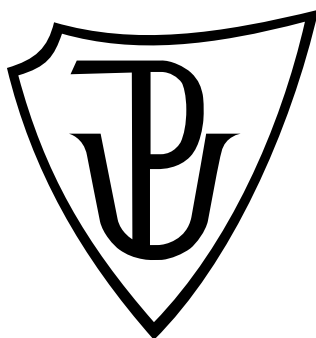


Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Expres demetylačních genů patřících
do rodiny TET proteinů ve vzorcích pacientů
s mnohočetným myelomem**

Bakalářská práce

Veronika Frýbortová

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2018

Vedoucí práce: Ing. Kateřina Smešný Trtková, CSc.

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci na téma: Exprese demetylačních genů patřících do rodiny TET proteinů ve vzorcích pacientů s mnohočetným myelomem zpracovala s využitím citovaných informačních zdrojů pod vedením Ing. Kateřiny Smešný Trtkové, CSc.,

V Olomouci dne 2. 5. 2018

SOUHRN:

Cílem této bakalářské práce je detekce exprese demetylačních genů, mezi které patří proteiny TET, u vzorků pacientů s mnohočetným myelomem. Teoretická část pojednává o problematice mnohočetného myelomu. Jedná se o druhé nejčastější hematologické onemocnění postihující plazmatické buňky. Vznik a progresse mnohočetného myelomu není zatím zcela objasněna, avšak je známo, že vznik tohoto onemocnění ovlivňují faktory genetické a epigenetické. Mezi významné epigenetické modifikace patří metylace DNA a demethylace DNA. Proteiny ovlivňující především aktivní demetylaci se nazývají proteiny TET a na jejich modifikace se zaměřuje praktická část mé bakalářské práce.

V praktické části byly zjišťovány metylační změny v genech *TET1*, *TET2* a *TET3*. Izolovaná DNA byla štěpena pomocí restričních enzymů MspI a HpaII a následně analyzována pomocí real-time PCR na přítomnost metylací a hydroxymethylací. Metylační změny byly signifikantně prokázány u genu *TET3*. U genu *TET1* nebyly metylační změny detekovány.

Ve druhém kroku praktické části byla provedena relativní kvantifikace exprese genů *TET1*, *TET2* a *TET3*. Pro expresní analýzu byl použit referenční gen *β -2-mikroglobulin*. Snížená exprese byla detekována u genů *TET2* a *TET3*, u kterých byly v dřívějším kroku prokázány metylační změny.

SUMMARY:

The aim of this bachelor work is to detect an expression of demethylation genes, containing TET proteins, in samples of patients with multiple myeloma. Theoretical part discuss about problematics of multiple myeloma. It is the second most often hematological disease affecting plasmatic cells. Formation and progression of multiple myeloma is not explained yet, but it is already known, that formation of disease is affected by genetic and epigenetic factors. Significant epigenetic modifications are DNA methylation and demethylation. Proteins affecting mostly active demethylation are called TET proteins and experimental part of my bachelor work is concerned to modification of these proteins.

In experimental part, methylation changes in genes *TET1*, *TET2* and *TET3* were detected. Isolated DNA was cleaved by using restriction enzymes MspI and HpaII and subsequently analyzed by using real-time PCR for the presence of methylation and hydroxymethylation. Methylation changes were significantly proved in the gene *TET3*. Methylation changes were not detected in the gene *TET1*.

In second step of experimental part relative quantification of expression of genes *TET1*, *TET2* and *TET3* was performed. For expression analysis reference gene *β -2-mikroglobulin* was used. In case of genes *TET2* and *TET3*, where methylation changes were proved in previous step, less level of expression was detected.

Ráda bych poděkovala vedoucí práce Ing. Kateřině Smešný Trtkové, CSc. za cenné rady a ochotu při zpracování bakalářské práce. Zaměstnancům laboratoře molekulární patologie za vstřícnost a poskytnutí prostor pro vykonání praktické části mé bakalářské práce.

OBSAH

1	ÚVOD	1
2	CÍLE PRÁCE	2
3	LITERÁRNÍ PŘEHLED	3
3.1	Krvetvorba	3
3.1.1	B-lymfocyty.....	4
3.1.2	Plazmatické buňky.....	4
3.2	Malignity plazmatických buněk.....	5
3.2.1	Mnohočetný myelom (MM)	6
3.3	Genetické faktory vzniku MM	10
3.4	Epigenetické faktory vzniku MM	14
3.4.1	Histonové modifikace.....	14
3.4.1.1	Acetylace histonů.....	14
3.4.1.2	Metylace histonů.....	15
3.4.2	Metylace DNA.....	16
3.4.2.1	Enzymy DNA metylace	17
3.4.2.2	DNA metylace a MM	18
3.4.2.3	Proteiny TET	19
4	MATERIÁL A METODY	22
4.1	Biologický materiál.....	22
4.2	Použité chemikálie, soupravy a roztoky.....	22
4.2.1	Použité chemikálie a roztoky.....	22
4.2.2	Použité soupravy.....	23
4.3	Seznam použitých přístrojů a zařízení	23
4.4	Použité experimentální a vyhodnocovací postupy	24
4.4.1	Izolace DNA z aspirátu kostní dřeně	24
4.4.2	Detekce metylací a hydroxymethylací.....	25
4.4.3	Analýza 5-mC a 5-hmC pomocí qPCR.....	26
4.4.4	Izolace RNA z aspirátu kostní dřeně	28
4.4.5	Reverzní transkripce (RT-PCR)	29
4.4.6	Expresní analýza <i>TET1</i> , <i>TET2</i> a <i>TET3</i>	30
5	VÝSLEDKY	32
5.1	Detekce metylací a hydroxymethylací u genů <i>TET1</i> , <i>TET2</i> a <i>TET3</i>	32
5.2	Relativní kvantifikace exprese genů <i>TET1</i> , <i>TET2</i> a <i>TET3</i>	39
6	DISKUSE	40
7	ZÁVĚR.....	42
8	LITERATURA	43
9	PŘÍLOHY	54

SEZNAM SYMBOLŮ A ZKRATEK

CRAB	hyperkalcémie, selhání ledvin, anémie, kostní změny
DNMT	metyltransferázy DNA
HSC	hematopoetická kmenová buňka
IMWG	International myeloma working group
M-Ig	M-protein/paraprotein
MGUS	monoklonální gamapatie nejasného původu
MM	mnohočetný myelom
PL/PCL	plazmocelulární leukémie
qPCR	kvantitativní PCR (real-time PCR)
RT-PCR	reverzní transkripce PCR
SMM	asymptomatický (doutnající) mnohočetný myelom
TET	proteiny „ten-eleven translocation“

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. č. 1: Model hematopoetické hierarchie.	4
Obr. č. 2: Vývoj maligních onemocnění plazmatických buněk.	6
Obr. č. 3: Klíčové genetické změny v genomu pacientů s MM.	11
Obr. č. 4: Nádorové iniciační procesy a sekundární mutace vedoucí ke vzniku a progresi MM a jejich regulační dráhy v organismu.	13
Obr. č. 5: Konverze cytosinu na 5-metylcytosin pomocí DNMTs.	16
Obr. č. 6: Struktura TET proteinů. Hodnota AK udává počet aminokyselin.	19
Obr. č. 7: Metylační/demetylační proces cytosinu.	21

SEZNAM GRAFŮ

Graf. č. 1: Detekce nepřítomnosti metylace v sekvenci 5'-CCGG-3' pomocí enzymů HpaII a MspI.	32
Graf. č. 2: Detekce metylace v sekvenci 5'-CCGG-3' pomocí enzymů HpaII a MspI.	33
Graf. č. 3: qPCR závislost fluorescence na čase u vzorku č. 90 u genu <i>TET1</i>	33
Graf. č. 4: qPCR závislost fluorescence na čase u vzorku č. 96 u genu <i>TET1</i>	34
Graf. č. 5: qPCR závislost fluorescence na čase u vzorku č. 90 u genu <i>TET2</i>	34
Graf. č. 6: qPCR závislost fluorescence na čase u vzorku č. 96 u genu <i>TET2</i>	35
Graf. č. 7: qPCR závislost fluorescence na čase u vzorku č. 90 u genu <i>TET3</i>	35
Graf. č. 8: qPCR závislost fluorescence na čase u vzorku č. 96 u genu <i>TET3</i>	36
Graf. č. 9: Exprese proteinů <i>TET1</i> , <i>TET2</i> a <i>TET3</i> u sledovaných pacientů s MM.	39

SEZNAM TABULEK

Tab. č. 1: Rozdělení malignit plazmatických buněk	5
Tab. č. 2: Diagnostická kritéria schválená organizací WHO.	7
Tab. č. 3: Diagnostická kritéria symptomatického MM dle INWG.	7
Tab. č. 4: Komponenty pro glukosylační reakční směs.	26
Tab. č. 5: Enzymy obsažené v jednotlivých 0,2ml mikrozkuvkách.	26
Tab. č. 6: Přítomnost modifikované štěpené/neštěpené DNA v mikrozkuvkách 1, 2, 3 a 4.	26
Tab. č. 7: Komponenty pro qPCR směs a následné pipetování vzorků.	27
Tab. č. 8: Teplotní profil qPCR.	27
Tab. č. 9: Seznam použitých primerů a sond.	28
Tab. č. 10: Komponenty pro RT-PCR.	30
Tab. č. 11: Komponenty pro qPCR směs a následné pipetování vzorků a sond.	31
Tab. č. 12: Teplotní profil qPCR.	31
Tab. č. 13: Hodnoty Ct naměřené pro gen <i>TET1</i>	36
Tab. č. 14: Hodnoty Ct naměřené pro gen <i>TET2</i>	37
Tab. č. 15: Hodnoty vypočítané dle výše uvedeného vzorce pro gen <i>TET2</i>	37
Tab. č. 16: Hodnoty Ct naměřené pro gen <i>TET3</i>	38
Tab. č. 17: Hodnoty vypočítané dle výše uvedeného vzorce pro gen <i>TET3</i>	38

1 ÚVOD

Mnohočetný myelom (MM) je hemato-onkologické onemocnění plazmatických buněk. Podle posledních studií se na vzniku a progresi mnohočetného myelomu podílejí genetické a epigenetické faktory. Mezi genetické faktory patří translokace a hyperploidizace, mezi nejčastěji studované epigenetické modifikace vedoucí ke vzniku MM patří metylace a demethylace DNA. DNA je metylována pomocí enzymů metyltransferáz DNA: DNMT3a, DNMT3b a DNMT1. Metyltransferázy DNA katalyzují vazbu metylové skupiny na 5-C za vzniku 5-metylcytosinu (5-mC) v dinukleotidové sekvenci CpG (cytosine-phosphate-guanine), které se v genomu shlukují v úseky 500–2000 bp, nazývané ostrůvky CpG. U zdravých buněk jsou ostrůvky CpG v oblastech promotorů asi 60 % genů hypometylovány, čímž je umožněna jejich exprese (Ehrlich a kol., 1982; Jones, 2012). U mnohočetného myelomu jsou naopak popsány hypermetylace v sekvencích CpG v promotorech tumor-supresorových genů. Tím dochází k jejich inaktivaci a ztrátě důležitých buněčných funkcí (Esteller, 2009).

Metylace DNA byla považována za nevratný proces, ale v poslední době se objevuje stále více studií popisujících demethylaci 5-mC a úlohu 5-hydroxymetylcytosinu (5-hmC) v procesu metylace-demethylace. Demetylační funkcí proteinů TET (ten-eleven translocation), mezi které patří TET1, TET2 a TET3, je tvorba 5-hmC z 5-mC. Demethylace je několikasupňový cyklický proces přeměny 5-mC na nemetylovaný cytosin (5-C), do něhož jsou mimo jiné zapojeny proteiny TET. Úloha metylačních-demetylačních procesů a funkce 5-hmC při vzniku rakoviny zatím není zcela objasněna. Detekce 5-hmC by mohla být potenciálně užitečným prognostickým indikátorem v diagnostice mnohočetného myelomu.

2 CÍLE PRÁCE

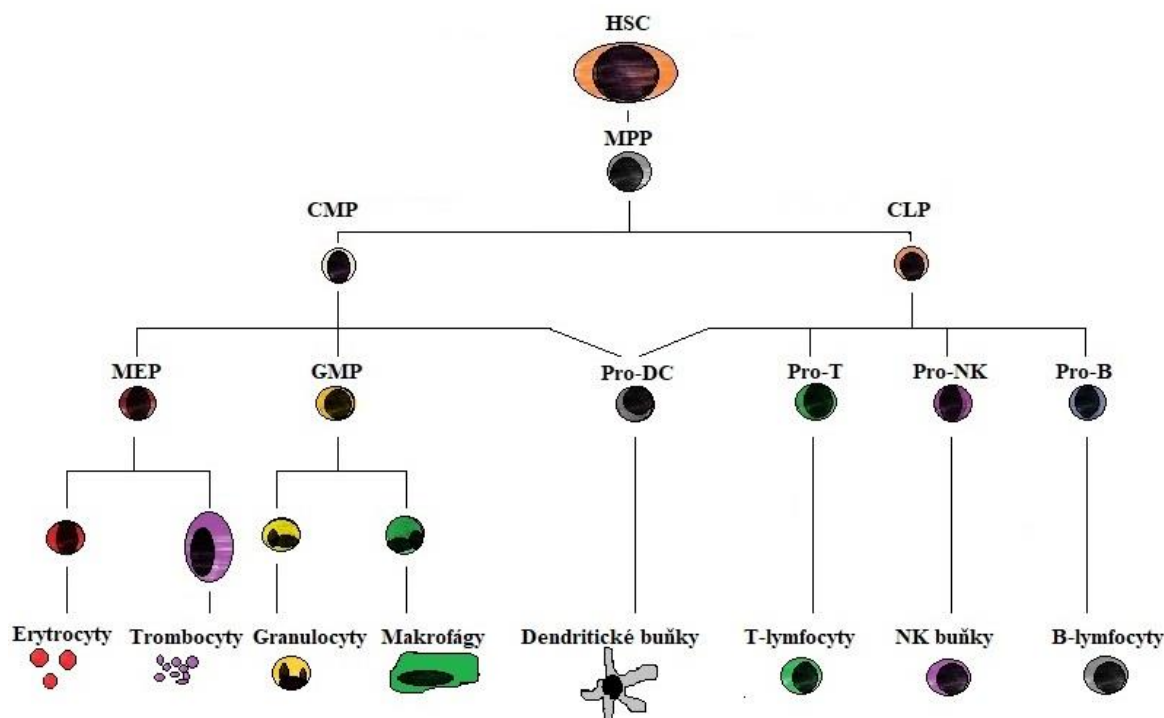
- Práce s odbornou literaturou a vypracování literární rešerše na zadané téma.
- Izolace RNA z krevních aspirátů pacientů s mnohočetným myelomem a příprava komplementární cDNA.
- Expresní analýza Real-Time PCR genu TET2, který patří do rodiny demetylačních enzymů, jejichž exprese souvisí s hydroxymethylací.
- Izolovanou DNA naštěpit restrikčními enzymy MspI a HpaII a následně analyzovat qPCR na přítomnost metylací a hydroxymethylací.

3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1 Krvetvorba

Krvetvorba „hematopoéza“ je rozsáhlým procesem vedoucím ke vzniku krevních buněk. Z vývojového hlediska se krvetvorba dělí na prenatální a postnatální období, které se navzájem liší místem a procesem vzniku diferencovaných krevních buněk. Prenatální hematopoéza začíná v krevních ostrůvcích žloutkového vaku a následně dochází k jejímu přesunu do jaterní tkáně, sleziny, brzlíku a kostní dřevě, která zůstává hlavním zdrojem krevních buněk v postnatálním období (Pecka, 2002).

Dle Ogawa (1993) dojde během jednoho dne u osoby o hmotnosti 70 kg k obnově 1 bilionu buněk hematopoetického systému. Hlavním prekurzorem pro vznik krevních buněk je hematopoetická kmenová buňka (HSC). HSC se vyznačuje dvěma základními vlastnostmi, a to schopností „multipotence“, tedy schopností diferencovat se do všech druhů krevních buněk, a schopností sebe-obnovy, tedy opakované tvorby nediferencovaných dceřiných buněk (Sietta a Weissman, 2010). HSCs jsou dvojího typu: dlouhodobé HSCs (LT-HSC- long term HSC), které mají schopnost sebe-obnovy po celou dobu života organismu, a krátkodobé HSCs (ST-HSC- short term HSC), které vznikají postupnou diferenciací z LT-HSCs a udržují si schopnost sebe-obnovy po dobu 8 týdnů (Passegue a kol., 2003). ST-HSCs následnou diferenciací dávají vznik multipotentním prekurzorům (MPP), viz obr. č. 1, které ztrácejí schopnost sebe-obnovy, a u nichž dochází k oddělení dvou odlišných linií: lymfoidním prekurzorům (CLP- common lymphoid progenitor) a myeloidním prekurzorům (CMP- common myeloid progenitor) (Seita a Weissman, 2010). Z myeloidní linie se diferencují dvě odlišné skupiny prekurzorů. Prvním typem jsou prekurzory pro megakarocyty/erytrocyty (MEP), z nichž následně dochází k tvorbě zralých erytrocytů a trombocytů. Druhým typem jsou prekurzory pro granulocyty/makrofágy (GMP), z nichž následně dochází k tvorbě granulocytů a monocytů. Myeloidní i lymfoidní linie dávají společně vznik prekurzorům dendritických buněk (Passegue a kol., 2003). Z lymfoidní linie se diferencují nejprve prekurzory T-lymfocytů, B-lymfocytů, NK buněk a následně dochází k tvorbě zralých efektorových buněk (Weiskopf a kol., 2016).



Obr. č. 1: Model hematopoetické hierarchie (inspirováno: Passegue a kol., 2003; Sieta a Weissman, 2010).

3.1.1 B-lymfocyty

B-lymfocyty jsou buňky, které u savců získávají imuno-kompetenci v kostní dřeni a po kontaktu se specifickými antigeny dochází k jejich terminální diferenciaci na buňky paměťové a plazmatické (Pecka, 2002; Ferenčík a kol., 2004).

Paměťové buňky jsou podle Ferenčík a kol. (2004) definovány jako diferencované B-lymfocyty a T-lymfocyty, které v organismu zůstávají po dlouhou dobu a pamatují si antigen, který jejich produkci navodil. Při opětovném kontaktu s totožným antigenem zajišťují pohotovější a intenzivnější sekundární imunitní odpověď.

3.1.2 Plazmatické buňky

V roce 1965 Cooper a kol. prokázali na experimentálním modelu kuřat, že za produkci protilátek jsou zodpovědné B-lymfocyty. Konkrétním diferencovaným stádiem B-lymfocytů, produkujícím obrovské množství protilátek jsou buňky plazmatické. Signály, indukující vznik plazmatických buněk, mohou být poskytnuty T-buňkami, dendritickými buňkami a patogeny, nebo jejich kombinacemi (Moser a kol., 2006). Zralá plazmatická buňka je kulatého či oválného tvaru s průměrem 9–20 μm . Jádro buňky je excentrické a podstatnou část bazofilní cytoplasmy vyplňuje endoplazmatické retikulum, produkující protilátky, které se následně v buňce hromadí (Pecka, 2002; Ribatti, 2017).

3.2 Malignity plazmatických buněk

Malignity plazmatických buněk jsou definovány jako klonální expanze plazmatických buněk, které jsou charakteristické sekrecí monoklonálního imunoglobulinového proteinu, označovaného jako M-protein (M-Ig) nebo jako para-protein (Kačírková a Campr, 2007; Penka a Tesařová, 2011).

Dle Penka a Tesařová (2011) se malignity plazmatických buněk dělí na monoklonální gamapatii nejasného původu, plazmocytom, choroby z depozice imunoglobulinu, osteosklerotický myelom a plazmocelulární myelom, který lze dále rozdělit do tří variant na nesekreční formu myelomu, asymptomatický (doutnající) myelom a plazmocelulární leukemii, viz tab. č. 1.

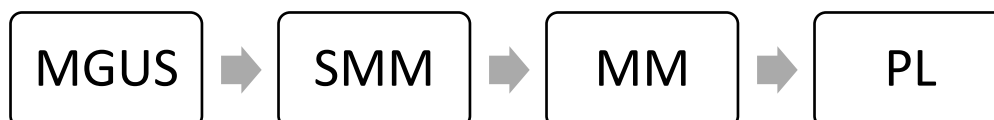
Tab. č. 1: Rozdělení malignit plazmatických buněk (Penka a Tesařová, 2011).

monoklonální gamapatie nejasného původu	
plazmocelulární/mnohočetný myelom	-asymptomatický/doutnající myelom
	-nesekreční myelom
	-plazmocelulární leukémie
plazmocytom	-extraoseální/extramedulární
	-solitární plazmocytom v kosti
choroba z depozice imunoglobulinu	-primární amyloidóza
	-systémové onemocnění z lehkých a těžkých řetězců
osteosklerotický myelom	

Monoklonální gamapatie nejasného původu (MGUS) je asymptomatický stav, kdy je v séru pacienta zjištěna přítomnost M-proteinu v koncentraci menší nebo rovné $30 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$, v moči není detekováno žádné nebo pouze mírné množství monoklonálních lehkých řetězců imunoglobulinů, kostní dřeň obsahuje méně než 10 % plazmatických buněk a nejsou přítomny lytické kostní léze, anémie, hyperkalcémie nebo renální nedostatečnost (Kyle a kol., 2002).

V minulosti bylo považováno pozorování pacientů s MGUS, u nichž nedošlo během pěti let ke zvýšení koncentrace para-proteinu v séru, za bezpředmětné. Dnes je již známo, že během jednoho roku dochází téměř u 1 % pacientů s MGUS k progresi mnohočetného myelomu (MM) nebo s ním souvisejících poruch (Kyle a kol., 2002).

Při opakovaných studiích vývoje MGUS v MM bylo zjištěno vyšší riziko progresu u pacientů s IgA nebo IgM monoklonální gamapatií než u pacientů s IgG monoklonální gamapatií (Kyle, 1978; Kyle a kol., 2002). MGUS vždy předchází MM a konečným stádiem progresu může být plazmocelulární leukémie (PL), při níž již myelomové buňky nejsou závislé na mikroprostředí kostní dřeně (Shapiro-Shelef a Calame, 2004; Morgan a kol., 2012), viz obr. č. 2.



Obr. č. 2: Vývoj maligních onemocnění plazmatických buněk. Monoklonální gamapatie nejasného původu (MGUS), doutnající mnohočetný myelom (SMM), mnohočetný myelom (MM), plazmocelulární leukémie (PL) (převzato a upraveno z: Morgan a kol., 2012).

3.2.1 Mnohočetný myelom (MM)

Mnohočetný myelom, označován také jako plazmocelulární myelom, je nádorové onemocnění plazmatických buněk lokalizovaných v kostní dřeni, způsobujících osteolytické léze či osteoporózu a v naprosté většině případů je spojeno s přítomností paraproteinu v séru (Kačírková a Campr, 2007; Penka a Tesařová 2011). MM je druhým nejčastějším hematopoetickým karcinomem (Chen-Kiang, 2005).

V současné době jsou stanovena dvojí diagnostická kritéria MM. První kritéria jsou schválena světovou zdravotnickou organizací (WHO- World Health Organization), viz tab. č. 2. Druhá kritéria byla vydána International Myeloma Working Group (IMWG, 2003), viz tab. č. 3.

Tab. č. 2: Diagnostická kritéria schválená organizací WHO.

Hlavní kritéria:	
počet plazmatických buněk v kostní dřeni > 30 %	
plazmocytom v biopsii	
koncentrace	M-Ig v séru > 35 g·l ⁻¹
	M-IgA > 20 g·l ⁻¹
	M-Ig v moči: množství lehkých řetězců/24 hodin > 1 g
Vedlejší kritéria:	
počet plazmatických buněk v kostní dřeni 10–30 %	
koncentrace	M-Ig v séru < 35 g·l ⁻¹
	M-IgA < 20 g·l ⁻¹
	M-Ig v moči: množství lehkých řetězců/24 hodin < 1 g
přítomnost osteolytického ložiska	
snížení ostatních fyziologických imunoglobulinů pod 50 % normálních hodnot	

Diagnóza MM vyžaduje splnění jednoho a více hlavních kritérií a jednoho nebo více vedlejších kritérií nebo při splnění tří vedlejších kritérií, přičemž musí vždy obsahovat první dvě vedlejší kritéria (převzato a upraveno z: Kačírková a Campr, 2007).

Tab. č. 3: Diagnostická kritéria symptomatického MM dle INWG.

přítomnost M-Ig v séru nebo v moči	
přítomnost monoklonálních plazmatických buněk v kostní dřeni > 10 %, nebo bioptický průkaz plazmocytomu	
přítomnost alespoň jedné dysfunkce či poškození orgánu:	C (calcium)- hyperkalcémie v séru
	R (renal)- renální insuficience
	A (anemia)- anémie
	B (bone)- osteolytické ložisko nebo osteoporóza

Diagnóza MM vyžaduje splnění všech tří kritérií (převzato a upraveno z: Kačírková a Campr, 2007).

Symptomy MM jsou velmi různorodé. V periferní krvi bývá detekována anémie a leukopenie, která vede ke snížené tvorbě fyziologických imunoglobulinů, čímž může docházet k opakovaným infekcím. V závislosti na pokročilosti onemocnění dochází také ke snížení tvorby trombocytů, což se projevuje krvácením do kůže a sliznic.

Počet plazmatických buněk v aspirátu kostní dřeně je 10 % nebo více, přičemž plazmocyty jsou přítomny v různých vývojových stádiích, od zralých plazmatických buněk po formy blastické. Zralé plazmatické buňky jsou charakteristické excentricky uloženým jádrem a nízkým poměrem mezi jádrem a cytoplazmou. Tato plazmoblastická stádia nemají excentricky uložená jádra, mají velmi jemnou strukturu chromatinu a vysoký poměr mezi jádrem a cytoplazmou. Přítomny mohou být také netypické mnohojaderné plazmatické buňky s abnormálními tvary jader či se schopností fagocytózy.

Nefunkčnost či poškození orgánu jsou způsobeny přítomností M-proteinu nebo nádorových buněk v kostní dřeni nebo výjimečně v jiných orgánech. Mezi klinické symptomy MM patří zvýšená sérová hladina vápníku (hyperkalcémie), postižení ledvin, anémie a kostní léze, které se souhrnně označují zkratkou CRAB (calcium, renal, anemia, bone). Typickými příznaky hyperkalcémie jsou polyurie, polydipsie a zvýšená tělesná teplota. Vlivem filtrace a zachytávání volných lehkých řetězců imunoglobulinů může docházet k poškození ledvin. Anémie se projevuje zvýšenou únavou a dušností organismu. Poškození kostí se projevuje chronickými bolestmi, které neustupují ani v klidové fázi. K poškození kostí dochází v osteolytických ložiscích nebo může mít difuzní charakter a projevovat se jako osteoporóza. Vlivem oslabení kostní hmoty dochází také k jejich častým zlomeninám (Kačírková a Campr, 2007; Šálek, 2008; Penka a Tesařová, 2011).

Jednou z diagnostických metod MM je pozorování výše popsaných abnormalit v aspirátu kostní dřeně. Myelomové buňky odpovídají různým vývojovým stádiím plazmocytů. Při zvýšené destrukci kostí jsou v preparátu pozorovány výrazné osteoklasty.

Imuno-histologicky jsou plazmatické buňky pozitivní při průkazu exprese znaků CD138+, CD38+ a CD13+. Kvůli složitému invazivnímu procesu odběru kostní dřeně pacienta se provádí histologická vyšetření většinou až po zjištění monoklonálního imunoglobulinu z moči nebo séra (Ščudla a Adam, 2006; Šálek, 2008).

K biochemickým metodám používaným při diagnóze MM patří elektroforéza proteinů, imuno-fixační elektroforéza a stanovení volných lehkých řetězců (VLŘ metoda) v séru nebo v moči. Tyto metody slouží k zachycení para-proteinu, který je přítomný u 99 % pacientů s MM. Elektroforéza sérových proteinů slouží k potvrzení přítomnosti M-proteinu a zachytí asi 80 % pacientů. Pro potvrzení se provádí imuno-fixační

elektroforéza, která využívá interakce mezi antisérem proti jednotlivým řetězcům imunoglobulinů a řetězci imunoglobulinů. Výsledkem je identifikace imunoglobulinu přítomného ve vzorku pacienta. Elektroforeticky lze detekovat kompletní molekuly imunoglobulinů, ale stanovení pouze lehkých řetězců je pod minimální detekční mezí této metody. K zachycení asi 20 % pacientů, u kterých dochází k produkci monoklonálních volných lehkých řetězců, slouží metoda VLŘ, která využívá imuno-turbidimetrii, imunonefelometrii nebo enzymo-immunoanalytické stanovení. Na lehkých řetězcích se nachází epitopy, které jsou v komplexních molekulách imunoglobulinů skryty (Ščudla a Adam, 2006; Šálek, 2008). Tyto specifické epitopy rozpoznávají specifické protilátky. Dle Špička a kol. (2008) je metoda VŘL oproti elektroforetickým metodám citlivější. V prvotních krocích se biochemické metody aplikují na krevních sérech pacientů, vyšetření moči se většinou provádí až při nálezů para-proteinu v séru.

U pacientů s diagnostikovaným MM se ve specializovaných centrech provádí i cytogenetická vyšetření, která mají důležitý prognostický význam (Ščudla a Adam, 2006; Šálek, 2008).

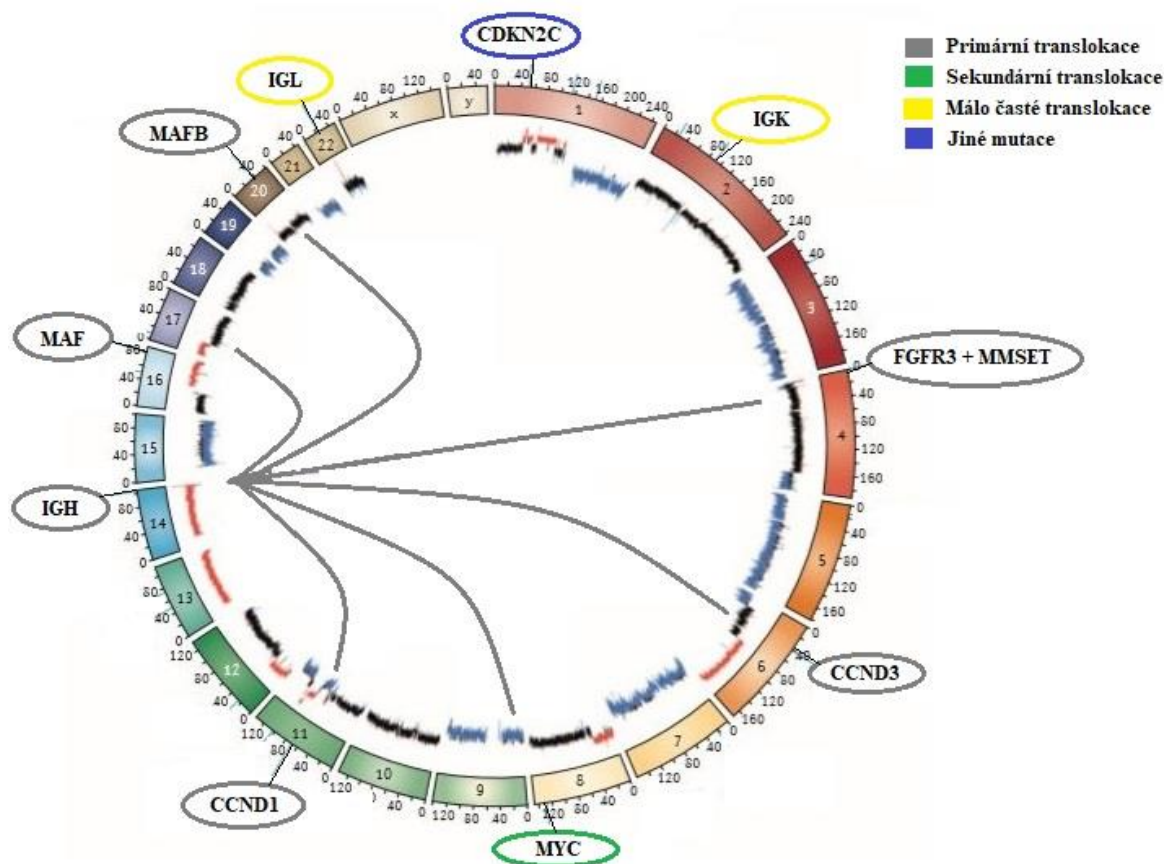
3.3 Genetické faktory vzniku MM

MM je maligním onemocněním plazmatických buněk, jehož vznik je ovlivněn řadou genetických a epigenetických faktorů. Obecně při vzniku rakoviny dochází k narušení tumor supresorových genů, jejichž exprese je v nádorových buňkách potlačena, nebo onkogenů, které jsou naopak v nádorových buňkách nad-exprimovány (Hanahan a Weinberg, 2000). Sekvenční data studie Chapman a kol. (2011) poukazují na existenci celé řady genetických změn, vedoucím ke vzniku MM. Myelomové buňky mohou mít více chromozomálních abnormalit a komplexních translokací, přičemž je prokázáno, že frekvence těchto abnormalit narůstá úměrně s progresí onemocnění (Shapiro-Shelef a Calame, 2004). Mezi genetické faktory vedoucí ke vzniku MM patří translokace a hyper-ploidizace (Pawlyn a Morgan, 2017).

Pro hyper-diploidní nádory jsou typické numerické aberace jako monozomie chromozomů 13, 14, 16 a 22 a trizomie chromozomů 3, 5, 7, 9, 15, 19 a 21 (Fonseca a kol., 2002).

Translokace u MM vzniká během vývoje B-lymfocytů a při generaci plazmatických a paměťových buněk. Během vývoje jsou uplatněny tři procesy: V(D)J rekombinace, somatická hypermutace a izotypové přepnutí. V(D)J rekombinace probíhá v kostní dřeni a dochází během ní k přeskupování genových segmentů pro těžké a lehké řetězce imunoglobulinů. Somatické hyper-mutace a izotypové přepnutí probíhají v germinálních centrech, místech sekundárních lymfatických orgánů, kde dochází k intenzivní proliferaci B-lymfocytů. Izotypové přepnutí zajišťuje, mechanismem rekombinace DNA a nehomologního spojování konců DNA, produkci protilátek různých tříd. Somatické hyper-mutace způsobují delece, inserce nebo jednonukleotidové záměny ve variabilních místech imunoglobulinů, ke kterým dochází pomocí dvouřetězcových zlomů DNA. Aktivace izotypového přepnutí a somatických hyper-mutací je závislá na expresi deaminázy cytidinu (González a kol., 2007; Klein a Dalla-Favera, 2008). Ačkoli jsou většinou dvouřetězcové zlomy, vznikající působením deamináz cytidinu, opraveny lokálně, mohou být připojeny ke dvouřetězcovým zlomům, vyskytujícím se v jiné části genomu. Konečným výsledkem těchto procesů jsou chromozomální translokace, které vedou k umístění různých onkogenů pod oblasti silných zesilovačů „enhancerů“ imunoglobulinových genů. Nadměrná exprese těchto genů může tlačit buňku k následné maligní proliferaci. (Morgan a kol., 2012; Pawlyn a Morgan, 2017).

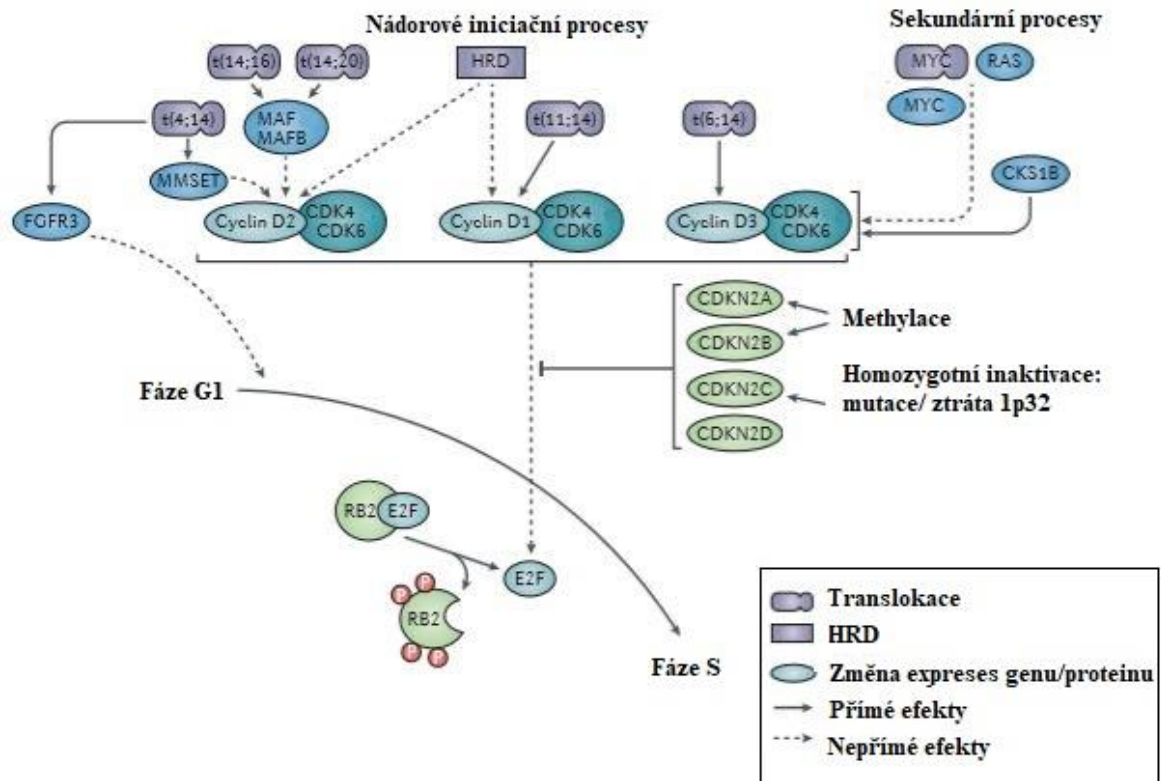
Primární translokace zahrnující nejčastěji lokus 14q32 pro těžký řetězec imunoglobulinu (*IGH*), výjimečně pak lokusy 2p12 nebo 22q11 pro lehké řetězce (*IGK* a *IGL*) (Fonseca, 2003). Partnery pro translokační procesy jsou z 25 % geny pro cykliny D: *CCND1* (11q13), *CCND3* (6p21) nebo ze 75 % geny pro transkripční oblasti: *MAF* (16q23), *MAFB* (20q11), *FGFR3* a *MMSET* (4p16), které regulují expresi cyklinu D2 (Bergsagel a Kuehl, 2001; Fonseca a kol., 2009), viz obr. č. 3.



Obr. č. 3: Klíčové genetické změny v genomu pacientů s MM. Chromozomy jsou znázorněny pomocí kruhu, chromozom č. 1 se nachází v horní části kruhu. Translokace lokusu pro těžký řetězec imunoglobulinu *IGH* a jejich partnerské lokusy jsou znázorněny křivkami uvnitř kruhu. Údaje o počtech kopií jsou zobrazeny uvnitř kruhu, červená značí ztrátu, modrá značí zisk, černá značí nezměněný počet kopií. Na vnější straně kruhu jsou k chromozomům přiřazené příslušné geny, u kterých se v rámci MM vyskytují primární a sekundární abnormality. Inhibitor 2C cyklin-dependentních kináz (*CDKN2C*); gen pro lehký řetězec κ imunoglobulinu (*IGK*); gen pro receptor pro fibroblastový růstový faktor 3 (*FGFR3*); kandidátní gen pro Wolf-Hirschhornův syndrom (*MMSET/WHSC1*); gen pro cyklin D1/D3 (*CCND1/CCND3*); proto-onkogen (*MYC*); gen pro těžký řetězec imunoglobulinu (*IGH*); proto-onkogen (*MAF*); proto-onkogen homolog B (*MAFB*); gen pro lehký řetězec λ imunoglobulinu (*IGL*) (převzato a upraveno z: Morgan kol., 2012).

Translokace a hyper-diploidie vedou buďto přímo nebo nepřímo k up-regulaci cyklinu D1, D2 nebo D3. Tato skupina D cyklinů může vytvářet komplexy s cyklin-dependentními kinázami 4 a 6 (CDK4 a CDK6). CDK4/CDK6 fosforylují retinoblastomový protein (RB), což vede k jeho disociaci z transkripčního faktoru E2F. Uvolněním inhibitoru E2F dochází k transkripci genů potřebných pro přechod buňky přes regulační bod buněčného cyklu G1/S. Receptor fibroblastového růstového faktoru 3 (FGFR3) je také translokací t(4;14) up-regulován a tlačí buňku k přechodu mezi G1 a S fází (Pawlyn a Morgan, 2017), viz obr. č. 4.

Při progresi MM dochází k řadě sekundárních aberací, z nichž nejvýznamnější jsou změny počtu kopií a translokace v genu *MYC* (8q24), up-regulace dráhy proto-onkogenu *RAS* a zisk (amplifikace) 1q, což vede k dalšímu zvýšení buněčné proliferace vlivem zvýšení aktivity D-CDK. Inhibitory cyklin-dependentních kináz 2A, 2B, 2C a 2D (*CDKN2A*, *CDKN2B*, *CDKN2C*, *CDKN2D*) mohou pomocí tvorby komplexů s D-CDK inhibovat buněčnou proliferaci. Zvýšená proliferace myelomových buněk, vlivem odstranění inhibičního účinku, byla pozorována u homozygotní inaktivace *CDKN2C*, způsobenou mutací nebo delecí lokusu 1p32. Dále byla zvýšená proliferace zaznamenána u DNA metylací *CDKN2A* a *CDKN2B* (Bergsagel a Kuehl, 2001; Pawlyn a Morgan, 2017), viz obr. č. 4.



Obr. č. 4: Nádorové iniciační procesy a sekundární mutace vedoucí ke vzniku a progresi MM a jejich regulační dráhy v organismu. Získání chromozomu hyperdiploidizačním procesem (HRD); cyklin-dependentní kináza 4/6 (CDK4/CDK6); retinoblastomový protein (RB2); transkripčních faktorů (E2F); fibroblastový růstový faktor 3 (FGFR3); proto-onkogen (*MYC*); proto-onkogen (*RAS*); inhibitory cyklin-dependentních kináz (CDKN2A/CDKN2B/CDKN2C/CDKN2D); kandidátní gen pro Wolf-Hirschhornův syndrom (*MMSET*); proto-onkogeny (*MAF*, *MAFB*); gen pro regulační podjednotku 1B kinázy (*CKS1B*) (převzato a upraveno z: Pawlyn a Morgan, 2017).

3.4 Epigenetické faktory vzniku MM

Mimo centrální úlohu genetických mutací mají i epigenetické faktory důležitou funkci při vzniku a progresi MM. Epigenetika byla definována jako studium mitoticky a meioticky dědičných změn ve funkci genů, které nejsou způsobeny změnami sekvencí DNA (Riggs a Porter, 1996). Jako klíčové epigenetické faktory se při vzniku MM jeví histonová modifikace a aberantní DNA metylace (Dimopoulos a kol., 2014).

3.4.1 Histonové modifikace

Histony jsou proteiny, které se nacházejí ve všech jaderných eukaryotických buňkách. Nukleozom je jednotka složená z histonového oktameru (dva páry histonů: H2A, H2B, H3 a H4) a vlákna DNA obtočeného okolo oktameru. Místem nejčastějšího výskytu epigenetických modifikací histonů jsou N-terminální konce s kladně nabitými aminokyselinami (Lachner a kol., 2003; Kouzarides, 2007). Mezi histonové modifikace je řazena acetylace, metylace, fosforylace, deiminace, poly-ADP ribosylace, ubiquitinace, sumoylace a izomerace prolinu, přičemž první čtyři jmenované jsou velmi dynamické a může docházet k jejich vymizení během několika minut (Kouzarides, 2007). Kombinace těchto modifikací ovlivňují interakce mezi histonovými nebo nehistonovými proteiny a vláknem DNA, které se označují jako histonový kód (Turner, 2002). Podle aktivity rozlišujeme chromatin na transkripčně aktivní, dekonzenzovaný euchromatin a transkripčně neaktivní, kondenzovaný heterochromatin. Nedávné studie prokázaly přítomnost přes 840 různých kombinací histonových změn, což potvrzuje nespécifický účinek některých typů histonových modifikací (Ucar a kol., 2011; Linghu a kol., 2013). Důkladněji popsány budou nejvíce prostudované modifikace histonů, mezi které patří acetylace a metylace.

3.4.1.1 Acetylace histonů

Nejvíce prozkoumanou histonovou modifikací je acetylace/deacetylace histonů. Tento proces je zprostředkován enzymy histonových acetyltransferáz (HATs) a histonových deacetyláz (HDACs). Acetylace histonů je spojena s největší mírou ovlivnění kondenzace a dekonzenzace vlákna DNA a aktivace či inaktivace transkripce genů. Enzymy HAT přenášejí acetylovou skupinu z acetyl-coA na lysinové zbytky histonů. Dochází k neutralizaci pozitivního náboje histonu a přerušení interakce s negativně

nabitými fosfátovými skupinami DNA. Vlákna DNA se rozvolňují a je umožněna vazba transkripčních faktorů a následná transkripce. Enzymy HDAC naopak z histonů odstraňují acetylové skupiny zpět na acetyl-coA, což vede ke kondenzaci vlákna DNA a znemožnění transkripce (Grunstein, 1997; Dimopoulos a kol., 2014). Celková úroveň acetylovaných histonů závisí na rovnováze mezi aktivitou HAT a HDAC (Esteller, 2009).

Nadměrná exprese histonových deacetyláz byla u pacientů s MM spojena s nepříznivou prognostikou (Mithraprabhu a kol., 2014).

3.4.1.2 Metylace histonů

Metylace histonů umožňuje transkripční aktivaci i inaktivaci. Lysin může být mono-, di-, nebo tri-metylován v pozicích K4, K9, K27, K36 a K79 na histonu H3 nebo v pozici K20 na histonu H4 (Kouzarides, 2007). Arginin může být pouze mono-, nebo di-metylován v pozicích R2, R17, R26 na histonu H3 nebo v pozici R3 na histonu H4 (Tollefsbol, 2017). Všechny tyto typy metylací jsou katalyzovány třemi typy histonových metyltransferáz (HMTs) mezi které patří: histonová metyltransferáza lysinu se specifickou SET doménou, histonová metyltransferáza lysinu bez specifické SET domény a metyltransferáza argininu (Tollefsbol, 2017). Metylová skupina může být odstraněna skupinou enzymů histonových demetyláz (HDMs). S aktivací genové transkripce jsou spojeny modifikace: H3K4me3 (tri-metylace lysinu v pozici 4 na histonu H3), H3K36me3, H3K79me3, H4R3me1 a H4K20me1. S inaktivací genové transkripce jsou naopak spojeny modifikace: H3K9me3 a H3K27me3 (Vakoc a kol., 2005; Barski a kol., 2007). Metylace v pozici 27 na histonu H3 se podílí na tlumení exprese genu *HOX* a předpokládá se, že tento mechanismus je pravděpodobně zapojen také při inaktivaci chromozomu X (Kouzarides, 2007).

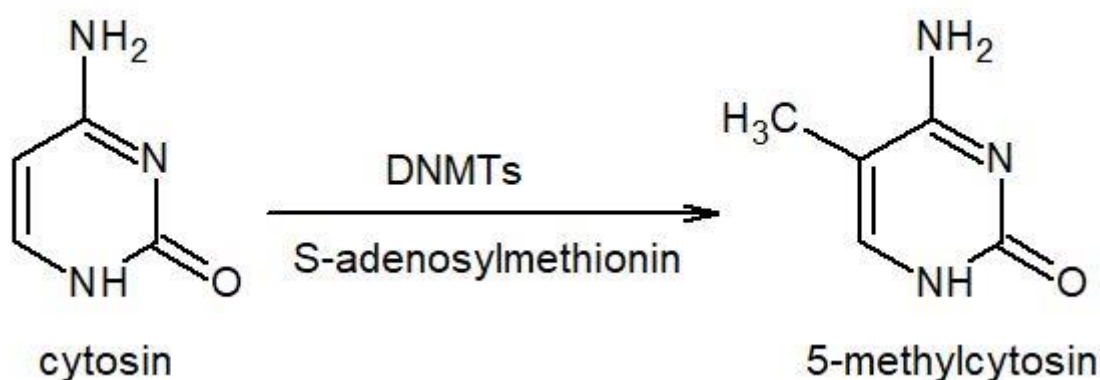
Nejvíce charakteristickou změnou na úrovni metylace histonů u pacientů s MM je zvýšení syntézy histonové metyltransferázy lysinu se specifickou MMSET doménou (multiple myeloma SET domain). Tyto případy jsou charakteristické pro translokaci t(4;14), která se vyskytuje asi u 15 % všech pacientů a je spojena se špatnou prognózou (Chesi a kol., 1998). Gen *MMSET*, také známý jako *WHSC1*, je vysoce exprimován ve všech tkáních a produkuje dva typy transkriptů: MMSET1 a MMSET2 (Stec a kol., 1998). Několik studií potvrdilo, že *MMSET* interaguje s histony H3 a H4, a tím katalyzuje metylace na H3K4, H3K9, H3K27, H3K36, H4K20, ale také zvyšuje funkci histonových deacetyláz a demetyláz (Martinez-Garcia a kol., 2011; Pei a kol., 2011; Huang, 2013).

Vyšší exprese *MMSET* ovlivňuje akumulaci H3K36me2, která způsobuje transkripční aktivaci onkogenních lokusů (Kuo a kol., 2011; Martinez-Garcia a kol., 2011).

Histonová modifikace je úzce spojena s procesem metylace DNA. Metylované lysiny slouží jako vazebné místo pro enzymy metyltransferázy DNA, které katalyzují metylaci DNA, a heterochromatinový protein HP1. Po jejich navázání vzniká inaktivní chromatinová struktura a exprese genů je obvykle zastavena (Kouzarides, 2007).

3.4.2 Metylace DNA

Doposud nejvíce studovanou epigenetickou modifikací jsou metylace cytosinových bází, které představují negativní regulační mechanismus při řízení genové exprese. Nejčastěji dochází k náhradě cytosinu 5-metylcytosinem v sekvencích CpG (cytosine-phosphodiester bond-guanine) dinukleotidů (Doskočil a Šorm, 1962), viz obr. č. 5.



Obr. č. 5: Konverze cytosinu na 5-metylcytosin pomocí DNMTs.

5-metylcytosin (5-mC) vzniká kovalentní vazbou metylové skupiny ($-\text{CH}_3$), poskytnutou S-adenosylmethioninem (SAM) na cytosin v pozici 5-C. Distribuce CpG v genomu není náhodná, dochází k jejich shlukování v 500–2000 bp dlouhé úseky, nazývané ostrůvky CpG „CpG islands“, které se v genomu vyskytují jak hypermetylované tak v hypometylované podobě. Hypometylované ostrůvky CpG jsou přítomny v promotorech asi u 60 % často exprimovaných lidských genů (Ehrlich a kol., 1982; Esteller, 2009). Naopak hypermetylované CpG ostrůvky jsou přítomny v repetitivních sekvencích, představující oblasti centromer nebo také oblasti transpozónů (Moarefi a Chédin, 2011). Obecně platí, že exprese genu ovlivňuje metylace DNA, které se vyskytují v promotoru příslušného genu. Pokračování (elongace) transkripce, na rozdíl od její

iniciace, není tedy blokováno metylacemi DNA v ostrůvcích CpG, nacházejícími se v sekvencích genů (Riggs, 1975; Jones, 2012). Dle studie Ehrlich a kol. (1982) byly pro specifické tkáně stanoveny přibližně stejné hladiny 5-mC s výjimkou DNA získané ze spermatických buněk. Regulace genové exprese pomocí metylace DNA se podílí na ontogenezi savců (Okano a kol., 1999), hraje důležitou roli v tkáňově-specifické regulaci genů, inaktivaci X chromozomu a nejspíše také v umlčování transponovatelných elementů (Dimopoulos a kol., 2014).

3.4.2.1 Enzymy DNA metylace

Genomová DNA je během embryonálního vývoje savců metylována *de novo* za pomoci enzymů metyltransferáz DNA: DNMT3a a DNMT3b (Okano a kol., 1999; Ooi a kol., 2007) a spolu s DNMT1 se tyto enzymy podílí na udržení metylace DNA během každého buněčném dělení (Walton a kol., 2014).

DNMT3a a DNMT3b jsou silně exprimovány v embryonálních kmenových buňkách, kde se podílejí na utváření modelu metylace DNA. V liniích somatických buněk jejich exprese následně klesá, ale nedochází k její úplné inhibici (Okano a kol., 1999). Byl detekován příbuzný protein DNMT3l, bez specifické katalytické domény, který zvyšuje metylační aktivitu DNMT3a a DNMT3b (Suetake a kol., 2004). Několik studií (Ooi a kol., 2007; Jeong a kol., 2009; Sharma a kol., 2011) popsalo výskyt enzymů DNMT3a a DNMT3b na nukleozomech, což naznačuje jejich schopnost modifikovat histony v nukleozomu, a také schopnost těchto enzymů indukce metylace *de novo*. Například nukleozomy s modifikacemi H3K4me2, H3K4me3 nebo s výskytem histonové varianty H2A.Z, zabraňují navázání metyltransferáz DNA (Ooi a kol., 2007; Jones, 2012). Dle studií You a kol. (2011) se do oblasti promotoru genu nejdříve naváží histony s příslušným typem epigenetických modifikací za vzniku nukleozomu, čímž následně dochází k potlačení transkripce genů. V dalším kroku dojde k navázání enzymů DNMT3a a DNMT3b, které katalyzují *de novo* metylace, čímž zcela umlčí expresi konkrétního genu. Tento model objasňuje, že metylace DNA nejsou počátečním mechanismem umlčování genů.

Enzym DNMT1 má výraznou preferenci pro hemimetylovaná vlákna DNA, která vznikají při replikaci (Bestor a Ingram, 1983), čemuž odpovídá také zvýšená exprese během S-fáze buněčného cyklu (Robertson a kol., 2000). DNMT1 je zodpovědná za metylaci cytosinů na nově syntetizovaném vlákně podle templátové předlohy

(Walton a kol., 2014). Podle studie Chuang a kol. (1997) může DNMT1 asociovat již s replikační vidlicí během replikace. Na rozdíl od ostatních metyltransferáz DNA, aktivita DNMT1 není ovlivněna přítomností nukleozomů (Jones a Liang, 2009). Podle Jones a Liang (2009) je nepravděpodobné, že by metylační vzor vytvořený v průběhu embryonálního vývoje byl kopírován do dceřiných buněk pouze pomocí DNMT1 bez jakéhokoliv pomocného a opravného mechanismu. Proto se při metylaci komplementárního vlákna DNA předpokládá přítomnost dalších proteinů, např. typu UHRF1 (Bostick a kol., 2007).

Každá ze tří metyltransferáz DNA je nezbytná pro embryonální nebo novorozenecký vývoj (Li a kol., 1992; Okano a kol., 1999). Jones a kol. (1990) testovali několik buněčných linií, u kterých byla popsána přítomnost nemetylovaných ostrůvků CpG. U všech sledovaných linií, kde došlo k *de-novo* metylaci ostrůvků CpG, byl pozorován vliv metyltransferáz DNA na senescenci buněk a také na onkogenní transformaci buněčných linií.

3.4.2.2 DNA metylace a MM

Během progresu mnohočetného myelomu dochází k výrazným metylačním změnám (Walker a kol., 2011; Heuck a kol., 2013). Obecně platí, že při vzniku rakovinných onemocnění dochází ke globální hypometylaci DNA a k hypermetylaci v oblasti genových promotorů. Je známo, že rakovinné buňky ztrácí 20–60 % 5-mC oproti zdravým buňkám v normálním fyziologickém stavu. Tato ztráta je způsobena hypometylací intronových a exonových oblastí genů a také demetylací repetitivních sekvencí (Esteller, 2009).

Hypermetylace v promotorových oblastech tumor-supresorových genů vede k jejich umlčování. Důsledkem je přerušení transkripce genů regulujících buněčný cyklus, apoptózu a mnoho dalších funkcí důležitých pro normální aktivitu buněk (Esteller, 2009).

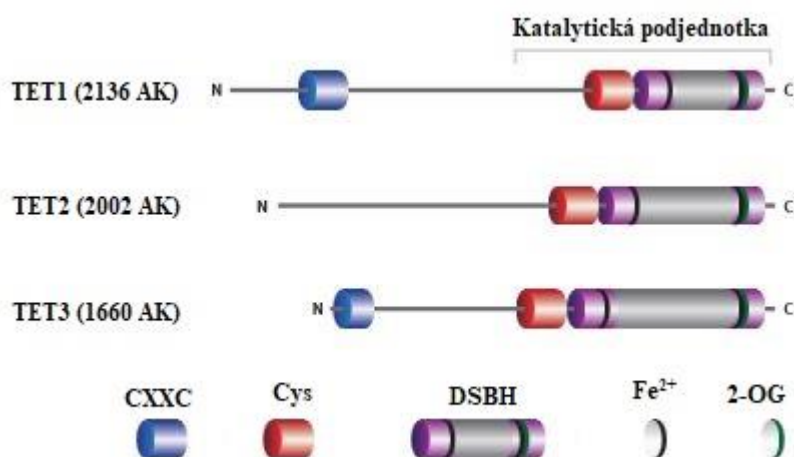
Příčiny aberantní metylace DNA u MM nejsou zcela objasněny, přičemž právě u tohoto onemocnění jsou pozorovány charakteristické znaky aberantní metylace: celkové genomové hypometylace a hypermetylace v promotorových oblastech specifických genů. Exprese DNMT1 je u MM buněk vyšší ve srovnání s normálními plasmatickými buňkami a je prokázáno, že během vývoje onemocnění se exprese zvyšuje (Walker a kol., 2011; Heuck a kol., 2013).

Metylace DNA se považovala za nevratný proces, ale v poslední době se objevuje stále více studií popisujících demetylací 5-mC a úlohu 5-hydroxymetylcytosinu (5-hmC)

v procesu metylace/demethylace (Tahiliani a kol., 2009; Ito a kol., 2010). Demethylace může probíhat pasivně nebo aktivně. Pasivním procesem demethylace je zabránění nebo omezení metylace nově syntetizovaného komplementárního vlákna po replikaci (Jones, 2012). Aktivní demethylace probíhá nezávisle na replikaci. Faktorem aktivního demetylačního procesu je 5-hmC, který vzniká aktivitou proteinů TET (ten-eleven translocation) (Tahiliani a kol., 2009; Ito a kol., 2010).

3.4.2.3 Proteiny TET

Do rodiny TET (ten-eleven translocation) proteinů patří TET1, TET2 a TET3. Jedná se dioxygenázy, jejichž kofaktory jsou 2-oxoglutarát (2-OG) a Fe^{2+} . Tyto enzymy mají schopnost převádět 5-metylcytosin (5-mC) na 5-hydroxymetylcytosin (5-hmC) (Tahiliani a kol., 2009; Ito a kol., 2010). Všechny tři typy TET proteinů mají na svém C-terminálním konci katalytickou podjednotku, složenou ze specifické oblasti bohaté na cystein, domény pro vazbu kofaktorů 2-OG a Fe^{2+} a domény DSBH s doposud neznámou funkcí. Strukturní studie naznačují, že katalytická podjednotka se přednostně váže na cytosiny v oblastech s CpG (Hu a kol., 2013). TET1 a TET3 navíc obsahují na svém N-terminálním konci doménu se sekvencí CXXC (motiv zinkového prstu), která umožňuje jejich přímou vazbu na DNA v pozicích 5-mC a 5-hmC (Xu a kol., 2011; Zhang a kol., 2010), viz obr. č. 6.



Obr. č. 6: Struktura TET proteinů. Hodnota AK udává počet aminokyselin. Doména DSBH (double-stranded beta-helix, AK 1611–2074); doména bohatá na cystein (AK 1418–1610); doména CXXC (AK 584–624) (převzato a upraveno z: Williams a kol., 2012; Rasmussen a Helin, 2016).

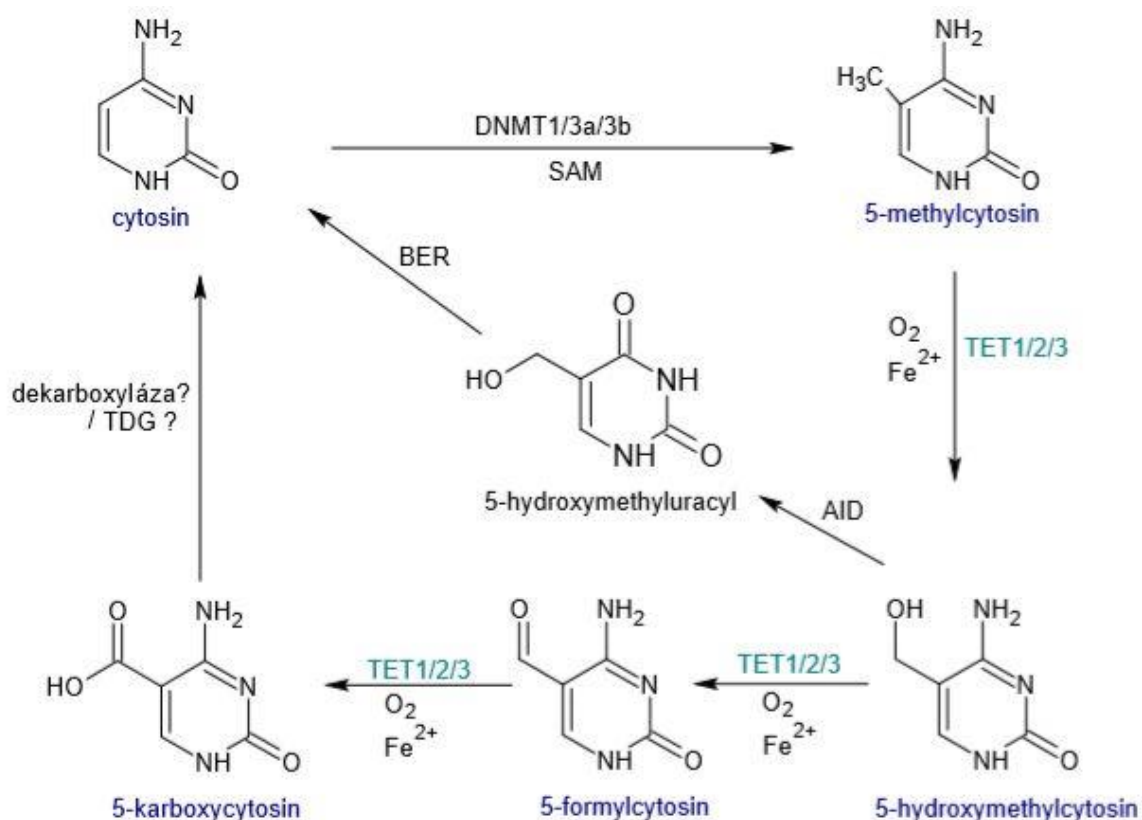
Proteiny TET vykazují odlišnou hladinu exprese, specifickou pro daný typ tkáně. Oproti TET2 a TET3, které jsou exprimovány rovnoměrně ve všech tkáních (Tahiliani a kol., 2009), vykazuje TET1 nejvyšší expresi v embryonálních kmenových buňkách (Ito a kol., 2010). TET1 má silnou vazbu k promotorovým oblastem, které vykazují signifikantně nižší hladiny 5-mC (Wu a kol., 2011). Příkladem může být udržování hypometylovaného promotoru genu *Nanog*, který je zodpovědný za schopnost sebe-obnovy kmenových buněk (Ito a kol., 2010). Vazbu proteinů TET prostřednictvím sekvence DNA ovlivňuje chromatinová struktura nebo vazba jiných proteinů (Ko a kol., 2010). Bylo prokázáno, že aktivita DNMT1 je až 60-ti násobně snížena na substrátu DNA obsahujícího 5-hmC, který je produkován právě proteiny TET v procesu aktivní demethylace (Hashimoto a kol., 2012).

Aktivní demethylace je několikastupňový cyklický proces, při němž dochází pomocí proteinů TET ke konverzi 5-mC na původní nemetylovaný cytosin, viz obr. č. 7. V souladu s tím Zhang a kol. (2010) zjistili, že při nadměrné expresi TET1 docházelo k demethylaci uměle metylované plazmidové DNA.

Prvním meziproduktem tohoto procesu je 5-hmC, který vzniká oxidací 5-mC pomocí proteinů TET (Ito a kol., 2010; Zhang a kol., 2010). V dalších krocích dochází k deaminaci 5-hmC na 5-hydroxymetyluracyl (5-hmU) pomocí deamináz AID/APOBEC cytidinu a následné báze excisní opravě (BER) nebo ke glykosylaci 5-hmC pomocí thyminových glykosyláz DNA (TDG), čímž vznikne abazické místo, ke kterému je pomocí mechanismu BER přidělen nemodifikovaný cytosin (Rai a kol., 2008; Hashimoto a kol., 2012; Williams a kol., 2012). Dle některých studií však bylo demonstrováno, že TDG nemá vliv na 5-hmC (He a kol., 2011). Ito a kol. (2011) prokázali existenci formylcytosinu (5-fC) a karboxycytosinu (5-caC) v savčí DNA, čímž potvrdili hypotézu 5-hmC jako meziprojektu enzymatické dráhy aktivní demethylace. Báze 5-fC vzniká oxidační reakcí 5-hmC a báze 5-caC následnou oxidační reakcí 5-fC, katalyzovanou pomocí proteinů TET (Ito a kol., 2011). Vzhledem k tomu, že proteiny TET nemohou konvertovat 5-caC na cytosin, musí být v tomto kroku zahrnut jiný enzym, kterým by mohla být například dekarboxyláza nebo TDG (Williams a kol., 2012), viz obr. č. 7. Předpokládanou úlohu TGD podporuje studie na myších embryonálních kmenových buňkách, kdy mutace vyřazující gen pro TDG způsobil akumulaci 5-caC na snadno detekovatelnou úroveň (He a kol., 2011).

Přítomnost 5-hmC a 5-fC v DNA saveců popisuje Bachman a kol. (2015). Stabilní přítomnost těchto modifikovaných bází v DNA předpokládá jejich jinou funkci

v demetylačním procesu než pouze jejich přítomnost. Nicméně úloha 5-hmC v demetylačním procesu a jeho další funkce v genomu není doposud plně objasněna.



Obr. č. 7: Metylační/demetylační proces cytosinu. Metyltransferázy DNA (DNMT1/3a/3b); S-adenosylmethionin (SAM); proteiny TET „ten-eleven translocation“ (TET1/2/3); deamináza (AID); básová excisní oprava (BER); thyminová glykosyláza DNA (TDG) (inspirováno: Williams a kol., 2012; Ye a Li, 2014).

Mutace nebo změny exprese v proteinech TET jsou poměrně časté u nádorových onemocnění a zejména u hemato-onkologických onemocnění je detekována mutace v genu *TET2* (Delhommeau a kol., 2009). Gen kódující *TET2* se nachází na lokusu 4q24 (NCBI). Ve studii Ko a kol. (2010) byla popsána statisticky významná korelace mezi mutacemi v genu *TET2* a sníženou hladinou 5-hmC, a naopak zvýšenou hladinou 5-mC. Naopak některé studie uvádějí zvýšené hladiny 5-mC v promotorových oblastech sledovaných genů (Figuroa a kol., 2010). Oproti tomu jiné studie popisují nezměněné hladiny 5-mC v promotorových oblastech sledovaných genů (Yamazaki a kol., 2012).

4 MATERIÁL A METODY

4.1 Biologický materiál

Jako biologický materiál byly použity vzorky aspirátu kostní dřeně (KD) pacientů s mnohočetným myelomem z hemato-onkologického oddělení fakultní nemocnice Olomouc. Vzorky byly uchovávány zmrazené při -80 °C.

4.2 Použité chemikálie, soupravy a roztoky

4.2.1 Použité chemikálie a roztoky

- 4-bromoanisol (MOLECULAR RESEARCH CENTER, INC., kat. č. BN191, USA)
- ddH₂O
- depcH₂O
- DNAzol[®] (MOLECULAR RESEARCH CENTER, INC., kat. č. TB127, USA)
- 75% ethanol
- isopropanol
- RNase ZAP (SIGMA-ALDRICH, USA)
- TRI REAGENT[®] BD (MOLECULAR RESEARCH CENTER, INC., kat. č. TB126, USA)
- sondy:
 - CD #17 (LIFE TECHNOLOGIES, kat. č. Hs00793225)
 - CD #66 (LIFE TECHNOLOGIES, kat. č. Hs00766782)
 - CD #25 (LIFE TECHNOLOGIES, kat. č. Hs00896441)
 - CD #42 (LIFE TECHNOLOGIES, kat. č. Hs00984230)
- primery (SIGMA-ALDRICH):
 - TET1 (kat. č.: left- HA10616068 ; right- HA10616069)
 - TET 2 (kat. č.: left- HA10988626; right- HA10988627)
 - TET 2a (kat. č.: left- HA09625836; right- HA09625837)
 - TET 3 (kat. č.: left- HA10616070; right- HA10616071)
 - B2M (kat. č.: left- HA08134737; right- HA08134738)

4.2.2 Použité soupravy

- Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (ROCHE, kat. č. 04897030001, Německo)
- Xceed qPCR Probe 2x Mix Lo-ROX (INSTITUTE OF APPLIED BIOTECHNOLOGIES, kat. č. LPCR10506, ČR)
- Xceed qPCR Probe 2x Mix No-ROX (INSTITUTE OF APPLIED BIOTECHNOLOGIES, kat. č. NPCR10506, ČR)
- QIAamp DNA Mini (QIAGEN, kat. č. 51106, Německo)
- EpiJET 5-hmC and 5-mC Analysis Kit (THERMO SCIENTIFIC, kat. č. K1501, USA)
- EpiMark 5-hmC and 5-mC Analysis Kit (NEW ENGLAND BIOLABS, kat. č. E3317S, USA)
- SsoAdvanced Universal SyberGreen Supermix (BIO-RAD, kat. č. 172-5271, USA)

4.3 Seznam použitých přístrojů a zařízení

0,2ml, 1,5ml a 2ml mikrokumavky, EPPENDORF

Centrifuga 3K30, SIGMA

Centrifuga LMC-3000, BIOSAN

Centrifuga MiniSpin plus, EPPENDORF

Centrifuga Multi-spin PCV-3000, GRANT-BIO

Digestoř M/900 M2, MERCI

DNA/RNA UV-cleaner box UVC/T-AR, BIOSAN

Inkubátor Dry Bath MD-02N, MAJOR SCIENCE

Lightcykler 480, ROCHE

Mikropipety Pipetman® Neo 0,2–1000 µl, GILSON

Mikropipety Research® plus, 0,1–1000 µl, EPPENDORF

Mraznička 900 series froma, THERMO SCIENTIFIC

Spektrafuga™ mini C1301-B, LABNET

Spektrofotometr NanoDrop™-1000, THERMO SCIENTIFIC

Termocykler C-1000™, BIO-RAD

Vortex mixér PV-1, GRANT-BIO

4.4 Použité experimentální a vyhodnocovací postupy

4.4.1 Izolace DNA z aspirátu kostní dřevě

S cílem detekovat přítomnost 5-mC a 5-hmC v sekvenci 5'- CCGG -3' příslušných úseků DNA genů *TET1*, *TET2* a *TET3* byla nejdříve provedena izolace DNA, z aspirátu KD pacientů, pomocí kitu QIAamp DNA Mini (QIAGEN).

- Do 1,5ml mikrozkušavky bylo pipetováno 20 μ l QIAGEN proteázy.
- Do mikrozkušavky bylo přidáno 200 μ l aspirátu KD.
- Poté bylo do mikrozkušavky pipetováno 200 μ l pufru AL.
- Vzorek byl krátce centrifugován a následně inkubován po dobu 10 min při teplotě 56 °C.
- Vzorek byl krátce centrifugován.
- Ke vzorku bylo pipetováno 200 μ l ethanolu, vzorek byl protřepán a krátce centrifugován.
- Roztok byl nanesen na QIAamp Mini kolonu, umístěnou ve 2ml sběrné zkumavce.
- Kolona byla centrifugována po dobu 1 min při otáčkách 6000 g.
- Kolona byla přenesena do čisté 2ml sběrné zkumavky a filtrát byl odstraněn.
- Na stěnu kolony bylo naneseo 500 μ l pufru AW1.
- Kolona byla centrifugována po dobu 1 min při otáčkách 6000 g.
- Kolona byla opět umístěna do čisté 2ml sběrné zkumavky a filtrát byl odstraněn.
- Na stěnu kolony bylo naneseo 500 μ l AW2 pufru.
- Kolona byla centrifugována po dobu 3 min při otáčkách 20000 g.
- Kolona byla opět umístěna do čisté 2ml sběrné zkumavky, filtrát byl odstraněn, a následovala centrifugace po dobu 1 min při otáčkách 20000 g.
- Kolona byla přenesena do čisté 1,5ml mikrozkušavky.
- Na kolonu bylo naneseo 20–60 μ l pufru AE, byla inkubována po dobu 1 min při pokojové teplotě a následně byla centrifugována po dobu 1 min při otáčkách 6000 g.
- Pomocí spektrofotometru NanoDrop byla změřena koncentrace a čistota získané DNA. Koncentrace dosahovala hodnot 102,1–246,6 ng· μ l⁻¹.
- Získaná DNA byla uskladněna při -20 °C.

4.4.2 Detekce metylací a hydroxymethylací

Pro detekci metylací (přítomnost 5-mC) a hydroxymethylací (přítomnost 5-hmC) byl použit metodický postup podle EpiJET 5-hmC and 5-mC Analysis Kit (THERMO SCIENTIFIC). Izolovaná DNA byla glukosylována UDP-glucose a v dalších krocích štěpena pomocí metylačně senzitivních restrikčních enzymů MspI a HpaII. Pracovní postup byl optimalizován kombinací metodických postupů výše uvedeného kitu a EpiMark 5-hmC and 5-mC Analysis Kit (NEW ENGLAND BIOLABS).

MspI a HpaII jsou restrikční enzymy, které rozpoznají specifickou sekvenci 5'- CCGG -3', ale mají odlišnou citlivost k 5-mC v této sekvenci. Enzym MspI štěpí sekvenci v přítomnosti 5-mC i 5-hmC, ale jeho aktivita je blokována, pokud je 5-hmC glukosylováný. HpaII štěpí pouze nemodifikovaný cytosin v 5'- CCGG -3' sekvenci (EpiJet). Glukosylaci DNA umožňuje přítomnost enzymu T4-glukosyltransferázy (T4-BGT). Tato reakce je nezávislá na nukleotidové sekvenci, a proto jsou všechny 5-hmC glukosylovány a nemodifikované cytosiny nebo 5-mC obsažené v DNA nejsou ovlivněny (EpiMark).

DNA glukosylace byla provedena podle protokolu EpiMark.

- Do 1,5ml mikrozkušavky byly pipetovány komponenty, viz tab. č. 4.
- Reakční směs byla rozdělena do dvou 1,5ml mikrozkušavek tak, že v každé mikrozkušavce bylo 155 μ l reakční směsi.
- Do jedné mikrozkušavky byly pipetovány 3 μ l T4 β -glukosyltransferázy (T4-BGT) o počáteční koncentraci (10 U $\cdot\mu$ l⁻¹).
- Do druhé mikrozkušavky byly pipetovány 3 μ l deionizované H₂O.
- Směs obou zkušavek byla opatrně promísena a inkubována po dobu 12–18 hod při teplotě 37 °C.

Restrikční štěpení pomocí enzymů MspI a HpaII bylo provedeno podle protokolu EpiJET. Pro přehlednost jsou jednotlivé enzymy obsažené v 0,2ml mikrozkušavkách rozepsány v tab. č. 5 a přítomnost štěpené/neštěpené DNA v tab. č. 6.

- Po inkubaci bylo ze směsi s obsahem T4-BGT přeneseno 50 μ l do čisté 0,2ml mikrozkušavky a tato mikrozkušavka byla označena číslem 3.

- Ze směsi s obsahem deionizované H₂O bylo postupně přeneseno po 50 µl do čistých 0,2ml mikrozkuvek s označením **1, 2 a 4**.
- Do mikrozkuvky **2** byl pipetován 1 µl HpaII.
- Do mikrozkuvek **3 a 4** byl pipetován 1 µl MspI.
- Do mikrozkuvky **1** byl pipetován 1 µl deionizované H₂O.
- Směs byla důkladně promíchána a krátce centrifugována.
- Mikrozkuvky byly inkubovány po dobu 4 hod při teplotě 37 °C.

Tab. č. 4: Komponenty pro glukosylační reakční směs.

komponenty	objem [µl]	výsledná koncentrace
DNA	odpovídající 5 µg DNA	30 µg·ml ⁻¹
2mmol·l ⁻¹ UDP-glukóza	12,4	80 µmol·l ⁻¹
10x NEBuffer 4	31	1x
deionizovaná H ₂ O	do objemu 310	
Celkem	310	

Tab. č. 5: Enzymy obsažené v jednotlivých 0,2ml mikrozkuvkách.

1	2	3	4
-	-	T4-BGT	-
-	HpaII	-	-
-	-	MspI	MspI

Tab. č. 6: Přítomnost modifikované štěpené/neštěpené DNA v mikrozkuvkách 1, 2, 3 a 4.

1	kontrolní neštěpená DNA
2	rozštěpená DNA v CCGG sekvencích s nemodifikovaným C
3	rozštěpená DNA v CCGG sekvencích s nemodifikovaným C nebo 5-mC
4	rozštěpená DNA v CCGG sekvencích s nemodifikovaným C, 5-mC nebo 5-hmC

4.4.3 Analýza 5-mC a 5-hmC pomocí qPCR

DNA, štěpená pomocí restričních enzymů MspI a HpaII, byla analyzována pomocí absolutní kvantifikace qPCR na přítomnost 5-mC a 5-hmC. Pro qPCR byl použit SsoAdvanced Universal SyberGreen Supermix a primery, viz tab. č. 9.

- Byla připravena reakční směs pro qPCR z komponent uvedených, viz tab. č. 7, objem pro 1 jamku byl vynásoben 4 (modifikovaná DNA = mikrozkušavky 1, 2, 3, 4 jednotlivých vzorků) a 2 (duplikáty).
- Reakční směs byla pipetována do 96-ti jamkové destičky po 19 μl na 1 jamku, viz tab. č. 7.
- Do jamek destičky byl pipetován 1 μl modifikované štěpené/neštěpené DNA z mikrozkušavek 1, 2, 3, 4 ve dvou opakováních, viz tab. č. 7.
- Destička byla zalepena fólií a centrifugována po dobu 2 min při 1200 g.
- Pomocí přístroje Lightcycler s přednastaveným programem, viz tab. č. 8, byly získány grafy s profily amplifikačních křivek a z programu pro absolutní kvantifikaci byly použity Ct hodnoty pro následné analýzy metylačních a hydroxymetylačních změn.

Tab. č. 7: Komponenty pro qPCR směs a následné pipetování vzorků.

komponenty	objem pro 1 jamku [μl]	výsledná koncentrace
2x SsoAdvanced universal Syber Green supermix	10	1x
10 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ left primer, viz tab. č. 9	0,8	400 $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$
10 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ right primer, viz tab. č. 9	0,8	400 $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$
deionizovaná H ₂ O	7,4	
celkem	19	
následně pipetováno:		
modifikovaná DNA 1/2/3/4	1	
celkem	20	

Tab. č. 8: Teplotní profil qPCR.

krok	teplota [$^{\circ}\text{C}$]	čas	cykly
aktivace polymerázy	95	10 min	1
denaturace	95	10 s	40+10
hybridizace	60	30 s	
elongace	72	20 s	

Tab. č. 9: Seznam použitých primerů a sond.

primer	sekvence primeru	sonda
TET 1		
left	CAGCCATCAGATCTGTAAGAAAAG	CD #17
right	GGCCTCTTGTTTTTCCTTTATAAC	
TET 2		
left	GAAGGTGGGCCGGGGCGG	CD #66
right	GAGAGGGTGTGCTGCTGAAT	
TET 2 (pouze pro expresní analýzu)		
left	ACGCTTGGAAGCAGGAGAT	CD #66
right	AAGGCTGCCCTCTAGTTGAA	
TET 3		
left	CGCCTCTATCCGGGAAC	CD #25
right	CTTCCCCGTGTAGATGACCT	
β2M (pouze pro expresní analýzu)		
left	TTCTGGCCTGGAGGCTATC	CD #42
right	TCAGGAAATTTGACTTTCCATTC	

4.4.4 Izolace RNA z aspirátu kostní dřeně

Stanovení exprese genů *TET1*, *TET2* a *TET3* předcházela izolace RNA z aspirátu kostní dřeně pacientů podle metodického postupu TRI REAGENT® RT-BLOOD (MOLECULAR RESEARCH CENTER). Izolace RNA byla provedena v digestoři, pracovní plochy byly ošetřeny inhibitory RNAz - RNase ZAP (SIGMA-ALDRICH), byly používány chladicí boxy.

- Do 1,5ml mikrokumavek bylo pipetováno 750 µl roztoku TRI-reagent RT-Blood a 125 µl aspirátu KD.
- Aspirát KD byl s TRI-reagentem ihned promíchán pomocí vortex.
- Ke směsi bylo pipetováno 50 µl 4'-bromanisolu.
- Tato směs byla ihned 15 s pulzně pomíchána pomocí vortex.
- Následně byl vzorek centrifugován po dobu 15 min při otáčkách 12 000 g a teplotě 4 °C. Centrifugací byly vytvořeny 3 fáze, přičemž RNA byla přítomna v horní fázi.

- Do 1,5ml mikrozkušavky bylo odebráno přibližně 500 μl horní fáze, do které bylo následně pipetováno 500 μl isopropanolu.
- Směs byla opatrně promísena a inkubována po dobu 10 min při pokojové teplotě.
- Následně byla směs centrifugována po dobu 5 min při otáčkách 12 000 g a teplotě 4 °C.
- Supernatant byl odstraněn a vzniklý pelet byl pomocí vortex promýván 1 ml 75% ethanolu.
- Vzorek byl centrifugován po dobu 5 min při otáčkách 6 000 g a teplotě 24 °C.
- Supernatant byl odstraněn a dle velikosti peletu byl pelet resuspendován ve 20–40 μl de pH_2O .
- Následně byla pomocí spektrofotometru NanoDrop změřena koncentrace a čistota získané RNA. Koncentrace dosahovala hodnot 34–449,5 $\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$.
- Získaná RNA byla uskladněna při -80 °C.

4.4.5 Reverzní transkripce (RT-PCR)

Ze vzorků RNA byla pomocí kitu Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (ROCHE) připravena cDNA.

- Do 0,2ml mikrozkušavek byly pipetovány 2 μl random hexamer primeru, 100 ng RNA a deionizovanou H_2O byl objem doplněn do 13 μl .
- Vzorky byly denaturovány po dobu 10 min při 65 °C.
- Po ukončení denaturace byly vzorky okamžitě zchlazeny.
- Ke vzorkům byly postupně pipetovány komponenty, viz tab. č. 10.
- Vzorky byly inkubovány v termocykleru po dobu 10 min při teplotě 25 °C, následně po dobu 30 min při teplotě 55 °C, a nakonec po dobu 5 min při teplotě 85 °C.
- cDNA byla použita přímo pro qPCR, nebo byla uskladněna při -20 °C.

Tab. č. 10: Komponenty pro RT-PCR.

komponenty	objem pro 1 reakci [μl]	výsledná koncentrace
5x transcriptor reverse transcriptase reaction pufr	4	1x
$40\text{U}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ protector RNase inhibitor	0,5	20 U
$10\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ deoxynukleotidový mix	2	$1\text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$
$20\text{ U}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ transcriptor reverse transkriptáza	0,5	10 U
celkem (+13 μl z 1. kroku)	20 μl	

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

Relativní kvantifikace exprese genů *TET1* (tet metylcytosin dioxygenáza 1), *TET2* (tet metylcytosin dioxygenáza 2) a *TET3* (tet metylcytosin dioxygenáza 3) byla provedena metodou real-time PCR, známou i jako kvantitativní PCR (qPCR). Pomocí relativní kvantifikace můžeme analyzovat změny exprese určitého genu v porovnání s referenčním vzorkem (např. zdravá kontrola), tedy s normalizovanou kontrolou. Všechny vzorky jsou většinou normalizovány k referenčním genům, které se označují jako „housekeepingové“ geny. Normalizovaná kontrola je porovnávána se vzorkem a výsledkem je násobek exprese genu vzorku oproti genu normalizované kontroly (fold change). Pro relativní kvantifikaci exprese genů: *TET1*, *TET2* a *TET3* byla provedena real-time PCR pomocí Xceed qPCR Probe 2x Mix Lo-ROX (No-ROX). Vzorky pacientů s MM byly porovnávány se vzorkem zdravých jedinců (NC1), které byly podle kroku 4.4.5 RT-PCR převedeny do cDNA. Jako „housekeepingový“ gen byl použit gen pro beta-2-mikroglobulin (*$\beta 2M$*). Byly použity primery a k nim kompatibilní sondy, viz tab. č. 9.

- Byla připravena reakční směs pro qPCR z komponent, viz tab. č. 11, objem pro 1 jamku se vynásobil počtem vzorků a 3 (triplety).
- Následně byla reakční směs pro qPCR rozdělena do 96-ti jamkové destičky po 18,6 μl na 1 jamku, viz tab. č. 11.
- Do jamek destičky byl pipetován 1 μl vzorku cDNA, který byl vždy přítomen ve třech opakováních (triplet), a k němu 0,4 μl příslušné sondy, viz tab. č. 11.
- Destička byla přelepena fólií a centrifugována po dobu 2 min při 1200 g.

- Pomocí přístroje Lightcycler s přednastaveným programem, viz tab. č. 12, byla expresní data vyhodnocena programem pro relativní kvantifikaci.

Tab. č. 11: Komponenty pro qPCR směs a následné pipetování vzorků a sond.

komponenty	objem pro 1 jamku [μl]	výsledná koncentrace
Xceed qPCR Probe 2x mix	10	1x
10 μ mol \cdot l ⁻¹ left primer, viz tab. č. 9	0,8	400 nmol \cdot l ⁻¹
10 μ mol \cdot l ⁻¹ right primer, viz tab. č. 9	0,8	400 nmol \cdot l ⁻¹
deionizovaná H ₂ O	7	-
celkem	18,6	
následně pipetováno:		
10 μ mol \cdot l ⁻¹ sonda, viz tab. č. 9	0,4	200 nmol \cdot l ⁻¹
cDNA templát	1	variabilní
celkem	20	

Tab. č. 12: Teplotní profil qPCR.

krok	teplota [°C]	čas	cykly
aktivace polymerázy	95	2 min	1
denaturace	95	5 s	40+10
hybridizace/elongace	63	25 s	

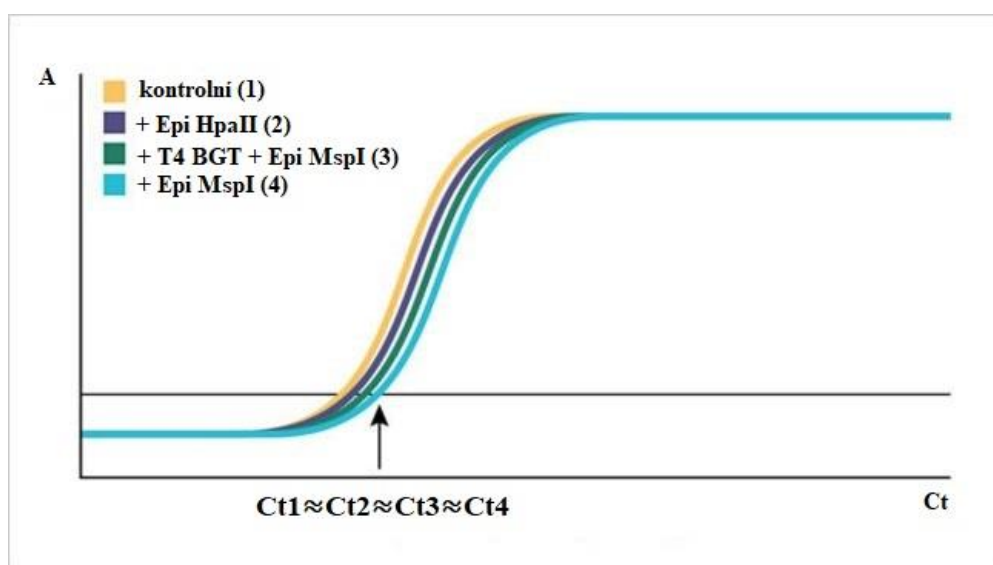
5 VÝSLEDKY

5.1 Detekce metylací a hydroxymetylací u genů *TET1*, *TET2* a *TET3*

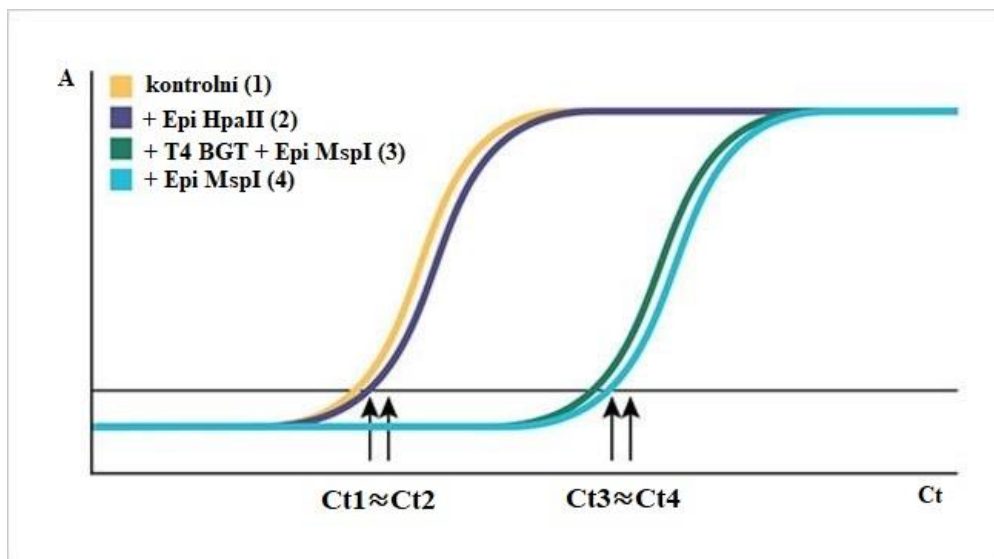
Pro detekci modifikovaných cytosinů 5-metylcytosin (5-mC) a 5-hydroxymetylcytosin (5-hmC) ve specifických úsecích DNA genů *TET1*, *TET2* a *TET3* byl použit postup EpiJET 5-hmC and 5-mC Analysis Kit (THERMO SCIENTIFIC). Podle protokolu byla genomová DNA po glukosylaci štěpena restrikcí endonukleázami *MspI* a *HpaII* a následně byla provedena absolutní kvantifikace úseků DNA, pro jejichž výběr byla limitující přítomnost sekvence 5'- CCGG -3'. Pro absolutní kvantifikaci byla použita metoda qPCR.

Pro detekci 5-mC a 5-hmC bylo použito 5 vzorků DNA pacientů s MM, u kterých byla současně provedena expresní analýza sledovaných genů. Cílem absolutní kvantifikace specifických úseků DNA bylo stanovení počtu cyklů u tří kombinací štěpení a jedné kontroly (1–4), viz tab. 5 a 6, a porovnání průběhu jednotlivých amplifikačních křivek v grafu závislosti fluorescence na počtech cyklů (popř. čase) podle vzorů (1–4) uvedených v protokolu.

Z celkového počtu vzorových profilů amplifikačních křivek v pěti grafech, byla detekována shoda se dvěma profilovými vzory, viz graf č. 1 a 2.

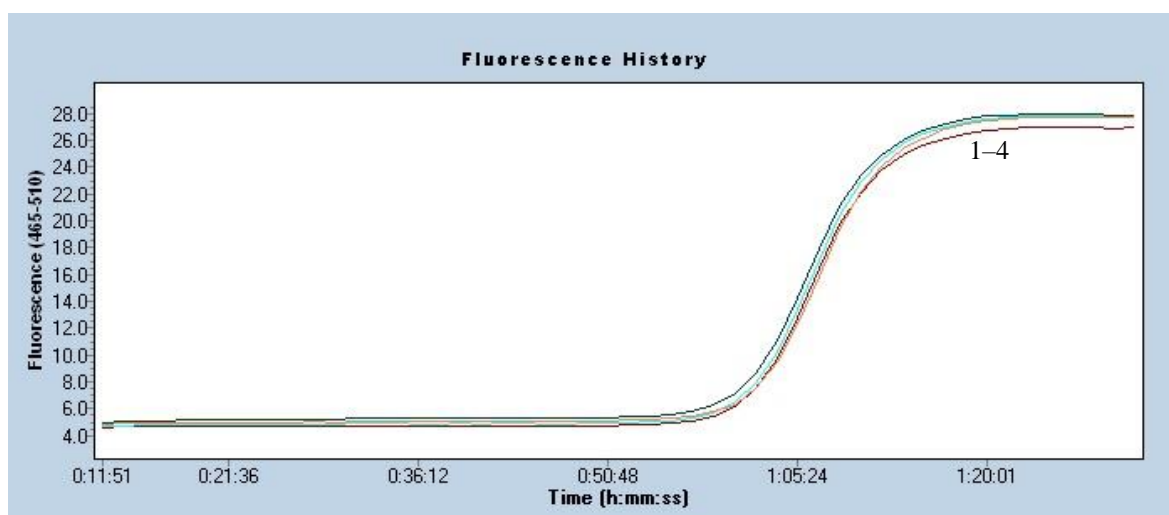


Graf. č. 1: Detekce nepřítomnosti metylace v sekvenci 5'- CCGG -3' pomocí enzymů *HpaII* a *MspI*.
Převzato z: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/K1501>

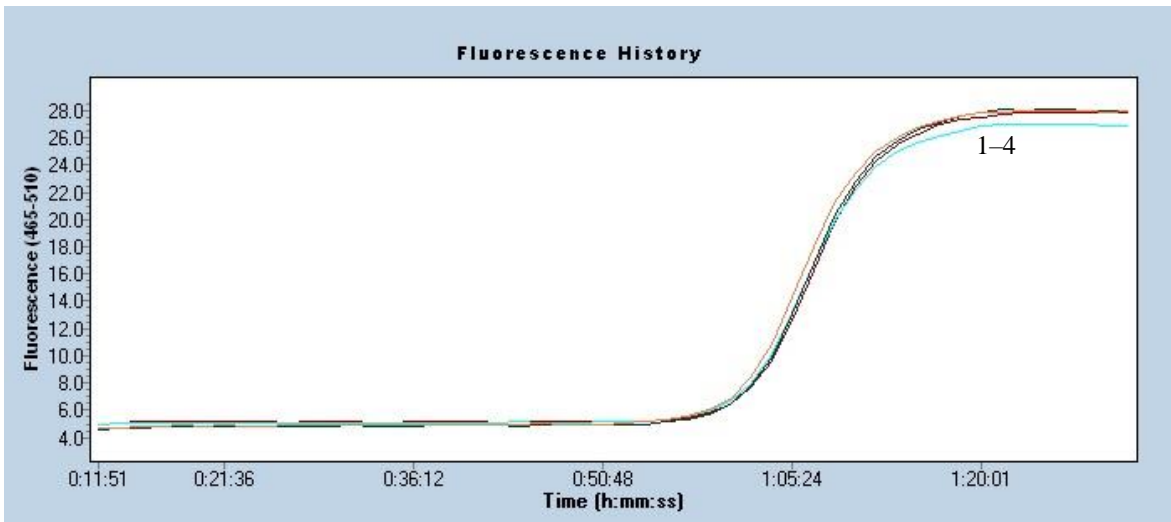


Graf. č. 2: Detekce metylace v sekvenci 5'- CCGG -3' pomocí enzymů HpaII a MspI. Převzato z: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/K1501>.

Analýza metylačních a hydroxymetylačních změn u genu *TET1*. U kvantitativního PCR s primery specifickými pro gen *TET1* jsme získali profil amplifikačních křivek u 5 vzorků DNA pacientů s MM odpovídající vzorovému grafu č. 1. Hodnoty Ct v grafu č. 1 jsou pro odlišně modifikovanou genomovou DNA 1–4 přibližně stejné, což indikuje nepřítomnost 5-mC a 5-hmC v tomto úseku genu *TET1*. Pro ukázkou amplifikační křivky, zhotovenou během qPCR, byly vybrány vzorky pacientů č. 90 a 96, viz graf č. 3 a 4.

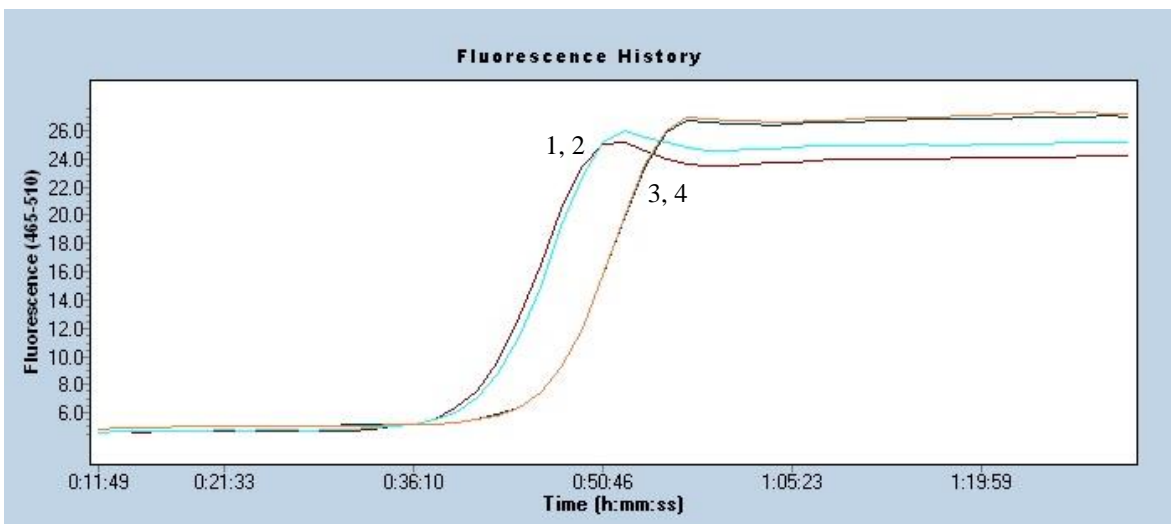


Graf. č. 3: qPCR závislost fluorescence na čase u vzorku č. 90 u genu *TET1*.

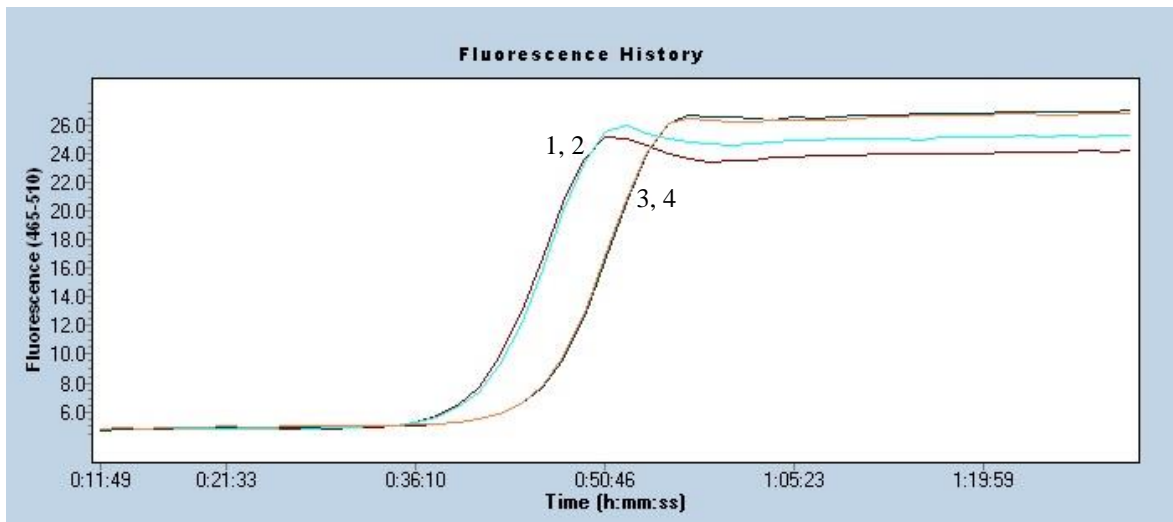


Graf. č. 4: qPCR závislost fluorescence na čase u vzorku č. 96 u genu *TET1*.

Analýza metylačních a hydroxymetylačních změn u genu *TET2*. U kvantitativního PCR s primery specifickými pro gen *TET2* jsme získali profil amplifikačních křivek u 5 vzorků DNA pacientů s MM odpovídající vzorovému grafu č. 2. Hodnoty Ct v grafu č. 2 jsou přibližně stejné u modifikací 1 a 2 a následně u modifikací 3 a 4, což naznačuje přítomnost metylovaného cytosinu 5-mC v sekvenci 5'-CCGG-3' amplifikovaného úseku DNA. Pro ukázkou amplifikační křivky, zhotovenou během qPCR, byly vybrány vzorky pacientů č. 90 a 96, viz graf č. 5 a 6.

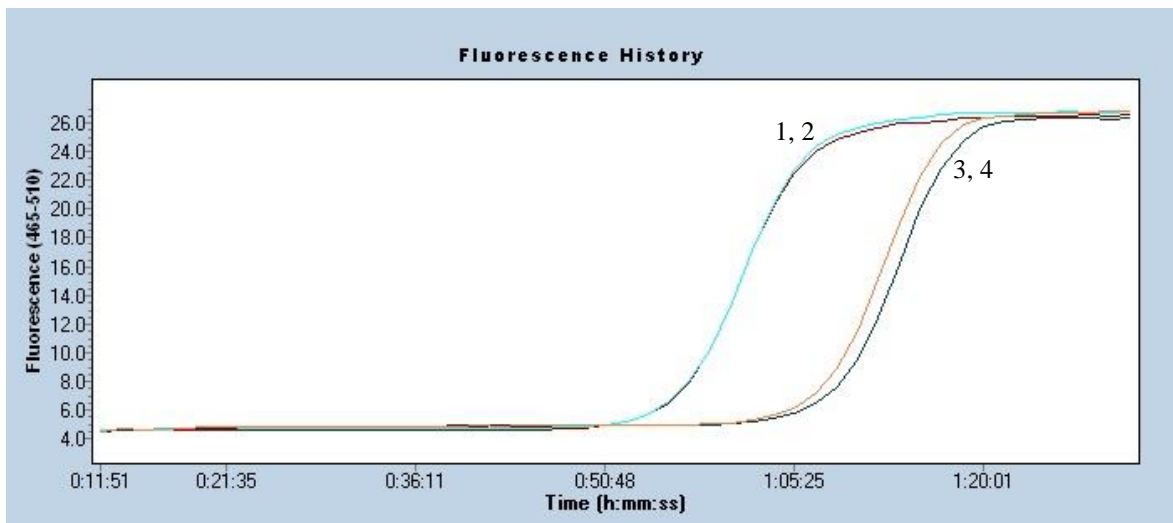


Graf. č. 5: qPCR závislost fluorescence na čase u vzorku č. 90 u genu *TET2*.

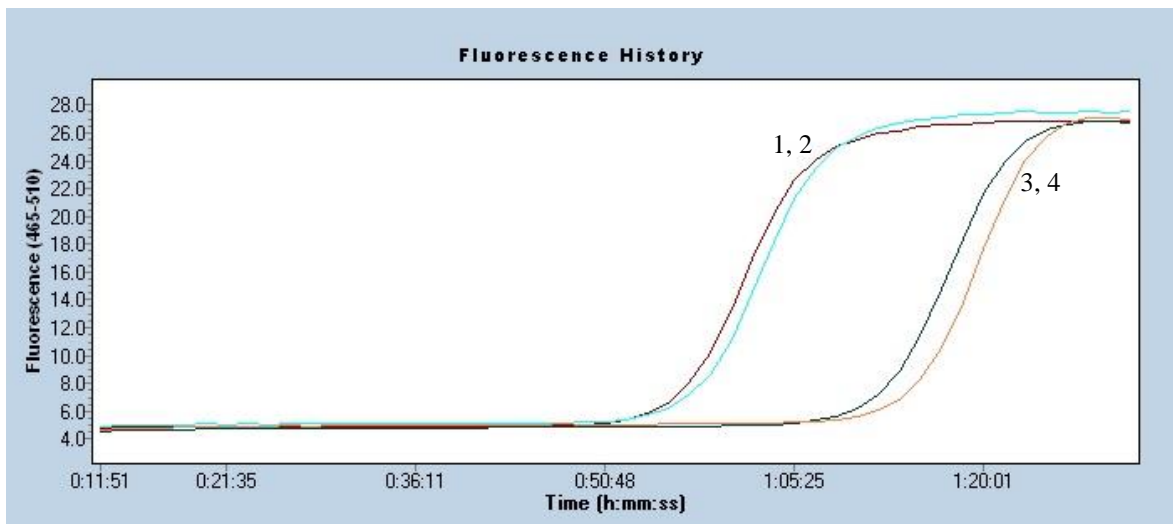


Graf. č. 6: qPCR závislost fluorescence na čase u vzorku č. 96 u genu *TET2*.

Analýza metylačních a hydroxymetylačních změn u genu *TET3*. U kvantitativního PCR s primery specifickými pro gen *TET3* jsme získali profil amplifikačních křivek u 5 vzorků DNA pacientů s MM odpovídající vzorovému grafu č. 2. Hodnoty Ct jsou přibližně stejné u modifikací 1 a 2 a následně u modifikací 3 a 4, což naznačuje přítomnost metylovaného cytosinu 5-mC v sekvenci 5'- CCGG -3' amplifikovaného úseku DNA. Pro ukázkou amplifikační křivky, zhotovenou během qPCR, byly vybrány vzorky pacientů č. 90 a 96, viz graf č. 7 a 8.



Graf. č. 7: qPCR závislost fluorescence na čase u vzorku č. 90 u genu *TET3*.



Graf. č. 8: qPCR závislost fluorescence na čase u vzorku č. 96 u genu *TET3*

Absolutní kvantifikace produktů restrikčního štěpení genu *TET1*. Naměřené hodnoty C_t pro gen *TET1* byly u jednotlivých amplifikačních křivek čtyř typů modifikované štěpené/neštěpené DNA (1–4) přibližně stejné, viz tab. č. 13. (Celkové shrnutí výsledků pro gen *TET1*, viz příloha č. 1). Zjištěná úroveň hodnot C_t potvrzuje nepřítomnost metylačních nebo hydroxymetylačních změn ve sledovaném úseku genu *TET1*, viz graf č. 3 a 4.

Tab. č. 13: Hodnoty C_t naměřené pro gen *TET1*.

<i>TET1</i>	C_t							
vzorky	1a	1b	2a	2b	3a	3b	4a	4b
88	31,98	32,01	32,08	32,13	32,15	32,07	32,42	32,09
89	31,47	31,55	31,12	31,46	31,77	31,75	31,98	31,71
90	31,77	31,43	31,54	31,32	30,95	31,15	31,13	31,70
96	31,63	31,73	31,33	31,54	31,51	31,14	31,11	31,48
98	31,80	31,63	31,66	33,56	31,69	31,63	31,78	31,53

Písmeno a/b označuje duplikáty jednotlivých modifikací s odlišně štěpenou genomovou DNA, viz kapitola 4.4.2.

Absolutní kvantifikace produktů restrikčního štěpení genu *TET2*. Naměřené hodnoty C_t pro gen *TET2* vykazovaly dvě úrovně hodnot. Hodnoty C_t byly přibližně stejné u 1. a 2. typu modifikované štěpené/neštěpené DNA, a u 3. a 4. typu modifikované štěpené/neštěpené DNA, viz tab. č. 14. (Celkové shrnutí výsledků pro gen *TET2*, viz příloha č. 2). Ze získaných hodnot C_t byly pomocí níže uvedeného vzorce vypočítány hodnoty, které jsou-li větší nebo rovny 4,5 potvrzují přítomnost metylačních změn, souhrn

vypočítaných hodnot viz tab. č. 15. U vzorků č. 88, 89, 90 a 96 byly výsledné hodnoty v rozmezí 3,04–3,52.

Vzorec pro výpočet úrovně metylace a příklad výpočtu z hodnot Ct vzorku 88a (gen *TET2*):

$$(Cq3 \approx Cq4) - (Cq1 \approx Cq2) \geq 4,5$$

$$\left[\frac{(Cq3 + Cq4)}{2} \right] - \left[\frac{(Cq1 + Cq2)}{2} \right] \geq 4,5$$

$$\left[\frac{(3a + 4a)}{2} \right] - \left[\frac{(1a + 2a)}{2} \right] \geq 4,5$$

$$\left[\frac{(23,23 + 22,62)}{2} \right] - \left[\frac{(19,41 + 19,82)}{2} \right] = 3,31$$

Tab. č. 14: Hodnoty Ct naměřené pro gen *TET2*.

<i>TET2</i>	<i>C_t</i> (počet cyklů)							
vzorky	1a	1b	2a	2b	3a	3b	4a	4b
88	19,41	19,24	19,82	19,91	23,23	23,55	22,62	22,64
89	18,90	18,68	19,07	19,18	22,26	22,16	22,12	22,00
90	18,61	18,65	18,89	19,07	21,82	22,01	21,75	22,03
96	18,78	18,60	19,04	19,17	22,28	22,40	21,71	21,71
98y	19,90	19,77	19,79	20,03	22,63	28,28	22,52	24,60

Písmeno a/b označuje duplikáty jednotlivých modifikací s odlišně štěpenou genomovou DNA, viz kapitola 4.4.2. Písmeno y označuje opakování některých pokusů se stejným vzorkem.

Tab. č. 15: Hodnoty vypočítané dle výše uvedeného vzorce pro gen *TET2*.

<i>TET2</i>		
vzorky	a	b
88	3,31	3,52
89	3,21	3,15
90	3,04	3,16
96	3,09	3,17
98y	2,73	6,54

Absolutní kvantifikace produktů restrikčního štěpení genu *TET3*. Naměřené hodnoty Ct pro gen *TET3* vykazovaly dvě úrovně hodnot. Hodnoty Ct byly přibližně stejné u 1. a 2. typu modifikované štěpené/neštěpené DNA, a u 3. a 4. typu modifikované štěpené/neštěpené DNA, viz tab. č. 16. (Celkové shrnutí výsledků pro gen *TET3*, viz příloha č. 3). Ze získaných hodnot Ct byly pomocí níže uvedeného vzorce vypočítány hodnoty, které jsou-li větší nebo rovny 4,5 potvrzují přítomnost metylačních změn.

(Souhrn vypočítaných hodnot, viz tab. č. 17). U všech vzorků byly získány duplikáty s nízkou odchylkou ($\Delta Cq \leq 0,5$). Vypočítané hodnoty u všech 5 vzorků byly v rozmezí 6,92–10,30, což potvrzuje přítomnost metylačních změn ve sledovaném úseku genu *TET3*, viz graf č. 7 a 8.

Vzorec pro výpočet úrovně metylace a příklad výpočtu z hodnot C_t vzorku 88a (gen *TET3*):

$$(Cq3 \approx Cq4) - (Cq1 \approx Cq2) \geq 4,5$$

$$\left[(Cq3 + Cq4) / 2 \right] - \left[(Cq1 + Cq2) / 2 \right] \geq 4,5$$

$$\left[(3a + 4a) / 2 \right] - \left[(1a + 2a) / 2 \right] \geq 4,5$$

$$\left[(35,93 + 37,07) / 2 \right] - \left[(28,52 + 28,91) / 2 \right] = 7,79$$

Tab. č. 16: Hodnoty C_t naměřené pro gen *TET3*.

<i>TET3</i>	C_t (počet cyklů)							
vzorky	1a	1b	2a	2b	3a	3b	4a	4b
88	28,52	28,53	28,91	29,04	35,93	35,87	37,07	38,67
89	28,13	27,86	28,47	28,16	36,86	36,05	35,96	36,65
90	28,18	28,07	28,25	28,03	35,73	36,56	35,01	37,03
96	28,28	28,91	29,07	29,24	38,02	39,97	39,49	38,78
98	32,64	32,42	32,89	32,45	41,57	41,43	38,84	37,28

Písmeno a/b označuje duplikáty jednotlivých modifikací s odlišně štěpenou genomovou DNA, viz kapitola 4.4.2. Písmeno y označuje opakování některých pokusů se stejným vzorkem.

Tab. č. 17: Hodnoty vypočítané dle výše uvedeného vzorce pro gen *TET3*.

<i>TET3</i>		
vzorky	a	b
88	7,79	8,49
89	8,11	8,34
90	7,16	8,85
96	10,08	10,30
98	7,44	6,92

5.2 Relativní kvantifikace exprese genů *TET1*, *TET2* a *TET3*

Cílem expresní analýzy bylo zjistit úroveň exprese genů *TET1*, *TET2* a *TET3* ve srovnání s úrovní exprese těchto genů u zdravých jedinců. Vzorky pacientů s MM byly porovnávány se vzorkem zdravého jedince (NC1). Jako „housekeepingový“ gen byl zvolen $\beta 2M$ (beta-2-mikroglobulin).

Bylo analyzováno 7 vzorků izolovaných z aspirátu kostí dřeně od pacientů s MM. Měření byla prováděna v tripletech nebo v duplikátech.



Graf. č. 9: Expresce proteinů *TET1*, *TET2* a *TET3* u sledovaných pacientů s MM.

Expresce genu *TET1* dosahovala oproti genům *TET2* a *TET3* vyšších hodnot a vyšší variability. Expresce genů *TET2* a *TET3* je ve srovnání s expresí genu *TET1* výrazně nižší.

Metylační změny byly detekovány u genu *TET2* a výrazně signifikantní byly u genu *TET3*. U genu *TET1* nebyly metylační změny zjištěny. Přítomnost metylačních změn ve sledovaném úseku DNA u genu *TET2* a *TET3* může souviset s výrazně nižší expresí obou genů, viz graf č. 9, ve srovnání s expresí genu *TET1*, u kterého nebyly detekovány metylační změny.

6 DISKUSE

Cílem bakalářské práce bylo detekovat metylační a případně hydroxymetylační změny ve sledovaných úsecích DNA v genech *TET1*, *TET2* a *TET3* s následnou expresní analýzou těchto genů u vzorků pacientů s mnohočetným myelomem. Stanovení hladiny 5-hmC u myeloidních malignit může být cenným diagnostickým a prognostickým nástrojem při léčbě mnohočetného myelomu (Ko a kol., 2010).

Metylace DNA úzce souvisí a ovlivňuje ontogenetický vývoj člověka a změněný metylační vzorec je průvodním znakem nádorových onemocnění. *TET1*, *TET2* a *TET3* patří do rodiny proteinů TET (ten-eleven translocation). Tyto enzymy mají schopnost převádět 5-metylcytosin na 5-hydroxymetylcytosin (Tahiliani a kol., 2009; Ito a kol., 2010). Člen rodiny *TET1* byl identifikován jako fúzní partner myeloid/lymphoid leukemie (MLL) v t(10;11) (q22;23) translokací akutní leukémie (Ono a kol., 2002; Lorschbach a kol., 2003). Mutace v genu *TET2* byly opakovaně identifikovány u pacientů s myeloidními malignitami (Delhommeau a kol., 2009; Langemeijer a kol., 2009; Tefferi a kol., 2011). Ko a kol. (2010) popsal, že u většiny testovaných vzorků od pacientů s MM, u kterých nebyla zjištěna mutace v genu *TET2* měla vysokou hladinu 5-hmC, zatímco vzorky s mutací v genu *TET2* vykazovaly nízkou úroveň 5-hmC.

Celkem bylo hodnoceno 7 pacientů, viz příloha 1–3. U genů *TET1* a *TET2* nebyly prokázány signifikantní metylační změny v sekvenci 5'- CCGG -3'. U genů *TET3* byla prokázána přítomnost metylací ve sledované sekvenci. Expresní analýza těchto genů prokázala zvýšenou hladinu exprese genu *TET1* oproti genům *TET2* a *TET3*.

Naměřené hodnoty Ct pro gen *TET1* byly přibližně stejné, viz tab. 13, což potvrzuje nepřítomnost metylačních nebo hydroxymetylačních změn ve sledovaném úseku genu *TET1*, viz graf č. 3 a 4. Profil amplifikačních křivek sledované sekvence genu *TET1* u všech 7 vzorků pacientů s MM odpovídal vzorovému grafu č. 1. (www.thermofisher.com). Hodnoty Ct v grafu č. 1 jsou pro odlišně modifikovanou genomovou DNA 1–4 přibližně stejné, což může být způsobeno tím, že HpaII a MspI nedetekují místo pro modifikaci. Příčinou může být také vnější modifikovaný C v 5'- CCGG -3' sekvenci, který také HpaII a MspI neštěpí.

U genu *TET2* a *TET3* byl profil amplifikačních křivek u 7 vzorků DNA pacientů s MM odpovídající vzorovému grafu č. 2. (www.thermofisher.com). Enzym HpaII dokáže rozštěpit pouze nemodifikovaný cytosin. Tím, že nedošlo k naštěpení sledované sekvence DNA (její amplifikační profil u modifikací 1 a 2 je téměř shodný) byla indikována možná

přítomnost metylovaného cytosinu 5-mC v sekvenci 5'-CCGG-3' amplifikovaného úseku DNA.

Naměřené hodnoty Ct pro geny *TET2* a *TET3* vykazovaly dvě úrovně hodnot. Hodnoty Ct byly přibližně stejné u 1. a 2. typu modifikované štěpené/neštěpené DNA a u 3. a 4. typu modifikované štěpené/neštěpené DNA, viz tab. č. 14. a č. 16. Hodnoty vypočítané pomocí uvedeného vzorce, viz tab. č. 15, nepotvrdily u vzorků č. 88, 89, 90, 96 přítomnost metylací v genu *TET2*. U vzorku č. 98 byla mezi duplikáty příliš velká odchylka, a proto hodnota 6,54, která by naznačovala metylaci, nebyla považována za signifikantní. U genu *TET3* byly hodnoty vypočítané pomocí uvedeného vzorce, viz tab. č. 17, v rozmezí 6,92–10,30, což naznačuje signifikantní přítomnost metylačních změn ve sledovaném úseku genu. Navíc byly u všech vzorků získány duplikáty s nízkou odchylkou ($\Delta Cq \leq 0,5$). Zapojení genu *TET3* na vzniku nebo rozvoji hemato-onkologických onemocnění nebylo doposud podrobně popsáno. Abdel-Wahab a kol. (2009) analyzovali mutační status genů *TET1*, *TET2* a *TET3* u myeloproliferativních neoplazií, chronické myelomonocytární leukémii a akutní myeloidní leukémii. Autoři popsali somatické mutace a jednonukleotidové polymorfismy u genu *TET2*. Stejně somatické mutace jako u genu *TET2* nebyly doposud zjištěny u genů *TET1* a *TET3*.

Mutace v genu *TET2* byly popsány u myeloidních malignit (Delhommeau a kol., 2009; Langemeijer a kol., 2009; Tefferi a kol., 2011), ale metylační analýzy genů *TET1*, *TET2* a *TET3* s jejich následnou expresní analýzou nebyly zatím popsány u žádného z hemato-onkologických onemocnění. U genu *TET2* nebyla potvrzena hypermetylace promotoru tohoto genu (Abdel-Wahab a kol., 2009). V této bakalářské práci bylo zjištěno, že exprese genu *TET1* dosahovala oproti genům *TET2* a *TET3* vyšších hodnot a vyšší variability. Expresí genů *TET2* a *TET3* je ve srovnání s expresí genu *TET1* výrazně nižší. Přítomnost metylačních změn ve sledovaném úseku DNA u genů *TET2* a *TET3* tak může souviset s výrazně nižší expresí obou genů, viz graf č. 9, ve srovnání s expresí genu *TET1*, u kterého nebyly metylační změny detekovány.

7 ZÁVĚR

Cílem bakalářské práce bylo detekovat metylační a případně hydroxymetylační změny ve sledovaných úsecích DNA v genech *TET1*, *TET2* a *TET3* s následnou expresní analýzou těchto genů u vzorků pacientů s mnohočetným myelomem.

Izolovaná DNA byla po glukosylové modifikaci štěpena pomocí restričních enzymů MspI a HpaII a následně analyzována pomocí real-time PCR na přítomnost metylací a hydroxymetylací.

Signifikantní metylační změny byly zjištěny ve sledovaném úseku DNA u genu *TET3* a u genu *TET2* jeho amplifikační křivky vykazovaly metylační profil. U genu *TET1* nebyl detekován 5-mC ani 5-hmC.

Následně byla provedena expresní analýza těchto genů. Celkem byla hodnocena modifikovaná DNA a cDNA 7 pacientů s mnohočetným myelomem. Expresní analýza těchto genů prokázala zvýšenou hladinu exprese genu *TET1* oproti genům *TET2* a *TET3*.

Přítomnost metylačních změn ve sledovaném úseku DNA u genů *TET2* a *TET3* tak může souviset s výrazně nižší expresí obou genů, ve srovnání s expresí genu *TET1*.

8 LITERATURA

Abdel-Wahab O., Mullally A., Hedvat C., Garcia-Manero G., Patel J., Wadleigh M., Malinge S., Yao J. J., Kilpivaara O., Bhat R., Huberman K., Thomas S., Dolgalev I., Heguy A., Paietta E., Le Beau M. M., Beran M., Tallman M. S., Ebert B. L., Kantarjian H. M., Stone R. M., Gilliland D. G., Crispino J. D. a Levine R. L. (2009): Genetic characterization of TET1, TET2, and TET3 alteratins in myeloid malignancies. *Blood* 114: 144–147.

Bachman M., Uribe-Lewis S., Yang X., Burgess H. E., Iurlaro M., Reik W., Murrell A. a Balasubramanian S. (2015): 5-formylcytosine can be a stable DNA modification in mammals. *Nature Chemical Biology* 11: 555–557.

Barski A., Cuddapah S., Cui K., Roh T. Y., Schones D. E., Wang Z., Wei G., Chepelev I. a Zhao K. (2007): High-resolution profiling of histone metylations in the human genome. *Cell* 129: 823–837.

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

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

Bostick M., Kim J. K., Estève P. O., Clark A., Pradhan S., Jacobsen S. E. (2007): UHRF1 plays a role in maintaining DNA metylation in mammalian cells. *Science* 317: 1760–1764.

Cooper M. D., Peterson R. D. A. a Good R. A. (1965): Delineation of the thymic and bursal lymphoid systems in the chicken. *Nature* 205: 143–146.

Delhommeau F., Dupont S., Della Valle V., James C., Trannoy S., Massé A., Kosmider O., Le-Couedic J. P., Robert F., Alberdi A., Lécluse Y., Plo I., Dreyfus F. J., Marzac C., Casadevall N., Lacombe C., Romana S. P., Dessen P., Soulier J., Viguié F., Fontenay M., Vainchenker W. a Bernard O. A. (2009): Mutation in TET2 in myeloid cancers. *New England Journal of Medicine* 360: 2289–2301.

Dimopoulos K., Gimsing P. a Grønbæk K. (2014): The role of epigenetics in the biology of multiple myeloma. *Blood Cancer Journal* 4: 207–217.

Doskočil J. a Šorm F. (1962): Distribution of 5-methylcytosine in pyrimidine sequences of deoxyribonucleic acids. *Biochimica et Biophysica Acta* 55: 953–959.

Ehrlich M., Gama-Sosa M. A., Huang L. H., Midgett R. M., Kuo K. C., McCune R. A. a Gehrke C. (1982): Amount and distribution of 5-methylcytosine in human DNA from different types of tissues or cells. *Nucleic Acids Research* 10: 2709–2721.

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

Ferenčík M., Rovenský J. a Matřha V. (2004): *Ilustrovaný imunologický slovník*. Galén, Praha.

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

Fonseca R., Bailey R. J., Ahmann G. J., Rajkumar S. V., Hoyer J. D., Lust J. A., Kyle R. A., Gertz M. A., Greipp P. R. a Dewald G. W. (2002): Genomic abnormalities in monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Blood* 100: 1417–1424.

Fonseca R., Bergsagel P. L., Drach J., Shaughnessy J., Gutierrez N., Stewart A. K., Morgan A., Van Ness B., Chesi M., Minvielle S., Neri A., Barlogie B., Kuehl W. M.,

Liebisch P., Davies F., Chen-Kiang S., Durie B. G. M., Carrasco R., Sezer O., Reiman T., Pilarski L. a Avet-Loiseau H. (2009): International myeloma working group molecular classification of multiple myeloma: spotlight review. *Leukemia* 23: 2210–2221.

Fonseca R., Blood E., Rue M., Harrington D., Oken M. M., Kyle R. A., Dewald G. W., Van Ness B., Van Wier S. A., Henderson K. J., Bailey R. J. a Greipp P. R. (2003): Clinical and biologic implications of recurrent genomic aberrations in myeloma. *Blood* 101: 4569–4575.

González D., Van der Burg M., García-Sanz R., Fenton J. A., Langerak A. W., González M., Jacques, Van Dongen J. J. M., San Miguel J. F. a Morgan G. J. (2007): Immunoglobulin gene rearrangements and the pathogenesis of multiple myeloma. *Blood* 110: 3112–3121.

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

Hanahan D. a Weinberg R. A. (2000): The hallmarks of cancer. *Cell* 100: 57–70.

Hashimoto H., Liu Y., Upadhyay A. K., Chang Y., Howerton S. B., Vertino P. M., Zhang X. a Cheng X. (2012): Recognition and potential mechanisms for replication and erasure of cytosine hydroxymetylation. *Nucleic Acids Research* 40: 4841–4849.

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

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

Hu L., Li Z., Cheng J., Rao Q., Gong W., Liu M., Shi Y. G., Zhu J., Wang P. a Xu Y. (2013): Crystal Structure of TET2-DNA Complex: Insight into TET-Mediated 5mC Oxidation. *Cell* 155: 1545–1555.

Huang Z., Wu H., Chuai S., Xu F., Yan F., Englund N., Wang Z., Zhang H., Fang M., Wang Y., Gu J., Zhang M., Yang T., Zhao K., Yu Y., Dai J., Yi W., Zhou S., Li Q., Wu J., Liu J., Wu X., Chan H., Lu C., Atadja P., Li E., Wang Y. a Hu M. (2013): NSD2 is recruited through its PHD domain to oncogenic gene loci to drive multiple myeloma. *Cancer research* 73: 6277–6288.

Chapman M. A., Lawrence M. S., Keats J. J., Cibulskis K., Sougnez C., Schinzel A. C., Harview C. L., Brunet J. P., Ahmann G. J., Adli M., Anderson K. C., Ardlie K. G., Auclair D., Baker A., Bergsagel P. L., Bernstein B. E., Drier Y., Fonseca R., Gabriel S. B., Hofmeister C. C., Jagannath S., Jakubowiak A. J., Krishnan A., Levy J., Liefeld T., Lonial S., Mahan S., Mfuko B., Monti S., Perkins L. M., Onofrio R., Pugh T. J., Rajkumar S. V., Ramos A. H., Siegel D. S., Sivachenko A., Stewart A. K., Trudel S., Vij R., Voet D., Winckler W., Zimmerman T., Carpten J., Trent J., Hahn W. C., Garraway L. A., Meyerson M., Lander E. S., Getz G. a Golub T. R. (2011): Initial genome sequencing and analysis of multiple myeloma. *Nature* 471: 467–472.

Chen-Kiang S. (2005): Biology of plasma cells. *Best Practice & Research Clinical Haematology* 18: 493–507.

Chesi M., Nardini E., Lim R. S. C., Smith K. D., Kuehl W. M. a Bergsagel P. L. (1998): The t(4;14) translocation in myeloma dysregulates both FGFR3 and a novel gene, MMSET, resulting in IgH/MMSET hybrid transcripts. *Blood* 92: 3025–3034.

Chuang L. S., Ian H. I., Koh T. W., Ng H. H., Xu G. a Li B. F. (1997): Human DNA-(cytosine-5) methyltransferase PCNA complex as a target for p21 WAF1. *Science* 277: 1996–2000.

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

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

Jeong S., Liang G., Sharma S., Lin J. C., Choi S. H., Han H., Yoo C. B., Egger G., Yang A. S. a Jones P. A. (2009): Selective anchoring of DNA methyltransferases 3A and 3B to nucleosomes containing methylated DNA. *Molecular and Cellular Biology* 29: 5366–5376.

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

Jones P. A. a Liang G. (2009): Rethinking how DNA methylation patterns are maintained. *Nature Reviews Genetics* 10: 805–811.

Jones P. A., Wolkowicz M. J., Rideout W. M., Gonzales F. A., Marziasz C. M., Coetzee G. A. a Tapscott S. J. (1990): *De novo* methylation of the MyoDi CpG island during the establishment of immortal cell lines. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87: 6117–6121.

Kačírková P. a Campr V. (2007): Hematoonkologický atlas krve a kostní dřeně. Grada, Praha.

Klein U. a Dalla-Favera U. (2008): Germinal centres: role in B-cell physiology and malignancy. *Nature Reviews Immunology* 8: 22–33.

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

Kouzarides T. (2007): Chromatin modification and their function. *Cell* 128: 693–705.

Kuo A. J., Cheung P., Chen K., Zee B. M., Kioi M., Luring J., Xi Y., Park B. H., Shi X., Garcia B. A., Li W. a Gozani O. (2011): NSD2 links dimethylation of histone H3 at lysine 36 to oncogenic programming. *Molecular Cell* 44: 609–620.

Kyle R. A. (1978): Monoclonal gammopathy of undetermined significance. *The American Journal of Medicine* 64: 814–826.

Kyle R. A., Therneau T. M., Rajkumar S. V., Offord J. R., Larson D. R., Plevak M. F. a Melton L. J. (2002): A long-term study of prognosis in monoclonal gammopathy of undetermined significance. *New England Journal of Medicine* 346: 564–569.

Lachner M., O’Sullivan R. J. a Jenuwien T. (2003): An epigenetic road map for lysine methylation. *Journal of Cell Science* 116: 2117–2124.

Langemeijer S. M., Kuiper R. P., Berends M., Knops R., Aslanyan M. G., Massop M., Stevens-Linders E., van Hooqen P., van Kessel A. G., Raymakers R. A., Kamping E. J., Verhoef G. E., Verburgh E., Haqemeijer A., Vandenberqhe P., de Witte T., van der Reijden B. A. a Jansen J. H. (2009): Acquired mutations in TET2 are common in myelodysplastic syndromes. *Nature Genetics* 41: 838–842.

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

Linghu C., Zheng H., Zhang L. a Zhang J. (2013): Discovering common combinatorial histone modification patterns in the human genome. *Gene* 518: 171–178.

Lorsbach R. B., Moore J., Mathew S., Raimondi S. C., Mukatira S. T. a Downing J. R. (2003): TET1, a member of a novel protein family, is fused to MLL in acute myeloid leukemia containing the t(10;11) (q22;23). *Leukemia* 17: 637–641.

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

Mithraprabhu S., Kalff A., Chow A., Khong T. a Spencer A. (2014): Dysregulated class I histone deacetylases are indicators of poor prognosis in multiple myeloma. *Epigenetics* 9: 1511–1520.

Moarefi A. H. a Chédin F. (2011): ICF syndrome mutations cause a broad spectrum of biochemical defects in DNMT3B-mediated *de novo* DNA methylation. *Journal of molecular Biology* 409: 758–772.

Morgan G. J., Walker B. A. a Davies F. E. (2012): The genetic architecture of multiple myeloma. *Nature Reviews Cancer* 12: 335–348.

Moser K., Tokoyoda K., Radbruch A., MacLennan I. a Manz R. A. (2006): Stromal niches, plasma cell differentiation and survival. *Current Opinion in Immunology* 18: 265–270.

Ogawa M. (1993): Differentiation and proliferation of hematopoietic stem cells. *Blood*, 81: 2844–2853.

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

Ono R., Taki T., Taketani T., Taniwaki M., Kobayashi H. a Hayashi Y. (2002): LCS, leukemia-associated protein with a CXXC domain, is fused to MLL in acute leukemia with trilineage dysplasia having t(10;11) (q22;q23). *Cancer Research* 62: 4075–4080.

Ooi S. K., Qiu C., Bernstein E., Li K., Jia D., Yang Z., Erdjument-Bromage H., Tempst P., Lin S. P., Allis C. D., Cheng X. a Bestor T. H. (2007): DNMT3L connects unmethylated lysine 4 of histone H3 to *de novo* methylation of DNA. *Nature* 448: 714–717.

Passegue E., Jamieson C. H. M., Ailles L. E. a 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.

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

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

Pei H., Zhang L., Luo K., Qin Y., Chesi M., Fei F., Bergsagel P. L., Wang L., You Z. a Lou Z. (2011): MMSET regulates histone H4K20 methylation and 53BP1 accumulation at DNA damage sites. *Nature* 470: 124–128.

Penka M. a Tesařová E. (2011): *Hematologie a transfuzní lékařství*. Grada, Praha.

Rai K., Huggins I. J., James S. R., Karpf A. R., Jones D. A. a Cairns B. R. (2008): DNA demethylation in zebrafish involves the coupling of a deaminase, a glycosylase, and Gadd45. *Cell* 135: 1201–1212.

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

Ribatti D. (2017): The discovery of plasma cells: An historical note. *Immunology Letters* 188: 64–67.

Riggs A. D. (1975): X inactivation, differentiation, and DNA methylation. *Cytogenetic and genome Research* 14: 9–25.

Riggs A. D. a Porter T. N. (1996): Overview of epigenetic mechanisms. Z: Riggs A. D., Porter T. N. a kol.: *Epigenetic Mechanisms of Gene Regulation*, pp. 29–45, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New-York.

Robertson K. D., Keyomarsi K., Gonzales F. A., Velicescu M. a Jones P. A. (2000): Differential mRNA expression of the human DNA methyltransferases (DNMTs) 1, 3a and 3b during the G0/G1 to S phase transition in normal and tumor cells. *Nucleic Acids Research* 28: 2108–2113.

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

Shapiro-Shelef M. a Calame K. (2004): Plasma cell differentiation and multiple myeloma. *Current Opinion in Immunology* 16: 226–234.

Sharma S., De Carvalho D. D., Jeong S., Jones P. A. a Liang G. (2011): Nucleosomes containing methylated DNA stabilize DNA methyltransferases 3A/3B and ensure faithful epigenetic inheritance. *PLOS Genetics* 7: 1–14.

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

Suetake I., Shinozaki F., Miyagawa J., Takeshima H. a Tajima S. (2004): DNMT3L stimulates the DNA methylation activity of Dnmt3a and Dnmt3b through a direct interaction. *Journal of Biological Chemistry* 279: 27816–27823.

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

Ščudla V. a Adam Z. (2006): Diagnostický význam a úskalí hodnocení roztěrového preparátu kostní dřeně u mnohočetného myelomu. *Vnitřní lékařství* 52: 55–65.

Špička, I., Mecl J., Benáková, H., Nohejlová A., Straub J., Novotná E. a Zima T. (2008): Srovnání detekce monoklonálního proteinu pomocí současně dostupných biochemických metod. *Klinická biochemie a metabolismus* 16: 89–92.

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

Tollefsbol T. (2017): *Handbook of epigenetics: The new molecular and medical genetics*. Academic press, London.

Tefferi A. a Vainchenker W. (2011): Myeloproliferative neoplasms: molecular pathophysiology, essential clinical understanding, and treatment strategies. *Journal of Clinical Oncology* 29: 573–582.

Turner B. M. (2002): Cellular Memory and the histone code. *Cell*, 111, 285–291.

Ucar D., Hu Q. a Tan K. (2011): Combinatorial chromatin modification patterns in the human genome revealed by subspace clustering. *Nucleic Acids Research* 39: 4063–4075.

Vakoc Ch. R., Mandat S. A., Olenchock B. A. a Blobel G. A. (2005): Histone H3 lysine 9 methylation and HP1 γ are associated with transcription elongation through mammalian chromatin. *Molecular Cell* 19: 381–391.

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

Walton E. L., Francastel C. a Velasco G. (2014): Maintenance of DNA methylation: Dnmt3b joins the dance. *Epigenetics* 6: 1373–1377.

Weiskopf K., Schnorr P. J., Pang W. W., Chao M. P., Chhabra A., Seita J., Feng M. a Weissman I. L. (2016): Myeloid cell origins, differentiation, and clinical implications. *Microbiology Spectrum* 4: 1–28.

Williams K., Christensen J. a Helin K. (2012): DNA metylation: TET proteins-guardians of CpG islands? *European Molecular Biology Organization* 13: 28–35.

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

Xu Y., Wu F., Tan L., Kong L., Xiong L., Deng J., Barbera A. J., Zheng L., Zhang H., Huang S., Min J., Nicholson T., Chen T., Xu G., Shi Y., Zhang K. a Shi Y. G. (2011): Genome-wide regulation of 5hmC, 5mC and gene expression by Tet1 hydroxylase in mouse embryonic stem cells. *Molecular Cell*: 42, 451–464.

Yamazaki J., Taby R., Vasanthakumar A., Macrae T., Ostler K. R., Shen L., Kantarjian H. M., Estecio M. R., Jelinek J., Godley L. A. a Issa J. P. (2012): Effects of TET2 mutations on DNA metylation in chronic myelomonocytic leukemia. *Epigenetics* 7: 201–207.

Ye Ch. a Li L. (2014): 5-hydroxymethylcytosine. *Cancer Biology & Therapy* 15: 10–15.

You J. S., Kelly T. K., De Carvalho D. D., Taberlay P. C., Liang G. a Jones P. A. (2011): OCT4 establishes and maintains nucleosome-depleted regions that provide additional layers of epigenetic regulation of its target genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108: 14497–14502.

Zhang H., Zhang X., Clark E., Mulcahey M., Huang S. a Shi Y. G. (2010): TET1 is a DNA-binding protein that modulates DNA metylation and gene transcription via hydroxylation of 5-methylcytosine. *Cell Research* 20: 1390–1393.

NCBI [online], navštíveno: 4. 4. 2018 dostupné z:

https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM_001127208.2

9 PŘÍLOHY

Příloha č. 1: Hodnoty naměřené při analýze celkového zastoupení 5-mC a 5-hmC pomocí qPCR pro *TET1*.

Příloha č. 2: Hodnoty naměřené při analýze celkového zastoupení 5-mC a 5-hmC pomocí qPCR pro *TET2*.

Příloha č. 3: Hodnoty naměřené při analýze celkového zastoupení 5-mC a 5-hmC pomocí qPCR pro *TET3*.

Příloha. č. 1: Hodnoty naměřené při analýze celkového zastoupení 5-mC a 5-hmC pomocí qPCR pro *TET1*.

<i>TET1</i>	C_t (počet cyklů)											
vzorky (5000ng)	1a	1b	\bar{x} 1	2a	2b	\bar{x} 2	3a	3b	\bar{x} 3	4a	4b	\bar{x} 4
88	31,98	32,01	32,00	32,08	32,13	32,11	32,15	32,07	32,11	32,42	32,09	32,26
89	31,47	31,55	31,51	31,12	31,46	31,29	31,77	31,75	31,76	31,98	31,71	31,85
90	31,77	31,43	31,60	31,54	31,32	31,43	30,95	31,15	31,05	31,13	31,70	31,42
92	30,01	30,29	30,15	30,49	30,26	30,38	30,25	30,29	30,27	30,19	30,16	30,18
93	33,16	32,73	32,95	32,60	32,96	32,78	33,76	32,21	32,99	33,03	32,60	32,82
96	31,63	31,73	31,68	31,33	31,54	31,44	31,51	31,14	31,33	31,11	31,48	31,30
98	31,80	31,63	31,72	31,66	33,56	32,61	31,69	31,63	31,66	31,78	31,53	31,66
vzorky (500ng)*												
98	36,58	39,14	37,86	33,90	34,19	34,05	33,89	34,71	34,30	33,55	33,62	33,59

Písmeno a/b označuje duplikáty jednotlivých modifikací s odlišně štěpenou genomovou DNA, viz kapitola 4.4.2. * získané hodnoty nejsou součástí výsledků.

Příloha č. 2: Hodnoty naměřené při analýze celkového zastoupení 5-mC a 5-hmC pomocí qPCR pro *TET2*.

<i>TET2</i>	C_t (počet cyklů)											
vzorky (5000ng)	1a	1b	\bar{x} 1	2a	2b	\bar{x} 2	3a	3b	\bar{x} 3	4a	4b	\bar{x} 4
88	19,41	19,24	19,33	19,82	19,91	19,87	23,23	23,55	23,39	22,62	22,64	22,63
89	18,90	18,68	18,79	19,07	19,18	19,13	22,26	22,16	22,21	22,12	22,00	22,06
90	18,61	18,65	18,63	18,89	19,07	18,98	21,82	22,01	21,92	21,75	22,03	21,89
92x	32,18	32,25	32,22	32,16	32,41	32,29	32,87	32,42	32,65	32,80	32,58	32,69
92y	18,90	18,99	18,95	19,50	19,50	19,50	22,43	22,57	22,50	22,40	22,24	22,32
93x	45,00	45,00	45,00	45,00	N	45,00	45,00	40,01	42,51	37,29	45,00	41,15
93y	20,63	20,66	20,65	20,83	20,77	20,80	24,02	23,92	23,97	23,66	23,63	23,65
96	18,78	18,60	18,69	19,04	19,17	19,11	22,28	22,40	22,34	21,71	21,71	21,71
98x	44,30	N	44,30	45,00	N	45,00	41,59	N	41,59	45,00	45,00	45,00
98y	19,90	19,77	19,84	19,79	20,03	19,91	22,63	28,28	25,46	22,52	24,60	23,56
vzorky (500ng)												
98x	36,60	36,09	36,35	34,56	33,58	34,07	33,66	33,70	33,68	34,20	22,94	28,57
98y	25,48	25,98	25,73	26,48	26,13	26,31	26,25	27,63	26,94	27,75	45,00	36,38

Písmeno a/b označuje duplikáty jednotlivých modifikací s odlišně štěpenou genomovou DNA, viz kapitola 4.4.2. Písmeno x/y označuje opakování některých pokusů se stejným vzorkem. Písmeno N označuje nehodnotitelný experiment. Měření s $C_t = 45$ jsou označena šedou, nejsou zahrnuta v hodnocení, neboť vzorky vykazovaly velmi nízkou expresi. * získané hodnoty nejsou součástí výsledků.

Příloha č. 3: Hodnoty naměřené při analýze celkového zastoupení 5-mC a 5-hmC pomocí qPCR pro *TET3*.

<i>TET3</i>	C_t (počet cyklů)											
vzorky (5000ng)	1a	1b	\bar{x} 1	2a	2b	\bar{x} 2	3a	3b	\bar{x} 3	4a	4b	\bar{x} 4
88	28,52	28,53	28,53	28,91	29,04	28,98	35,93	35,87	35,90	37,07	38,67	37,87
89	28,13	27,86	28,00	28,47	28,16	28,32	36,86	36,05	36,46	35,96	36,65	36,31
90	28,18	28,07	28,13	28,25	28,03	28,14	35,73	36,56	36,15	35,01	37,03	36,02
92	27,73	27,56	27,65	27,68	27,75	27,72	34,63	35,24	34,94	34,73	35,63	35,18
93	32,74	32,60	32,67	33,60	33,50	33,55	41,40	45,00	43,20	45,00	45,00	45,00
96	28,28	28,91	28,60	29,07	29,24	29,16	38,02	39,97	39,00	39,49	38,78	39,14
98	32,64	32,42	32,53	32,89	32,45	32,67	41,57	41,43	41,50	38,84	37,28	38,06
vzorky (500ng)												
98	35,76	34,75	35,26	31,67	31,51	31,59	37,30	37,63	37,47	38,50	35,65	37,08

Písmeno a/b označuje duplikáty jednotlivých modifikací s odlišně štěpenou genomovou DNA, viz kapitola 4.4.2. Měření s $C_t = 45$ jsou označena šedou, nejsou zahrnuta v hodnocení, neboť vzorky vykazovaly velmi nízkou expresi. * získané hodnoty nejsou součástí výsledků.