 and the control group (*post hoc* ANOVA tests, Duncan, $P<0.05$).

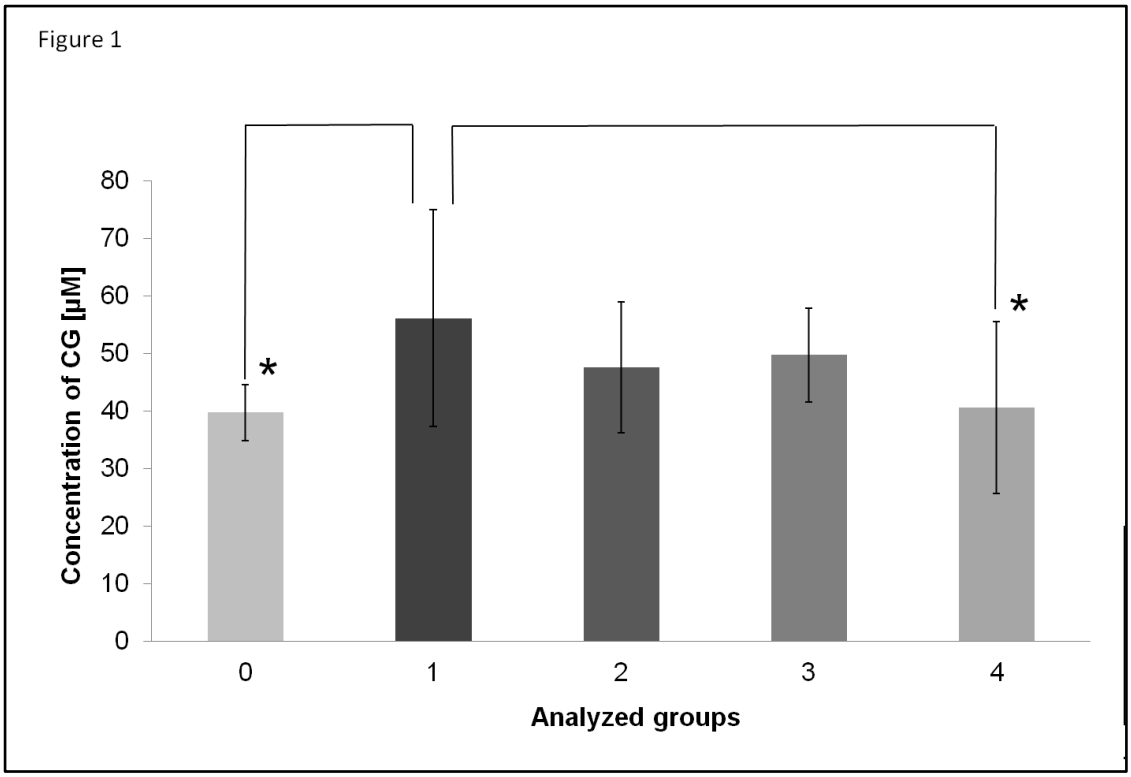
Figure 3: **Correlation of total cysteinylglycine (t-CG) and total glutathione (t-GSH).** Correlation of t-CG plasma concentrations and t-GSH plasma concentrations in MDS patients and healthy donors. *P* and r values were derived by a *Pearson* correlation test.

Figure 4: **Correlation of cysteinylglycine (t-CG) and nitrite (NO_2^-).** Correlation of cysteinylglycine plasma concentrations and nitrite plasma concentrations in MDS patients and healthy donors. *P* and r values were derived by a *Pearson* correlation test.

Figure 5: **Correlation of total malondialdehyde (MDA) and free iron (Fe).** Correlation of MDA plasma concentrations and Fe plasma concentrations in MDS patients and healthy donors. *P* and r values were derived by a *Pearson* correlation test.

Figure 6: **Correlation of total malondialdehyde (MDA) and ferritin.** Correlation of MDA plasma concentrations and ferritin plasma concentrations in MDS patients and healthy donors. *P* and r values were derived by a *Pearson* correlation test.

Figure 1


Concentration of CG [µM]
80
70
60
50
40
30
20
10
0
*
*
0
1
2
3
4
Analyzed groups

1

Figure 2

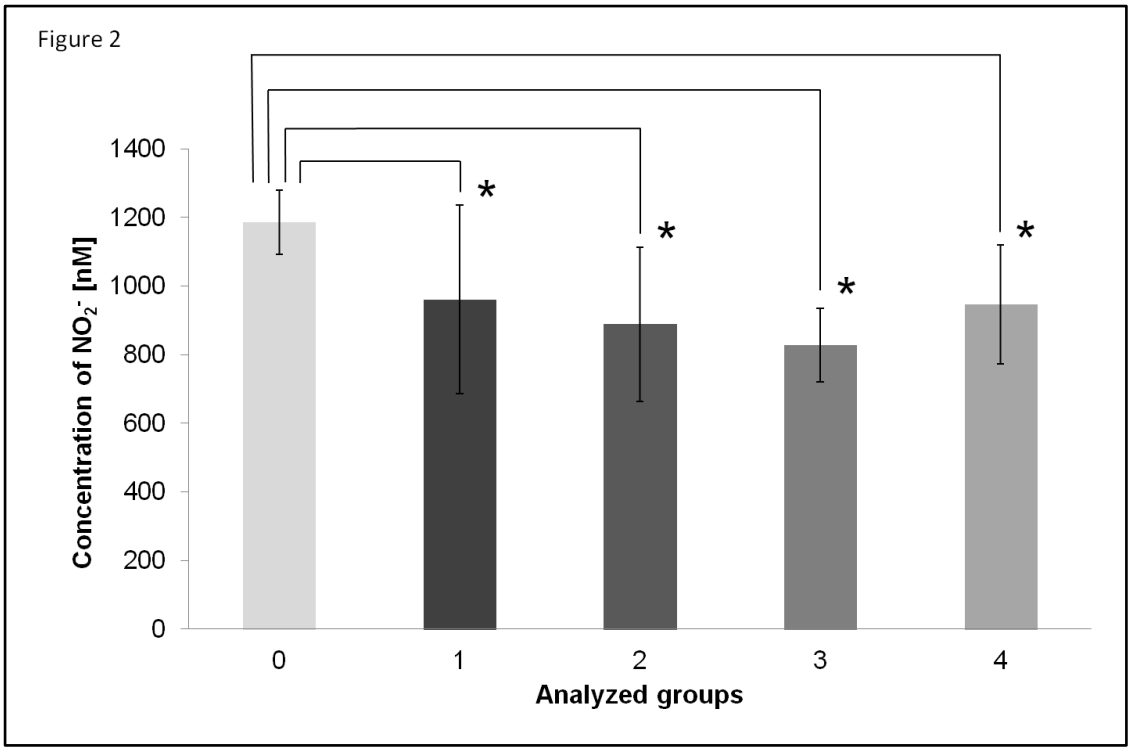
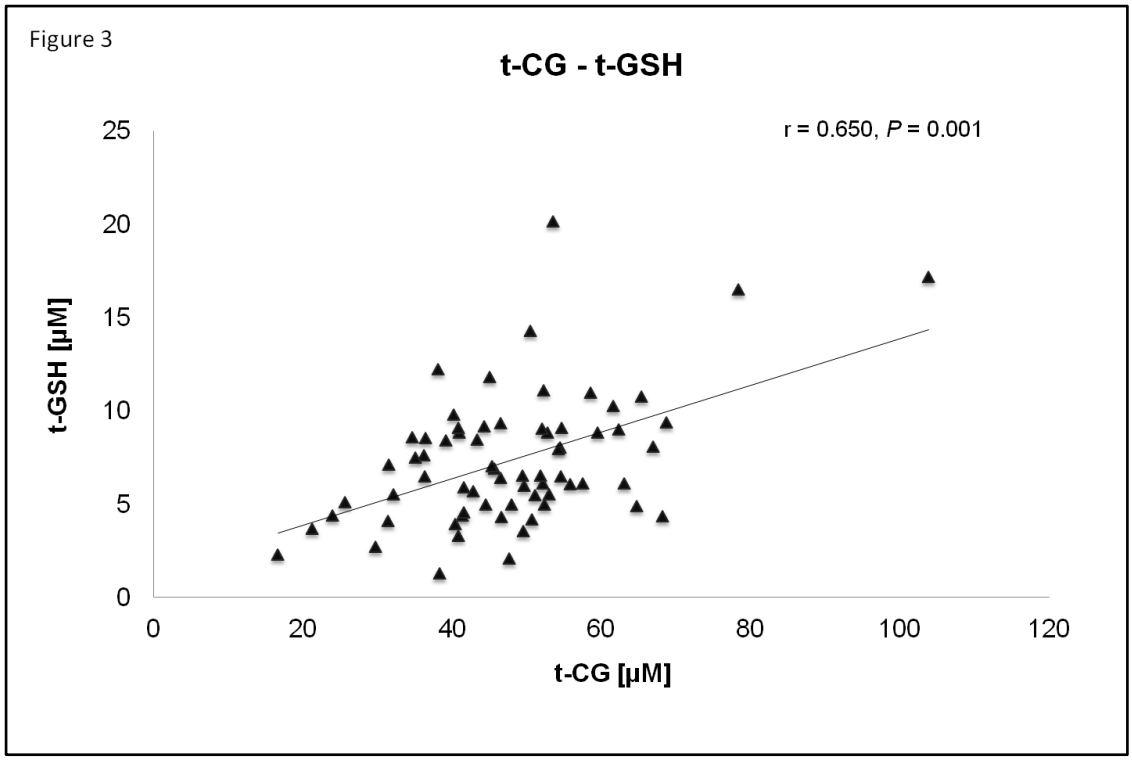

1400
1200
1000
800
600
400
200
0
Concentration of NO_2^- [nM]
0
1
2
3
4
Analyzed groups
*
*
*
*

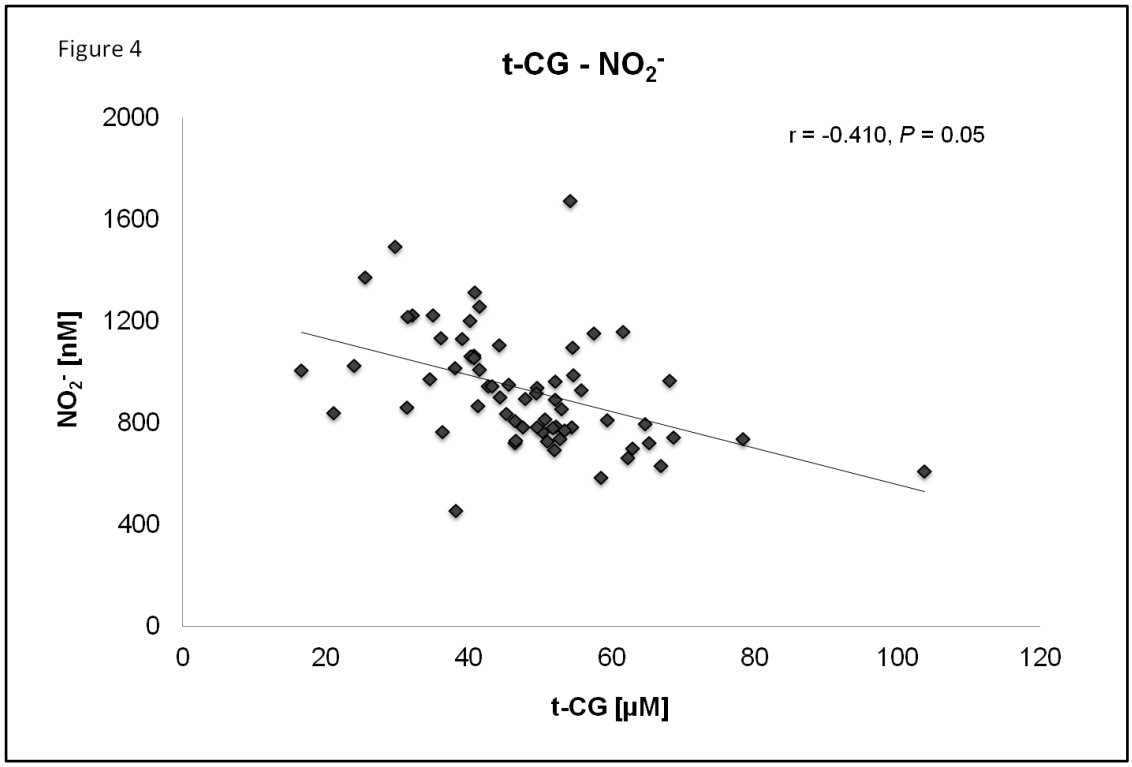
Figure 3


t-CG - t-GSH
r = 0.650, P = 0.001
t-GSH [µM]
t-CG [µM]
0
5
10
15
20
25
0
20
40
60
80
100
120

1

2

Figure 4


t-CG - NO2-
r = -0.410, P = 0.05
NO2- [nM]
2000
1600
1200
800
400
0
0
20
40
60
80
100
120
t-CG [µM]

1

2

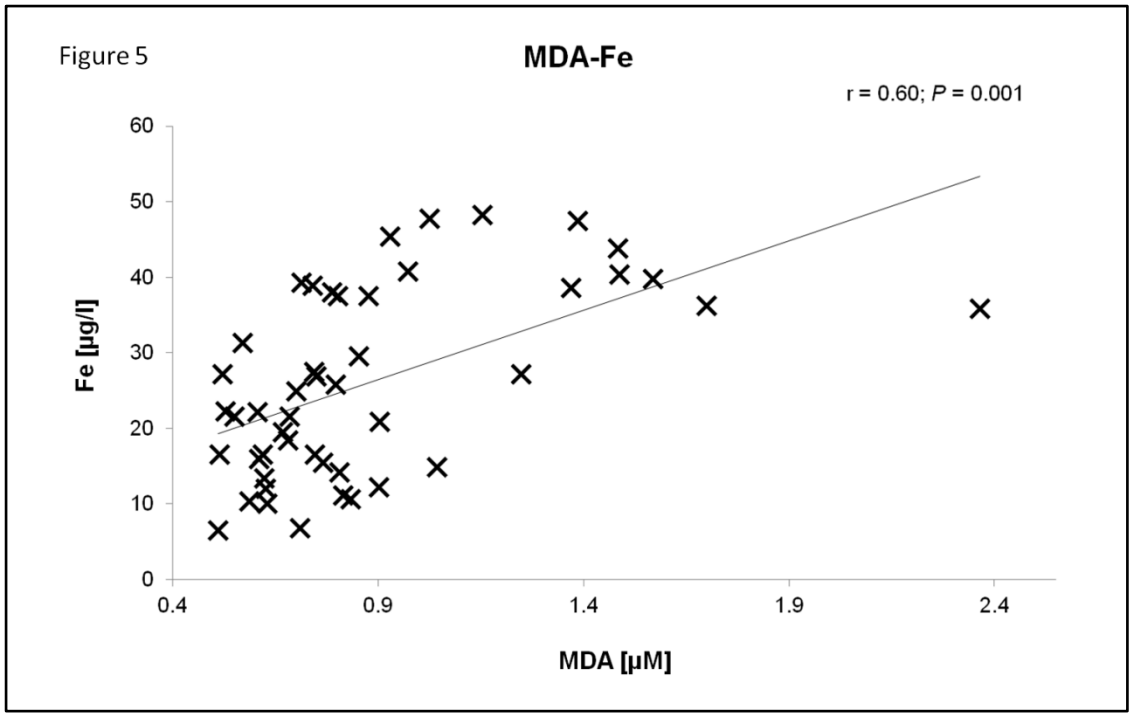


Figure 5
MDA-Fe
r = 0.60; P = 0.001
Fe [µg/l]
MDA [µM]
0
10
20
30
40
50
60
0.4
0.9
1.4
1.9
2.4

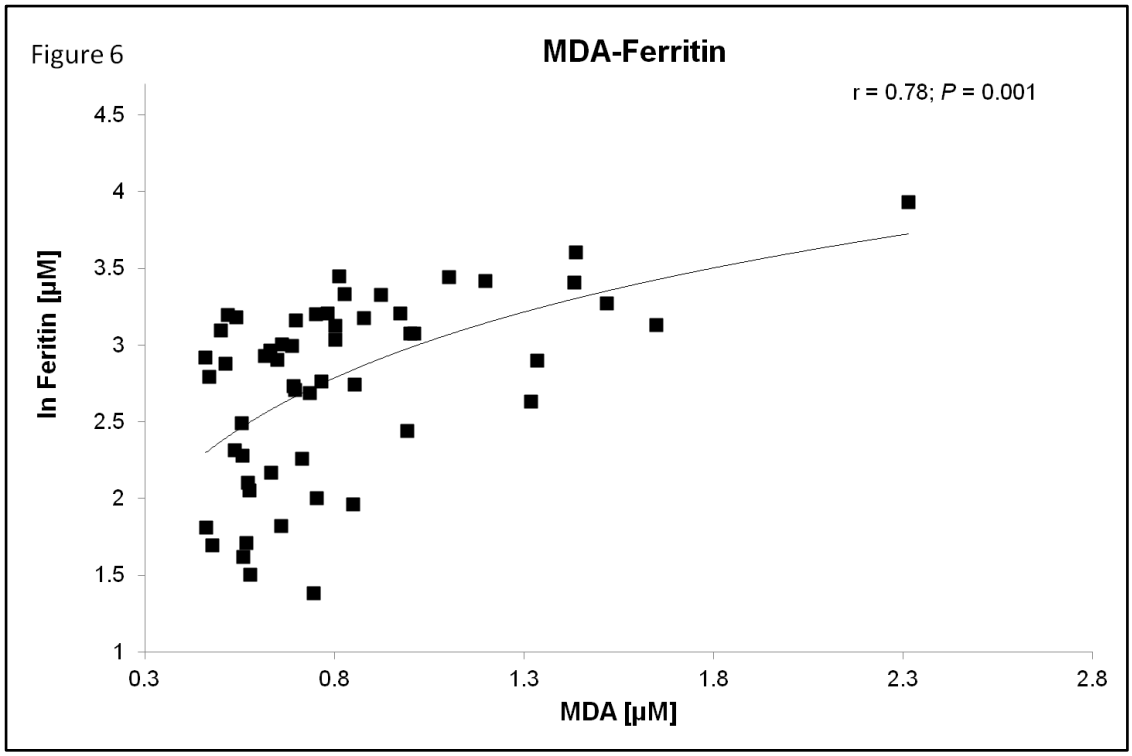


Figure 6
MDA-Ferritin
r = 0.78; P = 0.001
ln Feritin [µM]
4.5
4
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.3
0.8
1.3
1.8
2.3
2.8
MDA [µM]