

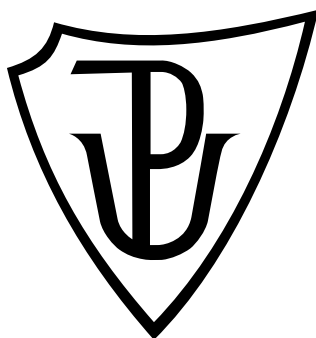
Univerzita Palackého v Olomouci

Diplomová práce

Olomouc 2020

Bc. Veronika Frýbortová

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Kvantifikace metylačních změn proteinů
TET a jejich vliv na celkovou úroveň metylace
DNA a hydroxymethylace u pacientů
s mnohočetným myelomem**

Diplomová práce

Bc. Veronika Frýbortová

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE
(PROJEKTU, UMELECKÉHO DÍLA, UMELECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Veronika FRÝBORTOVÁ**
Osobní číslo: **R18927**
Studijní program: **N1501 Biologie**
Studijní obor: **Molekulární a buněčná biologie**
Název tématu: **Kvantifikace metylačních změn proteinů TET a jejich vliv na celkovou úroveň metylace DNA a hydroxymethylace u pacientů s mnohočetným myelomem**
Zadávací katedra: **Katedra buněčné biologie a genetiky**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

1. Práce s odbornou literaturou a vypracování literární rešerše na zadané téma; 2. Izolace RNA a DNA z krevních aspirátů pacientů s mnohočetným myelomem; 3. Příprava cDNA a následná expresní analýza genů TET1, TET2 a TET3 metodou kvantitativního PCR; 4. Po restrikčním štěpení DNA enzymy MspI a HpaII kvantifikovat úroveň metylačních (5-mC) a hydroxymetylačních (5-hmC) změn u sledovaného souboru pacientů; 5. Stanovení hladiny celkové metylace DNA a hydroxymethylace u jednotlivých vzorků DNA sledovaného souboru pacientů.

Rozsah grafických prací:

Rozsah pracovní oprávy:

Forma zpracování diplomové práce: **tisková**

Seznam odborné literatury:

1. Williams K et al. (2012): DNA methylation: TET proteins-guardians of CpG islands? *EMBO reports* 13 (1): 28-35; doi:10.1038/embor.2011.233
2. Nakajima H and Kunimoto H (2014): TET2 as an epigenetic master regulator for normal and malignant hematopoiesis. *Cancer Science* 105: 1093-1099; doi:10.1111/cas.12454
3. Abdel-Wahab O et al. (2018): Genetic characterization of TET1, TET2, and TET alterations in myeloid malignancies. *Blood* 114 (1): 144-147; doi:10.1182/blood-2009-03-210039
4. Rasmussen and Helin (2016): Role of TET enzymes in DNA methylation, development, and cancer. *Genes & Development* 30: 733-750; doi:10.1101/gad.276568.115
5. Ravichandran et al. (2017): Target specificity of mammalian DNA methylation and demethylation machinery. *Organic & Biomolecular Chemistry* 16: 1419-1435; doi:10.1039/c7ob02574b

Vedoucí diplomové práce:


Ing. Kateřina Šmešný Trtková, CSc.

Ústav klinické a molekulární patologie

Datum zadání diplomové práce:


12. října 2018

Termín odevzdání diplomové práce:

31. července 2020

doc. RNDr. Martin Kubala, Ph.D.
děkan

I. S.


31.10.2018
prof. RNDr. Zdeněk Dvořák, DrSc.
vedoucí katedry

V Olomouci dne

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora: Veronika Frýbortová

Název práce: Kvantifikace metylační změn proteinů TET a jejich vliv na celkovou úroveň metylace DNA a hydroxymetylaci u pacientů s mnohočetným myelomem.

Typ práce: Diplomová

Pracoviště: Katedra buněčné biologie a genetiky

Vedoucí práce: Ing. Kateřina Smešný Trtková, CSc.

Rok obhajoby práce: 2020

Klíčová slova: Mnohočetný myelom, proteiny TET, metylace, hydroxymetylaci, 5-mC, 5-hmC

Počet stran: 68

Počet příloh: 0

Jazyk: Český

SOUHRN:

Obsahem diplomové práce je studium epigenetických změn na úrovni DNA u pacientů s mnohočetným myelomem. Teoretická část obsahuje charakteristiku onemocnění mnohočetného myelomu, kapitoly jsou věnované epigenetickým modifikacím, jež mohou vést ke vzniku a progresi hemato-onkologických onemocnění, k nimž patří mnohočetný myelom. Zdůrazněna je část věnovaná úloze a důležitosti demetylačních enzymů z rodiny proteinů TET (Ten-eleven translocation), které jsou obsahem experimentální a výsledkové části této práce.

Podstatou praktické části byla analýza 19 vzorků nesortovaných buněčných populací pacientů s mnohočetným myelomem a 11 vzorků buněčných suspenzí pacientů s mnohočetným myelomem sortovaných na povrchový marker CD138.

Pomocí kvantitativního real-time PCR byla stanovena úroveň exprese genů *TET1*, *TET2* a *TET3*. Z našich výsledků vyplývá, že nízké exprese genů *TET1* a *TET3* mohou být ovlivněny kombinací detekovaných metylačních a hydroxymetylačních změn v promotorových úsecích těchto genů. Hydroxymetylační změny nejčastěji detekované v promotorové sekvenci genu *TET2* a pozitivní korelace mezi hydroxymetylací promotorového úseku tohoto genu a jeho genovou expresí mohly naopak ovlivnit úroveň exprese genu *TET2*, která je porovnáním s expresí genů *TET1* a *TET3* zvýšena.

Bibliographical identification

Author's first name and surname: Veronika Frýbortová

Title: Quantification of TET genes demethylation and effect of possible demethylation changes on the global level of DNA methylation and hydroxymethylation in patients with multiple myeloma.

Type of thesis: Master

Department: Department of cell biology and genetics

Supervisor: Ing. Kateřina Smešný Trtková, CSc.

The year of presentation: 2020

Keywords: TET proteins, multiple myeloma, methylation, hydroxymethylation, 5-mC, 5-hmC

Number of pages: 68

Number of appendices: 0

Language: Czech

SUMMARY:

The content of the master thesis is the study of epigenetic changes at the DNA level in patients with multiple myeloma. The theoretical part of the thesis contains the multiple myeloma disease characteristics, another chapters are devoted to the description of epigenetic modifications that can lead to the initiation and progression of hematological diseases, including multiple myeloma. The part devoted to the role and importance of demethylation enzymes belonging to the TET (Ten-eleven translocation) family of proteins. Expression and methylation analyzes of TET genes are included in the experimental and result part of this work.

Analysis of 19 multiple myeloma patient samples of unsorted cell populations and 11 multiple myeloma samples after cell sorting on surface marker CD138.

The expression level of studied *TET1*, *TET2* and *TET3* genes were determined by quantitative real-time PCR. Our results indicate that the detected low expression of both *TET1* and *TET3* genes may be affected by a combination of confirmed methylation and hydroxymethylation changes in analyzed promoter regions of these genes. On the contrary, hydroxymethylation changes most frequently detected in the promoter sequence of the *TET2* gene together with calculated the positive correlation between detected hydroxymethylation changes of the promoter region of the *TET2* gene and its expression could affect the *TET2* expression level, which was found increased in comparison to the expression of both *TET1* and *TET3* genes.

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci na téma: Kvantifikace metylačních změn proteinů TET a jejich vliv na celkovou úroveň metylace DNA a hydroxymethylace u pacientů s mnohočetným myelomem zpracovala s využitím citovaných informačních zdrojů pod vedením Ing. Kateřiny Smešný Trtkové, CSc.,

V Olomouci dne:

Ráda bych poděkovala vedoucí práce Ing. Kateřině Smešný Trtkové, CSc. za cenné rady a ochotu při zpracování diplomové práce. Zaměstnancům laboratoře molekulární patologie za vstřícnost a poskytnutí prostor pro vykonání praktické části mé diplomové práce. Pro zpracování diplomové práce byly využity finanční prostředky z grantu NV18-03-00500 Ministerstva Zdravotnictví České republiky a interního grantu (LF_2020_0015) LF Univerzity Palackého v Olomouci.

OBSAH

1	ÚVOD	1
2	CÍLE PRÁCE	2
3	LITERÁRNÍ PŘEHLED	3
3.1	Diagnostika a charakteristika MM	3
3.1.1	Genetika a MM	5
3.1.2	Prognóza	6
3.1.3	Varianty myelomu plazmatických buněk	6
3.1.3.1	Asymptomatický (smoldering) mnohočetný myelom	6
3.1.3.2	Nesekreční myelom	7
3.1.3.3	Leukémie plazmatických buněk	7
3.2	CD138	7
3.3	Epigenetika	8
3.3.1	Metylace DNA	9
3.3.2	Strukturní organizace DNMTs	11
3.3.3	Metylační změny u onkologických onemocnění	11
3.3.4	TET a 5-hmC	12
3.3.4.1	Aktivní demethylace	13
3.3.4.2	TET1	15
3.3.4.3	TET2	16
3.3.4.4	TET3	16
3.3.4.5	TET enzymy a hematopoetické onemocnění	17
3.3.4.6	Indukované pluripotentní kmenové buňky (iPSC)	18
3.3.5	Význam epigenetiky u MM	19
4	MATERIÁL A METODY	20
4.1	Biologický materiál	20
4.2	Použité chemikálie, soupravy a roztoky	20
4.2.1	Použité chemikálie a roztoky	20
4.2.2	Použité soupravy	21
4.3	Seznam použitých přístrojů a zařízení	21
4.4	Použité experimentální a vyhodnocovací postupy	22
4.4.1	Izolace genomové DNA	22
4.4.2	Lokální metylační a hydroxymetylační analýza	23
4.4.3	Detekce globální metylace	26
4.4.4	Detekce globální hydroxymetylace	28
4.4.5	Izolace RNA z aspirátů kostní dřeně nebo ze sortované populace buněk (CD138)	30
4.4.6	Reverzní transkripce (RT-PCR)	31
4.4.7	Expresní analýza <i>TET1</i> , <i>TET2</i> a <i>TET3</i>	31
5	VÝSLEDKY	33
5.1	Stanovení hladiny celkové metylace a hydroxymetylace DNA	33
5.2	Kvantifikace metylací a hydroxymetylací v promotorech genů <i>TET1</i> , <i>TET2</i> a <i>TET3</i>	36
5.3	Expresní analýza genů <i>TET1</i> , <i>TET2</i> a <i>TET3</i>	41

5.4	Korelace	42
6	DISKUSE	43
7	ZÁVĚR	47
8	LITERATURA	48

SEZNAM SYMBOLŮ A ZKRATEK

CRAB	Hyperkalcémie, selhání ledvin, anémie, kostní změny (hypercalcemia, renal insufficiency, anemia, bone lesions)
DNMT	DNA metyltransferázy
FISH	Fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace
Ig	Imunoglobuliny typu: G, A, M, E, D
IMWG	International myeloma working group
M-Ig	M-protein/paraprotein
MGUS	Monoklonální gamapatie nejasného původu (monoclonal gammopathy of undetermined significance)
MM	Mnohočetný myelom
PL/PCL	Plazmocelulární leukémie
qPCR	Kvantitativní PCR (real-time PCR)
RT-PCR	Reverzní transkripce PCR
SMM	Asymptomatický mnohočetný myelom (smoldering multiple myeloma)
TET	Ten-eleven translokační proteiny
iPSC	Indukované pluripotentní kmenové buňky (induced pluripotent stem cell)

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1. Metylační profil vyvíjejícího se embrya	9
Obrázek 2. Konverze 5-mC na 5-hmC	13
Obrázek 3. Signální dráhy aktivní DNA demethylace	15
Obrázek 4. Demetylační kinetika během přeprogramování pomocí transkripčních faktorů (TF) řídicích skupinu proteinů TET	18
Obrázek 5. Detekce 5-mC a 5-hmC pomocí restričních endonukleáz MspI a HpaII	24

SEZNAM GRAFŮ

Graf 1. Příklad kalibrační závislosti absorbance na koncentraci pro výpočet celkové metylace DNA	34
Graf 2. Profil amplifikačních křivek, bez přítomnosti metylace v promotorové sekvenci	39
Graf 3. Profil amplifikačních křivek, v přítomnosti metylace v promotorové sekvenci	40
Graf 4. Amplifikační křivky naznačující přítomnost nemodifikovaného cytosinu v promotorové sekvenci ..	40

Graf 5. Amplifikační křivky naznačující přítomnost metylace v promotorové sekvenci	41
Graf 6. Expresse <i>TET</i> genů u vzorků nesortované populace buněk	41
Graf 7. Expresse <i>TET</i> genů u vzorků sortované populace buněk	42

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1. Diagnostická kritéria pro mnohočetný myelom (MM) a asymptomatický MM	3
Tabulka 2. Molekulárně-cytogenetická klasifikace MM	5
Tabulka 3. Charakteristika genů z rodiny <i>TET</i>	17
Tabulka 4. Komponenty glukosylační reakční směsi	25
Tabulka 5. Enzymy obsažené v jednotlivých zkumavkách	25
Tabulka 6. Komponenty reakční směsi pro 1 jamku	25
Tabulka 7. Primery pro lokální metylační a hydrxymetylační analýzu	26
Tabulka 8. Podmínky amplifikace	26
Tabulka 9. Příprava kalibrační řady	27
Tabulka 10. Vzor nanášení duplikátu na destičku	27
Tabulka 11. Příprava kalibrační řady	29
Tabulka 12. Vzor nanášení duplikátu na destičku	29
Tabulka 13. Komponenty pro RT-PCR	31
Tabulka 14. Primery a sondy pro expresní analýzu	32
Tabulka 15. Komponenty qPCR reakční směsi pro 1 jamku	32
Tabulka 16. Podmínky amplifikace	32
Tabulka 17. Procentické zastoupení 5-mC v nesortované populaci buněk	34
Tabulka 18. Procentické zastoupení 5-mC v sortované populaci buněk	35
Tabulka 19. Procentické zastoupení 5-hmC v nesortované populaci buněk	36
Tabulka 20. Procentické zastoupení 5-hmC v sortované populaci buněk	36
Tabulka 21. Parametry pro kvantifikaci metylací	37
Tabulka 22. Procentické zastoupení 5-mC a 5-hmC	38
Tabulka 23. Procentické zastoupení 5-mC a 5-hmC	39

1 ÚVOD

Mnohočetný myelom patří mezi maligní hematopoetická onemocnění plazmatických buněk, konečného diferenciačního stádia B-lymfocytů. Pro mnohočetný myelom je charakteristická přítomnost M-proteinu v krvi a multiorgánové poškození zasahující především ledviny a kosti. Genetické změny podílející se na rozvoji mnohočetného myelomu mají hyperdiploidní charakter, nejčastěji trisomii chromozomů s lichým číslem, nebo non-hyperdiploidní charakter, většinou translokaci lokusu IGH. V patogenezi onemocnění mají také důležitý vliv epigenetické modifikace, především změny metylačního profilu DNA. Tyto změny v lokální sekvenci ovlivňují expresi genů, například tumor supresorových genů a onkogenů, a v globálním měřítku ovlivňují chromozomovou stabilitu.

Metylační profil chromatinu je udržován pomocí enzymaticky řízených procesů metylace a aktivní demethylace. Metylace DNA zajišťují dvě skupiny enzymů: DNA metyltransferázy 3, katalyzující *de novo* metylaci a DNA metyltransferáza 1, metylující dceřiné vlákno během replikace DNA. Proces aktivní demethylace, zprostředkovaný ten-eleven translokačními enzymy, byl popsán poměrně nedávno a doposud některé jeho kroky nejsou zcela objasněny.

Ten-eleven translokační enzymy umožňují konverzi 5-metylcytosinu na 5-hydroxymetylcytosin, a dále na 5-formylcytosin a 5-karboxylcytosin. Přítomnost 5-hydroxymetylcytosinu v promotorech genů naznačuje, že v genovém úseku dochází k procesu aktivní demethylace. Porovnání úrovně metylace v promotorové sekvenci *TET* genů a jejich exprese doposud nebylo u pacientů s mnohočetným myelomem zkoumáno. Stejně tak nebyl studován vliv exprese genů *TET* na celkovou úroveň metylačních a hydroxymetylačních změn v DNA.

2 CÍLE PRÁCE

- Práce s odbornou literaturou a vypracování literární rešerše na zadané téma;
- Izolace RNA a DNA z krevních aspirátů pacientů s mnohočetným myelomem;
- Příprava cDNA a následná expresní analýza genů *TET1*, *TET2* a *TET3* metodou kvantitativního PCR;
- Po restričním štěpení DNA enzymy MspI a HpaII kvantifikovat úroveň metylačních (5-mC) a hydroxymetylačních (5-hmC) změn u sledovaného souboru pacientů;
- Stanovení hladiny celkové metylace DNA a hydroxymetylace u jednotlivých vzorků DNA sledovaného souboru pacientů.

3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1 Diagnostika a charakteristika MM

Mnohočetný myelom (MM) se v anglické literatuře také označuje jako „plasma cell myeloma“ (PCM), medullary plasmacytoma, myelomatosis, myeloma. Jedná se o multifokální neoplastickou proliferaci plazmatických buněk, obvykle spojenou s přítomností M-proteinu v séru a/nebo moči, a přítomným poškozením orgánů v souvislosti s nadprodukcí nefunkčních intaktních imunoglobulinů nebo imunoglobulinových řetězců, viz tabulka 1 (Swerdlow a kol., 2017). Plazmatické buňky jsou diferencovaným stádiem B-lymfocytů, které vznikají po kontaktu B-lymfocytů se specifickými antigeny a mají schopnost produkce specifických protilátek (Pecka, 2002).

Tabulka 1. Diagnostická kritéria pro mnohočetný myelom (MM) a asymptomatický MM. Rentgen (RTG); výpočetní tomografie (CT); pozitronová emisní tomografie (PET); magnetická rezonance (MRI). Dle WHO (Swerdlow a kol., 2017); upravené dle kritérií International Myeloma Working Group.

MM

Procentuální zastoupení klonálních plazmatických buněk v kostní dřeni $\geq 10\%$ nebo biopsií potvrzený plasmocytom a ≥ 1 z následujících myelom-definujících událostí:

Orgánové poškození, přičitatelné poruše proliferace plazmatických buněk:

Hyperkalcémie: vápník v séru $> 0,25 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ($> 1 \text{ mg}\cdot\text{dl}^{-1}$) vyšší než normální horní limit nebo $> 2,75 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ($> 11 \text{ mg}\cdot\text{dl}^{-1}$)

Renální nedostatečnost: clearance kreatinu $< 40 \text{ ml/min}$ nebo kreatin v séru $> 177 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ($> 2 \text{ mg}\cdot\text{dl}^{-1}$)

Anémie: hodnota hemoglobinu $> 20 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ pod normálním dolním limitem nebo hodnota hemoglobinu $< 100 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$

Kostní léze: ≥ 1 nebo více kostních lézí na RTG snímku kostí, CT nebo PET/CT

≥ 1 nebo více z následujících biomarkerů malignit:

Procentuální zastoupení klonálních plazmatických buněk kostní dřeni $\geq 60\%$

Podíl volného lehkého řetězce ≥ 100

> 1 fokální léze na MRI

Asymptomatický MM

Musejí být splněny obě následující kritéria:

M-protein v séru (IgG nebo IgA) $\geq 30 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ nebo M-protein v moči $\geq 500 \text{ mg}/24 \text{ hod}$ a/nebo procentuální zastoupení klonálních plazmatických buněk 10% až 60%

Absence události definující myelom nebo amyloidózu

Mnohočetný myelom se vyskytuje u 10 % až 15 % všech hematopoetických malignit (Kyle a kol., 2003). V poměru 1,1:1 postihuje více mužů než žen. Medián věku pacientů při diagnóze je 70 let. Česká republika se s incidencí 4,8 případů na 100 000 obyvatel řadí mezi země se středním výskytem tohoto onemocnění v Evropě (data z roku 2014: Malúšková a kol., 2017). Zvýšený výskyt mnohočetného myelomu je spojován s expozicí specifickým toxickým látkám, radiaci nebo větší vnímavostí u pacientů s některými chronickými onemocněními (Lewis, 1963; Linet a kol., 1987). Mnohočetnému myelomu téměř u všech pacientů předchází monoklonální gamapatie nejasného původu (MGUS). Zvýšené riziko rozvoje MGUS je u jedinců s výskytem MM v rodině, a je také častěji pozorován u lidí africké, či afroamerické rasy (Kyle a kol., 2003; Brigle a Rogers, 2017). Kostní dřev je nejčastějším místem vzniku mnohočetného myelomu, sekundárně mohou být postiženy další orgány. Projevy mnohočetného myelomu jsou různé, od asymptomatických stádií po agresivní stadia. Typicky je přítomno celkové nebo vícečetné poškození kostní dřev. V místech aktivní hematopoézy bývají pozorovány lytické kostní léze. V pokročilém stadiu nemoci se obvykle vyskytují příznaky onemocnění mimo mikroprostředí kostní dřev. Onemocnění se vyznačuje příznaky, jež jsou souhrnně označovány jako CRAB: hyperkalcémie, renální selhání, anémie a kostní léze. Bolest kostí a hyperkalcémie jsou výsledkem lytických lézí a osteoporózy, v důsledku nahrazení kostního mikroprostředí myelomovými buňkami. Anémie nastává v důsledku poškození kostní dřev a ledvin. K selhání ledvin dochází poškozením ledvinných tubulů akumulací M-proteinu, označovaného také jako Bence Jonesův protein, produkovaného plazmocytoidními buňkami u 97 % pacientů. Produkovaný M-protein je u 50 % případů tvořen IgG; u 20 % IgA; u 20 % lehkým řetězcem κ nebo λ a v <10 % IgD, IgE a IgM. Výjimečně, asi u 3 % pacientů není sekretický nález v moči ani krvi. U 90 % pacientů MM se vyskytuje snížená hladina polyklonálních protilátek na <50 % normálního stavu. Mezi další nálezy patří přidružená infekce, krvácení nebo neurologické projevy (Kyle a kol., 2003; Swerdlow a kol., 2017).

Základní zobrazovací metodou je rentgenový snímek, kde jsou patrné kostní léze u 70 % pacientů. Mimo kostní léze mohou být přítomny patologické fraktury, kompresní fraktury obratlů nebo řídnutí kostní tkáně, osteoporóza. Nejčastěji zasaženými kostmi jsou obratle, žebra, lebka, lopatky a pánev. Mikroskopické vyšetření se provádí biopsií kostní dřev. Monoklonální plazmatické buňky mohou být rozptýlené, v malých klastrech, ve fokálních nodulech nebo v rozptýlených štítech (Bartl a kol., 1987). Vlivem narušení kostní dřev dochází ke snížení hematopoézy. Pro diagnostiku mnohočetného myelomu je důležitou metodou imunohistochemie. Metoda umožňuje kvantifikaci plazmatických buněk z biopsie,

při níž se využívá značení CD138+. Klonalita bývá obvykle detekována značením Ig kappa a lambda lehkých řetězců. Pro detekci neoplastických plazmatických buněk může být také použito značení CD56 a KIT (CD117). Z odběru aspirátu kostní dřeně se posuzuje vzhled plazmatických buněk. Kromě vyzrálých forem myelomových plazmatických buněk, které jsou od standardních typů obtížně odlišitelné, se mohou vyskytovat plazmablastické nebo pleomorfní buňky. Spolehlivým markerem pro detekci neoplastických plazmatických buněk jsou jaderná nevyzrálost a mnohotvárnost, které nejsou téměř nikdy pozorovány u reaktivních plazmatických buněk. Snížená hladina povrchových imunoglobulinů je detekována pomocí imunofenotypizace, která umožňuje detekovat přítomnost monotypických cytoplazmatických imunoglobulinů. Buňky exprimují CD38, a exprese CD138 je výraznější než u normálních plazmatických buněk. Stejně tak, byla zjištěna nadměrná exprese antigenů zahrnujících CD56, CD200, CD28, CD117, CD20, CD52 a CD10. Naopak negativní nebo snížené signály oproti standardním buňkám jsou u CD45, CD19, CD27 a CD8 (Lin a kol., 2004; Bataille a kol., 2006; Bataille a kol., 2008).

3.1.1 Genetika a MM

Pro mnohočetný myelom je charakteristická genetická nestabilita. Abnormality jsou numerické (hyperdiploidie) a strukturní (non-hyperdiploidie). Hyperdiploidní abnormality, vyskytující se u 45 % případů, nejčastěji zahrnují trisomii lichých chromozomů 3, 5, 7, 9, 11, 15, 19, 21. Non-hyperdiploidní abnormality se vyskytují u 40 % pacientů, a u většiny je přítomna chromozomová translokace lokusu *IGH* (14q32). Do translokace bývá zapojeno 7 onkogenů, shrnutých v tabulce 2 (Fonseca a kol., 2009; Swerdlow a kol., 2017).

Tabulka 2. Molekulárně-cytogenetická klasifikace MM (Fonseca a kol., 2009).

Translokační partner lokusu <i>IGH</i>	Zkratka	Pozice	Četnost případů
Geny pro cykliny D1/D2/D3	<i>CCND1</i>	11q13	16 %
	<i>CCND3</i>	6p21	2 %
	<i>CCND2</i>	12p13	<1 %
Gen pro doménu SET 2 mnohočetného myelomu	<i>NSD2 (MMSET)</i>	4p16	15 %
Geny pro transkripční faktory rodiny MAF	<i>MAF</i>	16q23	5 %
	<i>MAFB</i>	20q11	2 %
	<i>MAFA</i>	8q24	<1 %

Průvodním jevem onemocnění je *IGH* translokace nebo hyperdiploidie (Kuehl a Bergsagel, 2012). Cytogenetická analýza vzorků kostní dřeně metodou FISH (fluorescenční *in situ* hybridizace) je nezbytná pro stanovení léčebné strategie. U poloviny případů se vyskytuje monosomie, či parciální delece chromozomu 13 (13q14). V některých případech byla pozorována jako jedna z prvotních událostí, u některých pacientů byla detekována až při progresi onemocnění. U téměř poloviny pacientů je přítomno přemístění lokusu *MYC*. Translokace genu *MYC* do blízkosti „super-enhancerů“ specifických pro plazmatické buňky (např. *IGH*; *IGK*; *IGL*-enhancery) může způsobovat progresi z MGUS do stádia MM. Ve studii Pawlyn a kol. (2016) byla u 53 % pacientů s MM identifikována mutace v genech ovlivňujících epigenetické modifikace. Z toho u 4 % pacientů byla mutace přítomna v genech ovlivňujících DNA metylaci: *IDH*, *TETs*, *DNMTs*. Mutace v těchto genech jsou spojeny s horší prognózou onemocnění (Lohr a kol., 2012; Swerdlow a kol., 2017).

3.1.2 Prognóza

Mnohočetný myelom je doposud nevléčitelné onemocnění, nové léčebné strategie však umožňují zlepšení kvality a délky života pacientů. Medián přežití je cca 5,5 let. U nejvíce progresivních případů je délka přežití kratší než 6 měsíců, naopak u nejméně progresivních případů může dosahovat až 10 let. Zhodnocení prognózy pacienta se řídí dvěma postupy. Dle „International staging“ systému je pacient zařazen do skupiny I–III, podle hladin β -2-mikroglobulinu a albuminu v krevním séru před léčbou. Při druhé analýze je pomocí metody FISH stanoven genetický profil, na jehož základě je pacient zařazen do skupiny se standardním rizikem (60 %), se středním rizikem (20 %), nebo s vysokým rizikem (20 %). Delece úseku kódující tumor supresorový gen *TP53* (17p13.1), nebo translokace genu *MAF* t(14;16) a t(14;20) jsou spojovány s horší prognózou (Dispenzieri a kol., 2013; Rajkumar a kol., 2014).

3.1.3 Varianty myelomu plazmatických buněk

3.1.3.1 Asymptomatický (smoldering) mnohočetný myelom

Pro „doutnající“ (smoldering) mnohočetný myelom (SMM) je charakteristické 10 % až 60% zastoupení klonálních plazmatických buněk kostní dřeně a/nebo charakteristický nález M-proteinu v krevním séru/moči, ale oproti MM absence CRAB a amyloidózy. Absencí klinických projevů je SMM podobný MGUS, ale oproti MGUS u něj dochází častěji

k progresi onemocnění do stádia MM. U více než 83 % pacientů je redukována četnost normálních imunoglobulinů, a u 53 % pacientů jsou detekovány monoklonální lehké řetězce v moči. Pravděpodobnost progresu v MM je v prvních 5 letech 10 % případů ročně, v následujících 5 letech 3 % případů ročně a poté 1 % ročně. Jako vysoce rizikové faktory vedoucí k progresi onemocnění jsou více než 60 % zastoupení klonálních plazmatických buněk kostní dřeně, abnormálně pozměněný poměr lehkých řetězců (>100), nebo přítomnost více než 2 kostních lézí (Kyle a kol., 2003; Swerdlow a kol., 2017).

3.1.3.2 Nesekreční myelom

Forma nesekrečního myelomu se vyskytuje u 1 % pacientů s MM která se projevuje absencí M-proteinu. U 2/3 těchto případů byl však detekován abnormální poměr lehkých řetězců a/nebo zvýšená přítomnost volného lehkého řetězce v séru, což naznačuje, že mnoho z těchto případů je alespoň minimálně sekrečních, tedy produkujících alespoň jeden typ abnormálního imunoglobulinu. Prognóza a genetika nesekrečního myelomu je stejná jako u jiných forem MM, ale délka přežití se zdá být lepší u pacientů se zachovaným poměrem lehkých řetězců (Dul a Argon, 1990; Drayson a kol., 2001).

3.1.3.3 Leukémie plazmatických buněk

Leukémie plazmatických buněk je forma MM, kdy klonální plazmatické buňky představují >20 % celkových leukocytů v krvi, nebo je jejich četnost $>2 \cdot 10^9/l$. Neoplastické plazmatické buňky nejsou obvykle závislé na mikroprostředí kostní dřeně a mohou být přítomny v játrech, slezině nebo míšní tekutině. Primární leukémie plazmatických buněk je diagnostikována u 1 % až 3 % MM. Sekundární leukémie plazmatických buněk nastává u průměrně 1 % případů, původně diagnostikovaných jako MM. Oproti ostatním druhům myelomů se liší nižším mediánem věku pacientů při diagnóze, renálním poškozením, častým zvětšením orgánů a uzlin. Méně časté jsou pak bolesti kostí a lytické kostní léze. Leukémie plazmatických buněk je agresivní formou MM s relativně krátkým časem přežití (Avet-Loiseau a kol., 2001; Sahara a kol., 2002; Swerdlow a kol., 2017).

3.2 CD138

Pro studium malignit plazmatických buněk je nezbytným krokem jejich separace od ostatních buněk kostní dřeně. Procento plazmatických buněk v kostní dřeni je velmi heterogenní v závislosti na stádiu onemocnění, od MGUS po MM. Pro získání čisté populace

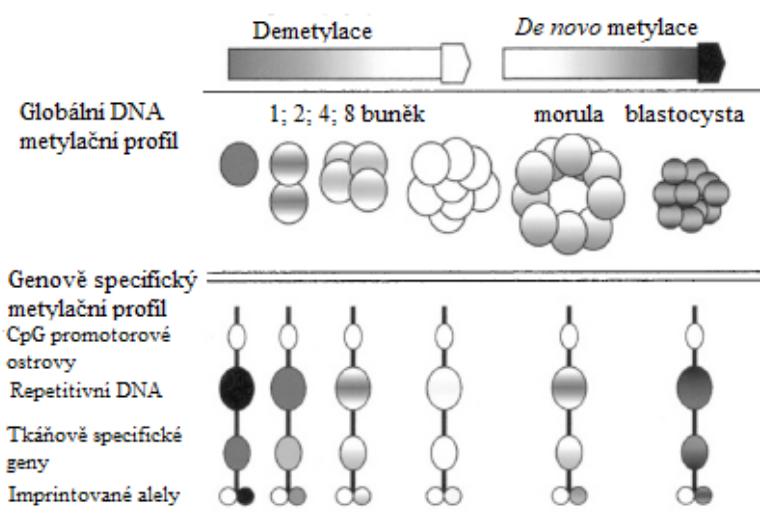
plazmatických buněk se využívá separace s použitím monoklonálních protilátek cílených proti markerům na povrchu plazmatických buněk, značených magnetickými částicemi: MACS, nebo flourochromy: FACS (Burešová a kol., 2012). U většiny maligních plazmatických buněk byla detekována exprese syndekanu-1 (Ridley a kol., 1993), který se dnes využívá jako citlivý povrchový marker s označením CD138 (Burešová a kol., 2012). Syndekan-1 je transmembránový protein, patřící do rodiny syndekanových proteoglykanů (NCBI-Gene). V kostní dřeni se syndekan vyskytuje na prekurzorech B-lymfocytů a před uvolněním B-lymfocytů do krevního oběhu je exprese syndekanu utlumena a znovu obnovena až při diferenciaci v imobilizované plazmatické buňky (Sanderson a kol., 1989). Ve studii Dhodapkar a kol. (1998) bylo identifikován hned několik buněčných funkcí syndekanu-1. První z nich je indukce apoptózy po uvolnění extracelulární domény z povrchu myelomových buněk. Syndekan-1 dále ovlivňuje buňky v nádorovém mikroprostředí inhibicí osteoklastů a podporou diferenciaci osteoblastů. Umožňuje vazbu mezi buňkami, mezi buňkou a extracelulární matrix a zprostředkovává cytoskeletální organizaci (Sanderson a kol., 1989). V souladu s tím, bylo potvrzeno, že se na tento receptor mohou vázat stovky proteinů, včetně integrinů, růstových faktorů, cytokinů, chemokinů a proteinů extracelulární matrix (McCarron a kol., 2017). Vyšší exprese syndekanu-1 uděluje selektivní výhodu plně zralým plazmatickým buňkám oproti méně zralým a nově vznikajícím buňkám pomocí zvýšené intenzity cytokinové signalizace, důležité pro přežití. Vysoká exprese markeru CD138 byla detekována v epiteliálních buňkách, a naopak jeho nižší úroveň exprese byla detekována u fibroblastů a v endoteliálních buňkách (McCarron a kol., 2017). Z tohoto důvodů se v posledních letech hledaly markery pro izolaci více homogenní populace plazmatických buněk. Ve studii Halliley a kol. (2015) byla popsána izolace dlouho žijící plazmatické buňky z lidské kostní dřeni pomocí značení CD19-, CD38+ a CD138+.

3.3 Epigenetika

Epigenetika byla dle Das a Singal (2004) definována jako stabilní změna potenciálu genové exprese, ke které dochází během vývoje a buněčné proliferace, bez změny v genové sekvenci.

3.3.1 Metylace DNA

Metylace cytosinu v dinukleotidech CpG (fosfodiesterová vazba mezi cytosinem a guaninem) nastává přidáním metylové skupiny z donoru S-adenosyl-L-methioninu na 5' uhlík cytosinu působením enzymů DNA metyltransferáz (DNMTs). V lidském genomu byly identifikovány tři geny pro DNA metyltransferázy: *DNMT1*, *DNMT3A* a *DNMT3B* (Bestor a Ingram, 1983; Okano a kol., 1998; Clark a Melki, 2002). V roce 2016 byl identifikován nový gen pro metyltransferázu *DNMT3c*, který se vyvinul duplikací genu *DNMT3b* v genomu hlodavců, původně označený jako pseudogen. Jeho přítomnost je omezena pouze na hlodavce, v lidském genomu nebyl homolog doposud nalezen (Barau a kol., 2016). Exprese *DNMT3c* je specifická pro samčí zárodečné buňky, ve kterých zajišťuje metylaci retrotranspozonů během spermatogeneze (Ravichandrian a kol., 2017). Nepostradatelná role metylace DNA u savců byla potvrzena studii na myším modelu, při nichž byla delece genů kódující DNA metyltransferázy smrtelná (Li a kol., 1992; Okano a kol., 1999). Během replikace buňky je DNMT1, která metyluje dceřiné vlákno DNA podle vlákna původního, zachováván a přenášen metylační profil do další generace buněk (Holliday a Pugh, 1975). Afinita DNMT1 k hemimetylovaným vláknům je podle studie Song a kol. (2012), založena na rozpoznání metylové skupiny cytosinu hydrofobní kapsou katalytické domény enzymu. V několika prvních buněčných děleních oplodněného oocyty je rodičovská DNA demetylována. Před nidací, uhnížděním, blastocysty dochází k *de novo* metylaci specifických CpG míst pomocí enzymů DNMT3A a DNMT3B (Howlett a Reik, 1991; Mayer a kol., 2000), viz obrázek 1. *De novo* metylace se uplatňuje také během dozrávání zárodečných buněk (Ravichandrian a kol., 2017).



Obrázek 1. Metylační profil vyvíjejícího se embrya (převzato z: Clark a Melki, 2002).

Během raného embryonálního vývoje jsou repetitivní sekvence, obsahující až 35 % genomu, obecně hypermetylované, stejně jako oblasti kódující geny a promotory tkáňově specifických genů (Yoder a kol., 1997). Naopak ostrůvky CpG zůstávají během embryonálního vývoje nemetylované (Clark a Melki, 2002). V souladu s tím byla prokázána vysoká aktivita DNMT3 mimo ostrůvky CpG v embryonálních kmenových buňkách, indukujících pluripotentní buňky, v oocytech a v mozku. Naopak aktivita DNMT1 je mimo ostrůvky CpG velmi nízká (Ravichandrian a kol., 2017). Ostrůvky CpG jsou úseky DNA, které mají přibližně pětikrát vyšší výskyt dinukleotidů CpG než jiná místa v genomu. Jejich délka je v rozmezí 200 bp až několik kb a tvoří 1 % až 2 % genomu (Gardiner-Garden a Frommer, 1987). Přibližně 50 % až 60 % všech anotovaných genů obsahuje promotory s obsahem ostrůvků CpG (Antequera a Bird, 1993). Obecně platí, že metylované promotory bývají spojovány s inaktivními geny, nemetylované promotory naopak s geny aktivními. Jak bylo uvedeno výše, v embryu je většina ostrůvků CpG chráněna před metylací, ale malá frakce ostrůvků CpG metylaci podléhá. Příkladem jsou ostrůvky CpG inaktivního chromozomu X a promotorů imprintovaných genů (Bird, 1986; Smith a Meissner, 2013; Ravichandrian a kol., 2017). Předpokládanou hlavní rolí metylace DNA u savců je regulace genové transkripce inaktivací promotorů a enhancerů. Mechanismus potlačení transkripce genů pomocí metylace, je popsán na základě tří modelů. První model vychází z nemožnosti vazby mezi specifickými transkripčními faktory a metylovaným úsekem DNA (Iguchi-Arigo a Schaffner, 1989; Molloy a Watt, 1997). Transkripční faktory AP-2, c-Myc/Myn, CREB, E2F a NFkB rozpoznávají sekvence CpG a jejich vazba tak může být inhibována metylací úseku DNA (Tate a Bird, 1993). Druhý model vychází z přímé vazby specifických transkripčních represorů na metylovanou DNA. Proteiny, které rozpoznávají metylovanou DNA se označují jako MBP (methyl-binding proteins), obsahují motiv zinkových prstů (ZnF), doménu SRA a doménu zprostředkující vazbu mezi metylovou skupinou a místem CpG. Do rodiny proteinů MBP patří MeCP1, MeCP2, MBD1, MBD2, MBD4 a Kaiso. Mechanismus vazby Kaiso se od ostatních proteinů, vážících se vazebnou doménou mezi metylovou skupinou a CpG, liší vazbou prostřednictvím motivu zinkových prstů (Prokhortchouk a kol., 2001; Chiarella a kol., 2020). Umlčení transkripce nastává po vazbě MBD1, MBD2, MeCP2 a Kaiso vlivem vazby s komplexy histonových deacetyláz (Prokhortchouk a Hendrich, 2002; Chiarella a kol., 2020). Pomocí metylace DNA může také dojít k ovlivnění modifikace histonu a následná kondenzace chromatinu způsobí nepřístupnost DNA. Na tomto principu je založen třetí model (Nan a kol., 1998). Dříve se

předpokládalo, že modifikaci histonu vždy předchází metylace DNA, ale studie Tamaru a Selker (2001) objasnila, že modifikace histonu může naopak zahájit proces metylace DNA.

3.3.2 Strukturní organizace DNMTs

Na N-terminálním konci DNMTs se nachází rozsáhlá jednotka s regulační funkcí, obsahující řadu domén vázajících chromatin a interagující s proteiny. Na C-terminálním konci se nachází menší katalytická jednotka, důležitá pro vazbu kofaktoru S-adenosyl-L-metioninu a substrátu DNA a pro jejich následnou katalýzu. Podle strukturních podobností se DNA metyltransferázy rozdělují do dvou skupin na DNMT1 a DNMT3. DNMT1 na svém N-terminálním konci obsahuje několik funkčních domén: DMAP1 (DNMT-associated protein 1) doména umožňuje specifické cílení do místa replikace; PCNA (proliferating cell nuclear antigen) vazebná doména je zodpovědná za nábor DNMT1 do replikační vidličky během S fáze; RFTD (replication foci-targeting) doména cílí DNMT1 do replikačního místa, či do místa centromerického chromatinu. Úloha domény CXXC je ve zprostředkování vazby s úsekem nemetylované DNA. Její molekulární funkce zůstávají však doposud neobjasněny, stejně jako funkce domén BAH1 a BAH2 (bromo-adjacent homology 1/2), které jsou zodpovědné za správné strukturování enzymů. C-terminální doména DNMT1 má katalytickou funkci a je s ostatními doménami spojena pomocí lysin-glycinových repetitiv (Margot a kol., 2003; Bashtryko a kol., 2012; Ravichandrian a kol., 2017). Skupina DNMT3 se skládá ze 3 členů: DNMT3A; DNMT3B a DNMT3c. Na N-terminálním konci se nachází 2 domény: ADD a PWWP. Doména ADD je zodpovědná za rozpoznání a vazbu k nemetylovanému lysinu K4 na histonu H3. Doména PWWP, která není přítomna v DNMT3c, je zásadní pro cílení enzymu do pericentromerické oblasti chromatinu či genu, pomocí interakce s trimetylovanými lysiny K36 histonu H3. C-terminální konce všech DNMT3 jsou z 80 % homologní a obsahují katalytické centrum enzymu (Li a kol., 2011; Neri a kol., 2017; Ravichandrian a kol., 2017).

3.3.3 Metylační změny u onkologických onemocnění

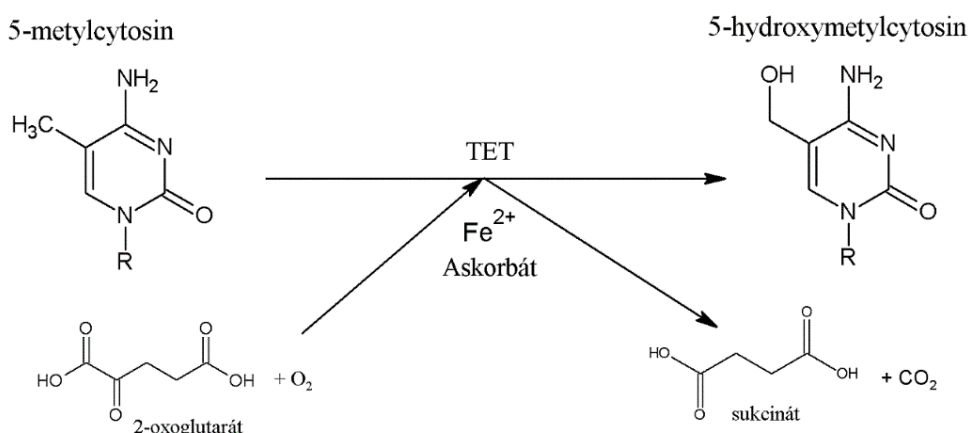
Jako původní předpoklad k nádorové transformaci bylo považováno poškození genomu, způsobené ztrátou, ziskem či mutací genetické informace. Změna v expresi genů však může nastat i v důsledku metylace DNA, která je zmiňována jako jedna ze dvou příčin v Knudsonově teorii onkogenní transformace (Das a Singal, 2004). Repetitivní sekvence, které jsou za normálních podmínek hypermetylovány, se stávají hypometylovány, proto mají

nádorové buňky pozměněný metylační profil. Příčina hypometylace není zatím zcela objasněna. Jednou z možností jsou nefunkční DNMTs, nutriční nedostatečnost kyseliny listové nebo deregulace enzymů TET, jež jsou zodpovědné za demetylaci (Clark a Melki, 2002). Hypometylace může být příčinou aktivace některých onkogenů (např. *cMYC* nebo *H-RAS*). Dále může docházet k aktivaci latentních retrotranspozonů (např. LINE), která může vést k narušení exprese blízkého genu. Hypometylace také způsobuje chromozomální nestabilitu. Opačným případem změny metylačního profilu nádorových buněk je hypermetylace. Důsledkem hypermetylace může být umlčení genové transkripce, které jsou za normálních podmínek exprimovány. Mezi tyto geny patří „housekeepingové“ geny nebo tumor-supresorové geny. Citlivé k hypermetylaci jsou geny regulující buněčný cyklus (např. *Rb*), geny asociované s opravami DNA (např. *BRCA1*), geny asociované s apoptózou, rezistencí na léčiva, detoxikací, angiogenezí, diferenciací a metastázováním (Das a Singal, 2004).

3.3.4 TET a 5-hmC

V oblastech genů je častý společný výskyt 5-mC (5-metyl cytosin) a 5-hmC (5-hydroxymetyl cytosin), nicméně byla pozorována i odlišná distribuce těchto cytosinových modifikací v rámci genomu. 5-mC je hojně zastoupen v heterochromatinových sekvencích, ve kterých je 5-hmC přítomen pouze zřídka. Naopak 5-hmC je bohatě přítomen v sekvencích promotorů (Williams a kol., 2011; Wu a kol., 2011). 5-hmC může vzniknout pouze z již přítomného 5-mC působením TET proteinů (Williams a kol., 2011). Proteiny TET jsou 2-oxoglutarát (2-OG) a Fe^{II} dependentní metylcytosin dioxigenázy, které umožňují konverzi 5-metylcytosinu (5-mC) na 5-hydroxymetylcytosin (5-hmC), viz obrázek 2, a při další oxidaci poskytují 5-formylcytosin (5-fC) a 5-karboxylcytosin (5-caC) (Tahiliani a kol., 2009; Ko a kol., 2010; Ito a kol., 2011; He a kol., 2011). Na C-terminální části TET enzymů se nachází katalytická jednotka s doménou DSHB (double-stranded- β -helix) a doménou bohatou na cystein. Funkce katalytické jednotky je závislá na interakci s Fe^{II} a 2-OG. Na N-terminální části TET1 a TET3 je CXXC doména s motivem zinkových prstů, která umožňuje vazbu na DNA (Rasmussen a Helin, 2017). Katalytická doména proteinu TET2 interaguje s DNA pomocí samostatného proteinu IDAX (Ko a kol., 2013). TET enzymy můžeme zařadit k faktorům, jež jsou nezbytné pro udržování rovnováhy epigenetických modifikací buňky. Jednou z možných funkcí TET enzymů je blokování navázání metyl-vazebných proteinů (MBP), nerozpoznáním 5-hmC. Další funkcí je proces pasivní

demetylace, při němž není 5-hmC rozpoznán DNMT1 během replikace a nedochází tedy k metylaci nově vzniklého vlákna. 5-hmC je také zapojen do procesu aktivní demetylace, kde je jejím meziproduktem, viz kapitola 3.3.4.1 (Williams a kol., 2011). Přesto není 5-hmC díky jeho malé četnosti v rámci genomu považován za stabilní epigenetickou modifikaci (Rasmussen a Helin, 2017). Mezi proteiny, schopnými interakce s 5-mC a zároveň 5-hmC, bylo pozorováno malé překrytí. Mezi tyto proteiny patří MeCP2, Uhrf1 a Thy28, přičemž MeCP2 má vyšší afinitu vůči 5-mC. Na 5-hmC se váží proteiny Mpg a Neil3, patřící mezi DNA glykosylázy a RecqI helikázový protein, což potvrzuje teorii, že 5-hmC je meziproduktem v procesu aktivní demetylace, ve které tyto proteiny mohou zprostředkovávat báze excisní opravy (BER) (Spruijt a kol., 2013). Ve studii Dawlaty a kol. (2014) byly zkoumány myší embryonální buňky s vyřazenými (knock-out) *TET* geny vzhledem k jejich vývojovému potenciálu. Vyřazení *TET* genů z funkce se projevovalo chybami v buněčné diferenciaci, způsobené hypermetylacemi v promotorech genů zapojených do embryonálního vývoje a diferenciaci. I přes zvýšenou globální metylační úroveň byla embrya s vyřazenými *TET* geny životaschopná.



Obrázek 2. Konverze 5-mC na 5-hmC. Po vazbě kofaktoru a substrátu molekulární kyslík oxiduje Fe²⁺, což indukuje oxidaci substrátu a dekarboxylaci 2-OG na sukcinát a CO₂.

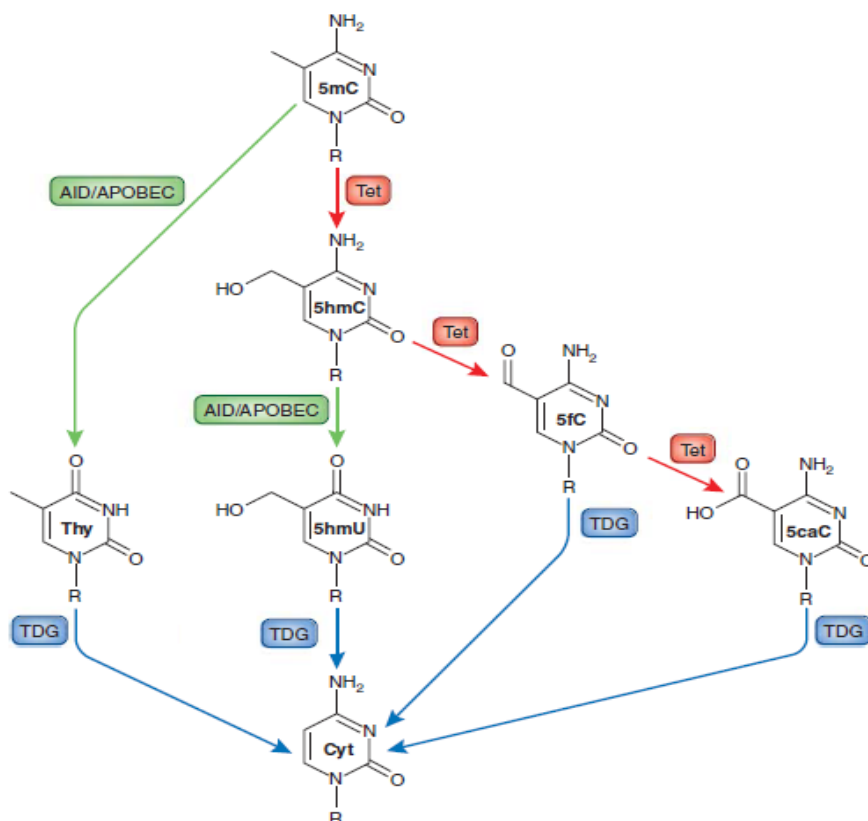
3.3.4.1 Aktivní demetylace

Proces aktivní demetylace byl popsán ve studii Tahiliani a kol. (2009), kde enzymy TET oxidují 5-mC na 5-hmC. Bylo také pozorováno, že katalytická doména TET1 byla schopná oxidace 5-mC na 5-hmC na hemimetylovaném vlákně. Pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií (HPLC-MS) byla detekována nová báze 5-fC, vznikající oxidací 5-hmC, jejíž signifikantní snížení souvisí s vývojovým stádiem buňky (Pfaffeneder a kol., 2011). S využitím HPLC-MS byla v genomu také detekována

báze 5-caC, vznikající oxidací 5-fC (He a kol., 2011). Bylo prokázáno, že 5-fC a 5-caC mohou být specificky rozpoznány thymin-DNA-glykosylázou (TDG) a následně štěpeny. V souladu s tím, vyřazení TDG z funkce vedlo v myších embryonálních kmenových buňkách k akumulaci 5-caC, což poukazuje na proces oxidace 5-mC pomocí TET, a následně na báze excisní opravu řízenou TDG, jako proces aktivní demethylace. (He a kol., 2011). TDG je enzym, který odstraňuje chyby v párování mezi T–G, U–G a v tomto případě dokáže odstranit modifikovanou bázi z páru 5-fC–G nebo 5-caC–G a nahradit ji nemodifikovaným cytosinem. DNA glykosylázy katalyzují hydrolyzu N-glykosidových vazeb, za vzniku abazického místa AP (apurinového/apyrimidinového). Toto místo je rozpoznáno endonukleázami AP, které hydrolyzují fosfodiesterovou vazbu dsDNA. Zapojením různých druhů DNA polymeráz se uplatňují 2 způsoby opravy: krátká a dlouhá. V případě krátké opravy je zařazen nemodifikovaný cytosin. V případě dlouhé opravy štěpí DNA polymeráza β dva a více původních nukleotidů, a na jejich místo syntetizuje nové. Vlákno je následně spojeno pomocí DNA ligázy I/III (Robertson a kol., 2009). Savčí TDG postrádá schopnost štěpit 5-mC (Li a kol., 2011; Lio a kol., 2019).

V procesu aktivní demethylace, může být 5-mC, mimo metylovou skupinu, chemicky modifikován také na aminoskupině. Aminoskupina může podléhat deaminaci za vzniku karbonylové skupiny pomocí aktivačně indukované cytidin deaminázy/apolipoprotein B mRNA-editujícího enzymového komplexu (AID/APOBEC) konvertující 5-mC na thymin. Vzniká nesprávné párování mezi G–T a pomocí BER, např. TDG, je štěpen thymin a zařazen nemodifikovaný cytosin (Moore a kol., 2013). Proces aktivní demethylace je shrnut v obrázku 3.

Dle studie Popp a kol. (2010) byly myši s vyřazeným *AID* genem životaschopné a plodné, což je nejspíše kompenzováno existencí druhého, výše popsaného mechanismu aktivní demethylace. Pomocí nově modifikované metody metylace a následného bisulfitového sekvenování (MAB-seq), byly mapovány modifikace 5-fC a 5-caC v genomu myších embryonálních kmenových buněk (Neri a kol., 2015). V souladu s předchozími znalostmi byly tyto báze detekovány v místech enhancerů a repetitivních regionů. Mimo to, byly modifikace detekovány také v promotorech vysoce exprimovaných genů, což potvrzuje teorii procesu aktivní demethylace a vysvětluje výskyt TET proteinů v těchto oblastech.



Obrázek 3. Signální dráhy aktivní DNA demethylace. 5-mC bývá chemicky modifikován na dvou místech: aminoskupině (NH_2) a metylové skupině (CH_3). Aminoskupina může být deaminována pomocí AID/APOBEC na thymin. Metylová skupina může být modifikována přidáním hydroxylové skupiny pomocí TET enzymů. Vzniklý 5-hmC může být opět deaminován pomocí AID/APOBEC na hydroxymetyl-uracil (5hmU), nebo může podléhat další oxidaci pomocí TET enzymů, za vzniku 5-formyl-cytosinu (5fC) a dále 5-karboxy-cytosinu (5caC). Produkty 5-hmU, 5-fC a 5-caC mohou být rozpoznány a nahrazeny nemodifikovaným cytosinem pomocí BER (base excision repair) zprostředkované thymin-DNA-glukosylázou (TDG) (převzato: Moore, 2013).

3.3.4.2 TET1

TET metylcytosin dioxygenáza 1 je v lidském genomu lokalizována v pozici 10q21.3, viz tabulka 3, a byla detekována jako fúzní partner genu *MLL* u myeloidní akutní leukémie (Ono a kol., 2002). TET1 vykazuje tkáňovou specifitu, je exprimována především v embryonálních kmenových buňkách a primordiálních zárodečných buňkách, a její exprese během diferenciaci obecně klesá (Tahiliani a kol., 2009; Melamed a kol., 2018). Dle studie Wu a kol. (2011) bylo v myších embryonálních buňkách prokázáno, že enzym TET1 je přednostně vázán do úseků CpG v promotorech transkripčně aktivních genů, kde zprostředkovává hypometylaci, důležitou pro udržení jejich exprese. V souladu s tím, byla detekována přítomnost 5-hmC v sekvencích se vysokou frekvencí genů (Williams a kol.,

2011; Wu a kol., 2011). Protein TET1 je také zapojen do signální dráhy umlčení vývojových genů komplexem Polycomb, usnadněním navázání proteinů Polycomb do promotoru genů bohatých na CpG úseky. Podle studie Cimmino a kol. (2015) může být *TET1* také tumor-supresorovým genem. Zvýšená schopnost sebeobnovy byla pozorována v progenitorových B-lymfocytech *in vitro* a v kmenových buňkách *in vivo* s vyřazeným (knock-out) genem *TET1*, přičemž TET1-deficientní B-lymfocyty měly zvýšené poškození DNA (Cimmino a kol., 2015). Další výzkumy s vyřazeným genem *TET1* vedly ke zjištění signifikantně snížené hladiny 5-hmC (Williams a kol., 2011; Wu a kol., 2011). Embryonální kmenové buňky s defektním *TET1* zůstávají pluripotentní a *TET1* „knock-out“ myši jsou životaschopné a plodné, i když vykazují sníženou velikost těla a vrhu, což naznačuje důležitou roli TET1 v embryonálním vývoji a gametogenezi (Dawlaty a kol., 2014).

3.3.4.3 TET2

Tet metylcytosin dioxygenáza 2 je v lidském genomu lokalizována v pozici 4q24, viz tabulka 3. TET2 je exprimována ve všech tkáních, včetně embryonálních kmenových buněk, kde umožňuje jejich diferenciaci (Tahiliani a kol., 2009; Koh a kol., 2011). Gen *TET2* je důležitý pro normální myelopoézu a mutace v *TET2* způsobují myeloidní i lymfoidní transformaci, především rozvoj chronické myelomonocytární leukémie, a to jak u myšičího modelu, tak u lidí (Ko a kol. 2010; Li a kol., 2011). Oproti tomu, studie Quivoron a kol. (2011) nepotvrdila mutaci v *TET2* genu u žádného z 22 pacientů s lymfoproliferativním onemocněním plazmatických buněk, které zahrnuje i MM. Dle studie Figueroa a kol. (2010), byl u pacientů trpících akutní myeloidní leukémií s vyřazenou (knock-out) funkcí *TET2*, prokázán hypermetylovaný fenotyp. TET2 a TET3 jsou stěžejní pro zrání vývojové linie B-lymfocytů. Buňky pre-B-lymfocytů s deficitem TET2/TET3 vykazovaly zvýšenou úroveň metylace CpG v promotoru genu pro lehký řetězec κ , a také na vzdálených enhancerech. Důsledkem hypermetylace je nízká úroveň genové transkripce a zablokování přeskupení genů lehkých řetězců. Obnovená exprese katalytické domény genu *TET2* v B-lymfocytech vede k demetylaci enhancerů *Igk* a obnovení dostupnosti chromatinu (Lio a kol., 2016; Browne a kol., 2017).

3.3.4.4 TET3

Tet metylcytosin dioxygenáza 3 je v lidském genomu lokalizována v pozici 2p13.1, viz tabulka 3. TET3 je, jako jediná z TET proteinů, přítomná bezprostředně po oplodnění

vajíčka a zprostředkovává celkovou oxidaci 5-mC v samčím pronukleu (Iqbal a kol., 2011). U raných embryí jsou procesem pasivní demetylace odstraňovány 5-mC v mateřském genomu a 5-hmC v otcovském genomu. Po implantaci embrya dochází u buněk vnitřní buněčné masy k nastavení nových metylačních vzorů pomocí *de novo* metylace (Melamed a kol., 2018). Funkce TET3 je také významná pro centrální nervový systém. U savců má 5-hmC nejvyšší zastoupení, kromě embryonálního stádia, v mozkové tkáni. Při zkoumání exprese genu *TET3* v neuronech bylo zjištěno, že její hladiny mohou snižovat/zvyšovat excitační synaptický přenos, tedy přenos neurotransmiterů mezi 2 neurony, nebo neuronem a jinou buňkou. Hladina GluR1, ionotropního receptoru pro přenos glutamátu, je v centrálním nervovém systému regulována oxidací DNA a následnou opravou, pomocí BER mechanismu. Aktivní demetylace DNA, zprostředkovaná TET3, má v neuronech základní roli ve fyziologii a plasticitě. (Yu a kol., 2015).

Tabulka 3. Charakteristika genů z rodiny *TET*. *TET1*: NM_030625.2; *TET2*- transkripční varianta 2: NM_017628.4; *TET3*- transkripční varianta 1: NM_001287491.2 (NCBI-gene).

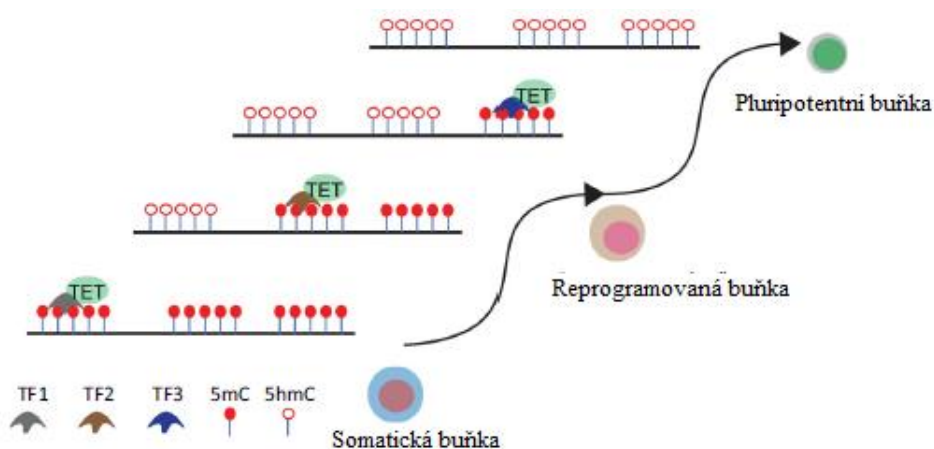
Gen (Homo sapiens)	Lokalizace genu	Délka bp	Počet exonů	Počet aminokyselin
<i>Tet methylcytosin dioxygenáza 1 (TET1)</i>	10q21.3	9612	20	2136
<i>Tet methylcytosin dioxygenáza 2 (TET2)</i>	4q24	9233	15	1165
<i>Tet methylcytosin dioxygenáza 3 (TET3)</i>	2p13.1	12060	17	1795

3.3.4.5 TET enzymy a hematopoetické onemocnění

Jak již bylo zmíněno výše, u hematopoetických onemocnění bývají často přítomny mutace v genu pro *TET2*. Kromě toho, může být také narušena dráha produkující 2-oxoglutarát, který je společně s Fe^{II} a O_2 nezbytný pro funkci enzymů TET. Somatické mutace v genech pro cytosolickou/mitochondriální izocitrát dehydrogenázu (IDH) umožní těmto enzymům produkci 2-hydroxyglutarátu, který je považován za onkometabolit, inhibující enzymy závislé na 2-oxoglutarátu. Enzymy TET mohou být také citlivé na přítomnost karcinogenních kovů (arsen, nikl, chrom), vytlačujících železo z vazby na katalytickou doménu nebo na reaktivní formy kyslíku (Figuroa a kol., 2010; Solary a kol., 2014).

3.3.4.6 Indukované pluripotentní kmenové buňky (iPSC)

Jelikož jsou proteiny TET spojovány s přirozenou diferenciací buněk, mohou být využity při procesu reprogramování, vzniku indukovaných pluripotentních kmenových buněk (iPSC). Reprogramování buněk přináší potenciál v léčbě různých onemocnění. Pro reprogramování jsou často využívány fibroblastové buňky pro jejich snadnou dostupnost. V roce 2006 byly popsány čtyři transkripční faktory, klíčové pro vznik iPSC: Oct3/4, Sox2, c-Myc a Klf4 (Takahashi a Yamanaka, 2006). V somatických buňkách jsou transkripční faktory, zodpovídající za pluripotenci, metylovány, tedy transkripčně umlčeny (Li a kol., 2018). Enzym TET1 podporuje demetylací a reaktivaci *Oct4*. Může také *Oct4* nahradit a indukovat tak proces přeprogramování buněk ve spojení s ostatními transkripčními faktory: Sox2, Klf4 a c-Myc (Gao a kol., 2013). Některé další transkripční faktory: Klf4, c-Myc mohou být nahrazeny TET proteiny, díky jejich schopnosti aktivní demetylace, a tedy reaktive genů zodpovědných za pluripotenci (Browne a kol., 2017). Byla pozorována interakce TET2 s transkripčním faktorem Klf4, jejich translokace do jádra a následné cílení TET2 do lokusu genu *Nanog*. V procesu reprogramování buněk probíhá aktivní demetylace kaskádovým způsobem, viz obrázek 4 (Di Stefano a kol., 2014; Li a kol., 2018). Pro uchování pluripotentního stavu je důležitá kontrola délek telomer, které napomáhají udržení genomové stability. Jednogenové „knock-out“ buňky pro *TET1*, nebo *TET2* vykazují sníženou expresi genů pro rekombinaci telomer, jako jsou: *Dmc1*, *Rad50* a *Smc1b*, a minimální změnu v expresi genů telomerázy (Yang a kol., 2016). Aktivita enzymu TET3 při generaci iPSC může být podpořena kultivací v prostředí se zvýšeným obsahem vitamínu C, který je jeho kofaktorem (Browne a kol., 2017).



Obrázek 4. Demetylační kinetika během přeprogramování pomocí transkripčních faktorů (TF) řídících skupinu proteinů TET. TF směřují proteiny TET k demetylací specifických míst chromatinu kaskádovým způsobem

s výsledným přeprogramování B-lymfocytů na indukované pluripotentní kmenové buňky (iPSC) (převzato z: Li a kol., 2018).

3.3.5 Význam epigenetiky u MM

Podle dat z posledních deseti let se epigenetické mechanismy jeví jako důležité faktory při progresi MM (Martinez-Garcia a kol., 2010; Agirre a kol., 2015; Alzrigat a kol., 2018). Mezi hlavní a nejčastěji studované epigenetické faktory patří metylace DNA, histonové modifikace a nekódující miRNA. Epigenetické změny u MM způsobují fenotypovou rozmanitost a mohou vést k rezistenci na léčbu. U nádorových buněk MM může docházet ke globální hypometylaci DNA, a naopak hypermetylaci v promotorových oblastech tumor supresorových genů (Liang a Weisenberger, 2017). Globální hypometylace DNA koreluje s progresí onemocnění a špatnou prognózou (Alzrigat a kol., 2018). Ve studii Agirre a kol. (2015) byla pozorována extrémní heterogenita ve středních hodnotách metylace, pohybující se od globální hypometylace ke globální hypermetylaci, ve srovnání s normálními plazmatickými buňkami, což je charakteristickým rysem MM. Při porovnání vzorků jedinců s MGUS se vzorky pacientů s MM byla heterogenita metylačního profilu výraznější u vzorků pacientů s MM, což naznačuje souvislost mezi různými stádii onemocnění. U jedinců s MGUS, MM i u myelomových buněčných linií byla pozorována hypometylace v promotorových úsecích některých genů, například Notch ligandu *JAG2*. *JAG2* zvyšuje sekreci interleukinu-6 (IL-6), vaskulárního endoteliálního růstového faktoru (VEGF) a IGF-1 (insulin like growth factor-1), což nasvědčuje, že nadměrná exprese *JAG2* může být časnou událostí v patogenezi MM (Houde a kol., 2004). Hypometylace promotorového úseku DNA byla také pozorována v genech pro ABC-transportéry (ATP-binding cassette). Nadměrná exprese *ABC-G2* vedla při chemoterapeutické léčbě ke zvýšenému odtoku léčiva z buněk a výsledné rezistenci na léčivo (Turner a kol., 2006). Druhým rysem onkologických onemocnění je hypermetylace promotorů tumor supresorových genů, řídících buněčný cyklus: *CDKN2B* (p15), *CDKN2A* (p16), *TP73* (p73); apoptózu: *DAPK*, *BCL2/BNIP3*, *BCL7c*, *GADD45*; opravy DNA: *MGMT*; adhezi buněk: *E-CAD*, *GJA1*, *AKAP12*, *DCC* a dalších (Galm a kol., 2004; Chim a kol., 2007). Jako časně události patogeneze jsou označovány hypermetylace promotorů tumor supresorových genů *SOCS-1* a *DAPK*. Hypermetylace promotorů *CDKN2A*, *SHP1* a *E-CAD* jsou asociovány s progresí z MGUS do MM (Chim a kol., 2007). Metylace DNA je úzce spojena s dalšími potenciálními epigenetickými regulátory MM jako jsou histonové modifikace a nekódující molekuly RNA (Alzrigat a kol., 2018).

4 MATERIÁL A METODY

4.1 Biologický materiál

- 19 vzorků aspirátů kostní dřeně (nesortovaná populace buněk) pacientů s diagnostikovaným mnohočetným myelomem (MM): 9 mužů a 8 žen, nebo s monoklonální gamapatií s neurčitým významem (MGUS): 1 muž a 1 žena, z hemato-onkologického oddělení fakultní nemocnice Olomouc. Pacienti byli nově diagnostikováni před zahájením léčby, nebo s relapsem po předchozí léčbě. Vzorky byly uchovávány zmrazené při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- 11 vzorků buněčných suspenzí po jejich sortování na povrchový marker CD138 pomocí průtokového cytometru (sortovaná populace buněk). Sortování buněk bylo provedeno po trepanobiopsii pánevní kosti. Celkem bylo použito 8 vzorků nově diagnostikovaných pacientů MM, nebo s relapsem onemocnění po předchozí léčbě: 7 mužů a 1 žena; 2 vzorky s diagnózou amyloidóza: 2 ženy a 1 vzorek pacientky s MGUS.
- Vzorek vícezdrojové RNA získaný ze vzorků kostní dřeně od 56 zdravých dárců asijské populace věkem 22–85 let (Human Bone Marrow Total RNA; kat. č. 636591, koncentrace $1\text{ }\mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$, Clontech)

4.2 Použité chemikálie, soupravy a roztoky

4.2.1 Použité chemikálie a roztoky

- 4-bromoanisol (Molecular Research Center, INC., kat. č. BN191, USA)
- ddH₂O
- DepcH₂O
- DNazol[®] (Molecular Research Center, INC., kat. č. TB127, USA)
- Etanol (98%, 75%)
- Isopropanol
- PBS roztok ($1,37\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl; $27\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ KCl; $18\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ KH₂PO₄; $100\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Na₂HPO₄; dH₂O; sterilizováno autoklávováním)
- RNase ZAP (Sigma-Aldrich, USA)
- 1x TE pufr ($1\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Tris HCl; $0,1\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ EDTA (ethylendiamintetraoctová kyselina); dH₂O; sterilizováno autoklávováním)
- Tri Reagent[®] BD (Molecular Research Center, INC., kat. č. TB126, USA)

- Sondy:
 - CD #66 (kat. č. 04688651001; Roche)
 - CD #25 (kat. č. 04686993001; Roche)
 - Sonda s primery B2M (TaqMan™ Gene Expression Assay (FAM); Hs00984230_m1; Applied Biosystems)
 - Sonda s primery TET1 (TaqMan™ Gene Expression Assay (FAM); Hs04189344_g1; Applied Biosystems)
- Primery pro expresní analýzu (Sigma Aldrich):
 - TET 2 (F: ACGCTTGGAAGCAGGAGAT; R: CAAGGCTGCCCTCTAGTTGAA)
 - TET 3 (F: CGCCTCTATCCGGGAACT; R: CTTCCCCGTGTAGATGACCT)
- Primery pro lokální metylační a hydroxymetylační analýzu (Sigma Aldrich):
 - TET 1 gl (F: ACTCCCTGAGGTCTGTCCTG; R: CAGGTAGGGCTGCATGACTT)
 - TET 2 gl (F: GAAGGTGGGCCGGGGCGG; R: GAGAGGGTGTGCTGCTGAAT)
 - TET 3 gl (F: AAAGGCCATGGTAGGAAGTG; R: TGAAGTAGCGCTGTCCAGAA)

4.2.2 Použité soupravy

- Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche, kat. č. 04897030001, Německo)
- Xceed qPCR Probe 2x Mix Lo-ROX (Institute of applied biotechnologies, kat. č. LPCR10506, Česká republika)
- QIAamp DNA Mini (Qiagen, kat. č. 51106, Německo)
- EpiMark 5-hmC and 5-mC Analysis Kit (New England BioLabs, kat. č. E3317S, USA)
- SsoAdvanced Universal SyberGreen Supermix (BIO-Rad, kat. č. 172-5271, USA)
- MethylFlash Methylated DNA 5-mC Quantification Kit Colorimetric (Epigentek; kat. č. P-1034; USA)
- MethylFlash Hydroxymethylated DNA 5-hmC Quantification Kit Colorimetric (Epigentek; kat. č. P-1036; USA)

4.3 Seznam použitých přístrojů a zařízení

- Centrifuga 3K30, Sigma
- Centrifuga LMC-3000, Biosan
- Centrifuga MiniSpin plus, Eppendorf
- Centrifuga Multi-spin PCV-3000, Grant-Bio

- Digestoř M/900 M2, Merci
- DNA/RNA UV-cleaner box UVC/T-AR, Biosan
- Inkubátor Dry Bath MD-02N, Major Science
- Light-Cykler 480, Roche
- Mikropipety Pipetman® Neo 0,2–1000 µl, Gilson
- Mikropipety Research® plus, 0,1–1000 µl, Eppendorf
- Mraznička 900 series froma, Thermo scientific
- Spektrafuga™ mini C1301-B, Labnet
- Spektrofotometr NanoDrop™-1000, Thermo Scientific
- Termocykler C-1000™, Bio-Rad
- UV/VIS Spektrofotometer PowerWave XS, BioTek
- Vortex mixer PV-1, Grant-Bio

4.4 Použité experimentální a vyhodnocovací postupy

4.4.1 Izolace genomové DNA

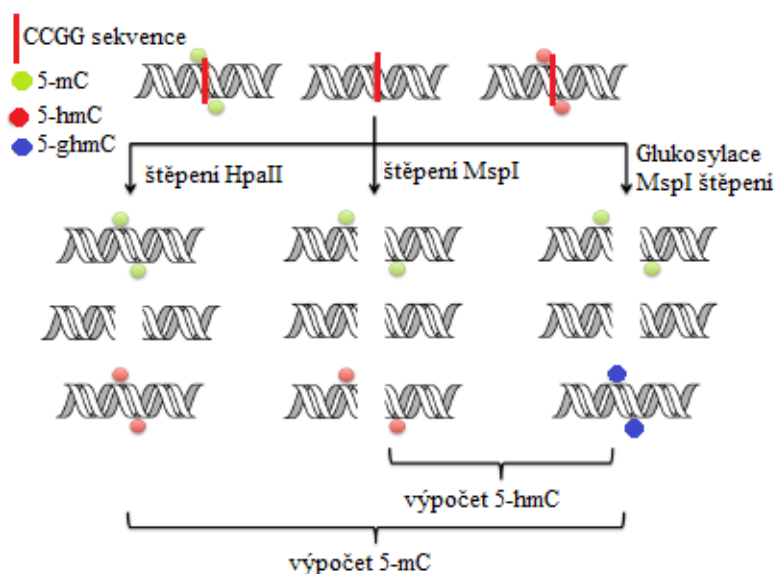
Genomová DNA byla izolována z aspirátů KD a sortovaných buněk CD138 pomocí QIAamp DNA Mini (Qiagen). Izolovaná DNA byla použita pro 3 druhy analýz: lokální metylační a hydroxymetylační analýzu, detekci globální metylace a detekci globální hydroxymetylace.

- Do mikrozkušavky o objemu 1,5 ml bylo pipetováno 20 µl QIAgen proteázy.
- Do zkumavky bylo přidáno 200 µl aspirátu KD, nebo 100 µl roztoku PBS s obsahem sortovaných buněk CD138.
- Do zkumavky bylo přidáno 200 µl pufru AL.
- Vzorek byl inkubován 10 min při 56 °C.
- Do zkumavky bylo přidáno 200 µl 98% ethanolu.
- Roztok byl nanesen na QIAamp Mini kolonu, umístěnou ve sběrné zkumavce o objemu 2 ml.
- Zkumavka byla centrifugována 1 min při 6 000 g.
- Kolona byla přenesena do čisté sběrné zkumavky o objemu 2 ml, filtrát byl odstraněn.
- Na kolonu bylo nanesen 500 µl pufru AW1.
- Zkumavka byla centrifugována 1 min při 6 000 g.
- Kolona byla umístěna do čisté sběrné zkumavky o objemu 2 ml, filtrát byl odstraněn.

- Na kolonu bylo naneseno 500 μ l pufru AW2.
- Zkumavka byla centrifugována 3 min při 20 000 g.
- Kolona byla umístěna do čisté sběrné zkumavky o objemu 2 ml, filtrát byl odstraněn, následovala centrifugace 1 min při 20 000 g.
- Kolona byla přenesena do čisté mikrozkušavky o objemu 1,5 ml.
- Na kolonu bylo naneseno 20–60 μ l pufru AE, byla inkubována 1 min při pokojové teplotě a následně byla centrifugována 1 min při 6 000 g.
- Pomocí spektrofotometru NanoDrop byla změřena koncentrace a čistota DNA.
- Izolovaná DNA byla uchována při -20 °C.

4.4.2 Lokální metylační a hydroxymetylační analýza

Hladiny 5-mC a 5-hmC u genů *TET1*, *TET2* a *TET3* byly analyzovány pomocí EpiMark 5-hmC and 5-mC Analysis Kit (New England BioLabs, USA). Využitím restričních endonukleáz citlivých na místa s obsahem 5-mC a 5-hmC. Genomová DNA byla glukosylována pomocí enzymu T4-glukosyltransferázy (T4-BGT) a UDP-glukózy. V dalších krocích byla DNA štěpena pomocí metylačně senzitivních restričních enzymů MspI a HpaII. MspI a HpaII jsou izoschizomery, které štěpí v sekvenci 5'-CCGG-3', ale mají odlišnou citlivost k modifikacím cytosinu. HpaII štěpí pouze nemodifikovaný cytosin, jakákoli modifikace cytosinu blokuje štěpení tohoto místa. Enzym MspI štěpí v přítomnosti 5-mC a 5-hmC, ale jeho aktivita je zablokována, pokud je 5-hmC glukosylován (5-ghmC). Glukosylaci DNA umožňuje přítomnost enzymu T4-glukosyltransferázy (T4-BGT). Tato reakce je nezávislá na nukleotidové sekvenci, a proto jsou všechny 5-hmC glukosylovány a nemodifikované cytosiny nebo 5-mC obsažené v DNA nejsou ovlivněny. Zastoupení 5-mC a 5-hmC v promotorových sekvencích studovaných genů byly kvantifikovány pomocí qPCR s primery, ohraničujícími sekvenci 5'-CCGG-3'. Pro stanovení hladin 5-mC a 5-hmC byly vyhodnoceny grafy amplifikačních křivek a pro kvantifikaci cytosinových modifikací byly porovnány Ct hodnoty z jednotlivých digescí, které byly normalizovány k neštěpené kontrole, viz obrázek 5.



Obrázek 5. Detekce 5-mC a 5-hmC pomocí restričních endonukleáz MspI a HpaII. HpaII štěpí pouze DNA, která obsahuje cytosin bez modifikace. MspI štěpí DNA, která obsahuje 5-mC a 5-hmC. Glukosylace 5-hmC, pomocí T4-BGT, dává vznik 5-ghmC, který inhibuje štěpení MspI. 5-hmC lze rozlišit porovnáním vzorku, ve kterém proběhla glukosylace a MspI štěpení, oproti vzorku pouze se štěpením MspI. 5-mC lze rozlišit porovnáním vzorku, ve kterém proběhla glukosylace a štěpení MspI, oproti vzorku pouze se štěpením HpaII (Booth, M. Raiber a S. Balasubramanian, 2014).

DNA glukosylace a kontrolní reakce

- Byla připravena reakční směs, viz tabulka 4.
- Reakční směs byla rozdělena do dvou mikrozkušavek o objemu 1,5 ml po 155 μ l.
- Do jedné zkumavky byly pipetovány 3 μ l T4-BGT ($10 \text{ U} \cdot \mu\text{l}^{-1}$).
- Do druhé zkumavky byly pipetovány 3 μ l deionizované H_2O .
- Obsah zkumavek byl inkubován 18 hod při $37 \text{ }^\circ\text{C}$.

Restriční štěpení pomocí enzymů MspI a HpaII

- 155 μ l ze zkumavky s obsahem T4-BGT bylo rozděleno do zkumavek o objemu 0,2 ml po 50 μ l (zkumavky 1–3).
- 155 μ l ze zkumavky bez T4-BGT bylo rozděleno do zkumavek o objemu 0,2 ml po 50 μ l (zkumavky 4–6).
- Do zkumavek 1 a 4 byl přidán 1 μ l MspI ($100 \text{ U} \cdot \mu\text{l}^{-1}$), viz tabulka 5.
- Do zkumavek 2 a 5 byl přidán 1 μ l HpaII ($50 \text{ U} \cdot \mu\text{l}^{-1}$), viz tabulka 5.
- Obsah zkumavek byl inkubován 4 hod při $37 \text{ }^\circ\text{C}$.
- Do všech zkumavek byl přidán 1 μ l proteinázy K ($20 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$).
- Zkumavky s restriční směsí byly inkubovány 30 min při $40 \text{ }^\circ\text{C}$, následně byla proteináza K inaktivována inkubací 10 min při $95 \text{ }^\circ\text{C}$.

Tabulka 4. Komponenty glukosylační reakční směsi.

Komponenty	Množství
Genomová DNA	620 ng DNA
20x UDP-glukóza	12,4 μ l
10x NEBuffer 4	31 μ l
Deionizovaná H ₂ O	Do objemu 310 μ l
Celkem	310 μl

Tabulka 5. Enzymy obsažené v jednotlivých zkumavkách o objemu 0,2 ml.

DNA + T4-BGT + UDP-Gl			DNA + UDP-Gl (kontrolní)		
1	2	3	4	5	6
MspI	HpaII	Kontrola	MspI	HpaII	Kontrola

Analýza glukosylované a naštěpené DNA pomocí qPCR

- Byla připravena reakční směs, viz tabulka 6, s primery specifickými pro sekvence studovaných genů, viz tabulka 7. Reakční směs byla pipetována do 96-ti jamkové destičky po 19 μ l.
- Do jamky byl pipetován 1 μ l DNA ze zkumavek o objemu 0,2 ml 1–6 ve dvou opakováních.
- Destička byla zalepena fólií a centrifugována 2 min při 800 g.
- Amplifikace probíhala v přístroji Light-Cykler za podmínek, viz tabulka 8.

Tabulka 6. Komponenty reakční směsi pro 1 jamku.

Komponenty	Objem [μ l]	Výsledná koncentrace
2x SsoAdvanced universal Syber Green supermix	10	1x
Left primer (10 μ mol \cdot l ⁻¹)	0,8	400 nmol \cdot l ⁻¹
Right primer (10 μ mol \cdot l ⁻¹)	0,8	400 nmol \cdot l ⁻¹
Deionizovaná H ₂ O	7,4	
Celkem	19	
Modifikovaná DNA 1–6	1	
Celkem	20	

Tabulka 7. Primery pro lokální metylační a hydrxymetylační analýzu.

Gen	Sekvence primeru 5' - 3'	Délka amplikonu
<i>TET1</i>	Forward: ACTCCCTGAGGTCTGTCCTG	175
	Reverse: CAGGTAGGGCTGCATGACTT	
<i>TET2</i>	Forward: GAAGGTGGGCCGGGGCGG	237
	Reverse: GAGAGGGTGTGCTGCTGAAT	
<i>TET3</i>	Forward: AAAGGCCATGGTAGGAAGTG	160
	Reverse: TGAAGTAGCGCTGTCCAGAA	

Tabulka 8. Podmínky amplifikace.

Krok	Teplota [°C]	Čas	Cykly
Aktivace polymerázy	95	10 min	1
Denaturace	95	15 s	50
Hybridizace	60	30 s	
Elongace	72	30 s	

4.4.3 Detekce globální metylace

Hladina 5-mC v genomové DNA byla kvantifikována pomocí MethylFlash Methylated DNA 5-mC Quantification Kit Colorimetric (Epigentek). DNA je aplikována do jamek se speciálně upraveným povrchem zajišťujícím vysokou afinitu k DNA. Metylovaná frakce DNA je detekována selektivním zachycením monoklonální detekční protilátkou, a poté kolorimetricky kvantifikována pomocí spektrofotometru. Množství metylované DNA je úměrné měřené intenzitě OD a je možné jej odečíst z kalibrační křivky. Pro analýzu bylo použito 100 ng genomové DNA pro jeden vzorek, ve dvou opakováních.

Ředění roztoků

- Dle protokolu byl připraven 1x promývací pufr (ME1).
- Pozitivní kontrola (ME4) byla naředěna pufrům TE na koncentraci 10 ng·μl⁻¹.
- Ze série ředění pozitivní kontroly byla připravena kalibrační řada, viz tabulka 9.

Navázání DNA

- Do jamky bylo pipetováno 80 μl vazebného roztoku (ME2).
- Do jamky byl přidán 1 μl negativní kontroly (ME3), nebo 1 μl ze série ředění kalibrační řady (ME4), nebo 1–8 μl (100 ng) vzorku DNA, viz tabulka 10.
- Destička byla zakryta parafilmem a inkubována 90 min při 37 °C.

- Z jamky byl odstraněn vazebný roztok a každá jamka byla třikrát promyta 150 μl zředěného promývacího roztoku.

Tabulka 9. Příprava kalibrační řady.

Zkumavka	ME4 [μl]	1x TE [μl]	Výsledná koncentrace ME4 [$\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$]
1	1,0	19,0	0,5
2	1,0	9,0	1,0
3	1,0	4,0	2,0
4	2,5	2,5	5,0
5	4,0	-	10,0

Tabulka 10. Vzor nanášení duplikátu na destičku.

	1	2
A	ME3	ME3
B	ME4 ($0,5 \text{ ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$)	ME4 ($0,5 \text{ ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$)
C	ME4 ($1 \text{ ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$)	ME4 ($1 \text{ ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$)
D	ME4 ($2 \text{ ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$)	ME4 ($2 \text{ ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$)
E	ME4 ($5 \text{ ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$)	ME4 ($5 \text{ ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$)
F	ME4 ($10 \text{ ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$)	ME4 ($10 \text{ ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$)
G	Vzorek 1	Vzorek 1

Detekce metylované DNA

- Selektivní protilátka (ME5) byla zředěna v poměru 1:1000 s ředěným promývacím roztokem.
- Do jamky bylo pipetováno 50 μl zředěné selektivní protilátky a destička byla inkubována 60 min při pokojové teplotě.
- Roztok byl z jamky odstraněn a jamka byla třikrát promyta 150 μl zředěného promývacího roztoku.
- Detekční protilátka (ME6) byla zředěna v poměru 1:2000 s ředěným promývacím roztokem.
- Do jamky bylo pipetováno 50 μl zředěné detekční protilátky a destička byla inkubována 30 min při pokojové teplotě.
- Roztok byl z jamky odstraněn a jamka byla čtyřikrát promyta 150 μl zředěného promývacího roztoku.

- Roztok enhanceru (ME7) byl zředěn v poměru 1:5000 s ředěným promývacím roztokem.
- Do jamky bylo pipetováno 50 μl zředěného roztoku enhanceru a destička byla inkubována 30 min při pokojové teplotě.
- Roztok byl z jamky odstraněn a jamka byla pětkrát promyta 150 μl zředěného promývacího roztoku.

Signální detekce

- Do jamky bylo přidáno 100 μl vyvíjecího roztoku (ME8) a destička byla inkubována 10 min při pokojové teplotě ve tmě.
- Do jamky bylo přidáno 100 μl stop roztoku (ME9) a destička byla ponechána 2 min při pokojové teplotě, aby došlo k zastavení reakce.
- Pomocí UV/VIS spektrofotometru byla odečtena absorbance při vlnové délce 450 nm.

4.4.4 Detekce globální hydroxymetylace

Hladina 5-hmC v genomové DNA byla kvantifikována pomocí MethylFlash Hydroxymethylated DNA 5-hmC Quantification Kit Colorimetric (Epigentek). DNA je aplikována do jamek se speciálně upraveným povrchem zajišťujícím vysokou afinitu k DNA. Hydroxymetylovaná frakce DNA je detekována pomocí selektivní protilátky s monoklonální detekční protilátkou, a poté kolorimetricky kvantifikována pomocí spektrofotometru. Množství hydroxymetylované DNA je úměrné měřené intenzitě OD a je možné jej odečíst z kalibrační křivky. Pro analýzu bylo použito 200 ng DNA pro vzorek, ve dvou opakováních.

Ředění roztoků

- Dle protokolu byl připraven 1x promývací pufr (HC1).
- Pozitivní kontrola (HC5) byla naředěna pufrem TE na koncentraci 10 $\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$.
- Ze série ředění pozitivní kontroly byla připravena kalibrační řada, viz tabulka 11.

Navázání DNA

- Do jamky bylo pipetováno 80 μl vazebného roztoku (HC2).
- Do jamky byl přidán 1 μl negativní kontroly (HC3), nebo negativní kontroly 2 (HC4), nebo 1 μl ze série ředění kalibrační řady (HC5), nebo 1–8 μl (200 ng) vzorku DNA, viz tabulka 12.
- Destička byla zakryta parafilmem a inkubována 90 min při 37 °C.
- Z jamky byl odstraněn vazebný roztok a každá jamka byla třikrát promyta 150 μl zředěného promývacího roztoku.

Tabulka 11. Příprava kalibrační řady.

Zkumavka	HC5 [μl]	1x TE [μl]	Výsledná koncentrace ME4 [$\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$]
1	1,0	19,0	0,5
2	1,0	9,0	1,0
3	1,0	4,0	2,0
4	2,5	2,5	5,0
5	4,5	-	10,0

Tabulka 12. Vzor nanášení duplikátu na destičku.

	1	2
A	HC3	HC3
B	HC4	HC4
C	HC5 ($0,5 \text{ ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$)	HC5 ($0,5 \text{ ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$)
D	HC5 ($1 \text{ ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$)	HC5 ($1 \text{ ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$)
E	HC5 ($2 \text{ ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$)	HC5 ($2 \text{ ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$)
F	HC5 ($5 \text{ ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$)	HC5 ($5 \text{ ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$)
G	HC5 ($10 \text{ ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$)	HC5 ($10 \text{ ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$)
H	Vzorek 1	Vzorek 1

Detekce metylované DNA

- Selektivní protilátka (HC6) byla zředěna v poměru 1:1000 s ředěným promývacím roztokem.
- Do jamky bylo pipetováno 50 μl zředěné selektivní protilátky a destička byla inkubována 60 min při pokojové teplotě.
- Roztok byl z jamky odstraněn a jamka byla třikrát promyta 150 μl zředěného promývacího roztoku.
- Detekční protilátka (HC7) byla zředěna v poměru 1:1000 s ředěným promývacím roztokem.
- Do jamky bylo pipetováno 50 μl zředěné detekční protilátky a destička byla inkubována 30 min při pokojové teplotě.
- Roztok byl z jamky odstraněn a jamka byla čtyřikrát promyta 150 μl zředěného promývacího roztoku.
- Roztok enhanceru (HC8) byl zředěn v poměru 1:5000 s ředěným promývacím roztokem.

- Do jamky bylo pipetováno 50 µl zředěného roztoku enhanceru a destička byla inkubována 30 min při pokojové teplotě.
- Roztok byl z jamky odstraněn a jamka byla pětkrát promyta 150 µl zředěného promývacího roztoku.

Signální detekce

- Do jamky bylo přidáno 100 µl vyvíjecího roztoku (HC9) a destička byla inkubována 10 min při pokojové teplotě ve tmě.
- Do jamky bylo přidáno 100 µl stop roztoku (HC10) a destička byla ponechána 2 min při pokojové teplotě, aby došlo k zastavení reakce.
- Pomocí UV/VIS spektrofotometru byla odečtena absorbance při vlnové délce 450 nm.

4.4.5 Izolace RNA z aspirátů kostní dřeni nebo ze sortované populace buněk (CD138)

Pro stanovení exprese genů *TET1*, *TET2* a *TET3* byla RNA izolována z aspirátu KD nebo z buněk sortovaných na přítomnost antigenu CD138 pomocí metodického postupu Tri Reagent® RT-Blood (Molecular Research Center). Pro izolaci RNA ze sortovaných buněk CD138 byly použity poloviční objemy. Práce s lyzačním roztokem (Trizol) byla provedena v digestoři. Pracovní plochy, kde probíhal pracovní postup izolace RNA, byly ošetřeny roztokem inhibitorů RNAz - RNase ZAP (Sigma Aldrich).

- Do mikrozkušavky o objemu 1,5 ml bylo pipetováno 750 µl (nebo 375 µl) roztoku TRI-reagent RT-Blood a 125 µl aspirátu KD, nebo 100 µl roztoku buněčné suspenze v PBS.
- Lyzát byl homogenizován použitím Vortex.
- Do zkumavky s lyzátem bylo přidáno 50 µl (nebo 25 µl) 4'-bromanisolu.
- Lyzát byl homogenizován použitím Vortex.
- Zkumavka byla centrifugována 15 min při 12 000 g a 4 °C. Centrifugací byly vytvořeny 3 fáze, RNA byla přítomna v horní vodnaté fázi.
- Do nové mikrozkušavky o objemu 1,5 ml bylo odebráno přibližně 500 µl (nebo 300 µl) horní fáze, ke které bylo přidáno 500 µl (nebo 250 µl) isopropanolu.
- Obsah zkumavky byl inkubován 10 min při pokojové teplotě.
- Zkumavka byla centrifugována 5 min při 12 000 g a 4 °C.
- Supernatant byl odstraněn a vzniklý pelet byl pomocí Vortex promyt 1 ml 75% ethanolu.
- Zkumavka byla centrifugována 5 min při 6 000 g a 24 °C.

- Supernatant byl odstraněn a pelet resuspendován ve 20–40 μl depH_2O .
- Pomocí spektrofotometru NanoDrop byla měřena koncentrace a čistota RNA.
- Izolovaná RNA byla uskladněna při $-80\text{ }^\circ\text{C}$.

4.4.6 Reverzní transkripce (RT-PCR)

Komplementární DNA (cDNA) byla syntetizována pomocí Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche). Pro reverzní transkripci byl použit 1 μg RNA izolované z aspirátu KD, nebo 100 ng RNA izolované ze sortovaných buněk.

- Do mikrozkušavek o objemu 0,2 ml byly pipetovány 2 μl random hexamer primeru, 1000 ng (nebo 100 ng) RNA a deionizovanou H_2O byl objem doplněn do 13 μl .
- Obsah mikrozkušavky byl inkubován v termocykleru 10 min při $65\text{ }^\circ\text{C}$ a následně umístěn do chladicího bloku.
- Do mikrozkušavky byly k 13 μl (RNA + random hexamer primer) postupně pipetovány komponenty, viz tabulka 13.
- Obsah zkumavky byl inkubována v termocykleru při programu: 10 min při $25\text{ }^\circ\text{C}$; 30 min při $55\text{ }^\circ\text{C}$ a následně 5 min při $85\text{ }^\circ\text{C}$.
- cDNA byla uskladněna při $-20\text{ }^\circ\text{C}$.

Tabulka 13. Komponenty pro RT-PCR.

Komponenty	Objem [μl]	Výsledná koncentrace
5x Transcriptor reverse pufr	4	1x
Protector RNase inhibitor ($40\text{ U}\cdot\mu\text{l}^{-1}$)	0,5	20 U
Deoxynukleotidy ($10\text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$)	2	$1\text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$
Transcriptor reverse transkriptáza ($20\text{ U}\cdot\mu\text{l}^{-1}$)	0,5	10 U
Celkem (+13 μl z 1. kroku)	20	

4.4.7 Expresní analýza *TET1*, *TET2* a *TET3*

Úroveň exprese genů *TET1*, *TET2* a *TET3* byla stanovena pomocí qPCR použitím Xceed qPCR Probe 2x Mix Lo-ROX (Institute of applied biotechnologies). Jako „house-keepingový“ byl zvolen gen pro β -2-mikroglobulin (*B2M*). Pro normalizaci expresních dat studovaných genů byla použita RNA izolována ze vzorků kostní dřevě 56 zdravých jedinců, Human Bone Marrow Total RNA (Clontech). Primery pro *B2M* a *TET1* byly součástí sond TaqMan Gene Expression Assays (Applied Biosystems). Primery pro *TET2* a *TET3* (Sigma Aldrich) byly navrženy, a spolu s příslušnými sondami (Roche)

jsou shrnuty v tabulce 14. Pro kalkulaci relativní úrovně cílové RNA byl použit Livakův vzorec $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

- Byla připravena reakční směs pro qPCR, viz tabulka 15.
- Reakční směs byla pipetována po 19 μl do jednotlivých jamek 96-ti jamkové destičky.
- Do těchto jamek byl pipetován 1 μl cDNA, vzorky byly nanесeny v duplikátech.
- Destička byla přelepena fólií a centrifugována po dobu 2 min při 800 g.
- Amplifikace probíhala v přístroji Light-Cycler za podmínek, viz tabulka 16.

Tabulka 14. Primery a sondy pro expresní analýzu.

Gen	Sekvence primeru 5' - 3'	Sonda
<i>TET2</i>	Forward: ACGCTTGGAAGCAGGAGAT	CD #66
	Reverse: CAAGGCTGCCCTCTAGTTGAA	
<i>TET3</i>	Forward: CGCCTCTATCCGGGAACT	CD #25
	Reverse: CTTCCCCGTGTAGATGACCT	

Tabulka 15. Komponenty qPCR reakční směsi pro 1 jamku.

Komponenty	Objem [μl]	Výsledná koncentrace
μXceed qPCR Probe 2x mix	10	1x
Left primer ($10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)	0,8	$400 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$
Right primer ($10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)	0,8	$400 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$
Sonda ($10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)	0,4	$200 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$
Deionizovaná H_2O	7	
Celkem	19	
cDNA templát	1	
Celkem	20	

Tabulka 16. Podmínky amplifikace.

Krok	Teplota [$^{\circ}\text{C}$]	Čas	Cykly
Aktivace polymerázy	95	2 min	1
Denaturace	95	5 s	50
Hybridizace/elongace	63	20 s	

5 VÝSLEDKY

5.1 Stanovení hladiny celkové metylace a hydroxymethylace DNA

Pro stanovení hladiny celkové metylace a hydroxymethylace DNA byla použita DNA izolovaná z aspirátů kostní dřene, která po izolaci dosahovala hodnot 43,4–558,5 ng·μl⁻¹ a absorbance při 260/280 nm, jako kvalitativní parametr DNA, byla 1,79–1,97. DNA izolovaná ze sortovaných buněk dosahovala hodnot 10,4–227,1 ng·μl⁻¹ a absorbance při 260/280 nm byla 1,55–1,98.

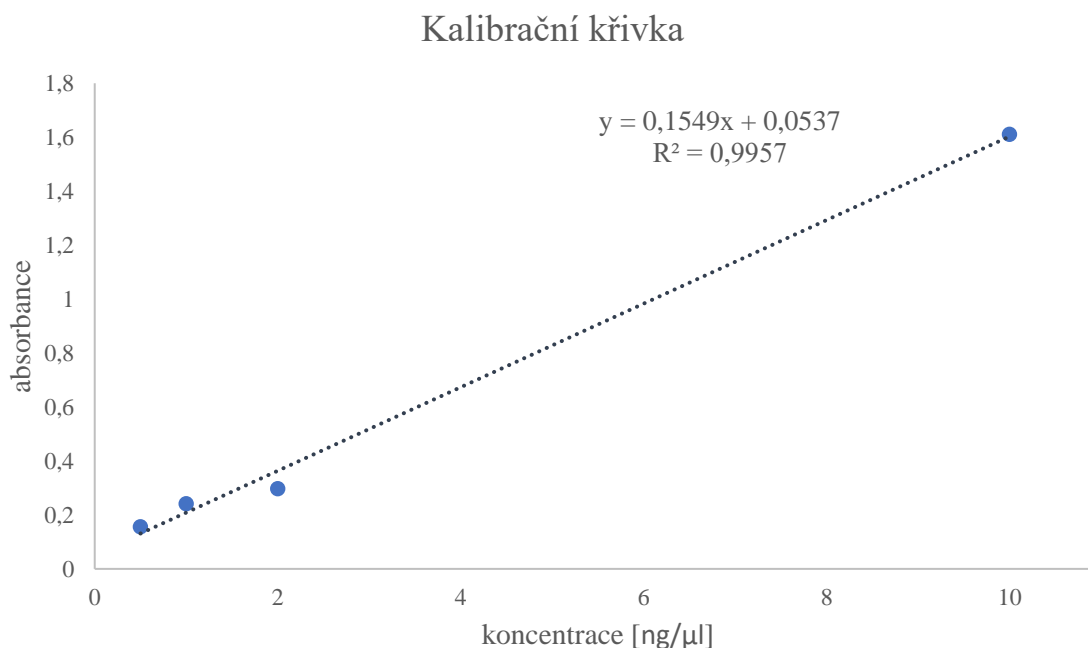
Pro stanovení hladiny 5-metylcytosinu (5-mC) v genomové DNA byl použit kit MethylFlash Methylated DNA 5-mC Quantification Kit Colorimetric (Epigentek), procentické zastoupení 5-hydroxymetylcytosinu (5-hmC) v genomové DNA bylo stanoveno použitím kitu MethylFlash Hydroxymethylated DNA 5-hmC Quantification Kit Colorimetric (Epigentek). Stanovení hladiny 5-mC bylo provedeno u 19 vzorků nesortované populace buněk: 2 jedinců s MGUS, 17 pacientů s MM, a u 8 vzorků sortované populace buněk: 1 jedinec s MGUS, 5 pacientů s MM a 2 pacienti s diagnózou amyloidóza. Koncentrace (ng·μl⁻¹) celkové metylované DNA byla vypočítána podle rovnice regrese na základě kalibrační křivky. Protože vstupní množství bylo 100 ng DNA, výsledná hodnota tak představuje procentické zastoupení. Pro výpočet byly použity duplikáty vzorků se směrodatnou odchylkou nižší než 0,5, viz graf 1. Analýza hladiny 5-hydroxymetylcytosinu byla provedena u 8 vzorků nesortované populace buněk a u 4 vzorků sortované populace buněk pacientů s MM. Procentické zastoupení 5-hmC bylo vypočítáno pomocí vzorce, uvedeného níže.

Procentický podíl 5-mC z celkové DNA u nesortované populace buněk 19 pacientů s MM pacientů byl stanoven v rozmezí 0,03 % až 14,77 % (tj. 0,03–14,77 ng/100 ng DNA) a u sortované populace buněk se hodnoty pohybovaly mezi 0,36 % až 5,60 % (tj. 0,36–5,60 ng/100 ng DNA).

Ve skupině pacientů, kde byla DNA izolována z nesortované populace buněk vykazovaly vzorky jedinců s MGUS hodnoty globální metylace DNA 0,56 % (2,09 % po opakování) a 4,93 %. U 17 vzorků pacientů s MM se hodnoty globální metylace pohybovaly v rozmezí 0,03 % až 14,77 %, viz tabulka 17.

Ve skupině pacientů, kde byla DNA izolována ze sortované populace buněk vykazoval vzorek jedince s MGUS hodnotu globální metylace DNA 5,32 %. U 4 vzorků pacientů s MM

se hodnoty globální metylace DNA pohybovaly v rozmezí 0,36 % až 0,57 % a vzorky pacientů s amyloidózou dosahovaly zvýšených hodnot 2,25 % a 5,60 %, viz tabulka 18.



Graf 1. Příklad kalibrační závislosti absorbance na koncentraci pro výpočet celkové metylace DNA.

Příklad výpočtu procentického zastoupení 5-mC u vzorku M10 (nesortovaná buněčná populace):

Průměrná naměřená hodnota OD při 450 nm (po odečtení negativní kontroly) pro vzorek

M10 = 0,1345

$$y = 0,1549 x + 0,0537$$

$$0,1345 = 0,1549 x + 0,0537$$

$$x = 0,5216 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$$

Tabulka 17. Procentické zastoupení 5-mC v nesortované populaci buněk.

Vzorek	Diagnóza	Zastoupení 5-mC [%]
M1	MM	2,43
M9	MGUS	4,93
M10	MM	0,52
M12	MM	0,56
M13	MM	0,48
M14	MM	0,37

Vzorek	Diagnóza	Zastoupení 5-mC [%]
M15	MM	0,50
M17	MM	1,26
M21	MM	0,44
M24	MM	1,36
M27	MM	1,39
M34	MGUS	0,56; 2,09
M37	MM	0,03
M39	MM	0,05
M41	MM	0,13
M56	MM	0,13
M59	MM	12,85
M65	MM	14,77
M69	MM	2,52

Tabulka 18. Procentické zastoupení 5-mC v sortované populaci buněk.

Vzorek	Diagnóza	Zastoupení 5-mC [%]
08-09	MM	0,36
02-14	MM	0,41
06-05	MM	0,43
10-01A	MM + amyloidóza	2,25
11-22B	MM	0,57
02-11	MGUS	5,32
02-28	MM + amyloidóza	5,60
11-29	MM	0,47

Procentický podíl 5-hmC z celkové DNA u nesortované populace buněk 8 pacientů byl stanoven v rozmezí 0,0113 % až 0,1418 % (tj. 0,0113–0,1418 ng/100 ng DNA), viz tabulka 19, a u 4 vzorků sortované populace buněk se hodnoty pohybovaly mezi 0 % až 0,0065 % (tj. 0–0,0065 ng/100 ng DNA), viz tabulka 20. Hodnoceny byly vzorky pacientů s MM.

Vzorec pro výpočet procentického zastoupení 5-hmC:

$$5\text{-hmC \%} = [(A \text{ (vzorku)} - A \text{ (HC4)}) / (\text{směrnice kalibrační křivky} \cdot 5)] / 2$$

Příklad výpočtu procentického zastoupení 5-hmC u vzorku M1 (nesortovaná buněčná populace):

$$A (M1) = 0,2015$$

$$A (HC4) = 0,0940$$

$$\text{Směrnice kalibrační křivky} = 0,2786$$

$$5\text{-hmC \%} = [(0,2015 - 0,0940) / (0,2786 \cdot 5)] / 2$$

$$5\text{-hmC \%} = 0,0386$$

Tabulka 19. Procentické zastoupení 5-hmC v nesortované populaci buněk.

Vzorek	Diagnóza	Zastoupení 5-hmC [%]
M1	MM	0,0386
M14	MM	0,0167
M15	MM	0,0237
M21	MM	0,0113
M24	MM	0,0445
M27	MM	0,0298
M39	MM	0,0337
M56	MM	0,1418

Tabulka 20. Procentické zastoupení 5-hmC v sortované populaci buněk. * Záporné hodnoty odpovídají nedetekovatelné hladině 5-hmC.

Vzorek	Diagnóza	Zastoupení 5-hmC [%]
08-09	MM	0,0022
02-14	MM	-0,0011*
06-05	MM	0,0023
11-22B	MM	0,0056

5.2 Kvantifikace metylací a hydroxymethylací v promotorech genů *TET1*, *TET2* a *TET3*

Hladiny 5-mC a 5-hmC v promotorech genů *TET1*, *TET2* a *TET3* byly analyzovány s použitím kitu EpiMark 5-hmC and 5-mC Analysis Kit (New England BioLabs).

Analýza byla provedena u 8 vzorků nesortované populace buněk pacientů s MM a u 5 vzorků sortované populace buněk: 4 pacienti s MM a 1 pacient s diagnózou amyloidóza. Základní parametry, pomocí kterých byla kvantifikace metylací stanovena jsou shrnuty v tabulce 21 a ve vzorci uvedeném níže.

Tabulka 21. Parametry pro kvantifikaci metylací.

Zkumavka	Zkratka	Enzym	Přítomnost DNA
1	M2	T4-BGT MspI	rozštěpená DNA v CCGG sekvencích s nemodifikovaným C nebo 5-mC
2	H2	T4-BGT HpaII	rozštěpená DNA v CCGG sekvencích s nemodifikovaným C
3	C2	T4-BGT	kontrolní neštěpená DNA
4	M1	MspI	rozštěpená DNA v CCGG sekvencích s nemodifikovaným C, 5-mC nebo 5-hmC
5	H1	HpaII	rozštěpená DNA v CCGG sekvencích s nemodifikovaným C
6	C1	/	kontrolní neštěpená DNA

Vzorec pro výpočet procentického zastoupení 5-mC:

$$\% \text{ metylace} = [H1 - M2 \cdot (C1 / C2)] / C1 \cdot 100$$

Vzorec pro výpočet procentického zastoupení 5-hmC:

$$\% \text{ hydroxymetylace} = [M2 \cdot (C1 / C2) - M1] / C1 \cdot 100$$

Příklad výpočtu procentického zastoupení 5-mC a 5-hmC v sekvenci CCGG promotoru genu *TET2* u vzorku M14 (nesortovaná buněčná populace):

Hodnoty Ct (cycle treshold) pro vzorek M14:

- 1/ M14/1 Ct (**M2**) = 20,75 TET2 (*Target Unknown*)
- 2/ M14/2 Ct (**H2**) = 21,88 TET2 (*Target Unknown*)
- 3/ M14/3 Ct (**C2**) = 20,12 TET2 (*Target PosCalibrator*)
- 4/ M14/1 Ct (**M1**) = 19,34 TET2_CTRL (*Reference Unknown*)
- 5/ M14/2 Ct (**H1**) = 22,16 TET2_CTRL (*Reference Unknown*)
- 6/ M14/3 Ct (**C1**) = 19,99 TET2_CTRL (*Reference PosCalibrator*)

$$\% \text{ metylace} = [22,16 - 20,75 \cdot (19,99 / 20,12)] / 19,99 \cdot 100$$

$$\text{Metylace} = 7,72 \%$$

$$\% \text{ hydroxymetylace} = [20,75 \cdot (19,99 / 20,12) - 19,34] / 19,99 \cdot 100$$

$$\text{Hydroxymetylace} = 6,29 \%$$

U nesortované populace buněk patientských vzorků byly metylační změny v promotorové oblasti genu *TET1* detekovány u vzorků M14, M21 a M24, přítomnost hydroxymetylačních změn byla detekována u vzorků M1 a M14. V promotorové sekvenci genu *TET2* byla přítomnost metylace zjištěna u vzorků M14, M15, M21, M24, M27 a M56, přítomnost hydroxymetylace byla zjištěna u vzorků M1, M14, M15, M24 a M39. V promotorové sekvenci genu *TET3* byly metylační změny detekovány u všech vzorků, hydroxymetylační změny byly detekovány u vzorků M1 a M14, viz tabulka 22. U tří vzorků (M14, M21, M24) z celkového počtu 8 analyzovaných pacientů, tedy u 37,5 % byly detekovány metylační změny v promotorových úsecích všech tří genů *TET1*, *TET2* a *TET3*.

U sortované populace buněk patientských vzorků byla přítomnost metylačních změn v promotorové sekvenci genu *TET1* zjištěna u vzorků 06-05 a 11-22B, přítomnost hydroxymetylačních změn byla zjištěna u vzorků 08-09 a 10-01A. V promotorové sekvenci genu *TET2* byly metylační změny zjištěny u vzorků 02-14, 06-05 a 11-22B, hydroxymetylační změny byly zjištěny u vzorků 08-09 a 10-01A. V promotorové sekvenci genu *TET3* byly metylační změny zjištěny u všech vzorků, hydroxymetylační změny byly zjištěny u vzorku 10-01A, viz tabulka 23. Z celkového počtu 5 sortovaných patientských vzorků byly u dvou pacientů (06-05 a 11-22B), tedy u 40 % zjištěny metylační změny v promotorech všech tří testovaných genů *TET*.

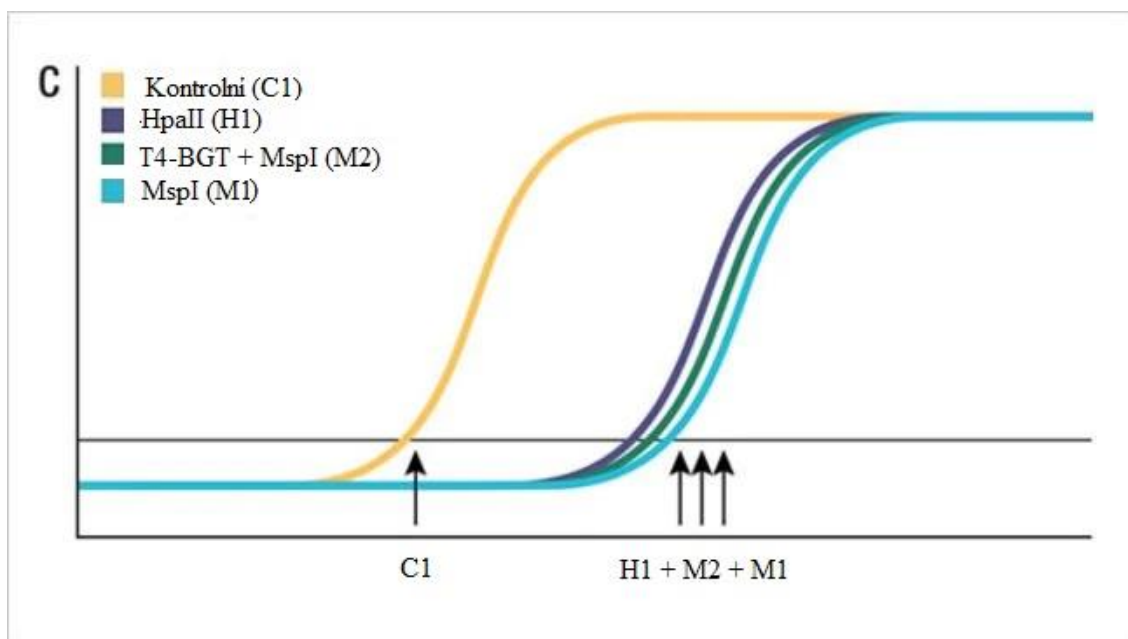
Tabulka 22. Procentické zastoupení 5-mC a 5-hmC v sekvenci CCGG promotoru sledovaných genů v nesortované populaci buněk. *Záporné hodnoty odpovídají nedetekovatelné hladině 5-mC nebo 5-hmC.

Vzorek	<i>TET1</i>		<i>TET2</i>		<i>TET3</i>	
	5-mC [%]	5-hmC [%]	5-mC [%]	5-hmC [%]	5-mC [%]	5-hmC [%]
M1	-0,44*	7,73	2,78	9,03	10,48	6,79
M14	5,34	3,5	7,72	6,29	13,17	5,3
M15	0,61	1,82	4,80	7,22	5,44	2,74
M21	6,32	1,2	12,76	-3,13*	18,80	-5,00*
M24	5,12	-0,48*	10,37	3,69	22,08	-3,30*
M27	x	x	13,97	-1,11*	19,06	-7,18*
M39	-1,23*	1,36	3,27	4,42	11,44	0,89
M56	2,26	-0,49*	8,50	2,29	27,58	0,42

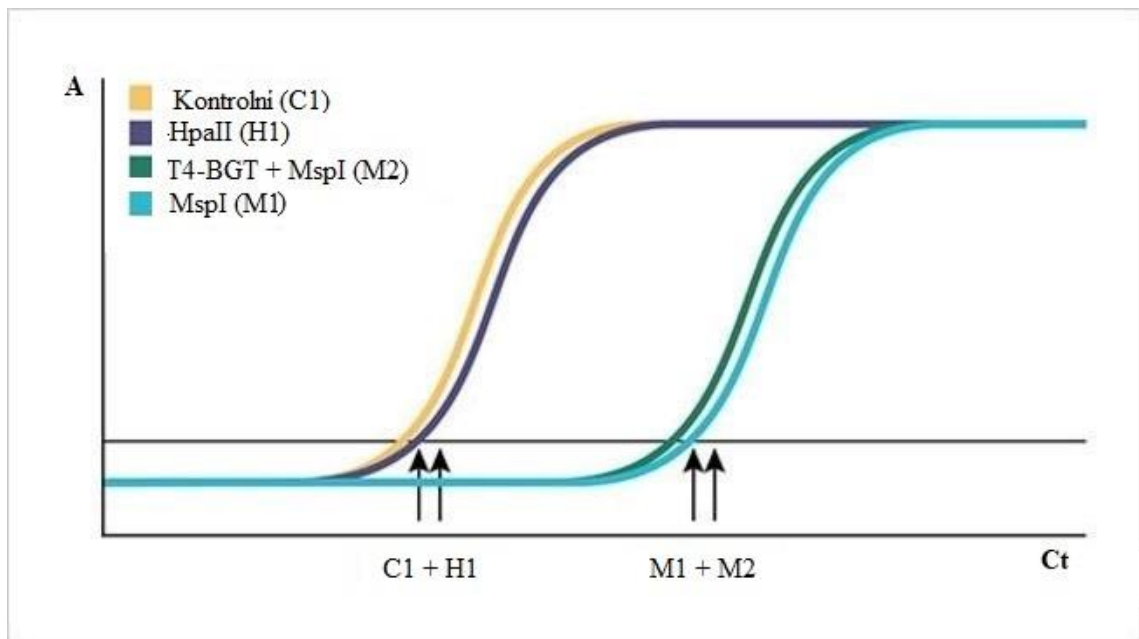
Tabulka 23. Procentické zastoupení 5-mC a 5-hmC v sekvenci CCGG promotoru sledovaných genů v sortované populaci buněk. *Záporné hodnoty odpovídají nedetekovatelné hladině 5-mC nebo 5-hmC.

Vzorek	<i>TET1</i>		<i>TET2</i>		<i>TET3</i>	
	5-mC [%]	5-hmC [%]	5-mC [%]	5-hmC [%]	5-mC [%]	5-hmC [%]
08-09	0,27	6,64	1,19	8,29	27,08	1,49
02-14	-3,86*	1,9	8,48	1,58	6,64	1,68
06-05	5,34	-3,51*	4,17	0,75	34,92	-5,08*
10-01A	-36,67*	41,41	-11,35*	15,55	14,45	6,66
11-22B	7,33	-2,88*	11,31	-0,38*	26,26	-2,02*

Pomocí metodického postupu EpiJET 5-hmC and 5-mC Analysis Kit (Thermo Scientific), který je reagenциemi shodný jako mnou používaný kit, ale využívá jiné metody vyhodnocení, byly analyzovány amplifikační křivky úseků DNA po štěpení enzymy citlivými na přítomnost 5-mC a 5-hmC (MspI) nebo na přítomnost nemodifikovaného cytosinu (HpaII). Pokud ve vzorku není detekována metylace dojde nejdříve k amplifikaci frakce s kontrolní neštěpenou DNA (C1) a následně jsou amplifikovány ostatní frakce (H1, M1, M2), viz graf 2. Pokud je ve vzorku detekována metylace dojde zároveň k amplifikaci frakcí s obsahem kontrolní DNA a DNA po štěpení restričním enzymem HpaII (C1, H1). Následně dochází k souběžné amplifikaci frakcí s obsahem MspI a MspI + T4-BGT (M1, M2), viz graf 3.

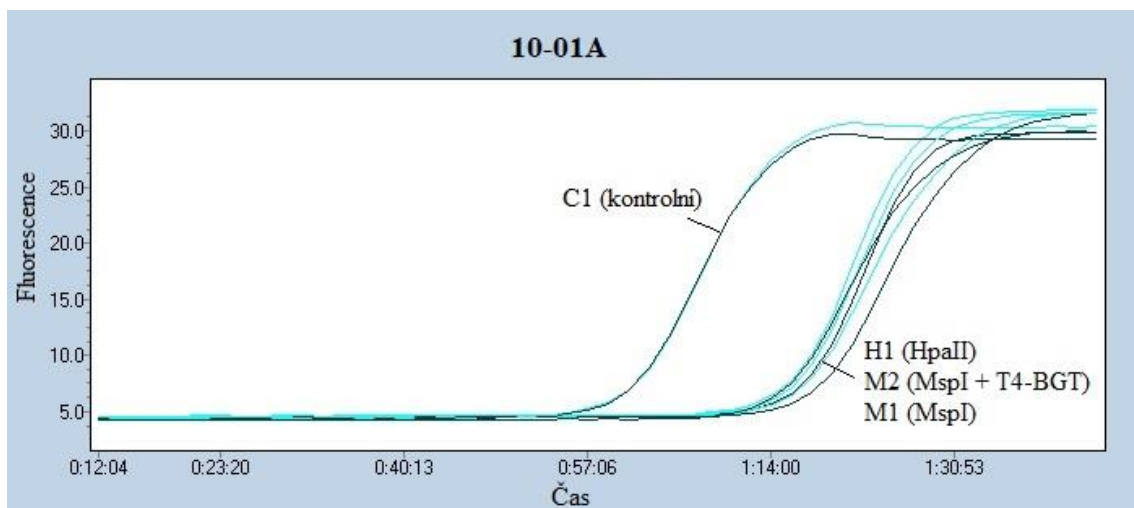


Graf 2. Profil amplifikačních křivek, bez přítomnosti metylace v promotorové sekvenci sledovaných genů.

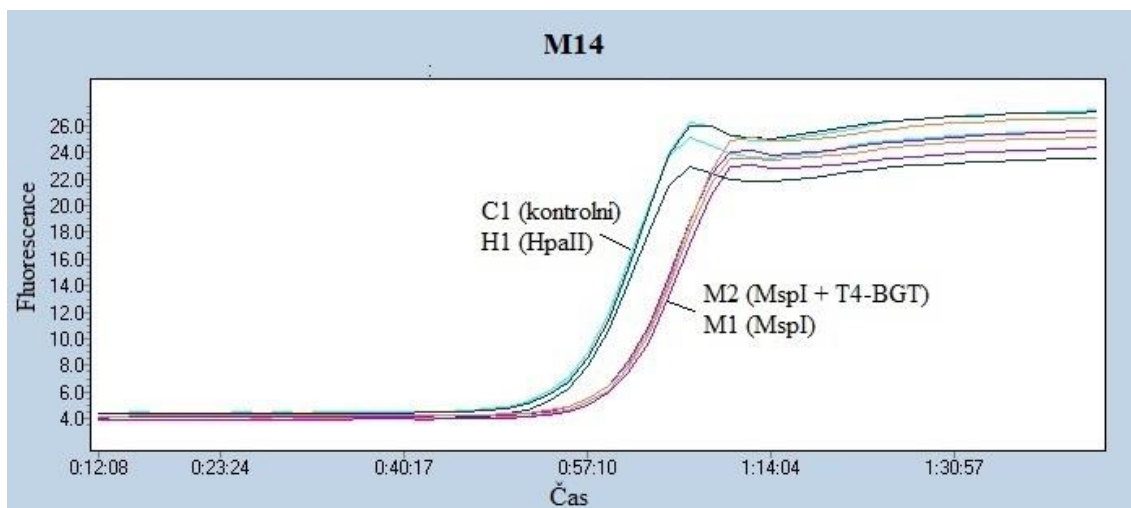


Graf 3. Profil amplifikačních křivek, v přítomnosti metylace v promotorové sekvenci sledovaných genů.

Pro porovnání obou výše popsaných metod jsou zobrazeny grafy pro vybrané vzorky. Vzorek 10-01A, graf 4, u kterého nebyla detekována metylace v oblasti promotoru genu *TET1*, má charakteristický tvar amplifikačních křivek jako graf 2. Vzorek M14, graf 5, u kterého byla stanovena hladina metylace v oblasti promotoru genu *TET2* 7,72 %, má charakteristický tvar amplifikačních křivek jako graf 3.



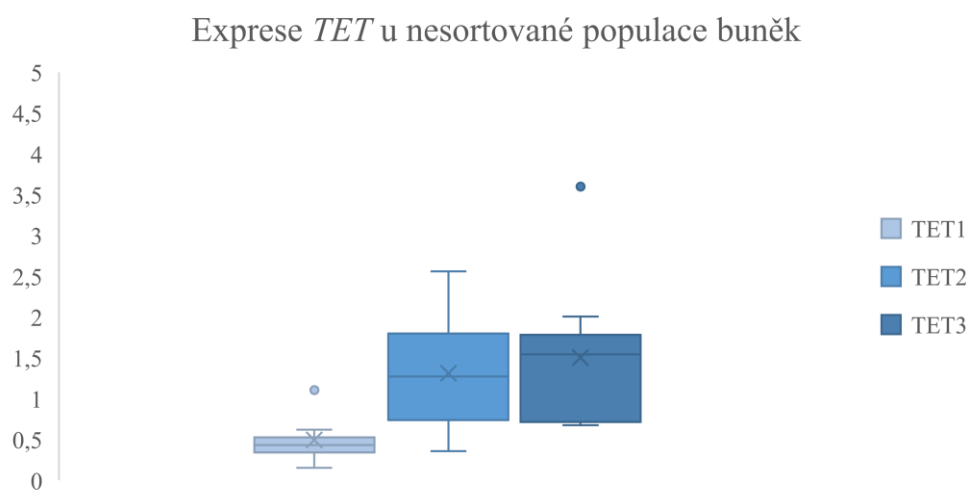
Graf 4. Amplifikační křivky naznačující přítomnost nemodifikovaného cytosinu v promotorové sekvenci genu *TET1* u vzorku pacienta 10-01A (sortovaná populace buněk).



Graf 5. Amplifikační křivky naznačující přítomnost metylace v promotorové sekvenci genu *TET2* u vzorku pacienta M14 (nesortovaná populace buněk).

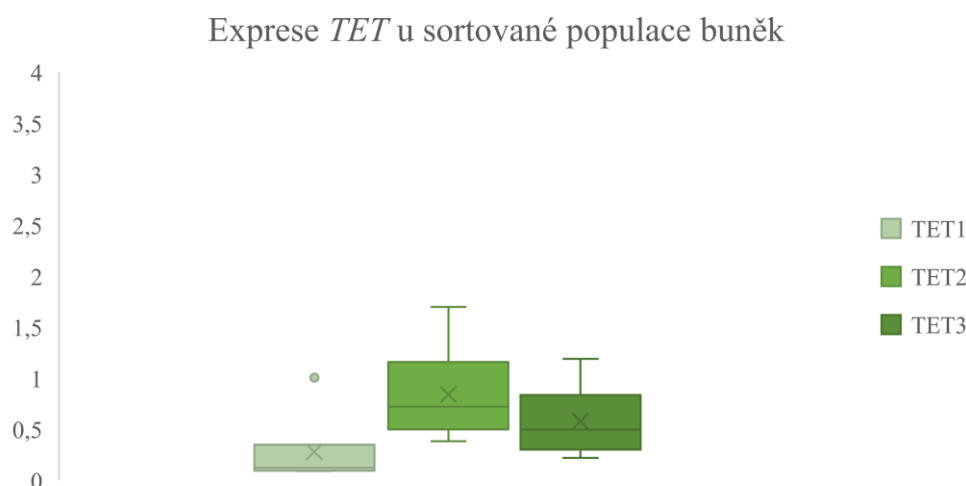
5.3 Expresní analýza genů *TET1*, *TET2* a *TET3*

RNA izolovaná z aspirátu kostní dřeně dosahovala hodnot $196,9\text{--}1360\text{ ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ a absorbance při 260/280 nm byla 1,5–1,88. RNA izolovaná ze sortované populace buněk dosahovala hodnot $15\text{--}169,4\text{ ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ a absorbance při 260/280 nm byla 1,4–1,9. Metodou qPCR byly kvantifikovány hladiny exprese genů *TET1*, *TET2* a *TET3*. Expres byla vypočítána pomocí Livakova vzorce $2^{-\Delta\Delta C_t}$ s předpokladem, že úspěšnost amplifikace referenčního i cílového genu byla blízka 100 %. Vzorky byly nanášeny v duplikátech a kvantitativní analýza každého vzorku byla minimálně jedenkrát opakována. Ze statistického hodnocení byly vyřazeny hodnoty exprese nad 4. Bylo analyzováno 16 vzorků nesortované populace buněk pacientů s MM, viz graf 6.



Graf 6. Expresse *TET* genů u vzorků nesortované populace buněk.

Expresí genů *TET2* a *TET3* dosahovala zvýšených hodnot porovnáním s expresí genu *TET1*. Expresí genu *TET1* dosahovala hodnot v rozmezí 0,15–1,15. U 8 analyzovaných vzorků sortované populace buněk pacientů s MM, zahrnující vzorek pacienta s amyloidózou, dosahovala nejvyšších hodnot expresí genu *TET2*, zatímco expresí genů *TET3* a *TET1* byly při porovnání s expresí *TET2* nižší, viz graf 7.



Graf 7. Expresí *TET* genů u vzorků sortované populace buněk.

5.4 Korelace

Pomocí funkce CORREL v tabulkovém editoru Excel byla hodnocena korelace mezi lokální metylací v promotorové sekvenci genu a expresí příslušného genu. Pearsonův korelační koeficient (r) nabývá hodnot 0–1 pro kladnou korelaci a 0–(-1) pro zápornou korelaci. Negativní korelace matematicky vyjadřuje vztah mezi zvyšujícím se procentem metylace promotoru genu a poklesem jeho expresí.

U vzorků nesortované populace buněk byla pozorována negativní korelace mezi úrovní metylace promotoru genů *TET1* ($r = -0,74$) a *TET3* ($r = -0,37$) a normalizovanou hodnotou jejich expresí. Naopak pozitivní korelace ($r = 0,80$) byla pozorována mezi detekovanou hydroxymetylací v promotoru genu *TET1* a úrovní její expresí. Korelační koeficient byl stanoven u 8 vzorků pacientů s MM.

U vzorků sortované populace buněk byla pozorována negativní korelace mezi metylací promotoru genu *TET2* a normalizovanou hodnotou její expresí ($r = -0,84$). Naopak pozitivní korelace byla pozorována mezi hydroxymetylací genů *TET2* ($r = 0,77$) a *TET3* ($r = 0,90$) a úrovněmi jejich expresí. Korelační koeficient byl stanoven u 3 vzorků pacientů s MM.

6 DISKUSE

Při řešení zadání této diplomové práce se ukázala jako problémová izolaci RNA a DNA z populace buněk sortovaných na povrchový marker CD138. Z důvodu nízké výtěžnosti obou typů nukleových kyselin z omezeného počtu sortovaných buněk bylo vyzkoušeno více metodických postupů. Pro izolaci DNA byly použity následující kity: Tri Reagent BD (Molecular Research Center); Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega); AllPrep DNA/RNA Micro Kit (Qiagen); QIAamp DNA Mini (Qiagen), který se ukázal, jako nejvhodnější z důvodu nejvyšší výtěžnosti DNA. Pro izolaci RNA byly použity následující kity: High pure RNA Isolation Kit (Roche); AllPrep DNA/RNA Micro Kit (Qiagen); Tri Reagent BD (Molecular Research Center). Pro nejlepší výtěžnost RNA byla zvolena izolace RNA metodickým postupem Tri Reagent BD (Molecular Research Center).

Cílem diplomové práce bylo stanovení úrovně exprese genů *TET1*, *TET2* a *TET3*, zvolení optimálního postupu kvantifikace metylačních (5-mC) a hydroxymetylačních (5-hmC) změn ve vybraných promotorových sekvencích genů *TET1*, *TET2* a *TET3* a stanovení hladin celkové metylace a hydroxymetylace DNA. U obou skupin vzorků pacientů s mnohočetným myelomem (sortovaných/nesortovaných buněčných populací) byla pozorována nejnižší exprese u genu *TET1*. Hladiny exprese genů *TET2* a *TET3* byly u nesortované populace buněk velmi podobné, ale u sortované populace buněk byla hladina exprese nižší u genu *TET3* při porovnání s expresí genu *TET2*, viz graf 6 a graf 7. Metylační i hydroxymetylační změny v analyzovaných promotorových sekvencích byly zjištěny u všech sledovaných genů, přičemž v promotorové sekvenci genu *TET3*, u sortované i nesortované populace buněk byla úroveň metylačních změn nejvyšší, viz tabulka 22 a tabulka 23. Porovnáním procentického zastoupení 5-mC v promotorových sekvencích genů *TET1* a *TET3* neparametrickým Mann-Whitney testem ukázalo u společného souboru sortovaných a nesortovaných vzorků statisticky průkazný rozdíl při hladině významnosti $p < 0,05$ (p -value 0,031) naznačující, že nízká exprese enzymu *TET3* může být na rozdíl od nízké exprese *TET1* způsobena vysokým zastoupením 5-mC, tedy přítomností metylačních změn ve sledovaném promotorovém úseku. Citlivost genů *TET1* a *TET3* na přítomnost metylačních změn potvrzuje u nesortovaných patientských vzorků i úroveň negativní korelace mezi expresí a procentickým podílem 5-mC v analyzovaných sekvencích promotorů obou genů, která je u genu *TET1* velmi vysoká ($r = -0,74$) a u genu *TET3* dosahuje střední míry negativní korelace ($r = -0,37$).

Pozitivní korelace matematicky vyjadřuje vztah mezi zvyšujícím se procentem 5-hmC v analyzované sekvenci promotoru a rostoucí expresí genu. Celkem u 50 % analýz byla pozorována očekávaná korelace mezi metylací/hydroxymethylací promotorové sekvence genu a sníženou/zvýšenou expresí daného genu. Vysoká míra pozitivních korelací mezi zastoupením 5-hmC ve sledovaných promotorových úsecích a úrovni exprese příslušných genů, zjištěna u všech tří studovaných genů, potvrzuje důležitost demetylačního mechanismu při obnově nebo zvýšení exprese sledovaného genu. Silné pozitivní korelace mezi detekovanou hydroxymethylací v promotoru genu *TET1* ($r = 0,80$) a úrovni exprese u nesortovaných buněk a *TET3* ($r = 0,90$) v populaci sortovaných buněk pak může vysvětlit rozdílnou úroveň exprese těchto dvou genů mezi vzorky sortovaných a nesortovaných buněk, viz graf 6 a graf 7, která může být ovlivněna různou mírou zastoupení 5-hmC.

Jak vyplývá z literárních zdrojů, vztah mezi hydroxymethylací promotoru a expresí genů u vzorků pacientů s mnohočetným myelomem byl hodnocen, pomocí RNAseq (Illumina) ve studii Agirre a kol. (2015). Pouze 1,9 % promotorových sekvencí podléhajících demethylaci korelovalo se zvýšenou genovou expresí. Obecně platí, že geny, které se nacházejí v hypometylovaném heterochromatinu vykazují nízkou úroveň transkripce, což naznačuje nízký vliv hypometylce v této oblasti na genovou expresi. Úroveň metylace oblasti enhanceru obvykle koreluje se sníženou hladinou genové exprese. Jak uvádí Agirre a kol. (2015), hypermetylované oblasti enhancerů se překrývají s místy pro vazbu transkripčních faktorů specifickými pro B-lymfocyty. Stupeň metylace oblasti enhanceru tak nepřímě koreloval s hladinami exprese těchto transkripčních faktorů. Úloha demetylačního procesu byla zdůrazněna ve studii Alberge a kol. (2019), kde autoři popsali asociaci 5-hmC s transkripčně aktivními enhancery.

V souvislosti s detekcí metylačních a demetylačních změn v lokálních oblastech sledovaných genů, jsme se v této diplomové práci zaměřili na stanovení hladin globální metylace DNA u vzorků pacientů s mnohočetným myelomem. U zdravých jedinců hladina 5-mC v DNA lymfocytů dosahuje hodnot 2,2 % až 3,4 % (2,2–3,4 ng /100 ng DNA), přičemž autoři článku Góméz a kol. (2017) použili stejný metodický postup jako byl použit v této práci.

U patientských vzorků nesortované populace buněk se hodnoty celkové metylace DNA pohybovaly v širokém rozmezí 0,03 % až 14,77 %. Vzorky jedinců s MGUS vykazovaly kolísavé hodnoty celkové metylace DNA 4,93 % a 0,56 %, přičemž při opakování byla detekována hodnota 2,09 %. U patientských vzorků sortované populace buněk se hladiny metylace pohybovaly v užším rozmezí 0,36 % až 5,57 % a vzorek jedince s MGUS

vykazoval zvýšenou hodnotu metylace DNA 5,32 %. Podobně bylo stanovení vyšších hladin globální metylace u jedinců s MGUS, tedy jedinců s přítomností M proteinu, ale nesplňujících diagnostická kritéria mnohočetného myelomu, a naproti tomu nižších hladin globální metylace DNA u pacientů s MM pozorováno ve studiích Salhia a kol. (2010); Walker a kol., (2010); Agirre a kol., (2015). Obvykle je snižující se úroveň globální metylace spojována s nestabilitou genomu. Jedná se o obecný jev, který se vyskytuje u mnoha typů nádorových onemocnění, jako jsou kolorektální karcinom nebo chronická leukocytární leukémie (Matsuzaki a kol., 2005; Fabris a kol., 2014). Vysoké hladiny globální metylace byly detekovány u vzorků pacientů s potvrzenou amyloidózou (2,25 % a 5,60 %). Amyloidóza není jednotnou nemocí, a nejčastější AL-amyloidóza může provázet mnohočetný myelom. Jedná se o skupinu chorobných stavů, které sice mají jednu společnou vlastnost, extracelulární ukládání nerozpustných fibrilárních proteinů, ale jak vyplývá z původu onemocnění, příčin zvýšené hladiny globální metylace může být více (Adam a kol., 2011).

Martínez-Banos a kol. (2017) použili stejný způsob stanovení úrovně globální metylace DNA, jako byl popsán v této práci. U buněk sortovaných na povrchový marker CD138 byla u pacienta s progredujícím mnohočetným myelomem stanovena hladina globální metylace 14,26 % a u pacienta s mnohočetným myelomem ve stádiu remise 13,83 %. Úroveň globální metylace DNA byla, dle Agirre a kol. (2015), stanovena celogenomovým bisulfitovým sekvenováním a mezi vzorky pacientů s mnohočetným myelomem byla pozorována extrémní heterogenita. Široké rozmezí hladin 5-mC (0,5 % až 13,2 %), bylo také pozorováno u pacientů s akutní myeloidní leukémií (AML) (Góméz a kol., 2017).

Proteiny TET mají důležitou roli v procesu aktivní demethylace a jejich snížená exprese může způsobit nárůst metylačních změn, které mohou vést až k hypermetylovanému genomu. Naopak důsledkem zvýšené exprese genů *TET* je snížení úrovně metylací, která se může projevit hypometylací genomu.

Hladiny globální hydroxymethylace DNA u vzorků pacientů s mnohočetným myelomem byly stanoveny na základě rovnice regrese získané z kalibrační křivky. Protože získané hodnoty dosahovaly nulových, nebo záporných hodnot, byl výpočet modifikován podle vzorce uvedeného v metodice, námi použitého kitu MethylFlash Hydroxymethylated DNA 5-hmC Quantification Kit Colorimetric (Epigentek). Porovnáním hodnot globální hydroxymethylace DNA u analyzovaných vzorků, které byly vypočítány dvěma rozdílnými postupy, byla zjištěna jejich vzájemná korelace a podobný vývoj u jednotlivých vzorků (není uvedeno).

Wernig-Zorc a kol. (2019) stanovili metodou hmotnostní spektrometrie hodnotu mediánu 5-hmC v DNA B-lymfocytů zdravých jedinců 0,025 % (0,025 ng /100 ng DNA), zatímco u pacientů s chronickou lymfocytární leukémií (CLL) bylo, u B-lymfocytů sortovaných na povrchové markery CD38 a CD19, pozorováno signifikantní snížení hladin 5-hmC, s mediánem 0,013 %. Podobné výsledky (0,038 %) pro B-lymfocyty zdravých jedinců, sortované na povrchový marker CD138 byly naměřeny dle Alberge a kol. (2019).

Tyto výsledky jsou ve shodě s námi detekovanými velmi nízkými hladinami 5-hmC. U patientských vzorků nesortované populace buněk se pohybovaly v rozmezí 0,01 % až 0,14 %, a u 4 vzorků sortované populace buněk se hodnoty pohybovaly mezi 0 % až 0,0065 %.

Ve studii Alberge a kol. (2019), kde byly publikovány obdobné hodnoty 5-hmC v genomové DNA ve vzorcích pacientů MM, sortovaných na povrchový marker CD138, se 5-hmC jevil jako marker progresu onemocnění, protože jeho hladina pozitivně korelovala s délkou přežití pacientů s mnohočetným myelomem. Tato pozorování, včetně našich výsledků tak ukazují, že 5hmC může být markerem progresu a závažnosti tohoto onemocnění.

7 ZÁVĚR

V této diplomové práci byly analyzovány hladiny expresí genů *TET1*, *TET2* a *TET3*, kvantifikovány metylační a hydroxymetylační změny hladin v promotorových sekvencích genů *TET1*, *TET2* a *TET3* pomocí metylačně senzitivních restričních enzymů a byly stanoveny hladiny celkové metylace a hydroxymetylace DNA. Analýzy byly provedeny u nesortovaných buněčných populací 19 pacientů s mnohočetným myelomem nebo monoklonální gamapatií nejasného významu u 11 vzorků buněčných suspenzí pacientů s mnohočetným myelomem nebo monoklonální gamapatií nejasného významu, sortovaných na povrchový marker CD138.

Nízké exprese u obou skupin vzorků (sortovaných i nesortovaných) byly pozorovány u genu *TET1* a genu *TET3* u sortované buněčné populace. Gen *TET2* vykazoval u obou buněčných populací vzorků mnohočetného myelomu nejvyšší expresi, přičemž hydroxymetylační změny byly nejvíce detekovány v promotorové sekvenci tohoto genu. Přesto, že metylační i hydroxymetylační změny promotorových sekvencí byly zjištěny u všech tří genů, metylační změny převládaly ve sledované promotorové sekvenci genu *TET3* u všech patientských vzorků obou testovaných skupin sortované a nesortované populace buněk. Významná negativní korelace byla pozorována mezi normalizovanou hodnotou exprese a úrovní metylace promotoru genu *TET1* ($r = -0,74$) a střední míra negativní korelace byla zjištěna u genu *TET3* ($r = -0,37$). Naproti tomu významná pozitivní korelace byla pozorována mezi normalizovanou hodnotou exprese a úrovní hydroxymetylace promotoru genu *TET1* ($r = 0,80$) u nesortovaných buněk a *TET3* ($r = 0,90$) u sortovaných buněk. Porovnání procentického zastoupení 5-mC v promotorových sekvencích genů *TET1* a *TET3* ukázalo, že nízká exprese enzymu *TET3* může být, na rozdíl od nízké exprese *TET1*, způsobena vysokým zastoupením 5-mC, tedy přítomností metylačních změn ve sledovaném promotorovém úseku.

Dalším cílem této diplomové práce bylo stanovení globální metylace a hydroxymetylace DNA u pacientů s mnohočetným myelomem. Hodnoty celkové metylace DNA u pacientů s MM byly heterogenní, pohybovaly se v rozmezí 0,03 % až 14,77 % a ve srovnání s jedinci MGUS vykazovaly nižší úroveň globální metylace DNA. Ještě nižší byla úroveň hydroxymetačních změn, přítomnost 5-hmC v analyzovaných sekvencích promotorů sledovaných genů se pohybovala v rozmezí 0,01 % až 0,14 %.

8 LITERATURA

Adam Z., Krejčí M., Simonides J. (2011): Choroby způsobené ukládáním monoklonálních imunoglobulinů. Zdravotnictví a medicína.

Agirre X., Castellano G., Pascual M., Heath S., Kulis M., Segura V., Bergmann A., Esteve A., Merkel A., Raineri E., Agueda L., Blanc J., Richardson D., Clarke L., Datta A., Russiñol N., Queirós A. C., Beekman R., Rodríguez-Madoz J., S. José-Enériz E., Fang F., Gutiérrez N. C., García-Verdugo J. M., Robson M. I., Schirmer E. C., Guruceaga E., Martens J. H. A, Gut M, Calasanz M. J., Flicek P., Siebert R., Campo E., San Miguel J. F., Melnick A., Stunnenberg H. G., Gut I. G., Prosper F., Martín-Subero J. I. (2015): Whole-epigenome analysis in multiple myeloma reveals DNA hypermethylation of B cell specific enhancers. *Genome Research* 25: 478–487.

Alberge J. B., Magrangeas F., Wagner M., Denié S., Guérin-Charbonnel C., Campion L., Attal M., Avet-Loiseau H., Carell T., Moreau P., Minvielle S., Sérandour A. A. (2019): DNA hydroxymethylation reveals transcription regulation networks and prognostic signatures in multiple myeloma. *BioRxiv* 1–11.

Alzrigat M., Árraga A. A., Jernbetg-Wiklund H. (2018): Epigenetics in multiple myeloma: From mechanisms to therapy. *Seminars in Cancer Biology* 51: 101–115.

Antequera F., Bird A. (1993): Number of CpG islands and genes in human and mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 90: 11995–11999.

Avet-Loiseau H., Daviet A., Brigaudeau C., Callet-Bauchu E., Terré C., Lafage-Pochitaloff M., Désangles F., Ramond S., Talmant P., Bataille R. (2001). Cytogenetic, interphase, and multicolor fluorescence *in situ* hybridization analyses in primary plasma cell leukemia: a study of 40 patients at diagnosis, on behalf of the Intergroupe Francophone du Myelome and the Groupe Francais de Cytogenetique Hematologique. *Blood* 97: 822–825.

Barau J., Teissandier A., Zamundio N., Roy S., Nalesso V., Herault Y., Guillou F., Bouchis D. (2016): The DNA methyltransferase DNMT3C protects male germ cells from transposon activity. *Science* 354: 909–912.

Bartl R., Frisch B., Fateh-Moghadam A., Kettner G., Jaeger K., Sommerfeld W. (1987): Histologic classification and staging of multiple myeloma: A Retrospective and Prospective Study of 674 Cases. *American Journal of Clinical Pathology* 87: 342–355.

Bashtryko P., Jankevicius G., Smarandache A., Jurkowska R. Z., Ragozin S., Jeltsch A. (2012): Specificity of Dnmt1 for methylation of hemimethylated CpG sites resides in its catalytic domain. *Chemistry and biology* 19: 572–578.

Bataille R., Jigo G., Robillard N., Barille-Nion S, Harousseau J. L., Moreau P., Amiot M. Pellat-Deceunynck C (2006): The phenotype of normal, reactive and malignant plasma cells. Identification of “many and multiple myelomas” and of new targets for myeloma therapy. *Haematologica* 91: 1234-1240.

Bataille R., Pellat-Deceunynck C., Robillard N., Avet-Loiseau H., Harousseau, J. L., Moreau P. (2008). CD117 (c-kit) is aberrantly expressed in a subset of MGUS and multiple myeloma with unexpectedly good prognosis. *Leukemia Research* 32: 379–382.

Bestor T. H., Ingram V. M. (1983): Two DNA methyltransferases from murine erythroleukemia cells: purification, sequence specificity, and mode of interaction with DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 80: 5559–5563.

Bird A. P. (1986): CpG-rich islands and the function of DNA methylation. *Nature* 321: 209–213.

Bird A. P. (1992): The essentials of DNA methylation. *Cell* 70: 5–8.

Booth M. J., Raiber E. A., Balasubramanian S. (2014): Chemical methods for decoding cytosine modifications in DNA. *Chemical Reviews* 115: 2240–2254.

Brigle K., Rogers B. (2017): Pathobiology and diagnosis of multiple myeloma. *Seminars in Oncology Nursing* 33: 225–236.

Browne S. J. P., Lio C. W. J., Rao A. (2017): TET proteins in natural and induced differentiation. *Current Opinion in Genetics & Development* 46: 202–208.

Burešová I., Čumová J., Kovářová L., Stossova J., Dementyeva E., Kryukov F., Ševčíková S., Šváchová H., Hájek R. (2012): Bone marrow plasma cell separation-validation of separation algorithm. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 50.

Chiarella A. M., Lu D., Hathaway N. A. (2020): Epigenetic Control of a Local Chromatin Landscape. *International Journal of Molecular Sciences* 21: 1–25.

Chim C. S., Liang R., Leung M. H., Kwong Y. L. (2007): Aberrant gene methylation implicated in the progression of monoclonal gammopathy of undetermined significance to multiple myeloma. *Journal of Clinical Pathology* 60: 104–106.

Cimmino L., Dawlaty M. M., Ndiaye-Lobry D., Yap Y. S., Bakogianni S., Yu Y., Bhattacharyya S., Shaknovich R., Geng H., Lobry C., Mullenders J., King B., Trimarchi T., Aranda-Orgilles B., Liu C., Shen S., Verma A. K., Jaenisch R., Aifantis I. (2015): Tet1 is a tumor suppressor of hematopoietic malignancy. *Nature Immunology* 16: 653–662.

Clark S. J., Melki J. (2002): DNA methylation and gene silencing in cancer: which is the guilty party? *Oncogene* 21: 5380–5387.

Das P. M., Singal R. (2004): DNA methylation and cancer. *Journal of Clinical Oncology* 22: 4632–4642.

Dawlaty M. M., Breiling A., Le T., Barrasa M. I., Raddatz G., Gao Q., Powell B. E., Cheng A. W., Faull K. F., Lyko F., Jaenisch R. (2014): Loss of Tet enzymes compromises proper differentiation of embryonic stem cells. *Developmental Cell* 29: 102–111.

Dhodapkar M. V., Abe E., Theus A., Lacy M., Langford J. K., Barlogie B., Sanderson R. D. (1998): Syndecan-1 is a multifunctional regulator of myeloma pathobiology: control of tumor cell survival, growth, and bone cell differentiation. *Blood* 91: 2679–2688.

Di Stefano B, Sardina J. L., van Oevelen C., Collombet S., Kallin E. M., Vicent G. P., Lu J., Thieffry D., Beato M., Graf T. (2014): C/EBP α poises B cells for rapid reprogramming into induced pluripotent stem cells. *Nature* 506: 235–239.

Dispenzieri A., Stewart A. K., Chanan-Khan A., Rajkumar S. V., Kyle R. A., Fonseca R., Kapoor P., Bergsagel P. L., McCurdy A., Gertz M. A., Lacy M. Q., Lust J. A., Russell S. J., Zeldenrust S. R., Reeder C., Roy V., Buadi F., Dingli D., Hayman S. R., Leung N., Lin Y., Mikhael J., Kumar S. K. (2013): Smoldering multiple myeloma requiring treatment: time for a new definition? *Blood* 122: 4172–4181.

Drayson M., Tang L. X., Drew R., Mead G. P., Carr-Smith H., Bradwell A. R. (2001): Serum free light-chain measurements for identifying and monitoring patients with nonsecretory multiple myeloma. *Blood* 97: 2900–2902.

Dul J. L., Argon Y. (1990): A single amino acid substitution in the variable region of the light chain specifically blocks immunoglobulin secretion. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 87: 8135–8139.

Fabris S., Bollati V., Agnelli L., Morabito F., Motta V., Cutrona G., Recchia S. M. A. G., Gigliotti V., Gentile M., Delilieri G. L., Bertazzi P. A., Ferrarini M., Neri A., Baccarelli A. (2014): Biological and clinical relevance of quantitative global methylation of repetitive DNA sequences in chronic lymphocytic leukemia. *Epigenetics* 6: 188–194.

Figueroa M. E., Abdel-Wahab O., Lu C., Ward P. S., Patel J., Shih A., Li Y., Bhagwat N., Vasanthakumar A., Fernandez H. F., Tallman M. S., Sun Z., Wolniak K., Peeters J. K., Liu W., Choe S. E., Fantin V. R., Paietta E., Löwenberg B., Licht J. D., Godley L. A., Delwel R., Valk P. J., Thompson C. B., Levine R. L., Melnick A. (2010): Leukemic *IDH1* and *IDH2* mutations result in a hypermethylation phenotype, disrupt TET2 function, and impair hematopoietic differentiation. *Cancer Cell* 18: 553–567.

Fonseca R., Bergsagel P. L., Drach J., Shaughnessy J., Gutierrez N., Stewart A. K., Avet-Loiseau H. (2009). International Myeloma Working Group molecular classification of multiple myeloma: spotlight review. *Leukemia* 23: 2210–2221.

Galm O., Wilop S., Reichelt J, Jost E., Gehbauer G., Herman J. G., Osieka R. (2004): DNA methylation changes in multiple myeloma. *Leukemia* 18: 1687–1692.

Gao Y., Chen J., Li K., Wu T., Huang B., Liu W., Kou X., Zhang Y., Huang H., Jiang Y., Yao C., Liu X., Lu Z., Xu Z., Kang L., Chen J., Wang H., Cai T., Gao S. (2013): Replacement of Oct4 by Tet1 during iPSC induction reveals an important role of DNA methylation and hydroxymethylation in reprogramming. *Cell Stem Cell* 12 453–469.

Gardiner-Garden M., Frommer M. (1987): CpG islands in vertebrate genomes. *Journal of Molecular Biology* 196: 261–282.

Gómez A. P., Tovar A. M., Vela-Ojeda J., Carrillo I. O., Cruz F. C., Garrido E. (2017): Mutations in *TET2* and *DNMT3A* genes are associated with changes in global and gene-specific methylation in acute myeloid leukemia. *Tumor Biology* 39: 1–17.

Halliley J. L., Tipton C. M., Liesveld J., Rosenberg A. F., Darce J., Gregoretti I. V., Popova L., Kaminiski D., Fucile C. F., Albizua I., Kyu S., Chiang K. Y., Bradley K. T., Burack R., Slifka M., Hammarlund E., Wu H., Zhao L., Walsh E. E., Falsey A. R., Randall T. D., Cheung W. C., Sanz I., Lee F. E. (2015): Long-lived plasma cells are contained within the CD19-, CD38hi, CD138 subset in human bone marrow. *Immunity* 43: 132–145.

He Y F., Li B. Z., Lu Z., Liu P., Wang Y., Tang Q., Ding J., Jia Y., Chen Z., Li L., Sun Y., Li X., Dai Q., Song C. X., Zhang K., He C., Xu G. L. (2011): Tet-mediated formation of 5-carboxylcytosine and its excision by TDG in mammalian DNA. *Science* 333: 1303–1307.

Holliday R., Pugh J. E. (1975): DNA modification mechanism and gene activity during development. *Science* 173: 226–232.

Houde C., Li Y., Song L., Barton K., Zhang Q., Godwin J., Nand S., Toor A., Alkan S., Smadja N. V., Avet-Loiseau H., Lima C. S., Miele L., Coignet L. J. (2004): Overexpression of the NOTCH ligand JAG2 in malignant plasma cells from multiple myeloma patients and cell lines. *Blood* 104: 3697–3704.

Howlett S. K., Reik W. (1991): Methylation levels of maternal and paternal genomes during preimplantation development. *Development* 113: 119–127.

Iqbal K., Jin S. G., Pfeifer G. P., Szabó P. E. (2011): Reprogramming of the paternal genome upon fertilization involves genome-wide oxidation of 5-methylcytosine. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108: 3642–3647.

Iguchi-Arigo S. M., Schaffner W. (1989): CpG methylation of the cAMP-responsive enhancer/promoter sequence TGACGTCA abolishes specific factor binding as well as transcriptional activation. *Genes & Development* 3: 612–619.

Ito S., D'Alessio A. C., Taranova O. V., Hong K., Sowers L. C., Zhang Y. (2010): Role of Tet proteins in 5mC to 5hmC conversion, ES-cell self-renewal and inner cell mass specification. *Nature* 466: 1129–1133.

Ito S., Shen L., Dai Q., Wu S. C., Collins L. B., Swenberg J. A., He C., Zhang Y. (2011): Tet proteins can convert 5-methylcytosine to 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine. *Science* 333: 1300–1303.

Kinde B., Gabel H. W., Gilbert C. S., Griffith E. C., Greenberg M. E. (2015): Reading the unique DNA methylation landscape of the brain: Non-CpG methylation, hydroxymethylation, and MeCP2. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112: 6800–6806.

Ko M., An J., Bandukwala H. S., Chavez L., Aijö T., Pastor W. A., Segal M. F., Li H., Koh K. P., Lähdesmäki H., Hogan P. G., Aravind L., Rao A. (2013): Modulation of TET2 expression and 5-methylcytosine oxidation by the CXXC domain protein IDAX. *Nature* 497: 122–126.

Ko M., Huang Y., Jankowska A. M., Pape U. J., Tahiliani M., Bandukwala H. S., An J., Lamperti E. D., Koh K. P., Ganetzky R., Liu X. S., Aravind L., Agarwal S., Maciejewski J. P., Rao A. (2010): Impaired hydroxylation of 5-methylcytosine in myeloid cancers with mutant TET2. *Nature* 468: 839–843.

Koh K. P., Yabuuchi A., Rao S., Huang Y., Cunniff K., Nardone J., Laiho A., Tahiliani M., Sommer C. A., Mostoslavsky G., Lahesmaa R., Orkin S. H., Rodig S. J., Daley G. Q., Rao A. (2011). Tet1 and Tet2 regulate 5-hydroxymethylcytosine production and cell lineage specification in mouse embryonic stem cells. *Cell Stem Cell* 8: 200–213.

Kuehl W. M., Bergsagel P. L. (2012): Molecular pathogenesis of multiple myeloma and its premalignant precursor. *Journal of Clinical Investigation* 122: 3456–3463.

Kyle R. A., Gertz M. A., Witzig T. E., Lust J. A., Lacy M. Q., Dispenzieri A., Fonseca R., Rajkumar S. V., Offord J. R., Larson D. R., Plevak M. E., Therneau T. M., Greipp PR. (2003): Review of 1027 patients with newly diagnosed multiple myeloma. *Mayo Clinic Proceedings* 78: 21–33.

Lewis E. B. (1963): Leukemia, multiple myeloma, and aplastic anemia in american radiologists. *Science* 142: 1492–1494.

Li E., Bestor T. H., Jaenisch R. (1992): Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell* 69: 915–926.

Li D., Chen J. a Pei D. (2018): The battle between TET proteins and DNA methylation for the right cell. *Trends in Cell Biology* 28: 973–975.

Li B. Z., Huang Z., Cui Q. Y., Song X. H., Du L., Jeltsch A., Chen P., Li G., Li E., Xu G. L. (2011): Histone tails regulate DNA methylation by allosterically activating *de novo* methyltransferase. *Cell Research* 21: 1172–1181.

Liang G., Weisenberger D. J. (2017): DNA methylation aberrancies as a guide for surveillance and treatment of human cancers. *Epigenetics* 12: 416–432.

Lin P., Owens R., Tricot, G., Wilson C. S. (2004). Flow cytometric immunophenotypic analysis of 306 cases of multiple myeloma. *American Journal of Clinical Pathology* 121: 482–488.

Linet M. S., Harlow S. D, McLaughlin J. K. (1987): A case-control study of multiple myeloma in whites: chronic antigenic stimulation, occupation, and drug use. *Cancer Research* 47: 2978–2981.

Lio C. W. J., Yuita H, Rao A. (2019): Dysregulation of the TET family of epigenetic regulators in lymphoid and myeloid malignancies. *Blood* 134: 1487–1497.

Lio C. W. J., Zhang J., González-Avalos E., Hogan P. G., Chang X., Rao A. (2016): Tet2 and Tet3 cooperate with B-lineage transcription factors to regulate DNA modification and chromatin accessibility. *Elife* 5: 2–26.

Lohr J. G., Stojanov P., Lawrence M. S., Auclair D., Chapuy B., Sougnez C., Cruz-Gordillo P., Knoechel B., Asmann Y. W., Slager S. L., Novak A. J., Dogan A., Ansell S. M., Link B. K., Zou L., Gould J., Saksena G., Stransky N., Rangel-Escareño C., Fernandez-Lopez J. C., Hidalgo-Miranda A., Melendez-Zajgla J., Hernández-Lemus E., Schwarz-Cruzy Celis A., Imaz-Rosshandler I., Ojesina A. I., Jung J., Pedamallu C. S., Lander E. S., Habermann T. M., Cerhan J. R., Shipp M. A., Getz G., Golub T. R. (2012). Discovery and prioritization of somatic mutations in diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) by whole-exome sequencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109: 3879–3884.

Malúšková D., Svobodová I., Kučerová M., Brožová L., Mužík J., Jarkovská J., Hájek R., Maisnar V., Dušek L. (2017): Epidemiology of multiple myeloma in the Czech Republic. *Klinická Onkologie* 30: 235–242.

Margot J. B., Ehrenhofer-Murray A. E., Leonhardt H. (2003): Interactions within the mammalian DNA methyltransferase family. *BMC Molecular Biology* 4: 1–9.

Martinez-Garcia E., Popovic R., Min D. J., Sweet S. M., Thomas P. M., Zamdborg L., Heffner A., Will C., Lamy L., Staudt L. M., Levens D. L., Kelleher N. L., Licht J. D. (2010): The MMSET histone methyl transferase switches global histone methylation and alters gene expression in t(4;14) multiple myeloma cells. *Blood* 117: 211–220.

Martínez-Banos D., Sánchez-Hernández B., Jiménez G., Barrera-Lumbreras G., Barrales-Benítez O. (2017): Global methylation and promoter-specific methylation of the *P16*,

SOCS-1, E-cadherin, P73 and SHP-1 genes and their expression in patients with multiple myeloma during active disease and remission. *Experimental and Therapeutic Medicine* 13: 2442–2450.

Matsuzaki K., Deng G., Tanaka H., Kakar S., Miura S., Kim J. S. (2005): The relationship between global methylation level, loss of heterozygosity, and microsatellite instability in sporadic colorectal cancer. *Clinical Cancer Research* 11: 8564–8569.

Mayer W., Niveleau A., Walter J., Fundele R., Haaf T. (2000): Demethylation of the zygotic paternal genome. *Nature* 403, 501–502.

McCarron M. J., Park P. W., Fooksman D. R. (2017): CD138 mediates selection of mature plasma cells by regulating their survival. *Blood* 129, 2749–2759.

Melamed P., Yosefzon Y., David C., Tsukerman A., Pnueli L. (2018): Tet enzymes, variants, and differential effects on function. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 6: 2–7.

Molloy P. L., Watt F. (1997): DNA methylation and specific protein-DNA interactions. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences* 326: 267–275.

Moore L. D., Le T., Fan G. (2013): DNA methylation and its basic function. *Neuropsychopharmacology* 38: 23–38.

Nan X., Huck-Hui N. G., Johnson C. A., Laherty C. D., Turner B. M., Eisenman R. N., Bird A. (1998): Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature* 393: 386–389.

Neri F., Incarnato D., Krepelova A., Rapelli S., Anselmi F., Parlato C., Medana C., Dal Bello F., Oliviero S. (2015): Single-base resolution analysis of 5-formyl and 5-carboxyl cytosine reveals promoter DNA methylation dynamics. *Cell Reports* 10: 674–683.

Neri F., Rapelli S., Krepelova A., Incarnato D., Parlato C., Basile G., Maldotti M., Anselmi F., Oliviero S. (2017): Intragenic DNA methylation prevents spurious transcription initiation. *Nature* 543: 72–77.

Okano M., Bell D. W., Haber D. A., Li E. (1999): DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for *de novo* methylation and mammalian development. *Cell* 99: 247–257.

Okano M., Xie S., Li E. (1998): Cloning and characterization of a family of novel mammalian DNA (cytosine-5) methyltransferases. *Nature Genetics* 19: 219–220.

Ono R., Taki T., Taketani T., Taniwaki M., Kobayashi H., Hayashi Y. (2002): LCX, leukemia-associated protein with a CXXC domain, is fused to MLL in acute myeloid leukemia with trilineage dysplasia having t(10;11)(q22;q23). *Cancer Research* 62: 4075–80.

Pawlyn C., Kaiser M. F., Heuck C., Melchor L., Wardell C. P., Murison A., Chavan S. S., Johnson D. C., Begum D. B., Dahir N. M., Proszek P. Z., Cairns D. A., Boyle E. M., Jones J. R., Cook G., Drayson M. T., Owen R. G., Gregory W. M., Jackson G. H., Barlogie B., Davies F. E., Walker B. A., Morgan G. J. (2016): The spectrum and clinical impact of epigenetic modifier mutations in myeloma. *Clinical Cancer Research* 22: 5783–5794.

Pecka M. (2002): *Laboratorní hematologie v přehledu: Buňka a krvetvorba*. Finidr, Český Těšín.

Pfaffeneder T., Hackner B., Truss M., Munzel M., Muller M., Deiml C. A., Hagemeyer C., Carell T. (2011): The discovery of 5-formylcytosine in embryonic stem cell DNA. *Angewandte Chemie International Edition* 50: 7008–7012.

Popp C., Dean W., Feng S., Cokus S. J., Andrews S., Pellegrini M., Jacobsen S. E., Reik W. (2010): Genome-wide erasure of DNA methylation in mouse primordial germ cells is affected by AID deficiency. *Nature* 463: 1101–1105.

Prokhorchouk E., Hendrich B. (2002): Methyl-CpG binding proteins and cancer: are MeCpGs more important than MBDs? *Oncogene* 21: 5394–5399.

Prokhortchouk A., Hendrich B., Jørgensen H., Ruzov A., Wilm M., Georgiev G., Bird A., Prokhortchouk E. (2001): The p120 catenin partner Kaiso is a DNA methylation-dependent transcriptional repressor. *Genes & Development* 15: 1613–1618.

Quivoron C., Couronné L., Della Valle V., Lopez C. K., Plo I., Wagner-Ballon O., Do Cruzeiro M., Delhommeau F., Arnulf B., Stern M. H., Godley L., Opolon P., Tilly H., Solary E., Duffourd Y., Dessen P., Merle-Beral H., Nguyen-Khac F., Fontenay M., Vainchenker W., Bastard C., Mercher T., Bernard O. A. (2011): TET2 inactivation results in pleiotropic hematopoietic abnormalities in mouse and is a recurrent event during human lymphomagenesis. *Cancer Cell* 20: 25–38.

Rajkumar S. V., Dimopoulos M. A., Palumbo A., Blade J., Merlini G., Mateos M.-V., Kumar S., Hillengass J., Kastritis E., Richardson P., Landgren O., Paiva B., Dispenzieri A., Weiss B., LeLeu X., Zweegman S., Lonial S., Rosinol L., Zamagni E., Jagannath S., Sezer O., Kristinsson S. Y., Caers J., Usmani S. Z., Lahuerta J. J., Johnsen H. E., Beksac M., Cavo M., Goldschmidt H., Terpos E., Kyle R. A., Anderson K. C., Durie B. G., Miguel, J. F. S. (2014). International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. *The Lancet Oncology* 15: 538–548.

Rasmussen K. D., Helin K. (2016): Role of TET enzymes in DNA methylation, development, and cancer. *Genes Development* 30, 733–750.

Ravichandrian M., Jurkowska R. Z., Jurkowski T. P. (2017): Target specificity of mammalian DNA methylation and demethylation machinery. *Organic & Biomolecular Chemistry* 16: 1419–1435.

Ridley R. C., Xiao H., Hata H., Woodliff J., Epstein J., Sanderson R. D. (1993): Expression of syndecan regulates human myeloma plasma cell adhesion to type I collagen. *Blood* 81: 767–774.

Robertson A. B., Klungland A., Rognes T., Leiros I. (2009): DNA repair in mammalian cells. *Cellular and Molecular Life Sciences* 66, 981–993.

Sahara N., Takeshita A., Shigeno K., Fujisawa S., Takeshita K., Naito K., Ihara M., Ono T., Tamashima S., Nara K., Ohnishi K., Ohno R. (2002): Clinicopathological and prognostic characteristics of CD56-negative multiple myeloma. *British Journal of Haematol* 117: 882–885.

Salhia B., Baker A., Ahmann G., Auclair D., Fonseca R., Carpten J. (2010): DNA methylation analysis determines the high frequency of genic hypomethylation and low frequency of hypermethylation events in plasma cell tumors. *Cancer Research*: 6943–6944.

Sanderson R. D., Lalor P., Bernfield M. (1989): B-lymphocytes express and lose syndecan at specific stages of differentiation. *Cell Regulation* 1: 27–35.

Smith Z. D., Meissner A. (2013): DNA methylation: roles in mammalian development. *Nature Reviews Genetics* 14: 204–220.

Solary E., Bernard O. A., Tefferi A., Fuks F., Vainchenker W. (2014): The Ten-Eleven Translocation-2 (*TET2*) gene in hematopoiesis and hematopoietic diseases. *Leukemia* 28: 485–496.

Song J., Teplova M., Ishibe-Murakami S., Patel D. J. (2012): Structure-based mechanistic insights into DNMT1-mediated maintenance DNA methylation. *Science* 335: 709–712.

Spruijt C. G., Gnerlich F., Smits A. H., Pfaffeneder T., Jansen P. W., Bauer C., Münzel M., Wagner M., Müller M., Khan F., Eberl H. C., Mensinga A., Brinkman A. B., Lephikov K, Müller U., Walter J., Boelens R., van Ingen H., Leonhardt H., Carell T., Vermeulen M. (2013): Dynamic readers for 5-(hydroxy)methylcytosine and its oxidized derivatives. *Cell* 152:1146–1159.

Swerdlow S. H, Campo E., Harris N. L., Jaffe E. S., Pileri S. A., Stein H., Thiele J. (2017) WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. International Agency for Research on Cancer, Lyon.

Tahiliani M., Koh K. P., Shen Y., Pastor W. A., Bandukwala H., Brudno Y., Agarwal S., Iyer A. (2009): Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science* 324: 930–935.

Takahashi K., Yamanaka S. (2006): Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126: 663–676.

Tamaru H., Selker E. U. (2001): A histone H3 methyltransferase controls DNA methylation in *Neurospora crassa*. *Nature* 414: 277–283.

Tate P. H., Bird A. P. (1993): Effects of DNA methylation on DNA-binding proteins and gene expression. *Current Opinion in Genetics & Development* 3: 226–231.

Turner J. G., Gump J. L., Zhang C., Cook J. M., Marchion D., Hazlehurst L., Munster P., Schell M. J., Dalton W. S., Sullivan D. M. (2006): ABCG2 expression, function, and promoter methylation in human multiple myeloma. *Blood* 108: 3881–3889.

Walker B. A., Wardell C. P., Chiecchio L., Smith E. M., Boyd K. D., Neri A., Davies F. E., Ross F. M., Morgan G. J. (2011): Aberrant global methylation patterns affect the molecular pathogenesis and prognosis of multiple myeloma. *Blood* 117: 553–562.

Wernig-Zorc S., Yadav M. P., Kopparapu P. K., Bemark M., Kristjansdottir H. L., Andersson P. O., Kanduri C., Kanduri M. (2019): Global distribution of DNA hydroxymethylation and DNA methylation in chronic lymphocytic leukemia. *Epigenetics & Chromatin* 12: 1–15.

Williams K., Christensen J., Pedersen M. T., Johansen J. V., Cloos P. A. C., Rappsilber J., Helin K. (2011): TET1 and hydroxymethylcytosine in transcription and DNA methylation fidelity. *Nature* 473: 343–348.

Wu H., D'Alessio A. C., Ito S., Xia K., Wang Z., Cui K., Zhao K., Sun Y. E., Zhang Y. (2011): Dual functions of Tet1 in transcriptional regulation in mouse embryonic stem cells. *Nature* 473: 389–393.

Yang J., Guo R., Wang H., Ye X., Zhou Z., Dan J., Wang H., Gong P., Deng W., Yin Y., Mao S., Wang L., Ding J., Li J., Keefe D. L., Dawlaty M. M., Wang J., Xu G., Liu L. (2016): Enzymes regulate telomere maintenance and chromosomal stability of mouse ESCs. *Cell Reports* 15: 1809–1821.

Yoder J. A., Walsh C. P., Bestor T. H. (1997): Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites. *Trends in Genetics* 13: 335–340

Yu H., Su Y., Shin J., Zhong C., Guo J. U., Weng Y. L., Gao F., Geschwind D. H., Coppola G., Ming G. L., Song H. (2015): Tet3 regulates synaptic transmission and homeostatic plasticity via DNA oxidation and repair. *Nature Neuroscience* 18: 836–843.

E-zdroje:

NCBI Gene [online] [navštíveno 16.3.2020]

Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/6382>