

Univerzita Palackého v Olomouci

Diplomová práce

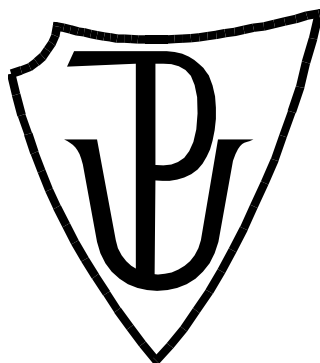
Olomouc 2015

Bc. Kateřina Sikorová

Univerzita Palackého v Olomouci

Přírodovědecká fakulta

Katedra buněčné biologie a genetiky



**Kvantifikace metylací metodou pyrosekvenování u
hemato-onkologických onemocnění**

Diplomová práce

Bc. Kateřina Sikorová

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2015

Vedoucí práce: Ing. Kateřina Smešný Trtková, CSc.

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem tuto práci na téma Kvantifikace metylací metodou pyrosekvenování u hemato-onkologických onemocnění zpracovala samostatně během svého bakalářského studia, s použitím uvedených literárních zdrojů pod vedením Ing. Kateřiny Smešný Trtkové, CSc.,

V Olomouci dne _ _ _ _ _

_ _ _ _ _

Poděkování:

Ráda bych poděkovala vedoucí práce, Ing. Kateřině Smešný Trtkové, CSc., za cenné rady a ochotu při vypracovávání diplomové práce. Laboratoři molekulární patologie a jejím zaměstnancům za přístup, přátelské prostředí a poskytnutí prostor, přístrojů a prostředků pro vykonání praktické části mé diplomové práce.

Souhrn

Hemato-onkologická onemocnění, mezi které se řadí akutní myeloidní leukemie a myelodysplastický syndrom jsou velmi častými maligními onemocněními. U myelodysplastického syndromu se jedná spíše o jakousi formu prekancerózy, která v mnohých případech progreduje právě v akutní myeloidní leukemii. Diagnóza těchto onemocnění je založena na vyšetření kostní dřeně, což je značně invazivní vyšetření. Proto je snaha o nalezení vhodných markerů, jejichž hodnoty by byly dostatečně prokazatelné i ze vzorků periferní krve a mohly by přispět ke zpřesnění nebo urychlení diagnostiky MDS. Dalším důvodem pro detekci metylačních změn u myelodysplastického syndromu je nedávné zavedení léčby pomocí demetylačních látek u tohoto onemocnění.

V rámci diplomové práce byly analyzovány promotorové úseky potenciálního tumor-supresorového genu *RIL*, genu pro inhibitor cyklin-dependentních kináz 2B (*CDKN2B*) *p15*, genu *BLU*, který je důležitý v procesu apoptózy a u genu *RASSF1*, u kterého se předpokládají změny exprese v nádorových onemocněních v důsledku hypermetylace (Boumber *et al.*, 2007; Park *et al.*, 2013).

Pro analýzu jsme použili jak běžně používanou metodu metylačně specifická PCR, tak metodu pyrosekvenování. Pyrosekvenování umožňuje kvantifikaci metylací a odstraňuje možnou chybu, která vzniká při bisulfitové konverzi DNA. Výsledky pyrosekvenování byly ve vybraných případech porovnány s expresí příslušného genu.

Výsledky naznačují, že pyrosekvenování je daleko přesnější a citlivější metodický postup než klasická metoda metylačně specifická PCR. Metylační změny genů *BLU* a *RASSF1* zjištěné u pacientů s MDS jsou minimální při porovnání s výsledky získanými od zdravého jedince. U sledovaných úseků genů *p15* a *RIL* jsme detekovali významné metylační změny v porovnání se zdravým jedincem. Následná expresní analýza genu *RIL*, ukazuje na možnou korelaci mezi metylací promotorové oblasti tohoto genu a jeho expresí. Geny *p15* a především *RIL* by mohly být v budoucnu využity jak pro diagnostiku MDS a AML tak i pro určení prognózy u pacientů s MDS.

Summary

Hemato-oncological diseases like acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome, are very often malignant diseases. Myelodysplastic syndrome is rather the precancerous stage which in many cases progresses to acute myeloid leukemia. Diagnostic of this diseases is based on an examination of the bone marrow, which is very invasive examination. Because of this, efforts are focused on finding new suitable markers provided for of the peripheral blood samples contributing to specification and speeding of the MDS diagnosis. Another reason for DNA methylation detection in the myelodysplastic syndrome patients, is a new approach to the treatment based on applying of demethylation agents.

In this thesis, we analyzed promoter region of the potential tumor-suppressor gene *RIL*, the inhibitor of cyclin dependent kinase 2B (*CDKN2B*) *p15*, *BLU* gene with an important function for apoptosis and *RASSF1* gene in which is assumed an change of the expression in some types of tumors caused by its hypermethylation (Park *et al.*, 2013; Boumber *et al.*, 2007).

For methylation analysis we used Methylation specific PCR and following method of pyrosequencing. Pyrosequencing enables quantification of specific methylation and removes possible errors caused by the bisulfite modification of DNA. Our results from pyrosequencing analysis were comparable with MSP detection of the obtained PCR products.

Our results indicate that pyrosequencing is more accurate and sensitive methodical approach than methylation specific PCR. DNA methylation in the *BLU* and *RASSF1* genes detected in MDS patients comparable with healthy person was insignificant. In the genes *p15* and *RIL*, we detected significant changes of the methylation level by comparison with healthy control. Following expression analysis of the *RIL* gene showed possible correlation between promoter methylation level of this gene and his expression level. Finally, the *p15* and even more the *RIL* genes could be useful markers for diagnosis of the MDS and AML diseases as well as for the MDS prognosis.

Obsah

1	Úvod	1
2	Cíl práce.....	2
3	Literární přehled	3
3.1	Hematopoéza	3
3.2	Nádorová onemocnění krve	4
3.2.1	<i>Myelodysplastický syndrom (MDS)</i>	4
3.2.1.1	Klasifikace a diagnostika	5
3.2.1.2	Léčba MDS	7
3.2.2	<i>Akutní myeloidní leukemie (AML)</i>	8
3.2.2.1	Klasifikace a diagnostika	9
3.2.2.2	Léčba.....	11
3.3	Biomarkery hemato-onkologických onemocnění	11
3.3.1	<i>RIL</i>	13
3.3.2	<i>RASSF1</i>	14
3.3.3	<i>BLU</i>	15
3.3.4	<i>p15</i>	17
3.4	Epigenetické modifikace.....	17
4	Materiál a metodika	20
4.1	Přístroje a pomůcky	20
4.2	Chemikálie a roztoky	21
4.3	Biologický materiál.....	21
4.4	Bisulfitová modifikace DNA	22
4.5	Metylačně specifická PCR.....	23
4.6	Elektroforetická separace v agarózovém gelu	25
4.7	Pyrosekvenování.....	25
4.8	Izolace RNA z krve.....	27
4.9	Reverzní transkripce	28
4.10	Real-time PCR	28
5	Výsledky.....	31
5.1	Analýza metylačně specifickou PCR.....	31

5.2	Pyrosekvenování	33
5.3	Expresní analýza	38
6	Diskuze	39
7	Závěr	42
8	Seznam použitých zkratk	43
9	Seznam použité literatury	47

1 Úvod

Hemato-onkologická onemocnění jsou velmi častým maligním onemocněním. Mezi tato onemocnění můžeme zařadit myelodysplastický syndrom (MDS) a akutní myeloidní leukemii (AML). Myelodysplastický syndrom je soubor onemocnění, která jsou charakteristická klonální poruchou krvetvorby. Tato onemocnění se vyskytují především u starších pacientů, jejichž věkový medián se pohybuje kolem 65 let (Aul *et al.*, 2001). U pacientů s myelodysplastickým syndromem dochází velmi často k progresi onemocnění v akutní myeloidní leukemii. Myelodysplastický syndrom i akutní myeloidní leukemie jsou diagnostikovány na základě vyšetření kostní dřeně. Úspěšnost léčby závisí z velké části na věku pacienta, jediným léčebným přístupem je alogenní transplantace, která je u starších pacientů možná jen zřídka. V poslední době se uplatňuje léčba MDS pomocí hypometylačních preparátů, ale tento způsob nevede vždy ke zlepšení stavu pacienta (Koreth *et al.*, 2013). Z tohoto důvodu je důležité identifikovat geny, které mohou být u pacientů s myelodysplastickým syndromem ovlivněny metylací, a u kterých by mohlo působením demetylačních látek docházet k požadovaným změnám v jejich expresi.

Metylace také plní důležitou úlohu v tumorigenezi hemato-onkologických onemocnění (Ko *et al.*, 2010; Figueroa *et al.*, 2010) a mohly by být vhodnými molekulárními markery pro diagnostiku těchto onemocnění z periferní krve, bez potřeby vyšetření kostní dřeně. Tumor-supresorové geny *RIL*, *BLU*, *RASSF1* a *p15* jsou kandidáty, jak na cílové geny metylační léčby, tak právě na možné biomarkery těchto hemato-onkologických onemocnění (Boumber *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2012; Dammann *et al.*, 2000; Hirai, 2003).

Metylace jsou v dnešní době detekovány především pomocí metody MSP (Methylation Specific PCR). Metylační analýza pomocí pyrosekvenování poskytuje nejen komplexní informaci o úrovni metylace v daném analyzovaném úseku, ale umožňuje analýzu metylace u jednotlivých CpG dinukleotidů (Quillien *et al.*, 2012).

2 Cíl práce

- Za použití odborné literatury vypracovat literární rešerši na téma kvantifikace metylací metodou pyrosekvenování u hemato-onkologických onemocnění.
- Provedení bisulfitové modifikace DNA u vzorků získaných od pacientů s hemato-onkologickými diagnózami a provedení metylačně specifické PCR genu *p15* a dalších vybraných tumor-supresorových genů.
- Navržení primerů, pro pyrosekvenační analýzu, do promotorových úseku či do kodujícího úseku 1 exonu.
- Provedení specifické PCR pro pyrosekvenační analýzu, s biotinem označenými primery. Provedení pyrosekvenační analýzy metylací.
- Reverzní transkripce a expresní analýza pomocí real-time PCR vybraných genů, u kterých byla provedena MSP a kvantifikace metylací metodou pyrosekvenování.

3 Literární přehled

3.1 Hematopoéza

Hematopoéza (krvetvorba) je proces, během kterého dochází ke vzniku krevních buněk. Tento proces je značně složitý a jeho detaily nejsou stále přesně prostudovány. Hematopoézu můžeme rozdělit na prenatální a postnatální, kdy se tyto dvě formy odlišují, jak místem, kde primárně probíhají, tak způsobem tvorby krevních buněk.

Obrázek č. 1: Schéma průběhu hematopoézy, převzato a upraveno z www.ebioscience.com



Postnatální křvetvorba probíhá především v kostní dřeni, kde dochází k produkci křvetvorných buněk. Jejich základem je mateřská pluripotentní buňka, která má schopnost sebe obnovy. Z této pluripotentní buňky následně vzniká dlouhodobá kultura křvetvorných buněk, která je schopna nepřetržitě sebe obnovy. Kulturey křvetvorných buněk pak dávají za vznik prekurzorům jednotlivých řad. (Passegue *et al.*, 2003) V tomto bodě dochází k rozdělení hematopoézy na myelopoézu a lymfopoézu. Buňky myelopoézy mají svůj původ ve vlastní mateřské kmenové buňce označované CFU-GEMM podle křvetvorných elementů, které z ní vznikají. Během zrání buněk myeloidní řady dochází ke ztrátě bazofily cytoplazmy a

v cytoplazmě se objevují specifická granula. Tato linie se dále dělí na červenou a bílou složku. (Pecka, 2002). Další generace je ve své diferenciaci více specifická. Vznikají z ní funkční dospělé buňky. V lymfoidní linii dochází diferenciací a zráním ke vzniku lymfocytů. Konečným produktem zrání jsou v této řadě T- lymfocyty, B- lymfocyty a NK buňky. V myeloidní linii vznikají eozinofily, bazofily, trombocyty, makrofágy, neutrofilové a erytrocyty (Iwasaki *et al.*, 2007). V kostní dřeni se nacházejí u zdravého člověka zásoby jak buněk červené složky- erytrocytů, tak buněk bílé krevní složky, které jsou v různém stádiu vývoje. U bílé složky jsou pak tyto zásoby buněk i v periferní krvi (Pecka, 2002) (viz **Obr. č. 1**).

3.2 Nádorová onemocnění krve

Buňky krvetvorby jsou schopné neustále proliferace. Tato vlastnost zůstává i při jejich zvrátě v tumorigenní leukemické buňky (Passegue *et al.*, 2003). Touto cestou dochází k hromadění aberací hematopoetických buněk v kostní dřeni. Následně dochází k vyplavování nezralých krevních elementů do periferní krve, kde takto narůstá procento blastů. Tento jev můžeme pozorovat například u leukémií, polycytémií či těžkých anemií (Pecka *et al.*, 2002). Pozměněné krevní buňky se mohou také usazovat v lymfatických uzlinách, způsobovat jejich zvětšení a tvořit v tomto případě už viditelný nádor. Nádorově transformované hematopoetické buňky tvoří značně heterogenní populaci. Tato heterogenita je způsobena právě neustále probíhající mutagenezí, epigenetickými změnami a dalšími aberacemi (Passegue *et al.*, 2003). Zatímco u některých buněk dochází k nepřetržitému dělení, jiné zůstávají v klidovém stádiu, což může být důvodem případné rezistence nádorového onemocnění ve vztahu k chemoterapeutikům (Guan *et al.*, 2000).

3.2.1 Myelodysplastický syndrom (MDS)

Myelodysplastický syndrom je skupina onemocnění vyznačujících se klonální poruchou krvetvorby. Kostní dřev neprodukuje dostatek zralých blastů, dochází k cytopenii a dysplazii. Toto onemocnění je smrtelné pouze v případě zvýšené krvácivosti, nebo pokud dojde ke ztrátě imunity (Mufti, 2004). Častěji ovšem MDS progreduje do akutní myeloidní leukémie. Akutní

myeloidní leukémie je nádorovým onemocněním krve a bývá ve velkém množství případů smrtelná.

Výskyt MDS začíná prudce stoupat u osob ve věku kolem 65 let a postižených je 2 - 12 obyvatel na 100 000 obyvatel za rok (Aul *et al.*, 2001). Častěji se toto onemocnění vyskytuje u mužů. Výjimkou je subtyp 5q- syndrom. Obecně se jedná o typ s poměrně dobrou prognózou (viz **Tab. č. 1**), který je častější u žen (Aul *et al.*, 2001, Van Den Berghe *et Michaux*, 1997). 5q- syndrom je samostatnou kategorií MDS, kdy dochází k delecím v oblasti dlouhých ramen chromozómu 5, kde se nacházejí geny, jejichž ztráta může vést k následné dysplazii a chromozomální nestabilitě genomu (Jerez, 2012).

Velice ojediněle se MDS vyskytuje i u dětí a zde je většinou spojeno s genetickými poruchami (Mufti, 2004).

3.2.1.1 Klasifikace a diagnostika

Podle příčiny vzniku se onemocnění myelodysplastického syndromu dělí na primární a sekundární. Ve většině případů se vyskytuje primární MDS – onemocnění vzniká *de novo*. Případy sekundárního MDS byly pozorovány u lidí vystavených dlouhodobému působení benzenu, alkylačních činidel či ionizačnímu záření. Sekundární MDS se také často vyskytuje u onkologických pacientů jako následek ozařování či chemoterapie (Mufti, 2004).

Pro určení diagnózy byla používána především klasifikace FAB a v současné době se používá klasifikace WHO. Klasifikace onemocnění MDS podle FAB byla založena především na zjištěném počtu blastů u jednotlivých pacientů (Mufti *et al.*, 2008). Klasifikace WHO zohledňuje cytogenetické faktory, markery získané vyšetřením krve a jako samostatný definuje i 5q- syndrom (Jonas *et Greenberg*, 2014) (viz **Tab. č. 1**).

Prognóza pacientů, od které se odvíjí následná léčba, se stanovuje podle tzv. skóre IPSS. Skóre IPSS (*International Prognostic Scoring System*) hodnotí procento blastů, cytopenii a karyotyp. U karyotypu je hodnoceno množství abnormalit, především pak přítomnost delece na dlouhých ramenech chromozómu 5, vzácná submikroskopická delece 20q a mutace na chromozómu 7. Na základě těchto skutečností se stanoví skóre IPSS, podle něhož pak dělíme pacienty do čtyř skupin. Při nízkém skóre IPSS má pacient nejvyšší šance na přežití. Následují skupiny int-1a int-2 až po skupinu s vysokým skórem IPSS, kdy je přežití pacienta většinou nižší než půl roku (Greenberg *et al.*, 1997).

Tabulka č. 1: WHO klasifikace MDS, převzato a upraveno z Vardiman *et al.*, 2009

Typ MDS	Nález při vyšetření krve	Nález při vyšetření kostní dřeně
Refraktorní cytopenie s unilineární dysplasií (RCUD)	Unicytopenie nebo bicytopenie blasty < 1%	Unilineární dysplasie : $\geq 10\%$ buněk jedné myeloidní linie < 5% blastů < 15% erythroidních preurzorů, jsou prstenčité sideroblasty
Refraktorní anemie s prstenčitými sideroblasty (RARS)	Anémie žádné blasty	$\geq 15\%$ erythroidních prekurzorů jsou prstenčité sideroblasty Erythroidní dysplasie < 5% blastů
Refraktorní cytopenie s multilineární dysplasií (RCMD)	Cytopenie Blasty < 1% nejsou Auerovy tyče < $1 \times 10^9/l$ monocytů	Dysplasie u $\geq 10\%$ buněk v ≥ 2 myeloidních liniích (neutrophily nebo erythroidní prekurzory nebo megakaryocyty) < 5% blastů nejsou Auerovy tyče $\pm 15\%$ prstenčitých sideroblastů
Refraktorní anemie s přebytkem blastů-1 (RAEB-1)	Cytopenie < 5% blastů nejsou Auerovy tyče < $1 \times 10^9/l$ monocytů	Unilineární nebo multilineární dysplasie 5%-9% blastů nejsou Auerovy tyče
Refraktorní anemie s přebytkem blastů-2 (RAEB-2)	Cytopenie 5%-19% blastů Auerovy tyče < $1 \times 10^9/l$ monocytů	Unilineární nebo multilineární dysplasie 10%-19% blastů Auerovy tyče
Myelodysplastický syndrom, neklasifikovaný (MDS-U)	Cytopenie < 1% blastů	Jednolineární granulocytární nebo megakaryocytární dysplazie < 5% blastů Auerovy tyče
MDS asociovaný s izolovanou 5q-	Anémie Normalní či zvýšené destičky blasty (< 1%)	Normalní či zvýšené megakaryocyty s hypolobulovanými jádry < 5% blastů izolovaná 5q- cytogenetické abnormality nejsou Auerovy tyče

Prvním krokem při diagnostice myeloidního nádoru je vyšetření periferní krve a určení přítomnosti cytopenie (snížení počtu krevních elementů v krvi). Pokud není zjištěna žádná jiná primární příčina cytopenie, následuje odběr kostní dřeně. Při cytologickém vyšetření aspirátů

kostní dřeně se hodnotí morfologie buněk, výskyt cytogenetických abnormalit a počet blastů, tedy přítomnost nezralých buněk v kostní dřeni (Platzbecker *et al.*, 2012). Výskyt blastů, je jedním z kritérií při diagnostice myelodysplastického syndromu, který udává podle klasifikace WHO hranici mezi MDS a AML. Akutní myeloidní leukémie je diagnostikována při stanoveném počtu blastů vyšším než 20%.

Při cytologickém vyšetření kostní dřeně se hodnotí morfologie buněk a jejich zrání a také se sestavuje karyotyp. K diagnostice onemocnění MDS se využívá také stanovení specifických mutací u genů *JAK2*, *NRAS*, *KRAS*. Pro posouzení účinnosti léčby a určení jejího dalšího postupu jsou prováděny opakované odběry a vyšetření (Vardiman *et al.*, 2009).

Je známo, že průběh onemocnění je ovlivněn sekundárními mutacemi, genetickou haploinsuficiencí, tedy přítomností jediné funkční alely genu v diploidním organismu, a také epigenetickými změnami (Tefferi, 2010). V současné době dochází k rozvoji mnoha dalších technologií, které by mohly přispět k upřesnění diagnostiky MDS. Jedná se například o genové expresní analýzy nebo analýzy genů za využití sekvenačních technologií nové generace (NGS). Zařazení těchto přístupů do standartní diagnostiky je limitující vzhledem k velkým nákladům na provedení velkého množství vzorků a také nedostatečnému porozumění patogenezi MDS na molekulární úrovni (Platzbecker *et al.*, 2012).

3.2.1.2 Léčba MDS

Jediným plně léčebným přístupem k MDS je v současné době alogenní transplantace hematopoetických kmenových buněk. Jiná léčba než transplantace má nízkou úspěšnost a odpověď není trvalá. Pacienti s vysokým skóre IPSS, tedy pacienti z velmi rizikové skupiny, mají vysokou pravděpodobnost, že jejich MDS přejde do akutní myeloidní leukémie. Přestože transplantace krve či kostní dřeně může MDS vyléčit, lze tento postup použít pouze pro malé procento pacientů, a to vzhledem k často pokročilému věku a nedostatku vhodných dárců. K transplantaci se přistupuje, ale jen v případě, kdy je pacient podle skóre IPSS řazen do skupiny int-2 a skupiny s vysokým rizikem (Koreth *et al.*, 2013). Před transplantací je pacientům často podávána chemoterapie (Cytarabin, mitoxantrone), která může zvýšit úspěšnost léčby a především snížit pravděpodobnost návratu onemocnění (Witte *et al.*, 2001).

Léčba hypometylačními preparáty je novým trendem v terapii MDS. Je používána jak k překonání období před transplantací, tak i v případě, kdy není u těchto skupin transplantace možná, což z důvodu vysokého věku většiny pacientů, není výjimkou. Metylační léčba

azacytidinem (**Obr. č. 2**) u těchto pacientů prodlužuje přežití a snižuje riziko progresu v AML (Koreth *et al.*, 2013). Azacytidin byl oficiálně pro léčbu MDS schválen v roce 2004 (komerční označení Vidáza). V roce 2006 byl schválen pro léčbu deoxynukleotidový analog Azacytidinu, Decitabin. Jeho účinkem dochází k zlepšení krevního obrazu a snížení procenta blastů (Steensma *et al.*, 2009).

Pacienti zařazení do skupin s nízkým a středním rizikem jsou většinou léčeni podpůrnou terapií. Transplantace není díky své rizikovosti u těchto pacientů vhodným řešením (Koreth *et al.*, 2013). Podpůrná léčba se skládá s léčby jednotlivých příznaků MDS. Při anémii a trombocypenii jsou pacienti léčeni transfúzcemi které doplňují hladinu erytrocytů či krevních destiček a tak dále (Bejar, 2014). Časté krevní transfúze, které jsou u těchto pacientů potřeba, ovšem mohou způsobit přesycení organismu železem, což vyvolává kardiovaskulární obtíže zvyšující úmrtnost. Proto je snaha o kompenzaci chelatační léčbou, která přináší lehký posun doby přežití těchto pacientů (Lyons *et al.*, 2013). Mezi chelatační látky patří například Deferoxamin či Deferasirox, který je možné podávat orálně (Tefferi, 2010). Dále jsou tito pacienti léčeni antimikrobiálními agens, protože mikrobiální onemocnění jsou nejčastější příčinou úmrtí pacientů s MDS (nejčastěji je v této spojitosti zaznamenán zápal plic a sepse). Progrese v AML, krvácení do mozku a vnitřních orgánů jsou dalšími příčinami úmrtí pacientů s MDS (Dayyani *et al.*, 2010).

U pacientů s 5q- syndromem, závislých na transfúzi, je zaváděno nové léčivo Lenalidomid. Lenalidomid funguje jeho antiangiogenní faktor (Tefferi, 2010). U pacientů léčených Lenalidomidem dochází především k zlepšení cytogenetiky. Na progresi v AML nemá tato látka, podávaná samostatně, vliv (Giagounidis *et al.*, 2014).

3.2.2 Akutní myeloidní leukemie (AML)

Jako akutní myeloidní leukemie je označována skupina onemocnění, u kterých dochází k poruchám krvetvorných buněk kostní dřeně. Jedná se o onemocnění především starších lidí (věkový medián tohoto onemocnění se pohybuje kolem 65 let), ale vyskytuje se i u dětí, a to především jako doprovod genetických abnormalit typu Klinefelterův syndrom, což je genetická porucha způsobená chromozomální aneuploidií (Deschler *et Lubbert*, 2006). Počet případů tohoto onemocnění stále roste. V roce 2015 je očekávaný počet nových případů AML v USA přes 20 000 a očekává se přes 10 000 úmrtí na toto onemocnění (Siegel *et al.*, 2015).

AML vzniká nejčastěji z důvodu chromozomálních přestaveb nebo genetických mutací uvnitř krvetvorné buňky. Cytogenetická charakteristika má u tohoto onemocnění vysokou diagnostickou hodnotu. Sekundární AML vzniká v důsledku progresu jiného hematologického onemocnění jako je například MDS či myeloproliferativní neoplazma. Na vznik tohoto onemocnění mají vliv i genetické předpoklady a s tím souvisí i působení některých látek znečišťujících životní prostředí. Objevuje se domněnka, že určité látky by mohly být spjaty s výskytem konkrétních chromozomálních abnormalit (Deschler *et* Lubbert, 2006). Například působení benzenu bývá spojeno a abnormalitami na 5. a 7. chromozomu. Mezi další polutanty mající vliv na leukemogenezi patří například ionizační záření a organické látky (Crane *et al.*, 1996). Důležitou roli v patogenezi AML mohou hrát i virová onemocnění (Kerr *et al.*, 2003).

3.2.2.1 Klasifikace a diagnostika

Hlavním kritériem pro stanovení diagnózy AML je procento blastů v periferní krvi nebo v kostní dřeni, které by mělo, u tohoto onemocnění dosahovat hodnot vyšších než 20% (Vardiman *et al.*, 2009). Pacienti s AML trpí častými infekcemi a krvácivostí. Klasifikace AML byla založena především na morfologickém hodnocení buněk, které je nicméně stále hlavním měřítkem pro klasifikaci FAB. Klasifikace WHO však navíc zohledňuje cytogenetické změny, jež jsou u tohoto onemocnění velmi časté. Jedná se především o ztráty chromozomů a delece vyskytující se často u chromozomů 5, 7, 9 a Y. Opakující se abnormality karyotypu tvoří první skupinu klasifikace WHO. Velmi časté jsou translokace $t(15;17)(q22;q11)$, které jsou, spolu s abnormalitami na chromozómu 16 a abnormálními eozinofily, řazeny do další samostatné skupiny. Tato skupina je charakteristická často mírným průběhem onemocnění. Translokace $t(8;21)$ spolu s molekulární přestavbou CBFa/ETO tvoří další samostatnou skupinu klasifikace WHO. Tato translokace bývá spojována i se skupinou M2 v klasifikaci FAB. Pacienti, kteří mají tyto charakteristiky, patří do skupiny se středním rizikem (Grimwade *et al.*, 1998).

Pro AML jsou časté trizomie chromozomů (Deschler *et* Lubbert, 2006), což je genetická odchylka, při které chromozomální výbava obsahuje místo dvou chromozomů určitého páru chromozomy tři. Další WHO skupinou je AML s dysplazií, která se projevuje u 50 % buněk více hematopoetických řad. Tento typ vzniká často právě přechodem z MDS. Do další skupiny patří AML, které nelze jinak zařadit a podléhají tak standardní klasifikaci FAB. Poslední skupinu tvoří obtížně klasifikovatelné leukemie jako je např. bilineární akutní leukemie či

akutní nediferencovaná leukemie. Ukazuje se, že genetická analýza může být nápomocná při zařazení pacientů do skupin, může přispět k odhadu jejich odpovědi na léčbu a pomoci zvolit vhodnou léčebnou strategii. Přínos by měl být především u mladších pacientů; problémová je ovšem skupina se středním rizikem, která zahrnuje polovinu diagnostikovaných pacientů, u této skupiny je onemocnění příliš heterogenní (Grimwade *et al.*, 1998).

Klasifikace FAB je založena pouze na buněčné morfologii a rozděluje AML do 9 stádií: M0 – M7. Akutní myeloidní leukemie bez diferenciacie (akutní nediferencovaná leukémie AUL) je prvním stádiem a označuje se M0. Pacient s AML ve stadiu M0 má jen minimálně diferencované změny buněk, jež jsou rozpoznatelné pomocí imunofenotypizace nebo cytochemickým vyšetřením. Stádium M1 zahrnuje AML bez vyzrávání, u níž jsou buňky ne-erytroidní řady v kostní dřeni tvořeny z 90% myeloblasty. Naopak u typu M2 (AML s vyzráváním) se vyskytuje více jak 10% zralejších forem blastů. U stádia M3 akutní promyelocytární leukémie (APL) převažují v kostní dřeni patologické promyelocyty a v jejich cytoplazmě dochází ke granulaci a často i vzniku Auerových tyčí. Akutní myelomonocytární leukémie ve stádiu M4 postihuje buňky jak granulocytární tak monocytárních řad. U varianty M5 (akutní monocytární leukémie) tvoří většinu buněk ne-erytroidních řad buňky monocytární řady. V případě M5a je to více než 80% a v případě M5b je to méně než 80 % buněk monocytární řady. Typ M6 představuje akutní erytroleukémii, která vzniká často přechodem z MDS, a je charakteristický dysplastickými změnami buněk erytroidních řad. Akutní megakaryocytární leukémie představuje stádium M7, jež je reprezentováno kostní dřením ve fázi fibrózy (Čermák *et Kačírková*, 2003).

V poslední době se objevují snahy zavést do klasifikace a diagnostiky i molekulární ukazatele, které by napomohly přesnější charakteristice onemocnění. Například detekce přestavby genů *RUNX1*, *CBFB*, *RARA* a *MLL*, které kódují transkripční faktory, ukazatele spojené s klinickými a morfologickými změnami v průběhu leukemogeneze, případně přestavby genů spojených s proliferací a přežitím neplastických klonů jako jsou geny *FLT3*, *JAK2*, *RAS*. Tyto geny jsou navíc přítomné u pacientů s AML, u nichž nejsou pozorovány žádné cytogenetické abnormality (Vardiman *et al.*, 2009). Do skupiny pacientů se středním rizikem, by také měli být řazeni pacienti, u kterých také nedochází k výskytu cytogenetických abnormalit, ale je detekována mutacemi genů *NPM1*, *CEBPA* (Schlenk *et al.*, 2008) a mutace genu *FLT3*, jež se vyskytuje v mnoha případech AML napříč všemi skupinami (Deschler *et Lubbert*, 2006).

3.2.2.2 Léčba

Pacienti, trpící AML, jsou primárně léčeni chemoterapeutiky. Nejčastěji používaný je Cytarabin označovaný Ara-C (Büchner *et al.*, 2001; Cetkovský, 2007). K alogenní transplantaci se přistupuje pouze v případě, že se jedná o pacienty s vysoce rizikovým AML, v případě pacientů ALM se středním rizikem v případě, že je vhodný dárce v rodině. Dlouhodobý klinický benefit má podávání demetylačního agens po alogenní transplantaci alespoň ve 4 cyklech (Lima *et al.*, 2010). V případě selhání počáteční indukční léčby přichází na řadu takzvaná záchranná terapie, jež je založená na zvýšení dávky chemoterapeutika (Cetkovský, 2007). Vyšší dávky chemoterapeutika v indukční fázi jsou, z důvodu rizika toxicity tohoto přístupu, vhodné pouze u mladších pacientů (Bradstock *et al.*, 2005).

Problémem jsou pacienti ve věku nad 60 let, kterých je u tohoto onemocnění většina. U nich je často, z důvodu současného výskytu více onemocnění, volena pouze paliativní terapie, jejímž cílem není pacienta úplně vyléčit, ale zlepšit kvalitu života a prodloužit jej. Soustředí se na potlačení příznaků AML jako je anémie, trombocypenie a případné infekce. Vzhledem k vysokému počtu těchto pacientů pokračují snahy o nalezení vhodné kombinace a dávky léčiv u která by byla pro tyto pacienty méně riziková. Současně probíhají snahy o zvýšení úspěšnosti alogenní transplantace u těchto pacientů (Büchner *et al.*, 2001). Velmi nadějnými se jeví, dnes komerčně dostupné a klinicky používané, kombinace faktor stimuluje růst kolonií makrofágů a granulocytů (GM-CSF) a faktor stimuluje růst kolonií granulocytů (G-CSF) (Štěrba *et al.*, 2000), které snížily riziko relapsu onemocnění u skupiny pacientů s mírně a středně rizikovým AML (Löwenberg *et al.*, 2003). Pro léčbu AML jsou v současné době zkoušeny i jiné přístupy jako je například léčba pomocí kombinace inhibitorů histonových deacetyláz nebo použití kyseliny all-trans-retinové, která je používána v terapii APL ve stádiu M3, kdy vyvolává terminální diferenciaci APL blastů do zralých granulocytů (Kostrouchova *et al.*, 2007).

3.3 Biomarkery hemato-onkologických onemocnění

Pro přesnější klasifikaci hemato-onkologických onemocnění jsou zvažovány i další markery, které poukazují na určité aspekty těchto onemocnění. Patří mezi ně například mutace některých genů. Jedna z nejčastěji pozorovaných mutací u MDS, je mutace genu *TET2*. Ta bývá často spojována i s metylačními změnami v této oblasti (Ko *et al.*, 2010). Navíc byla u pacientů s touto mutací a dále mutací genu *DNMT3A* pozorována pozitivní reakce na azacitidin a

Decitabin (Traina *et al.*, 2011). Naopak pro pacienty s mutací *TP53*, což je transkripční faktor zodpovídající za antiproliferační funkci (Vogelstein *et al.*, 2000), je prognóza horší a často dochází k progresi v AML. Také u pacientů MDS s 5q- syndromem se medián přežití snižuje (Kulasekararaj *et al.*, 2013).

U pacientů s onemocněním myelodysplastického syndromu se často vyskytují translokace a fuze genů *RAS*, *FLT3*, které jsou zapojené do tvorby hematopoetických prekursorů (Hirai, 2003). Dále jsou u MDS často pozorovány mutace genů *ASXL1* (46%), *RUNX1* (20%) a *SF3B1*, jež se vyskytují především u pacientů s RARS (Refraktorní anemie s prstenčitými sideroblasty; viz Tab. č. 1), či mutace genů *IDH1* a *IDH2* (*Isocitrate dehydrogenase 1* a 2) (Figueroa *et al.*, 2010). Byla pozorována inverzní korelace mezi expresí genu a výskytem metylací, v genech *IDH1/2*. Tyto geny by tak mohly mít vliv na průběh onkogeneze (Figueroa *et al.*, 2010).

Problémem při léčbě demetylačními preparáty se zdá být mutace genu *ASXL1*, která způsobuje částečnou rezistenci k demetylačním látkám (Bejar *et al.*, 2014) U MDS dochází také často ke ztrátě genetických lokusů, kdy jedna kopie genu bývá často deletována vlivem chromozomálních aberací a druhá je následně umlčena, ať už bodovou mutací, či například z důvodu regionální metylace. Nejčastěji jsou u tohoto onemocnění postiženy delecí chromozomy 5, 7, 11, 13 a 20 (Hirai, 2003).

V případech AML jsou velmi časté mutace genů *NPM1*, *FLT3-ITD*, *CEBPA*, *NRAS*. Rozpoznání těchto mutací může mít velký přínos pro následnou léčbu onemocnění. Studie prokázaly, že u pacientů s mutací v genu *FLT3-ITD*, u kterých se ovšem nevyskytuje mutace v genu *CEBPA*, je velmi vysoká úspěšnost léčby alogenní transplantací (Schlenk *et al.*, 2008). Dalšími geny, které mohou být u AML zodpovědné za vznik či následný rozvoj neoplastických malignit jsou *JAK2* a *RAS*. Svou roli zde hrají také genové přestavby vyskytující se především u genů *RUNX1*, *CBFB*, *RARA* a *MLL* (Vardiman *et al.*, 2009).

Onemocnění AML je charakteristické výskytem translokací a tímto způsobem také vznikají fuze genů. Asi 5 % všech AML jsou leukemie s translokací t(8;21)(q22;q22), při které vzniká fúzní gen *RUNX1-RUNX1T1* (dříve *AML1-ETO*) (Miyoshi *et al.*, 1995). Fúzní protein *RUNX1-RUNX1T1* funguje jako transkripční represor a inhibuje expresi genů reagujících s *AML1*. Protože je doména „Runt“ nezbytná pro diferenciaci hematopoetických kmenových buněk, její zablokování způsobuje zastavení diferenciaci těchto buněk a následně, v komplexu dalších genetických změn, může docházet k transformaci normálních buněk na buňky leukemické (Asou, 2003).

3.3.1 RIL

Mezi geny, u kterých byla pozorována změna exprese v průběhu onkogeneze patří gen *RIL* (**R**eversion-**I**nduced **L**IM protein), který bývá také označován *PDLIM4*, protože kóduje proteiny nesoucí domény PDZ a LIM (Guryanova *et al.*, 2011). Označení domény PDZ je tvořeno počátečními písmeny tří proteinů, u kterých byla tato doména poprvé objevena (*Post synaptic density protein*, *Drosophila disc large tumor suppressor* a *Zonula occludens-1 protein*) (Audebert *et al.*, 2004). Doména PDZ se vyskytuje u proteinů, které podporují signální komplex v buněčné membráně tím, že jej drží pohromadě a organizují ho (Cuppen *et al.*, 1997).

Proteiny s doménou LIM představují velkou skupinu strukturálně příbuzných proteinů, které obsahují jednu nebo více domén zinkového prstu (*zinc finger*). Doména zinkového prstu umožňuje specifickou vazbu bílkovin na DNA. Má charakter smyčky o délce 20 – 30 aminokyselin, u jejíhož základu je atom zinku koordinačně vázaný dvěma dvojicemi cysteinových zbytků (místo jedné z nich může být dvojice zbytků histidinu). Zinkové prsty jsou typickými motivy transkripčních faktorů a proteinů regulujících expresi genů. Název LIM je odvozen od tří proteinů: **L**IN-11, **I**sl1 a **M**ec3, ve kterých byl motiv zinkového prstu objeven (Guy *et al.*, 1999).

RIL patří do proteinové rodiny ALP/enigma (Guryanova *et al.*, 2011). Tato skupina proteinů je pojmenována podle jednoho z proteinů, které do ní patří – ALP proteinu. Tyto proteiny interagují s C-koncem α -aktinu-2 a fungují i jako adaptorové proteiny. V případě adaptorových proteinů se jejich doména PDZ váže k cytoskeletu a doména LIM, obsahující motiv zinkových prstů, aktivuje další signální proteiny (Zheng *et al.*, 2010).

Gen *RIL* je lokalizován na pátém chromozomu v pozici 5q31.1 (Bashirova *et al.*, 1998). Jedná se o gen s vysoce konzervativní strukturou, který se vyskytuje u mnoha živočišných druhů. Identifikován byl například u myši, kuřat, opic a v neposlední řadě u člověka (Kiess *et al.*, 1995). *RIL* je exprimován především v tkáních mozku a srdce. Exprese tohoto genu je odlišná v rámci jednoho orgánu u různých typů buněk. Například v mozku byla vysoká exprese pozorována především v Purkyňových buňkách mozečku (Kiess *et al.*, 1995).

Transkript RIL existuje ve dvou sestříhových variantách. První je základní funkční varianta a druhá je varianta, která neobsahuje exon 6 (Bashirova *et al.*, 1998). Druhá varianta vzniká v buňkách především jako odpověď na oxidativní stres, a je uzpůsobena k vlastní degradaci navedením vzniklého proteinu do 20S proteazomu bez účasti ubiquitinu. Tento

proces může být ovšem blokován NAD(P)H: chinon-oxidoreduktázou. Pokud dojde k zablokování degradace, forma genu *RIL* bez 6. exonu zůstává v buňce, kde způsobuje reorganizaci cytoskeletu. S tím souvisí vznik genetických abnormalit, které mohou ovlivňovat normální fungování buňky (Guryanova *et al.*, 2011).

RIL je důležitý pro proliferaci buněk (Kiess *et al.*, 1995). Funguje v buňce jako regulátor, který má podíl na dynamice aktinového cytoskeletu. Jednak tím, že *RIL* je v buňce lokalizován společně s F-aktinem a jednak je součástí proteinovém komplexu interagujícím s proteinem aktivujícím GTPázu. *RIL* interaguje s aktin cross linking proteinem, alfa aktinem 1, a napomáhá tímto způsobem stimulovat tvorbu aktinu (Guryanova *et al.*, 2011). Tato interakce přispívá k dynamice makromolekulárního uspořádání v buněčném kortexu (Cuppen *et al.*, 1997).

Sekvence *RIL* obsahuje také vazebná místa, do kterých by se potenciálně mohly vázat buněčně specifické hematopoetické faktory a růstový faktor (Bashirova *et al.*, 1998). Gen *RIL* je také považován za tumor-supresorový gen (Kiess *et al.*, 1995). Snížení exprese tohoto genu je typické pro neoplastickou transformaci buněk. Nejnižší exprese tohoto genu byla pozorována v buňkách nesoucích onkogen RAS nebo jeho následný efektor V-Raf (Kiess *et al.*, 1995). U hematoonkologických onemocnění jako je například MDS nebo AML je tato oblast chromozomu ve které se gen *RIL* nachází často deletovaná.

Na umlčování tohoto genu v nádorových buňkách se podílí metylace. *RIL* byl detekován jako metylovaný v 70% nádorových linií na rozdíl od normálních buněk zdravé tkáně, u které je běžný pouze nízký stupeň metylace (Boumber *et al.*, 2007). Hypermetylace *RIL* pozastavuje jeho transkripci například u nádoru prostaty (Vanaja *et al.*, 2006). Bylo zjištěno, že metylaci genových úseků *RIL* je v nádorových buňkách možno ovlivnit působením demetylačního preparátu 5-aza-2-deoxycytidin, kdy bylo popsáno obnovení exprese tohoto genu (Boumber *et al.*, 2007). Při výzkumu epigenetických modifikací, mezi něž metylace DNA patří, byly použity i inhibitory histonových deacetyláz (HDACI). U buněk ovlivněných HDACI ovšem k obnovení exprese genu *RIL* nedocházelo (Boumber *et al.*, 2007).

3.3.2 *RASSF1*

RASSF1 je tumorsupresorový gen (Dammann *et al.*, 2000), který je efektozem genu *RAS* (Vos *et al.*, 2000). Nachází se na chromozomu 3 v oblasti 3p21.3, u které často dochází ke ztrátě heterozygotnosti (Vos *et al.*, 2000), a s tím souvisí zvýšená pravděpodobnost nádorového

zvratu. V buňce jsou tyto geny asociovány především s mitochondriemi (Liu *et al.*, 2005). Tento gen produkuje tři transkripty označovány A, B, C (Dammann *et al.*, 2000).

Mezi úlohy genu *RASSF1* v buňce patří především indukce apoptózy, kontrola některých fází buněčného cyklu, ovlivňování dynamiky mikrotubulů a má vliv na pohyblivost buňky (Vos *et al.*, 2000; Dallol *et al.*, 2005)

Transkripty *RASSF1A* a *RASSF1C* jsou asociované s mitochondriemi pouze po dobu interfáze buňky, poté putují v buňce, chrání před porušením mikrotubulová vlákna a napomáhají polymerizaci nových. Pokud jsou transkripty A a C exprimovány v nadměrném množství, dochází ke stabilizaci mikrotubulů a bývá narušen buněčný cyklus (Liu *et al.*, 2005).

Byla pozorována delece oblasti 3p21.3 a ztráta exprese genu *RASSF1* u několika typů nádorových onemocnění a buněčných linií od nich odvozených (například nádory plic či vaječníků) (Vos *et al.*, 2000; Dammann *et al.*, 2000). Ztráta exprese tohoto genu korelovala často s výskytem metylace v oblasti promotoru genu (Dammann *et al.*, 2000). Nejvyšší procento metylace v této oblasti bylo zaznamenáno u karcinomu plic (Agathangelou *et al.*, 2001).

3.3.3 *BLU*

Gen *BLU* má tumor-supresorovou funkci (Dong *et al.*, 2012). Je také označován jako *ZMYND10* (**Z**inc **F**inger, **MYND** **D**omain-**C**ontaining **P**rotein **10**). Obsahuje doménu MYND (*Myeloid, Nervy and DEAF-1*), což je typ domény zinkových prstů. Doména MYND je tvořena shlukem cysteinových a histidinových zbytků, které jsou pro doménu zinkových prstů charakteristické (Dong *et al.*, 2012). Doména MYND je z 45% identická s doménami plnicí regulační a supresorovou funkci a vyskytuje se u proteinů s fungujícími jako transkripční regulátory signálních drah, pro které je její přítomnost nezbytná (Dong *et al.*, 2012; Hesson *et al.*, 2004).

Exprese *BLU* je nejvýraznější především v tkáních průdušnice, hrtanu, plic a varlat. Nízká exprese byla naopak detekována v tkáních srdce, mozku, placentě a kostní dřeni (Qiu *et al.*, 2004). *BLU* má důležitou úlohu při apoptóze, kdy interakcí s kinázou MEK1 aktivuje signální dráhu, která umožňuje nasměrování buňku do apoptózy (Dong *et al.*, 2012). V jedné z mála publikací o tomto genu bylo popsáno, že při zvýšené expresi *BLU* dochází k aktivaci signálních drah, které vedou k zachycení nádorových buněk vaječniku v G2 fázi. Kromě toho,

bylo popsáno, že ektopická exprese *BLU* inhibuje transkripční aktivitu genu pro Bcl2 (Park *et al.*, 2013).

U mnoha nádorových onemocnění (karcinom prostaty, nosohltanu, plic, jater a dalších) byl pozorován pokles exprese genu *BLU*. Se zhoršující se prognózou dochází ke snížení exprese genu *BLU*. Úplné vymizení exprese ovšem nebylo detekováno (Agathangelou *et al.*, 2003, Hesson *et al.*, 2004). Obnovení exprese tohoto genu bylo zjištěno po ovlivnění nádorových buněk demetylačním agens 5-aza-2- deoxycytidinem, což naznačuje, že změny v expresi genu *BLU* mohou být ovlivněny metylačními změnami DNA (Agathangelou *et al.*, 2003). V případě detekce metylace promotoru genu *BLU* nebyla potvrzena metylace promotoru sousedního genu RASSF1 (Hesson *et al.*, 2004). Z toho můžeme usuzovat, že se nejedná o globální metylaci celého regionu 3p21.3, kde se *BLU* nachází, ale o cílenou metylaci tohoto genu (Hesson *et al.*, 2004). Gen *BLU* je aktivován navázáním některého z transkripčních faktorů ze skupiny E2F na specifické místo v jeho promotorové oblasti. Pokud dojde k metylačním změnám v úseku promotoru, je tato vazba znemožněna a nedochází tak k aktivaci tohoto genu (Qiu *et al.*, 2004).

Největší frekvence metylačních změn byla pozorována u neuroblastomu a nádoru nosohltanu (Liu *et al.*, 2003, Agathangelou *et al.*, 2003, Qiu *et al.*, 2004). Vyšší úroveň celkové metylace byla pozorovaná u primárních nádorů a to v případě gliomu (Hesson *et al.*, 2004).

Metylační analýza MDS ukázala téměř u poloviny vyšetřovaných pacientů vysoký stupeň metylace v oblasti promotoru genu *BLU* na rozdíl od zdravých jedinců, kdy nebyly detekovány žádné metylační změny v této oblasti (Yang *et al.*, 2012). Hypermetylace genu *RAS*, patřícího do skupiny proto-onkogenů, byl zjištěn u menšího počtu pacientů s MDS konkrétně s 5q-syndromem. Vysoká úroveň metylace byla naopak pozorována u pacientů s refrakterní anémií s nadbytkem blastů (RAEB) a u pacientů s refrakterní cytopenií s dysplazií ve více řadách (RCMD) (viz **Tab č. 1**) (Yang *et al.*, 2012). Exprimovaný gen *BLU* může indukovat buněčnou smrt v nádorových buňkách (Park *et al.*, 2013), proto může být jeho umlčení (*silencing*), způsobené metylací, kritickým bodem ve vývoji onemocnění. Léčba Decitabinem (5-aza-2- deoxycytidin) nevede k úplnému obnovení exprese tohoto genu (Yang *et al.*, 2012), čímž se významně zvyšuje závažnost tohoto onemocnění.

3.3.4 p15

Gen *p15* je tumorsupresorový gen (Dodge *et al.*, 1998). Nachází se na chromozómu 9 v oblasti 9p21 (Jen *et al.*, 1994). Spolu s geny *p16*, *p18* a *p19* je součástí rodiny inhibitorů cyklin-dependentních kináz (CDK) INK4 (Drexler, 1998). P15 je aktivován pomocí TGF- β 1 (*Transforming Growth Factor*) (Robson *et al.*, 1999) a následně se váže na CDK4 (Jen *et al.*, 1994). Jeho aktivace má za následek spuštění buněčné dráhy, která zastavuje buňku v G1 fázi (Drexler, 1998). Exprese tohoto genu byla detekována například ve tkáních mozku, plic, prostaty, placenty, slinné žlázy a tlustého střeva (Jen *et al.*, 1994).

Tento gen se velmi často objevuje v pozměněném stavu především u hematologických malignit. Nejčastějšími změnami, které jsou u něj pozorovány, jsou delece regionu 9p21 a hypermetylace (Krug *et al.*, 2002). V promotorové oblasti tohoto genu se nachází mnoho CpG ostrůvků (*CpG islands*) a jejich metylací může docházet k umlčení exprese genu *p15* (Dodge *et al.*, 1998). Ukazuje se, že metylace inhibuje efekt TGF a mohla by být určující pro únik nezralých blastů zachycení v G1 fázi, v případě myeloidních malignit (Quesnel *et al.*, 1998). Methylace tohoto genu byla pozorována u MDS, kdy její výskyt koreloval s procentem blastů v kostní dřeni (Hirai, 2003). Výrazné zvýšení metylace bylo také pozorováno v mnohých případech AML a APL (Krug *et al.*, 2002; Drexler, 1998). Methylace *p15* u pacientů s MDS byla vysoká především v pokročilých stádiích tohoto onemocnění (Aoki *et al.*, 2000). U RAEB- 2 to bylo až v 71% případu v porovnání s 33% u RAEB- 1. U sekundárního typu AML (po progresi z MDS) se metylace genu *p15* vyskytovala ve 100% případů (Drexler, 1998). Tento trend je možné sledovat jak u dospělých, tak u dětských pacientů s MDS (Rodrigues *et al.*, 2010). Častý výskyt metylace DNA v oblasti promotoru genu *p15* byl pozorován u pacientů s AML rezistentních k léčbě Ara-C (Dodge *et al.*, 1998).

3.4 Epigenetické modifikace

Epigenetické modifikace způsobují změny na úrovni transkripce i translace a to beze změny genetické informace. Jsou založeny na vzájemně se ovlivňujících modifikacích na obou těchto úrovních a tvoří tak složitý mechanismus regulující funkce genu a ovlivňují dynamiku chromatinu (Sharma *et al.*, 2010). Tyto změny člověk získává v průběhu života a mohou mít vliv na vznik a progresi onkologických onemocnění. Na úrovni translace je nejčastější epigenetickou změnou acetylace histonů, kde působí enzymy histonových acetyláz a

histonových deacetyláz. Objevují se ale i další modifikace histonu jako jsou fosforylace, metylace histonů, sumoylace, ubiquitinace a další. Tyto změny mohou způsobovat jak aktivaci, tak i represi transkripce. Transkripci ovlivňuje dále například i proteinový komplex Polycomb/trithorax a na uspořádání heterochromatinu má vliv „small RNA“.

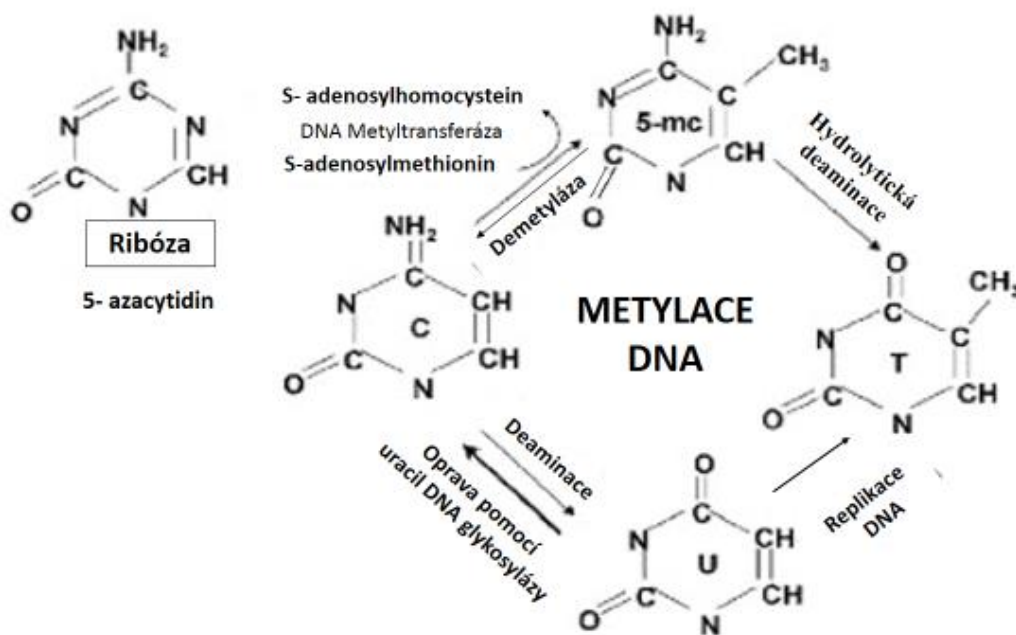
Velmi častým epigenetickým mechanismem je metylace na úrovni DNA. Methylace DNA se týká cytosinu, nejčastěji toho, který je v sekvenci následován guaninem. Dárce metylové skupin je SAM, který je prostřednictvím metyltransferáz přenesen na cytosin a váže se na uhlík v poloze 5' (**Obr. č. 2**). Metylované cytosiny tvoří ostrůvky CpG, což jsou sekvence o délce minimálně 500 bp, ve kterých se alespoň z 55% vyskytují dinukleotidy CpG (Takai *et al.*, 2002). Methylace těchto úseků v oblasti promotoru genů vede k deaktivaci genu a může být klíčová pro vznik a průběh MDS a AML. Zvýšená metylace v promotorových oblastech některých tumor-supresorových genů a pokles exprese těchto genů v závislosti na stádiu tohoto onemocnění byl popsán v několika studiích (Akalin *et al.*, 2012; Figueroa *et al.*, 2009).

Hlavními enzymy této epigenetické změny jsou metyltransferázy DNA (DNMTs). DNMT1 je metyl transferáza udržující metylační stav DNA během její replikace. DNMT3a a DNMT3b jsou metyltransferázy způsobující metylace de novo. Významnou roli hrají během vývoje v diferenciaci jednotlivých tkání, ale mají také podíl na inaktivaci důležitých genů při vývoji malignit. V těchto případech je důležitá jejich spolupráce DNMT1, která tyto změny následně udržuje a napomáhá tak hromadění aberantních metylací (Kim *et al.*, 2002). Demetylační látky Azacytidin a Decitabin mohou s DNMT1 tvořit kovalentní komplex a tím indukují hypometylací. Z dosud známých poznatků vyplývá, že tyto demetylační látky vznik neoplazií kompletně nepřekonávají, pouze potlačují (Leone *et al.*, 2003).

Jednou z nejpoužívanějších technik detekce metylací je MSP (Metylačně specifická PCR) (Herman *et al.*, 1996). Na PCR jsou založeny i další techniky detekce metylací jako je například Methylation-sensitive high-resolution melting nebo na Real-time založená technika MethyLight (Hernández *et al.*, 2013) Tyto dvě zmíněné techniky ale ve srovnání ukázaly menší specifitu než MSP (Quillien *et al.*, 2012). Jednou z novějších metod detekce metylací je metoda pyrosekvenování. Jedná se o metodu využívající 4 enzymy: Klenowův fragment DNA polymerázy I, ATP sulfurylázu, luciferázu a apyrázu. Právě enzym luciferáza katalyzuje při inkorporaci nukleotidu reakci jejímž důsledkem je emise fotonu. Tento signál je následně zachycen CCD kamerou a vyhodnocen počítačem, pokud k inkorporaci nukleotidu nedojde, je odstraněn pomocí apyrázy (Tost *et al.*, 2007). Pyrosekvenování slouží ke kvantifikaci metylací v jednotlivých hodnocených CpG dinukleotidech (England *et al.*, 2005). V současné

době dochází k rozvoji NGS (*Next generation sequencing*) metod které v kombinaci s bisulfitovou modifikací nabízejí do budoucnosti možnost analýz s vysokým rozlišením, vysokou propustností a vysokou rychlostí (Zhang *et Jeltsch*, 2010).

Obrázek č. 2: Změny na pyrimidinovém kruhu související s metylací DNA (převzato a upraveno z Leone *et al.*, 2003)



4 Materiál a metodika

4.1 Přístroje a pomůcky

DNA/RNA UV-CLEANER UVC/T-AR (BIOSAN)

LightCycler 480 Multiwell Plat 96, white (roche)

LightCycler 480 Sealing Foil (roche)

LightCycler 480 II (ROCHE)

Digestoř 1200 MERCI

Centrifuga 3K30 (SIGMA))

Centrifuga LCM- 3000 (BIOSAN)

Termostat-AccuBlock digital dry bath (labnet)

Centrifuga MiniSpin (Eppendorf)

Elektroforetická komůrka Owl model B1

Erlenmayerovy baňky

Mikrovlonná trouba AKL 536-IGNIS

Mikrozkumavky 1,5ml; 0,2ml

Mini Centrifuga Blue

Mikropipety a špičky- GILSON,

Eppendorf Thermoblok P-lab

Termocykler C1000TM (BIO-RAD)

Digitální laboratorní váha- 440-33 (KERN)

Váženky Vortex- GENIE 2 (Scientific Industries)

Vortex mixer (Labnet)

Zdroj napětí MP-300N (MAJOR SCIENCE)

Nanodrop ND-1000

LI-COR Odyssey® Fc Imaging System (LI-COR Biosciences)

PyroMark Q96 ID (QIAGEN)

PyroMark Q96 Vacuum Workstation (QIAGEN)

PyroMark Q96 Cartridge (QIAGEN)

4.2 Chemikálie a roztoky

EpiTect Bisulfite Kit (Qiagen)

Pyromark PCR kit (Qiagen)

Transcriptor First Strand cDNA Synthesi Kit (Roche)

Xceed qPCR probe 2x mix Lo-ROX (Biotech)

50 bp DNA Ladder (BioLabs)

10x Optimized DyNAzyme™ EXT Buffer (Finnzymes)

50x TAE pufr - 121 g Tris - base - 28,6 ml ledové kyseliny octové - 50 ml roztoku EDTA 0,5 mol/l, (pH 8,0) 32 - do 500 ml doplnit sterilní deionizovanou vodou

70%, 75%, 90%, 96% etanol (Tamda)

Agarose for DNA electrophoresis (Serva)

Deionizovaná voda

Tri Reagent® RT – Blood (Biotech)

4'- Bromoanisole (Biotech)

NucleoSpin RNA Blood (Macherey-Nagel)

6x Gel Loading Dye Blue (BioLabs)

GelRed™ Nucleid Acid Stain 10 000x (Biotium)

dNTPs 10 mmol/l - dNTPs Mix (Promega, Finnzymes, Sigma-Aldrich)

MgCl₂ 50 mmol/l (Finnzymes)

Universal Unmethylated DNA 5µg (0,1 µg/µl) (Millipore)

CpGenome Universal Methylated DNA 10µg (0,1 µg/µl) (Millipore)

DepcH₂O

PyroMark GOLD Q96 (Qiagen)

4.3 Biologický materiál

Pro analýzu metylací u genů *RIL*, *p15*, *RASSF1* a *BLU* byla použita DNA izolovaná ze vzorků periferní krve či aspirátů kostní dřeně pacientů s MDS a AML (vzorky byly poskytnuty z Hemato-onkologické kliniky FN Olomouc, RNDr. Martina Divoká, PhD.). Jako kontrola byla použita DNA izolovaná z periferní krve osob netrpících žádným onemocněním. Pro reverzní transkripci a následnou expresní analýzu byly použity vzorky periferní krve

pacientů s AML, ze kterých byla následně izolována RNA. Jako kontrola byla použita RNA z periferní krve osob netrpících žádným onemocněním.

4.4 Bisulfitová modifikace DNA

Pro rozlišení metylovaného a nemetylovaného cytosinu byla provedena bisulfitová modifikace DNA. Jedná se o reakci DNA s bisulfitem sodným, během které jsou nemetylované cytosiny změněny na thymin, zatím co metylované cytosiny jsou před reakcí chráněny právě metylovou skupinou a zůstávají ve formě cytosinů. Bisulfitová modifikace DNA byla provedena kitem EpiTect Bisulfite Kit (Qiagen) podle protokolu: *Sodium Bisulfite conversion of Unmethylated cytosines in DNA*. Modifikace vzorků DNA byla prováděna při pokojové teplotě. Do reakce bylo vloženo 200- 250 ng DNA (**Tab. č. 2**). Bisulfitová reakce probíhala v termocykleru podle protokolu v návodu (**Tab. č. 3**). Dalším krokem bylo promytí modifikované DNA a její eluce v objemu 15 μ l. Následně byla změřena koncentrace DNA a zjištěna její čistota.

Tabulka č. 2: Komponenty reakce modifikace DNA bisulfitem sodným

Komponenty	Objem na 1 reakci [μ l]
DNA + ddH ₂ O	20
Bisulfitový mix	85
DNA protect buffer	35

Tabulka č. 3: Teplotní profil reakce modifikace DNA bisulfitem sodným

Krok	Teplota [$^{\circ}$ C]	Čas
Denaturace	95	
Inkubace	60	
Denaturace	95	
Inkubace	60	
Denaturace	95	
Pokračování	20	

4.5 Metylačně specifická PCR

Pro stanovení metylace DNA byla na jednotlivých vzorcích bisulfitové DNA provedena nejprve metylačně-specifická PCR. Pro amplifikaci byl použit enzym DyNAzyme™ EXT DNA Polymerase (Finnzymes). Jedná se o polymerázu vhodnou pro amplifikaci templátů s vysokým obsahem CpG dinukleotidů. Byly použity dva páry metylačně-specifických primerů (**Tabulka č. 4**). Metylačně specifické primery rozpoznávají mezi metylovanou a nemetylovanou DNA na základě modifikace DNA bisulfitem sodným. Primery byly navrženy pomocí programu MethPrimer a pro geny *BLU* a *RASSF1* byla použita referenční sekvence genů na chromosomu 3 NG_023270.1. Pro gen *RIL* byla použita referenční sekvence genů na chromozomu 5 NG_015836.1 a pro návrh primerů pro gen *p15* byla použita referenční sekvence genu na chromozomu 9 NG_023297.1 (**Tab. č. 4**).

PCR byla provedena ve sterilním boxu vysvíceným UV světlem a nástroje, používané výhradně v tomto boxu, byly vydezinfikovány 70% etanolem. Jednotlivé komponenty do PCR reakce byly pipetovány do 0,2 ml mikrozkušavek v množství a pořadí uvedeném v **tabulce č. 5**. Poté byla ke vzorkům pipetováno 25 – 50 ng DNA. Následně byl obsah mikrozkušavek promíchán pomocí Vortex, krátce centrifugován a mikrozkušavky byly vloženy do termocykleru s přednastaveným programem (**Tab. č. 6**). Součástí protokolu bylo zařazení pozitivní a negativní kontroly jak pro metylovanou, tak pro nemetylovanou DNA. Negativní kontrolou byla v obou případech destilovaná voda. Jako pozitivní kontrola metylované a nemetylované DNA (0,1 µg/µl) byly použity komerčně dodané vzorky (Millipore).

Tabulka č. 4: Primery pro MSP

Název primeru	Sekvence primeru 5'→3'	Velikost produktu [bp]
RIL-M/F	GATGGGTCGTAGGTGTGTTAGTC	124
RIL-M/R	CTTTAAAATCGCTTTTAAAAACGAT	
RIL-U/F	GATGGGTTGTAGGTGTGTTAGTTG	124
RIL-U/R	CTTTAAAATCACTTTTAAAAACAAT	
p15-M/F	TCGGAGTTAATAGTATTTTTTTTCGA	162
p15-M/R	CTCTTTCTCCTCCGATACTAACG	
p15-U/F	TTGGAGTTAATAGTATTTTTTTGA	162
p15-U/R	CCTCTTTCTCCTCCAATACTAACA	
BLU-M/F	CGTTGGGAATTTAAATATTATGGC	177
BLU-M/R	CAATTACGAAACGATTA AAAAACG	
BLU-U/F	GTGTTGGGAATTTAAATATTATGGTG	177
BLU-U/R	AATTACAAAACAATTA AAAAACAT	
RASSF1-M/F	TTTTGTATTTAGGTTTTTATTGCG	146
RASSF1-M/R	CCGACTTCGCTAACTTTAAACG	
RASSF1-U/F	ATTTAGGTTTTTATTGTGTGG	140
RASSF1-U/R	CCATACTTCACTAACTTTAAACAC	

Tabulka č. 5: Komponenty MSP

komponenty		Množství na jednu reakci [μl]	
		Nemetylované primery	Metylované primery
premix	Sterilní H ₂ O	19	19
	10x Optimized DyNAzyme EXT Buffer (50 mmol/l Tris - HCl (pH 9,0 při 25°C), 1,5 mmol/l MgCl ₂ , 15 mmol/l (NH ₄) ₂ SO ₄ , 0,1% Triton® X-100	2,5	2,5
	Roztok MgCl ₂ (50 mmol/l)	0,5	0,5
	Roztok dNTPs (10 mmol/l)	0,5	0,5
	Forward primer (25 μmol/l)	0,5	0,5
	Reverse primer (25 μmol/l)	0,5	0,5
	DyNAzyme™ EXT DNA Polymerase	0,5	0,5

Tabulka č. 6: Teplotní profil reakce MSP

Krok	Teplota [°C]	Čas [min]
Inicializace	94	4
Denaturace	94	1
Hybridizace	56	1
Elongace	72	1
Finální elongace	72	10
Pokračování	4	-

4.6 Elektroforetická separace v agarózovém gelu

Pro zobrazení výsledku PCR reakce byla prováděna elektroforetická separace v 3% agarózovém gelu. 3% agarózový gel byl připraven rozpuštěním 2,7 g agarózy v 90 ml destilované vody. Suspenzní směs byla ohřata v mikrovlnné troubě, dokud nedošlo k úplnému rozpuštění. Po ochlazení na 60°C bylo do roztoku a do směsi bylo přidáno 1800 µl 50x TAE pufru a 8 µl barvicího roztoku GelRed™ Nucleid Acid Stain (Biotium). Agaróza byla nalita do elektroforetické vaničky s upevněnými hřebínky a ponechána vychladnout, aby došlo k jejímu ztuhnutí. Elektroforetický pufr byl připravován smísením 5 ml 50x TAE pufru s 245 ml deionizované vody. Byl nalit do elektroforetické vany, do které byl vložen agarózový gel. Byly vytaženy hřebínky. Do agarózového gelu byly pipetovány vzorky s PCR produktem (25 µl) a 2,5 µl barvicího roztoku Gel Loading Dye, Blue (6X) (BioLabs). Do jamek v agarózovém gelu bylo nanášeno 25 µl takto připraveného vzorku. Do první jamky v gelu bylo napipetováno 5 µl markeru 50bp DNA StepLadder (BioLabs). Elektroforetická vana byla připojena ke zdroji stejnosměrného napětí. Elektroforéza probíhala při napětí 60 voltů minimálně 60 minut. Po skončení elektroforézy byl gel hodnocen pomocí přístroje LI-COR Odyssey® Fc Imaging System (Biosciences).

4.7 Pyrosekvenování

Pro kvantifikaci metylací ve vzorcích bisulfitované DNA byla provedena metylační analýza pomocí pyrosekvenování. Tato metoda na rozdíl od MSP umožňuje kvantifikaci metylačních změn a navíc zohledňuje chybu způsobenou nedokonale proběhlou bisulfitovou modifikací DNA.

Nejprve byly navrženy primery pro PCR a sekvenační primer pomocí programu PyroMark Assay Design, který na základě zadané sekvence navrhne vhodnou kombinaci primerů. Byly použity stejné referenční sekvence jako při navrhování primerů pro MSP analýzu: pro geny *BLU* a *RASSF1* referenční sekvence NG_023270.1, pro gen *RIL* referenční sekvence NG_015836.1 a pro gen *p15* referenční sekvence NG_023297.1 (**Tab. č. 9**, **Tab. č. 10**).

Sekvence úseku amplifikovaného PCR produktu a navržené primery byly zadány do programu PyroMark CpG Software. DNA po bisulfitové konverzi byla amplifikována pomocí navržených primerů, z nichž jeden z primerů (Forward nebo Reverse) byl biotinylovaný (**Tab. č. 9**), pomocí standartního kitu PyroMark PCR kit (Qiagen). Vzorky byly promíchány pomocí Vortex, krátce centrifugovány a následně byly vloženy do termocykleru s přednastaveným doporučeným programem (**Tab. č. 7**). Následně bylo 20 μ l z jednotlivých amplikonů napipetováno do destičky a byla k nim přidána směs streptavidinových kuliček (Streptavidin coat beads) spolu s vazebným pufrům a destilovanou vodou (**Tab. č. 8**). Destička s PCR produkty byla umístěna na třepačku po dobu 10 minut při 1400 rpm. Během tohoto by mělo dojít k navázání PCR produktů pomocí biotinylovaného konce na streptavidinové kuličky. Následovala příprava vzorků k zahájení sekvenování pomocí přístroje PyroMark Q96 Vacuum Workstation. Streptavidinové kuličky navázané na amplikony byly zachyceny pomocí vakua a potom promývány v jednotlivých roztocích. Nejprve byly 5 s promývány v 70% etanolu, 5 s byly promývány v denaturačním roztoku a nakonec 10 s v promývacím pufru. Poté sondy po dobu 5 s v úhlu 90° k vakuové stanici krátce oschly a následně byly smíseny se sekvenačními primery a po dobu 2 minut inkubovány při 80°C. Výsledkem této reakce je získání jednovláknové DNA, která je vhodná pro sekvenování. Do programu PyroMark CpG Software bylo zadáno schéma testovaných vzorků na destičce a přiřadíme jednotlivé analýzy. Na základě tohoto schématu bylo programem vypočítáváno množství enzymů, substrátu a jednotlivých nukleotidů potřebných pro tuto reakci. Toto množství bylo pipetováno do „cartrige“, kompatibilní jak s programem v počítači tak s přístrojem. Destička se vzorky i „cartrige“ byla vložena do pyrosekvenátoru PyroMark Q96 a pomocí počítače bylo zahájeno sekvenování. Stejným programem byly získané výsledky vyhodnocovány. Data ze vzorků pacientů s AML a MDS byla porovnávána s daty získanými od zdravého jedince a ke statistickému hodnocení metylačních změn sloužil test Wilcoxon Signed-Rank. (<http://www.socscistatistics.com>)

Tabulka č. 7: Teplotní profil PCR s biotinylovaným primerem

Krok	Teplota [°C]	Čas
Aktivace	95	15 min
Denaturace	94	30 s
Hybridizace	56	30 s
Elongace	72	30 s
Finální elongace	72	10 min
Pokračování	4	-

Tabulka č. 8: Komponenty směsi „Streptavidin coat beads“

Komponenty	Množství na 1 reakci [μl]
Streptavidin Sepharose High Performance	3
PyroMark Binding Buffer	40
Destilovaná voda	17

Tabulka č. 9: primery pro předsekvenační PCR

	Forward primer 5'→3'	Reverse primer 5'→3'
<i>RIL</i>	GGGTTTATGAGGAGGTATTTGAGTTG	[B]ACACCCCACTCAACTCTC
<i>p15</i> exon	AGGAGGGGTAGTGAGGAT	[B]ACTTTTCCTAACCTCAAAAACCAAC
<i>p15</i> promotor	AGGAGTTGAGGGTAGTGGT	[B]TCCCACCCCTTAAACT
<i>BLU</i>	GTTTGAGGATAGAGTTTAGATTATAAGG	[B]ACCTAAACCCCCCTAAAAATAAC
<i>RASSF1</i>	AGGGGAAGGAGGGAAGGA	[B]ACTTCAACCCCTCCCCAAAATC

B- biotin

Tabulka č. 10: Sekvenační primery

	Sekvence sekvenačního primeru 5'→3'
<i>RIL</i>	TGTAGATAGTTGGGTTTGG
<i>p15</i> exon	GGGGTAGTGAGGATT
<i>p15</i> promotor	GGATATTTAGAGAGTAGTGAGTTA
<i>BLU</i>	GGATTTGGAGTTTAGGAGA
<i>RASSF1</i>	AGGGAAGGAAGGGTA

4.8 Izolace RNA z krve

Pro stanovení exprese genu *RIL* v daných vzorcích byla provedena izolace RNA ze vzorků krve vybraných pacientů.

Pracovní prostředí bylo vydezinfikováno pomocí RNase ZAP (Sigma-Aldrich). Vzorky byly po celou dobu uchovávány v ledové tříšti v digestoři. Do mikrozkušavek 1,5 ml bylo napipetováno 750 μl roztoku TRI-reagent a 250 μl krve. Krev s reagentem byly ihned důkladně protřepány, aby nedocházelo ke vzniku sraženiny, a promíchány pomocí Vortex. Ke směsi bylo přidáno 50 μl 4'-bromanisole (Biotech) a tato směs byla 15 s pulzně pomíchávána pomocí Vortex. Následně byl vzorek centrifugován po dobu 15 minut při 12 000g a 4°C. Centrifugací

dochází ke vzniku tří fází: spodní organická fáze, střední fáze obsahující DNA a horní fáze obsahující RNA. Přibližně 500 µl horní fáze bylo odebráno do připravené 1,5 ml mikrozkušavky, do které bylo následně přidáno 500 µl isopropanolu. Směs byla opatrně promísena a inkubována 10 minut při pokojové teplotě. Následně byla centrifugována 5 minut při 12 000g a při 4°C. Supernatant byl odstraněn a vzniklý pelet byl promýván 1 ml 75% etanolu a následně centrifugován po dobu 5 minut při 6 000g a 4°C. Supernatant byl opět odstraněn a pelet re suspendován ve 20-50 µl (podle velikosti peletu) depcH₂O. Následně byla změřena koncentrace a čistota RNA.

4.9 Reverzní transkripce

Ze vzorků RNA byla pomocí kitu Transcriptor First Strand cDNA Synthesi Kit připravena cDNA.

Do mikrozkušavek o objemu 0,5 ml bylo napipetováno 2 µl reagentie Random hexamer primer, 100 ng RNA a doplnila ddH₂O do konečného objemu 13 µl. Vzorky byly denaturovány po dobu 10 minut při 65°C, po ukončení inkubace byly okamžitě zchlazeny na teplotu 4°C (ledová tříšť nebo chladicí box). Do mikrozkušavek pipetujeme chemikálie dle **tabulky č. 11**. Následně byly vzorky inkubovány 10 minut při 25°C, 30 minut při 55°C a 5 minut při 85°C.

Tabulka č. 11: Komponenty pro reverzní transkripci

Komponenty	Množství na 1 reakci [µl]
Pufř	4
Inhibitor	0,5
dNTPs	2
transkriptáza	0,5

4.10 Real-time PCR

Pro relativní kvantifikaci exprese genu *RIL* ve vzorcích pacientů s akutní myeloidní leukémií byla provedena real-time PCR (qPCR). Vzorky AML byly porovnávány se vzorkem zdravého jedince. qPCR byla provedena pomocí kitu *Xceed qPCR probe 2x mix Lo-ROX*

(Biotech). Tímto způsobem byla provedena expresní analýza genu *RIL* u vzorků testovaných pacientů.

Jako housekeepingový gen byl použit gen *GAPDH*. Jako kontrolní cDNA byla použita cDNA získána od zdravých jedinců. Byly použity sondy od firem Roche a Life Technologies.

Pro sledovaný gen *RIL* je to sonda #38 a s ní kompatibilní primery:

RIL38/Right (Roche)- GGAAGAGGTGGTCCCTGACT

RIL38/Left (Roche)- CAGCAAGAGAAGGCCTGAAT.

Pro provozní gen *GAPDH* sonda #63 a k ní kompatibilní primery:

GAPDH63/Right (Life Technologies)- CCC CGG TTT CTA TAA ATT GAG C

GAPDH63/Left (Life Technologies)- CAC CTT CCC CAT GGT GTC T.

Do 96-jamkové destičky pro přístroj Light-cycler 480 jsem napipetovala reagentie dle **tabulky č. 12**. Destičku jsem následně zakryla fólií a centrifugovala po dobu 2 minut. Poté jsme destičku vložila do přístroje Light-cycler 480 s přednastaveným programem (**Tab. č. 13**) a po ukončení jsem spustila analýzu dat. Ze získaných hodnot Ct jsem vypočítala úroveň exprese genu *RIL* v testovaných vzorcích.

Tabulka č. 12: Komponenty pro qPCR

Komponenty	Objem pro jednu reakci [μl]
<i>Xceed qPCR SG 2x mix</i>	10
Forward primer (10μM)	0,8
Reverse primer (10μM)	0,8
Sonda (10μM)	0,4
PCR H ₂ O	6
Templátová cDNA	2

Tabulka č. 13: Teplotní profil qPCR

Krok	Teplota [°C]	Čas
Aktivace polymerázy	95	2 min.
Denaturace	95	5 s
Hybridizace/elongace	62	25 s
40 x		

Výpočet:

$$\Delta Ct_1 = \text{RIL}(\text{Vzorek AML}) - \text{GAPDH}(\text{Vzorek AML})$$

$$\Delta Ct_2 = \text{RIL}(\text{Kontrola}) - \text{GAPDH}(\text{Kontrola})$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_1 - \Delta Ct_2$$

$$\text{Úroveň exprese cílového genu} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

5 Výsledky

5.1 Analýza metylačně specifickou PCR

Vzorky bisulfitované DNA pacientů s hemato-onkologickým onemocněním a zdravé kontroly byly použity jako templát pro metylačně specifickou PCR. Bylo analyzováno 17 vzorků pocházejících od pacientů s MDS (vzorky označeny S). V této skupině byly zastoupeny především typy RAEB-1 (5) a RAEB-2 (6). 27 vzorků pocházelo od pacientů s AML (vzorky označeny LE), 1 vzorek byl získán od pacienta s MDS po alogenní transplantaci (S18) a 1 kontrolní vzorek pocházel od zdravého jedince (kontrola nemetylované DNA). Pomocí MSP byla detekována přítomnost metylací v oblasti promotorových sekvencí genů *RIL* (45 vzorků), *BLU* (16 vzorků), *RASSF1* (16 vzorků) a *p15* (45 vzorků). V jednom případě byl porovnáván vzorek DNA jak z kostní dřeně (S15), tak z periferní krve (S14) (odběr proběhl ve stejný den). Pro vizualizaci produktů PCR byla provedena elektroforetická separace v agarózovém gelu (**Obr. č. 3**). Podle přítomnosti produktů byly vzorky hodnoceny jako metylované (M), nemetylované (U) nebo směsné (U/M).

V případě genu *RIL* bylo u MDS 8 vzorků metylovaných (47%), 6 směsných (35%) a 3 nemetylované (18%). U RAEB-1 byl jako metylovaný pouze jeden vzorek (20%), u RAEB-2 byly hodnoceny jako metylované 4 vzorky (67%). U AML bylo hodnoceno jako metylovaných 15 vzorků (56%) a jako směsných 12 vzorků (44%) (**Tab. č. 14**). Žádný ze vzorků AML nebyl pouze nemetylovaný (U). Progrese onemocnění v jednotlivých stádiích odpovídala nárůstu podílu vzorků s metylací ve sledovaném úseku genu *RIL*. Vzorek jedince po alogenní transplantaci a kontrolní vzorek zdravého jedince byly nemetylovány.

V případě genu *BLU* byly analyzovány především vzorky MDS, kdy byla zjištěna metylace ve 2 případech (13%), v 8 případech (54%) byla detekována přítomnost jak metylované tak nemetylované DNA a v 5 případech (33%) jsem zjistila pouze nemetylovanou DNA. U typu RAEB-2 byla v porovnání s RAEB-1 častěji detekována přítomnost metylované i nemetylované tkáně (50%). V případě AML byl hodnocen pouze jeden vzorek, který byl hodnocen jako směs metylované a nemetylované DNA (**Tab. č. 14**). Vzorek zdravého jedince byl hodnocen jako nemetylovaný. Z důvodu vysokého zastoupení nemetylované DNA, nebylo nadále pokračováno v analýzách u tohoto genu. Stejný soubor byl analyzován i u genu *RASSF1*. U tohoto genu byly jako metylované hodnoceny 3 vzorky (20%), jako směsné 2 vzorky (13%) a 10 vzorků (67%) bylo hodnoceno jako nemetylované. Vzorek pacienta AML byl hodnocen

jako směsný (**Tab. č. 14**). Vzorek zdravého jedince byl nemetylovaný. U tohoto souboru nebylo pokračováno v dalších analýzách z důvodu vysokého výskytu nemetylované DNA v této i pyrosekvenační analýze.

Gen *p15* byl u pacientů s MDS hodnocen v 8 vzorcích jako pouze nemetylovaný (47%). Přítomnost nemetylované DNA byla zjištěna ve všech vzorcích MDS, u 9 vzorků (53%) byla detekována současně i přítomnost metylované DNA (U/M). Metylovaná DNA byla ve více případech detekována u RAEB-2 (3 z 6) oproti RAEB-1 (1 z 5). U pacientů s onemocněním AML byla analyzovaná oblast promotoru genu *p15* metylovaná v 8 případech (30%), ve 13 případech (48%) byla detekována jak metylovaná tak nemetylovaná DNA a v 6 případech (22%) pouze nemetylovaná DNA (**Tab. č. 14**).

U pacienta, u kterého byla analyzována DNA pocházející ze vzorku periferní krve a kostní dřeně, nebyl detekován při hodnocení metylací žádný rozdíl mezi těmito typy vzorků.

Tabulka č. 14: Souhrn detekovaných metylačních změn v jednotlivých genech u vybraných analyzovaných hemato-onkologických onemocnění

gen	MDS			AML
	RAEB-1	RAEB-2	Další typy	
	M – M/U - U	M – M/U - U	M – M/U - U	M – M/U - U
<i>RIL</i>	1 – 2 - 2	4 – 1 - 1	3 – 3 - 0	15 - 12 - 0
<i>p15</i>	0 – 1 - 4	0 – 3 - 3	0 – 5 - 1	8 – 13 - 6
<i>BLU</i>	0 – 4 - 1	1 – 3 - 2	1 – 1 - 2	0 – 1 - 0
<i>RASSF1</i>	1 – 0 - 4	2 – 1 - 3	0 – 1 - 3	0 – 1 - 0

M- metylovaná DNA, M/U- smíšená DNA, U- nemetylovaná DNA, MDS- myelodysplastický syndrom, AML- akutní myeloidní leukemie, RAEB-1- refraktorní anemie s přebytkem blastů 1, RAEB-2- refraktorní anemie s přebytkem blastů 2

Obr. 3: Příklad výsledku separace produktů MSP u genů *RIL*, *p15*, *BLU* a *RASSF1*

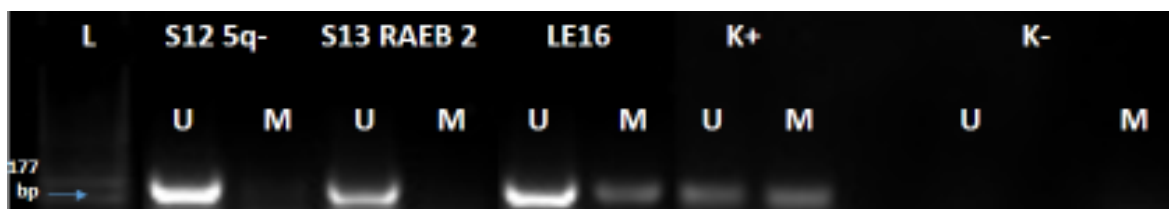
RIL



p15



BLU



RASSF1



L - 50 bp marker (Ladder), U- nemetylované, M - metylované, LE- akutní myeloidní leukemie, S- myelodysplastický syndrom, RAEB-1- refraktorní anemie s přebytkem blastů 1, RAEB-2- refraktorní anemie s přebytkem blastů 2, K+ pozitivní kontrola PCR, K- negativní kontrola PCR

5.2 Pyrosekvenování

Metylační analýza byla provedena u 45 vzorků pacientů s hemato-onkologickým onemocněním: ve 27 případech se jednalo o vzorky pacientů s AML a v 18 případech o vzorky pacientů s MDS. Pyrosekvenační analýza se týkala promotorových oblastí genů *RIL*, *BLU*, *RASSF1* a *p15* (Obr. č. 4). Pro statistické vyhodnocení výsledků byl použit test Wilcoxon Signed-Rank. Byla porovnávána úroveň metylace jednotlivých míst CpG mezi kontrolní

vzorkem (zdravý jedinec) a testovanými vzorky. Hladina významnosti byla stanovena na 0,05; pro p-hodnotu menší než 0,05 byl výsledek hodnocen jako signifikantní. Dalším výstupem této analýzy bylo průměrné procento úrovně metylace, které bylo vypočítáváno přímo při analýze příslušným programem (**Obr. č. 5**).

U genu *RIL* bylo hodnoceno 9 míst CpG v sekvenci promotoru o velikosti 90 bází (**Obr. č. 4**). Z průměru procentuálních úrovní metylace na jednotlivých pozicích CpG byla stanovena výsledná úroveň metylace v daném úseku uváděna v **tabulce č. 15**. Signifikantní zvýšení úrovně metylace oproti zdravému jedinci ($p \leq 0,05$) bylo stanoveno v 8 případech pacientů s MDS (47%). V případě pacienta po alogenní transplantaci nebyla detekována signifikantní změna v úrovni metylace. U pacientů s AML byla zjištěna ve 24 případech (89%) zvýšená úroveň metylace ve srovnání se zdravým jedincem. U genu *RIL* byla pozorována zvýšená metylace především na pozici 7., v tomto CpG bylo procento metylace vždy nejvyšší, v mnoha případech výrazně vyšší než u zbývajících míst CpG (**Obr. č. 5**).

U genu *p15* byly hodnoceny dva úseky. První se nacházel v oblasti promotoru (146 bází) s 13 dinukleotidy CpG. Druhý byl v oblasti 1. exonu (110 bází), v rámci tohoto úseku bylo hodnoceno 16 CpG (**Obr. č. 4**). U pacientů s MDS byl zjištěn v oblasti promotoru signifikantní nárůst úrovně metylace pouze ve 4 případech (22%), u pacientů s AML byl nárůst metylace oproti zdravému jedinci signifikantní ($p \leq 0,05$) v 19 případech (70%). V oblasti 1. exonu genu *p15*, bylo stanoveno zvýšení úrovně metylace u pacientů s MDS v 16 případech (89%) a u pacientů s AML v 5 případech (50%). U vzorku pacienta po alogenní transplantaci nedošlo k signifikantní změně úrovně metylace oproti kontrole v žádném ze sledovaných úseků genu (**Tab. č. 15**).

U genu *RASSF1* byl hodnocen úsek v oblasti promotoru genu o velikosti 136 bází (**Obr. č. 4**). K signifikantnímu navýšení metylace bylo zjištěno pouze v jednom případě MDS z 15 (6%), v případě AML byl analyzován pouze jeden vzorek, u kterého nebylo detekováno signifikantní navýšení úrovně metylace (**Tab. č. 16**).

V případě genu *BLU* byl analyzován úsek o délce 131 bází, na němž bylo hodnoceno 13 dinukleotidů CpG (**Obr. č. 4**). V tomto úseku byla zjištěna signifikantní změna úrovně metylace oproti kontrole ve dvou případech MDS z 15 hodnocených (13%). U AML byl analyzován 1 vzorek, u kterého nebyl detekován signifikantní nárůst metylace (**Tab. č. 16**). U těchto dvou genů nebyla pozorována závislost na námi sledovaných hemato-onkologických onemocněních, a z tohoto důvodu byly vyřazeny z dalších analýz.

Při porovnání vzorků periferní krve a aspirátů kostní dřeně stejného pacienta se nelišila úroveň metylace ani u jednoho z testovaných genů (*RIL*, *BLU*, *RASSF1* a *p15*).

Obrázek č. 4: Analyzované sekvence genů *RIL*, *p15*, *BLU* a *RASSF1*

RIL

GT Y C YGGTTTGTAGATTTAAGGTTYGAGTAGGATTTAGGTYGYGGGGYGTTY
 GAYCYGGGGATTTTGTAGAGTTGAGTGGGGGTGT

p15 promotor

GTTATTTTTGCYGGTTTTTGGTTTAGTTTTTGCYGTATCYGTTTTTAGTATTTTTGG
 GTAGGTTTTYGTTYGTGAYYGYGGTYGGGTTTGGTTTTYGYGATTT
 AGYGGATAGGGGGYGGAGTTTAAGGGGGTGGGA

p15 exon

YCYGAYCYGTYGTATTTTTYGGTTAGAGYGGTTTTGAGTYGGTCYGTYCY
 GTTAGCYGTTTTTTTTTAGAAGTAATTTAGCYCYGTYGTTGGTTTTGAGYGT
 AGGAAAAGT

BLU

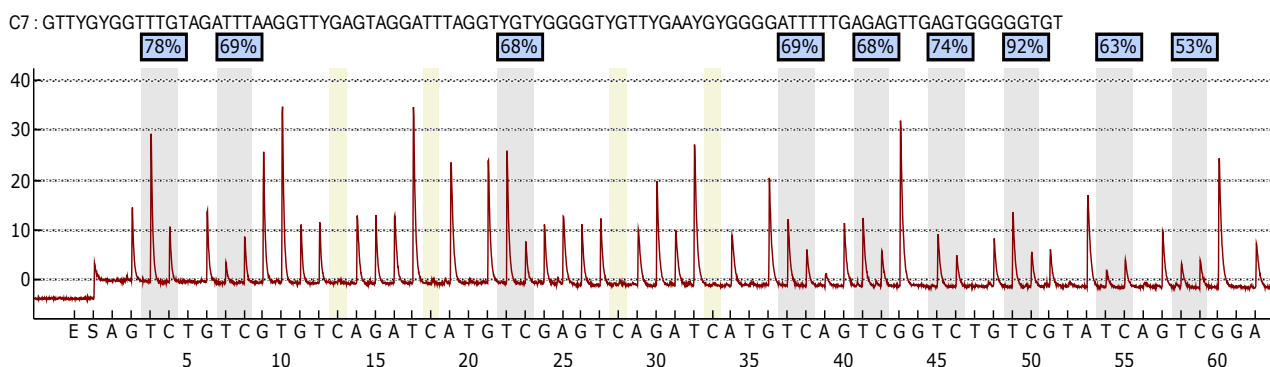
GATYGTGGGTTATAGTYGAGAAAGYGTTGGGAATTTAAATATTATGCYGATT
 GGTAGYCYGTAGCYAGCYGGTTAGAGATTYGTTYGGATTAGCYCYAGTT
 ATTTTTAGGGGYGGGGTTTAGGT

RASSF1

AGCYGGGGGGGTTTTCYGAGAGYCYGTTAGTTTTYGTTTTYGGGTTTTATAGTT
 TTTGTATTTAGGTTTTATTCYCYGGTTTTTTTTAGTTTTTTTTYGYGTTTAGTT
 GGATTTTGGGGGAGYGTTGAAGT

T – kontrola bisulfitové modifikace, Y= C nebo T, - analyzovaný CpG dinukleotid

Obrázek č. 5: Pyrogram- metylační analýza genu *RIL* u pacienta LE16



Tabulka č. 15: Výsledky pyrosekvenační analýzy metylací pro geny *p15* a *RIL*

Č. vzorku	<i>p15</i> exon		<i>p15</i> promotor		<i>RIL</i>	
	Průměr metylace [%]	p≤0,05	Průměr metylace [%]	p≤0,05	Průměr metylace [%]	p≤0,05
S1	7	signifikantní	4	nesignifikantní	38	signifikantní
S2	11	signifikantní	7	nesignifikantní	67	signifikantní
S3	5	signifikantní	3	nesignifikantní	27	signifikantní
S4	5	signifikantní	6	nesignifikantní	11	signifikantní
S5	6	signifikantní	4	nesignifikantní	12	signifikantní
S6	6	signifikantní	12	signifikantní	14	nesignifikantní
S7	5	signifikantní	5	signifikantní	10	signifikantní
S8	5	signifikantní	5	nesignifikantní	13	signifikantní
S9	6	signifikantní	9	nesignifikantní	30	signifikantní
S10	23	signifikantní	21	signifikantní	65	signifikantní
S11	6	signifikantní	4	nesignifikantní	19	nesignifikantní
S12	6	signifikantní	5	nesignifikantní	18	nesignifikantní
S13	6	signifikantní	8	signifikantní	38	signifikantní
S14	4	signifikantní	2	nesignifikantní	20	nesignifikantní
S15	2	nesignifikantní	3	nesignifikantní	18	nesignifikantní
S16	5	signifikantní	3	nesignifikantní	21	signifikantní
S17	5	signifikantní	4	nesignifikantní	30	signifikantní
S18	3	nesignifikantní	3	nesignifikantní	13	nesignifikantní
LE1	na	-	11	nesignifikantní	29	signifikantní
LE2	17	signifikantní	15	signifikantní	67	signifikantní
LE3	na	-	7	nesignifikantní	48	signifikantní
LE4	na	-	12	nesignifikantní	59	signifikantní
LE5	13	nesignifikantní	12	signifikantní	38	signifikantní
LE6	na	-	12	signifikantní	62	signifikantní
LE7	12	signifikantní	15	signifikantní	49	signifikantní
LE8	na	-	10	nesignifikantní	34	signifikantní
LE9	na	-	11	signifikantní	44	signifikantní

Č. vzorku	<i>p15</i> exon		<i>p15</i> promotor		<i>RIL</i>	
	Průměr metylace [%]	p≤0,05	Průměr metylace [%]	p≤0,05	Průměr metylace [%]	p≤0,05
LE10	4	nesignifikantní	14	signifikantní	64	signifikantní
LE11	19	signifikantní	15	signifikantní	17	nesignifikantní
LE12	na	-	9	signifikantní	68	signifikantní
LE13	4	nesignifikantní	7	signifikantní	23	signifikantní
LE14	na	-	5	signifikantní	53	signifikantní
LE15	na	-	16	signifikantní	25	signifikantní
LE16	11	signifikantní	8	signifikantní	71	signifikantní
LE17	na	-	20	signifikantní	83	signifikantní
LE18	na	-	30	signifikantní	65	signifikantní
LE19	na	-	5	nesignifikantní	64	signifikantní
LE20	na	-	9	signifikantní	41	signifikantní
LE21	na	-	24	signifikantní	65	signifikantní
LE22	11	signifikantní	9	signifikantní	20	signifikantní
LE23	na	-	10	signifikantní	27	signifikantní
LE24	na	-	10	signifikantní	34	signifikantní
LE25	6	nesignifikantní	6	signifikantní	18	nesignifikantní
LE26	1	signifikantní	5	nesignifikantní	24	nesignifikantní
LE27	24	nesignifikantní	4	nesignifikantní	24	signifikantní

Tabulka č. 16: Výsledky pyrosekvenační analýzy metylací pro geny *BLU* a *RASSF1*

Č. vzorku	<i>BLU</i> Průměrná metylace [%]	<i>BLU</i> p≤0,05	<i>RASSF1</i> Průměrná metylace [%]	<i>RASSF1</i> p≤0,05
S1	5	signifikantní	8	signifikantní
S2	3	nesignifikantní	4	nesignifikantní
S3	7	signifikantní	3	nesignifikantní
S4	2	nesignifikantní	4	nesignifikantní
S5	1	nesignifikantní	3	nesignifikantní
S6	2	nesignifikantní	4	nesignifikantní
S7	1	nesignifikantní	3	nesignifikantní
S8	2	nesignifikantní	3	nesignifikantní
S9	1	nesignifikantní	3	nesignifikantní
S10	3	nesignifikantní	5	nesignifikantní
S11	2	nesignifikantní	4	nesignifikantní
S12	2	nesignifikantní	3	nesignifikantní
S13	2	nesignifikantní	1	nesignifikantní
S14	2	nesignifikantní	1	nesignifikantní
S15	2	nesignifikantní	2	nesignifikantní
LE16	2	nesignifikantní	3	nesignifikantní

5.3 Expresní analýza

S cílem zjistit, zda-li metylace genu *RIL* má vliv na jeho expresi, byla provedena expresní analýza použitím kvantitativního Real-time PCR (qPCR). Jako provozní gen (*housekeeping gene*) byl zvolen gen *GAPDH* (Glyceraldehyd 3-fosfát dehydrogenáza). Jedná se o gen kódující oxidoreduktázu, podílející se na glykolýze a glukoneogenezi, a nachází se na 12. chromozomu. Gen *GAPDH* byl vybrán jako nejvhodnější po předcházející optimalizaci qPCR s několika jinými provozními geny. Expresní analýza byla provedena u vzorků pacientů s onemocněním AML, u kterých byl pyrosekvenační analýzou identifikován signifikantní nárůst úrovně metylace (některé vzorky byly vyřazeny z důvodu neprůkazné exprese genu *GAPDH*).

V 11 případech (73%) z 15 hodnocených vzorků došlo ke snížení exprese sledovaného genu *RIL* (Tab. č. 17)

Tabulka č. 17: Výsledky expresní analýzy

Č. vzorku	Ct <i>RIL</i>	Ct <i>GAPDH</i>	$2^{-\Delta\Delta Ct}$
LE5	29,32	28,50	0,7423
LE6	30,10	30,02	1,2397
LE7	29,78	29,73	1,2657
LE8	30,79	27,62	0,1456
LE10	29,85	23,81	0,0199
LE14	29,41	30,85	3,5554
LE12	26,27	26,19	1,2397
LE13	30,16	27,58	0,2191
LE15	28,93	27,68	0,5509
LE17	29,93	24,21	0,0249
LE18	29,29	28,73	0,8888
LE20	29,31	28,73	0,8766
LE21	28,90	24,84	0,0786
LE22	27,85	26,68	0,5824
LE27	30,33	29,55	0,7631

6 Diskuze

V mé diplomové práci jsem se zaměřila na analýzu genů, jejichž snížená exprese by mohla souviset se vznikem hemato-onkologických onemocnění jako je myelodysplastický syndrom (MDS), který může progredovat do akutní myeloidní leukémie (AML).

U pacientů s vysoce rizikovým stádiem MDS je zřejmá asociace mezi metylačními změnami v promotorech příslušných genů a expresí metyltransferáz DNA u genů kontrolující apoptózu (*p73*, *DAPK1*), opravu DNA (*MLH1*) nebo diferenciaci buněk (*RARB*, *WT1*) (Hopfer *et al.*, 2009). Metylační změny byly detekovány také v genech kontrolujících buněčný cyklus (*p14*, *p15*, *p16*). V práci Cechova *et al.* (2012) byly metylační změny detekovány častěji v genu *p15/INK4B* (77%) než v genu *p16/INK4A* (38%).

Je známo, že nejenom změny nukleotidové sekvence, ale rovněž epigenetické modifikace, mezi kterými je jednou z nejvýznamnějších *de novo* metylace CpG dinukleotidů, mohou mít velký vliv na vznik a vývoj nádorových onemocnění. Již v dřívější studii bylo popsáno, že ve vzorcích pacientů s AML byla detekována inaktivace genu *p15/INK4B* způsobena pouze metylací promotorového úseku tohoto genu. Následná metylační analýza DNA pacientů s MDS pak ukázala hypermetylací promotorového úseku nacházející se v 5'-konci ostrůvku CpG v oblasti 1. exonu (Uchida *et al.*, 1998). Častý výskyt metylace tohoto genu u pacientů s MDS a AML byl pozorován i v promotorové oblasti genu *p15* (Au *et al.*, 2003). Výsledky této studie potvrzují závěry těchto prací o výskytu metylací jak v promotorové oblasti tak v oblasti 1. exonu genu *p15* u MDS a AML.

Pro metylační a expresní analýzy, které byly popsány a realizovány v této diplomové práci, byly vybrány geny *RIL*, *p15*, *BLU* a *RASSF1*. Gen *RIL*, patřící do skupiny genů s LIM doménou, byl lokalizován v chromozomovém úseku 5q31.1 (Bashirova *et al.*, 1998, Bumber *et al.*, 2007) jako potenciální tumor-supresorový gen. Vedle toho je delece dlouhého raménka chromozomu 5q jednou z nejčastějších cytogenetických změn u MDS. Izolovaná delece 5q je podle WHO jednou z klasifikačních podskupin MDS označovaná jako 5q- syndrom. I když mohou být delece 5q různě dlouhé, byly objeveny dvě běžně deletované oblasti. Úsek blíže telomeře, obsahující 40 genů, byl identifikován jako 5q33 (Boulton *et al.*, 2002). Druhým deletovaným úsekem je 5q31 (Lai *et al.*, 2001). Je blíže k telomeře a je spojován s agresivnější formou nemoci, špatnou prognózou a rychlou transformací do AML. Právě

delece 5q31 činí geny nacházející se v této oblasti, mezi které patří i *RIL*, náchylné k inaktivaci genetickými, ale i epigenetickými mechanismy. V rámci řešení této diplomové práce, jsem provedla metylační analýzu dvou pacientů s MDS, z nichž u jednoho došlo k progresi onemocnění do AML. V prvním případě se jednalo o pacienta, u kterého byl diagnostikován MDS (RAEB- 2) a z tohoto stádia pocházel první vzorek. Pacient byl léčen Vidázou a bezprostředně po ukončení této léčby, byl odebrán druhý vzorek. Metylace u prvního vzorku byla signifikantně zvýšena - 27% oproti zdravému jedinci, a u druhého vzorku došlo k poklesu metylace (18%) při současné zlepšení zdravotního stavu pacienta. U druhého pacienta, u něhož došlo k progresi onemocnění v AML, byla ve vzorku, odebraném před léčbou, detekována výrazně zvýšená metylace (67%) ve srovnání s mírou metylace u kontrolního zdravého jedince. V průběhu léčby Vidázou byl odebrán další vzorek, u něhož jsem detekovala sníženou úroveň metylace (38%) oproti prvnímu vzorku, ale po přerušení léčby, kdy onemocnění progredovalo, se úroveň metylace zvýšila na 59%. Z uvedeného vyplývá, že epigenetický mechanismus metylačních změn je velmi pravděpodobně jedním z mechanismů inaktivace genu *RIL*. Tento gen je zřejmě účinkem demetylační léčby ovlivňován, ale u pacientů s velmi vysokou úrovní metylace ve sledovaných úsecích nemusí být tento typ léčby dostatečný.

V rámci této studie byla provedena analýza exprese genu *RIL* u vzorků pacientů s onemocněním AML. I u těchto vzorků jsem zjistila signifikantní zvýšení metylace při současném snížení exprese genu *RIL* v 73% případech. Expresní analýza tak potvrdila hypotézu, že epigenetické změny genu *RIL* mohou být jednou z možností jeho umlčení.

Pro statistické vyhodnocení byl z důvodu snížené dostupnosti vzorků použit menší soubor vzorků pacientů s AML. Soubor byl současně zmenšen o několik vzorků z důvodu nehodnotitelné exprese provozního genu *GAPDH*, což není u klinických vzorků bohužel výjimkou. Gen *GAPDH* byl vybrán po optimalizaci programu a expresních analýzách několika jiných provozních genů (např. *TBP*, *SRY*, *HPRT1*) vzhledem k jeho nejnižším hodnotám Ct v porovnání s ostatními testovanými provozními geny. U nádorových malignit působí stres i na provozní geny a ty u pokročilých forem onemocnění bývají také v některých tkáních zasaženy (Vandesompele *et al.*, 2002).

Ve studii, týkající se detekce metylací metodou MSP v oblasti promotoru genu *BLU*, byla zjištěna vysoká frekvence metylačních změn u DNA ze vzorků pacientů s MDS (Yang *et al.*, 2012). Kromě toho byla pozorována závislost míry metylačních změn na stádiu a subtypy tohoto onemocnění. V této diplomové práci jsem metodou MSP detekovala u některých vzorků přítomnost metylací v promotorové oblasti genu. Metylovaná DNA byla detekována u 67%

testovaných vzorků pacientů s MDS, ve většině případů se ovšem jednalo o směs metylované a nemetylované DNA. Pouze metylovaná DNA byla identifikována pouze v 13% sledovaných vzorků. Metylační analýza pomocí pyrosekvenování ovšem ukázala, že nárůst metylací, ke kterému u těchto vzorků dochází, je oproti kontrolnímu vzorku minimální a není tedy signifikantní.

Gen *RASSF1* byl ve většině případů u MSP analýzy hodnocen jako nemetylovaný a toto zjištění potvrdila i pyrosekvenáční analýza kdy u tohoto genu byl detekován signifikantní nárůst úrovně methylace pouze v jediném případě (6%). Tyto výsledky naznačují, v případě tohoto genu u onemocnění MDS nedochází k jeho inaktivaci v důsledku metylačních změn DNA v oblasti promotoru.

Metoda MSP je pro svou relativní nenáročnost jednou z nejpoužívanějších pro detekci metylací. Předností této metody je sice vysoká citlivost, ovšem neumožňuje kvantifikaci metylačních změn, i přes to, že proběhly pokusy o semikvantifikaci na základě intenzity bandů (Karayan-Tapon *et al.*, 2010). Nevýhodou metody MSP je rovněž velká míra subjektivity při vyhodnocování výsledků. Vážným problémem této metody je také nemožnost určení míry účinnosti bisulfitové konverze DNA, která nemusí být ve všech případech 100 % a může tak ovlivnit typ výsledku. Nedostatky metody MSP odstraňuje pyrosekvenáční metylační analýza. Pyrosekvenování umožňuje kontrolu bisulfitové konverze DNA na cytosinech mimo dinukleotidy CpG a zjištěné hodnoty ovlivňují průkaznost hodnot při výpočtu procenta methylace v jednotlivých místech CpG. V některých studiích (Quillien *et al.*, 2012) je doporučována právě kombinace MSP a pyrosekvenování s cílem co nejpřesnější metylační analýzy. Jedná se podle některých srovnání metod detekce metylací o dva nejúčinnější metodické přístupy v této oblasti (Quillien *et al.*, 2012).

7 Závěr

V rámci své diplomové práce jsem vypracovala literární rešerši na téma kvantifikace metylací metodou pyrosekvenování u dvou hemato-onkologických onemocnění: MDS a AML. Následně jsem na základě získaných výsledků zpracovala praktickou část. Jejím obsahem je provedení bisulfitové modifikace DNA u vzorků pacientů sledovaných hemato-onkologických malignit. U vzorků s modifikovanou DNA byly provedeny analýzy vybraných genů metodou MSP a pyrosekvenační analýzou. Dále byla ze vzorků krve vybraných pacientů izolovaná RNA, reverzní transkripce připravena cDNA a následným real-time PCR analýza stanovena exprese genu *RIL*.

Analýza genu *RIL* potvrdila významnou úlohu metylace DNA v promotorovém úseku tohoto genu na snížení, případně vymizení jeho exprese u pacientů s AML. Výsledky metylačních analýz genu *RIL* související s úrovní jeho exprese, naznačují jeho účast mechanismu nádorové progresy z MDS v AML. Tento gen by mohl být nejenom velmi užitečným markerem, ale i jedním z cílových genů léčby MDS pomocí demetylačních látek.

K významným metylačním změnám dochází u těchto onemocnění, jak potvrdila pyrosekvenační analýza i MSP, často i u sledovaného genu *p15*. U dalších testovaných genů *BLU* a *RASSF1* nebyly pozorovány výrazné změny v úrovni metylace DNA.

8 Seznam použitých zkratek

20S	20Svedberg (sedimentační koeficient)
ALP	<i>alkaline phosphatase</i>
AML	akutní myeloidní leukémie (<i>acute myeloid leukemia</i>)
AML1	<i>Acute myeloid leukemia 1</i>
APL	akutní promyelocytární leukémie (<i>acute promyelocytic leukemia</i>)
Ara-C	Cytarabin
ASXL1	<i>Additional sex comb like 1</i>
AUL	akutní nediferencovaná leukémie (<i>acute undifferentiated leukemia</i>)
Bcl2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
bp	páry bazí (<i>base pair</i>)
CBFB,	<i>core-binding factor, beta subunit</i>
CCD	<i>charge-coupled device</i>
CDK	cyklin-dependentní kinázy (<i>Cyclin-dependent kinase</i>)
CDKN2B	<i>cyclin-dependent kinase inhibitor 2B</i> (INK4B, P15)
cDNA	complementary DNA (DNA vzniklá zpětným přepisem z RNA)
CEBPA	<i>CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), alpha</i>
CFU-GEMM	<i>Colony Forming Unit, G - granulocyte, E - erythrocyte, M - macrophage, M - megakaryocyte</i> (progenitorové kmenové buňky)
CpG	cytosin spojen fosfátovou vazbou s guaninem
DAPK1	<i>death-associated protein kinase 1</i>
ddH ₂ O	deionizovaná voda (<i>double-distilled water</i>)
depcH ₂ O	voda ošetřená Dietylpyrocarbonátem (odstranění RNáz)
DNA	deoxyribonukleová kyselina (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
DNMT	DNA metyltransferáza (<i>DNA methyltransferase</i>)
dNTPs	deoxyribonukleosid trifosfáty
FAB	Francouzsko-americkobritská klasifikace (<i>French-American-British classification</i>)
F-aktin	fibrilární aktin
FLT3	<i>fms-related tyrosine kinase 3</i>

FN	Fakultní nemocnice
GAPDH	<i>glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>
G-CSF	faktor stimulující růst kolonií granulocytů (<i>Granulocyte colony-stimulating factor</i>)
GM-CSF	faktor stimulující růst kolonií makrofágů a granulocytů (<i>Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>)
GTPáza	guanosintrifosfát fosfohydroláza
HDACI	inhibitory histonových deacetyláz (<i>histone deacetylase inhibitors</i>)
HPRT1	<i>hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1</i>
IDH1	<i>Isocitrate dehydrogenase 1</i>
IDH2	<i>Isocitrate dehydrogenase 2</i>
Int-1	intermediate-1-risk
Int-2	intermediate-2-risk
IPSS	Mezinárodní prognostický skórovací systém (<i>International Prognostic Scoring System</i>)
JAK2	<i>Janus kinase 2</i>
KRAS	<i>Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog</i>
LE	akutní myeloidní leukémie (v označení vzorků)
LIM	doména označená prvními písmeny genů <i>Lin11</i> , <i>Isl1</i> , <i>Mec3</i> , u nichž byla nejprve identifikována
MDS	myelodysplastický syndrom (<i>myelodysplastic syndrome</i>)
MDS-U	myelodysplastický syndrom, neklasifikovaný (<i>myelodysplastic syndrome, unclassified</i>)
MEK1	mitogen-activated protein <i>kinase kinase 1</i>
MLH1	<i>mutL homolog 1</i>
MLL	<i>Mixed lineage leukemia</i>
MSP	metylačně specifická PCR (<i>Methylation Specific PCR</i>)
MYND	doména tvořena počátečními písmeny <i>Myeloid</i> , <i>Nervy</i> a <i>DEAF-1</i>
NAD(P)H	nikotinamid adenin dinukleotid fosfát
NGS	sekvenační metody nové generace (<i>next generation sequencing</i>)
NK buňky	druh lymfocytu (<i>natural killer</i>)
NPM1	<i>nucleolar phosphoprotein B23</i>
NRAS	<i>neuroblastoma RAS viral (v-ras) oncogene homolog</i>

p	krátké rameno chromozómu
PCR	polymerázová řetězová reakce (<i>polymerase chain reaction</i>)
PDZ	doména, název tvořen prvními písmeny <i>Post synaptic density protein</i> , <i>Drosophila disc large tumor suppressor</i> a <i>Zonula occludens-1 protein</i>
q	dlouhé rameno chromozómu
qPCR	real-time PCR
RAEB	refraktorní anemie s přebytkem blastů (<i>refractory anemia with excess of blasts</i>)
RARA	<i>retinoic acid receptor, alpha</i>
RARB	<i>retinoic acid receptor, beta</i>
RARS	refraktorní anemie s prstenčitými sideroblasty (<i>refractory anemia with ringed sideroblasts</i>)
RAS	<i>Rat sarcoma</i>
RASSF1	<i>Ras association domain family member 1</i>
RCMD	refraktorní cytopenie s multilineární dysplasií (<i>refractory cytopenia with multilineage dysplasia</i>)
RCUD	Refraktorní cytopenie s unilineární dysplasií (<i>refractory cytopenia with unilineage dysplasia</i>)
RIL	<i>reversion-induced LIM protein</i>
RNA	ribonukleová kyselina (<i>ribonucleic acid</i>)
RUNX1	<i>Runt-related transcription factor</i>
RUNX1T1	<i>runt-related transcription factor 1; translocated to, 1 (ETO)</i>
S	myelodysplastický syndrom (v označení vzorků)
SAM	S-adenosylmetionin
SF3B1	<i>splicing factor 3b, subunit 1</i>
SRY	<i>sex determining region Y</i>
TBP	<i>TATA box binding protein</i>
TET2	<i>Tet methylcytosine dioxygenase 2</i>
TGF- β 1	<i>Transforming Growth Factor</i>
TP53	<i>tumor protein p73 (p73)</i>
tzv	tak zvané
USA	Spojené státy americké (<i>United States of America</i>)
UV	Ultrafialové záření (<i>ultraviolet light</i>)

V-Raf	<i>proto-oncogene serine/threonine-protein kinase</i>
WHO	Světová zdravotnická organizace (<i>World Health Organization</i>)
WT1	<i>Wilms tumor 1</i>
ZMYND10	<i>Zinc Finger, MYND Domain-Containing Protein 10 (BLU)</i>

9 Seznam použité literatury

- Agathangelou A., Honorio S., Macartney D. P., Martinez A., Dallol A., Rader J., Fullwood P., Chauhan A., Walker R., Shaw J.A., Hosoe S., Lerman M.I., Minna J.D., Maher E.R., Latif F. (2001): Methylation associated inactivation of RASSF1A from region 3p21.3 in lung, breast and ovarian tumours. *Oncogene*. 20(12): 1509-1518.
- Agathangelou A., Dallol A., Zöchbauer-Müller S., Morrissey C., Honorio S., Hesson L., Martinsson T., Fong K.M., Kuo M.J., Yuen P.W., Maher E.R., Minna J.D., Latif F. (2003): Epigenetic inactivation of the candidate 3p21.3 suppressor gene BLU in human cancers. *Oncogene*. 22(10): 1580-1588.
- Akalin A., Garrett-Bakelman F. E., Kormaksson M., Busuttil J., Zhang L., Khrebtukova I., Milne T.A., Huang Y., Biswas D., Hess J.L., Allis C.D., Roeder R.G., Valk P.J., Löwenberg B., Delwel R., Fernandez H.F., Paietta E., Tallman M.S., Schroth G.P., Mason C.E., Melnick A., Figueroa M. E. (2012): Base-pair resolution DNA methylation sequencing reveals profoundly divergent epigenetic landscapes in acute myeloid leukemia. *PLoS genetics*. 8(6): e1002781.
- Aoki E., Uchida T., Ohashi H., Nagai H., Murase T., Ichikawa A., Yamao K., Hotta T., Kinoshita T., Saito H., Murate T. (2000): Methylation status of the p15 INK4B gene in hematopoietic progenitors and peripheral blood cells in myelodysplastic syndromes. *Leukemia*. 14(4): 586-593.
- Asou N. (2003): The role of a Runt domain transcription factor AML1/RUNX1 in leukemogenesis and its clinical implications. *Critical reviews in oncology/hematology*. 45(2): 129-150.
- Au W. Y., Fung A., Man C., Ma S. K., Wan T. S., Liang R., Kwong Y. L. (2003): Aberrant p15 gene promoter methylation in therapy-related myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukaemia: clinicopathological and karyotypic associations. *British journal of haematology*. 120(6): 1062-1065.
- Audebert S., Navarro C., Nourry C., Chasserot-Golaz S., Lécine P., Bellaïche Y., Dupont J.L., Premont R.T., Sempéré Ch., Strub J.M., Van Dorsselaer A., Vitale N., Borg, J. P. (2004): Mammalian Scribble forms a tight complex with the β PIX exchange factor. *Current Biology*. 14(11): 987-995

- Aul C., Giagounidis A., Germing U. (2001): Epidemiological features of myelodysplastic syndromes: results from regional cancer surveys and hospital-based statistics. *International journal of hematology*. 73: 405-410.
- Bashirova A. A., Markelov M. L., Shlykova T. V., Levshenkova E. V., Alibaeva R. A., Frolova E. I. (1998): The human RIL gene: mapping to human chromosome 5q31. 1, genomic organization and alternative transcripts. *Gene*. 210(2): 239-245.
- Bejar R. (2014): Clinical and genetic predictors of prognosis in myelodysplastic syndromes. *Haematologica*. 99(6): 956-964.
- Bejar R., Stevenson K.E., Caughey B., Lindsley R.C., Mar B.G., Stojanov, P., Getz G., Steensma D.P., Ritz J., Soiffer R., Antin J.H., Alyea E., Armand P., Ho V., Koreth J., Neuberg D., Cutler C.S., Ebert B.L. (2014): Somatic mutations predict poor outcome in patients with myelodysplastic syndrome after hematopoietic stem-cell transplantation. *Journal of Clinical Oncology*. 32(25): 2691-2698.
- Boultonwood J., Fidler C., Strickson A. J., Watkins F., Gama S., Kearney, L., Tosi S., Kasprzyk A., Cheng J.F., Jaju R.J., Wainscoat, J. S. (2002): Narrowing and genomic annotation of the commonly deleted region of the 5q- syndrome. *Blood*. 99(12): 4638-4641.
- Boumber Y. A., Kondo Y., Chen X., Shen L., Gharibyan V., Konishi K., Estey E., Kantarjian H., Garcia-Manero G., Issa 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(5): 1997-2005.
- Bradstock K. F., Matthews J. P., Lowenthal R. M., Baxter H., Catalano J., Brighton T., Gill D., Eliadis P., Joshua D., Cannell P., Schwarzer A.P., Durrant S., Gillett A., Koutts J., Taylor K., Bashford J., Arthur Ch., Enno A., Dunlop L., Szer J., Leahy M., Juneja S., Young G. A. (2005): A randomized trial of high-versus conventional-dose cytarabine in consolidation chemotherapy for adult de novo acute myeloid leukemia in first remission after induction therapy containing high-dose cytarabine. *Blood*. 105(2): 481-488.
- Büchner T., Hiddemann W., Schoch C., Haferlach T., Sauerland M. C., Heinecke A. (2001): Acute myeloid leukaemia (AML): treatment of the older patient. *Best Practice & Research Clinical Haematology*. 14(1): 139-151.
- Cechova H., Lassuthova P., Novakova L., Belickova M., Stemberkova R., Jencik J., Stankova M., Hrabakova P., Pegova K., Zizkova H., Cermak J. (2011): Monitoring of

- methylation changes in 9p21 region in patients with myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia. *Neoplasma*. 59(2): 168-174.
- Cetkovský P. (2007): Invasive fungous infections in post haematopoietic stem cell transplant patients--editorial. *Vnitřní lékařství*. 53(9): 931.
- Crane M. M., Strom S. S., Halabi S., Berman E. L., Fueger J. J., Spitz M. R., & Keating M. J. (1996): Correlation between selected environmental exposures and karyotype in acute myelocytic leukemia. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*. 5(8): 639-644.
- Cuppen E., Nagata S., Wieringa B., Hendriks W. (1997): No evidence for involvement of mouse protein-tyrosine phosphatase-BAS-like Fas-associated phosphatase-1 in Fas-mediated apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*. 272(48): 30215-30220.
- Čermák J., Kačírková P. (2003): Akutní myelodní leukemie a myelodysplastický syndrom. *Lékařské listy*. 11/2013
- Dallol A., Agathangelou A., Tommasi S., Pfeifer G. P., Maher E. R., Latif F. (2005): Involvement of the RASSF1A tumor suppressor gene in controlling cell migration. *Cancer Research*. 65: 7653-7659.
- Dammann R., Li C., Yoon J. H., Chin P. L., Bates S., Pfeifer G. P. (2000): Epigenetic inactivation of a RAS association domain family protein from the lung tumour suppressor locus 3p21. 3. *Nature genetics*. 25(3): 315-319.
- Dayyani F., Conley A. P., Strom S. S., Stevenson W., Cortes J. E., Borthakur G., Faderl S., O'Brien S., Pierce S., Kantarjian H., Garcia-Manero, G. (2010): Cause of death in patients with lower-risk myelodysplastic syndrome. *Cancer*. 116(9): 2174-2179.
- Deschler B., Lübbert M. (2006): Acute myeloid leukemia: epidemiology and etiology. *Cancer*. 107(9): 2099-2107.
- Dodge J., List A. F., Futscher B. W. (1998): Selective Variegated Methylation of the P15 CpG Island in Acute Myeloid Leukemia. *International Journal of Cancer* 78: 561-567
- Dong S. M., Byun H. J., Kim B. R., Lee S. H., Trink B., Rho S. B. (2012): Tumor suppressor BLU enhances pro-apoptotic activity of sMEK1 through physical interaction. *Cellular signalling*. 24(6): 1208-1214.
- Drexler H. G. (1998): Review of alterations of the cyclin-dependent kinase inhibitor INK4 family genes p15, p16, p18 and p19 in human leukemia-lymphoma cells. *Leukemia*. 12(6): 845-859.
- England R., Pettersson M. (2005): Pyro Q-CpGTM: quantitative analysis of methylation in multiple CpG sites by Pyrosequencing®. *Nature Methods*. 2(10).

- Figuroa M. E., Skrabanek L., Li Y., Jiemjit A., Fandy T. E., Paietta E., Fernandez H., Tallman M.S., Grealley J.M., Carraway H., Licht J.D., Gore S.D., Melnick A. (2009): MDS and secondary AML display unique patterns and abundance of aberrant DNA methylation. *Blood*. 114(16): 3448-3458.
- Figuroa M. E., Abdel-Wahab O., Lu C., Ward P. S., Patel J., Shih A., Li Y., Bhagwat N., Vasanthakumar A., Fernandez H.F., Tallman M.S., Sun Z., Wolniak K., Peeters J.K., Liu W., Choe S.E., Fantin V.R., Paietta E., Löwenberg B., Licht J.D., Godley L.A., Delwel R., Valk P.J.M., Thompson C.B., Levine R.L., Melnick, A. (2010): Leukemic IDH1 and IDH2 mutations result in a hypermethylation phenotype, disrupt TET2 function, and impair hematopoietic differentiation. *Cancer cell*. 18(6): 553-567.
- Giagounidis A., List A. F., Hellstrom-Lindberg E., Mufti G. J., Schlegelberger B., Morrill J., Wu Ch., Skikne B., Fenaux P., Göhring, G. (2014): Prevalence and Clinical Impact of Additional Cytogenetic Abnormalities in Patients (Pts) with Myelodysplastic Syndromes (MDS) and Deletion 5q from the MDS-003 and MDS-004 Studies. *Blood*. 124(21): 3270-3270.
- Greenberg P., Cox C., LeBeau M. M., Fenaux P., Morel P., Sanz G., Vallespi T., Hamblin T., Oscier D., Ohyashiki K., Toyama K., Aul C., Mufti G., Bennett J. (1997): International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. *Blood*. 89(6): 2079-2088.
- Grimwade D., Walker H., Oliver F., Wheatley K., Harrison C., Harrison G., Rees J., Hann I., Stevens R., Burnett A., Goldstone, A. (1998): The importance of diagnostic cytogenetics on outcome in AML: analysis of 1,612 patients entered into the MRC AML 10 trial. *Blood*. 92(7): 2322-2333.
- Guan Y., Hogge D. E. (2000): Proliferative status of primitive hematopoietic progenitors from patients with acute myelogenous leukemia (AML). *Leukemia*. 14: 2135-2141.
- Guryanova O. A., Drazba J. A., Frolova E. I., Chumakov P. M. (2011): Actin cytoskeleton remodeling by the alternatively spliced isoform of PDLIM4/RIL protein. *Journal of Biological Chemistry*. 286(30): 26849-26859.
- Guy P. M., Kenny D. A., Gill G. N. (1999): The PDZ domain of the LIM protein enigma binds to β -tropomyosin. *Molecular biology of the cell*. 10(6): 1973-1984.
- Herman J. G., Graff J. R., Myöhänen S. B. D. N., Nelkin B. D., Baylin S. B. (1996): Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 93(18): 9821-9826.

- Hernández H. G., Tse M. Y., Pang S. C., Arboleda H., Forero D. A. (2013): Optimizing methodologies for PCR-based DNA methylation analysis. *BioTechniques*. 55:181-197
- Hesson L., Bièche I., Krex D., Criniere E., Hoang-Xuan K., Maher E. R., Latif F. (2004): Frequent epigenetic inactivation of RASSF1A and BLU genes located within the critical 3p21.3 region in gliomas. *Oncogene*. 23(13): 2408-2419.
- Hirai H. (2003): Molecular mechanisms of myelodysplastic syndrome. *Japanese journal of clinical oncology*. 33(4): 153-160.
- Hopfer O., Komor M., Koehler I. S., Freitag C., Schulze M., Hoelzer D., Thiel E., Hofmann W. K. (2009): Aberrant promotor methylation in MDS hematopoietic cells during in vitro lineage specific differentiation is differently associated with DNMT isoforms. *Leukemia research*. 33(3): 434-442.
- Iwasaki H., Akashi K. (2007): Hematopoietic developmental pathways: on cellular basis. *Oncogene*. 26(47): 6687-6696.
- Jen J., Harper J.W., Bigner S.H., Bigner D. D., Papadopoulos N., Markowitz S., Wilson J. K. V., Kinzler K. W., Vogelstein B. (1994): Deletion of p16 and p15 Genes in Brain Tumors. *Cancer Research*. 54: 6353-6358.
- Jerez A., Gondek L. P., Jankowska A. M., Makishima H., Przychodzen B., Tiu R. V., O'Keefe Ch. L., Mohamedali A.M., Batista D., Sekeres M.A., McDevitt M.A., Mufti G.J., Maciejewski J. P. (2012): Topography, clinical, and genomic correlates of 5q myeloid malignancies revisited. *Journal of Clinical Oncology*. 30(12): 1343-1349.
- Jonas B. A., Greenberg P. L. (2014): MDS prognostic scoring systems—Past, present, and future. *Best Practice & Research Clinical Haematology*. 28(1): 3-13.
- Karayan-Tapon L., Quillien V., Guilhot J., Wager M., Fromont G., Saikali S., Etcheverry A., Hamlat A., Loussouarn D., Campion L., Campone M., Vallette F., Gratas-Rabbia-Ré, C. (2010): Prognostic value of O6-methylguanine-DNA methyltransferase status in glioblastoma patients, assessed by five different methods. *Journal of neuro-oncology*. 97(3): 311-322.
- Kerr J. R., Barah F., Cunniffe V. S., Smith J., Vallely P. J., Will A. M., Wynn R.F., Stevens R.F., Taylor G.M., Cleator G.M., Eden, O. B. (2003): Association of acute parvovirus B19 infection with new onset of acute lymphoblastic and myeloblastic leukaemia. *Journal of clinical pathology*. 56(11): 873-875.

- Kiess M., Scharm B., Aguzzi A., Hajnal A., Klemenz R., Schwarte-Waldhoff I., Schäfer R. (1995): Expression of ril, a novel LIM domain gene, is down-regulated in Hras-transformed cells and restored in phenotypic revertants. *Oncogene*. 10(1): 61-68.
- Kim G. D., Ni J., Kelesoglu N., Roberts R. J., Pradhan S. (2002): Co-operation and communication between the human maintenance and de novo DNA (cytosine-5) methyltransferases. *The EMBO journal*. 21(15): 4183-4195.
- Ko M., Huang Y., Jankowska A. M., Pape U. J., Tahiliani M., Bandukwala H. S., Lamperti E.D., Koh K.P., Ganetzky R., Liu X.S., Aravind L., Agarwal S., Maciejewski J.P., Rao A. (2010): Impaired hydroxylation of 5-methylcytosine in myeloid cancers with mutant TET2. *Nature*. 468(7325): 839-843.
- Koreth J., Pidala J., Perez W. S., Deeg H. J., Garcia-Manero G., Malcovati L., Cazzola M., Park S., Itzykson R., Ades L., Fenaux P., Jadersten M., Hellstrom-Lindberg E., Gale R. P., Beach C. L., Lee S. L., Horowitz M. M., Greenberg P. L., Tallman M. S., DiPersio J. F., Bunjes D., Weisdorf D. J., Cutler C. (2013): Role of reduced-intensity conditioning allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation in older patients with de novo myelodysplastic syndromes: an international collaborative decision analysis. *Journal of Clinical Oncology*. 31(21): 2662-2670.
- Kostrouchova M., Kostrouch Z., Kostrouchova M. (2007): Valproic acid, a molecular lead to multiple regulatory pathways. *Folia Biologica*. 53(2):37-49.
- Krug U., Ganser A., Koeffler H. P. (2002): Tumor suppressor genes in normal and malignant hematopoiesis. *Oncogene*. 21(21): 3475-3495.
- Kulasekararaj A. G., Smith A. E., Mian S. A., Mohamedali A. M., Krishnamurthy P., Lea N. C., Gäken J., Pennaneach C., Ireland R., Czepulkowski B., Pomplun S., Marsh J.C., Mufti G. J. (2013): TP53 mutations in myelodysplastic syndrome are strongly correlated with aberrations of chromosome 5, and correlate with adverse prognosis. *British journal of haematology*. 160(5): 660-672.
- Lai F., Godley L. A., Joslin J., Fernald A. A., Liu J., Espinosa R., Zhao N., Pamintuan L., Till B.G., Larson R.A., Qian Z, Le Beau M. M. (2001): Transcript map and comparative analysis of the 1.5-Mb commonly deleted segment of human 5q31 in malignant myeloid diseases with a del (5q). *Genomics*. 71(2): 235-245.
- Leone G., Voso M. T., Teofili L., Lübbert M. (2003): Inhibitors of DNA methylation in the treatment of hematological malignancies and MDS. *Clinical Immunology*. 109(1): 89-102.

- Lima M., Giralt S., Thall P. F., de Padua Silva L., Jones R. B., Komanduri K., Braun T.M., Nguyen H.Q., Champlin R., Garcia-Manero, G. (2010): Maintenance therapy with low-dose azacitidine after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for recurrent acute myelogenous leukemia or myelodysplastic syndrome. *Cancer*. 116(23): 5420-5431.
- Liu X. Q., Chen H. K., Zhang X. S., Pan Z. G., Li A., Feng Q. S., Long Q.X., Wang X.Z., Zeng Y. X. (2003): Alterations of BLU, a candidate tumor suppressor gene on chromosome 3p21. 3, in human nasopharyngeal carcinoma. *International journal of cancer*. 106(1): 60-65.
- Liu L., Vo A., McKeehan W. L. (2005): Specificity of the methylation-suppressed A isoform of candidate tumor suppressor RASSF1 for microtubule hyperstabilization is determined by cell death inducer C19ORF5. *Cancer research*. 65(5): 1830-1838.
- Löwenberg B., Griffin J. D., Tallman M. S. (2003): Acute myeloid leukemia and acute promyelotic leukemia. *Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program* 82-101.
- Lyons R. M., Marek B. J., Paley C., Esposito J., Garbo L., DiBella N., Garcia-Manero G. (2014): Comparison of 24-month outcomes in chelated and non-chelated lower-risk patients with myelodysplastic syndromes in a prospective registry. *Leukemia research*. 38(2): 149-154.
- Miyoshi H., Ohira M., Shimizu K., Mitani K., Hirai H., Imai T., Yokoyama K., Soeda E., Ohki M. (1995): Alternative splicing and genomic structure of the AML1 gene involved in acute myeloid leukemia. *Nucleic Acids Research*. 23(14):2762-2769.
- Mufti G. J. (2004): Pathobiology, classification, and diagnosis of myelodysplastic syndrome. *Best Practice & Research Clinical Haematology*. 17: 543-557.
- Mufti G. J., Bennett J. M., Goasguen J., Bain B. J., Baumann I., Brunning R., Cazzola M., Fenaux P., Germing U., Hellström-Lindberg E., Jinnai I., Manabe A., Matsuda A., Niemeyer C. M., Sanz G., Tomonaga M., Vallespi T., Yoshimi A. (2008): Diagnosis and classification of myelodysplastic syndrome: International Working Group on Morphology of myelodysplastic syndrome (IWGM-MDS) consensus proposals for the definition and enumeration of myeloblasts and ring sideroblasts. *Haematologica*. 93(11): 1712-1717.
- Park S. T., Byun H. J., Kim B. R., Dong S. M., Park S. H., Jang P. R., Rho S. B. (2013): Tumor suppressor BLU promotes paclitaxel antitumor activity by inducing apoptosis through

- the down-regulation of Bcl-2 expression in tumorigenesis. *Biochemical and biophysical research communications*. 435(1): 153-159.
- Passegué E., Jamieson C. H., Ailles L. E., Weissman I. L. (2003): Normal and leukemic hematopoiesis: are leukemias a stem cell disorder or a reacquisition of stem cell characteristics?. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 100: 11842-11849.
- Pecka M. (2002): Laboratorní hematologie v přehledu: Buňka a krvetvorba. Finidr, Český Těšín. Pp. 68-154.
- Platzbecker U., Wermke M., Radke J., Oelschlaegel U., Seltmann F., Kiani A., Klut I. M., Knoth H., Röllig C., Schetelig J., Mohr B., Graehlert X., Ehninger G., Bornhäuser M., Thiede, C. (2012): Azacitidine for treatment of imminent relapse in MDS or AML patients after allogeneic HSCT: results of the RELAZA trial. *Leukemia*. 26(3): 381-389.
- Qiu G. H., Tan L. K., Loh K. S., Lim C. Y., Srivastava G., Tsai S. T., Tsao S.W., Tao Q. (2004): The candidate tumor suppressor gene BLU, located at the commonly deleted region 3p21. 3, is an E2F-regulated, stress-responsive gene and inactivated by both epigenetic and genetic mechanisms in nasopharyngeal carcinoma. *Oncogene*. 23(27): 4793-4806.
- Quesnel B., Guillermin G., Vereecque R., Wattel E., Preudhomme C., Bauters F., Vanrumbeke M., Fenaux P. (1998): Methylation of the p15INK4b gene in myelodysplastic syndromes is frequent and acquired during disease progression. *Blood*. 91(8): 2985-2990.
- Quillien V., Lavenu A., Karayan-Tapon L., Carpentier C., Labussière M., Lesimple T., Chinot O., Wager M., Honnorat J., Saikali S., Fina F., Sanson M., Figarella-Branger D. (2012): Comparative assessment of 5 methods (methylation-specific polymerase chain reaction, methylight, pyrosequencing, methylation-sensitive high-resolution melting, and immunohistochemistry) to analyze O6-methylguanine-DNA-methyltransferase in a series of 100 glioblastoma patients. *Cancer*. 118(17): 4201-4211.
- Robson C. N., Gnanapragasam V., Byrne R. L., Collins A. T., Neal D. E. (1999): Transforming growth factor-beta1 up-regulates p15, p21 and p27 and blocks cell cycling in G1 in human prostate epithelium. *Journal of Endocrinology*. 160(2): 257-266.
- Rodrigues E. F., Santos-Rebouças C. B., Gonçalves Pimentel M. M., Mencialha A. L., Dobbin J., Da Costa E. S., Fernandez S., Bouzas L.F., Abdelhay E., De Souza Fernandez T. (2010): Epigenetic alterations of p15INK4B and p16INK4A genes in pediatric primary myelodysplastic syndrome. *Leukemia & lymphoma*. 51(10): 1887-1894.

- Sharma S., Kelly T. K., Jones P. A. (2010): Epigenetics in cancer. *Carcinogenesis*. 31(1): 27-36.
- Schlenk R. F., Döhner K., Krauter J., Fröhling S., Corbacioglu A., Bullinger L., Habdank M., Daniela Späth D., Morgan M., Benner A., Schlegelberger B., Heil G., Ganser A., Döhner, H. (2008): Mutations and treatment outcome in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *New England Journal of Medicine*. 358(18): 1909-1918.
- Siegel R. L., Miller K. D., Jemal A. (2015): Cancer statistics, 2015. *CA: a cancer journal for clinicians*. 65(1): 5-29.
- Steensma D. P., Baer M. R., Slack J. L., Buckstein R., Godley L. A., Garcia-Manero G., Albitar M., Larsen J. S., Arora S., Cullen M. T., Kantarjian H. (2009): Multicenter study of decitabine administered daily for 5 days every 4 weeks to adults with myelodysplastic syndromes: the alternative dosing for outpatient treatment (ADOPT) trial. *Journal of Clinical Oncology*. 27(23): 3842-3848.
- Štěrbá J., Dembická D. (2000): Aktuální pohled na roli hemopoetických růstových faktorů granulocytární řady při standardně dávkované chemoterapii u dětí. *Klinická Onkologie*. 13(3):91-95.
- Takai D., Jones P. A. (2002): Comprehensive analysis of CpG islands in human chromosomes 21 and 22. *Proceedings of the national academy of sciences*. 99(6): 3740-3745.
- Tefferi A. (2010): Novel mutations and their functional and clinical relevance in myeloproliferative neoplasms: JAK2, MPL, TET2, ASXL1, CBL, IDH and IKZF1. *Leukemia*. 24(6): 1128-1138.
- Tost J., Gut I. G. (2007): DNA methylation analysis by pyrosequencing. *Nature protocols*. 2(9): 2265-2275.
- Traina F., Jankowska A. M., Visconte V., Sugimoto Y., Szpurka H., Makishima H., Jerez A., O'Keefe Ch. L., Sekeres M.A., Advani A.S., Sauntharajah Y., Kalaycio M., Copelan E.A., Olalla Saad S.T., Maciejewski J.P., Tiu R. V (2011): Impact of molecular mutations on treatment response to hypomethylating agents in MDS. *ASH Annual Meeting Abstracts*. 118(21): 461
- Uchida T., Kinoshita T., Hotta T., Murate T. (1998): High-risk myelodysplastic syndromes and hypermethylation of the p15Ink4B gene. *Leukemia & lymphoma*. 32(1-2): 9-18.
- Van Den Berghe H., Michaux L. (1997): 5q-, twenty-five years later: a synopsis. *Cancer genetics and cytogenetics*. 94: 1-7.

- Vanaja D. K., Ballman K. V., Morlan B. W., Cheville J. C., Neumann R. M., Lieber M. M., Tindal D.J., Young C. Y. (2006): PDLIM4 repression by hypermethylation as a potential biomarker for prostate cancer. *Clinical cancer research*. 12(4): 1128-1136.
- Vandesompele J., De Preter K., Pattyn F., Poppe B., Van Roy N., De Paepe A., Speleman F. (2002): Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome biology*. 3(7): research0034.
- Vardiman J. W., Thiele J., Arber D. A., Brunning R. D., Borowitz M. J., Porwit A., Harris N. L., Le Beau M. M., Hellström-Lindberg E., Tefferi A., Bloomfield, C. D. (2009): The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood*. 114(5): 937-951.
- Vogelstein B., Lane D., Levine A. J. (2000): Surfing the p53 network. *Nature*. 408(6810): 307-310.
- Vos M. D., Ellis C. A., Bell A., Birrer M. J., Clark G. J. (2000): Ras uses the novel tumor suppressor RASSF1 as an effector to mediate apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*. 275(46): 35669-35672.
- Witte T., Suciú S., Verhoef G., Labar B., Archimbaud E., Aul C., Selleslag D., Ferrant A., Wijermans P., Mandelli F., Amadori S., Jehn U., Muus P., Boogaerts M., Zittoun R., Gratwohl A., Zwierzina H., Hagemeijer A., Willemze R. (2001): Intensive chemotherapy followed by allogeneic or autologous stem cell transplantation for patients with myelodysplastic syndromes (MDSs) and acute myeloid leukemia following MDS. *Blood*. 98(8): 2326-2331.
- Yang Y., Zhang Q., Xu F., Wu L., He Q., Li X. (2012): Tumor suppressor gene BLU is frequently downregulated by promoter hypermethylation in myelodysplastic syndrome. *Journal of cancer research and clinical oncology*. 138(5): 729-737.
- Zhang J. S., Gong A., Young C. Y. F. (2007): ZNF185, an actin–cytoskeleton-associated growth inhibitory LIM protein in prostate cancer. *Oncogene*, 26(1): 111-122.
- Zhang Y., Jeltsch A. (2010): The application of next generation sequencing in DNA methylation analysis. *Genes*. 1(1): 85-101.
- Zheng M., Cheng H., Banerjee I., Chen J. (2009): ALP/Enigma PDZ–LIM domain proteins in the heart. *Journal of molecular cell biology*. 2(2): 96-102.

<http://www.ebioscience.com/resources/pathways/hematopoiesis-from-multipotent-stem-cells.htm>
(28.3.2015)

<http://www.socscistatistics.com/tests/signedranks/Default2.aspx> (28.3.2015)