

Univerzita Palackého v Olomouci

Diplomová práce

Olomouc 2020

Bc. Eva Gottwaldová

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Porovnání expresního profilu vybraných
tumor-supresorových genů s úrovní metylace
v promotoru těchto genů**

Diplomová práce

Bc. Eva Gottwaldová

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2020

Vedoucí práce: Ing. Kateřina Smešný Trtková, CSc.

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Akademický rok: 2018/2019

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: Bc. Eva GOTTWALDOVÁ
Osobní číslo: R18928
Studijní program: N1501 Biologie
Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie
Název tématu: Porovnání expresního profilu vybraných tumor-supresorových genů s úrovní metylace v promotoru těchto genů
Zadávající 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 vybraných tumor-supresorových genů metodou kvantitativního PCR; 4. Bisulfitová modifikace izolované DNA a detekce úrovně metylace (5-mC) v promotoru studovaných genů metodou pyrosekvencování; 5. Ovlivnění myelomové buněčné linie demetylačním činidlem (5-Aza-2'-deoxycytidin) s následnou expresní a metylační analýzou vybraných tumor-supresorových genů.

Rozsah grafických prací:


Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování diplomové práce: tištěná

Seznam odborné literatury:

1. Kaiser MF et al. (2013): Global methylation analysis identifies prognostically important epigenetically inactivated tumor suppressor genes in multiple myeloma. *Blood* 122: 219-226; doi:10.1182/blood-2013-03-487884
2. Woong KY and Chim CS (2015): DNA methylation of tumor suppressor protein-coding and non-coding genes in multiple myeloma. *Epigenomics* 7(6): 985-1001; doi: 10.2217/epi.15.57
3. Jung S et al. (2012): DNA methylation in multiple myeloma is weakly associated with gene transcription. *PLoS ONE* 7(12): e52626; doi: 10.1371/journal.pone.0052626
4. Heller G et al. (2008): Genome-wide transcriptional response to 5-aza-2'-deoxycytidine and trichostatin A in multiple myeloma cells. *Cancer Res.* 68(1): 44-54; doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-2531
5. Yan J et al. (2018): SPARC is down-regulated by DNA methylation and functions as a tumor suppressor in T-cell lymphoma. *Exp Cell Res.* 364(2): 125-132; doi: 10.1016/j.yexcr.2017.12.022

Vedoucí diplomové práce:


Ing. Kateřina Smešný Trtková, CSc.

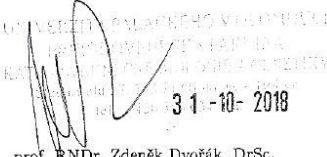
Ústav klinické a molekulární patologie

Datum zadání diplomové práce: 12. října 2018

Termín odevzdání diplomové práce: 31. července 2020

doc. RNDr. Martin Kubala, Ph.D.
děkan

L.S.


31. 10. 2018
prof. RNDr. Zdeněk Dvořák, DrSc.
vedoucí katedry

V Olomouci dne

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora: Bc. Eva Gottwaldová

Název práce: Porovnání expresního profilu vybraných tumor-supresorových genů s úrovní metylace v promotoru těchto genů

Typ práce: Diplomová

Pracoviště: Katedra buněčné biologie a genetiky

Vedoucí práce: Ing. Kateřina Smešný Trtková, CSc.

Rok obhajoby práce: 2020

Klíčová slova: Mnohočetný myelom, metylace, tumor-supresorový gen, *RBPI*, *GPX3*, *PDLIM4*, demetylační činidla, 5-aza-2'-deoxycytidin, 5-azacytidin, disulfiram

Počet stran: 65

Počet příloh: 9

Jazyk: Český

SOUHRN

Tato diplomová práce je zaměřena na porovnání expresního profilu vybraných tumor-supresorových genů s úrovní metylace v promotoru těchto genů metodou pyrosekvenování u pacientů s mnohočetným myelomem a u myelomových buněčných linií po jejich ovlivnění látkami s demetylačním účinkem.

Teoretická část je zaměřena na obecné informace o krvetvorbě a vývoji B-lymfocytů. Dále se zabývá stádií, která předchází aktivnímu mnohočetnému myelomu a následně se věnuje progredujícímu mnohočetnému myelomu. V závěru teoretické části práce jsou popsány cytogenetické a epigenetické faktory, které hrají důležitou roli při vzniku a progresi mnohočetného myelomu a také možnosti jeho léčby.

V experimentální části byla provedena kvantifikace exprese tumor-supresorových genů *RBPI*, *GPX3* a *PDLIM4* u 17 patientských vzorků aspirátů kostní dřeně (nesortované buněčné populace pacientů s mnohočetným myelomem) a u 5 buněčných vzorků sortovaných na antigen CD138. Expresní analýza studovaných tumor-supresorových genů byla provedena také u vzorků buněk myelomových linií KMS12-BM a KMS12-PE ovlivněných demetylačními činidly 5-aza-2'-deoxycytidin a 5-azacytidin a disulfiramem, činidlem s potenciálním demetylačním účinkem.

Expresní profil tumor-supresorových genů byl porovnán s úrovní metylace ve vybraných úsecích promotorů těchto genů. Korelační analýzou byla zjištěna silná negativní korelace mezi expresí a úrovní metylace v promotorovém úseku genu *GPX3* u sortovaných buněčných populací pacientů s mnohočetným myelomem. Mírnou negativní korelaci u sortovaných

pacientských vzorků vykazoval gen *RBPI* a pozitivní korelace byla zjištěna u genu *PDLIM4*. U nesortovaných vzorků pacientů s mnohočetným myelomem nebyla zjištěna významná korelace mezi expresí a úrovní metylace u žádného ze sledovaných genů.

U buněk myelomových linií KMS12-BM a KMS12-PE došlo ke zvýšení exprese u všech tří studovaných genů po ovlivnění demetylačním činidlem 5-aza-2'-deoxycytidin a disulfiramem, látkou s potenciálním demetylačním účinkem.

Výsledky naznačují, že obnovení nebo zvýšení exprese umlčeného tumor-supresorového genu *GPX3* nebo *RBPI*, může být důležité k ovlivnění progresu tohoto onemocnění.

Bibliographical identification:

Author's first name and surname: Bc. Eva Gottwaldová

Title: Comparison of the expression profile of selected tumor-suppressor genes and a methylation level in promoter of these genes

Type of thesis: Master

Department: Department of cell biology and genetics

Supervisor: Ing. Kateřina Smešný Trtková, CSc.

The year of presentation: 2020

Keywords: Multiple myeloma, methylation, tumor-suppressor gene, *RBPI*, *GPX3*, *PDLIM4*, demethylation agents, 5-aza-2'-deoxycytidine, 5-azacytidine, disulfiram

Number of pages: 65

Number of appendices: 9

Language: Czech

SUMMARY

This master thesis is focused on the comparison of the expression profile of selected tumor-suppressor genes and a methylation level of the promoter sequence by pyrosequencing method in multiple myeloma patients and myeloma cell lines after treatment with demethylating agents.

The theoretical part summarizes basic information about hematopoiesis and B-cell development. Furthermore, there are described stages that precede active multiple myeloma and progressive multiple myeloma. At the end of the theoretical part are described cytogenetic and epigenetic factors that play an important role in formation and progressing of multiple myeloma and treatment options as well.

The experimental part contains 17 patient samples of bone marrow aspirates (unsorted cell populations of patients with multiple myeloma) and 5 patient samples after cell sorting for the CD138 antigen. The quantification of tumor-suppressor genes *RBPI*, *GPX3* and *PDLIM4* was performed. The expression analysis of tumor-suppressor genes was performed in myeloma cell lines KMS12-BM and KMS12-PE after their treatment with the demethylating agents, 5-aza-2'-deoxycytidine and 5-azacytidine and disulfiram.

The expression profile of tumor-suppressor genes was compared with the methylation level in selected promoter regions. Strong negative correlation between an expression and a level of the promoter sequence methylation of *GPX3* gene in patient samples of sorted cell populations, and the low negative correlation between an expression and the promoter methylation level in *RBPI* gene

were detected. On the contrary, the positive correlation was detected in *PDLIM4* in patient samples of sorted cell populations. In unsorted patients samples no significant correlation was detected.

The re-expression and/or increased of *RBPI*, *GPX3* and *PDLIM4* gene expressions in comparison to untreated cells after treatment of both KMS12-BM and KMS12-PE cell lines with demethylating agents 5-aza-2'-deoxycytidine and disulfiram were found.

This finding indicates an important role of both studied *RBPI* or *GPX3* tumor-suppressor genes in progression of multiple myeloma.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením Ing. Kateřiny Smešný Trtkové, CSc. a za použití uvedených literárních zdrojů.

V Olomouci

.....

Bc. Eva Gottwaldová

Poděkování

Velké poděkování patří Ing. Kateřině Smešný Trtkové, CSc., vedoucí mé diplomové práce, za odborné vedení, cenné rady, připomínky a čas, který mi věnovala. Děkuji také pracovníkům Ústavu klinické a molekulární patologie LF UP v Olomouci za vstřícnost během vypracovávání experimentální části. V neposlední řadě děkuji mé rodině za podporu během studia.

Pro zpracování diplomové práce byly využity finanční prostředky z grantu NV18-03-00500 Ministerstva zdravotnictví České republiky a interního grantu LF_2020_0015 Univerzity Palackého v Olomouci.

Obsah

1	Úvod.....	1
2	Cíle práce	2
3	Literární přehled.....	3
3.1	Krvetvorba.....	3
3.1.1	B-lymfocyty	4
3.1.2	Plazmatické buňky a jejich malignity	6
3.2	Monoklonální gamapatie nejasného významu	7
3.3	Doutnající myelom (SMM, smoldering multiple myeloma).....	8
3.4	Mnohočetný myelom (MM, multiple myeloma).....	8
3.4.1	Imunofenotyp normálních a nádorových plazmatických buněk.....	8
3.4.2	Příznaky onemocnění	9
3.4.3	Kritéria pro stanovení diagnózy	10
3.5	Cytogenetické abnormality.....	13
3.5.1	Translokace t(11;14) (q13;q32).....	14
3.5.2	Translokace t(4;14) (p16;q32).....	14
3.5.3	Translokace t(14;16) (q32;q23) a t(14;20) (q32;q12)	14
3.5.4	Sekundární aberace	15
3.6	Epigenetické faktory	17
3.6.1	Metylace DNA	17
3.6.1.1	Hypermetylace promotorů tumor-supresorových genů u MM	19
3.6.1.2	Demetylační činidla	20
3.6.1.3	Inhibice DNMT1 pomocí disulfiramu	21
3.6.2	Histonové modifikace	22
3.6.2.1	Acetylace histonů.....	22
3.6.2.2	Metylace histonů.....	23
3.7	Léčba mnohočetného myelomu.....	24
4	Materiál a metody.....	26
4.1	Biologický materiál	26

4.1.1	Nesortovaná populace jedinců (vzorky aspirátu kostní dřeně).....	26
4.1.2	Sortovaná populace buněk (CD138)	27
4.1.3	Myelomové buněčné linie	27
4.2	Laboratorní pomůcky a přístroje	28
4.3	Použité chemikálie a roztoky	29
4.4	Použité soupravy	30
4.5	Použité počítačové programy	30
4.6	Izolace RNA z aspirátů kostní dřeně a/nebo ze sortované populace buněk CD138.....	30
4.7	Reverzní transkripce.....	31
4.8	Expresní analýza genů <i>RBP1</i> , <i>GPX3</i> a <i>PDLIM4</i>	32
4.9	Izolace DNA z aspirátů kostní dřeně a ze sortované populace buněk CD138	33
4.10	Bisulfitová modifikace	34
4.11	Metylačně-specifická PCR.....	35
4.12	Kontrolní elektroforetická separace v 2% agarózovém gelu.....	37
4.13	Pyrosekvenování	37
4.14	Ovlivnění myelomových buněčných linií	39
4.15	Izolace RNA z lyzátu myelomových buněčných linií a následná expresní analýza.....	41
4.16	Izolace DNA z buněčné suspenze, bisulfitová modifikace a stanovení úrovně metylace	42
5	Výsledky	43
5.1	Expresní analýza tumor-supresorových genů <i>RBP1</i> , <i>GPX3</i> a <i>PDLIM4</i>	43
5.1.1	Expresní analýza u patientských vzorků.....	43
5.1.2	Expresní analýza u ovlivněných myelomových buněčných linií	45
5.2	Detekce úrovně metylace v promotoru studovaných genů.....	45
5.3	Korelační analýza.....	50
6	Diskuse.....	52
7	Závěr	55
8	Literatura	56
9	Přílohy.....	65

Seznam symbolů a zkratek

5-mC	5-methylcytosin
β 2M	β -2-mikroglobulin
APC	antigen-prezentující buňka, antigen-presenting cell
AZA	5-azacytidin
<i>BCL9</i>	gen pro transkripční koaktivátor B-cell lymphoma
BCR	B buněčný receptor, B cell receptor
<i>CCND1</i>	gen pro cyklin D1
CD138	syndecan-1
CDK	cyklin-dependentní kináza
CDKN2C	inhibitor cyklin-dependentních kináz
CpG	dinukleotid cytosin-fosfatidyl-guanin
CRAB	hyperkalcémie, renální insuficience, anémie, kostní postižení
Ct	cyklus prahu, cycle of treshold
DAC	5-aza-2'-deoxycytidin
DMSO	dimetylsulfoxid
DNMT	DNA metyltransferáza, DNA methyltransferase
DSF	tetraethylthiuram disulfid, disulfiram
<i>FGFR3</i>	gen pro receptor fibroblastového růstového faktoru 3, fibroblast growth factor receptor 3
<i>GPX3</i>	gen pro glutathion peroxidázu 3, glutathion peroxidase 3
h-MM	hyperdiploidní mnohočetný myelom
HAT	histon acetyltransferáza, histone acetyltransferase
HDAC	histon deacetyláza, histone deacetylase
HMT	histon metyltransferáza, histone methyltransferase
HSC	hematopoetická kmenová buňka, hemopoetic stem cell
IMWG	Mezinárodní myelomová pracovní skupina, International myeloma working group
MAF	transkripční faktor
Met	metylovaná kontrola
MeCP	metyl-CpG-vazebný protein
MGUS	monoklonální gamapatie nejasného významu, monoclonal gammopathy of undetermined significance
MM	mnohočetný myelom, multiple myeloma
<i>MMSET</i>	gen pro doménu SET mnohočetného myelomu, multiple myeloma SET domain
<i>MYC</i>	proto-onkogen kódující jaderné transkripční faktory
nh-MM	ne-hyperdiploidní mnohočetný myelom
NMet	nemetylovaná kontrola
PCs	plazmatické buňky, plasma cells

PCR	polymerázová řetězová reakce, polymerase chain reaction
<i>PDLIM4</i>	gen pro PDZ a LIM doménu 4, PDZ and LIM domain 4
pRB	retinoblastomový protein
<i>RBP1</i>	gen pro retinol-vázající protein, retinol binding protein 1
<i>RAS</i>	rodina proto-onkogenů kódující malé GTPázy
ROS	reaktivní kyslíkové radikály
SAM	S-adenosylmethionin
SMM	doutnající mnohočetný myelom, smouldering multiple myeloma
SPARC	kyselý sekretovaný protein bohatý na cystein, secreted protein acidic and rich in cysteine
TET	proteiny „ten-eleven translocation“
TGFBI	β -indukovaný transformující růstový faktor, transforming growth factor beta induced
<i>TP53</i>	tumor-supresorový gen kódující protein p53

Seznam obrázků

Obrázek č. 1: Průběh hematopoézy	4
Obrázek č. 2: Genetické události během vývoje mnohočetného myelomu	6
Obrázek č. 3: Cytogenetické abnormality v průběhu vývoje mnohočetného myelomu	13
Obrázek č. 4: Metylace cytosinu na 5-metylcytosin pomocí enzymu DNA metyltransferázy	18
Obrázek č. 5: CpG místo tumor-supresorového genu u normálních a nádorových buněk	20
Obrázek č. 6: Strukturní srovnání mezi 5-azacytidinem, 5-aza-2'-deoxycytidinem a zebularinem	21
Obrázek č. 7: Schéma pipetování enzymu, substrátu a nukleotidů do kazety	38
Obrázek č. 8: Pipetování jednotlivých reakčních činidel do 24-jamkové destičky s buňkami.....	40
Obrázek č. 9: Produkty metylačně-specifické PCR reakce separované v 2% agarózovém gelu....	46
Obrázek č. 10: Produkty metylačně-specifické PCR reakce separované v 2% agarózovém gelu..	46
Obrázek č. 11: Pyrogram, analýza metylace v promotoru genu <i>PDLIM4</i> nesortovaného patientského vzorku 2014-01-22	49
Obrázek č. 12: Pyrogram, analýza metylace v promotoru genu <i>PDLIM4</i> buněčné linie KMS12-BM u neovlivněného vzorku (DMSO).....	49

Seznam tabulek

Tabulka č. 1: Diagnostická kritéria MGUS, doutnajícího myelomu, mnohočetného myelomu a plazmocelulární leukemie.....	10
Tabulka č. 2: Kritéria poškození orgánů nebo tkání myelomem	11
Tabulka č. 3: Aktualizovaná kritéria pro diagnostiku MM	11
Tabulka č. 4: Přehled cytogenetických abnormalit spojených s mnohočetným myelomem	16
Tabulka č. 5: Charakteristika analyzovaného souboru pacientů.....	26
Tabulka č. 6: Charakteristika analyzovaného souboru pacientů.....	27
Tabulka č. 7: Jednotlivé složky reakční směsi.....	31
Tabulka č. 8: Teplotní a časový profil pro reverzní transkripci.....	31
Tabulka č. 9: Příprava reakční směsi pro real-time PCR analýzu pro geny <i>RBPI</i> , <i>GPX3</i> a housekeepingový gen <i>$\beta 2M$</i>	32
Tabulka č. 10: Příprava reakční směsi pro real-time PCR analýzu pro gen <i>PDLIM4</i>	32
Tabulka č. 11: Teplotní a časový profil real-time PCR	32
Tabulka č. 12: Příprava reakční směsi pro bisulfitovou modifikaci	34
Tabulka č. 13: Teplotní a časový profil bisulfitové modifikace	34
Tabulka č. 14: Příprava pufru BL	34
Tabulka č. 15: Sady primerů pro metylačně-specifickou PCR.....	36
Tabulka č. 16: Příprava reakční směsi pro metylačně-specifickou PCR.....	36
Tabulka č. 17: Teplotní a časový profil metylačně-specifické PCR.....	36
Tabulka č. 18: Sekvenační primery	37
Tabulka č. 19: Příprava reakční směsi pro pyrosekvenování	38
Tabulka č. 20: Ředění reakčních činidel o zásobní koncentraci na pracovní koncentrace	39
Tabulka č. 21: Ředění pracovních koncentrací činidel na před-finální koncentrace	39
Tabulka č. 22: Ředění pracovních/před-finálních koncentrací činidel na finální koncentrace.....	39
Tabulka č. 23: Ředění reakčních činidel o zásobní koncentraci na pracovní koncentrace	40
Tabulka č. 24: Ředění reakčních činidel o pracovní koncentraci na finální koncentrace.....	40
Tabulka č. 25: Analyzované sekvence v promotorových oblastech tumor-supresorových genů <i>RBPI</i> , <i>GPX3</i> a <i>PDLIM4</i>	49

1 Úvod

Mnohočetný myelom je maligní onemocnění plazmatických buněk, které se kumulují v kostní dřeni a nadměrně produkují monoklonální imunoglobulin. Jedná se o druhé nejčastější hemato-onkologické onemocnění. Aktivnímu mnohočetnému myelomu předchází premaligní stádium monoklonální gamapatie nejasného významu a asymptomatický, též známý jako doutnající mnohočetný myelom (Indrák, 2014).

Na vzniku a vývoji mnohočetného myelomu se podílejí genetické i epigenetické změny. Genetické abnormality, jako jsou bodové mutace, translokace či delece, lze nalézt u 90 % plazmatických buněk pacientů s MM. K epigenetickým faktorům patří metylace DNA a modifikace histonů, které mohou měnit a řídit expresi genů. Genetické i epigenetické odchylky jsou úzce propojeny a vzájemně se ovlivňují.

Nejvíce prostudovanou epigenetickou modifikací je metylace DNA, za kterou jsou zodpovědné enzymy DNA metyltransferázy. Metylován je cytosin na 5-metylcytosin v dinukleotidu CpG. Dinukleotidy CpG se v genomu shlukují za tvorby ostrůvků CpG, které se nacházejí především v promotorových oblastech genů. Ve zdravých buňkách je metylace DNA důležitá při regulaci genové exprese během buněčné diferenciace, genomického imprintingu nebo v umlčování transponovatelných elementů. Zdravé buňky mají v promotorových oblastech ostrůvky CpG nemetylované, což je předpokladem aktivace genové exprese (Dimopoulos *et al.*, 2014).

Mnohočetný myelom je spojován s hypermetylací promotorových oblastí tumor-supresorových genů a většina studií se shoduje, že v průběhu onemocnění se intenzita metylace DNA zvyšuje (Walker *et al.*, 2011; Kaiser *et al.*, 2013). Snížit metylaci DNA lze pomocí činidel s demetylační aktivitou. Výsledkem je obnovení genové exprese. K látkám s demetylační aktivitou patří nukleosidová analoga, například 5-azacytidin a 5-aza-2'-deoxycytidin, která vyžadují intracelulární fosforylaci a následně inkorporaci do DNA. Obě tyto látky jsou inaktivovány nukleosid deaminázou a pokud je hladina tohoto enzymu v buňce vysoká, zvyšuje se léková rezistence buňky. V klinické praxi se zdá být více účinnější 5-aza-2'-deoxycytidin než 5-azacytidin (Dai *et al.*, 2005; Esteller, 2009).

2 Cíle práce

- 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 vybraných tumor-supresorových genů metodou kvantitativního PCR.
- 4) Bisulfitová modifikace izolované DNA a detekce úrovně metylace (5-mC) v promotoru studovaných genů metodou pyrosekvenování.
- 5) Ovlivnění myelomové buněčné linie demetylačními činidly 5-aza-2'-deoxycytidin a 5-azacytidin s následnou expresní a metylační analýzou vybraných tumor-supresorových genů.

3 Literární přehled

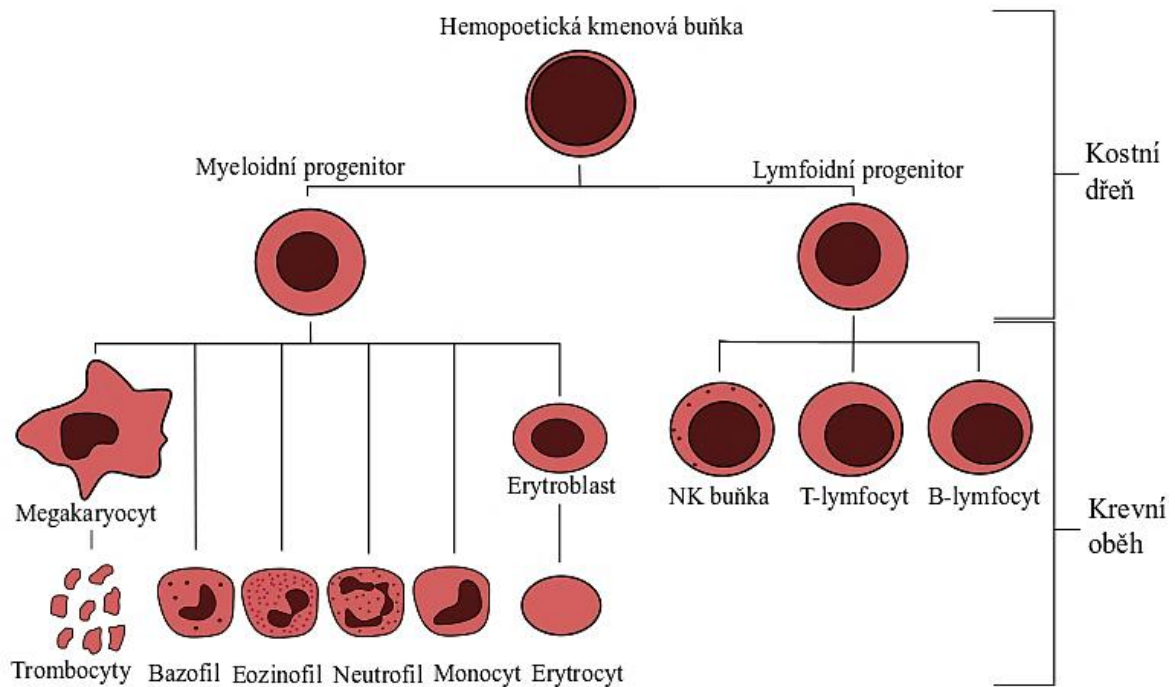
3.1 Krvetvorba

Krvetvorba, neboli hematopoéza, je proces vzniku krevních buněk v krvetvorných orgánech. Probíhá ve dvou fázích, prenatalní a postnatalní. Prenatalní fáze krvetvorby začíná v krevních ostrůvcích žloutkového vaku, následně se přesouvá do brzlíku, dále pak do jaterní tkáně a sleziny a nakonec do kostní dřeni. Zatímco krvetvorba ve žloutkovém vaku je pouze erytroidního charakteru, v brzlíku se vyvíjejí i mateřské buňky lymfocytů a v játrech pak vznikají mateřské buňky krevních destiček. Od 20. týdne prenatalního období, kdy se do krvetvorby zapojuje kostní dřeň, se tvoří všechny druhy krevních buněk, které jsou obsaženy v krvi (Pecka, 2002).

V postnatalní fázi probíhá krvetvorba v červené kostní dřeni, některé lymfocyty však vznikají i nadále v lymfatické tkáni. Po narození je červená kostní dřeň přítomná ve všech kostech a s vyšším věkem je nahrazována tukovou kostní dření, kde již krvetvorba neprobíhá. U dospělého člověka je červená kostní dřeň zachována převážně v těle obratlů, pánvi, žebrech, lebce a lopatkách. (Pecka, 2002). V hematopoetické kostní dřeni vznikají všechny typy krevních buněk, dozrávají zde B-lymfocyty a prekurzory T-lymfocytů.

Všechny krevní buňky se vyvíjejí z hematopoetické kmenové buňky (HSC), která je přítomná v krvetvorné tkáni kostní dřeni. Takováto buňka je schopná sebeobnovy a proliferuje a diferencuje do progenitorových a prekurzorových buněk a následně do zralých krevních buněk. Během diferenciaci postupně mizí schopnost sebeobnovy a snižuje se počet cest, do kterých může buňka diferencovat. HSC dává vznik dvěma odlišným liniím, myeloidní a lymfoidní. Z myeloidního prekurzoru vznikají erytrocyty, trombocyty, dále pak monocyty a tři druhy granulocytů – bazofily, eozinofily a neutrofilů. Z lymfoidního prekurzoru vznikají NK buňky, T-lymfocyty a B-lymfocyty (Sieta *et Weissman*, 2010; Pospíšilová *et al.*, 2013; Hořejší *et al.*, 2017).

B-lymfocyty, vzniklé v kostní dřeni, dokončují svůj vývoj ve slezině nebo lymfatických uzlinách po setkání s antigenem. Jejich konečným stádiem jsou plazmatické buňky, které jsou schopny produkovat protilátky. Prekurzory T-lymfocytů, taktéž vzniklé v kostní dřeni, se přesouvají do brzlíku (thymu), kde dozrávají. Brzlík pak opouští dvě fenotypově odlišné subpopulace, prekurzory pomocných T-buněk (Th), s povrchovým receptorem CD4, a prekurzory cytotoxických T-buněk (Tc), s povrchovým receptorem CD8. Tyto prekurzory diferencují na zralé efektorové Th a Tc buňky po setkání s antigenem vázaným antigen-prezentující buňkou (APC). Část B- a T-lymfocytů je schopná diferencovat do tzv. paměťových buněk po setkání s antigenem. Tyto buňky jsou po setkání se stejným antigenem rychle aktivovány a spustí rychlejší a efektivnější sekundární odpověď (Hořejší *et al.*, 2017).



Obrázek č. 1: Průběh hematopoézy (převzato a upraveno dle Hořejší *et al.*, 2017)

3.1.1 B-lymfocyty

5–15 % cirkulujících lymfocytů tvoří B-lymfocyty. Ve fetálním období se B-lymfocyty vytváří v játrech, v dospělosti pak v kostní dřeni. Osídlují povrchové vrstvy lymfatických uzlin, sleziny a Peyerových plaků, kde vytváří kulatá zárodečná centra, tzv. folikuly. Rozptýleně se nacházejí v kostní dřeni a obvodové krvi. Jejich životnost je 10–20 dní.

B-lymfocyty jsou charakteristické výskytem specifických receptorů, na které se váží různé antigeny. Tyto receptory se označují jako B buněčné receptory (BCR) a jsou tvořeny molekulami imunoglobulinů. Po vazbě antigenu na BCR dochází k jejich shlukování, proliferaci a následně pak k diferenciaci B-lymfocytů v plazmatické buňky schopné produkovat protilátky. Část těchto buněk pak zůstává v organismu jako paměťové buňky.

BCR jsou tvořeny převážně imunoglobuliny typu IgM a IgD zapuštěnými hydrofobními částmi do plazmatické membrány. Kontakt mezi membránovým imunoglobulinem a antigenem je nezbytný k vyvolání tvorby volných protilátek (imunoglobulinů) proti molekulám stejného antigenu. Jeden B-lymfocyt nese všechny membránové imunoglobuliny s identickou vazebnou specifitou pro určitý epitop antigenu. Tato vazebná specifita je shodná s vazebnou specifitou imunoglobulinů, které jsou následně produkovány plazmatickými buňkami odvozenými od tohoto B-lymfocytu (Pecka, 2002; Otová *et al.*, 2013).

Řetězce imunoglobulinů jsou kódovány třemi genovými komplexy, u nichž dochází během vývoje lymfocytu k přeskupování. Jedná se o genové komplexy pro těžký řetězec imunoglobulinu

(IgH), pro lehký řetězec kappa (IgK) a pro lehký řetězec lambda (IgL). Genové komplexy IgK a IgL se skládají ze tří oblastí – variabilní (V), spojovací (J) a konstantní (C). Genový komplex IgH má navíc oblast D (z anglického diversity). Při diferenciaci B-lymfocytů nejprve dochází v progenitorech B-lymfocytů k přestavbám v komplexu IgH, kdy je jeden gen z D oblasti spojen s jedním genem z J oblasti. V dalším kroku je pak ke spojení V-D přemístěn jeden gen z V oblasti. Takto uspořádané geny jsou přepisovány od genu V až ke genu C, z primárního transkriptu jsou vystřiženy nekódující sekvence a po translaci mRNA se v buňce tvoří těžké řetězce typu μ .

Přeskupování genů pro lehké řetězce nastává až po tvorbě těžkého řetězce μ . Nejprve jsou přeskupovány geny pro kappa řetězec. Jeden gen z V komplexu je spojen s jedním z genů J komplexu. Následně dojde k deleci části DNA, která se nachází mezi těmito geny. Výsledkem je mRNA obsahující specifickou kombinaci V-J spojenou s genem C. Pokud nedojde k tvorbě funkčního lehkého řetězce kappa, který by byl schopný tvořit s těžkým řetězcem μ kompletní povrchový imunoglobulin M, je zahájeno přeskupování genů řetězce lambda. Imunoglobuliny produkované jednou buňkou tedy mají vždy buď řetězec kappa, nebo lambda, nikdy oba současně. Expresi povrchového IgM se buňka stává nezralým B-lymfocytem. Zralým B-lymfocytem se buňka stává po současné expresi povrchového IgM a IgD, který vzniká alternativním sestřihem mRNA.

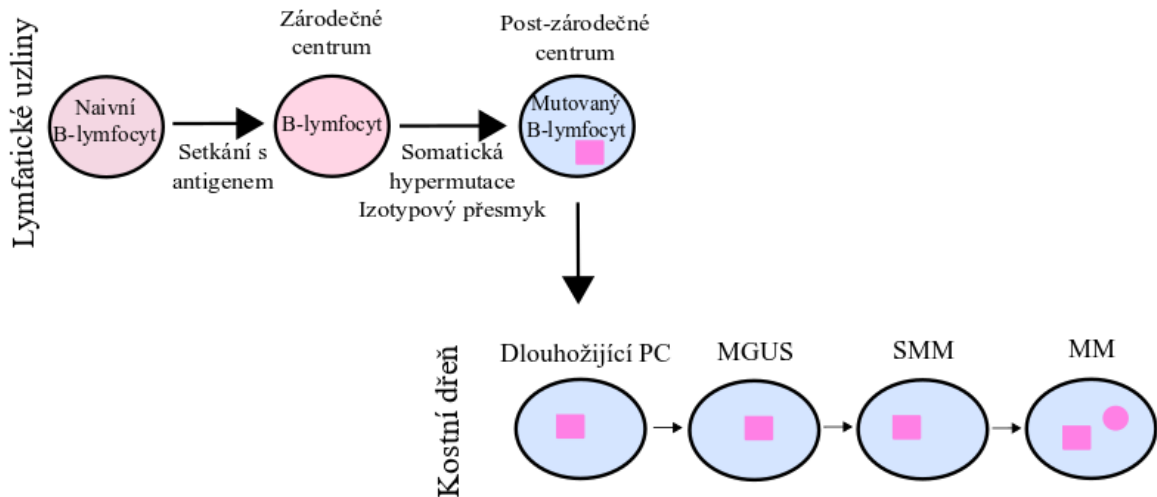
Při setkání zralého B-lymfocytu s antigenem je součástí primární aktivace B-lymfocytu tzv. somatická hypermutace, neboli mutace V segmentů přeskupených genů. Stimulovaný B-lymfocyt se začne rychle dělit, rychlá proliferace a replikace DNA bývá příčinou chyb, které, pokud uniknou mechanismu opravy, mohou zvýšit variabilitu imunoglobulinu. Cílem je selekce mutantních imunoglobulinů, které mají vysokou afinitu k antigenu (Otová *et al.*, 2013; Hořejší *et al.*, 2017).

Důležitým procesem při diferenciaci B-lymfocytů a přeskupování genů imunoglobulinů je izotypový přesmyk. Po aktivaci buněk antigenem dochází k vyštěpování úseků IgH genů, které kódují C oblast těžkého řetězce. Po eliminaci části C oblasti IgH genu je do mRNA přepsán ten C segment, který je v přeskupeném genu nejbližší VDJ segmentu. Po sestřihu a translaci je vzniklý izotyp těžkého řetězce odlišný od původního těžkého řetězce μ . Izotypovým přesmykem tak vznikají místo původních IgM i jiné podtřídy imunoglobulinů – IgG, IgA nebo IgE (Hořejší *et al.*, 2017).

3.1.2 Plazmatické buňky a jejich malignity

Vývoj B-lymfocytů je zakončen tvorbou plazmatických buněk (PCs). PCs jsou terminálně diferencované, nedělící se buňky, jejichž funkcí je produkce protilátek specifických pro antigen (Shapiro-Shelef *et* Calame, 2005).

Předpokladem pro vznik a rozvoj mnohočetného myelomu je počáteční genetická mutace, která se odehrává v zárodečném centru během procesu somatické hypermutace a izotypového přesmyku. Zmutovaný B-lymfocyt pak dokončuje svou diferenciaci do plazmatické buňky s dlouhou životností v kostní dřeni. Plazmatické buňky s dlouhou životností jsou podskupinou PCs produkujících protilátky. Tyto buňky dlouhou dobu přežívají v kostní dřeni a přispívají k imunologické paměti. Mutowané plazmatické buňky s dlouhou životností získávají další mutace během vývoje z MGUS (monoklonální gamapatie nejasného významu), přes SMM (doutnající mnohočetný myelom), až do MM (mnohočetný myelom) (Bianchi *et* Anderson, 2014).



Obrázek č. 2: Genetické události během vývoje mnohočetného myelomu (převzato a upraveno dle Bianchi *et* Anderson, 2014). Růžové čtverečky – počáteční genetická mutace; růžový kruh – nově získaná mutace. Naivní B-lymfocyt je lymfocyt, který se ještě nesetkal s antigenem. PC – plazmatické buňky, MGUS – monoklonální gamapatie nejasného významu, SMM – doutnající mnohočetný myelom, MM – mnohočetný myelom

3.2 Monoklonální gamapatie nejasného významu

Stádium MGUS předchází vývoji symptomatického mnohočetného myelomu, případně asymptomatického, též známo jako doutnající MM (Dimopoulos *et al.*, 2014). Jedná se o premaligní stav s omezeným množstvím maligních plazmatických buněk v kostní dřeni (<10 %), koncentrací monoklonálního imunoglobulinu v séru nižší než $30 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ a bez průkazu jiných poruch plazmatických buněk nebo symptomů MM. Jedinci s diagnostikovaným MGUS by měli být sledováni kvůli možné progresi do dalších stádií nemoci. Incidence přechodu mezi stádiem MGUS a aktivním MM je průměrně 1 % ročně (Kyle *et al.*, 2003).

MGUS lze rozdělit na MGUS s nízkým rizikem, s průměrnou roční progresí do MM 0,26 %, a MGUS s vysokým rizikem, s progresí až 12 % ročně. Klinický průběh jedinců s MGUS závisí na určitých klíčových biomarkerech – koncentrace a typ M proteinu v séru, poměr volných lehkých řetězců v séru, infiltrace kostní dřene klonálními plazmatickými buňkami, stabilita koncentrace M proteinu v séru v čase, přítomnost cirkulujících plazmatických buněk v periferní krvi, cytogenetické změny a další.

Incidence MGUS se také zvyšuje s věkem, u lidí mladších 50 let se vyskytuje u 0,2 % jedinců, za hranicí 70 let jsou to pak 3 %. Počet jedinců s MGUS se liší u různých etnických skupin, u Afroameričanů a Afričanů je přibližně dvojnásobný než u Kavkazanů. U Japonců je podíl jedinců s MGUS naopak nižší než u kavkazské populace (Kyle *et al.*, 2010; Klincová *et al.*, 2011).

Přibližně 15–20 % pacientů z celkového počtu MGUS produkuje IgM typ M proteinu a má lymfoidní nebo lymfoplazmocytární fenotyp (Sandecká *et al.*, 2018). MGUS lze proto dále rozdělit na non-IgM MGUS, IgM MGUS a MGUS s přítomností lehkých řetězců. 80 % jedinců s MGUS pochází z non-IgM formy MGUS a pouze 20 % z formy IgM MGUS. Non-IgM MGUS se vyznačuje koncentrací monoklonálního proteinu v séru (jiného než IgM) $<30 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$, u IgM MGUS je M proteinem právě IgM. U MGUS s přítomností lehkých řetězců je kritériem abnormální poměr volných lehkých řetězců ($<0,26$ nebo $>1,65$), dále musí být splněna kritéria jako zvýšená koncentrace příslušného volného lehkého řetězce, absence exprese těžkých řetězců při identifikaci typu paraproteinu (monoklonálního imunoglobulinu), absence poškození orgánů či tkání asociovaných s myelomem, koncentrace maligních plazmatických buněk v kostní dřeni nižší než 10 % a koncentrace monoklonálního proteinu v moči nižší než 500 mg za 24 hodin (Rajkumar *et al.*, 2014).

3.3 Doutnající myelom (SMM, smoldering multiple myeloma)

Doutnající mnohočetný myelom je známý jako asymptomatický myelom. Jedná se o přechodný stav mezi MGUS a aktivním MM. V případě doutnajícího myelomu je koncentrace M proteinu v séru $\geq 30 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ a množství maligních plazmatických buněk v kostní dřeni $\geq 10 \%$, přičemž ale chybí poškození orgánů či tkání souvisejících s onemocněním. Během prvních pěti let progreduje do MM 10 % pacientů za rok, 3 % během následujících pěti let a 1–2 % v následujících 10 letech. Pacienti musí být pečlivě sledováni, protože u mnoha z nich dojde k rozvoji symptomatického (mnohočetného) myelomu (Kyle *et al.*, 2003; Kyle *et al.*, 2010).

3.4 Mnohočetný myelom (MM, multiple myeloma)

Mnohočetný myelom prezentuje 1 % všech nádorů. Incidence onemocnění je 5 případů na 100 000 obyvatel (Sant *et al.*, 2010) a medián věku pacientů je 66–70 let. Frekvence výskytu u osob mladších 30 let je 0,02–0,3 % s mírnou převahou u mužů (Kazandjian, 2016). Častěji je postižena černošská populace, a to 2–3krát oproti bělošské populaci. Stejně tak úmrtnost u černošské populace je vyšší než u bělochů (Bianchi *et Anderson*, 2014).

Mnohočetný myelom je zhoubné onemocnění plazmatických buněk. Změněné plazmatické buňky, též nazývány myelomové, se hromadí v kostní dřeni a nadměrně produkují monoklonální imunoglobulin, též nazývaný jako M protein nebo paraprotein. Produkované imunoglobuliny mohou být kompletní molekuly, případně mohou být tvořeny pouze lehkými řetězci, ve výjimečných případech jsou tvořeny pouze spojovacím J-řetězcem imunoglobulinů (Adam *et al.*, 2001). V důsledku hromadění plazmatických buněk v kostní dřeni také dochází k útlumu tvorby normálních buněk krvetvorby a jejich krevnímu nedostatku. Nedostatek těchto krevních buněk má pak za následek slabost, bolesti hlavy, únavu, vyšší krvácivost, případně zvýšenou náchylnost k infekcím (Adam, 2008).

3.4.1 Imunofenotyp normálních a nádorových plazmatických buněk

Normální plazmatické buňky jsou heterogenní a exprimují cytoplazmatický imunoglobulin, nejčastěji znak CD28 a CD54 (Adam *et al.*, 1997). Klasickým imunofenotypem nádorové plazmatické buňky je CD19-, CD56+, CD38+ a CD138+ (Pospíšilová *et al.*, 2013). Plazmatické nádorové buňky nejčastěji exprimují antigeny CD38 a CD138 (syndecan-1), ale exprese CD38 může být u abnormálních plazmatických buněk snížena. Exprese CD138 je zvýšena, oproti normálním plazmatickým buňkám. Antigen CD45 je exprimován v nízkých úrovních nebo není exprimován vůbec. Pro rozlišení myelomových buněk od nádorových plazmatických buněk doporučuje Jeong *et al.* (2012) imunofenotypizační model složený z CD19-, CD45-, CD56+ a CD138+ (CD38+). Změněné exprese antigenů, které nebyly nalezeny u normálních

plazmatických buněk, zahrnují také antigeny CD56+, CD200+, CD28+, CD117+, CD20+, CD52+ či CD27- (Pileri *et al.*, 2017).

Syndecan-1, neboli povrchový antigen CD138, je membránový glykoprotein bohatý na heparan sulfát. Syndecany se mohou obecně účastnit interakcí buňka-buňka a buňka-mezibuněčné prostředí. Syndecan-1 váže buňky ke komponentům mezibuněčného prostoru (intersticiální matrix) – ke kolagenu I, III nebo V, fibronektinu, trombospondinu a dalším. Gen pro syndecan-1 se nachází na chromozomu 2 a jeho exprese byla popsána na normálních i nádorových plazmatických buňkách kostní dřeně a periferní krve pacientů s MM (Fišerová *et al.*, 2001; Čumová *et al.*, 2008).

Exprese syndecanu-1 na povrchu myelomových buněk může být detekována pomocí monoklonální protilátky B-B4. Tato protilátka se používá v průtokové cytometrii pro purifikaci nádorových buněk pacientů s MM. Exprese CD138 na povrchu myelomových buněk je specifická pro myelomové linie, které exprimují zralý fenotyp CD38+, CD19- a CD45-, a je omezena v myelomových liniích s nezralým fenotypem CD45+, CD19+. Obdobně v patientských vzorcích je vyšší exprese CD138 u zralejších cirkulujících plazmatických buněk (CD38+, CD45-) a nižší u méně zralých plazmatických buněk (CD38+, CD45+). Kromě toho jsou plazmatické buňky zdravé kostní dřeně nositeli CD19+ a exprese syndecanu-1 je nižší, než v plazmatických buňkách, které jsou CD19-. Exprese syndecanu-1 v myelomových buňkách tedy koreluje s fenotypovou vyspělostí nádorových buněk (Dhodapkar *et Sanderson*, 2009).

3.4.2 Příznaky onemocnění

Klinické projevy mnohočetného myelomu jsou nespecifické a často kombinované. Mezi nejčastější symptomy onemocnění patří bolesti zad a kostí, které se projevují jako osteoporóza. Časté jsou také změny v krevním obrazu – anémie, trombocytopenie a leukocytopenie – které se projevují únavou, dušností a krvácením do kůže a sliznic. Objevují se opakované infekce imunitní nedostatečnosti B-lymfocytů, u pokročilého stádia onemocnění pak T-lymfocytů. Poruchy B-lymfocytární imunity způsobují omezenou produkci funkčních imunoglobulinů, která se stupňuje s progresí onemocnění.

Mezi příznaky způsobené monoklonálním imunoglobulinem patří motorická a senzitivní polyneuropatie, myelomová nefropatie, poruchy hemostázy a hyperviskozita. Polyneuropatie neboli nezánnětlivé onemocnění nervů je časté u senzitivních vláken a způsobuje difúzní bolesti končetin. U motorických vláken je polyneuropatie vzácná. Poruchy funkce ledvin jsou způsobeny převážně volnými lehkými řetězci a mohou vést až k selhání ledvin a následně potřeby chronické dialyzační léčby. Mezi poruchy hemostázy patří trombocytopenie u pacientů s tvorbou lehkých řetězců. Lehké řetězce adherují na povrch trombocytů a ovlivňují jejich funkci. Hyperviskozita

krve způsobuje závažnou poruchu koagulačních mechanismů, které se projevují purpurou, krvácením do trávicího ústrojí či trombózou. Hyperviskozita je nejčastější u IgM gamapatií.

K méně častým příznakům mnohočetného myelomu patří syndrom zvýšení kapilární propustnosti, který může souviset s otoky nohou. Dalšími mohou být kardiální příznaky, jako je například srdeční selhání způsobené hyperviskozitou (Adam *et al.*, 2001; Šálek, 2008).

3.4.3 Kritéria pro stanovení diagnózy

Pro potvrzení diagnózy mnohočetného myelomu dle Mezinárodní myelomové skupiny z roku 2003 (IMWG, International Myeloma Working Group) je důležitá přítomnost monoklonálního imunoglobulinu v krvi a/nebo moči, počet monoklonálních plazmatických buněk v kostní dřeni vyšší než 10 % a přítomnost některého z kritérií poškození cílových orgánů nebo tkání myelomem – hyperkalcémie, renální insuficience, anémie nebo kostní postižení – souhrnně označována pod zkratkou CRAB (blíže specifikováno v Tabulce č. 2) (Kyle *et al.*, 2003).

V roce 2014 vydala IMWG aktualizovaný přehled kritérií pro stanovení diagnózy mnohočetného myelomu, který zahrnuje, vedle přítomnosti CRAB, také identifikaci biomarkerů spojených s nevyhnutelným rozvojem CRAB.

Tabulka č. 1: Diagnostická kritéria MGUS, doutnajícího myelomu, mnohočetného myelomu a plazmocelulární leukemie (převzato International Myeloma Working Group, 2003)

Onemocnění	Definice
MGUS	Koncentrace monoklonálního proteinu v séru $<30 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ Infiltrace kostní dřene plazmatickými buňkami $<10 \%$ Bez známek dalšího proliferačního onemocnění z B-lymfocytů Bez poškození koncových orgánů či tkání asociovaných s myelomem (souhrnně označeno zkratkou CRAB – hyperkalcémie, renální insuficience, anémie a kostní postižení)
Doutnající mnohočetný myelom	Koncentrace monoklonálního proteinu v séru $\geq 30 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ a/nebo klonální populace z plazmatických buněk v kostní dřeni $\geq 10 \%$ Bez poškození koncových orgánů či tkání
Mnohočetný myelom	Průkaz monoklonálního proteinu v séru a/nebo v moči Klonální zmnožení plazmatických buněk v kostní dřeni Přítomnost symptomů asociovaných s myelomem (CRAB)
Plazmocelulární leukemie	Klonální populace plazmatických buněk přítomná v periferní krvi $>2000\cdot\text{l}^{-1}$ nebo 20 % z leukocytů Přítomnost monoklonálního proteinu v séru, infiltrace kostní dřene nebo poškození orgánů nebo tkání asociovaných s myelomem nebo s kritérii CRAB, která podporují pravděpodobnost diagnózy, ale nejsou vyžadována pro její stanovení

Tabulka č. 2: Kritéria poškození orgánů nebo tkání myelomem (převzato International Myeloma Working Group, 2003)

Kritérium	Definice
Hyperkalcémie (C)	Zvýšení hladiny vápníku o 0,25 nad normální limit nebo $>2,75 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$
Renální insuficience (R)	Kreatinin $>173 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$
Anémie (A)	Hemoglobin $20 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ pod dolní limit nebo $<100 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$
Kostní změny (B)	Lytická kostní ložiska nebo osteoporóza s kompresivními zlomeninami
Další nálezy související s myelomem	Symptomatická hyperviskozita, amyloidóza, opakující se bakteriální infekce (>2 epizody za 12 měsíců)

Tabulka č. 3: Aktualizovaná kritéria pro diagnostiku MM (převzato International Myeloma Working Group, 2014)

Klonální expanze plazmatických buněk v kostní dřeni $\geq 10 \%$ nebo biopticky prokázaný kostní/extramedulární plazmocytom a současná přítomnost alespoň jednoho orgánového či tkáňového poškození nebo biomarkeru malignit	
Hyperkalcémie	Zvýšení hladiny vápníku o 0,25 nad normální limit nebo $>2,75 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$
Renální insuficience	Clearence kreatininu $<40 \text{ ml}$ za minutu nebo sérový kreatinin $>177 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$
Anémie	Hemoglobin $20 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ pod dolní hranici normálního rozmezí nebo $<100 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$
Kostní změny	Jedna nebo více osteolytických lézí na kosterní radiografii nebo CT (výpočetní tomografie)
Biomarkery	Přítomnost klonálních plazmatických buněk v kostní dřeni $\geq 60 \%$
	Poměr postižených a nepostižených volných lehkých řetězců v séru ≥ 100
	>1 fokální léze $\geq 5 \text{ mm}$ při MRI vyšetření (magnetická rezonance)

K diagnostice mnohočetného myelomu se používají tři laboratorní testy – elektroforéza proteinů krevního séra, imunofixační elektroforéza (elektroforéza bílkovin) a stanovení volných lehkých řetězců v séru. Přítomnost M proteinu musí být potvrzena imunofixační elektroforézou, především se jedná o potvrzení M proteinu tvořeného kompletní molekulou imunoglobulinu. Nelze ale diagnostikovat pacienty mnohočetného myelomu, kteří produkují pouze monoklonální volné lehké řetězce, jelikož se v séru vyskytují v nízkých koncentracích, které jsou touto metodou nedetekovatelné. Elektroforetická imunofixace je nezbytná k určení imunoglobulinové třídy M proteinu. Stanovení volných lehkých řetězců odhalí onemocnění u pacientů, kteří byli negativní při elektroforéze, jedná se až o 20 % pacientů. Po stanovení monoklonálního imunoglobulinu následuje vyšetření kostní dřeně ke zjištění, zda je kostní dřeň infiltrována plazmatickými buňkami. Zároveň se provádí rentgen skeletu ke zjištění přítomnosti osteolytických ložisek. Po splnění všech kritérií k diagnostice mnohočetného myelomu se provádí také cytogenetické testy, které jsou důležité pro prognózu onemocnění (Adam *et al.*, 2001; Šálek, 2008). V současnosti nejvíce rozšířenou molekulárně-cytogenetickou metodou je fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) umožňující testovat specifické chromozomové aberace. Až v 90 % případů je tak možné zachytit chromozomové odchylky u pacientů s onemocněním MM (Sandecká *et al.*, 2018).

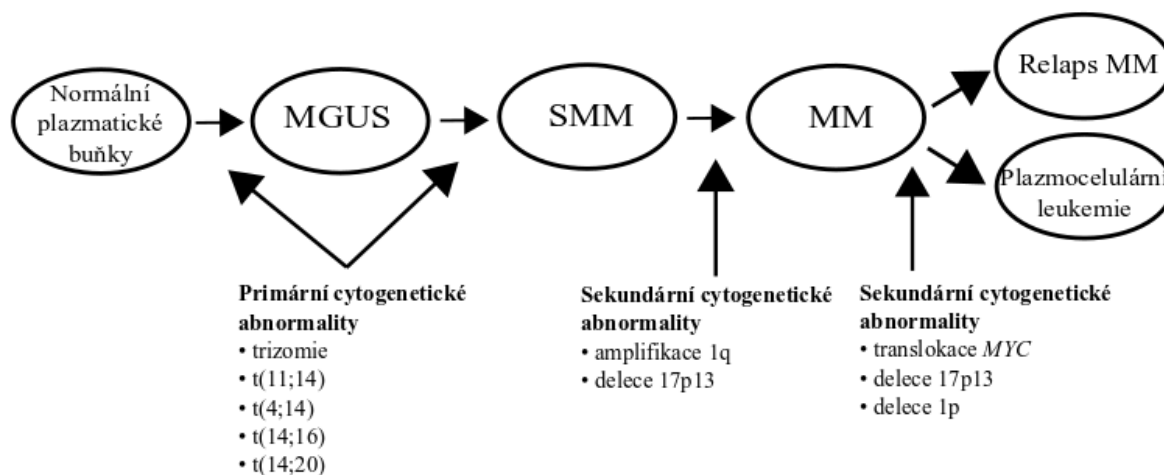
3.5 Cytogenetické abnormality

Mnohočetný myelom je onemocnění s velkou heterogenitou, která má původ v širokém spektru genetických abnormalit.

Fonseca *et al.* (2009) rozdělil mnohočetný myelom do tří kategorií – hyperdiploidní MM (h-MM, 45 %), ne-hyperdiploidní MM (nh-MM, 40 %) a neklasifikovaní (15 %). U h-MM jsou časté trizomie chromozomů 3, 5, 7, 9, 11, 15, 19 a 21 (Sawyer, 2011) a translokace těžkého řetězce imunoglobulinu IgH. U pacientů s h-MM je příznivější prognóza a častěji se jedná o starší pacienty, než v případě nh-MM. Ne-hyperdiploidní MM je charakteristický hypodiploidii, pseudodiploidii nebo tetraploidii a vysokou translokací IgH. Mezi nejčastěji deletované chromozomy patří chromozomy 13, 14, 16 a 22, 28, 29, 30 (Fonseca *et al.*, 2009).

Nejčastější cytogenetickou abnormalitou jsou reciproké translokace onkogenů do blízkosti imunoglobulinových zesilovačů. Tyto translokace vznikají jako důsledek nehomologní rekombinace genu pro imunoglobulin H (Balcárková *et al.*, 2016). Výskyt translokací IgH je v případě MGUS 50 % a při přechodu do MM se zvyšuje na 90 %. Translokace lehkého řetězce imunoglobulinu kappa nebo lambda je v případě MGUS 10 % a 20 % u MM.

Translokace, které se podílejí na iniciaci onemocnění, se nazývají primární, naopak sekundárními translokacemi se rozumí ty, které hrají roli v progresi onemocnění. Primární translokace se vyskytují již ve stádiu MGUS, zatímco sekundární jsou u MGUS vzácné nebo se zde vůbec nevyskytují (Bergsagel *et Kuehl*, 2001).



Obrázek č. 3: Cytogenetické abnormality v průběhu vývoje mnohočetného myelomu (převzato a upraveno dle Rajan *et Rajkumar*, 2015). MGUS – monoklonální gamapatie nejasného významu, SMM – doutnající mnohočetný myelom, MM – mnohočetný myelom

3.5.1 Translokace t(11;14) (q13;q32)

Translokace t(11;14) (q13;q32) představuje 15 % všech případů MM (Fonseca *et al.*, 2009) a pacienti s tímto typem translokace vykazují delší dobu přežití (Garand *et al.*, 2003). Gen *CCND1*, nacházející se v pozici 11q13 a kódující cyklin D1, je translokován do blízkosti genu pro těžký řetězec imunoglobulinu v pozici 14q32, čímž dochází k jeho nadměrné expresi. Cyklin D1, spolu s dalšími cykliny, má důležitou roli při vstupu buněk z G1 fáze do S fáze buněčného cyklu. Cyklin D1 tvoří komplex s cyklin-dependentními kinázami 4 (CDK4) a 6 (CDK6). Tento komplex je schopný fosforylovat retinoblastomový protein (pRB), který je asociován s transkripčním faktorem E2F. Následně dochází k disociaci transkripčního faktoru E2F, který aktivuje transkripci genů, které jsou potřebné pro přechod z G1 do S fáze (Hoyer *et al.*, 2000; Pawlyn *et Morgan*, 2017). Touto cestou ve finále dochází ke zkrácení G1 fáze, rychlejšímu přestupu do S fáze buněčného cyklu a k vyšší proliferaci plazmatických buněk (Hoyer *et al.*, 2000).

3.5.2 Translokace t(4;14) (p16;q32)

Translokace t(4;14) (p16;q32) je spojená se špatnou prognózou (Garand *et al.*, 2003), vyskytující se u 15 % případů MM, ovlivňuje především telomerickou část chromozomu 4. Translokací dochází k deregulaci genu pro receptor fibroblastového růstového faktoru 3 (*FGFR3*, fibroblast growth factor receptor 3) na chromozomu 14 a genu pro doménu SET mnohočetného myelomu (*MMSET*, multiple myeloma SET domain) na chromozomu 4.

Gen *MMSET* kóduje protein ovlivňující histon metyltransferázovou aktivitu histonů. Pokud je zvýšená exprese proteinu *MMSET*, dochází k umlčení exprese cílových genů v důsledku snížené metylace histonu H3. Důsledkem je pak změna adheze buněk, vyšší růst, genetická nestabilita a zvýšené přežití buněk (Balcárková *et al.*, 2016; Pawlyn *et Morgan*, 2017).

V 25 % případů dochází k částečným delecím na derivovaném chromozomu 14, případně ke ztrátě celého derivovaného chromozomu 14, což je spojeno se ztrátou exprese genu *FGFR3* (Sawyer, 2011; Balcárková *et al.*, 2016).

3.5.3 Translokace t(14;16) (q32;q23) a t(14;20) (q32;q12)

Translokace t(14;16) (q32;q23), spojená se špatnou prognózou onemocnění (Garand *et al.*, 2003), se vyskytuje u 6–7 % pacientů s MM. U tohoto typu translokace dochází ke zvýšené expresi proto-onkogenů *MAF*, které náleží do rodiny transkripčních faktorů MAF.

Translokace t(14;20) (q32;q12) je méně častá, vyskytuje se pouze u 2 % pacientů s MM. Je charakteristická zvýšenou expresí proto-onkogen *MAFB* (Sawyer, 2011; Pawlyn *et Morgan*, 2017).

3.5.4 Sekundární aberace

Během vývoje nádoru dochází u nádorových klonů k hromadění dalších genetických změn. Mezi nejčastější genetické abnormality patří translokace nebo amplifikace proto-onkogenu *MYC* (8q24), abnormality chromozomu 1, ztráta nebo delece chromozomu 13 a delece chromozomu 17p13 (Fonseca *et al.*, 2009). Tyto sekundární změny vedou ke zvýšení aktivity komplexu cyklin D–CDK, což vede k dalšímu zvýšení proliferační aktivity buněk (Pawlyn *et Morgan*, 2017).

Translokace genu *MYC* se objevuje v pozdnějším stádiu onemocnění a souvisí s jeho progresí. Ve 40 % případů nezahrnují genové translokace lokusy pro řetězce imunoglobulinů. Pokud jsou do translokace zapojeny lokusy pro řetězce Ig, jedná se nejčastěji o přestavbu genu *MYC* s lokusem IgH (14q32), méně pak s lokusem pro lehký řetězec IgL (22q11) a nejméně s IgK (2p11). Touto přestavbou dochází k nadměrné expresi onkogenu *MYC*, který se dostává do oblasti „enhanceru“ – zesilovače. Tento typ sekundární aberace je spojován s agresivním průběhem nemoci a špatnou prognózou (Shou *et al.*, 2000; Dib *et al.*, 2008).

Mezi abnormality chromozomu 1 patří amplifikace úseku 1q21, tvorba izochromozomu 1q nebo ztráta oblastí 1p13–1p31. Všechny tyto abnormality jsou spojeny se špatnou prognózou (Sawyer *et al.*, 1998; Pawlyn *et Morgan*, 2017). Amplifikace oblasti 1q21 se nevyskytuje u pacientů s MGUS, ale je detekována u 43 % pacientů s MM a v 72 % případech mnohočetného myelomu v relapsu (Hanamura *et al.*, 2006). Sawyer *et al.* (1998) prokázali vzácnou opakující se translokaci t(1;8) (p11;q24) zahrnující gen *MYC*. Jedná se o typ translokace genu *MYC*, která neobsahuje imunoglobulinové přeskupení.

Abnormality chromozomu 13 jsou spojovány s krátkou dobou přežití pacientů. U 15 % případů onemocnění jsou detekovány delece chromozomálních úseků, z 85 % případů se jedná o monosomii chromozomu 13. U 90 % případů je společně detekována delece chromozomu 13 a translokace t(4;14) (p16;q32) (Avet-Loiseau *et al.*, 2002; Fonseca *et al.*, 2009).

Delece 17p13 vede ke ztrátě tumor-supresorového genu *TP53*. Jeho produkt, protein p53, se podílí na regulaci buněčného cyklu a indukuje apoptózu v reakci na stresové signály, jako je oxidační stres či poškození DNA. Inaktivace genu hraje roli při onkogenezi a rozvoji nádorového onemocnění. Monoalelická delece 17p13 je spojena s nepříznivou prognózou a agresivnější formou onemocnění (Fonseca *et al.*, 2009; Lionetti *et al.*, 2016).

Důležitá se zdá být také mutace proto-onkogenu *RAS*, která se zřídka vyskytuje u pacientů s MGUS, ale je velmi častá u pacientů s MM. Do rodiny proto-onkogenů *RAS* patří geny *N-RAS*, *K-RAS* a *H-RAS*. Proteinové produkty těchto genů patří do rodiny malých GTPáz, které se podílejí na přenosu signálu do buňky. Mutace zasahují především geny *N-RAS* a *K-RAS*, zřídka nebo vůbec

H-RAS (Kalakonda *et al.*, 2001). Mutace *RAS* jsou obecně spojovány s translokací t(11;14) a zřídka se vyskytují u translokace t(4;14) a delece 17p13. Častější je také výskyt mutace v *N-RAS* než *K-RAS*, která je mnohdy asociována s mutací *TP53* (Chng *et al.*, 2008). Při relapsu onemocnění se mutace v genech *RAS* zvyšuje až na 70 %, oproti 10–40 % u nově diagnostikovaných pacientů, což naznačuje důležitou roli tohoto genu v progresi onemocnění, ale nikoli v její iniciaci (Kalakonda *et al.*, 2001).

Tabulka č. 4: Přehled cytogenetických abnormalit spojených s mnohočetným myelomem (převzato a upraveno dle Pawlyn *et Morgan*, 2017)

Kategorie	Abnormalita	Ovlivněné geny
Primární translokace	t(11;14) (q13;q32)	<i>CCND1</i>
	t(4;14) (p16;q32)	<i>MMSET</i>
	t(14;16) (q32;q23)	<i>MAF</i>
	t(14;20) (q32;q12)	<i>MAFB</i>
Sekundární translokace	8q24	<i>MYC</i>
	1q	<i>BCL9</i> a další
Změny v počtu kopií	Amplifikace 1q21	<i>BCL9</i> a další
	Delece 1p13–1p31	<i>CDKN2C</i> a další
	Delece 13	<i>RBI</i>
	Delece 17p13	<i>TP53</i>
Mutace	Bodová mutace	<i>N-RAS</i> , <i>K-RAS</i> , <i>H-RAS</i>

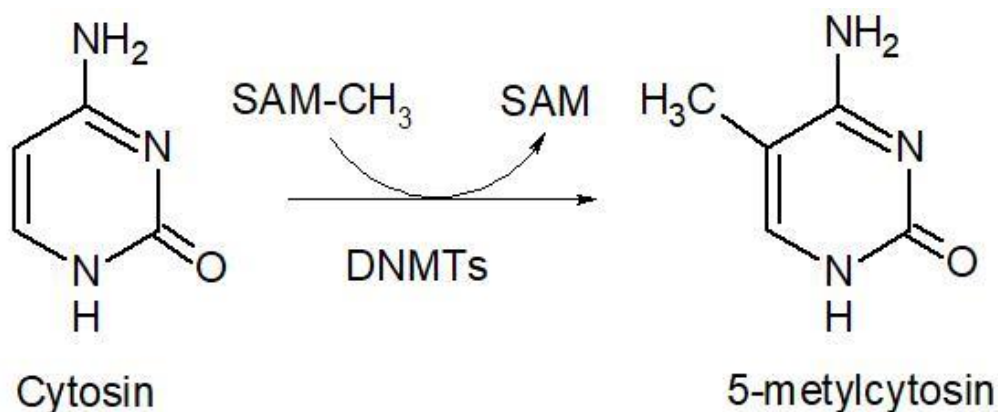
3.6 Epigenetické faktory

Kromě genetických abnormalit hrají důležitou roli ve vzniku a vývoji mnohočetného myelomu také epigenetické změny. Epigenetika popisuje mitoticky a meioticky děděné stavy genové exprese, které nejsou způsobeny změnami v sekvenci DNA (Russo *et al.*, 1996). Nejčastější oblastí výzkumu jsou metylace DNA a modifikace histonů. Metylace a acetylace histonů jsou epigenetické modifikace ovlivňující expresi genů, jejichž studium může vést k vývoji léčiv, jako jsou například inhibitory histonových deacetyláz (Dimopoulos *et al.*, 2014). V současnosti jsou epigenetické změny vedle genetických abnormalit považovány za stejně důležité a významně se podílející při vzniku a progresi nejen mnohočetného myelomu, ale i dalších hemato-onkologických nádorových onemocnění (Smith *et al.*, 2010).

Genetické i epigenetické abnormality spolu souvisí a navzájem se ovlivňují. Metylace DNA a modifikace histonů mohou ovlivňovat expresi genů a naopak mutace mohou ovlivňovat funkci epigenetických enzymů (Dimopoulos *et al.*, 2014).

3.6.1 Metylace DNA

Metylací DNA se rozumí adice metylové skupiny ($-CH_3$) na 5. uhlík cytosinu v dinukleotidu CpG (cytosin-fosfatidyl-guanin) za vzniku 5-metylcytosinu (5-mC). „P“ v dinukleotidu CpG znamená fosfodiesterový můstek mezi cytosinem a guaninem. Za tuto reakci zodpovídají enzymy DNA metyltransferázy (DNMTs) a donorem metylové skupiny je S-adenosylmethionin (SAM) (Esteller, 2009). DNMT3A a DNMT3B katalyzují metylaci nově vzniklých metylačních míst, velmi často u nádorových buněk, a proto jsou označovány jako *de novo* metyltransferázy DNA. DNMT3A a DNMT3B jsou také vysoce exprimované v embryonálních kmenových buňkách. DNMT1, ve spolupráci s DNMT3A a DNMT3B, je zodpovědná za udržování metylace DNA po buněčném dělení. Ztráta DNMT1, která zajišťuje dědičné metylační vzorce DNA, je letální. Demetylací DNA zajišťují translokační proteiny TET (tet metylcytosin dioxygenáza), které katalyzují konverzi 5-metylcytosinu na 5-hydroxymetylcytosin a následně na cytosin (Bird, 2002; Dai *et al.*, 2005; Holčáková, 2018).



Obrázek č. 4: Metylace cytosinu na 5-metylcytosin pomocí enzymu DNA metyltransferázy

V genomu jsou CpG dinukleotidy zastoupeny v malém množství, jelikož v průběhu evoluce dochází ke spontánní deaminaci 5-metylcytosinu na thymin. CpG dinukleotidy se shlukují za tvorby CpG ostrůvků dlouhých přibližně 500–2000 bp, které se nacházejí v promotorových a regulačních oblastech genů, tedy v místech, kde mohou ovlivňovat vazbu transkripčních faktorů na sekvenci DNA a následně genovou expresi. Více než polovina všech lidských genů obsahuje v promotorech CpG ostrůvky, které jsou definovány jako úseky DNA, které mají obsah cytosinu a guaninu větší než 50 % (Gardiner-Garden *et Frommer*, 1987). Jejich největší zastoupení je ovšem v intronových a intergenních oblastech DNA (Esteller, 2009).

Během vývojových procesů, jako je inaktivace chromozomu X u žen, genomový imprinting či u genů exprimovaných výlučně v zárodečných buňkách a u tkáňově specifických genů, jsou promotory metylované. Metylace hraje důležitou roli při segregaci chromozomů v mitóze, hypermetylované jsou také transponovatelné elementy a repetitivní sekvence. Ve zdravých buňkách se v promotorech CpG ostrůvky nacházejí převážně v nemetylovaném stavu, čímž je zajištěna transkripce příslušných genů. Obecně platí, že metylace v promotorových oblastech blokuje expresi, zatímco metylace v sekvenci genu nemá na transkripci vliv, ale její odlišná metylace se může podílet na výsledném sestřihu genu (Jones, 2012).

Metylované oblasti jsou spojeny s neacetylovanými histony H3 a H4 a nemetylované oblasti genu zase s acetylovanými histony. Tento vztah je pravděpodobně zprostředkován metyl-CpG-vazebnými proteiny MeCP1 a MeCP2, které se váží na metylovaná CpG místa, přitahují histonové deacetylázy (HDAC) k metylovaným oblastem a deaktivují transkripci genu kondenzací chromatinu (Nan *et al.*, 1998; Sharma *et al.*, 2010).

3.6.1.1 Hypermetylace promotorů tumor-supresorových genů u MM

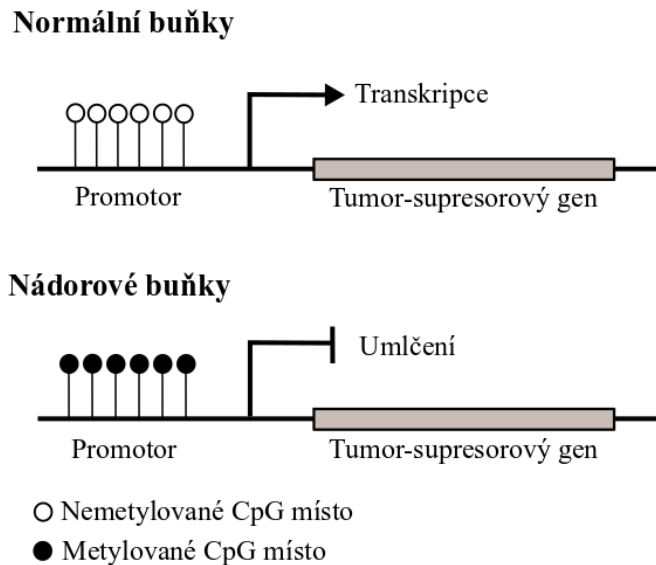
V nádorových buňkách dochází k abnormální hypo- nebo hypermetylaci DNA. Zatímco převládá globální hypometylace DNA, genové promotory jsou hypermetylované. U nádorových buněk bývá pozorována abnormální metylace DNA *de novo* u standardně nemetylovaných promotorů. S průběhem onemocnění mnohočetného myelomu se metylace DNA v promotorových oblastech genů zvyšuje. Velmi vysoká úroveň metylací DNA byla zjištěna v buněčných liniích lidských myelomových buněk (Walker *et al.*, 2011; Kaiser *et al.*, 2013; Holčáková, 2018).

V nádorových buňkách je hypermetylace CpG míst v promotorových oblastech tumor-supresorových genů spojována s metylací a deacetylací histonů (Ballestar, 2003). Odhaduje se, že odlišná metylace DNA v takových promotorech je stejně běžná, jako genetická mutace (Dai *et al.*, 2005).

V karcinogenezi se uplatňuje tzv. Knudsonova hypotéza dvojitého zásahu, podle níž je tumor-supresorový gen vyřazen z funkce až poté, co jsou nefunkční obě alely. Tato bialelická inaktivace tumor-supresorového genu může nastat, pokud je jedna alela inaktivována například chromozomální delecí či ztrátou funkce v důsledku mutace a druhá alela je umlčena v důsledku metylačních změn (Wong *et Chim*, 2015).

U mnohočetného myelomu byla zjištěna zvýšená exprese DNMT1 ve srovnání s normálními plazmatickými buňkami a exprese DNMT1 se v průběhu onemocnění zvyšuje. Heuck *et al.* (2013) ve své studii zjistili, že pacienti trpící mnohočetným myelomem mají sníženou expresi DNMT3A oproti normálním plazmatickým buňkám, jejíž příčinou je hypermetylovaný promotor genu.

Kaiser *et al.* (2013) ve své studii identifikovali 195 tumor-supresorových genů u nichž byly detekovány metylační změny v promotorových úsecích, které významně korelovaly s prognózou MM. Mezi tyto geny patří například *TGFBI* (β -indukovaný transformující růstový faktor), *SPARC* (kyselý sekretovaný protein bohatý na cystein), *RBPI* (retinol-vázající protein 1) a *GPX3* (glutathion peroxidáza 3), s různou úrovní metylačních změn. S tím související změny v expresi těchto genů by mohly vysvětlit rozdílný dopad na prognózu onemocnění. Tyto čtyři geny zprostředkovávají důležité tumor-supresorové funkce a identifikace dalších genů s touto funkcí by tak mohla přispět k lepší molekulární charakterizaci myelomové buňky s možností individuálního přístupu k léčbě pacientů MM.



Obrázek č. 5: CpG místo tumor-supresorového genu u normálních a nádorových buněk (převzato a upraveno dle Smith *et al.*, 2010)

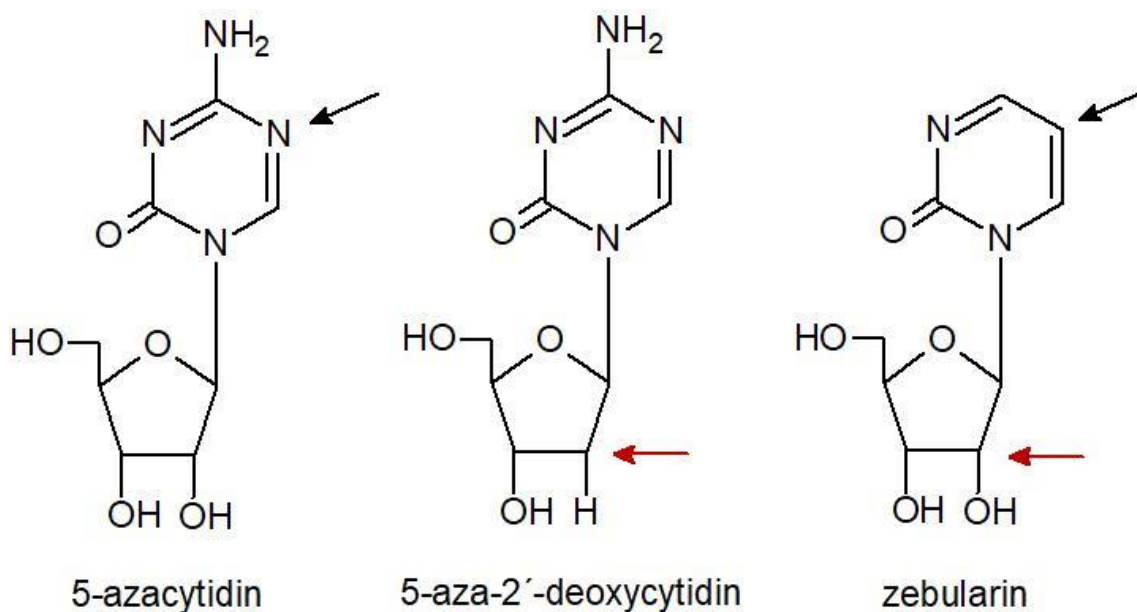
3.6.1.2 Demetylační činidla

Nukleosidové inhibitory 5-aza-2'-deoxycytidin, 5-azacytidin nebo zebularin jsou inhibitory metylací, které se používají v klinickém výzkumu i praxi jako demetylační činidla. Méně známé jsou nenukleosidové inhibitory, kam se řadí prokainamid a hydralazin, a antisense oligonukleotidy cílené proti DNA metyltransferázám (Dai *et al.*, 2005).

Nukleosidová analoga vyžadují inkorporaci do DNA, a proto jsou nejprve převedena na trifosfátovou formu. 5-azacytidin se řadí mezi analoga cytidinu, která byla vyvinuta jako inhibitory metylace DNA. 5-azacytidin je fosforylován na 5-azacytidintrifosfát a v této formě se inkorporuje do buněčné DNA, případně RNA, s následnou tvorbou kovalentní vazby s DNA metyltransferázou. Tento komplex se tvoří ireverzibilně, což má za následek vyčerpání DNA metyltransferázové aktivity buňkami a následnou demetylaci buněčné DNA. Léčivo je nejvíce aktivní v buňkách, které se rychle dělí. 5-azacytidin je degradován nukleosidovou deaminázou (Dai *et al.*, 2005).

5-aza-2'-deoxycytidin, též známý pod názvem Decitabin, je analog 2-deoxycytidinu. Po fosforylaci je začleněn do DNA a je inaktivován deaminázou cytidinu, která je ve vysokých hladinách přítomna v játrech a slezině. Na rozdíl od 5-azacytidinu se inkorporuje pouze do DNA, nikoli do RNA. Poločas rozpadu decitabinu je 15–20 minut. Další cytidinový analog, zebularin, postrádá na pyrimidinovém kruhu ve 4. poloze NH_2 skupinu a také atom dusíku v poloze 5 (Dai *et al.*, 2005; Esteller, 2009). I když je účinnost tohoto léčiva nižší, než účinnost 5-aza-2'-deoxycytidinu, lze jej aplikovat perorálně, což jej činí atraktivnější pro aplikaci v léčbě nádorových onemocnění (Liu *et al.*, 1997).

Nevýhodou těchto nukleosidových analogů je jejich cytotoxicita. Mezi vedlejší účinky patří trombocytopenie a neutropenie, které jsou pravděpodobně způsobeny nespecifickou inkorporací léčiva do DNA. Z tohoto důvodu je snaha hledat nové inhibitory metylace DNA, které by nevyžadovaly jejich začlenění do DNA. Jedním z takových léků může být derivát kyseliny 4-aminobenzoové, prokainamid, používaný k léčbě srdeční arytmie, který patří do skupiny nenukleosidových inhibitorů DNA metyltransferáz. Prokainamid se přímo váže na sekvence DNA bohaté na GC, čímž blokuje vazbu DNA metyltransferáz na DNA a způsobuje její demetylací (Villar-Garea *et al.*, 2003).



Obrázek č. 6: Strukturní srovnání mezi 5-azacytidinem, 5-aza-2'-deoxycytidinem a zebularinem. Černé šipky zobrazují pozici na pyrimidinovém kruhu, která rozlišuje „aza“ sloučeninu, a červené šipky zobrazují 2. pozici na cukerné složce, která odlišuje ribózu od deoxyribózy (převzato a upraveno dle Dai *et al.*, 2005)

3.6.1.3 Inhibice DNMT1 pomocí disulfiramu

Tetraethylthiuram disulfid, zkráceně disulfiram, též známý pod názvem Antabus, je všestranné činidlo, které se od 60. let minulého století používá jako prostředek k léčbě alkoholismu. Perorálně podaný disulfiram je v těle rychle přeměněn na dvě molekuly diethyldithiokarbamátu. Diethyldithiokarbamát je dále metabolizován na metylester-sulfoxid kyseliny diethylthiokarbamátové, což je účinný inhibitor aldehyd-dehydrogenázy, která metabolizuje acetaldehyd, metabolit ethanolu, na netoxický acetát. Stejným způsobem disulfiram inhibuje proteiny, které se podílejí na rozvoji nádorového onemocnění, například DNA metyltransferázy či P-glykoprotein (Brüning *et Kast*, 2014).

Disulfiram ve své struktuře obsahuje silné reaktivní thiolové funkční skupiny, které interagují s thiolovými skupinami reaktivního cysteinu v aktivním místě enzymu aldehyd-dehydrogenázy. Lin *et al.* (2011) ve své studii sledovali inhibiční účinek disulfiramu na DNA metyltransferázy u rakoviny prostaty, jelikož DNMT1 obsahuje ve svém aktivním místě také reaktivní cystein. Zjistili, že disulfiram dokáže inhibovat aktivitu DNMT1 v závislosti na dávce. Dále prokázali schopnost disulfiramu reaktivovat epigeneticky umlčené geny a schopnost inhibovat růst buněk rakoviny prostaty. Disulfiram vykazuje mírné vedlejší účinky a je dobře tolerován, díky čemuž se z něj může stát další kandidát pro léčbu nádorových onemocnění.

3.6.2 Histonové modifikace

Histony jsou malé proteiny s vysokým obsahem bazických aminokyselin argininu a lyzinu. Dle poměru arginin-lyzin se rozlišuje 5 typů histonů – H1, H2A, H2B, H3 a H4. Histony H2A, H2B, H3 a H4, každý ve dvou kopiích, tvoří tzv. oktamer proteinů, kolem kterého se obtáčí molekula DNA o délce 145–147 bp (párů bází) za vzniku nukleozomu. Jednotlivé nukleozomy jsou od sebe odděleny „linkerovou“ DNA a jsou stabilizovány histonem H1. Nukleozomy dále spiralizují za vzniku struktur vyššího řádu (Luger *et al.*, 1997).

Z nukleozomu vyčnívají amino-terminální konce histonů, které podléhají reverzibilním posttranslačním modifikacím, jako je acetylace, metylace, fosforylace nebo glykosylace. Modifikací histonů dochází ke změně struktury chromatinu, která je poté hůře dostupná pro transkripční faktory a proteiny kontrolující genovou expresi (Yoo *et Jones*, 2006; Dimopoulos *et al.*, 2014).

3.6.2.1 Acetylace histonů

Histonové acetyltransferázy (HAT) jsou enzymy, které acetylují histonové zbytky. Donorem acetylové skupiny je acetyl-koenzym A. Nejčastěji se jedná o acylaci na lyzinových zbytcích histonů H3 a H4. Dochází ke snížení afinity mezi histony a DNA, což má za následek rozvolnění nukleozomů a zpřístupnění DNA pro transkripci genových úseků. Acetylace je tedy spojena se zvýšenou transkripcí. Za potlačení transkripce jsou zodpovědné enzymy histon deacetylázy (HDAC), které odstraňují acetylové skupiny z lyzinových zbytků histonů zpět na acetyl-koenzym A. Tím dochází ke kondenzaci chromatinové struktury, která je transkripčně neaktivní (Grunstein, 1997; Dimopoulos *et al.*, 2014).

Narušení rovnováhy mezi HAT a HDAC může vést k progresi nádoru. Některé studie se shodují, že zvýšená aktivita HDAC je spojena s transkripčním umlčením genů u různých typů rakovin, například prostaty, prsu, žaludku, plic a dalších (Sasaki *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2004; Song *et al.*, 2005; Halkidou *et al.*, 2014). K potlačení aktivity HDAC byly vyvinuty inhibitory HDAC. I přesto, že nebyla potvrzena zvýšená exprese či aktivita HDAC u mnohočetného

myelomu, existují inhibitory HDAC se silnou anti-myelomovou aktivitou. Catley *et al.* (2003) či Kaiser *et al.* (2006) prokázali změny v acetylaci histonů u myelomových buněk po aplikaci inhibitorů HDAC, ale nebyl objasněn přesný mechanismus jejich aktivity proti myelomovým buňkám. Obecně inhibitory HDAC indukují zastavení buněčného cyklu na počátku G1 fáze, snižují buněčný růst a indukují apoptózu (Smith *et al.*, 2010). Studie You *et al.* (2008), Xiong *et al.* (2005) nebo Wu *et al.* (2008) naznačují, že inhibitory HDAC mohou ovlivnit také aktivitu DNA metyltransferáz snížením jejich exprese, přímou inhibicí enzymové aktivity nebo snížením metylace histonů.

3.6.2.2 Metylace histonů

Na metylaci histonů se podílí enzymy histon metyltransferázy (HMT). Hlavními metylačními místy v histonech jsou postranní řetězce aminokyselin lyzinu a argininu. U savců může být arginin mono- a dimetylován, zatímco lyzin může být mono-, di- a trimetylován. Na rozdíl od acetylace je metylace histonů místně specifická. S transkripční represí je spojena metylace histonu H3 na lyzinu 9 (H3K9me1) a trimetylace histonu H3 na lyzinu 27 (H3K9me3), zatímco s aktivní transkripcí jsou spojeny trimetylace histonu H3 na lyzinu 4 (H3K4me3), lyzinu 36 (H3K36me3) a lyzinu 79 (H3K79me3) a monometylace histonu H4 na lyzinu 20 (H4K20me1) a argininu 3 (H4R3me1).

Rozmístění metylačních značek je variabilní a závislé na funkci a aktivitě určité oblasti genomu. Například H3K4me3 a H3K79me3 mají význam v aktivních promotorových oblastech, zatímco H3K4me1 se vyskytuje v místech zesilovače (enhanceru) a H4K20me1 a H3K36me3 se soustřeďují přímo v těle aktivně transkribovaného genu (Dimopoulos *et al.*, 2014).

Gen *MMSET* (také nazývaný *WHSC1* či *NSD2*), kódující protein s histon metyltransferázovou aktivitou, bývá v 15 % případů mnohočetného myelomu upregulován. Abnormalita genu se řadí mezi primární translokace t(4;14) (p16;q32), kdy dochází ke zvýšené syntéze histon metyltransferázy se specifickou doménou MMSET. Gen *MMSET* exprimuje dva transkripty – MMSET-1 a MMSET-2 – a je vysoce exprimován ve všech tkáních (Stec *et al.*, 1998). Protein MMSET-2 obsahuje SET doménu, která se nachází v mnoha HMT a určuje jejich enzymatickou aktivitu. Protein MMSET je koncentrován v jádře buněk a je specifický vůči histonům H3 a H4 a funkčně interaguje s korepresory a histon deacetylázami. Výsledkem nadměrné exprese genu jsou globální změny v metylacích histonů – akumulují se dimetylace H3K36, které jsou spojeny s transkripční aktivitou onkogenních lokusů, a redukuje se trimetylace H3K27 spojené s transkripční represí (Marango *et al.*, 2008; Martinez-Garcia *et al.*, 2011).

3.7 Léčba mnohočetného myelomu

Mnohočetný myelom stále patří mezi nevléčitelné nemoci. Léčba je zahájena po potvrzení kritérií MM. V závislosti na citlivosti onemocnění k terapii dosahují pacienti remise různé délky. Reakce pokročilejšího onemocnění na léčbu je vždy horší a často dochází k recidivě (Hájek *et al.*, 2011).

Terapie mnohočetného myelomu je velmi dynamická, rychle se vyvíjí, a tím se zvyšuje celková doba přežití. V 90. letech minulého století, kdy byla využívána standardní chemoterapie, byl medián celkového přežití 30 měsíců. S využitím vysokodávkovací chemoterapie s autologní transplantací kostní dřeně se celkové přežití zvýšilo o 20 měsíců. Ke zvýšení přežití přispělo také zavedení podpůrné léčby pro onemocnění kostí asociované s myelomem. V současnosti je medián celkového přežití 6–8 let od stanovení diagnózy, ale třetina nemocných přežívá déle než 10 let. U starších pacientů, kteří nejsou schopni podstoupit autologní transplantaci kostní dřeně, je medián celkového přežití 4–6 let (Jelínek *et al.*, 2015; Štork *et al.*, 2017).

Na začátku tisíciletí se v léčbě MM začaly rutinně používat nové léky, jako je thalidomid, lenalidomid a bortezomib, které zvýšily efektivitu dosavadní léčby. Nejčastěji jsou používány v kombinaci s glukokortikoidy či alkylačními cytostatiky. Thalidomid, derivát kyseliny glutamové, patří mezi imunomodulační léky, které mají přímý i nepřímý efekt na růst myelomových buněk. V terapii MM se používá jak v primoléčbě, tak v relapsu onemocnění. Může být podáván v kombinaci s dalšími léky, často troj- a čtyřkombinace, či monoterapií. Thalidomid je teratogen, k nežádoucím účinkům patří senzomotorická polyneuropatie, tromboembolie, ospalost, třes, suchá kůže a sliznice (Hájek *et al.*, 2011; Hájek *et al.*, 2013).

Lenalidomid, analog thalidomidu, je další lék ze skupiny imunomodulačních látek. Oproti thalidomidu má vyšší imunomodulační a tumoricidní efekt a má přímý protimyelomový účinek. Lenalidomid je schopný snížit produkci cytokinů, například tumor necrosis faktor alfa, interleukin 6 a 8 a vaskulární endoteliální růstový faktor. Tyto cytokiny zvyšují proliferační aktivitu buněk. Dále je lenalidomid schopný aktivovat NK buňky a T-lymfocyty, čímž dochází k jejich zvýšené proliferaci. Hlavní výhodou lenalidomidu je vysoká účinnost a akceptovatelný toxický profil (Holánek *et Hájek*, 2010).

Bortezomib je proteazomový inhibitor. Inhibicí proteazomu brání degradaci proteinů a ovlivňuje metabolismus buňky, což má za následek narušení řízení buněčného cyklu a apoptózy. Bortezomib selektivně indukuje apoptózu aktivních aloreaktivních T-lymfocytů, při současném zachování klidových T-lymfocytů, a indukuje zvýšenou expozici heat shock proteinu 90 na povrchu odumírajících myelomových buněk, díky čemuž je navozena stimulace protinádorové

T-buněčné imunitní odpovědi pomocí dendritických buněk. Bortezomib má velký léčebný potenciál v kombinaci s thalidomidem (Vokurka, 2010; Hájek *et al.*, 2013).

Dnes se možnosti léčby dále rozrůstají, klinicky jsou testovány další nové látky, jako pomalidomid, carfilzomib, ixazomib, daratumumab, elotuzumab a panobinostat, kterými jsou léčeni pacienti s relapsí MM v rámci klinických studií. Carfilzomib a ixazomib patří do skupiny léčiv, která inhibují proteazom. Carfilzomib se selektivně a ireverzibilně váže na 20S podjednotku proteazomu, zatím ixazomib se na ni váže reverzibilně. Pomalidomid, který je strukturálním analogem lenalidomidu a thalidomidu, patří k imunomodulačním lékům. Pomalidomid působí cytotoxicky skrz zvýšenou expresi tumor-supresorových proteinů p21^{WAF1}, aktivaci apoptózy kaspázou 8 a vazbou na protein receblon, což vede k narušení regulace vazby ubikvitinu na cytoplazmatické bílkoviny. Daratumumab je monoklonální protilátka, která vazbou na antigen CD38 aktivuje imunitní mechanismy, které vedou k apoptóze nádorových buněk. Daratumumab je mírně toxický, nejčastějšími nežádoucími účinky je rýma, kašel, bolest hlavy a teplota, dále pak anémie, trombocytopenie a neutropenie. Další monoklonální protilátkou, která je klinicky testována je elotuzumab. Tato protilátka se váže na povrchové molekuly SLAMF7 (signaling lymphocytic activation molecule F7) na povrchu plazmatických a NK buňkách a způsobuje aktivaci protilátkově-vázané buněčné cytotoxicity. Nejnovějšími preparáty v léčbě MM jsou inhibitory histon deacetyláz, mezi které patří panobinostat. Histon deacetylázy jsou zodpovědné za epigenetické změny DNA. Mezi nežádoucí účinky panobinostatu patří trombocytopenie, lymfopenie a průjem (Michels *et Petersen*, 2017; Štork *et al.*, 2017).

4 Materiál a metody

4.1 Biologický materiál

Pro experimentální část bylo použito celkem 22 vzorků od pacientů s mnohočetným myelomem. Vzorky byly odebrány lékaři z hemato-onkologického oddělení FNOL. Od 17 pacientů byly získány vzorky aspirátu kostní dřeně a od 5 pacientů byly získány vzorky, které byly podrobeny sortování na antigen CD138. V premaligním stádiu MGUS byli celkem 3 pacienti a zbylých 19 pacientů mělo aktivní MM.

Pro normalizaci dat expresní analýzy byla použita RNA, která byla izolována z kostní dřeně zdravých 56 Asiatů ve věku 22–85 let, koncentrace $1 \mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$, cat. no. 636591 (Clontech).

4.1.1 Nesortovaná populace jedinců (vzorky aspirátu kostní dřeně)

Tabulka č. 5: Charakteristika analyzovaného souboru pacientů

Vzorek	Pohlaví	Diagnóza
2013-07-17	Žena	MM
2013-10-08	Muž	MM
2013-10-09	Žena	MGUS
2013-10-10	Muž	MM
2013-10-22	Žena	MM
2013-10-23a	Muž	MM
2013-11-04	Muž	MM
2013-11-18	Žena	MM
2014-01-22	Muž	MM
2014-03-12	Muž	MGUS
2014-03-19	Muž	MM
2014-03-27	Žena	MM
2014-03-31	Žena	MM
2014-05-07	Žena	MM
2014-05-20	Muž	MM
2014-06-17	Muž	MM
2014-06-20	Žena	MM

4.1.2 Sortovaná populace buněk (CD138)

Vzorky byly sortovány na antigen CD138 pomocí průtokové cytometrie. Sortování provedli pracovníci Ústavu molekulární a translační medicíny Univerzity Palackého v Olomouci.

Tabulka č. 6: Charakteristika analyzovaného souboru pacientů

Vzorek	Pohlaví	Diagnóza
2019-02-11	Muž	MGUS
2019-02-14	Muž	MM
2019-02-28	Muž	MM
2019-06-05	Muž	MM
2018-08-09	Muž	MM

4.1.3 Myelomové buněčné linie

Pro ovlivnění demetylačními činidly 5-azacytidinem a 5-aza-2'-deoxycytidinem a potenciálním demetylačním činidlem disulfiramem byly použity myelomové buněčné linie KMS12-BM a KMS12-PE. Myelomové buněčné linie byly zakoupeny od společnosti ATCC (CCL155TM) (Rockville, MD, USA).

Buněčná linie KMS12-BM byla vytvořena v roce 1988 z kostní dřeně 64leté ženy s mnohočetným myelomem. Morfologicky se jedná o jednotlivě rostoucí buňky v suspenzi s generační dobou 60 hodin. Doporučená inkubace je při 37 °C s 5% CO₂. Imunologie této linie: CD3-, CD10-, CD13-, CD19-, CD34-, CD37+, CD38+, cyCD79a+, CD80-, CD138+, HLA-DR-, sm/cylgG-, sm/cylgM-, sm/cykappa-, sm/cylambda- (zdroj dsmz.de; cat. no. ACC 551).

Buněčná linie KMS12-PE byla vytvořena z pleurální efuze 64leté ženy s refrakterním terminálním mnohočetným myelomem po kombinované chemoterapii. U KMS12-PE linie byla zjištěna translokace t(11;14) (q13;q32). Morfologicky se jedná o samostatně rostoucí malé kulaté buňky v suspenzi, příležitostně tvořící menší shluky, s generační dobou 60–80 hodin. Doporučená inkubace je při 37 °C s 5% CO₂. Imunologie této linie: CD3-, CD4-, CD13-, CD14-, CD15-, CD19-, CD20-, CD34-, CD38+, CD138+, HLA-DR+ (zdroj dsmz.de; cat. no. ACC 606).

4.2 Laboratorní pomůcky a přístroje

- 0,2ml a 1,5ml mikrozkuřavky (Eppendorf)
- 24-jamková destička, cat. no. 3337 (Corning)
- 5ml a 10ml plastové pipety (Techno Plastic Products)
- Biohazard box MSC-Advantage™ 1,8 (ThermoScientific)
- Centrifuga MiniSpin plus (Eppendorf)
- Centrifuga LMC-3000 (Biosan)
- Digitální váha 440-33N (Kern)
- DNA/RNA UV-cleaner box UVC/T-AR (Biosan)
- Elektroforetická komora Easycast B1A (Thermo Scientific)
- Chladící stojan
- Chlazená centrifuga 3K30 (Sigma)
- Chlazená centrifuga MR22i (Jouan)
- Inkubátor Heracell CO₂ (Heraeus)
- Laboratorní digestoř M/900 M2 (Merci)
- LightCycler® 480 (Roche)
- LightCycler® 480 multiwell plate 96 white, cat. no. 04729692001 (Roche)
- Mikrocentrifuga Multi-spin PCV-3000 (Grant-Bio)
- Mikropipety (Eppendorf, Gilson)
- Mikrovlnná trouba MO 17 MW (Gorenje)
- NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific)
- PyroMark Q96 ID (QIAGEN)
- PyroMark Q96 Vacuum Workstation (QIAGEN)
- PyroMark Q96 Cartridge (QIAGEN)
- Spectrafuge™ Mini C1301-B (Labnet)
- Thermal Cycler C1000™ (Bio-Rad)
- UV transiluminátor EB-20 (Ultra-Lum)
- Vortex mixer PV-1 (Grant-Bio)
- Zdroj elektrického proudu MP-300N (Major Science)

4.3 Použité chemikálie a roztoky

- 1x PBS pufr (8 g $137\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl; 0,2 g $2,7\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ KCl; 0,24 g $1,8\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ KH_2PO_4 ; 1,44 g $10\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Na_2HPO_4 ; 800 ml deionizované vody; pH 7,4; doplnit do 1000 ml sterilní deionizovanou vodou)
- 1x TAE elektroforetický pufr (10 ml 50x TAE pufr, doplnit do 500 ml sterilní deionizovanou vodou)
- 100% dimetylsulfoxid (Sigma-Aldrich)
- 4'-bromoanisol, cat. no. BN191 (Molecular Research centre Inc.)
- 5-aza-2'-deoxycytidin, cat. no. A3656 (Sigma Aldrich)
- 5-azacytidin, cat. no. A2385 (Sigma Aldrich)
- 50x TAE elektroforetický pufr (121 g Tris base; 28,6 ml ledové kyseliny octové; 50 ml roztoku EDTA $0,5\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, pH 8,0; doplnit do 500 ml sterilní deionizovanou vodou)
- 6x Orange Loading Dye Solution, cat. no. R0631 (Fermentas)
- 96%, 75% a 70% ethanol (Fargon)
- Agaróza Wide range/Standard 3:1, cat. no. A7431 (Sigma-Aldrich)
- Chloroform (Lachema a.s.)
- CpGenome Universal Methylated DNA $10\text{ }\mu\text{g}$ ($0,1\text{ }\mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$), cat. no. S7821 (Millipore)
- Deionizovaná voda
- DepcH₂O
- Ethidium bromid 100 mg (Amresco)
- Isopropylalkohol (mikroCHEM)
- Primery kompatibilní se sondou *PDLIM4* (ThermoFisher)
 - Right 5'-GCTTGGTCTGCCATCTTCTG-3'
 - Left 5'-GGATCCACATCGATCCTGAG-3'
- RPMI 1640 médium s 10% fetálním bovinním sérem (10 ml FBS, 1 ml antibiotikum Penicilin-Streptomycin, 1 ml $100\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ pyruvátu sodného, 1 ml L-glutaminu, doplnit do 100 ml PRMI 1640 médiem), cat. no. R5886 (Sigma-Aldrich)
- Sonda $\beta 2M$ 20x (β -2-mikroglobulin), součástí komerční sondy jsou primery, cat. no. 4331182, Hs00187842_m1 (ThermoFisher)
- Sonda *GPX3* 20x (glutathion peroxidáza 3), součástí komerční sondy jsou primery, cat. no. 4331182, Hs01078668_m1 (ThermoFisher)
- Sonda *PDLIM4* (PDZ a LIM doména 4), cat. no. 4331182, Hs00925323_g1 (ThermoFisher)
- Sonda *RBP1* 20x (protein vázající retinol 1), součástí komerční sondy jsou primery, cat. no. 4331182, Hs01011512_g1 (ThermoFisher)

- Standard molekulové hmotnosti 100 bp DNA Ladder 500 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, cat. no. N3231L (BioLabs)
- Tetraethylthiuram disulfid (disulfiram), cat. no. 86720 (Sigma-Aldrich)
- Tri Reagent RT-Blood, cat. no RB 211 (Molecular Research Centre, INC.)
- Universal Unmethylated DNA 5 μg (0,1 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$), cat. no. 90579 (Millipore)

4.4 Použité soupravy

- EpiTect Fast DNA Bisulfite Kit, cat. no. 59824 (QIAGEN)
- PyroMark PCR kit, cat. no. 978703 (Qiagen)
- QIAamp DNA Blood Mini Kit, cat no. 51106 (QIAGEN)
- Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit, cat. no. 04897030001 (Roche)
- Xceed qPCR Probe 2x Mix Lo-ROX, cat. no. LPCR10502S (Institute of Applied Biotechnologies)

4.5 Použité počítačové programy

- Li-Cor Odyssey[®]Fc Imaging Systém (LI-COR)
- LightCycler[®] 480 Software release 1.5.1.62 SP3 (Roche)
- PyroMark Assay Design Software (QIAGEN)
- PyroMark CpG Software (QIAGEN)
- Statistica (data analysis software system), version 13 (TIBCO Software Inc.)

4.6 Izolace RNA z aspirátů kostní dřeně a/nebo ze sortované populace buněk CD138

Pro izolaci RNA byl použit Tri Reagent RT-Blood. Pro izolaci RNA ze suspenze sortovaných buněk CD138 byly použity poloviční objemy chemikálií. Postup byl proveden dle pokynů výrobce:

1. Do mikrozkušavky napipetovat 750 μl TRI Reagent RT-Blood a 125 μl aspirátu kostní dřeně, vortexovat.
2. Přidat 50 μl 4'-bromoanisolu a vortexovat alespoň 15 vteřin.
3. Centrifugovat 15 minut při otáčkách 12000 g a teplotě 4 °C.
4. Do nové mikrozkušavky odebrat 500 μl horní vodnaté fáze a přidat 500 μl isopropanolu.
5. Promíchat směs ve zkumavce a inkubovat 10 minut při pokojové teplotě.
6. Centrifugovat 5 minut při otáčkách 12000 g a teplotě 4 °C.
7. Odstranit supernatant a pelet promýt přidáním 1 ml 75% ethanolu.
8. Centrifugovat 5 minut při otáčkách 6000 g a teplotě 24 °C.
9. Odstranit supernatant a pelet rozpustit ve 25 μl dep H_2O .

10. Změřit koncentraci a čistotu vyizolované RNA pomocí NanoDropu.

11. RNA uchovávat při teplotě -80 °C.

4.7 Reverzní transkripce

Z vyizolované RNA byla připravena cDNA pomocí kitu Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit. Postup byl proveden dle pokynů výrobce:

1. Do mikrozkuvek o objemu 0,2 ml napipetovat 2 μl random hexamer primeru, 1000 ng RNA (v případě RNA izolované z aspirátů kostní dřeně) nebo 100 ng RNA (v případě RNA izolované ze suspenze sortovaných buněk CD138) a deionizovanou vodu do celkového objemu 13 μl .
2. Denarovat vzorky 10 minut při teplotě 65 °C a následně umístit do chladícího bloku.
3. Ke vzorkům postupně přidat reagentie dle Tabulky č. 7.
4. Mikrozkuvky inkubovat v termocykleru dle programu uvedeného v Tabulky č. 8.
5. cDNA uchovávat při teplotě -20 °C.

Tabulka č. 7: Jednotlivé složky reakční směsi

Reagencie	Zásobní koncentrace	Objem pro 1 reakci [μl]	Výsledná koncentrace v reakci
Transcriptor reverse transcriptase reakční pufr	5x	4	1x
Protector RNase inhibitor	40 $\text{U}\cdot\mu\text{l}^{-1}$	0,5	20 U
Deoxynukleotidový mix	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
Celkový objem ve zkumavce	-	20	-

Tabulka č. 8: Teplotní a časový profil pro reverzní transkripci

Fáze	Teplota [$^{\circ}\text{C}$]	Čas
Inkubace	25	10:00
Inkubace	55	30:00
Inaktivace transkriptázy	85	05:00

4.8 Expresní analýza genů *RBPI*, *GPX3* a *PDLIM4*

Expresní analýza genů *RBPI*, *GPX3* a *PDLIM4* byla provedena metodou real-time PCR s použitím X-ceed qPCR Probe Mix (2x) Lo-ROX. Pro kvantitativní analýzu byl použit housekeepingový gen *$\beta 2M$* . RNA, izolovaná z kostní dřevě zdravých jedinců a převedená do cDNA, se používala k normalizaci hodnot exprese sledovaných genů u patientských vzorků. Každý vzorek byl analyzován v duplikátu.

1. Připravit PCR reakční směs dle Tabulky č. 9, případně Tabulky č. 10.
2. Reakční směs rozdělit do 96-jamkové destičky po 19 μl a následně přidat 1 μl cDNA.
3. Přelepit destičku fólií a centrifugovat při otáčkách 1200 g po dobu 2 minut.
4. Destičku umístit do Light-cycleru s nastaveným programem dle Tabulky č. 11.

Tabulka č. 9: Příprava reakční směsi pro real-time PCR analýzu pro geny *RBPI*, *GPX3* a housekeepingový gen *$\beta 2M$*

Reagencie	Zásobní koncentrace	Objem pro jednu reakci [μl]	Výsledná koncentrace
X-ceed qPCR Probe Mix	2x	10	1x
Sonda	20x	1	1x
Deionizovaná voda	-	8	-
cDNA templát	-	1	-
Celkový objem reakční směsi	-	20	-

Tabulka č. 10: Příprava reakční směsi pro real-time PCR analýzu pro gen *PDLIM4*

Reagencie	Zásobní koncentrace	Objem pro jednu reakci [μl]	Výsledná koncentrace
X-ceed qPCR Probe Mix	2x	10	1x
Forward primer	10 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$	0,8	400 $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$
Reverse primer	10 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$	0,8	400 $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$
Deionizovaná voda	-	7	-
Sonda	10 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$	0,4	200 $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$
cDNA templát	-	1	-
Celkový objem reakční směsi	-	20	-

Tabulka č. 11: Teplotní a časový profil real-time PCR

Fáze	Teplota [$^{\circ}\text{C}$]	Čas	Počet cyklů
Aktivace polymerázy	95	02:00	1
Denaturace	95	00:05	40 + 10
Nasedání primerů a prodlužování DNA	63	00:20	

5. Ze získaných hodnot Ct vypočítat úroveň exprese příslušných genů v testovaných vzorcích dle následujícího vzorce (efektivita reakce = 2):

$$\Delta Ct = Ct(c,t) - Ct(r,t)$$

$$\Delta Cn = Ct(c,n) - Ct(r,n)$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct - \Delta Cn$$

$$R = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Ct... cyklus prahu, cycle of threshold

ΔCt , ΔCn ... rozdíl v Ct hodnotách mezi srovnávanými vzorky

$Ct(c,t)$... Ct hodnota cílového genu (*RBPI*, *GPX3* nebo *PDLIM4*) při testovacích podmínkách

$Ct(r,t)$... Ct hodnota referenčního genu (*$\beta 2M$*) při testovacích podmínkách

$Ct(c,n)$... Ct hodnota cílového genu (*RBPI*, *GPX3* nebo *PDLIM4*) při normálních podmínkách

$Ct(r,n)$... Ct hodnota referenčního genu (*$\beta 2M$*) při normálních podmínkách

R... úroveň exprese cílového genu

4.9 Izolace DNA z aspirátů kostní dřeně a ze sortované populace buněk CD138

Pro izolaci DNA z aspirátů kostní dřeně byl použit QIAamp DNA Mini Kit. Postup byl proveden dle pokynů od výrobce:

1. K 200 μ l aspirátu kostní dřeně nebo peletě rozpuštěné v 200 μ l PBS pufru přidat 20 μ l QIAGEN Proteázy a 200 μ l pufru AL.
2. Směs v mikrozkuhavce minimálně 15 sekund vortexovat a následně inkubovat 10 minut při teplotě 56 °C.
3. Přidat 200 μ l 96% ethanolu, vortexovat a krátce stočit na stolní minicentrifuze.
4. Směs z mikrozkuhavky přenést do QIAamp Mini kolony umístěné ve 2ml sběrné zkuhavce.
5. Centrifugovat při otáčkách 6000 g po dobu 60 sekund.
6. Odstranit filtrát a přidat 500 μ l pufru AW1.
7. Centrifugovat při otáčkách 6000 g po dobu 60 sekund.
8. Odstranit filtrát a kolonu přenést do čisté 2ml sběrné zkuhavky.
9. Přidat 500 μ l pufru AW2 a centrifugovat při otáčkách 14000 g po dobu 3 minut.
10. Odstranit filtrát a kolonu přenést do čisté 2ml sběrné zkuhavky.
11. Centrifugovat při otáčkách 14000 g po dobu 60 sekund.
12. Přenést kolonu do čisté 1,5ml mikrozkuhavky a přidat 25 μ l pufru AE.
13. Inkubovat po dobu 60 sekund při pokojové teplotě.
14. Centrifugovat při otáčkách 6000 g po dobu 60 sekund.
15. Změřit koncentraci a čistotu získané DNA pomocí NanoDropu. Uchovávat při teplotě -20 °C.

4.10 Bisulfitová modifikace

Izolovaná DNA byla modifikována bisulfitovou reakcí pomocí EpiTect Fast DNA Bisulfite Kitu pro rozlišení metylovaného a nemetylovaného cytosinu. DNA reaguje s bisulfitem sodným, díky čemuž dochází k přeměně nemetylovaných cytosinů na thyminy, zatímco metylované cytosiny chrání metylová skupina a ke konverzi nedochází.

Součástí analýzy patientských vzorků DNA bylo zařazení komerční metylované a nemetylované DNA, která byla bisulfitově modifikována stejným postupem jako analyzované vzorky. Postup byl proveden dle pokynů výrobce:

1. Do mikrozkuvek o objemu 0,2 ml připravit reakční směs podle Tabulky č. 12.
2. Mikrozkuvky s reakční směsí umístit do termocycleru s nastaveným programem dle Tabulky č. 13.

Tabulka č. 12: Příprava reakční směsi pro bisulfitovou modifikaci

Reagencie	Objem [μ l]
DNA (300 ng)	Variabilní
RNase-free voda	Do celkového objemu 140
Bisulfitový roztok	85
DNA protect pufr	15
Celkem	140

Tabulka č. 13: Teplotní a časový profil bisulfitové modifikace

Fáze	Čas	Teplota [$^{\circ}$ C]
Denaturace	05:00	95
Inkubace	15:00	60
Denaturace	05:00	95
Inkubace	15:00	60

3. Mikrozkuvky krátce centrifugovat a směs přenést do čistých mikrozkuvek o objemu 1,5 ml.
4. Přidat 310 μ l čerstvě připraveného pufru BL obsahujícího carrier RNA dle Tabulky č. 14.

Tabulka č. 14: Příprava pufru BL

Reagencie	Objem pro 1 reakci [μ l]
Pufr BL	350
Roztok carrier RNA	3,5

5. Mikrozkušavky promíchat a krátce stočit.
6. Přidat 250 µl 96% ethanolu, promíchat pomocí Vortexu a krátce stočit.
7. Směs přenést do čisté kolony MinElute DNA umístěné ve sběrné zkumavce o objemu 2 ml.
8. Centrifugovat při otáčkách 14000 g po dobu 60 sekund.
9. Odstranit filtrát a přidat 500 µl pufru BW.
10. Centrifugovat při otáčkách 14000 g po dobu 60 sekund.
11. Odstranit filtrát a přidat 500 µl pufru BD.
12. Inkubovat po dobu 15 minut při pokojové teplotě.
13. Centrifugovat při otáčkách 14000 g po dobu 60 sekund.
14. Odstranit filtrát a přidat 500 µl pufru BW.
15. Centrifugovat při otáčkách 14000 g po dobu 60 sekund.
16. Odstranit filtrát a opakovat krok 15.
17. Odstranit filtrát a přidat 250 µl 96% ethanolu.
18. Centrifugovat při otáčkách 14000 g po dobu 60 sekund.
19. Přenést kolonu do čisté sběrné zkumavky o objemu 2 ml a centrifugovat při otáčkách 14000 g po dobu 60 sekund.
20. Inkubovat obsah kolony po dobu 5 minut při 60 °C.
21. Přenést kolonu do čisté mikrozkušavky o objemu 1,5 ml a přidat 15 µl pufru EB na střed kolony.
22. Inkubovat po dobu 60 sekund při pokojové teplotě a poté centrifugovat při otáčkách 14000 g po dobu 60 sekund.
23. Změřit koncentraci a čistotu bisulfitované DNA pomocí NanoDropu.
24. Bisulfitovanou DNA uchovávat při teplotě -20 °C.

4.11 Metylačně-specifická PCR

Bisulfitovaná DNA se používá jako templát do metylačně-specifické PCR pomocí kitu PyroMark PCR kit (Qiagen). Byly použity páry metylačně-specifických primerů (viz Tabulka č. 15), které dokáží rozpoznat metylovanou DNA od nemetylované DNA. Primery byly navrženy pomocí programu PyroMark Assay Design, přičemž jeden z primerů (forward, reverse nebo sekvenační) byl označen biotinem. Referenční sekvence pro gen *RBPI* (NC_000003.12) je lokalizována na chromozomu 3, pro geny *PDLIM4* a *GPX3* (NC_000005.10) se nachází na chromozomu 5. Postup byl proveden dle pokynů výrobce:

Tabulka č. 15: Sady primerů pro metylačně-specifickou PCR

Sada primerů	Sekvence primerů 5'→3'	Velikost produktu [bp]
R/ <i>RBPI</i> /As10/5biotin	[Btn]ACAACCACTCCAAAATTA AAAACAATCT	174
F/ <i>RBPI</i> /As10	GGGAGAGAAGTGGAAAAGTGT	174
R/ <i>RBPI</i> /As11/5biotin	[Btn]AACCCCATTA ACTTCTCACACTCAACA	196
F/ <i>RBPI</i> /As11	GGAGAGAAGTGGAAAAGTGT TTTAAT	196
R/ <i>RBPI</i> /As12/5biotin	[Btn]CACAAAACCTACCAAAAAATCCATTATAAC	245
F/ <i>RBPI</i> /As12	GGTTGTTGAGTGTGAGAAGTTAATG	245
R/ <i>GPX3</i> /As3/5biotin	[Btn]CTCCAACCACTTTTCAA	229
F/ <i>GPX3</i> /As3	GTATTTTGGAGTTAAAAGAGGAAGG	229
R/ <i>PDLIM4</i> /5biotin	[Btn]ACACCCCACTCAACTCTC	216
F/ <i>PDLIM4</i>	GGGTTTATGAGGAGGTATTTGAGTTG	216

1. Do mikrozkušavek o objemu 0,2 ml připravit reakční směs podle Tabulky č. 16.
2. Mikrozkušavky s reakční směsí umístit do termocycleru s nastaveným programem dle Tabulky č. 17.

Tabulka č. 16: Příprava reakční směsi pro metylačně-specifickou PCR

Reagencie	Koncentrace	Objem pro 1 reakci [μl]
PCR master mix	-	12,5
Coral load concentrate	10x	2,5
MgCl ₂	25 mmol·l ⁻¹	1
Primer forward	25 μmol·l ⁻¹	0,2
Primer reverse biotinylovaný	25 μmol·l ⁻¹	0,2
Didestilovaná voda RNase free	-	7,6
Bisulfitovaná DNA	-	1
Celkem	-	25

Tabulka č. 17: Teplotní a časový profil metylačně-specifické PCR

Fáze	Čas	Teplota [°C]	Počet cyklů
Denaturace	15:00	95	1
Denaturace	10:30	94	
Nasedání primerů	00:30	56	45
Prodlužování primerů	00:30	72	
Finální extenze	10:00	72	1

4.12 Kontrolní elektroforetická separace v 2% agarózovém gelu

Před vlastním pyrosekvenováním byla provedena kontrolní elektroforetická separace v 2% agarózovém gelu pro vizualizaci a kontrolu velikosti specifických PCR produktů.

1. Do objemu 120 ml deionizované vody přidat 2,4 g agarózy Wide range/Standard 3:1.
2. Suspenzi zahřát v mikrovlnné troubě až do úplného rozpuštění agarózy.
3. Po zchladnutí gelové suspenze přidat 2,4 ml pufru 50x TAE a 12 μ l ethidium bromidu.
4. Gelovou suspenzi vylít do elektroforetické komůrky a ponechat 30 minut ke ztuhnutí.
5. Po ztuhnutí gel vložit do elektroforetické vaničky obsahující pufr 1x TAE.
6. Do krajní jamky v gelu napipetovat 3 μ l standardu molekulové hmotnosti (100 bp DNA ladderu).
7. Do zbývajících jamek napipetovat 5 μ l vzorku po metylačně-specifické PCR.
8. Zapojit zdroj elektrického napětí s napětím 70 V.
9. Po hodině vyhodnotit elektroforetickou separaci pomocí přístroje Li-Cor.

4.13 Pyrosekvenování

Pro stanovení úrovně metylace v promotorových úsecích studovaných genů byla použita metoda pyrosekvenování. Primery pro sekvenační analýzu byly navrženy pomocí programu PyroMark Assay Design (viz Tabulka č. 18). Byly použity stejné referenční sekvence, jako při navrhování primerů pro metylačně-specifickou PCR (viz 4.11).

Tabulka č. 18: Sekvenační primery

Označení sekvence pro analýzu	Sekvence sekvenačního primeru 5' → 3'
<i>RBPI/As10</i>	GAGAGAAGTGGAAAGTGTT
<i>RBPI/As11</i>	TTTAGTTAGTAGTTGAATTTTTTAG
<i>RBPI/As12</i>	AGTTAATGGAGTTTGAAGGAA
<i>GPX3/As3</i>	TTTTTGTTTAGATTTGTTTATGTTA
<i>PDLIM4</i>	TGTAGATAGTTGGGTTTGG

Pro pyrosekvenování byl použit přístroj PyroMark[®] Q96 Vacuum Workstation a program PyroMark CpG. Postup pro přípravu vzorků před pyrosekvenováním byl proveden dle pokynů výrobce:

1. Zadat parametry navržené programem PyroMark Assay Design do programu PyroMark CpG.
2. Do jamek mikrotitrační destičky s rovným dnem napipetovat 40 μ l roztoku sekvenačního primeru.
3. Připravit reakční směs dle Tabulky č. 19, kterou rozpipetovat po 60 μ l do jednotlivých jamek kónické mikrotitrační destičky.

Tabulka č. 19: Příprava reakční směsi pro pyrosekvenování

Reagencie	Objem pro 1 reakci [μ l]
PyroMark annealing pufr	40
Streptavidin sepharose high performance	3
Deionizovaná voda	17
Celkem	60

4. K 60 μ l reakční směsi přidat 20 μ l PCR produktu (z kroku 4.11) a ponechat na třepačce po dobu 10 minut při frekvenci 1400 rpm, aby došlo k navázání biotinylovaného konce PCR produktů na streptavidinové kuličky.
5. Pomocí vakuové pumpy odsát supernatant a zachycené PCR produkty s navázanými streptavidinovými kuličkami následně promývat 5 vteřin 70% ethanolem, 5 vteřin denaturačním roztokem a 10 vteřin promývacím pufr.
6. Streptavidinové kuličky navázané na PCR produkty nechat oschnout po dobu 10 vteřin v úhlu 90°.
7. Smísit zachycené streptavidinové kuličky s navázanými PCR produkty se sekvenačními primery a inkubovat 2 minuty při 80 °C.
8. Do kazety (cartridge) napipetovat odpovídající množství enzymu, substrátu a jednotlivých nukleotidů dle Obrázku č. 7. Odpovídající hodnoty množství vypočítá program dle předem zadaných parametrů.
9. Kazetu a mikrotitrační destičku se vzorky vložit do sekvenátoru PyroMark Q96 a zahájit sekvenování.
10. Po ukončení programu odečíst a vyhodnotit výsledky.

	G	
C		T
S	A	E

Obrázek č. 7: Schéma pipetování enzymu, substrátu a nukleotidů do kazety. E – enzym, S – substrát, A – adenin, T – thymin, C – cytosin, G – guanin

4.14 Ovlivnění myelomových buněčných linií

Pro práci s buněčnými kulturami byly použity myelomové buněčné linie KMS12-BM a KMS12-PE.

1. Do jednotlivých jamek 24-jamkové destičky napipetovat 500 μl média RPMI s 10% podílem FBS (fetal bovine serum) tak, aby v každé jamce bylo 500 000 buněk.
2. Dát inkubovat do termostatu s teplotou 37 °C.
3. Naředit reakční činidla na pracovní koncentrace dle Tabulky č. 20 a následně na finální koncentrace dle Tabulek č. 21 a 22.

Tabulka č. 20: Ředění reakčních činidel o zásobní koncentraci na pracovní koncentrace

Reakční činidlo	Zásobní koncentrace	Pracovní koncentrace	Objem 10% RPMI média [μl]	Objem činidla [μl]
Dimetylsulfoxid	100%	10%	90	10
5-aza-2'-deoxycytidin	50 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$	0,5 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$	99	1
5-azacytidin	50 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$	0,5 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$	99	1
Disulfiram	20 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$	0,2 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$	99	1

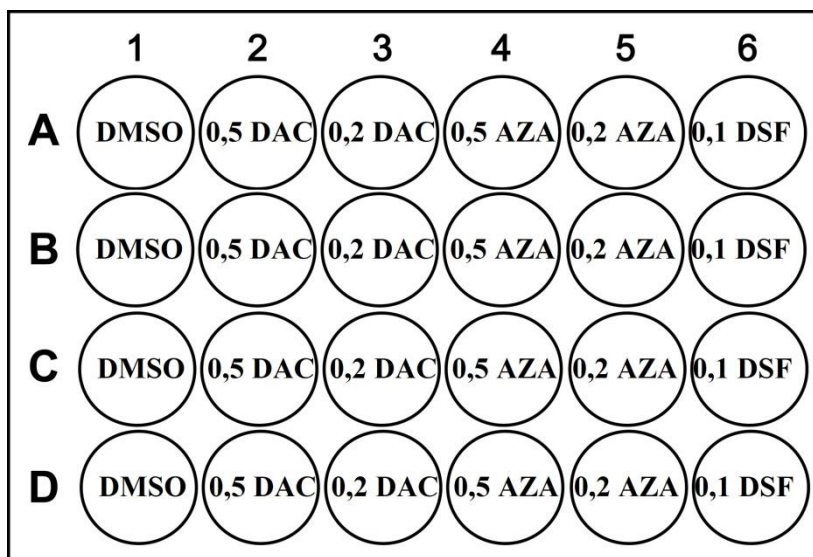
Tabulka č. 21: Ředění pracovních koncentrací činidel na před-finální koncentrace

Reakční činidlo	Pracovní koncentrace	Finální koncentrace	Objem 10% RPMI média [μl]	Objem činidla [μl]
5-aza-2'-deoxycytidin	0,5 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$	10 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$	490	10
5-azacytidin	0,5 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$	10 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$	490	10

Tabulka č. 22: Ředění pracovních/před-finálních koncentrací činidel na finální koncentrace

Reakční činidlo	Pracovní koncentrace	Finální koncentrace	Objem 10% RPMI média pro 1 reakci [μl]	Objem činidla pro 1 reakci [μl]
Dimetylsulfoxid	10%	0,15%	492,5	7,5
5-aza-2'-deoxycytidin	10 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$	1 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$	450	50
5-aza-2'-deoxycytidin	10 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$	0,4 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$	480	20
5-azacytidin	10 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$	1 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$	450	50
5-azacytidin	10 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$	0,4 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$	480	20
Disulfiram	0,2 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$	0,2 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$	499,5	0,5

4. K buněčné suspenzi o objemu 500 μl v jednotlivých jamkách destičky přidat 500 μl odpovídajícího reakčního činidla (viz Obrázek č. 8) o finální koncentraci. Finální koncentrace činidla se tak sníží na polovinu.
5. Inkubovat v termostatu při teplotě 37 °C 24 hodin.
6. Po 24 hodinách namíchat čerstvé roztoky reakčních činidel dle Tabulek č. 23 a 24.



Obrázek č. 8: Pipetování jednotlivých reakčních činidel do 24-jamkové destičky s buňkami. DMSO – dimetylsulfoxid; 0,5 DAC – $0,5\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ 5-aza-2'-deoxycytidin; 0,2 DAC – $0,2\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ 5-aza-2'-deoxycytidin; 0,5 AZA – $0,5\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ 5-azacytidin; 0,2 AZA – $0,2\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ 5-azacytidin; 0,1 DSF – $0,1\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ disulfiram

Tabulka č. 23: Ředění reakčních činidel o zásobní koncentraci na pracovní koncentrace

Reakční činidlo	Zásobní koncentrace	Pracovní koncentrace	Objem 10% RPMI média [μl]	Objem činidla [μl]
Dimetylsulfoxid	100%	10%	90	10
5-aza-2'-deoxycytidin	$50\text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$	$0,5\text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$	99	1
5-aza-2'-deoxycytidin	$50\text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$	$0,2\text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$	249	1
5-azacytidin	$50\text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$	$0,5\text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$	99	1
5-azacytidin	$50\text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$	$0,2\text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$	249	1
Disulfiram	$20\text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$	$0,2\text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$	99	1

Tabulka č. 24: Ředění reakčních činidel o pracovní koncentraci na finální koncentrace

Reakční činidlo	Pracovní koncentrace	Finální koncentrace	Objem 10% RPMI média pro 1 reakci [μl]	Objem činidla pro 1 reakci [μl]
Dimetylsulfoxid	10%	0,075%	496,25	3,75
5-aza-2'-deoxycytidin	$0,5\text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$	$0,5\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$	1980	20
5-aza-2'-deoxycytidin	$0,2\text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$	$0,2\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$	1980	20
5-azacytidin	$0,5\text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$	$0,5\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$	1980	20
5-azacytidin	$0,2\text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$	$0,2\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$	1980	20
Disulfiram	$0,2\text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$	$0,1\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$	1990	10

- Z jednotlivých jamek destičky odsát 100 μl buněčné suspenze a přidat 100 μl čerstvě připraveného činidla v pořadí odpovídající Obrázku č. 8.
- Incubovat v termostatu při teplotě 37 °C následujících 24 hodin.

9. Zopakovat kroky 6–8.
10. Do zkumavek o objemu 10 ml přenést buněčnou suspenzi z jamek, zbytky buněčné suspenze z jamek získat promytím 1 ml PBS pufru a přenést do odpovídající zkumavky.
11. Centrifugovat v chlazené centrifuze po dobu 5 minut při 1200 rpm a teplotě 4 °C.
12. Odsát supernatant a pelet resuspendovat v 1 ml PBS pufru.
13. Suspenzi centrifugovat v chlazené centrifuze po dobu 5 minut při 1200 rpm a teplotě 4 °C.
14. Odsát supernatant, pelet lyzovat v 1 ml TRI Reagent RT-Blood a celý objem zkumavky přenést do mikrozkušavky o objemu 1,5 ml.
15. Pokračovat v izolaci RNA, případně DNA, dle níže uvedených postupů.

4.15 Izolace RNA z lyzátu myelomových buněčných linií a následná expresní analýza

Z ovlivněných buněk myelomových linií rozpuštěných v TRI Reagent RT-Blood byla izolována RNA dle postupu firmy Sigma-Aldrich:

1. K lyzátu buněk rozpuštěných v 1 ml TRI Reagent RT-Blood přidat 200 µl chloroformu, 15 sekund míchat pomocí Vortex a 15 minut inkubovat při pokojové teplotě.
2. Lyzát centrifugovat v chlazené centrifuze 15 minut při otáčkách 12000 g a teplotě 4 °C.
3. Do čisté mikrozkušavky o objemu 1,5 ml odebrat horní vodnatou fázi obsahující RNA a přidat 500 µl isopropanolu.
4. Promíchat pomocí Vortex a inkubovat po dobu 10 minut při pokojové teplotě.
5. Centrifugovat v chlazené centrifuze 10 minut při otáčkách 12000 g a teplotě 4 °C.
6. Odstranit supernatant a pelet promýt v 1 ml 75% ethanolu.
7. Promíchat pomocí Vortex a centrifugovat po dobu 5 minut při otáčkách 7500 g a teplotě 4 °C.
8. Odstranit supernatant, pelet RNA zbavit tekutiny a po dobu 10–20 minut nechat vyschnout při pokojové teplotě.
9. Vysušený pelet rozpustit ve 40 µl destilované vody, propipetovat a vložit na 10 minut do termobloku s teplotou 56 °C.
10. Změřit koncentraci a čistotu získané RNA pomocí NanoDropu.
11. RNA uchovávat při teplotě -80 °C.

Z izolované RNA byla připravena cDNA pomocí Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kitu. Postup byl proveden dle pokynů výrobce, viz postup 4.7. Vstupní množství RNA do reakce bylo 1000 ng.

Expresní analýza genů *RBPI*, *GPX3* a *PDLIM4* byla provedena metodou real-time PCR s použitím X-ceed qPCR Probe Mix (2x) Lo-ROX. Postup viz 4.8.

4.16 Izolace DNA z buněčné suspenze, bisulfitová modifikace a stanovení úrovně metylace

Pro izolaci DNA z ovlivněných buněk myelomových linií byl použit QIAamp DNA Mini Kit. Postup byl proveden dle pokynů výrobce, viz postup 4.9.

Izolovaná DNA byla následně modifikována bisulfitovou reakcí pomocí EpiTect Fast DNA Bisulfite kitu, amplifikována metylačně-specifickou PCR reakcí pomocí PyroMark PCR kitu a pomocí pyrosekvenování byla stanovena úroveň metylace v promotorových úsecích studovaných genů. Postup byl proveden dle pokynů výrobců, viz postupy 4.10–4.13.

5 Výsledky

5.1 Expresní analýza tumor-supresorových genů *RBPI*, *GPX3* a *PDLIM4*

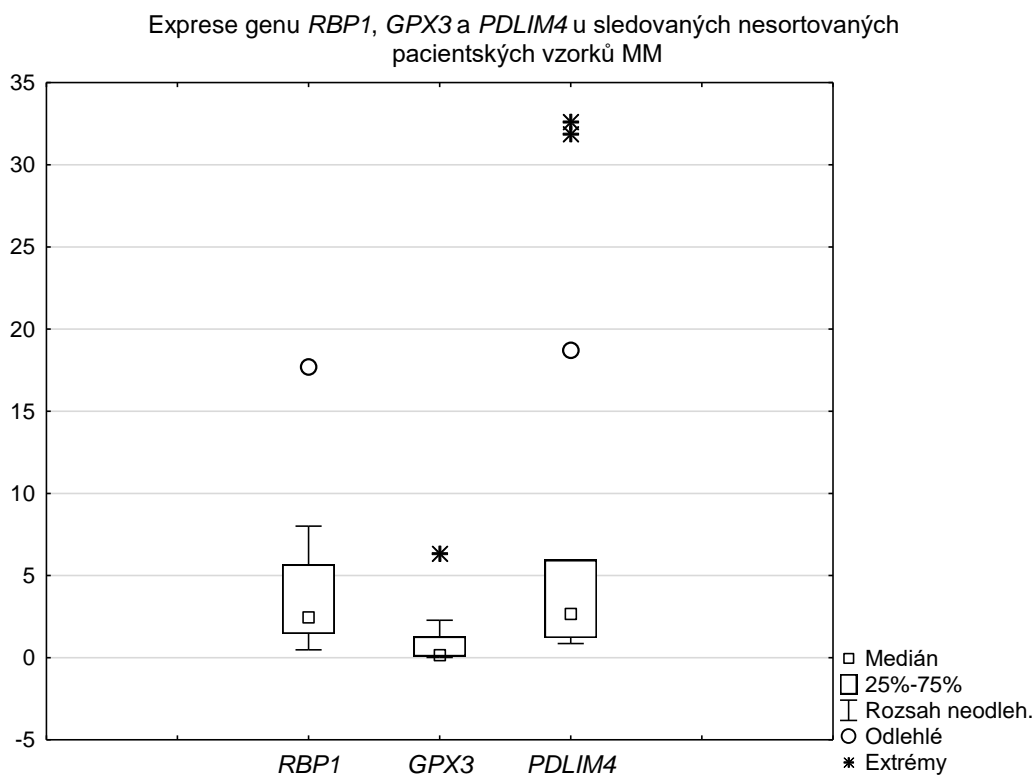
5.1.1 Expresní analýza u patientských vzorků

Cílem expresní analýzy bylo zjistit úroveň exprese tumor-supresorových genů *RBPI*, *GPX3* a *PDLIM4* u pacientů s diagnózou mnohočetného myelomu. Pro normalizace exprese studovaných genů u pacientů s MM byla použita RNA, izolovaná ze zdravé kostní dřeně 56 Asiatů ve věku 22–85 let. Byl použit housekeepingový gen *$\beta 2M$* , jehož produkt je součástí histokompatibilního komplexu (MHC, major histocompatibility complex) třídy I, který se nachází na povrchu jaderných buněk.

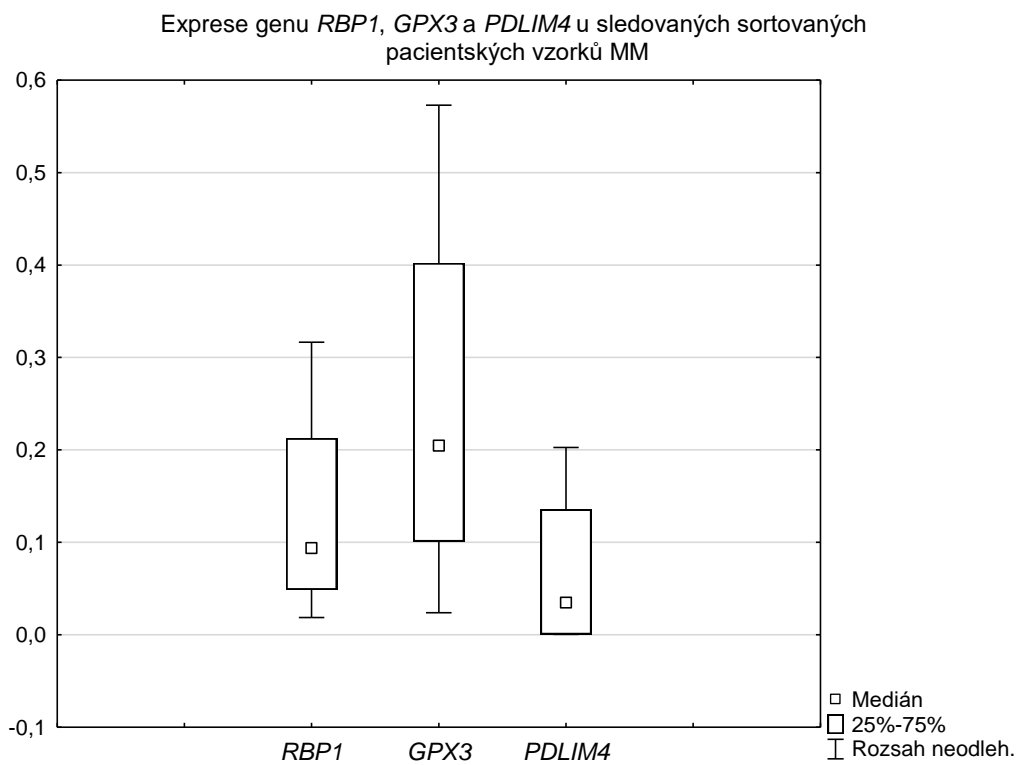
Expresní analýza byla provedena u 17 nesortovaných patientských vzorků a u 5 patientských vzorků sortovaných na antigen CD138. Z nesortovaných vzorků bylo 15 pacientů diagnostikováno jako MM a 2 jako MGUS. Mezi sortovanými vzorky byli 4 pacienti s MM a jeden jedinec s MGUS. Měření se provádělo v několika opakováních a v duplikátech. Z experimentu byly vyřazeny vzorky, jejichž Ct hodnota u housekeepingového genu přesahovala 28. cyklus. Do statistické analýzy byly zařazeny pouze vzorky od pacientů s diagnostikovaným mnohočetným myelomem a zároveň z ní byly vyřazeny vzorky, jejichž normalizovaná hodnota exprese byla vyšší než 50.

U nesortovaných patientských vzorků byla nejvyšší exprese detekována u genu *PDLIM4*. 12 vzorků vykazovalo normalizovanou expresi v rozmezí 0,859–10 a 4 vzorky měly expresi v rozmezí 10–50. Zvýšenou expresi vykazoval také gen *RBPI*, u kterého mělo 14 patientských vzorků normalizovanou expresi v rozmezí 0,478–10 a jeden jedinec vykazoval expresi v rozmezí 10–50. Nejnižší exprese byla u genu *GPX3*, u kterého nebyl zaznamenán vzorek s expresí v rozmezí 10–50 (viz Graf č. 1, Příloha č. 1).

U patientských vzorků sortovaných na antigen CD138 byly detekovány nejvyšší normalizované exprese u genu *GPX3* (0,024–0,231) a nejnižší exprese byla zjištěna u genu *PDLIM4* (0,005–0,203). U žádného z analyzovaných genů nebyla zaznamenána normalizovaná exprese vyšší než 1 (viz Graf č. 2, Příloha č. 2).



Graf č. 1: Expresse genů *RBP1*, *GPX3* a *PDLIM4* u nesortovaných patientských vzorků. Ze statistické analýzy byly vyřazeny vzorky s diagnózou MGUS a dále normalizované hodnoty expresí, které přesahovaly hodnotu 50



Graf č. 2: Expresse genů *RBP1*, *GPX3* a *PDLIM4* u sortovaných patientských vzorků. Ze statistické analýzy byly vyřazeny vzorky s diagnózou MGUS

5.1.2 Expresní analýza u ovlivněných myelomových buněčných linií

Expresní data sledovaných genů u ovlivněných myelomových buněčných linií KMS12-BM a KMS12-PE byla normalizována k expresi příslušných genů u neovlivněných buněk. Jako housekeepingový gen byl zvolen *β2M*.

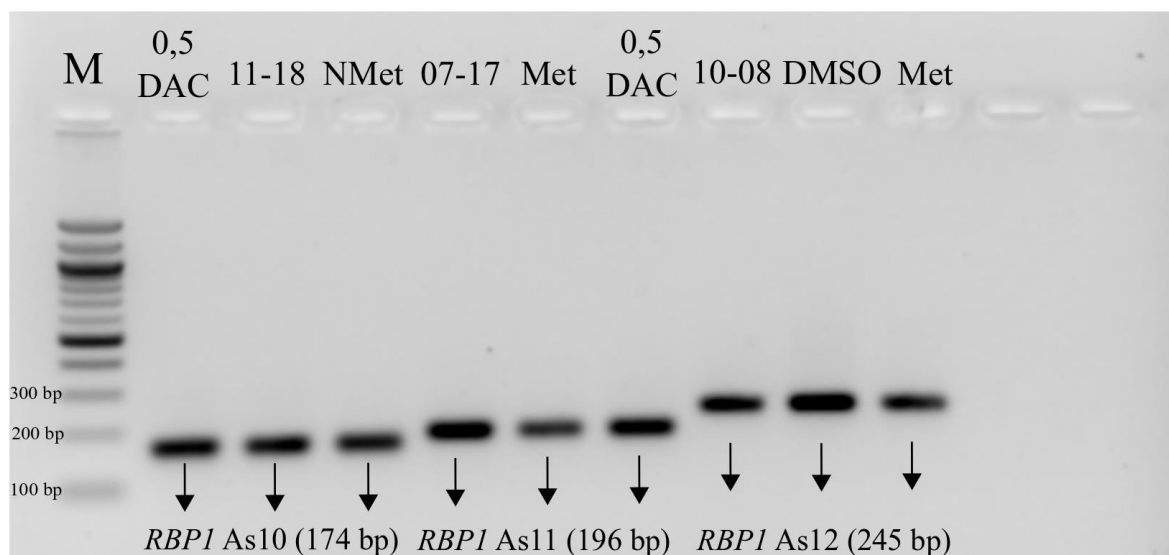
U buněk linie KMS12-BM ovlivněných $0,2\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ 5-aza-2'-deoxycytidinem byla u genu *RBPI* detekována zvýšená exprese v rozmezí 0,872–3,078, ale u ovlivnění $0,1\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ disulfiramem byla exprese genu *RBPI* nejvyšší (2,336–3,771). Vysoká exprese genu *GPX3* byla rovněž detekována u buněk této linie ovlivněných $0,2\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ 5-aza-2'-deoxycytidinem (3,246 a 6,283) a po ovlivnění $0,1\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ disulfiramem dosahovaly normalizované exprese rovněž vysokých hodnot (5,421 a 6,320). Podobně u genu *PDLIM4* byly zjištěny po ovlivnění buněk $0,2\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ 5-aza-2'-deoxycytidinem zvýšené hodnoty normalizované exprese v rozmezí 1,687–2,620, ale u buněk ovlivněných $0,1\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ disulfiramem byla exprese tohoto genu nejvyšší, pohybovala se v rozmezí 6,081–9,909.

U buněčné linie KMS12-PE byly zjištěny vysoké hodnoty exprese genu *RBPI* po ovlivnění buněk 5-aza-2'-deoxycytidinem u obou použitých koncentrací – $0,5\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ (3,265–4,607) a $0,2\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ (1,103–2,375). U těchto dvou ovlivnění 5-aza-2'-deoxycytidinem byly detekovány velmi vysoké hodnoty exprese genu *GPX3*. U buněk ovlivněných $0,5\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ 5-aza-2'-deoxycytidinem byly hodnoty normalizované exprese 41,727 a 57,270 a po ovlivnění $0,2\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ 5-aza-2'-deoxycytidinem byly hodnoty 17,076 a 28,820. Naproti tomu exprese genu *PDLIM4* se nezvýšila a zůstala po ovlivnění $0,5\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ 5-aza-2'-deoxycytidinem na nízké úrovni (0,592–0,985) a u ovlivnění $0,2\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ 5-aza-2'-deoxycytidinem na velmi nízké úrovni (0,092–0,477) (viz Příloha č. 4). Expresе všech tří studovaných genů u buněk KMS12-PE ovlivněných $0,1\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ disulfiramem byla velmi variabilní a normalizované hodnoty se pohybovaly od velmi nízkých (0,164 pro gen *RBPI* a 0,295 pro gen *PDLIM4*) až po velmi vysoké u genu *GPX3* (9,785 a 69,729).

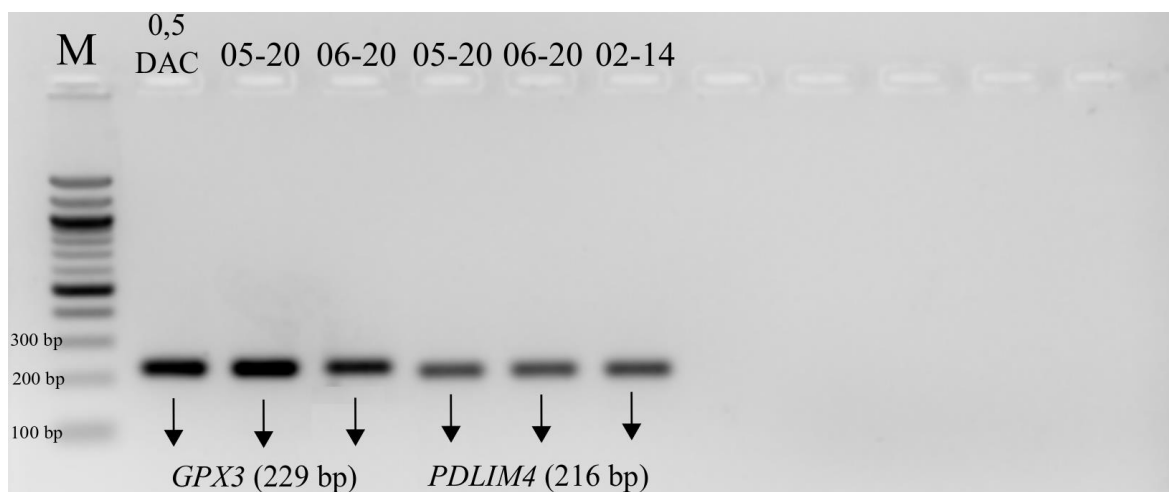
5.2 Detekce úrovně metylace v promotoru studovaných genů

Cílem detekce úrovně metylace v promotoru příslušných genů bylo zjistit, zda metylace v promotoru studovaných genů má vliv na jeho expresi.

Izolovaná DNA byla modifikována bisulfítovou reakcí a následně amplifikována metylačně-specifickou PCR. PCR produkty z metylačně-specifické PCR reakce byly separovány v 2% agarózovém gelu a vizualizovány pomocí přístroje Li-Cor. Produkty PCR byly detekovány u všech analyzovaných vzorků (viz Obrázky č. 9 a 10).



Obrázek č. 9: Produkty metylačně-specifické PCR reakce separované v 2% agarózovém gelu. M – marker molekulové hmotnosti; 0,5 DAC – vzorek buněčné linie KMS12-BM ovlivněný $0,5\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ 5-aza-2'-deoxycytidinem; DMSO – neovlivněný vzorek buněčné linie KMS12-BM; 11-18, 07-17, a 10-08 – nesortované patientské vzorky; NMet – nemetylovaná kontrola; Met – metylovaná kontrola



Obrázek č. 10: Produkty metylačně-specifické PCR reakce separované v 2% agarózovém gelu. M – marker molekulové hmotnosti; 0,5 DAC – vzorek buněčné linie KMS12-BM ovlivněný $0,5\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ 5-aza-2'-deoxycytidinem; 05-20 a 06-20 – nesortované patientské vzorky; 02-14 – sortovaný patientský vzorek

Pro pyrosekvenování bylo použito celkem 17 patientských vzorků nesortovaných buněk, přičemž 15 vzorků byli pacienti s diagnózou MM a 2 vzorky pocházely od jedinců s diagnózou MGUS. Z 5 patientských vzorků po sortování buněk byli 4 pacienti diagnostikováni s MM a jeden byl jedinec s MGUS. Součástí metylačně-sekvenační analýzy bylo pyrosekvenování vzorků buněčných linií KMS12-BM a KMS12-PE po jejich ovlivnění demetylačními činidly.

Pro metylačně-sekvenační analýzu genu *RBPI* byly navrženy 3 oblasti promotoru (viz Tabulka č. 25). V oblasti označené jako As10 o velikosti 95 bp se průměrná metylace stanovovaná z 5 ostrůvků CpG pohybovala od 2 do 15 % u nesortovaných patientských vzorků (viz Příloha č. 5) a od 1 do 21 % u sortovaných vzorků (viz Příloha č. 6). U buněčné linie KMS12-BM byla v promotorovém úseku As10 nejvyšší průměrná hodnota metylace 69 % u neovlivněných buněk (DMSO). Vysoké hodnoty průměrné metylace byly stanoveny také u buněk ovlivněných $0,1\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ disulfiramem (62,5 %) a $0,2\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ 5-azacytidinem (63 %). Nejnižší hodnotu vykazoval vzorek buněk ovlivněných $0,5\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ 5-aza-2'-deoxycytidinem, jehož průměrná metylace byla snížena na 30,5 %. U buněčné linie KMS12-PE byl nejvíce metylovaný úsek As10 u neovlivněných buněk (86 %) a u buněk ovlivněných $0,1\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ disulfiramem (80 %). Úroveň průměrných metylací dosahovala poměrně vysokých hodnot (61–75 %) u obou použitých koncentrací ($0,2$ a $0,5\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) 5-aza-2'-deoxycytidinu a 5-azacytidinu (viz Příloha č. 7).

Druhou analyzovanou oblastí promotorového úseku genu *RBPI* byla oblast označená jako As11 o velikosti 109 bp a obsahující 4 ostrůvky CpG. Průměrná metylace u nesortovaných vzorků se pohybovala mezi 2–19 % (viz Příloha č. 5) a mezi 2–16 % u sortovaných vzorků (viz Příloha č. 6). Neovlivněné kontrolní buňky (DMSO) linie KMS12-BM vykazovaly nejvyšší hodnoty průměrné metylace (60 % a 59 %) a vysoké hodnoty průměrné metylace (59 % u obou stanovení) byly stanoveny i u vzorku buněk ovlivněných $0,1\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ disulfiramem. Nejvyšší demetylační efekt projevující se nejnižší úrovní průměrné metylace (45 % a 46 %) byl zjištěn u vzorku buněk po ovlivnění $0,5\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ 5-aza-2'-deoxycytidinem a po ovlivnění $0,2\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ 5-aza-2'-deoxycytidinem (47 % u obou stanovení). Buněčná linie KMS12-PE vykazovala nejvyšší úroveň průměrné metylace u kontrolního vzorku neovlivněných buněk (70 % a 73 %). Porovnáním s úrovní metylace úseku As10 genu *RBPI*, hodnoty průměrných metylací ostrůvků CpG úseku As11 u buněk ovlivněných $0,2$ a $0,5\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ 5-aza-2'-deoxycytidinem dosahovaly nižších hodnot (30–43 %).

Třetí analyzovanou oblastí promotorového úseku genu byla oblast As12 o velikosti 127 bp s 10 dinukleotidy CpG. Hodnoty průměrné metylace se pohybovaly v rozmezí 3–23 % u nesortovaných vzorků a mezi 2–14 % u sortovaných vzorků (viz Příloha č. 5 a č. 6). Buňky linie KMS12-BM ovlivněné $0,1\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ disulfiramem vykazovaly nejvyšší hodnotu průměrné metylace (80 % a 75 %), která byla srovnatelná s průměrnou metylací u kontrolních neovlivněných buněk (DMSO) 78 % a 79 %. Nízké hodnoty průměrné metylace byly stanoveny u vzorků buněk ovlivněných koncentracemi $0,2\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ (48 % a 51 %) a $0,5\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ (49 % a 51 %) 5-aza-2'-deoxycytidinu. U buněčné linie KSM12-PE byl, podobně jako vzorek neovlivněných buněk (78 %), nejvíce metylován vzorek buněk ovlivněných $0,1\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ disulfiramem (83,5 %).

Efekt demetylace se projevil u ovlivnění $0,5\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ 5-aza-2'-deoxycytidinem, u něž byla stanovena úroveň průměrné metylace 50 % a u buněk ovlivněných $0,2\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ 5-aza-2'-deoxycytidinem s úrovní průměrné metylace 52 %.

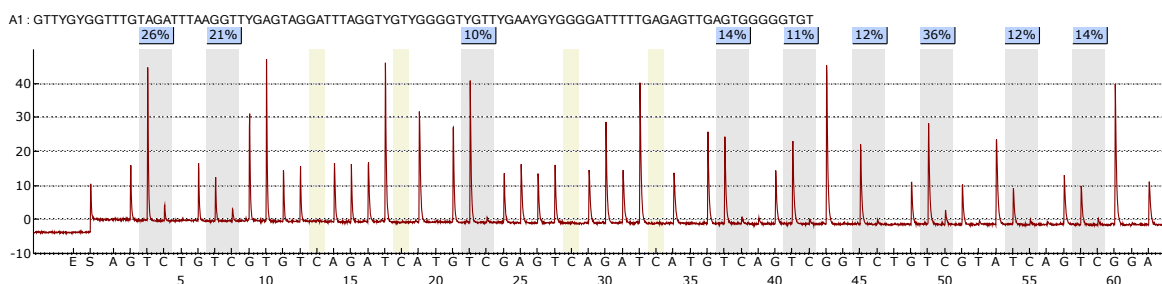
Metylačně-sekvenční analýza promotorové oblasti genu *GPX3* o velikosti 91 bp obsahující 8 ostrůvků CpG (viz Tabulka č. 25) stanovila průměrné hodnoty úrovně metylace u vzorků pacientů z nesortovaných buněk od 1 do 21 % (viz Příloha č. 5) a od 1 do 30 % u vzorků ze sortované buněčné populace (viz Příloha č. 6). U studovaných buněčných linií KMS12-BM a KMS12-PE byla detekována vysoká úroveň metylace u kontrolních neovlivněných buněk (DMSO) 89,5 %, respektive 76,5 % (viz Příloha č. 7). Nicméně nejvyšší průměrná hodnota metylace byla u buněk linie KMS12-BM po jejich ovlivnění $0,1\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ disulfiramem (93 %). U myelomové linie KMS12-BM se nejvyšší demetylační efekt projevující se nejnižšími hodnotami průměrné metylace projevil u buněk ovlivněných $0,5\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ 5-aza-2'-deoxycytidinem (62 % a 64 %). U buněk linie KMS12-PE byly detekovány podobné hodnoty průměrných metylací po jejich ovlivnění $0,5\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ 5-aza-2'-deoxycytidinem, $0,2\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a $0,5\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ 5-azacytidinem v rozmezí 54–65 %.

Pro gen *PDLIM4* byla navržena oblast o velikosti 90 bp, která obsahuje 9 dinukleotidů CpG (viz Tabulka č. 25, Obrázek č. 11 a č. 12). U nesortovaných buněčných populací patientských vzorků se průměrná metylace pohybovala v rozmezí 9–34 % (viz Příloha č. 5) a 9–36 % u vzorků pacientů po sortování buněk (viz Příloha č. 6). Nejvyšší hodnoty průměrné metylace u buněčné linie KMS12-BM vykazovaly vzorky neovlivněných buněk (76 % a 81 %) a buněk ovlivněných $0,1\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ disulfiramem (81 % a 84 %). Podobný výsledek metylačně-sekvenční analýzy byl získán u buněčné linie KMS12-PE. Nejvíce zametylovaný promotorový úsek genu *PDLIM4* byl u kontrolních neovlivněných buněk (79 % a 84 %) a u buněk po jejich ovlivnění $0,1\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ disulfiramem (77 % a 79 %). Nejnižší úroveň metylace byla zjištěna u buněk KMS12-PE ovlivněných $0,2\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ 5-azacytidinem (46 % a 54 %) (viz Příloha č. 7).

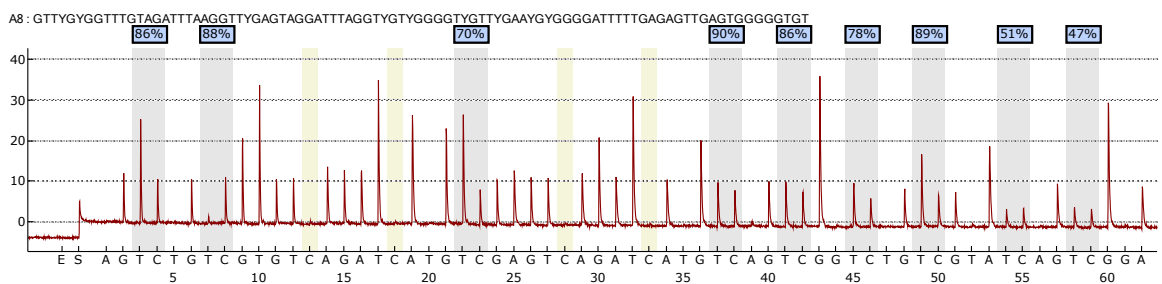
Tabulka č. 25: Analyzované sekvence v promotorových oblastech tumor-supresorových genů *RBPI*, *GPX3* a *PDLIM4*

<i>RBPI</i> As10	TTAATTTTTT Y GTT Y GTAGTTGAATTTTTTAGTTTTTTGATTTT AGTT ATTAT YGGYGY GAGGTTTTAGATAAAGGTTTGTAAAGTGGTTTTTTT
<i>RBPI</i> As11	TTTTTTGATTTTAGTTATTAT YGGYGY GAGGTTTTAGATAAAGGTTT GTAAGTGGTTTTTTTTTTTAATT Y GTTAGTATAAATTTTAGGAGATT GTTTTTAATTTT
<i>RBPI</i> As12	ATTTTTAGTAGT Y GAAGAGTT Y GGTTAATAAAGTAAA Y GTTT Y GTTTT Y GGTTTTTTTTTTTTTTGTAGGGGAA Y GAATTGAA Y GTTTGAA Y GA AGGTGG Y G Y GGTTTGATAAATTTGATTTTT
<i>GPX3</i>	TTGT Y GTTT Y GGGA Y GGGGAGGTGGGGAGTTGAGGGTAAGT Y G Y GTT Y GTTTTTGAATTTTAGT Y GTTTAG Y GATTGGTTGTAAGGGTTT
<i>PDLIM4</i>	GTT Y G Y GGTTTGTAGATTTAAGGTT Y GAGTAGGATTTAGGT Y G Y GG GGT Y GTT Y GA Y G Y GGGGATTTTTGAGAGTTGAGTGGGGGTGT

A – adenin, T- thymin, C – cytosin, G – guanin, Y – pyrimidin (cytosin nebo thymin); modře je označen analyzovaný dinukleotid CpG



Obrázek č. 11: Pyrogram, analýza metylace v promotoru genu *PDLIM4* nesortovaného patientského vzorku 2014-01-22



Obrázek č. 12: Pyrogram, analýza metylace v promotoru genu *PDLIM4* buněčné linie KMS12-BM u neovlivněného vzorku (DMSO)

Statistické posouzení hodnot průměrných metylací patientských vzorků nesortovaných a sortovaných buněčných populací bylo provedeno neparametrickým testem Mann-Whitney při hladině významnosti $p < 0,05$. Neparametrický Mann-Whitney test byl zvolen z důvodu nízkého počtu vzorků ve skupině sortovaných patientských vzorků. Vstupními daty pro statistické posouzení byly průměrné hodnoty průměrných metylací 1. a 2. duplikátu pro jednotlivé sekvence promotorových oblastí studovaných genů. Porovnáním těchto průměrných hodnot mezi dvěma skupinami patientských vzorků – sortovaných a nesortovaných buněk analyzovaného úseku As10 genu *RBP1* bylo statisticky nevýznamné při hladině významnosti $p < 0,05$ (p-hodnota 0,647). U promotorových úseků As11 a As12 genu *RBP1* při porovnání průměrných metylací mezi vzorky nesortovaných a sortovaných buněk byly stanoveny statisticky nevýznamné rozdíly při hladině významnosti $p < 0,05$ (p-hodnota 0,340 pro oblast As11 a p-hodnota 0,859 pro oblast As12). Statisticky nevýznamné rozdíly mezi nesortovanou a sortovanou buněčnou populací patientských vzorků byly vypočítány při hladině významnosti $p < 0,05$ i u promotorových úseků genů *GPX3* (p-hodnota 0,249) a *PDLIM4* (p-hodnota 0,920). Statistická analýza byla provedena po konzultaci s Mgr. Janou Zapletalovou, Dr. z Ústavu lékařské biofyziky Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci.

5.3 Korelační analýza

Zjištěné hodnoty metylací byly porovnávány s expresí příslušných genů. Cílem bylo stanovení korelace a potvrzení nebo vyvrácení hypotézy, kdy se zvyšující se metylací v promotorové oblasti studovaných genů může docházet ke snížení exprese příslušného genu a naopak, tedy snižující se úroveň metylací obnovuje nebo zvyšuje expresi genu. Z korelační analýzy byly vyřazeny vzorky, jejichž normalizovaná hodnota exprese byla vyšší než 50.

U nesortované populace nebyla zjištěna významná korelace u žádného ze sledovaných genů. Korelační koeficient (r) dosahoval hodnot od -0,162 do 0,140 u genu *RBP1*, $r = 0,054$ u genu *GPX3* a $r = 0,284$ u genu *PDLIM4*. Data pro výpočet jsou shrnuta v Příloze č. 8.

U sortované populace byla zjištěna silná záporná korelace ($r = -0,635$) mezi expresí genu *GPX3* a hodnotami průměrných metylací analyzované promotorové oblasti, která vede k potvrzení hypotézy, že důsledkem zjištěných vyšších úrovní metylací v promotorovém úseku tohoto genu je jeho snížená exprese. U genu *PDLIM4* byla naopak zjištěna pozitivní korelace $r = 0,790$ mezi metylací v promotorovém úseku a expresí tohoto genu. Ve studovaných promotorových úsecích genu *RBP1* byla negativní korelace zjištěna v úseku označeném jako As11 s hodnotou $r = -0,304$ a v promotorovém úseku označeném jako As10 s hodnotou $r = -0,154$, ale v úseku As12 byla pozitivní korelace s $r = 0,207$. Data pro výpočet jsou shrnuta v Příloze č. 9.

Korelační koeficient pro všechny tři oblasti As10, As11 a As12 genu *RBP1* u nesortovaných buněčných populací dosahuje hodnoty $r = -0,068$ a naznačuje slabou negativní korelaci. Korelační koeficient pro úseky As10, As11 a As12 genu *RBP1* u sortovaných buněk byl vypočítán v hodnotě $r = -0,352$ a vypovídá o střední míře negativní korelace mezi hodnotami průměrných metylací promotorových úseků genu *RBP1* a úrovní exprese tohoto genu.

6 Diskuse

Cílem diplomové práce bylo porovnat genovou expresi vybraných tumor-supresorových genů s úrovní metylace v promotorových oblastech těchto genů u pacientů s mnohočetným myelomem a u myelomových linií po jejich ovlivnění látkami s demetylačním účinkem.

Kaiser *et al.* (2013) popsali epigeneticky regulované geny, mezi které patří v našich experimentech studované geny *RBPI* a *GPX3*. Geny *RBPI*, *GPX3*, *SPARC* a *TGFBI* jsou také označovány jako geny pd-DMRs (differentially methylated regions) s funkcí potenciálně důležitých faktorů ovlivňujících průběh onemocnění. Kromě toho, že tyto geny patří mezi tumor-supresorové geny zmiňované v souvislosti s mnohočetným myelomem, jedná se o důležité geny v nádorové biologii a v signálních drahách ovlivňujících odpověď pacienta na zvolenou léčbu (Kaiser *et al.*, 2013; Wong *et Chim*, 2015).

Gen *RBPI* kóduje protein vázající retinol. Signální dráha kyseliny retinové, která je hlavním metabolitem retinolu, hraje roli v regulaci proliferace a diferenciaci buněk a inaktivace genů, jejichž produkty jsou zapojeny do této signální dráhy. V několika studiích (Jing *et al.*, 1996; Kuppumbatti *et al.*, 2000; Esteller *et al.*, 2002) byly popsány změny v expresi genu *RBPI* u lidského karcinomu prsu. Bylo zjištěno, že exprese tohoto genu byla výrazně snížena, pravděpodobně v důsledku metylace v promotoru genu, který obsahuje ostrůvky CpG. Kaiser *et al.* (2013) popsali gen *RBPI* jako významně epigeneticky regulovaný gen, jehož hypermetylovaný promotor ovlivnil kratší dobu přežití pacientů s MM.

V této práci nebyla zjištěna výrazně snížená exprese genu *RBPI* u vzorků nesortované buněčné populace pacientů s mnohočetným myelomem. Sníženou expresi vykazovaly početně omezené vzorky buněčné populace sortované na antigen CD138. Zvýšená exprese genu *RBPI* (viz Graf č. 1) u nesortovaných patientských vzorků vykazovala slabou negativní korelaci ($r = -0,068$) s nízkou úrovní průměrných metylací ve všech třech As10, As11 a As12 analyzovaných promotorových oblastech genu *RBPI*. U sortovaných patientských vzorků byla detekována nízká exprese genu *RBPI* (viz Graf č. 2), která ovšem vykazovala střední míru negativní korelace ($r = -0,352$) porovnáním s hodnotami průměrných metylací analyzovaných promotorových úseků genu *RBPI*.

Glutathion peroxidáza 3, produkt genu *GPX3*, se účastní inaktivace reaktivních kyslíkových radikálů (ROS), které se podílejí na rozvoji řady chorob, včetně nádorových onemocnění. Snížená exprese genu *GPX3* jako důsledek hypermetylace v oblasti promotoru je pozorována u mnoha lidských malignit. Chen *et al.* (2011) ve své studii zjistili výraznou metylaci (38–85 %) ostrůvků CpG v promotoru *GPX3* u analyzovaných buněčných linií odvozených od nádoru plic, prsu, močového měchýře či melanomu, přičemž úroveň metylace korelovala s hladinou exprese genu.

Yu *et al.* (2007) u rakoviny prostaty zjistili inaktivaci genu *GPX3* ztrátou jedné alely v důsledku delece a epigenetickým umlčením alely druhé.

Z námi analyzovaných genů měl gen *GPX3* nejnižší expresi u nesortovaných patientských vzorků (viz Graf č. 1) a jeho nízká exprese byla potvrzena i u sortované buněčné populace (viz Graf č. 2). U sortované populace byla zjištěna silná záporná korelace ($r = -0,6352$) mezi expresí genu *GPX3* a hodnotami průměrných metylací analyzované promotorové oblasti, která vede k potvrzení hypotézy, že důsledkem zjištěných vyšších úrovní metylací v promotorovém úseku tohoto genu (viz Příloha č. 6) je jeho snížená exprese (viz Příloha č. 2).

Třetím vybraným tumor-supresorovým genem je PDZ a LIM doména 4 (*PDLIM4*), který je metylován u různých nádorových onemocnění, jako je akutní myeloidní leukemie nebo myelodysplastického syndromu, zatímco zdravé tkáně vykazují nízkou úroveň či dokonce nepřítomnost metylace. Boumber *et al.* (2007) uvádí, že po obnovení exprese *PDLIM4* demetylačním činidlem 5-aza-2'-deoxycytidin v nádorových buňkách tlustého střeva došlo k potlačení buněčné proliferace a následně k indukci apoptózy. Vliv metylačních změn v promotoru genu *PDLIM4* na jeho expresi zatím nebyla popsána u mnohočetného myelomu.

U nesortovaných populací buněk pacientů s mnohočetným myelomem ukázala expresní analýza, podobně jako u genu *RBPI*, zvýšené hodnoty exprese genu *PDLIM4* (viz Příloha č. 1, Graf č. 1). Naopak u sortované populace byla zjištěna nízká úroveň exprese (viz Příloha č. 2, Graf č. 2). Úroveň metylací u nesortovaných i sortovaných patientských vzorků se pohybovala v rozmezí 9–36 % (viz Příloha č. 5 a č. 6) a byla vysoká při porovnání s hodnotami průměrných metylací promotorových úseků genů *RBPI* a *GPX3*. Korelace mezi expresí genu *PDLIM4* a úrovní metylace v jeho promotoru se jako jediná ukázala pozitivní u obou nesortovaných i sortovaných buněčných populací. U sortované populace buněk, která obsahuje pouze cíleně sortované plazmatické buňky na antigen CD138, lze podle hodnoty korelačního koeficientu ($r = 0,7904$) usuzovat na silnou pozitivní korelaci, která naznačuje, že metylační změny v promotoru tohoto genu zřejmě nemají vliv na jeho expresi.

Ve studii Kaiser *et al.* (2013) byla popsána obnova exprese genu *RBPI* u buněk myelomové linie KMS11 ovlivněných $0,2\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ 5-aza-2'-deoxycytidinem při současném snížení úrovně metylace ve sledované genomové oblasti. Podobný výsledek byl v této práci získán u linie KMS12-BM po jejím ovlivnění $0,2\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ 5-aza-2'-deoxycytidinem, kdy zvýšení exprese dosahovalo normalizované hodnoty až 3,078. Buňky linie KMS12-PE se ukázaly jako citlivější na demetylační účinek námi zvolených koncentrací 5-aza-2'-deoxycytidinu. Jejich ovlivnění $0,5\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ 5-aza-2'-deoxycytidinem zvýšilo expresi tohoto genu 3–4krát, oproti neovlivněným myelomovým buňkám, a po ovlivnění $0,2\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ 5-aza-2'-deoxycytidinem se normalizované

hodnoty exprese genu *RBPI* pohybovaly v rozmezí 1,103–2,375. U obou linií, KMS12-BM i KMS12-PE ovlivněných 5-aza-2'-deoxycytidinem byl současně pyrosekvenováním potvrzen pokles úrovní metylací v promotoru ve všech třech analyzovaných oblastech genu *RBPI* (viz Příloha č. 7).

U obou buněčných linií KMS12-BM i KMS12-PE byla analyzovaná promotorová oblast genu *GPX3* neovlivněných buněk výrazně zametylovaná a úrovní metylace se takřka shodovala s hladinou metylace detekovanou u kontrolní metylované DNA (viz Příloha č. 7). Expresní analýzy studovaných genů se u těchto vzorků neovlivněných buněk ukázaly jako problémové, pravděpodobně z důvodu vysoké úrovně metylace v promotorech těchto genů.

Nízká úroveň exprese genu *GPX3* u pacientů s mnohočetným myelomem a námi detekované zvýšení exprese genu *GPX3* u buněk myelomové linie KMS12-PE ovlivněných $0,2\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ 5-aza-2'-deoxycytidinem (3,246 a 6,283) naznačuje, že tento tumor-supresorový gen může být důležitý pro iniciaci nebo následnou progresi mnohočetného myelomu. Gen *GPX3* by tak mohl být vhodný prognostický marker tohoto onemocnění. U patientských vzorků, u obou sortovaných i nesortovaných buněčných populací, byla zjištěna jeho velmi nízká exprese a u neovlivněných buněk buněčných linií byla velmi vysoká úroveň metylace v promotoru tohoto genu. Velmi vysoké hodnoty exprese genu *GPX3* byly stanoveny také u buněk linie KMS12-PE ovlivněných $0,5\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ 5-aza-2'-deoxycytidinem a $0,1\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ disulfiramem. Nicméně k potvrzení obnovené exprese genu *GPX3* u myelomových buněk ovlivněných látkami s demetylačním účinkem by bylo vhodné detekovat tento gen na proteinové úrovni.

Výrazně zvýšená exprese genu *PDLIM4* u obou buněčných linií KMS12-BM i KMS12-PE byla zjištěna po ovlivnění buněk $0,1\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ disulfiramem, přičemž úroveň metylace v analyzovaném promotorovém úseku nebyla ovlivněna. Zjištěná pozitivní korelace mezi expresí a metylací u patientských vzorků tohoto genu naznačuje, že hladina metylace námi sledovaného promotorového úseku nemá vliv na změny exprese tohoto genu. Z těchto výsledků lze usoudit, že *PDLIM4* nemusí být klasický tumor-supresorový gen související s mnohočetným myelomem.

7 Závěr

Cílem diplomové práce bylo porovnat expresní profil tumor-supresorových genů *RBPI*, *GPX3* a *PDLIM4* s úrovní metylace v promotorových oblastech těchto genů u vzorků pacientů s mnohočetným myelomem a u myelomových buněčných linií po jejich ovlivnění demetylačními činidly.

V rámci teoretické části byla vypracována literární rešerše zaměřená na recentní poznatky o potenciálních příčinách vzniku mnohočetného myelomu a jednotlivých stádiích onemocnění. Součástí literární části byla cytogenetická a epigenetická charakteristika mnohočetného myelomu a možnosti léčby tohoto závažného onemocnění.

Podstatou experimentální části byly expresní i metylačně-sekvenční analýzy sortovaných a nesortovaných buněčných populací vzorků pacientů s diagnózou mnohočetného myelomu. Expresní profily genů *RBPI*, *GPX3* a *PDLIM4* byly stanoveny metodou kvantitativní real-time PCR. Pyrosekvenování, jako metylačně-sekvenční metoda, umožnilo detekci úrovně metylací v promotorových úsecích těchto genů. Silná negativní korelace ($r = -0,635$) mezi expresí a úrovní metylace byla zjištěna u genu *GPX3* u sortovaných buněčných populací pacientů s mnohočetným myelomem. Expresní a metylační analýza genu *RBPI* ukázala u sortovaných patientských vzorků střední míru negativní korelace ($r = -0,352$), ale u genu *PDLIM4* byla zjištěna pozitivní korelace ($r = 0,790$) mezi metylací v promotoru a expresí tohoto genu. U nesortovaných patientských vzorků nebyla zjištěna významná korelace u žádného ze sledovaných genů.

U použitých myelomových buněčných linií KMS12-BM a KMS12-PE se demetylační účinek 5-aza-2'-deoxycytidinu a disulfiramů projevil obnovením nebo zvýšením exprese všech tří studovaných genů. Při námi zjištěné nízké expresi tumor-supresorového genu *GPX3*, u sortovaných i nesortovaných buněčných populací patientských vzorků, se nabízí jeho obnovená exprese jako možný potenciál při léčbě tohoto onemocnění.

8 Literatura

Adam Z., Maisnar V. (2008): Mnohočetný myelom: jak včas rozpoznat tuto nemoc a jak s ní žít: informace pro nemocné a jejich blízké (3. přepracované a doplněné vydání). Brno: Masarykova univerzita pro Českou myelomovou skupinu, ISBN 978-80-210-4680-1.

Adam Z., Klabusay M., Vorlíček J. (1997): Imunofenotyp buněk mnohočetného myelomu. *Klinická onkologie* 10: 174–179.

Adam Z., Vorlíček J. (2001): Hematologie 2, přehled maligních hematologických onemocnění. Praha: Grada publishing, spol. s. r. o., ISBN 80-247-0116-2.

Avet-Loiseau H., Facon T., Grosbois B., Magrangeas F., Rapp M.-J., Harousseau J.-L., Minvielle S., Bataille R. (2002): Oncogenesis of multiple myeloma: 14q32 and 13q chromosomal abnormalities are not randomly distributed, but correlate with natural history, immunological features, and clinical presentation. *Blood* 99: 2185–2191.

Balcárková J., Mlynářčiková M., Mičková P., Ščulda V., Bačovský J., Minařík J., Jarošová M. (2016): Analýza variantních nálezů počtu signálů při určení translokace t(4;14)(p16.3;q32.3) metodou FICTION u nemocných s mnohočetným myelomem. *Transfusiology* 22: 182–288.

Ballestar E. (2003): Methyl-CpG binfing proteins identify novel sites of epigenetic inactivation in human cancer. *The Embo Journal* 22: 6335–6345.

Bergsagel P. L., Kuehl W. M. (2001): Chromosome translocations in multiple myeloma. *Oncogene* 20: 5611–5622.

Bianchi G., Anderson K. C. (2014): Understanding biology to tackle the disease: Multiple myeloma from bench to bedside, and back. *A Cancer Journal for Clinicians* 64: 422–444.

Bird A. (2002): DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Gene and Development* 16: 6–21.

Boumber Y. A., Kondo Y., Chen X., Shen L., Gharibyan V., Konishi K., Estey E., Kantarjian H., Garcia-Manero G., Isaa J.-P. J. (2007): *RIL*, a LIM gene on 5q31 is silenced by methylation in cancer and sensitizes cancer cells to apoptosis. *Cancer Research* 67: 1997–2005.

Brüning A., Kast R. E. (2014): Oxidizing to death. *Cell Cycle* 13: 1513–1514.

Catley L., Weisberg E., Tai Y. T., Atadja P., Remiszewski S., Hideshima T., Mitsiades N., Shringarpure R., LeBlanc R., Chauhan D., Munshi N. C., Schlossman R., Richardson P., Griffin J., Anderson K. C. (2003): NVP-LAQ824 is a potent novel histone deacetylase inhibitor with significant activity against multiple myeloma. *Blood* 102: 2615–2622.

Čumová J., Burešová I., Kyjovská D., Vidláková P., Perutka T., Moravcová J., Rycová M., Hájek R., Kovářová L., Suská R., Penka M. (2008): Izolace plazmatických buněk. *Klinická onkologie* 21: 190–194.

Dai Z., Kosuri K., Otterson G. A. (2005): Mechanism of DNA demethylating drugs against cancer progression. In *DNA methylation, epigenetics and metastasis*, pp 243–267.

Dhodapkar M. V., Sanderson R. D. (2009): Syndecan-1 (CD138) in multiple myeloma and lymphoid malignancies: a multifunctional regulator of cell behavior within the tumor microenvironment. *Leukemia and Lymphoma* 34: 35–43.

Dib A., Gabrea A., Glebov O. K., Bergsagel P. L., Kuehl W. M. (2008): Characterization of MYC translocations in multiple myeloma cell lines. *Jnci Monographs* 2008: 25–31.

Dimopoulos K., Gimsing P., Grønbæk K. (2014): The role of epigenetics in the biology of multiple myeloma. *Blood Cancer Journal* 4: e207–e207.

Esteller M. (2009): *Epigenetics in biology and medicine*. CRC Press, Boca Raton, ISBN 0849372895.

Esteller M., Guo M., Moreno V., Peinado M. A., Capella G., Galm O., Baylin S. B., Herman J. G. (2002): Hypermethylation-associated inactivation of the *cellular retinol-binding-protein 1* gene in human cancer. *Cancer Research* 62: 5902–5905.

Fišerová S., Hájek R., Doubek M., Bulíková A., Bourková L., Banovská A., Vidláková P., Tůzová E., Mareschová E., Vorlíček J., Penka M. (2001): Imunomagnetická separace myelomových buněk. *Klinická onkologie* 14: 46–50.

Fonseca R., Bergsagel P. L., Drach J., Shaughnessy J., Gutierrez N., Stewart A. K., Morgan G., Van Ness B., Chesi M., Minvielle S., Neri A., Barlogie B., Kuehl W. M., Liebisch P., Davies F., Chen-Kiang S., Durie B. G. M., Carrasco R., Sezer O., Reiman T., Pilarski L., Avet-Loiseau H. (2009): International Myeloma Working Group molecular classification of multiple myeloma: spotlight review. *Leukemia* 23: 2210–2221.

Garand R., Avet-Loiseau H., Accard F., Moreau P., Harousseau J. L., Bataille R. (2003): T(11;14) and t(4;14) translocations correlated with mature lymphoplasmacytoid and immature morphology, respectively, in multiple myeloma. *Leukemia* 17: 2032–2035.

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

Grunstein M. (1997): Histone acetylation in chromatin structure and transcription. *Nature* 389: 349–352.

Hájek R., Krejčí M., Pour L., Adam Z. (2011): Multiple myeloma. *Klinická onkologie*, S10.

Hájek R., Plonková H., Gumulec J. (2013): Thalidomid v léčbě mnohočetného myelomu se zaměřením na kombinaci s bortezomibem. *Klinická Onkologie* 26: 163–169.

Halkidou K., Gaughan L., Cook S., Leung H. Y., Neal D. E., Robson C. N. (2004): Upregulation and nuclear recruitment of HDAC1 in hormone refractory prostate cancer. *The Prostate* 59: 177–189.

Hanamura I., Stewart J. P., Huang Y., Zhan F., Santra M., Sawyer J. R., Hollmig K., Zangari M., Pineda-Roman M., Van Rhee F., Cavallo F., Burington B., Crowley J., Tricot G., Barlogie B., Shaughnessy J. D. (2006): Frequent gain of chromosome band 1q21 in plasma-cell dyscrasias detected by fluorescence in situ hybridization: incidence increases from MGUS to relapsed myeloma and is related to prognosis and disease progression following tandem stem-cell transplantation. *Blood* 108: 1724–1732.

Heuck C. J., Mehta J., Bhagat T., Gundabolu K., Yu Y., Khan S., Chrysofakis G., Schinke C., Tariman J., Vickrey E., Pulliam N., Nischal S., Zhou L., Bhattacharyya S., Meagher R., Hu C., Maqbool S., Suzuki M., Parekh S., Reu F., Steidl U., Grealley J., Verma A., Singhal S. B. (2013): Myeloma is characterized by stage-specific alterations in DNA methylation that occur early during myelomagenesis. *The Journal of Immunology* 190: 2966–2975.

Holánek M., Hájek R. (2010): Použití lenalomidu v léčbě mnohočetného myelomu. *Klinická Onkologie* 23: 67–72.

Holčáková J. (2018): Effect of DNA methylation on the development of cancer. *Klinická onkologie* 31 (Suppl 2).

Hořejší V., Bartůňková J., Brdička T., Špišek R. (2017): *Základy imunologie*, 6. aktualizované vydání. Praha: Triton, ISBN: 978-80-7553-250-3.

Hoyer J. D., Hanson C. A., Fonseca R., Greipp P. R., Dewald G. W., Kurtin P. J. (2000): The (11;14)(q13;q32) translocation in multiple myeloma. *American Journal of Clinical Pathology* 113: 831–837.

Chen B., Rao X., House M. G., Nephew K. P., Cullen K. J., Guo Z. (2011): GPx3 promoter hypermethylation is a frequent event in human cancer and is associated with tumorigenesis and chemotherapy response. *Cancer Letters* 309: 37–45.

Chng W. J., Gonzalez-Paz N., Price-Troska T., Jacobus S., Rajkumar S. V., Oken M. M., Kyle R. A., Henderson K. J., Van Wier S., Greipp P., Van Ness B., Fonseca R. (2008): Clinical and biological significance of *RAS* mutations in multiple myeloma. *Leukemia* 22: 2280–2284.

Indrák K. (2014): *Hematologie a transfuzní lékařství*. Praha: Triton. Lékařské repetitorium, ISBN 978-80-7387-722-4.

Jelínek T., Všianská P., Hájek R. (2015): Monoklonální protilátky v léčbě mnohočetného myelomu. *Transfuze a Hematologie Dnes* 21: 74–83.

Jeong T. D., Park Ch. J., Shim H., Jang S., Chi H. S., Yoon D. H., Kim D. Y., Lee J. H., Lee J. H., Suh Ch., Lee K. H. (2012): Simplified flow cytometric immunophenotyping panel for multiple myeloma, CD56/CD19/CD138(CD38)/CD45, to differentiate neoplastic myeloma cells from reactive plasma cells. *The Korean Journal of Hematology* 47.

Jing Y., Zhang J., Bleiweiss I. J., Waxman S., Zelent A., Mira-Y-Lopez R. (1996): Defective expression of cellular retinol binding protein type 1 and retinoic acid receptors $\alpha 2$, $\beta 2$ and $\gamma 2$ in human breast cancer cells. *The FASEB Journal* 10: 1064–1070.

Jones P. A. (2012): Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nature Reviews Genetics* 13: 484–492.

Kaiser M. F., Johnson D. C., Wu P., Walker B. A., Brioli A., Mirabella F., Wardell C. P., Melchor L., Davies F. E., Morgan G. J. (2013): Global methylation analysis identifies prognostically important epigenetically inactivated tumor suppressor genes in multiple myeloma. *Blood* 122: 219–226.

Kaiser M. F., Zavrski I., Sterz J., Jakob C., Fleissner C., Kloetzel P. M., Sezer O., Heider U. (2006): The effect of the histone deacetylase inhibitor valproic acid on cell cycle, growth suppression and apoptosis in multiple myeloma. *Haematologica* 91: 248–251.

Kalakonda N., Rothwell D. G., Scarffe J. H., Norton J. D. (2001): Detection of N-ras codon 61 mutations in subpopulations of tumor cells in multiple myeloma at presentation. *Blood* 98: 1555–1560.

Kazandjian D. (2016): Multiple myeloma epidemiology and survival: A unique malignancy. *Seminars in Oncology* 43: 676 – 681.

Kuppumbatti Y. S., Bleiweiss I. J., Mandeli J. P., Waxman S., Mira-Y-Lopez R. (2000): Cellular retinol-binding protein expression and breast cancer. *Jnci:Journal of the National Cancer Institute* 92: 475–480.

Kyle R. A., Durie B. G. M., Rajkumar S. V., Landgren O., Blade J., Merlini G., Kröger N., Einsele H., Vesole D. H., Dimopoulos M., San Miguel J., Avet-Loiseau H., Hajek R., Chen W. M., Anderson K. C., Ludwig H., Sonneveld P., Pavlovsky S., Palumbo A., Richardson P. G., Barlogie B., Greipp P., Vescio R., Turesson I., Westin J., Boccadoro M. (2010): Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) and smoldering (asymptomatic) multiple myeloma: IMWG consensual perspectives risk factors for progression and guidelines for monitoring and management. *Leukemia* 24: 1121–1127.

Kyle R. A., Child J. A., Anderson K., Barlogie B., Bataille R., Bensinger W., Blade J., Boccadoro M., Dalton W., Dimopoulos M., Djulbegovic B., Drayson M., Durie B., Facon T., Fonseca R., Gahrton G., Greipp P., Harousseau J. L., Harrington D., Hussein M., Joshua D., Ludwig H., Morgan G., Oken M., Powles R., Richardson P., Roodman D., San Miguel J., Shimizu K., Shustik C., Sirohi B., Sonneveld P., Tricot G., Turesson I., Van Ness B., Vesole D., Weber D., Westin J., Wheatley K. (2003): Criteria for the classification of monoclonal gammopathies, multiple myeloma and related disorders: a report of the International Myeloma Working Group. *British Journal of Haematology* 121: 749–757.

Klincová M., Sandecká V., Mikuláiová A., Radocha J., Maisnar V., Hájek R. (2011): Monoclonal gammopathy of undetermined significance: introduction and current clinical issues. *Klinická onkologie* 24 Suppl, S14-S17.

Lin J., Haffner M. C., Zhang Y., Lee B. H., Brennen W. N., Britton J., Kachhap S. K., Shim J. S., Liu J. O., Nelson W. G., Yegnasubramanian S., Carducci M. A. (2011): Disulfiram in a DNA demethylating agent and inhibits prostate cancer cell growth. *The Prostate* 71: 333–343.

Lionetti M., Barbieri M., Manzoni M., Fabris S., Bandini C., Todoerti K., Nozza F., Rossi D., Musto P., Baldini L., Neri A. (2016): Molecular spectrum of *TP53* mutation in plasma cell dyscrasias by next generation sequencing: an Italian cohort study and overview of the literature. *Oncotarget* 7.

Liu G., Franssen E., Fitch M. I., Warner E. (1997): Patient preferences for oral versus intravenous palliative chemotherapy. *Journal of Clinical Oncology* 15: 110–115.

Luger K., Mäder A. W., Richmond R. K., Sargent D. F., Richmond T. J. (1997): Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* 389: 251–260.

Marango J., Shimoyama M., Nishio H., Meyer J. A., Min D. J., Sirulnik A., Martinez-Martinez Y., Chesi M., Bergsagel P. L., Zhou M. M., Wayman S., Leibovitch B. A., Walsh M. J., Licht J. D. (2008): The MMSET protein is a histone methyltransferase with characteristics of a transcriptional corepressor. *Blood* 111: 3145–3154.

Martinez-Garcia E., Popovic R., Min D. J., Sweet S. M. M., Thomas P. M., Zamdborg L., Heffner A., Will C., Lamy L., Staudt L. M., Levens D. L., Kelleher N. L., Licht J. D. (2011): The MMSET histone methyl transferase switches global histone methylation and alters gene expression in t(4;14) multiple myeloma cells. *Blood* 117: 211–220.

Michels T. C., Petersen K. E. (2017): Multiple myeloma: diagnosis and treatment. *American Family Physician* 95: 373–383.

Nan X., Ng H. H., 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.

Otová B., Kohoutová M., Panczak A. (2013): *Lékařská biologie a genetika*. Praha: Karolinum, ISBN 9788024624150.

Pawlyn C., Morgan G. J. (2017): Evolutionary biology of high-risk multiple myeloma. *Nature Reviews Cancer* 17: 543–556.

Pecka M. (2002): *Laboratorní hematologie v přehledu*. Český Těšín: Finidr, ISBN: 80-86682-00-5.

Pileri S. A., Stein H., Thiele J., Jaffe E. S., Swerlow S. H., Campo Güerri E., Harris N. L. (2017): WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues (Revised 4th edition). International Agency for Research on Cancer, ISBN 9789283244943.

Pospíšilová Š., Dvořáková D., Mayer J. (2013): Molekulární hematologie. Praha: Galén, ISBN 9788072629428.

Rajan A. M., Rajkumar S. V. (2015): Interpretation of cytogenetic results in multiple myeloma for clinical practice. *Blood Cancer Journal* 5: e365–e356.

Rajkumar S. V., Dimopoulos M. A., Palumbo A., Blade J., Merlini G., Mateos M. A., 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., Kenneth C., Durie B. G. M., Miguel J. F. S. (2014): International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. *The Lancet Oncology* 15: 538–548.

Russo V. E. A., Martinssen R. A., Riggs A. D. (1996): Epigenetic mechanism of gene regulation. Plainview N. Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sandecká V., Pour L., Adam Z., Krejší M., Štork M., Ševčíková S., Král Z. (2018): Monoklonální gamapatie nejasného významu (MGUS). *Klinická onkologie* 31: 270–276.

Sant M., Allemani C., Tereanu C., De Angelis R., Capocaccia R., Visser O., Marcos-Gragera R., Maynadié M., Simonetti A., Lutz J. M., Berrino F. (2010): Incidence of hematologic malignancies in Europe by morphologic subtype: results of the Haemacare project. *Blood* 116: 3724–3734.

Sasaki H., Moriyama S., Nakashima Y., Kobayashi Y., Kiriyama M., Fukai I., Yamakawa Y., Fujii Y. (2004): Histone deacetylase 1 mRNA expression in lung cancer. *Lung Cancer* 46: 171–178.

Sawyer J. R. (2011): The prognostic significance of cytogenetics and molecular profiling in multiple myeloma. *Cancer Genetics* 204: 3–12.

Sawyer J. R., Lukacs J. L., Munshi N., Desikan K. R., Singhal S., Mehta J., Siegel D., Shaughnessy J., Barlogie B. (1998): Identification of new norandom translocations in multiple myeloma with multicolor spectral karyotyping. *Blood* 92: 4269–4278.

Shapiro-Shelef M., Calame K. (2005): Regulation of plasma-cell development. *Nature Reviews Immunology* 5: 230–242.

Sharma A., Heuck C. J., Fazzari M. J., Mehta J., Singhal S., Grealley J. M., Verma A. (2010): DNA methylation alterations in multiple myeloma as a model for epigenetic changes in cancer. *Wiley Interdisciplinary reviews: Systems biology and medicine* 2: 654–669.

Shou Y., Martelli M. L., Gabrea A., Qi Y., Brents L. A., Roschke A., Dewald G., Kirsch I. R., Bergsagel P. L., Kuehl W. M. (2000): Diverse karyotypic abnormalities of the *c-myc* locus associated with *c-myc* dysregulation and tumor progression in multiple myeloma. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97: 228–233.

Sieta J., Weissman I. L. (2010): Hematopoietic stem cell: Self-renewal versus differentiation. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine* 2: 640–653.

Smith E. M., Boyd K., Davies F. E. (2010): The potential role of epigenetic therapy in multiple myeloma. *British Journal of Haematology* 148: 702–713.

Song J., Noh J. H., Lee J. H., Eun J. W., Ahn Y. M., Kim S. Y., Lee S. H., Park W. S., Yoo N. J., Lee J. Y., Nam S. W. (2005): Increased expression of histone deacetylase 2 is found in human gastric cancer. *Apmis* 113: 264–268.

Stec I., Wright T. J., Van Ommen G. J., De Boer P. A., Van Haeringen A., Moorman A. F., Altheer M. R., Den Dunnen J. T. (1998): *WHSC1* a 90 kb SET domain-containing gene, expressed in early development and homologous to a *Drosophila* dysmorphia gene maps in the Wolf-Hirschhorn syndrome critical region and is fused to *IgH* in t(4;14) multiple myeloma. *Human Molecular Genetics* 7: 1071–1082.

Šálek T. (2008): Laboratorní diagnostika mnohočetného myelomu. *Interní medicína pro praxi* 10: 407–409.

Štork M., Vaculová J., Pour L., Sandecká V., Adam Z., Krejší M., Král Z. (2017): Novinky v léčbě mnohočetného myelomu. *Interní medicína* 19: 20–22.

Villar-Garea A., Fraga M. F., Espada J., Esteller M. (2003): Procaine is a DNA-demethylating agent with growth-inhibitory effect in human cancer cells. *Cancer Research* 63: 4984–4989.

Vokurka S. (2010): Bortezomib v léčbě mnohočetného myelomu u pacientů po alogenní transplantaci krvetvorných buněk. *Klinická Onkologie* 23: 242–244.

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.

Wong K. Y., Chim C. S. (2015): DNA methylation of tumor suppressor protein-coding and non-coding genes in multiple myeloma. *Epigenomics* 7: 985–1001.

Wu L. P., Wang X., Li L., Zhao Y., Lu S., Yu Y., Zhou W., Liu X., Yang J., Zheng Z., Zhang H., Feng J., Yang Y., Wang H., Zhu W. G. (2008): Histone deacetylase inhibitor depsipeptide activates silenced genes through decreasing both CpG and H3k9 methylation on the promoter. *Molecular and Cellular Biology* 28: 3219–3235.

Xiong Y., Dowdy S. C., Podratz K. C., Jin F., Attewell J. R., Eberhardt N. L., Jiang S. W. (2005): Histone deacetylase inhibitors decrease DNA methyltransferase-3B messenger RNA stability and down-regulate *de novo* DNA methyltransferase activity in human endometrial cells. *Cancer Research* 65: 2684–2689.

Yoo C. B., Jones P. A. (2006): Erratum: Epigenetic therapy of cancer. *Nature Reviews Drug Discovery* 5: 170–170.

You J. S., Kang J. K., Lee E. K., Lee J. C., Lee S. H., Jeon Y. J., Koh D. H., Ahn S. H., Seo D. W., Lee H. Y., Cho E. J., Han J. W. (2008): Histone deacetylase inhibitor apicidin downregulates DNA methyltransferase 1 expression and induces repressive histone modifications via recruitment of corepressor complex to promoter region in human cervix cancer cells. *Oncogene* 27: 1376–1386.

Yu Y. P., Yu G., Tseng G., Cieply K., Nelson J., Defrances M., Zarnegar R., Michalopoulos G., Luo J. H. (2007): Glutathione peroxidase 3, deleted or methylated in prostate cancer, suppressed prostate cancer growth and metastasis. *Cancer Research* 67: 8043–8050.

Zhang Z., Yamashita H., Toyama T., Sugiura H., Omoto Y., Ando Y., Mita K., Hamaguchi M., Hayashi S. I., Iwase H. (2004): HDAC6 expression is correlated with better survival in breast cancer. *Clinical Cancer Research* 10: 6962–6968.

9 Přílohy

Příloha č. 1: Výsledky expresní analýzy pro geny *RBP1*, *GPX3* a *PDLIM4* u nesortovaných vzorků

Příloha č. 2: Výsledky expresní analýzy pro geny *RBP1*, *GPX3* a *PDLIM4* u sortovaných vzorků

Příloha č. 3: Výsledky expresní analýzy pro geny *RBP1*, *GPX3* a *PDLIM4* u buněčné linie KMS12-BM

Příloha č. 4: Výsledky expresní analýzy pro geny *RBP1*, *GPX3* a *PDLIM4* u buněčné linie KMS12-PE

Příloha č. 5: Výsledky pyrosekvenování pro geny *RBP1*, *GPX3* a *PDLIM4* u nesortovaných patientských vzorků

Příloha č. 6: Výsledky pyrosekvenování pro geny *RBP1*, *GPX3* a *PDLIM4* u sortovaných patientských vzorků

Příloha č. 7: Výsledky pyrosekvenování pro geny *RBP1*, *GPX3* a *PDLIM4* u buněčných linií a kontrol

Příloha č. 8: Data z nesortovaných patientských vzorků pro výpočet korelačního koeficientu

Příloha č. 9: Data ze sortovaných patientských vzorků pro výpočet korelačního koeficientu

Příloha č. 1: Výsledky expresní analýzy pro geny *RBPI*, *GPX3* a *PDLIM4* u nesortovaných vzorků

Vzorek	Ct <i>RBPI</i>	Ct <i>β2M</i>	$2^{-\Delta\Delta Ct}$	Ct <i>GPX3</i>	Ct <i>β2M</i>	$2^{-\Delta\Delta Ct}$	Ct <i>PDLIM4</i>	Ct <i>β2M</i>	$2^{-\Delta\Delta Ct}$
2013-07-17	34,61	27,88	58,1400	33,96	25,64	1,3830	31,80	26,03	32,6100
2013-10-08	37,28	25,75	1,2860	38,87	26,90	1,2930	39,02	26,63	0,8586
2013-10-09	35,62	26,38	5,7770	37,00	26,50	0,2375	33,85	26,50	32,4000
2013-10-10	35,41	23,19	0,4779	34,11	22,76	0,0794	32,65	22,94	1,6690
2013-10-22	27,14	23,62	294,6690	36,16	24,73	0,1680	25,54	24,84	5,951
2013-10-23a	38,85	27,49	1,4510	38,61	27,46	2,2790	37,67	27,72	1,6950
2013-11-04	37,95	27,52	2,4480	37,36	26,84	0,1412	37,59	26,87	1,0650
2013-11-18	28,73	19,51	5,6760	36,09	21,49	0,0187	28,01	20,85	31,8600
2014-01-22	31,86	23,13	8,0070	37,54	27,91	0,4879	29,63	24,71	66,5400
2014-03-12	39,00	25,50	0,3013	37,64	25,70	0,0874	36,96	26,29	1,0930
2014-03-19	34,24	24,06	5,6170	35,38	23,68	0,1398	30,44	23,69	18,7100
2014-03-27	33,68	22,37	2,5600	34,52	22,83	0,1397	31,06	22,34	4,7770
2014-03-31	35,22	24,47	1,9760	35,91	25,73	0,1781	36,93	26,94	1,7550
2014-05-07	35,92	27,99	17,7000	37,28	27,61	6,3450	35,32	26,17	5,5460
2014-05-20	36,79	27,21	5,9450	39,33	27,21	0,0785	38,04	27,21	3,5920
2014-06-17	36,68	25,04	1,2790	37,10	24,99	0,0871	36,93	25,04	1,2010
2014-06-20	38,33	27,10	1,7020	38,67	26,16	0,0591	39,16	27,22	0,8766

Modře jsou označeny vzorky, které byly vyřazeny ze statistických analýz (MGUS). Šedě jsou označeny exprese, které byly vyřazeny ze statistických analýz (hodnota exprese byla vyšší než 50).

Příloha č. 2: Výsledky expresní analýzy pro geny *RBPI*, *GPX3* a *PDLIM4* u sortovaných vzorků

Vzorek	Ct <i>RBPI</i>	Ct <i>β2M</i>	$2^{-\Delta\Delta Ct}$	Ct <i>GPX3</i>	Ct <i>β2M</i>	$2^{-\Delta\Delta Ct}$	Ct <i>PDLIM4</i>	Ct <i>β2M</i>	$2^{-\Delta\Delta Ct}$
2019-02-11	35,42	20,87	0,0893	32,78	20,79	0,0353	33,74	20,87	0,1417
2019-02-14	35,28	21,02	0,1088	32,13	20,85	0,0573	35,69	21,88	0,0006
2019-02-28	36,37	21,65	0,0790	34,13	21,58	0,0239	33,99	21,65	0,2026
2019-06-05	34,42	21,54	0,3165	32,30	21,54	0,1779	35,73	22,09	0,0688
2018-08-09	36,45	20,16	0,0187	36,48	20,92	0,2311	34,95	20,92	0,0005

Modře jsou označeny vzorky, které byly vyřazeny ze statistických analýz (MGUS)

Příloha č. 3: Výsledky expresní analýzy pro geny *RBPI*, *GPX3* a *PDLIM4* u buněčné linie KMS12-BM

Vzorek	Ct <i>RBPI</i>	Ct <i>β2M</i>	$2^{-\Delta\Delta Ct}$	Ct <i>GPX3</i>	Ct <i>β2M</i>	$2^{-\Delta\Delta Ct}$	Ct <i>PDLIM4</i>	Ct <i>β2M</i>	$2^{-\Delta\Delta Ct}$
KMS12-BM									
DMSO I	33,55	19,32	1,0000	37,24	19,84	1,0000	35,91	19,48	1,0000
DMSO II	32,67	18,44	1,0000	36,80	19,32	1,0000	37,93	19,64	1,0000
DMSO III	33,33	18,16	1,0000	-	-	-	36,33	20,02	1,0000
0,5 DAC I	33,68	19,24	0,8620	37,11	19,96	1,1950	35,07	19,28	1,5600
0,5 DAC II	33,29	18,64	0,7531	37,33	19,24	0,6522	37,92	20,43	1,7420
0,5 DAC III	33,74	18,76	1,1400	-	-	-	37,92	20,43	0,4435
0,2 DAC I	31,94	19,34	3,0780	34,87	20,12	6,2830	35,69	20,35	1,6870
0,2 DAC II	33,08	18,64	0,8726	35,12	19,34	3,2460	36,70	19,80	2,6200
0,2 DAC III	33,14	18,63	1,5840	-	-	-	36,65	19,80	1,9250
0,5 AZA I	33,69	19,57	1,0750	35,42	20,06	4,0990	35,91	19,50	1,0120
0,5 AZA II	33,27	19,37	1,2690	36,74	19,57	1,2420	37,20	20,28	0,4044
0,5 AZA III	33,25	18,35	1,2050	-	-	-	37,20	20,28	1,8320
0,2 AZA I	33,92	19,46	0,8540	35,32	19,67	3,3530	37,02	19,51	0,4746
0,2 AZA II	34,03	19,13	0,6307	35,27	19,46	3,1710	37,18	20,24	0,5551
0,2 AZA III	35,04	19,83	0,9759	-	-	-	36,00	20,69	0,9403
0,1 DSF I	32,42	20,11	3,7710	35,33	20,60	6,3200	34,75	21,04	6,0810
0,1 DSF II	33,81	20,80	2,3360	35,14	20,11	5,4210	35,67	21,04	8,9790
0,1 DSF III	33,82	19,91	2,3970	-	-	-	34,55	22,63	9,9090

Římské číslice I, II, III označují stejný vzorek ovlivněný stejnou metodou, ale v odlišném experimentu. DMSO – dimetylsulfoxid; 0,5 DAC – 0,5 μmol·l⁻¹ 5-aza-2'-deoxycytidin; 0,2 DAC – 0,2 μmol·l⁻¹ 5-aza-2'-deoxycytidin; 0,5 AZA – 0,5 μmol·l⁻¹ 5-azacytidin; 0,2 AZA – 0,2 μmol·l⁻¹ 5-azacytidin; 0,1 DSF – 0,1 μmol·l⁻¹ disulfiram

Příloha č. 4: Výsledky expresní analýzy pro geny *RBPI*, *GPX3* a *PDLIM4* u buněčné linie KMS12-PE

Vzorek	Ct <i>RBPI</i>	Ct <i>β2M</i>	$2^{-\Delta\Delta Ct}$	Ct <i>GPX3</i>	Ct <i>β2M</i>	$2^{-\Delta\Delta Ct}$	Ct <i>PDLIM4</i>	Ct <i>β2M</i>	$2^{-\Delta\Delta Ct}$
KMS12-PE									
DMSO I	35,55	20,91	1,0000	40,37	20,02	1,0000	36,70	20,58	1,000
DMSO II	35,11	20,42	1,0000	39,76	20,13	1,0000	36,29	20,05	1,000
DMSO III	32,51	18,26	1,0000	-	-	-	33,58	19,65	1,000
DMSO IV	33,07	17,93	1,0000	-	-	-	33,78	19,89	1,000
0,5 DAC I	33,41	20,55	3,4130	34,59	20,08	57,2700	36,60	20,10	0,7695
0,5 DAC II	33,10	20,50	4,2390	34,74	20,50	41,7270	36,52	20,25	0,9846
0,5 DAC III	31,08	18,54	3,2650	-	-	-	34,60	19,92	0,5923
0,5 DAC IV	31,55	18,61	4,6070	-	-	-	34,23	20,08	0,8357
0,2 DAC I	33,85	19,96	1,6730	35,70	20,19	28,8200	36,82	19,63	0,4774
0,2 DAC II	33,64	20,20	2,3750	35,73	20,20	17,0760	37,71	19,86	0,3271
0,2 DAC III	32,00	17,89	1,1030	-	-	-	36,46	19,10	0,0920
0,2 DAC IV	32,42	18,02	1,6700	-	-	-	35,78	19,65	0,2113
0,5 AZA I	35,32	20,69	0,6510	37,65	20,36	8,3970	36,35	20,49	1,1950
0,5 AZA II	34,58	20,72	1,7730	37,15	20,72	9,1430	38,90	20,31	0,1971
0,5 AZA III	33,24	19,45	1,3760	-	-	-	34,76	20,72	0,9177
0,5 AZA IV	33,89	19,86	1,7310	-	-	-	34,50	20,96	1,276
0,2 AZA I	35,06	20,12	0,8090	40,66	19,74	0,6750	36,34	19,82	0,7637
0,2 AZA II	35,72	21,77	1,6700	-	-	-	36,60	21,27	1,8910
0,2 AZA III	33,34	18,67	0,7492	-	-	-	34,84	19,74	0,4416
0,2 AZA IV	34,85	20,18	1,3840	-	-	-	37,85	21,20	1,2470
0,1 DSF I	36,45	23,83	4,0600	38,06	23,83	69,7290	38,27	24,34	3,1660
0,1 DSF II	35,79	25,05	15,390	41,38	25,05	9,7850	37,40	24,99	14,3800
0,1 DSF III	35,51	18,65	0,1639	-	-	-	36,17	20,49	0,2950
0,1 DSF IV	33,77	19,47	1,7930	-	-	-	34,15	20,71	12,4800

Římské číslice I, II, III a IV označují stejný vzorek ovlivněný stejnou metodou, ale v odlišném experimentu. DMSO – dimetylsulfoxid; 0,5 DAC – $0,5\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ 5-aza-2'-deoxycytidin; 0,2 DAC – $0,2\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ 5-aza-2'-deoxycytidin; 0,5 AZA – $0,5\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ 5-azacytidin; 0,2 AZA – $0,2\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ 5-azacytidin; 0,1 DSF – $0,1\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ disulfiram

Příloha č. 5: Výsledky pyrosekvenování pro geny *RBPI*, *GPX3* a *PDLIM4* u nesortovaných patientských vzorků

Vzorek	Průměrná metylace <i>RBPI</i> As10		Průměrná metylace <i>RBPI</i> As11		Průměrná metylace <i>RBPI</i> As12		Průměrná metylace <i>GPX3</i>		Průměrná metylace <i>PDLIM4</i>	
	1. duplikát	2. duplikát	1. duplikát	2. duplikát	1. duplikát	2. duplikát	1. duplikát	2. duplikát	1. duplikát	2. duplikát
	2013-07-17	5 %	5 %	5 %	5 %	7 %	17 %	21 %	15 %	34 %
2013-10-08	7 %	6 %	7 %	6 %	12 %	9 %	4 %	6 %	17 %	20 %
2013-10-09	5 %	5 %	4 %	4 %	3 %	2 %	4 %	4 %	14 %	13 %
2013-10-10	5 %	5 %	5 %	7 %	17 %	21 %	8 %	7 %	22 %	21 %
2013-10-22	6 %	4 %	4 %	4 %	6 %	6 %	5 %	12 %	15 %	15 %
2013-10-23a	5 %	5 %	4 %	9 %	4 %	12 %	17 %	10 %	15 %	19 %
2013-11-04	15 %	15 %	9 %	4 %	4 %	8 %	7 %	12 %	14 %	9 %
2013-11-18	11 %	8 %	8 %	8 %	12 %	7 %	10 %	8 %	14 %	16 %
2014-01-22	13 %	9 %	13 %	7 %	18 %	23 %	3 %	1 %	17 %	17 %
2014-03-12	12 %	10 %	2 %	4 %	-	-	7 %	3 %	12 %	12 %
2014-03-19	6 %	7 %	5 %	3 %	4 %	3 %	4 %	5 %	15 %	14 %
2014-03-27	2 %	5 %	5 %	4 %	8 %	10 %	6 %	4 %	32 %	32 %
2014-03-31	2 %	2 %	9 %	5 %	6 %	5 %	11 %	5 %	14 %	12 %
2014-05-07	6 %	4 %	4 %	2 %	6 %	3 %	7 %	6 %	13 %	14 %
2014-05-20	12 %	11 %	12 %	12 %	4 %	6 %	16 %	11 %	22 %	12 %
2014-06-17	4 %	3 %	3 %	7 %	5 %	13 %	5 %	6 %	18 %	22 %
2014-06-20	5 %	6 %	5 %	19 %	10 %	4 %	7 %	10 %	19 %	19 %

Modře jsou označeny vzorky, které byly vyřazeny ze statistických analýz (MGUS)

Příloha č. 6: Výsledky pyrosekvenování pro geny *RBPI*, *GPX3* a *PDLIM4* u sortovaných patientských vzorků

Vzorek	Průměrná metylace <i>RBPI</i> As10		Průměrná metylace <i>RBPI</i> As11		Průměrná metylace <i>RBPI</i> As12		Průměrná metylace <i>GPX3</i>		Průměrná metylace <i>PDLIM4</i>	
	1. duplikát	2. duplikát	1. duplikát	2. duplikát	1. duplikát	2. duplikát	1. duplikát	2. duplikát	1. duplikát	2. duplikát
	2019-02-11	1 %	2 %	6 %	-	11 %	-	1 %	6 %	19 %
2019-02-14	6 %	1 %	2 %	5 %	10 %	14 %	4 %	2 %	18 %	10 %
2019-02-28	11 %	21 %	16 %	9 %	-	-	20 %	30 %	36 %	24 %
2019-06-05	8 %	2 %	4 %	3 %	2 %	3 %	5 %	4 %	15 %	17 %
2018-08-09	2 %	6 %	4 %	5 %	14 %	7 %	3 %	3 %	20 %	15 %

Modře jsou označeny vzorky, které byly vyřazeny ze statistických analýz (MGUS)

Příloha č. 7: Výsledky pyrosekvenování pro geny *RBPI*, *GPX3* a *PDLIM4* u buněčných linií a kontrol

Vzorek	Průměrná metylace <i>RBPI</i> As10		Průměrná metylace <i>RBPI</i> As11		Průměrná metylace <i>RBPI</i> As12		Průměrná metylace <i>GPX3</i>		Průměrná metylace <i>PDLIM4</i>	
	1. duplikát	2. duplikát	1. duplikát	2. duplikát	1. duplikát	2. duplikát	1. duplikát	2. duplikát	1. duplikát	2. duplikát
KMS12-BM										
DMSO	69 %	69 %	60 %	59 %	79 %	78 %	89 %	90 %	76 %	81 %
0,5 DAC	29 %	32 %	45 %	46 %	51 %	48 %	64 %	62 %	64 %	64 %
0,2 DAC	33 %	34 %	47 %	47 %	49 %	51 %	74 %	72 %	73 %	69 %
0,5 AZA	37 %	43 %	55 %	55 %	62 %	69 %	82 %	84 %	78 %	79 %
0,2 AZA	63 %	63 %	52 %	57 %	77 %	77 %	89 %	86 %	62 %	58 %
0,1 DSF	61 %	64 %	59 %	59 %	80 %	75 %	93 %	93 %	81 %	84 %
KMS12-PE										
DMSO	81 %	91 %	73 %	70 %	73 %	83 %	80 %	73 %	79 %	84 %
0,5 DAC	70 %	74 %	30 %	39 %	55 %	45 %	63 %	54 %	70 %	62 %
0,2 DAC	75 %	72 %	43 %	39 %	57 %	47 %	75 %	72 %	67 %	65 %
0,5 AZA	64 %	71 %	36 %	39 %	52 %	60 %	61 %	65 %	73 %	70 %
0,2 AZA	69 %	61 %	36 %	43 %	53 %	61 %	63 %	62 %	46 %	54 %
0,1 DSF	80 %	80 %	48 %	49 %	87 %	80 %	68 %	77 %	79 %	77 %
Kontroly										
Metylovaná	77 %	79 %	79 %	78 %	78 %	80 %	87 %	90 %	82 %	84 %
Nemetylovaná	3 %	5 %	4 %	6 %	3 %	3 %	4 %	6 %	2 %	6 %

DMSO – dimetylsulfoxid; 0,5 DAC – 0,5 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ 5-aza-2'-deoxycytidin; 0,2 DAC – 0,2 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ 5-aza-2'-deoxycytidin; 0,5 AZA – 0,5 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ 5-azacytidin; 0,2 AZA – 0,2 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ 5-azacytidin; 0,1 DSF - 0,1 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ disulfiram

Příloha č. 8: Data z nesortovaných patientských vzorků pro výpočet korelačního koeficientu

Vzorek	Data pro gen <i>RBPI</i>				Data pro gen <i>GPX3</i>		Data pro gen <i>PDLIM4</i>	
	Exprese	Metylace As10	Metylace As11	Metylace As12	Exprese	Metylace	Exprese	Metylace
2013-07-17	-	-	-	-	1,3830	21	32,6100	34
	-	-	-	-	1,3830	15	32,6100	33
2013-10-08	1,2860	7	7	12	1,2930	4	0,8586	17
	1,2860	6	6	9	1,2930	6	0,8586	20
2013-10-10	0,4799	5	5	17	0,0794	8	1,6690	22
	0,4799	5	7	21	0,0794	7	1,6690	21
2013-10-22	-	-	-	-	0,1680	5	5,951	15
	-	-	-	-	0,1680	12	5,951	15
2013-10-23a	1,4510	5	4	4	2,2790	17	1,6950	15
	1,4510	5	9	12	2,2790	10	1,6950	19
2013-11-04	2,4480	15	9	4	0,1412	7	1,0650	14
	2,4480	15	4	8	0,1412	12	1,0650	9
2013-11-18	5,6760	11	8	12	0,0187	10	31,8600	14
	5,6760	8	8	7	0,0187	8	31,8600	16
2014-01-22	8,0070	13	13	18	0,4879	3	-	-
	8,0070	9	7	23	0,4879	1	-	-
2014-03-19	5,6170	6	5	4	0,1398	4	18,7100	15
	5,6170	7	3	3	0,1398	5	18,7100	14
2014-03-27	2,5600	2	5	8	0,1397	6	4,7770	32
	2,5600	5	4	10	0,1397	4	4,7770	32
2014-03-31	1,9760	2	9	6	0,1781	11	1,7550	14
	1,9760	2	5	5	0,1781	5	1,7550	12
2014-05-07	17,7000	6	4	6	6,3450	7	5,5460	13
	17,7000	4	2	3	6,3450	6	5,5460	14

Příloha č. 8 – pokračování

Vzorek	Data pro gen <i>RBPI</i>				Data pro gen <i>GPX3</i>		Data pro gen <i>PDLIM4</i>	
	Exprese	Metylace As10	Metylace As11	Metylace As12	Exprese	Metylace	Exprese	Metylace
2014-05-20	5,9450	12	12	4	0,0785	16	3,5920	22
	5,9450	11	12	6	0,0785	11	3,5920	12
2014-06-17	1,2790	4	3	5	0,0871	5	1,2010	18
	1,2790	3	7	13	0,0871	6	1,2010	22
2014-06-20	1,7020	5	5	10	0,0591	7	0,8766	19
	1,7020	6	19	4	0,0591	10	0,8766	19
Korelační koeficient (r)	-	0,140	-0,147	-0,162	-	0,054	-	0,284
		r = -0,068 pro všechny 3 oblasti						

Příloha č. 9: Data ze sortovaných patientských vzorků pro výpočet korelačního koeficientu

Vzorek	Data pro gen <i>RBPI</i>				Data pro gen <i>GPX3</i>		Data pro gen <i>PDLIM4</i>	
	Exprese	Metylace As10	Metylace As11	Metylace As12	Exprese	Metylace	Exprese	Metylace
2019-02-14	0,1088	6	2	10	0,0573	4	0,0006	18
	0,1088	1	5	14	0,0573	2	0,0006	10
2019-02-28	0,0790	11	16	-	0,0239	20	0,2026	36
	0,0790	21	9	-	0,0239	30	0,2026	24
2019-06-05	0,3165	8	4	2	0,1779	5	0,0688	15
	0,3165	2	3	3	0,1779	4	0,0688	17
2018-08-09	0,0187	2	4	14	0,2311	3	0,0005	20
	0,0187	6	5	7	0,2311	3	0,0005	15
Korelační koeficient (r)	-	-0,154	-0,304	0,207	-	-0,635	-	0,790
		r = -0,352 pro všechny 3 oblasti						