

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2021

Katarína Ondrušková

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Expresný profil DNA metyltransferáz u buniek
mnohopočetného myelómu**

Bakalářská práce

Katarína Ondrušková

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: prezenční

Olomouc 2021

Vedoucí práce: Ing. Kateřina Smešný Trtková, CSc.

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Akademický rok: 2019/2020

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Katarína ONDRUŠKOVÁ**
Osobní číslo: **R18655**
Studijní program: **B1501 Biologie**
Studijní obor: **Molekulární a buněčná biologie**
Téma práce: **Expresní profil DNA metyltransferáz u buniek mnohopočetného myelómu**
Téma práce anglicky: **Expression profile of DNA methyltransferases in multiple myeloma cells**
Zadávací katedra: **Katedra buněčné biologie a genetiky**

Zásady pro vypracování

1. Spracovanie literárnej rešerše na zadanú tému;
2. Izolácia RNA z neoplyvnených buniek vybraných myelómových bunkových línii a príprava komplementárnej cDNA;
3. Izolácia RNA zo sortovaných buniek kostnej drene pacientov s diagnózou mnohopočetného myelómu a príprava komplementárnej cDNA;
4. Expresná analýza DNA metyltransferáz metódou Real-time PCR.

Rozsah pracovnej zprávy:
Rozsah grafických prací:
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**
Jazyk zpracování: **Slovenština**

Seznam doporučené literatury:

1. Galm O., Wilop S., Reichelt J. et al.: DNA methylation changes in multiple myeloma. *Leukemia* 18, pp. 1687 ? 1692, 2004;
2. Sharma A., Heuck C.J., Fazzari M.J. et al.: DNA methylation alterations in multiple myeloma as a model for epigenetic changes in cancer. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med* 6, pp. 664 ? 669, 2010;
3. Heuck C.J., Mehta J., Bhagat T. et al.: Myeloma is characterized by stage-specific alterations in DNA methylation that occur early during myelomagenesis. *Journal Immunol* 190, pp. 2966 ? 2975, 2013;
4. Qasameh M.A., Wu Y.C., Bose S. et al.: B cell activation and plasma cell differentiation are inhibited by de novo methylation. *Nat Commun* 9, p. 1900, 2018;
5. Barwick B.G., Gupta V.A., Vertino P.M. et al.: Cell of origin and genetic alterations in the pathogenesis of multiple myeloma. *Fron Immunol* 10, pp. 1–17, 2019.

Vedoucí bakalářské práce: **Ing. Kateřina Smešný Trtková, CSc.**
Ústav klinické a molekulární patologie

Datum zadání bakalářské práce: 17. dubna 2020
Termín odevzdání bakalářské práce: 31. července 2021

LS.

doc. RNDr. Martin Kubala, Ph.D.
děkan

prof. RNDr. Zdeněk Dvořák, Dr.Sc.
vedoucí katedry

Bibliografické údaje

Meno a priezvisko autora: Katarína Ondrušková

Názov práce: Expresný profil DNA metyltransferáz u buniek mnohopočetného myelómu

Typ práce: Bakalárska

Pracovisko: Katedra bunkovej biológie a genetiky

Vedúci práce: Ing. Kateřina Smešný Trtková, CSc.

Rok obhajoby práce: 2021

Kľúčové slová: DNA metyltransferázy, mnohopočetný myelóm, *DNMT1*, *DNMT3A*, *DNMT3B*, expresný profil génu

Počet strán: 42

Jazyk: Slovenský

Súhrn

Bakalárska práca je zameraná na stanovenie expresného profilu vybraných génov DNA metyltransferáz vo vzorkách pacientov s diagnostikovaným mnohopočetným myelómom a vzorkách myelómových bunkových línií. V teoretickej časti sú spracované základné informácie o DNA metyltransferázach, regulácii ich aktivity a ich funkciách. Druhá časť teórie pozostáva z charakteristiky ochorenia mnohopočetný myelóm, jeho diagnostiky, štádií ochorenia a možnostiach liečby. V experimentálnej časti bolo vykonané stanovenie expresných profilov troch DNA metyltransferáz – *DNMT1*, *DNMT3A* a *DNMT3B* pomocou metódy kvantitatívnej real-time PCR. Na expresné analýzy sledovaných génov bolo použitých 12 vzoriek pacientov s diagnostikovaným mnohopočetným myelómom a 6 vzoriek myelómových bunkových línií. Získané expresné profily boli porovnané medzi vzorkami pacientov s diagnostikovaným relabujúcim mnohopočetným myelómom a pacientov s novo diagnostikovaným mnohopočetným myelómom. Hodnoty relatívnych expresií génu *DNMT1* u pacientov s novo diagnostikovaným mnohopočetným myelómom boli nižšie ako expresie génu *DNMT3A*; zvýšené expresie génu *DNMT3A* tak môžu byť dôležitým diagnostickým markerom u novo diagnostikovaných pacientov s mnohopočetným myelómom. U myelómových bunkových línií boli relatívne hodnoty aj $2 - \Delta\Delta C_t$ hodnoty expresií génov *DNMT3A* a *DNMT3B* kolísavé, ale nižšie ako relatívne hodnoty expresií génu *DNMT1*.

Bibliographical identification

Author's first name and surname: Katarína Ondrušková

Title: Expression profile of DNA methyltransferases in multiple myeloma cells

Type of thesis: Bachelor

Department: Department of cell biology and genetics

Supervisor: Ing. Kateřina Smešný Trtková, CSc.

The year of presentation: 2021

Keywords: DNA methyltransferases, multiple myeloma, *DNMT1*, *DNMT3A*, *DNMT3B*, gene expression profile

Number of pages: 42

Language: Slovak

Summary

Bachelor thesis is aimed on specifying express profile of selected genes of DNA methyltransferases in patient samples with multiple myeloma diagnosed and samples of myeloma cell lines. In theoretical part, basic information about DNA methyltransferases, regulation of their activities and their functions are elaborated. Second part of theory characterizes multiple myeloma diseases, its diagnosis, stages of disease and treatment methods. In the experimental part, gene expression profiles of three DNA methyltransferases were determined: DNMT1, DNMT2 and DNMT3, with quantitative real time PCR method. For the expression analyzes of observed genes 12 patients samples diagnosed with multiple myeloma and 6 meyloma cell lines were used. Gathered expressio profiles were compared two groups of patients: patient samples with diagnosed relapsed multiple myeloma and patient samples with newly-diagnosed multiple myeloma. Value of relative *DNMT1* gene expressions of patients with newly-diagnosed multiple myeloma was lower than the *DNMT3A* gene expression. Thus, the increased *DNMT3A* gene expression could be an important marker for diagnosis of new patients with multiple myeloma. Furthemore, in tested myeloma cell lines, both relative value and $2 - \Delta\Delta C_t$ value of *DNMT3A* and *DNMT3B* genes expression were fluctuating, and lower compared to the relative value of *DNMT1* gene expression.

Prehlásenie

Prehlasujem, že som bakalársku prácu vypracovala samostatne pod vedením Ing. Kateřiny Smešný Trtkovej, CSc. a za použitia uvedených literárnych zdrojov.

V Olomouci

.....

Katarína Ondrušková

Pod'akovanie

Obrovská vd'aka patrí Ing. Kateřine Smešný Trtkovej, CSc., mojej vedúcej bakalárskej práce, za odborné vedenie, cenné rady a pripomienky a hlavne za venovaný čas a trpezlivosť. Ďalej ďakujem doktorandom za pomoc a usmernenie a ostatným pracovníkom Ústavu klinickej a molekulárnej patológie LF UP v Olomouci za ústretovosť pri vykonávaní experimentálnej časti mojej práce.

Pre spracovanie bakalárskej práce boli využité prostriedky z grantu NV18-03-005000 Ministerstva zdravotníctva Českej republiky, z projektu ENOCH No. CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_019/0000868 (the European Regional Development Fund) a študentského grantu LF_2020_0015.

OBSAH

1 ÚVOD	1
2 CIELE PRÁCE.....	2
3 LITERÁRNY PREHLAD	3
3.1 DNA metyltransferázy.....	3
3.1.1 Regulácia aktivity DNA metyltransferáz	5
3.1.2 Funkcie DNA metyltransferáz.....	6
3.1.3 Fyziologické funkcie DNA metyltrasnferáz.....	7
3.1.4 Úlohy DNA metyltransferáz pri ľudských ochoreniach.....	8
3.2 Mnohopočetný myelóm.....	9
3.2.1 Monoklonálna gamapatia neurčitého významu a tlejúci mnohopočetný myelóm	9
3.2.2 Diagnostika mnohopočetného myelómu	10
3.2.3 Molekulárna klasifikácia mnohopočetného myelómu.....	11
3.2.4 Prognóza mnohopočetného myelómu	11
3.2.5 Liečba mnohopočetného myelómu.....	12
4 MATERIÁL A METÓDY	13
4.1 Biologický materiál	13
4.1.1 Sortovaná populácia plazmatických buniek (zo vzorky aspirátov kostnej drene s mnohopočetným myelómom)	13
4.1.2 Myelómové bunkové línie.....	14
4.2 Laboratórne pomôcky a prístroje.....	16
4.3 Použité chemikálie a roztoky.....	16
4.4 Použité súpravy	17
4.5 Použité počítačové programy	17
4.6 Izolácia RNA zo sortovanej populácie buniek	17
4.7 Reverzná transkripcia	19
4.8 Expresná analýza génov <i>DNMT1</i> , <i>DNMT3A</i> a <i>DNMT3B</i>	19
5 VÝSLEDKY	23
5.1 Expresná analýza génov <i>DNMT1</i> , <i>DNMT3A</i> a <i>DNMT3B</i> v sortovanej populácii plazmatických buniek.....	23
5.2 Expresná analýza v myelómových bunkových líniách.....	31
6 DISKUSIA	34
7 ZÁVER.....	37
8 LITERATÚRA	38

ZOZNAM SYMBOLOV A SKRATIEK

ASCT – autológna transplantácia kmeňových buniek

DNMT1 – gén DNA metyltransferáza 1

DNMT3A – gén DNA metyltransferáza 3A

DNMT3B – gén DNA metyltransferáza 3B

DNMTs – DNA metyltransferázy

ES bunky – embryonálne kmeňové bunky

FISH – fluorescenčná *in situ* hybridizácia

ICF syndróm – imunodeficiencia, centromerická nestabilita a syndróm tvárových anomálií

IMiDs – imunomodulačné látky

MGUS – monoklonálna gamapatia neurčitého významu

n. a. – nedetekovateľné, no analysis

PCR – polymerázová reťazová reakcia

SMM – tlejúci mnohopočetný myelóm

TET – enzýmy rodiny „ten-eleven translocation“

ZOZNAM OBRÁZKOV A GRAFOV

Obr. č. 1: Katalytický mechanizmus DNA metyltransferáz

Graf č. 1: Porovnanie normalizovaných hodnôt expresií génov *DNMT1*, *DNMT3A* a *DNMT3B* u pacientov s novo diagnostikovaným mnohopočetným myelómom

Graf č. 2: Porovnanie normalizovaných hodnôt expresií génov *DNMT1*, *DNMT3A* a *DNMT3B* u pacientov s relabovaným mnohopočetným myelómom

Graf č. 3: Porovnanie normalizovaných hodnôt expresií génov *DNMT1*, *DNMT3A* a *DNMT3B* u pacientov s novo diagnostikovaným mnohopočetným myelómom a relabujúcim mnohopočetným myelómom

Graf č. 4: Porovnanie $2 - \Delta\Delta\text{Ct}$ hodnôt expresií génov *DNMT1*, *DNMT3A* a *DNMT3B* u pacientov s novo diagnostikovaným mnohopočetným myelómom

Graf č. 5: Porovnanie $2 - \Delta\Delta\text{Ct}$ hodnôt expresií génov *DNMT1*, *DNMT3A* a *DNMT3B* u pacientov s relabovaným mnohopočetným myelómom

Graf č. 6: Porovnanie $2 - \Delta\Delta\text{Ct}$ hodnôt expresií génov *DNMT1*, *DNMT3A* a *DNMT3B* u pacientov s novo diagnostikovaným mnohopočetným myelómom a relabujúcim mnohopočetným myelómom

Graf č. 7: Porovnanie normalizovaných hodnôt expresií bunkových línií KMS-12-PE, MM.1S, OPM2, KMS 12 BM, RPMI-8226 a U266

Graf č. 8: Porovnanie $2 - \Delta\Delta\text{Ct}$ hodnôt expresií bunkových línií KMS-12-PE, MM.1S, OPM2, KMS 12 BM, RPMI-8226 a U266

ZOZNAM TABULIEK

Tabuľka č. 1: Charakteristika analyzovaného súboru pacientov

Tabuľka č. 2: Teplotný a časový profil reverznej transkripcie

Tabuľka č. 3: Príprava reakčnej zmesi pre real-time PCR analýzu pre géne *DNMT1*, *DNMT3A* a *DNMT3B* a house-keepingový gén *GAPDH*

Tabuľka č. 4: Príprava reakčnej zmesi pre real-time PCR analýzu pre gén *DNMT1* v prípade použitia sondy bez prítomných primerov

Tabuľka č. 5: Teplotný a časový profil real-time PCR

Tabuľka č. 6: Výsledky experimentov pre modifikáciu teplotného a časového profilu real-time PCR

Tabuľka č. 7.: Výsledky expresie génu *DNMT1* a smerodajná odchýlka v sortovanej populácii plazmatických buniek

Tabuľka č. 8: Výsledky expresie génu *DNMT3A* a smerodajná odchýlka v sortovanej populácii plazmatických buniek

Tabuľka č. 9: Výsledky expresie génu *DNMT3B* a smerodajná odchýlka v sortovanej populácii plazmatických buniek

Tabuľka č. 10: Normalizované hodnoty expresií génov *DNMT1*, *DNMT3A* a *DNMT3B* u pacientov s novo diagnostikovaným mnohopočetným myelómom

Tabuľka č. 11: Normalizované hodnoty expresií génov *DNMT1*, *DNMT3A* a *DNMT3B* u pacientov s relabovaným mnohopočetným myelómom

Tabuľka č. 12: $2 - \Delta\Delta\text{Ct}$ hodnoty expresií génov *DNMT1*, *DNMT3A* a *DNMT3B* u pacientov s novo diagnostikovaným mnohopočetným myelómom

Tabuľka č. 13: $2 - \Delta\Delta\text{Ct}$ hodnoty expresií génov *DNMT1*, *DNMT3A* a *DNMT3B* u pacientov s relabovaným mnohopočetným myelómom

Tabuľka č. 14: Výsledky expresie génu *DNMT1* a smerodajná odchýlka v myelómových bunkových líniiach

Tabuľka č. 15: Výsledky expresie génu *DNMT3A* a smerodajná odchýlka v myelómových bunkových líniiach

Tabuľka č. 16: Výsledky expresie génu *DNMT3B* a smerodajná odchýlka v myelómových bunkových líniiach

1 ÚVOD

DNA metyltransferázy zodpovedajú za presun metylovej skupiny z univerzálneho darcu S-adenozyl-L-metioninu na piatu pozíciu zvyšku cytozínu v DNA, čím teda spôsobujú metyláciu DNA. Ľudský genóm kóduje 5 DNA metyltransferáz: *DNMT1*, *DNMT3A* a *DNMT3B*, ktoré katalyzujú prídanie metylačných značiek ku genómovej DNA, teda vykazujú enzymatickú aktivitu. U cicavcov tieto enzýmy tvoria základ epigenetického programovania. Zvyšným dvom *DNMT2* a *DNMT3L* katalytická aktivita chýba, ale spolu s enzymaticky aktívnymi DNA metyltransferázami plnia úlohu v evolučnej adaptácii pôvodných génov DNA metyltransferáz.

S mutáciami DNA metyltransferáz sa pri ľudských ochoreniach nestretávame často. Vyskytujú sa pri troch genetických syndrómoch a malej časti rakoviny. Pri rakovine dochádza pomerne rýchlo k zmene vzorov metylácie DNA, a preto sa často spájajú úlohy DNA metyltransferáz práve s ľudskými nádormi (Lyko F., 2018).

Mnohopočetný myelóm je malígna porucha plazmatických buniek kostnej drene, ktorá spôsobuje deštrukciu kostí a zlyhanie kostnej drene. Typické symptómy sú bolesť chrbta a rednutie kostí, zápcha a nevoľnosť. Pacienti často pociťujú únavu a slabosť ako dôsledok poškodenej funkcie kostnej drene, rovnako dochádza aj k zníženiu imunity, a tak častejšiemu výskytu chorôb. Aktívnemu mnohopočetnému myelómu predchádzajú dve asymptomatické premalígne štádia – monoklonálna gamapatia neurčitého významu (MGUS) a tlejúci mnohopočetný myelóm (SMM) (Rajkumar S. V., 2016).

2 CIELE PRÁCE

- 1) Spracovanie literárnej rešerše na danú tému;
- 2) Izolácia RNA z neovplyvnených buniek vybraných myelómových bunkových línií a príprava komplementárnej cDNA;
- 3) Izolácia RNA zo sortovaných buniek kostnej drene pacientov s diagnózou mnohopočetného myelómu a príprava komplementárnej cDNA;
- 4) Expresná analýza DNA metyltransferáz metódou Real-Time PCR.

3 LITERÁRNY PREHĽAD

3.1 DNA metyltransferázy

Vo väčšine genómov sa nachádza niekoľko málo metylovaných báz, ako sú N6-metyladenin (6mA), N4-metylcytozín (4mC) a C5-metylcytozín (5mC). N6-metyladenin sa vyskytuje v prokaryotickej DNA, pričom jeho hladina je pomerne vysoká v porovnaní s hladinou v eukaryotických bunkách. N4-metylcytozín bol nájdený len v bakteriálnej DNA. V eukaryotických genómoch sú metylované značky zväčša prítomné ako C5-metylcytozín a často sa nachádzajú v CpG dinukleotidoch (CpG islands). Metylačné značky CpG na oboch vláknach DNA sú symetrické, pričom táto symetria umožňuje post-replikatívne udržiavanie metylačných vzorcov DNA. Novo vytvárané metylačné značky CpG potom súvisia s epigenetickou reguláciou génovej expície (Lyko F., 2018).

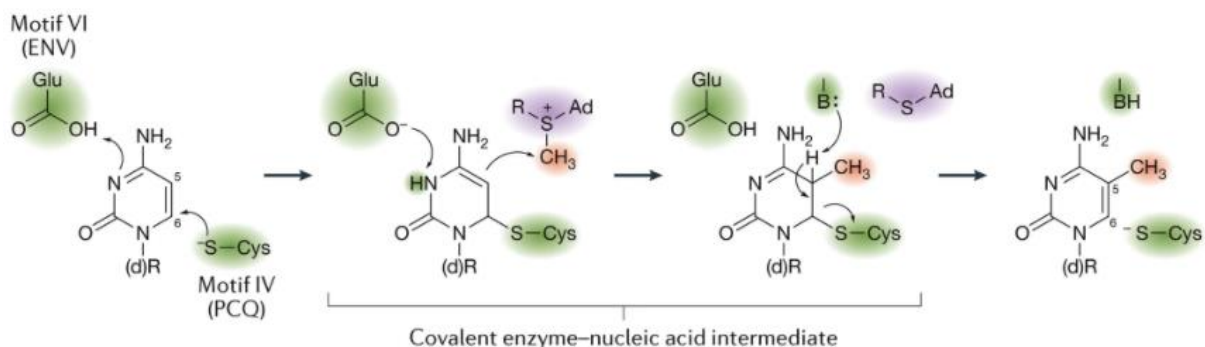
Všetky DNA metyltransferázy používajú rovnaké katalytické mechanizmy, ktoré sú typické tvorbou kovalentného medziproduktu enzýmu a substrátu (Wu J. C. *et al.*, 1985). Naopak, na tvorbu metylovaných báz 5mC, 4mC a 6mA používajú DNA metyltransferázy odlišné katalytické motívy. Katalytické motívy cytozín-5 DNA metyltransferáz sú vysoko konzervované a vďaka nim vieme rozpoznať DNA metyltransferázy v sekvenciách DNA (Posfai J. *et al.*, 1989). Identifikácia rodiny DNA metyltransferáz bola podmienená objavom, že katalytické motívy prvej rozpoznanej cytozín-5 DNA metyltransferázy u cicavcov, *DNMT1*, sú vysoko konzervované v bakteriálnych cytozín-5 DNA metyltransferázach (Bestor T. *et al.*, 1988). Od tohto objavu bolo rozpoznávaných množstvo eukaryotických génov, ktoré obsahujú 10 katalytických motívov prítomných v cytozín-5 DNA metyltransferázach. Vďaka tejto identifikácii bola možná rekonštrukcia evolučných vzťahov medzi týmito enzýmami, a tiež ich subklasifikácia (Ponger L. *et al.*, 2005).

Rozlišujeme 5 DNA metyltransferáz, ktoré kóduje ľudský genóm: *DNMT1*, *DNMT2*, *DNMT3A*, *DNMT3B* a *DNMT3L*. *DNMT1*, *DNMT3A* a *DNMT3B* vykazujú enzymatickú aktivitu, nakoľko katalyzujú prídanie metylačných značiek ku genómovej DNA. Tieto enzýmy sa niekedy nazývajú ako kanonické. *DNMT2* a *DNMT3L* nevykazujú katalytickú aktivitu, avšak spolu s kanonickými enzýmami predstavujú evolučnú adaptáciu pôvodných génov DNMTs. DNA metyltransferázy môžeme nájsť tiež v rastlinách, avšak ich sekvencie tu prešli rozsiahlejšími variáciami (Law J. A. *et al.*, 2010). V riasach a hubách sa nachádzajú *DNMT4*, *DNMT5* a *DNMT6*, pričom zatiaľ nebola dokázaná prítomnosť týchto enzýmov u zvierat (Ponger L. *et al.*, 2005; Huff J. T. *et al.*, 2014). Predpokladá sa, že majú rozdielne funkcie ako *DNMT1* a *DNMT3*, čo môže pomôcť zistiť ďalšie funkcie metylácie DNA.

DNA metyltransferázy u živočíchov sa skladajú z N-terminálnej regulačnej domény a C-terminálnej katalytickej domény, medzi výnimky patrí *DNMT2*, ktorá je tvorená iba katalytickou doménou. Druhou výnimkou je katalyticky neaktívna forma *DNMT3L*, ktorej chýba časť N-terminálnej

regulačnej domény (vrátane PWWP domény) a časť C-terminálnej katalytickej domény. DNMTs má vo svojej N-terminálnej doméne zopár menších subdomén, ktoré zabezpečujú molekulárne interakcie, ako napríklad väzbovú doménu pre proteín 1 spojený s *DNMT1* (DMAP1), ktorá je dôležitá pre interakciu *DNMT1* s transkripčným represorom DMAP1 (tiež známy ako DNMAP1) a s histónovou deacetylázou HDAC2 (tiež známa ako HD2) (Rountree M. R. *et al.*, 2000). Sekvencia zameriavajúca sa na ohniská replikácie je nevyhnutná na zameranie DNMT1 na tieto ohniská, a tiež na udržiavanie DNA metylácie, ktoré je od replikácie závislé. Nachádza sa tu aj CXXC doména, ktorá má podobu domény zinkového prstu a viaže sa na nemetylovanú DNA. Prítomné sú aj dve homologické brómové domény (BAH), ktorých funkcia ešte nie je zistená. V *DNMT3* boli tiež popísané domény, ako napríklad Pro-Trp-Trp-Pro (PWWP) doména a ATRX-DNMT3-DNMT3L (ADD) doména, ktoré sú dôležité pre interakciu chromatinu (Lyko F., 2018).

DNA metyltransferázy zabezpečujú presun metylovej skupiny z univerzálneho darcu S-adenozyl-L-metioninu na piatu pozíciu zvyšku cytozínu v DNA. Cysteínový zvyšok v motíve IV (známy aj ako PCQ enzým) iniciuje metylačnú reakciu, a to tak, že sprostredkuje nukleofilný útok na šiesty uhlík v cytozínovom kruhu (C6). Následne dochádza k prenosu metylovej skupiny z S-adenozylmetioninu na piaty uhlík cytozínového kruhu (C5) a deprotonizácii z C5 za vzniku metylcytozínu. Rôzne štúdie odhalili alosterické kontrolné mechanizmy DNA metyltransferáz a potvrdili existenciu autoinhibičných mechanizmov, ktoré chránia enzým pred nesprávnym zacielením (Lyko F., 2018).



Obr. č. 1: Katalytický mechanizmus DNA metyltransferáz (prevzaté a upravené podľa Lyko F., 2018).

Cysteínový zvyšok v motíve IV iniciuje metylačnú reakciu prostredníctvom nukleofilného útoku na C6 cytozínového kruhu. Tomuto útoku napomáha zvyšok kyseliny glutámovej v motíve VI (tiež známym ako ENV). Po nukleofilnom útoku dochádza k prenosu metylovej skupiny z S-adenozylmetioninu na C5 cytozínového kruhu a odstránenie protónov z C5 za vzniku 5-metylcytozínu. Predpokladá sa, že vzniknutý 5-metylcytozín je sprostredkovaný bázou poskytnutou enzýmom. Aminokyselinové bočné reťazce zapojené do reakcie sú na obrázku zvýraznené zelenou farbou, kofaktor S-adenozylmetionin fialovou farbou a metylová skupina červenou farbou.

3.1.1 Regulácia aktivity DNA metyltransferáz

DNA metylácia je u cicavcov vysoko regulovaná vďaka rôznym molekulárnym interakciám a modifikáciám, ktoré sa podieľajú na regulácii aktivity DNMTs. Gény kódujúce DNMTs sa môžu duplikovať alebo stratit', čo môže menit' celkovú aktivitu DNMTs v priebehu evolúcie.

Aktivitu DNA metyltransferáz môžu regulovať mnohé molekulárne interakcie. Napríklad *DNMT3L* je katalyticky neaktívna, avšak je dôležitým kofaktorom enzymatickej aktivity *DNMT3*. Dve molekuly *DNMT3L* dokážu vytvárať s dvomi molekulami *DNMT3A* heterotetramérny komplex, v ktorom sú molekuly *DNMT3A* v strede (Jia D. *et al.*, 2007). Táto formácia zvyšuje afinitu komplexu k DNA, čím sa zvyšuje efektívnosť metylácie DNA. Na udržanie metylácie *in vivo* je nevyhnutná ligáza *DNMT1* interagujúca s proteínom E3 ubiquitín UHRF1, ktorá sa viaže na DNA. Doména UHRF1 – SET a RING (SRA) – veľmi preferuje hemimetylovanú DNA a vyklopí metylovanú bázu z DNA helixu, tým nasmeruje *DNMT1* k jej fyziologickému substrátu. Bunky bez UHRF1 vykazovali výrazný a rozsiahly pokles metylácie DNA, čo poukazuje na dôležitosť proteínov interagujúcich s DNMT pre metyláciu DNA (Bostick M. *et al.*, 2007; Sharif J. *et al.*, 2007). Na vytvorenie a udržanie normálnych vzorcov metylácie DNA sú potrebné okrem UHRF1 aj ďalšie enzýmy predstavujúce chromatín, napríklad LSH (známy aj ako HELLS) a ATRX. Presný mechanizmus týchto reakcií ešte nie je objasnený, avšak je známe, že obsadenosť nukleozómov je znížená u mutantov LSH a zároveň je poškodené cieleenie *DNMT3A* a *DNMT3B* na DNA. Ukázalo sa, že *DNMT1* sa viaže na nekódujúcu RNA vznikajúcu z génu CEBPA, ktorý kóduje transkripčný faktor CCAAT/proteín viažuci zosilňovač (Di Ruscio A. *et al.*, 2013). Táto väzba medzi *DNMT1* a nekódujúcou RNA bráni metylácii CEBPA, čo naznačuje, že RNA zadržiava *DNMT1*, aby blokovala udržiavanie metylácie na príbuznom lokuse. Zadržiavanie DNA metyltransferáz prostredníctvom RNA by mohlo byť možným mechanizmom regulujúcim zameranie DNA metyltransferáz.

Ďalším spôsobom regulácie DNA metyltransferáz sú post-translačné modifikácie. Jedným z príkladov takejto regulácie DNA metyltransferáz je lyzín-demetyláza LSD1, ktorá môže demetylovať *DNMT1* na lyzín 1094 a lyzín-metyltransferáza SET7 môže metylovať *DNMT1* na lyzín 142. Metylácia v oboch polohách je zameraná na degradáciu DNMT1, ktorá je v súlade s celkovou hypometyláciou DNA pozorovaná v myších embryonálnych kmeňových bunkách s deficitom LSD1. Taktiež, kináza AKT1 môže fosforylovať *DNMT1* na serín 143, pričom táto kináza chráni *DNMT1* pred degradáciou, nakoľko zabraňuje metylácii na lyzíne 142. Ďalším príkladom je kaseín-kináza 2, ktorá fosforyluje *DNMT3A* na dve serínové zvyšky v doméne PWWP. Táto fosforylácia spôsobuje zameranie *DNMT3A* na heterochromatín a metyláciu heterochromatických repetícií. V neposlednej rade sa predpokladá, že kináza ATM môže fosforylovať *DNMT2* na dva serínové zvyšky. Účinky post-translačných modifikácií na aktivitu DNA metyltransferáz zatiaľ nie sú stále úplne preskúmané.

Alternatívny zostrih génu môže tiež regulovať DNA metyltransferázy. Príkladom je cicavčí *DNMT3B* gén, ktorý má niekoľko izoformiem zahŕňajúc aj tie, ktoré nemajú katalytickú doménu. Niektoré štúdie tvrdia, že odlišné izoformy vykazujú odlišnú enzymatickú aktivitu. Avšak, *DNMT3B* izoformy bez katalytickej aktivity môžu vyvolať metyláciu DNA, čím vzniká možnosť, že tieto katalyticky inaktívne izoformy môžu nahradiť *DNMT3L* a slúžiť ako kofaktor pre *DNMT3*.

Pri aktivite DNA metyltransferáz môžu byť dôležité aj zmeny v počte kópií génu *DNMT*, kedy sa aktivita DNA metyltransferáz prispôsobuje druhovo špecifickým podmienkam. Ako príklad môžeme uviesť rozšírenie *Dnmt1* u *Apis mellifera* (Včela európska), ktorá nesie 2 paralógy *Dnmt1* (*Dnmt1a* a *Dnmt1b*), naopak u *Bombyx mori* (Priadka morušová) dochádza k strate *Dnmt3* a u *Drosophila melanogaster* k strate *Dnmt1* a *Dnmt3*. Niektoré druhy zvierat stratili zo svojich génov celú rodinu DNA metyltransferáz, príkladom je *Caenorhabditis elegans*. Taktiež sa predpokladá, že jemné mutácie v *Dnmt1* či *Dnmt3* spôsobili zníženie metylácie DNA počas vývoja v určitých líniiach hmyzu a následne došlo k úplnej strate metylácie DNA, a tiež tak k strate génov DNA metyltransferáz. Niektoré enzýmy dokážu udržať metylačné vzorce neporušené aj počas evolučného obdobia. Napríklad sa predpokladá, že kvasinka *Cryptococcus neoformans* si vo svojom genóme metyláciu DNA zachovala aj po tom, čo svoju *de novo* metyltransferázu stratila pred viac ako 50 miliónmi rokov (Catania S. *et al.*, 2017). Treba spomenúť, že DNA metyltransferázy majú dôležité vývojové funkcie aj v organizmoch, ktoré majú genómy metylované len riedko, napríklad odbúravanie *Dnmt3* u včiel podporovalo podobné fenotypy kráľovnej. Avšak analýza funkčných úloh DNA metyltransferáz ešte nie je úplne preskúmaná (Lyko F., 2018).

3.1.2 Funkcie DNA metyltransferáz

Enzýmy cicavcov *DNMT1*, *DNMT3A* a *DNMT3B* tvoria základ epigenetického programovania. Prvým krokom je vymazanie metylačných značiek vo vývoji zárodočných buniek a v preimplantačných embryách, tým vzniká možnosť na vytvorenie metylačných vzorcov, ktoré budú špecifické pre bunkový typ počas embryonálneho vývoja. Enzýmy rodiny „ten-eleven translocation“ (TET) majú opačnú aktivitu ako DNA metyltransferázy a spôsobujú DNA demetyláciu. Nemetylovaná DNA je následne metylovaná pomocou „*de novo*“ *DNMT3* enzýmov, ktoré sa vyznačujú všadeprítomnou a neselektívnou aktivitou. ADD domény enzýmov *DNMT3* nasmerujú komplexy *DNMT3* na molekuly histónu H3, ktoré sú na lyzíne 4 nemetylované (H3K4) (Ooi S. K. *et al.*, 2007). Väčšina regulačných oblastí génov, zahŕňajúc CpG ostrovčeky a zosilňovače spojené s promotórom, je chránená pred týmto procesom vďaka viazaným transkripčným faktorom, metyláciou H3K4 a ďalšími proteínmi. Počas *de novo* metylácie nie sú metylačné vzorce špecifické pre CpG. Pôvodne sa táto nešpecifická *de novo* metylácia považovala za vedľajší produkt aktivity *DNMT3*, ktorá nie je selektívna pre CpG dinukleotidy. Neskôr niekoľko štúdií naznačilo nezávislú epigenetickú funkciu metylácie iných ako CpG, hlavne počas dozrievania neurónov (Lister R. *et al.*, 2013; Keown C. L. *et al.*, 2017). Takáto metylácia na iných

miestach ako dinukleotidy CpG podporuje väzbu proteínu na metyl-CpG 2 (MECP2), čo je dôležitý represor transkripcie, najmä pre dlhé gény s neuronálnymi funkciami (Chen L. *et al.*, 2015; Gabel H. W *et al.*, 2015).

Metylačné vzory sú vo vyvíjajúcom sa embryu udržiavané pomocou *DNMT1*, vďaka selektivitě *DNMT1* pre symetrické CpG miesta, čím je zabezpečená aj dedičnosť metylačných vzorcov DNA. *DNMT3* a *DNMT1* teda tvoria mechanický základ pre stanovenie a post-replikatívne udržiavanie epigenetických informácií. *DNMT3* zavádza metyláciu DNA a *DNMT1* ju udržiava, avšak, niekoľko štúdií ukázalo, že *DNMT3* prispieva k udržiavaniu vzorov metylácie DNA v diferencovaných bunkách (Chen T. *et al.*, 2003; Arand J. *et al.*, 2012; Raddatz G. *et al.*, 2012; Liao J. *et al.*, 2015).

DNA metyltransferázy sú schopné metylovať promotóry a meniť stavy chromatinu, a preto tieto enzýmy zohrávajú úlohu pri umlčovaní transkripcie (gene silencing). Pri tlmení transkripcie u cicavcov zohrávajú dôležitú úlohu retrotranspozóny, kde je situovaná veľká časť metylácie DNA. Umlčanie retrotranspozónov pozostáva z dvoch vln, a práve v prvej vlne dochádza k hromadnej metylácii a umlčovaniu evolučne starých retrotranspozónov v zárodočnej línii. Toto umlčanie zabezpečuje heterotetramérny komplex enzýmov DNA metyltransferáz *DNMT3A* a *DNMT3L*. V druhej vlne sú pomocou PIWI proteínov rozpoznávané aj mladé retrotranspozóny, ktoré unikli metylácii v prvej vlne a následne sú tiež metylované (Lyko F., 2018).

Pretože niektoré transkripčné faktory sa viažu prednostne na metylované cieľové sekvencie, môžu mať DNA metyltransferázy úlohu aj v transkripčnej aktivácii. V ľudských epidermálnych kmeňových bunkách sú *DNMT3A* a *DNMT3B* spojené s aktívnymi zosilňovačmi. Predpokladá sa, že *DNMT3A* poskytuje substrát pre oxidáciu sprostredkovanú TET. Táto oxidácia môže byť potrebná na odstránenie pôvodnej metylačnej značky alebo na generovanie ďalších značiek na väzbu transkripčného faktora.

3.1.3 Fyziologické funkcie DNA metyltransferáz

Na analýzu fyziologických funkcií DNA metyltransferáz boli použité myši. Táto analýza pomohla pochopiť úlohu DNA metyltransferáz vo vývoji a pri rôznych ochoreniach, avšak zúžili zameranie výskumu na funkcie špecifické pre myši. Ako bolo vyššie uvedené, niektoré organizmy (*C. Elegans*) úplne stratili DNA metyltransferázy, čo dokázalo, že DNA metyltransferázy nie sú pre eukaryoty nevyhnutné. Avšak u myši nedostatok *Dnmt1* alebo *Dnmt3* spôsobuje výrazné vývojové chyby (Okano M. *et al.*, 1999; Li, E., Bestor, *et al.*, 1992).

Inaktivácia *Dnmt1* spôsobovala globálnu stratu metylácie DNA a viedla k veľmi skorej letalite v štádiu embrya hneď po gastrulácii (Li, E. Bestor, *et al.*, 1992; Li E, 2002; Lei H, Oh SP, *et al.*, 1996). Po vypnutí *Dnmt3a* génu sa myši javili normálne, no po 4 týždňoch od narodenia zomreli a delécia

DNMT3b spôsobovala embryonálnu letalitu (Okano M. *et al.*, 1999). Delécia *Dnmt2* spôsobila len aberantnú krvotvorbu, ale myši boli životaschopné a plodné (Goll M. G. *et al.*, 2006).

K ďalšej analýze fyziologických funkcií DNA metyltransferáz boli použité myšie ES bunky (Embryonic Stem cells) s deficitom DNMTs. Takéto bunky sa množili normálne (Tsumura A. *et al.*, 2006). Myšie ES bunky s deficitom *Dnmt1* boli fenotypicky normálne, avšak počas bunkovej diferenciácie zomreli (Lei H *et al.*, 1996). Tento fenotyp podlieha podobným zmenám metylácie, aké sú pozorované počas diferenciácie ľudských ES buniek (Xie W. *et al.*, 2013; Gifford C. A. *et al.*, 2013). Avšak, nediferencované ľudské ES bunky s deficitom *Dnmt1* nie sú životaschopné (Liao J. *et al.*, 2015). Táto skutočnosť sa dá vysvetliť tak, že ľudské bunky kultivované za štandardných podmienok sú diferencovanejšie ako myšie bunky. Rovnako je tiež možné, že úloha *Dnmt1* sa líši medzi ľuďmi a myšami (Lyko F., 2018).

3.1.4 Úlohy DNA metyltransferáz pri ľudských ochoreniach

Pri ľudských ochoreniach dochádza k mutáciám DNA metyltransferáz len zriedkavo. V súčasnosti sa s nimi stretávame pri troch genetických syndrómoch a malej časti rakoviny.

Prvá mutácia bola identifikovaná mutácia *DNMT3B* pri imunodeficiencii, centromerickej nestabilite a syndróme tvárových anomálií (Okano M., Bell D. *et al.*, 1999; Hansen R. S. *et al.*, 1999; Xu G. L. *et al.* 1999). Zaujímavosťou je, že len približne polovica pacientov s týmto syndrómom má mutácie v *DNMT3B* a druhá polovica pacientov má mutácie v génoch, ktoré nepriamo súvisia s metyláciou sprostredkovanú *DNMT3B* (Thijssen P. E. *et al.*, 2015; Wu H. *et al.*, 2016).

Mutácia *DNMT1* bola identifikovaná v dedičnej senzorickej a autonómnej neuropatii typu 1E, ktorá sa prejavuje demenciou a stratou sluchu (Klein C. J. *et al.*, 2011; Baets J. *et al.*, 2015).

Mutácia *DNMT3A* bola pozorovaná pri Tatton-Brown-Rahmanovom syndróme (Tatton-Brown K. *et al.*, 2014). Ide o genetický syndróm, ktorý vedie k výraznému vzhľadu tváre, vysokému vzhľadu a mentálnemu postihnutiu, tiež vedie k akútnej myeloidnej leukémii asi u 25 % pacientov (Ley T. J. *et al.*, 2010).

Fenotypy vzniknuté týmito mutáciami nekorelujú s fenotypmi myších modelov, čo naznačuje, že fenotypy chorôb môžeme rekapitulovať iba mutáciami, ktorých výsledkom sú vysoko definované zmeny v enzýmovej aktivite. Potvrdzujú to aj vzorce mutácii *DNMT3B* u väčšiny pacientov s ICF syndrómom, kde ide o zriedkavé kombinácie heterozygotných mutácií, ktoré len mierne znižujú enzýmovú aktivitu. Je nepravdepodobné, aby slabšie mutácie pôsobili na fenotyp, zatiaľ čo silnejšie by viedli k embryonálnej letalite. Potvrzuje to aj skutočnosť, že ICF syndróm je extrémne zriedkavé ochorenie s menej ako 100 zdokumentovanými prípadmi (Lyko F., 2018)

Úlohy DNA metyltransferáz sa často spájajú s rakovinou, nakoľko zmenené vzory metylácie DNA sú jednou z prvých a najkonzistentnejších molekulárnych zmien ľudských nádorov. Na liečbu hematopoetických malignít boli schválené inhibítory 5-azacytidín a 2'-deoxy-5-azacytidín, pričom klinické aktivity týchto liekov sú už pôsobivé, avšak celkové pôsobenie ešte nie je úplne pochopené.

3.2 Mnohopočetný myelóm

Mnohopočetný myelóm je malígna porucha plazmatických buniek kostnej drene, ktorá v dôsledku nadmernej tvorby monoklonálnych proteínov spôsobuje deštrukciu kostí a zlyhanie kostnej drene. Mnohopočetný myelóm predstavuje 1 % všetkých druhov rakoviny a približne 10 % všetkých hematologických malignít (Rajkumar SV *et al.*, 2014). Toto ochorenie sa vyskytuje častejšie u mužov ako u žien a častejšie u černošskej populácie v porovnaní s beloškou populáciou (Landgren O. *et al.*, 2009). Medián veku pacientov je v čase diagnózy približne 65 rokov (Kyle R. A. *et al.*; 2003).

V porovnaní s inými malignitami metastázujúcimi do kostí osteolytické lézie kostí spôsobené mnohopočetným myelómom nevykazujú žiadnu novú tvorbu kostí (Roodman GD., 2009). Prítomnosť tohto kostného ochorenia sa dá zistiť pomocou bežných kostných rádiografov či magnetickej rezonancie (MRI). Medzi ďalšie klinické prejavy patrí hyperkalcémia, zlyhanie obličiek, anémia a zvýšené riziko infekcií. Typickými symptómami mnohopočetného myelómu sú bolesť chrbta, rednutie kostí až následné patologické zlomeniny. Pacienti často pociťujú únavu, slabosť, či nevoľnosť. Rozlišujeme 2 asymptomatické premalígne štádia pri mnohopočetnom myelóme, sú nimi monoklonálna gamapatia neurčitého významu (MGUS) a tlejúci mnohopočetný myelóm (SMM).

3.2.1 Monoklonálna gamapatia neurčitého významu a tlejúci mnohopočetný myelóm

Monoklonálna gamapatia neurčitého významu (MGUS) a tlejúci mnohopočetný myelóm (SMM) sú asymptomatické, premalígne poruchy charakteristické proliferáciou monoklonálnych plazmatických buniek v kostnej dreni.

MGUS je asymptomatické ochorenie, pri ktorom je detekovaná nízka (< 3 g/dl) hladina sérového monoklonálneho proteínu (M-Ig) a počet plazmatických buniek kostnej drene pod 10 %. Pacienti s MGUS nie sú liečení, sú len pozorovaní. Riziko progresie do aktívneho mnohopočetného myelómu je 1 %.

SMM je asymptomatické ochorenie, pri ktorom pozorujeme zvýšenú hladinu proteínu M-Ig (\geq 3 g/dl) a počet plazmatických buniek kostnej drene je rovný alebo vyšší ako 10 %. Je to medzištádium medzi MGUS a mnohopočetným myelómom. Pacienti sú sledovaní a pri vysoko rizikových pacientoch sa odporúčajú klinické štúdie. Riziko progresie do aktívneho mnohopočetného myelómu je 10–20 %.

Dôvodom rozdelenia premalígnych porúch plazmatických buniek na tieto dve štádia je skutočnosť, že riziko progresie do malignity je medzi MGUS a SMM podstatne odlišné, a preto je vyžadovaná odlišná liečba pre pacientov MGUS a SMM, predovšetkým odlišné frekvencie sledovania a vývoja chemopreventívnych stratégií. (Rajkumar S. V., 2005)

Pacienti s MGUS a SMM majú celoživotné riziko progresie do mnohopočetného myelómu alebo súvisiacej malignity, a preto je nutné ich neustále sledovanie. Vo väčšine prípadov sa mnohopočetný myelóm vyvíja zo štádia MGUS, ktorý je asymptomatický a viac ako 50 % jedincov s diagnostikovaným MGUS malo tento stav už viac ako 10 rokov pred klinickou diagnózou, a následne u niektorých pacientov dochádza k pokročilejšiemu prechodnému asymptomatickému štádiu SMM, pri ktorom je riziko progresie do aktívneho mnohopočetného myelómu 10–20 % (Rajkumar S.V., 2016).

3.2.2 Diagnostika mnohopočetného myelómu

Pre diagnózu aktívneho mnohopočetného myelómu musia byť splnené určité kritériá. Prvou podmienkou je zvýšený počet monoklonálnych plazmatických buniek (> 10%) v kostnej dreni alebo extramedulárny plazmocytóm preukázaný biopsiou. Druhou podmienkou je prítomnosť aspoň jednej dysfunkcie alebo dôkaz poškodenia koncového orgánu, ktoré môžeme pripísať základnej proliferatívnej poruche plazmatických buniek – CRAB – hyperkalcémia (C = „Calcium“), zlyhanie obličiek (R = „Renal dysfunction“), anémia (A = „Anemia“) alebo lytické kostné lézie (B = „Bone disease“). Ďalšími kritériami je zvýšené percento plazmatických buniek klonálnej kostnej drene (≥ 60 %) a aspoň jedna lézia zobrazená pomocou magnetickej rezonancie (s veľkosťou najmenej 5 mm). Vďaka týmto kritériám je možné včas diagnostikovať ochorenie a začať liečbu pred poškodením koncových orgánov (Rajkumar S.V., 2016).

Pri klinickom podozrení na mnohopočetný myelóm by mali byť pacienti testovaní na prítomnosť M-Ig. Tieto testy by mali zahŕňať elektroforézu sérových proteínov (SPEP), imunofixáciu (SIFE) a test voľného ľahkého reťazca v sére (Katzmann J.A. *et al.*, 2006). Približne 2 % pacientov s mnohopočetným myelómom má nesekrétne ochorenie, pričom nemá dokázanú prítomnosť M-Ig v žiadnej z uvedených štúdií (Kyle R. A. *et al.*, 2003). Pri počiatočnej diagnóze sa na štúdie kostnej drene používa fluorescenčná *in situ* hybridizácia (FISH) so sondami určenými na detekciu t(11; 14), t(4; 14), t(14; 16), t(6; 14), t(14; 20), trizómií a del(17p) (Kumar S. K. *et al.*, 2009). Ďalej sa môžeme stretnúť aj s metódami ako konvenčné karyotypizovanie na detekciu hypodiploidie a delécie 13, profilovaná génová expresia a sérové krížové väzby.

M proteín (M-Ig) sa považuje za merateľný, ak sa nachádza v sére ≥ 1 g/dl alebo v moči ≥ 200 mg/ deň. Hladina tohto proteínu sa pozoruje pomocou elektroforézy sérových a močových proteínov. Na vyhodnotenie liečby sa vykonáva toto meranie počas liečby každý mesiac a každé 3–4 mesiace pri

ukončení léčby. Pacientom s mnohopočetným myelómom, ktorým chýba merateľný M proteín sa stanovuje ľahký reťazec bez séra (Rajkumar S.V., 2016).

3.2.3 Molekulárna klasifikácia mnohopočetného myelómu

Mnohopočetný myelóm sa považuje za jedno ochorenie, v skutočnosti však ide o súbor niekoľkých rôznych cytogeneticky odlišných malignít plazmatických buniek (Kumar S. *et al.*, 2012; Rajan A. M. *et al.*, 2015). Pri štúdiách kostnej drene pomocou FISH bolo zistené, že približne 40 % mnohopočetného myelómu je charakterizovaných prítomnosťou trizómií v neoplastických plazmatických bunkách (trizómový mnohopočetný myelóm). Zvyšná väčšina má translokáciu zahŕňajúcu lokus imunoglobulínového ťažkého reťazca na chromozóme 14q32 (viacnásobný myelóm translokovaný IgH) (Kuehl W. M. *et al.*, 2002; Bergsagel P. L. *et al.*, 2001; Fonseca R. *et al.*, 2002; Seidl S. *et al.*, 2003). Malá časť pacientov má aj trizómie aj translokácie IgH. Trizómie a translokácie IgH sú považované za primárne cytogenetické abnormality vyskytujúce sa v čase vzniku MGUS. Počas priebehu ochorenia mnohopočetného myelómu vznikajú aj ďalšie cytogenetické zmeny, ktoré sa nazývajú sekundárne cytogenetické abnormality. Primárne a sekundárne abnormality môžu ovplyvniť priebeh ochorenia, reakciu na liečbu a prognózu (Rajan A. M. *et al.*, 2015).

3.2.4 Prognóza mnohopočetného myelómu

Medián prežitia u pacientov s diagnostikovaným mnohopočetným myelómom je 6–7 rokov. Táto doba sa môže, samozrejme, líšiť v závislosti od hostiteľských faktorov, nádorovej záťaže (štádium ochorenia), cytogenetických abnormalít, a tiež odpovede na liečbu (Russel S. J. *et al.*, 2011; Vu T. *et al.*, 2015). Okrem cytogenetických rizikových faktorov súvisí s agresivitou ochorenia a vysokorizikovým ochorením aj zvýšená laktátdehydrogenáza v sére a leukémia plazmatických buniek s dôkazom cirkulujúcich buniek pri rutinnom vyšetrení periférnych sterov (Rajkumar S.V., 2016).

Na hodnotenie nádorovej záťaže mnohopočetného myelómu sa používa viacero systémov. Revidovaný medzinárodný systém hodnotenia (RISS) spája prvky nádorovej záťaže s biológiou chorôb (prítomnosť vysoko rizikových cytogenetických abnormalít alebo zvýšená hladina laktátdehydrogenázy), a tým pomáha v klinickej starostlivosti. Podľa tohto systému delíme mnohopočetný myelóm na 3 štádiá:

Štádium I je typické hladinou sérového albumínu $\geq 3,5$ g/dl, hladinou séra beta-2-mikroglobulín $< 3,5$ mg/l a hladina laktátdehydrogenázy v sére je normálna. Žiadna vysoko riziková cytogenetika.

V štádiu II kritériá neodpovedajú ani štádiu I, ani štádiu III.

Štádium III je typické zvýšenou hladinou séra beta-2-mikrogobulín (> 5,5 mg/l), a tiež vysokorizikovou cytogenetikou alebo zvýšenou hladinou laktátdehydrogenázy v sére (Palumbo A. *et al.*, 2015).

3.2.5 Liečba mnohopočetného myelómu

Mnohopočetný myelóm stále patrí medzi nevyliciteľné ochorenia. Zahájenie liečby nastáva, ak pacient splňa kritériá mnohopočetného myelómu.

Doba prežitia pri mnohopočetnom myelóme sa za posledné roky významne zlepšila vďaka liečebnej aplikácii talidomidu, bortezomibu a lenalidomidu. Z liekov, ktoré preukázali aktivitu pri mnohopočetnom myelóme, sa vytvorilo množstvo kombinácií. Tieto liečebné kombinácie účinkujú pomocou rôznych mechanizmov, pričom niektoré z nich nie sú úplne pochopené. Jednou z kombinácií sú imunomodulačné látky (IMiDs), ktoré sa viažu na cereblon a aktivujú cereblonovú E3 ligázovú aktivitu, čím dochádza k rýchlej ubikvitinácii a degradácii dvoch špecifických transkripčných faktorov B-buniek. Môžu spôsobiť priamu cytotoxicitu vyvolaním poškodenia DNA sprostredkovaného voľnými radikálmi. Majú tiež antiangiogénne a imunomodulačné vlastnosti.

Zvyčajne sú pacienti liečení približne 3–4 cyklami indukčnej terapie pred zberom kmeňových buniek. Potom môžu pacienti buď podstúpiť autológnu transplantáciu kmeňových buniek (ASCT – Autologous stem cell transplantation), alebo pokračovať v indukčnej liečbe s oneskorením ASCT do prvého relapsu (Rajkumar S.V., 2016).

Možnosti liečby sa stále zdokonaľujú, FDA (Food and Drug Administration) schválila ďalšie látky na liečbu relapsu mnohopočetného myelómu, ktoré by mohli zlepšiť výsledky liečby. Nedávna štúdia tiež zistila, že včasná liečba lenalidomidom a dexametazónom u pacientov s vysokým rizikom SMM môže predĺžiť čas prežitia (Mateos M-V. *et al.*, 2013).

4 MATERIÁL A METÓDY

4.1 Biologický materiál

Pre experimentálnu časť bolo použitých celkom 27 vzoriek aspirátov kostnej drene (sortovaná populácia plazmatických buniek) od pacientov s diagnostikovaným mnohopočetným myelómom. Vzorky boli odobrané lekármi z Hemato-onkologického oddelenia Fakultnej nemocnice Olomouc. Pacienti boli novo diagnostikovaní pred zahájením liečby alebo s relapsom po predchádzajúcej liečbe. Vzorky boli uchovávané zmrazené pri $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Z aspirátov kostnej drene boli izolované plazmatické bunky následne sortované na povrchové markre CD19+, CD38+, CD45+ a CD56+ pomocou prietokovej cytometrie, ktoré vykonali pracovníci Ústavu molekulárnej a translačnej medicíny Univerzity Palackého v Olomouci. Sedem myelómových bunkových línii (KMS-12-BM, RPMI-8226, KMS-12-PE, U266, MM.1S a OPM2) bolo použitých pre stanovenie expresného profilu DNA metyltransferáz.

Pre normalizáciu dát expresnej analýzy bola použitá RNA vyizolovaná z kostnej drene zdravých 56 jedincov vo veku 22–85 rokov, koncentrácia $1\text{ }\mu\text{g} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ (cat. no. 636591, Clontech Laboratories, Inc., A Takara Bio Company, Mountain View, Kanada).

4.1.1 Sortovaná populácia plazmatických buniek (zo vzorky aspirátov kostnej drene s mnohopočetným myelómom)

Tabuľka č. 1: Charakteristika analyzovaného súboru pacientov

Číslo vzorky	Vzorka	Pohlavie	Diagnóza
1	2020-03-04B	Žena	MMdg
2	2020-01-07	Žena	MMrel
3	2020-02-25	Žena	MMdg
4	2019-11-22A	Muž	MMdg+CLL
5	2019-12-17B	Žena	AML
6	2020-01-14B	Muž	MMdg
7	2020-01-20	Muž	MMrel
8	2019-09-06B	Muž	MMrel
9	2020-01-14A	Žena	MMrel
10	2019-11-18B	Žena	MMrel
11	2020-01-22	Muž	MMostat
12	2020-03-04A	Žena	MMrel
13	2019-09-03C2	Žena	MMdg

Pokračovanie Tab. č. 1: Charakteristika analyzovaného súboru pacientov

Číslo vzorky	Vzorka	Pohlavie	Diagnóza
14	2019-09-06A	Žena	MMrel
15	2019-09-06C1	Žena	MMdg
16	2020-03-30	Muž	MMdg
17	2020-06-12A	Muž	MMrel
18	2020-04-20	Žena	MMrel
19	2020-04-29	Muž	MMdg
20	2020-06-29C*	Žena	MMdg
21	2020-06-29D	Žena	AML
22	2020-06-22B	Žena	MMrel
23	2020-01-07	Žena	MMrel
24	2020-02-25	Žena	MMdg
25	2020-03-04B	Žena	MMdg
26	2020-06-29C**	Žena	MMdg
27	2020-07-03	Muž	MMdg

* - vzorka 2020-06-29C* bola izolovaná pomocou Norgen Single Cell RNA Purification Kit (Norgen Biotek Corp, Thorold, ON, Kanada)

** - vzorka 2020-06-29C** bola izolovaná pomocou TRI Reagent BD (Molecular Research Center, Inc., OH, USA)

4. 1. 2 Myelómové bunkové línie

Pre experiment boli použité myelómové bunkové línie KMS-12-BM, RPMI-8226, KMS-12-PE, U266, MM.1S a OPM2. Myelómové bunkové línie MM.1S, RPMI-8226 a U266 (U66B1) boli zakúpené od spoločnosti ATCC – American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA). Myelómové bunkové línie KMS-12-BM a KMS-12-PE boli získané z bunkovej banky JCRB – Japanese Cancer Research Resources Bank (National Institute of Biomedical Innovation, Osaka, Japonsko), myelómová bunková línia OPM-2 pochádza od spoločnosti DSMZ – German Collection of Microorganisms and Cell (Braunschweig, Nemecko).

Bunková línia KMS-12-PE (JCRB0430) bola vytvorená v roku 1987 z pleurálneho výpotku 64-ročnej ženy s refraktérnym terminálnym mnohopočetným myelómom (neprodukujúcim Ig) po kombinovanej chemoterapii. Z hľadiska morfológie ide o malé okrúhle bunky, ktoré v suspenzii rastú samostatne alebo príležitostne v malých zhlukoch. Generačná doba („double time“) je približne 60–80 hodín a doporučená inkubácia je pri teplote 37 °C s 5% CO₂. Imunológia tejto línie: CD3 –, CD4 –,

CD13 –, CD14 –, CD15 –, CD19 –, CD20 –, CD34 –, CD38 +, CD138 +, HLA-DR + (zdroj dsmz.de; cat. no. ACC 606, navštívené dňa 20. 4. 2021)

Bunková línia KMS-12-BM (JCRB0429) bola vytvorená v roku 1988 z kostnej drene 64-ročnej ženy s mnohopočetným myelómom. Je sesterskou líniou k bunkovej línii KMS-12-PE. Z hľadiska morfológie ide prevažne o jednotlivé bunky v suspenzii. Generačná doba („double time“) je približne 60 hodín a doporučená inkubácia je pri teplote 37 °C s 5% CO₂. Imunológia tejto línie: CD3 –, CD10 –, CD13 –, CD19 –, CD34 –, CD37 +, CD38 +, cyCD79a +, CD80 –, CD138 +, HLA-DR –, sm/cyIgG –, sm/cyIgM –, sm/cykappa –, sm/cylambda – (zdroj dsmz.de; cat. no. ACC 551, navštívené dňa 20. 4. 2021).

Bunková línia MM.1S (ATCC®CRL-2974™) bola vytvorená z periférnej krvi 42-ročnej ženy s mnohopočetným myelómom, ktorý sa stal rezistentným na liečbu steroidmi. Doporučená inkubácia je pri teplote 37 °C s 5% CO₂. Antigénová expresia tejto línie: CD25 +, CD38 +, CD52 +, CD59 + (zdroj lgcstandards-atcc.org; ATCC®CRL-2974™, navštívené dňa 20. 4. 2021).

Bunková línia OPM-2 (ACC50) bola vytvorená v roku 1982 z periférnej krvi 56-ročnej ženy s mnohopočetným myelómom v leukemickej fáze. Z hľadiska morfológie ide o samostatné okrúhle až polygonálne bunky v suspenzii. Generačná doba („double time“) je približne 50–60 hodín a doporučená inkubácia je pri teplote 37 °C s 5% CO₂. Imunológia tejto línie: CD3 –, CD10 –, CD19 –, CD20 –, CD34 –, CD37 –, CD38 +, CD80 –, CD138 +, HLA-DR –, sm/cyIgG –, sm/cyIgM –, sm/cykappa –, sm/cylambda – (zdroj dsmz.de; cat. no. ACC 50, navštívené dňa 20. 4. 2021).

Bunková línia RPMI-8226 (ATCC® CCL-155™) bola vytvorená v roku 1966 z periférnej krvi 61-ročného muža s mnohopočetným myelómom. Z hľadiska morfológie rastú bunky v suspenzii samostatne. Generačná doba („double time“) je približne 60–70 hodín a doporučená inkubácia je pri teplote 37 °C s 5% CO₂. Imunológia tejto línie: CD3 –, CD5 –, CD10 –, CD13 –, CD19 –, CD20 –, CD34 –, CD38 +, CD80 –, CD138 +, sm/cyIgG –, sm/cyIgM –, sm/cykappa –, sm/cylambda – (zdroj dsmz.de; cat no. ACC 402, navštívené dňa 21. 4. 2021).

Bunková línia U-266 (ATCC®TIB-196™) bola vytvorená v roku 1968 z periférnej krvi 53-ročného muža s myelómom vylučujúcim IgE. Z hľadiska morfológie ide o jednotlivé alebo zoskupené okrúhle až polygonálne bunky v suspenzii. Generačná doba je približne 55 hodín a doporučená inkubácia je pri teplote 37 °C s 5% CO₂. Imunológia tejto línie: CD3 –, CD5 –, CD10 –, CD13 –, CD19 –, CD20 –, CD34 –, CD37 –, CD38 (+), CD138 +, HLA-DR +, sm/cyIgG –, sm/cyIgM –, sm/cykappa –, smlambda –, cylambda + (zdroj dsmz.de; cat. no. ACC 9, navštívené dňa 20. 4. 2021)

Bunková línia HS-5 (ATCC®CRL-11882™) odvodená z transformovaných fibroblastov bola získaná z kostnej drene zdravého 30-ročného muža. Tieto bunky sú adherentné a doporučená inkubácia je pri teplote 37 °C.

4.2 Laboratorne pomôcky a prístroje

- 0,2ml a 1,5ml mikroskúmavky (Eppendorf)
- 96-jamková mikrotitračná doštička (TPP)
- 5ml a 10ml plastové pipety (Techno Plastic Products)
- Biohazard box MSC-Advantage™ 1,8 (Thermo Scientific)
- Centrifúga LMC-3000 (Biosan)
- Centrifúga MiniSpin plus (Eppendorf)
- Centrifúga Multi-spin PCV-3000 (Grant-Bio)
- DNA/RNA UV-cleaner box UVC/T-AR (Biosan)
- Chladená centrifúga 3K30 (Sigma)
- Inkubátor Dry Bath MD-02N, Major Science
- Laboratórny digestor M/900 M2 (Merci)
- LightCycler® 480 (Roche, Basel, Switzerland)
- LightCycler® 480 multiwell plate 96 white, cat. No. 04729692001 (Roche)
- Mikrocentrifúga Multi-spin PCV-3000 (Grant-Bio)
- Mikropipety (Eppendorf, Gilson)
- NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific)
- Spectrafuge™ Mini C1301-B (Labnet)
- Thermal Cycler C1000™ (Bio-Rad)
- Vortex Lab Dancer (IKA)
- Vortex mixer PV-1 (Grant-Bio)

4.3 Použité chemikálie a roztoky

- 75% a 70% ethanol (Fargon)
- 1-bromo-3-chloropropan
- Deionizovaná voda
- DepcH₂O
- Etanol – 75% a 70% (Fargon)
- Izopropanol
- Primery kompatibilné so sondou *DNMT1* (Sigma)
 - Right 5'–TAATCCTGGGGCTAGGTGAA–3'
 - Left 5'–CAAACCCCTTTCCAAACCTC–3'
- Primery kompatibilné so sondou *DNMT3A* (Sigma)
 - Right 5'–TGGTCTCCTTCTGTCTTTGC–3'
 - Left 5'–CCTGAAGCCTCAAGAGCAGT–3'

- Primery kompatibilné so sondou *DNMT3B* (Sigma)
 - Right 5'–AATTTGTCTTGAGGCGCTTG–3'
 - Left 5'–GGAAATTAGAATCAAGGAAATACGA–3'
- RNáza ZAP (Sigma-Aldrich, USA)
- Sonda Hs02786624_g1 (GAPDH), súčasťou komerčnej sondy sú primery #4331182 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)
- Sonda Hs00945872_g1 (DNMT1), súčasťou komerčnej sondy sú primery, cat. #4351372 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)
- Sonda Hs01027162_ml (DNMT3A), súčasťou komerčnej sondy sú primery, cat. #4331182 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)
- Sonda Hs00171876_ml (DNMT3B), súčasťou komerčnej sondy sú primery, cat. #4351370 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)
- SsoAdvanced Universal SYBR® Green Supermix, cat. 1725271 (Bio-Rad)
- Tri Reagent BD (Molecular Research Center, Inc., OH, USA)

4.4 Použité súpravy

- Norgen Single Cell RNA Purification Kit (Norgen, Biotek Corp, Thorold, ON, Kanada), Cat. 51800
- Xceed qPCR Probe 2x Mix No-Rox, cat. No. NPCR10502S (Institute of Applied Biotechnologies, Praha, Česká republika)
- EasyScript Plus cDNA Synthesis Kit (Applied Biological Material, Inc., Richmond, Kanada), cat. No. B000570575

4.5 Použité počítačové programy

- LightCycler® 480 Software release 1.5.1.62 SP3 (Roche)

4.6 Izolácia RNA zo sortovanej populácie buniek

Izolácia RNA bola vykonaná dvomi metodickými postupmi – podľa protokolu pri použití TRI Reagent BD (Molecular Research Center, Inc., OH, USA) a podľa protokolu ku kitu Norgen Single Cell RNA Purification Kit (Norgen Biotek Corp, Thorold, ON, Kanada).

TRI Reagent BD (Molecular Research Center, Inc., OH, USA) bol použitý na izoláciu RNA z myelómových bunkových línií a z niektorých patientskych vzoriek. Postup bol vykonaný podľa návodu výrobcu.

- Vzorka bola inkubovaná pri izbovej teplote 5 minút a následne bola zvortexovaná.
- Bolo pridaných 100 µl 1-bromo-3-chloropropanu a dôsledne zvortexované minimálne 15 sekúnd.
- Vzorka bola inkubovaná pri izbovej teplote 10 minút.

- Skúmavka bola centrifugovaná 15 minút pri otáčkach 12000 g a teplote 4 °C.
- Do novej mikroskúmavky bola odobraná horná vodnatá fáza, bolo pridaných 500 µl isopropanolu a zmes bola premiešaná.
- Vzorka bola inkubovaná pri izbovej teplote 10 minút.
- Skúmavka bola centrifugovaná 10 minút pri otáčkach 12000 g a teplote 4 °C.
- Bol odstránený supernatant a pelet bol premytý 1 ml 75% ethanolu.
- Skúmavka bola centrifugovaná 5 minút pri otáčkach 7500 g a teplote 4 °C.
- Pelet bol vysušený a rozpustený v 20–40 µl depcH₂O, podľa veľkosti peletu.
- Vzorka bola inkubovaná 30 minút pri teplote 56 °C.
- Bola zmeraná koncentrácia a čistota izolovanej RNA pomocou spektrofotometra NanoDrop.
- Izolovaná RNA bola uchovaná pri teplote – 80 °C.

Na izoláciu RNA zo sortovanej bunkovej populácie (CD19+, CD38+, CD45+ a CD56+) patientskych vzoriek bol použitý Norgen Single Cell RNA Purification Kit (Norgen Biotek Corp, Thorold, ON, Kanada). Postup bol vykonávaný podľa návodu výrobcu.

- Bol pripravený DNasa MIX: do mikroskúmavky bolo napipetovaných 10 µl DNase I a 90 µl Enzyme Incubation Buffer. Mikroskúmavka bola jemne pretrepaná a inkubovaná v chladiacom bloku.
- Do vzorky bunkového peletu bolo pridaných 100 µl Buffer RL.
- Bolo pridaných 100 µl 70% ethanolu a zmes bola vortexovaná.
- Bola zostrojená kolónka.
- Na kolónku bolo prepipetovaných 200 µl vzorky, následne bola kolónka centrifugovaná 1 minútu pri otáčkach 3500 g.
- Supernatant bol vyliaty.
- Kolónka bola premytá pridaním 300 µl Wash Solution A a centrifugovaná 1 minútu pri otáčkach 14000 g.
- Supernatant bol vyliaty.
- Na kolónku bolo pridaných 100 µl DNasa MIX (pripravený v kroku č. 1) a kolónka bola centrifugovaná 1 minútu pri otáčkach 14000 g.
- Supernatant bol prepipetovaný späť na kolónku a inkubovaný pri izbovej teplote 15 minút.
- Kolónka bola premytá pridaním 300 µl Wash Solution A a centrifugovaná 1 minútu pri otáčkach 14000 g.
- Supernatant bol vyliaty.
- Kolónka bola premytá pridaním 300 µl Wash Solution A a centrifugovaná 1 minútu pri otáčkach 14000 g.
- Supernatant bol vyliaty a kolónka bola centrifugovaná 2 minúty pri otáčkach 14000 g.

- Supernatant bol vyliaty.
- Kolónka bola premiestnená do čistej mikroskúmavky.
- Na kolónku bolo pridaných 10 µl Elution Solution A a kolónka bola centrifugovaná 1 minútu pri otáčkach 200 g.
- Kolónka bola centrifugovaná 1 minútu pri otáčkach 14000 g.
- Koncentráciu a čistotu vyizolovanej RNA bola odmeraná pomocou spektrofotometra NanoDrop.
- Izolovaná RNA bola uchovaná pri teplote – 80 °C.

4.7 Reverzná transkripcia

Z vyizolovanej RNA bola pripravená cDNA pomocou kitu EasyScript Plus cDNA Synthesis Kit. Postup bol vykonávaný podľa pokynov výrobcu.

- Do mikroskúmavky s objemom 0,2 µl bolo napipetovaných 1 µl random hexamer primeru, 100 ng RNA a doplnená deionizovaná voda do objemu 14,5 µl.
- Vzorka bola denaturovaná 10 minút pri teplote 65 °C a následne premiestnená do chladiaceho bloku.
- Do vzorky bolo pridané:
 - 4 µl RT Buffer
 - 0,5 µl RNase off Ribonuclease
 - 0,5 µl deoxynukleotidy (dNTPs)
 - 0,5 µl enzyme One Script plus RTase
- Mikroskúmavka bola inkubovaná v termocykleri podľa programu uvedeného v tabuľke č. 2.
- cDNA bola uchovávaná pri teplote – 20 °C.

Tabuľka č. 2: Teplotný a časový profil reverznej transkripcie

Fáza	Teplota [°C]	Čas [min]
Inkubácia	25	10
Inkubácia	50	15
Inaktivácia transkriptázy	85	5

4.8 Expresná analýza génov *DNMT1*, *DNMT3A* a *DNMT3B*

Expresná analýza génov *DNMT1*, *DNMT3A* a *DNMT3B* bola vykonaná metódou real-time PCR s použitím Xceed qPCR Probe Mix 2x No-ROX. Na kvantitatívnu analýzu bol použitý house-keepingový gén *GAPDH*. RNA, izolovaná z kostnej drene zdravých jedincov (Clontech Laboratories, Inc., A Takara, Bio Company, Mountain View, Kanada) a prevedená do cDNA, sa použila

k normalizácii hodnôt expresie sledovaných génov pri patientskych vzorkách. Jednotlivé vzorky boli analyzované v tripletoch.

- Bola pripravená PCR reakčná zmes podľa Tabuľky č. 3 prípadne Tabuľky č. 4.
- Reakčná zmes bola rozdelená do 96-jamkovej doštičky po 19 μ l a následne bol pridaný 1 μ l cDNA.
- Doštička bola prelepená fóliou a následne centrifugovaná 1 minútu pri otáčkach 1000 g.
- Doštička bola umiestnená do LightCycler® 480 s nastaveným programom, vid' tabuľka č. 5.

Tabuľka č. 3: Príprava reakčnej zmesi pre real-time PCR analýzu pre gény *DNMT1*, *DNMT3A*, *DNMT3B* a house-keepingový gén *GAPDH*

Reagencia	Objem na jednu reakciu [μ l]
Xceed qPCR Probe Mix 2x No-ROX	10
Sonda	1
Deionizovaná voda	8
cDNA templát	1
Celkový objem reakčnej zmesi	20

Tabuľka č. 4: Príprava reakčnej zmesi pre real-time PCR analýzu pre gén *DNMT1* v prípade použitia sondy bez prítomných primerov

Reagencia	Objem na jednu reakciu [μ l]
Xceed qPCR Probe Mix 2x No-ROX	10
Sonda	1
Forward primer	0,8
Reverse primer	0,8
Deionizovaná voda	6,4
cDNA templát	1
Celkový objem reakčnej zmesi	20

Tabuľka č. 5: Teplotný a časový profil real-time PCR

Fáza	Teplota [°C]	Čas [min:s]	Počet cyklov
Aktivácia polymerázy	95	02:00	1
Denaturácia	95	00:05	40 + 10
Nasadnutie primerov a predlžovanie DNA	60	00:20	

- Úroveň expresie príslušných génov v testovaných vzorcoch bola vypočítaná zo získaných hodnôt Ct podľa nasledujúceho vzorca (efektivita reakcie = 1,8):

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

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

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

$$R = 2 - \Delta \Delta Ct \text{ (úroveň expresie cieľového génu)}$$

Ct – cyklus prahu (cycle of treshold)

ΔCt , ΔCn – rozdiel v Ct hodnotách medzi porovnávanými vzorkami

$Ct(c,t)$ – Ct hodnota cieľového génu (*DNMT1*, *DNMT3A* alebo *DNMT3B*) pri testovacích podmienkach

$Ct(r,t)$ – Ct hodnota referenčného génu (*GAPDH*) pri testovacích podmienkach

$Ct(c,n)$ – Ct hodnota cieľového génu (*DNMT1*, *DNMT3A* alebo *DNMT3B*) pri normálnych podmienkach

$Ct(r,n)$ – Ct hodnota referenčného génu (*GAPDH*) pri normálnych podmienkach

Pri vzorkách č. 20, 21 a 22 bola vykonaná modifikácia teplotného a časového profilu v nastavenom programe LightCycler® 480, nakoľko pri viacerých vzorkách boli pozorované neanalyzovateľné výsledky expresie najmä génu *DNMT3B* a pomerne neskorý nástup expresie house-keepingového génu *GAPDH*. Pri prvých experimentoch bolo v reagentii použité Xceed qPCR Probe Mix 2x No-Rox a zvolená teplota pre nasadnutie primerov a predlžovanie DNA bola 63 °C. Pri týchto podmienkach boli pozorované nedetekovateľné výsledky expresií pri géne *DNMT3B*. Nástup expresie house-keepingového génu bol neskorší. Následne bol použitý SsoAdvanced Universal SYBR® Green Supermix a zvolená teplota pre nasadnutie primerov a predlžovanie DNA bola zmenená na 60 °C. Pri týchto podmienkach boli pozorované skoršie nástupy expresií pri géne *DNMT3B* (približne 34. cyklus), rovnako aj skorší nástup expresie house-keepingového génu *GAPDH* (priemerne 28. cyklus). Pri poslednom experimente bol použitý Xceed qPCR Probe Mix 2x No-Rox a teplota pre nasadenie primerov a predlžovanie DNA bola opäť 60 °C. Pri týchto podmienkach boli pozorované neskoršie nástupy expresií génu *DNMT3B* v porovnaní s SsoAdvanced Universal SYBR® Green Supermix (až

39. cyklus), podobne neskorší nástup expresie housekeepingového génu *GAPDH* (priemerne 32. cyklus). Pre ostatné vzorky boli použité podmienky z posledného experimentu, teda Xceed qPCR Probe Mix 2x No-Rox v reagentii, ale teplota pre nasadenie primerov a predlžovanie DNA 63 °C. Napriek tomu, že pri použití SsoAdvanced Universal SYBR® Green Supermix boli získané výsledky expresie skôr, bol zvolený posledný postup, nakoľko Xceed qPCR Probe Mix 2x No-Rox poskytuje výsledok s menšou chybovosťou. Výsledky experimentov sú uvedené v tabuľke č. 6.

Tabuľka č. 6: Výsledky experimentov pre modifikáciu teplotného a časového profilu real-time PCR

Postup	Xceed + 63 °C		Sybr + 60 °C		Xceed + 60 °C	
	Nástup GAPDH	Nástup DNMT3B	Nástup GAPDH	Nástup DNMT3B	Nástup GAPDH	Nástup DNMT3B
Vzorka č. 20	27,56	35	24,79	34,57	27,63	39,74
Vzorka č. 21	31,97	n. a.	27,37	34,34	31,9	40
Vzorka č. 22	35	n. a.	32,07	35,11	36,81	40

5 VÝSLEDKY

5.1 Expresná analýza génov *DNMT1*, *DNMT3A* a *DNMT3B* v sortovanej populácii plazmatických buniek

Cieľom expresnej analýzy bolo zistiť úroveň expresie génov *DNMT1*, *DNMT3A* a *DNMT3B* vo vzorkách pacientov s novo diagnostikovaným mnohopočetným myelómom a s relabujúcim mnohopočetným myelómom. Pre normalizáciu expresie pozorovaných génov v sortovanej populácii plazmatických buniek bola použitá RNA vyizolovaná z kostnej drene zdravých 56 jedincov vo veku 22–85 rokov (Clontech Laboratories, Inc., A Takara, Bio Company, Mountain View, Kanada). Ako house-keepingový gén bol použitý gén *GAPDH*. Meranie bolo vykonané v niekoľkých opakovaníach a v tripletoch.

Na expresnú analýzu bolo použitých 13 vzoriek pacientov (viď tab. č. 7, 8 a 9). Z týchto vzoriek bolo 5 vzoriek od pacientov, ktorým bol novo diagnostikovaný mnohopočetný myelóm. Vzorky č. 20 a 26 pochádzajú z jedného pacienta, ale boli vyizolované odlišným postupom, preto bola do výpočtov použitá len vzorka č. 20. Vzorka č. 20 bola vyizolovaná pomocou Norgen Single Cell RNA Purification Kit (Norgen Biotek Corp, Thorold, ON, Kanada) a vzorka č. 26 bola vyizolovaná pomocou TRI Reagent BD (Molecular Research Center, Inc., OH, USA). Ďalších 5 vzoriek pochádzalo od pacientov s relabujúcim mnohopočetným myelómom. Dve vzorky (č. 11 a 21) neboli zahrnuté do neskoršieho porovnania vzhľadom na odlišný typ diagnózy a niektoré výsledky expresii neboli detekovateľné (najmä pri géne *DNMT3B*). Z výsledkov boli získané relatívne (normalizované) expresie jednotlivých génov, $2 - \Delta\Delta Ct$ hodnoty a vypočítaná smerodajná odchýlka (viď Tab. č. 7, 8 a 9).

Tabuľka č. 7.: Výsledky expresie génu *DNMT1* a smerodajná odchýlka v sortovanej populácii plazmatických buniek

Číslo vzorky	Vzorka	Diagnóza	Relatívne hodnoty expresie	$2 - \Delta\Delta Ct$ hodnoty expresie	Smerodajná odchýlka
1	2020-03-04B	MMdg	0,8014	0,0575	0,0529
2	2020-01-07	MMrel	1,1171	0,0272	0,2694
3	2020-02-25	MMdg	1,0788	0,0775	0,0596
7	2020-01-20	MMrel	1,8969	0,1470	0,3543
10	2019-11-18B	MMrel	1,9783	0,2316	0,0714
11	2020-01-22	MMostat	5,9601	0,6186	0,3151
16	2020-03-30	MMdg	1,1083	0,0862	0,2791
18	2020-04-20	MMrel	1,0184	0,0793	0,2361
20	2020-06-29C*	MMdg	1,1232	0,0814	0,0855
21	2020-06-29D	AML	3,6949	0,3079	0,4427
22	2020-06-22B	MMrel	7,4432	0,7253	0,4103
26	2020-06-29C**	MMdg	1,6803	0,2042	0,3637
27	2020-07-03	MMdg	2,1166	0,2573	0,3731

* - vzorka 2020-06-29C* - RNA bola izolovaná pomocou Norgen Single Cell RNA Purification Kit (Norgen Biotek Corp, Thorold, ON, Kanada)

** - vzorka 2020-06-29C** - RNA bola izolovaná pomocou TRI Reagent BD (Molecular Research Center, Inc., OH, USA)

Tabuľka č. 8: Výsledky expresie génu *DNMT3A* a smerodajná odchýlka v sortovanej populácii plazmatických buniek

Číslo vzorky	Vzorka	Diagnóza	Relatívne hodnoty expresie	2 – $\Delta\Delta\text{Ct}$ hodnoty expresie	Smerodajná odchýlka
1	2020-03-04B	MMdg	2,3251	0,0332	0,4955
2	2020-01-07	MMrel	1,5119	0,1288	0,0994
3	2020-02-25	MMdg	3,3247	0,0475	0,2373
7	2020-01-20	MMrel	1,8462	0,0309	0,4524
10	2019-11-18B	MMrel	3,4715	0,0564	0,4964
11	2020-01-22	MMostat	6,6367	0,1319	0,4473
16	2020-03-30	MMdg	1,5696	0,0504	0,2488
18	2020-04-20	MMrel	1,0734	0,0345	0,2599
20	2020-06-29C*	MMdg	0,9648	0,0262	0,0844
21	2020-06-29D	AML	3,7261	0,1246	0,3934
22	2020-06-22B	MMrel	5,5086	0,1967	0,4574
26	2020-06-29C**	MMdg	2,0621	0,0827	0,3082
27	2020-07-03	MMdg	2,4310	0,1027	0,4767

* - vzorka 2020-06-29C* - RNA bola izolovaná pomocou Norgen Single Cell RNA Purification Kit (Norgen Biotek Corp, Thorold, ON, Kanada)

** - vzorka 2020-06-29C** - RNA bola izolovaná pomocou TRI Reagent BD (Molecular Research Center, Inc., OH, USA)

Tabuľka č. 9: Výsledky expresie génu *DNMT3B* a smerodajná odchýlka v sortovanej populácii plazmatických buniek

Číslo vzorky	Vzorka	Diagnóza	Relatívne hodnoty expresie	2 – $\Delta\Delta\text{Ct}$ hodnoty expresie	Smerodajná odchýlka
1	2020-03-04B	MMdg	1,1541	0,0041	0,2746
2	2020-01-07	MMrel	0,7262	0,0154	0,0775
3	2020-02-25	MMdg	1,8214	0,0072	0,4128
7	2020-01-20	MMrel	2,2831	0,0096	0,4506
10	2019-11-18B	MMrel	1,8292	0,0077	0,2217
11	2020-01-22	MMostat	n. a.	n. a.	n. a.
16	2020-03-30	MMdg	0,5572	0,0047	0,3244
18	2020-04-20	MMrel	n. a.	n. a.	n. a.
20	2020-06-29C*	MMdg	0,1975	0,0008	0,0583
21	2020-06-29D	AML	2,5541	0,0086	0,5903

Pokračovanie Tab. č. 9: Výsledky expresie génu *DNMT3B* a smerodajná odchýlka v sortovanej populácii plazmatických buniek

Číslo vzorky	Vzorka	Diagnóza	Relatívne hodnoty expresie	2 – $\Delta\Delta$ Ct hodnoty expresie	Smerodajná odchýlka
22	2020-06-22B	MMrel	n. a.	0,1535	n. a.
26	2020-06-29C**	MMdg	2,4280	0,0197	0,4249
27	2020-07-03	MMdg	1,1346	0,0084	0,3541

* - vzorka 2020-06-29C* - RNA bola izolovaná pomocou Norgen Single Cell RNA Purification Kit (Norgen Biotek Corp, Thorold, ON, Kanada)

** - vzorka 2020-06-29C** - RNA bola izolovaná pomocou TRI Reagent BD (Molecular Research Center, Inc., OH, USA)

Následne boli porovnávané relatívne expresie pozorovaných génov *DNMT1*, *DNMT3A* a *DNMT3B* u pacientov s novo diagnostikovaným mnohopočetným myelómom a u pacientov s diagnostikovaným relabujúcim mnohopočetným myelómom (viď Tab. č. 10 a 11).

Pri pacientoch s novo diagnostikovaným mnohopočetným myelómom boli pozorované zvýšené hodnoty expresií génu *DNMT3A*. Expresia génu *DNMT1* sa pohybovala okolo hodnoty 1 a expresia génu *DNMT3B* bola u niektorých vzoriek vyššia a u niektorých nižšia ako hodnota expresie génu *DNMT1* (viď Graf č. 1).

Pri pacientoch s diagnostikovaným relabujúcim mnohopočetným myelómom boli porovnávané len tri z piatich vzoriek, nakoľko expresie génu *DNMT3B* vzoriek č. 18 a 22 neboli detekovateľné, a preto neboli zahrnuté do porovnania. Na grafe č. 2 je pozorovaná hodnota expresie génu *DNMT1* medzi hodnotami 1–2. Hodnoty expresie génu *DNMT3A* sa navzájom viditeľne líšia a hodnoty expresie génu *DNMT3B* sú podobné s hodnotami expresie génu *DNMT1* (viď Graf č. 2).

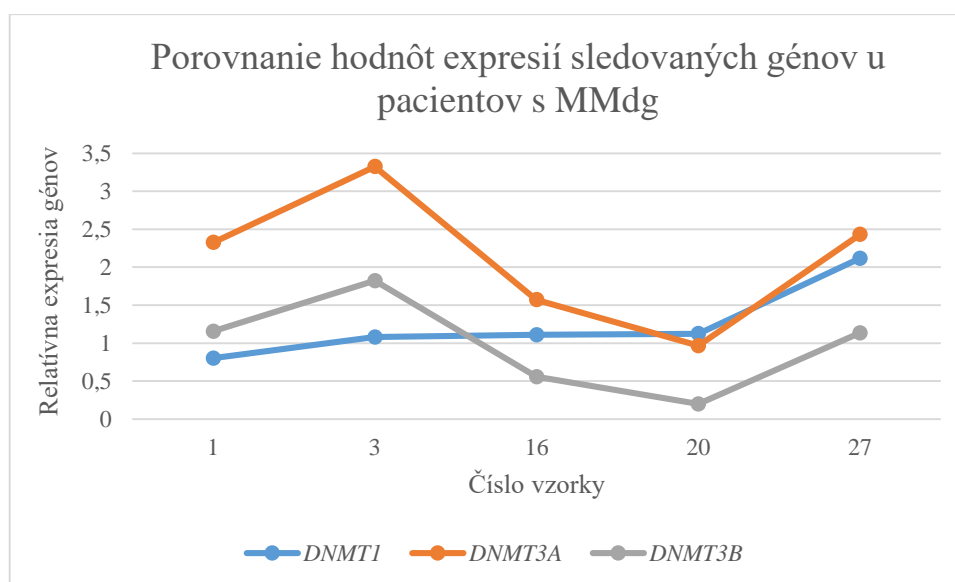
Porovnaním relatívnych expresií sledovaných génov *DNMT1*, *DNMT3A* a *DNMT3B* u pacientov s novo diagnostikovaným mnohopočetným myelómom a u pacientov s diagnostikovaným relabujúcim mnohopočetným myelómom je viditeľné, že pacienti s diagnostikovaným relabujúcim mnohopočetným myelómom majú zvýšené hodnoty expresií všetkých troch génov v porovnaní s pacientami s novo diagnostikovaným mnohopočetným myelómom. Taktiež sa ukázalo, že u tejto skupiny pacientov je relatívna expresia génov *DNMT3A* a *DNMT3B* vyššia ako relatívna expresia génu *DNMT1* (viď Graf č. 3).

Tabuľka č. 10: Normalizované hodnoty expresií génov *DNMT1*, *DNMT3A* a *DNMT3B* u pacientov s novo diagnostikovaným mnohopočetným myelómom

Číslo vzorky	Vzorka	Expresia génu <i>DNMT1</i>	Expresia génu <i>DNMT3A</i>	Expresia génu <i>DNMT3B</i>
1	2020-03-04B	0,8014	2,3251	1,1541
3	2020-02-25	1,0788	3,3247	1,8214
16	2020-03-30	1,1083	1,5696	0,5572
20	2020-06-29C*	1,1232	0,9648	0,1975
27	2020-07-03	2,1166	2,4310	1,1346

* - vzorka 2020-06-29C* - RNA bola izolovaná pomocou Norgen Single Cell RNA Purification Kit (Norgen Biotek Corp, Thorold, ON, Kanada)

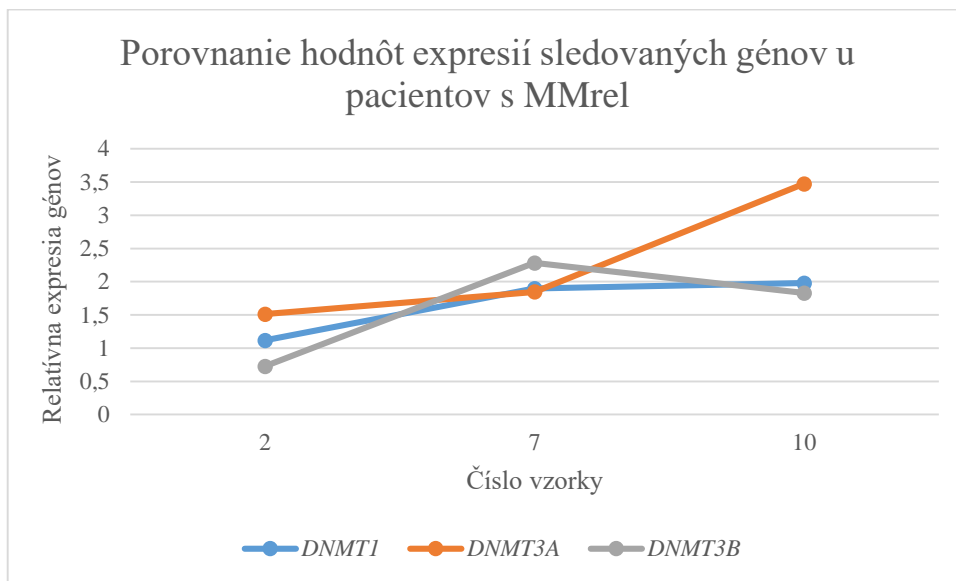
Graf č. 1: Porovnanie normalizovaných hodnôt expresií génov *DNMT1*, *DNMT3A* a *DNMT3B* u pacientov s novo diagnostikovaným mnohopočetným myelómom



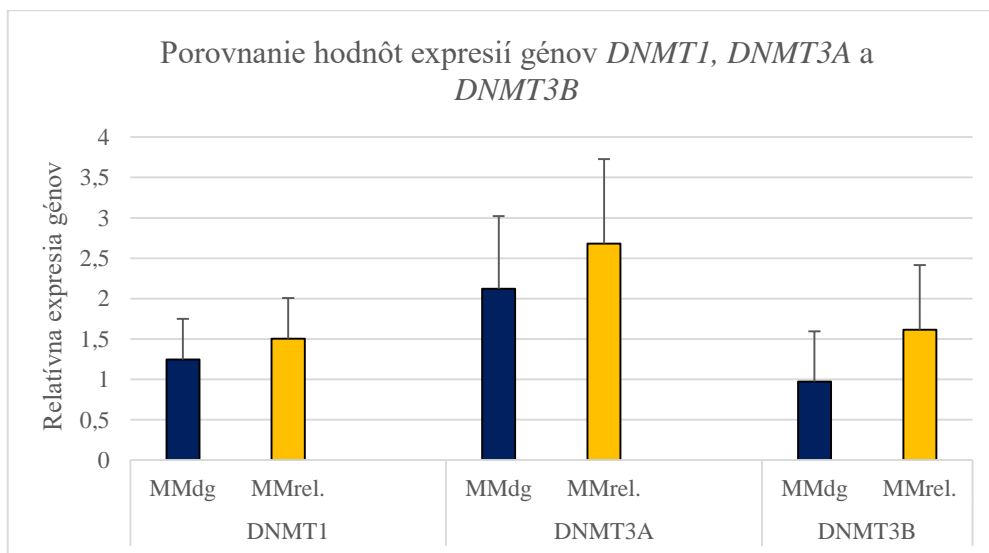
Tabuľka č. 11: Normalizované hodnoty expresií génov *DNMT1*, *DNMT3A* a *DNMT3B* u pacientov s relabovaným mnohopočetným myelómom

Číslo vzorky	Vzorka	Expresia génu <i>DNMT1</i>	Expresia génu <i>DNMT3A</i>	Expresia génu <i>DNMT3B</i>
2	2020-01-07	1,1171	1,5119	0,7262
7	2020-01-20	1,8969	1,8462	2,2831
10	2019-11-18B	1,9783	3,4715	1,8292
18	2020-04-20	1,0184	1,0734	n.a.
22	2020-06-22B	7,4432	5,5086	n.a.

Graf č. 2: Porovnanie normalizovaných hodnôt expresií génov *DNMT1*, *DNMT3A* a *DNMT3B* u pacientov s relabovaným mnohopočetným myelómom



Graf č. 3: Porovnanie normalizovaných hodnôt expresií génov *DNMT1*, *DNMT3A* a *DNMT3B* u pacientov s novo diagnostikovaným mnohopočetným myelómom a relabujúcim mnohopočetným myelómom



V druhej časti analýzy génovej expisie *DNMT1*, *DNMT3A* a *DNMT3B* boli vypočítané hodnoty $2 - \Delta\Delta Ct$ génov *DNMT1*, *DNMT3A* a *DNMT3B* u pacientov s novo diagnostikovaným mnohopočetným myelómom a pacientov s diagnostikovaným relabujúcim mnohopočetným myelómom (viď Tab. č. 12 a 13).

Pri pacientoch s novo diagnostikovaným mnohopočetným myelómom boli $2 - \Delta\Delta\text{Ct}$ hodnoty expresií nízke. Najvyššie hodnoty expresie opäť dosahoval gén *DNMT1*, avšak stále boli menšia ako 1. Hodnoty expresií génov *DNMT3A* a *DNMT3B* boli nižšie, dokonca expresie génu *DNMT3B* boli blízke nule (viď Graf č. 4).

U pacientov s diagnostikovaným relabujúcim mnohopočetným myelómom boli pozorované zvýšené hodnoty expresií pozorovaných génov v porovnaní s pacientami s novo diagnostikovaným mnohopočetným myelómom. Rozdiel v expresiách génov je viac zreteľný. Hodnota expresie génu *DNMT1* je opäť vyššia ako hodnoty expresie génov *DNMT3A* a *DNMT3B*. Pri tomto porovnaní nebola použitá vzorka č. 18, nakoľko hodnota expresie génu *DNMT3B* nebola detekovateľná (viď Graf č. 5).

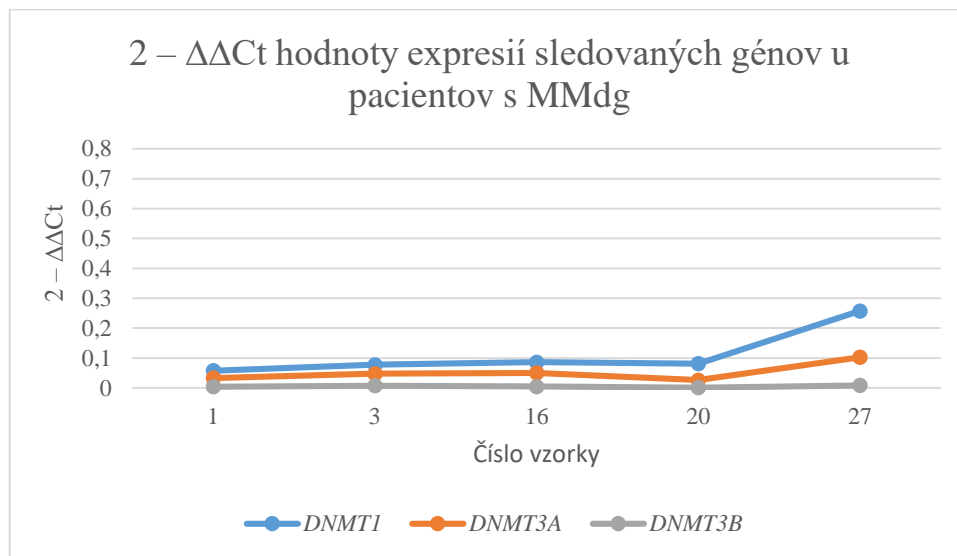
Porovnaním $2 - \Delta\Delta\text{Ct}$ hodnôt génov *DNMT1*, *DNMT3A* a *DNMT3B* u pacientov s novo diagnostikovaným mnohopočetným myelómom a pacientov s diagnostikovaným relabujúcim mnohopočetným myelómom sa ukázalo, že pacienti s diagnostikovaným relabujúcim mnohopočetným myelómom majú vyššie hodnoty expresie všetkých troch génov v porovnaní s pacientmi s novo diagnostikovaným mnohopočetným myelómom. Na rozdiel od relatívnych expresií sledovaných génov, $2 - \Delta\Delta\text{Ct}$ hodnoty génov *DNMT3A* a *DNMT3B* sú nižšie ako $2 - \Delta\Delta\text{Ct}$ hodnota génu *DNMT1* (viď Graf č. 6).

Tabuľka č. 12: $2 - \Delta\Delta\text{Ct}$ hodnoty expresií génov *DNMT1*, *DNMT3A* a *DNMT3B* u pacientov s novo diagnostikovaným mnohopočetným myelómom

Číslo vzorky	Vzorka	Expresia génu <i>DNMT1</i>	Expresia génu <i>DNMT3A</i>	Expresia génu <i>DNMT3B</i>
1	2020-03-04B	0,0575	0,0332	0,0041
3	2020-02-25	0,0775	0,0475	0,0072
16	2020-03-30	0,0862	0,0504	0,0047
20	2020-06-29C*	0,0814	0,0262	0,0008
27	2020-07-03	0,2573	0,1027	0,0084

* - vzorka 2020-06-29C* - RNA bola izolovaná pomocou Norgen Single Cell RNA Purification Kit (Norgen Biotek Corp, Thorold, ON, Kanada)

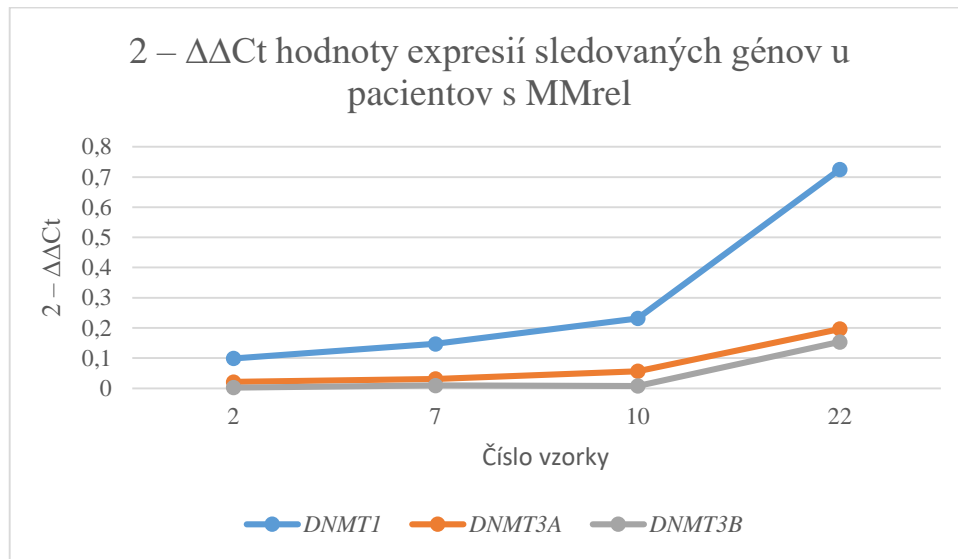
Graf č. 4: Porovnanie $2 - \Delta\Delta Ct$ hodnôt expresií génov *DNMT1*, *DNMT3A* a *DNMT3B* u pacientov s novo diagnostikovaným mnohopočetným myelómom (Kruskal-Wallis, p-value = 0,46448)



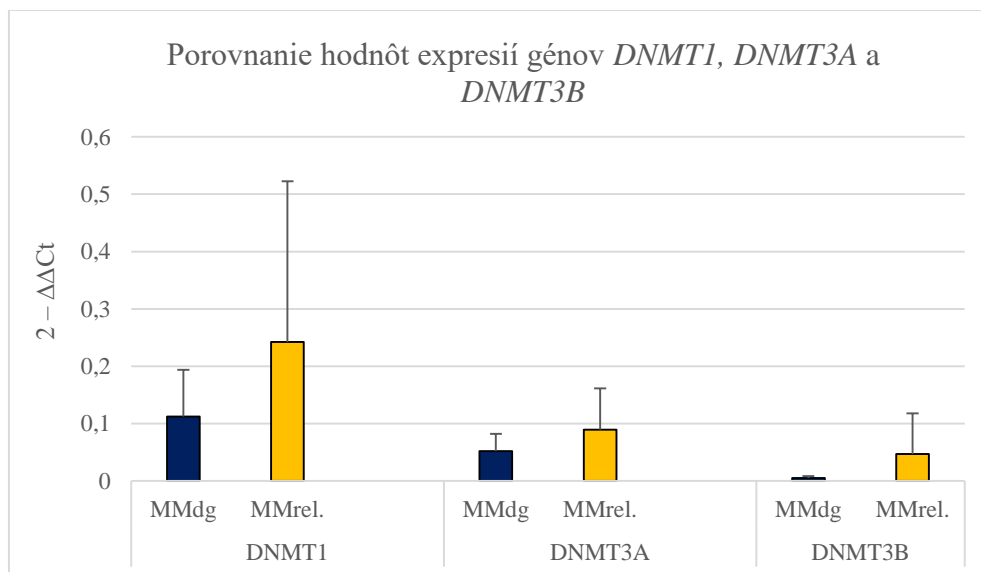
Tabuľka č. 13: $2 - \Delta\Delta Ct$ hodnoty expresií génov *DNMT1*, *DNMT3A* a *DNMT3B* u pacientov s relabovaným mnohopočetným myelómom

Číslo vzorky	Vzorka	Expresia génu <i>DNMT1</i>	Expresia génu <i>DNMT3A</i>	Expresia génu <i>DNMT3B</i>
2	2020-01-07	0,0272	0,1288	0,0154
7	2020-01-20	0,147	0,0309	0,0096
10	2019-11-18B	0,2316	0,0564	0,0077
18	2020-04-20	0,0793	0,0345	n.a.
22	2020-06-22B	0,7253	0,1967	0,1535

Graf č. 5: Porovnanie $2 - \Delta\Delta Ct$ hodnôt expresií génov *DNMT1*, *DNMT3A* a *DNMT3B* u pacientov s relabovaným mnohopočetným myelómom (Kruskal-Wallis, p-value = 0,04158, p < 0,05)



Graf č. 6: Porovnanie $2 - \Delta\Delta Ct$ hodnôt expresií génov *DNMT1*, *DNMT3A* a *DNMT3B* u pacientov s novo diagnostikovaným mnohopočetným myelómom a relabujúcim mnohopočetným myelómom (Kruskal-Wallis, p-value = 0,04158 p < 0,05)



5.2 Expresná analýza v myelómových bunkových líniah

Cieľom expresnej analýzy bolo zistiť úroveň expresie génov *DNMT1*, *DNMT3A* a *DNMT3B* v myelómových bunkových líniah. Pre normalizáciu expresie pozorovaných génov v myelómových bunkových líniah bola použitá bunková línia HS-5 (ATCC®CRL-11882™) odvodená z transformovaných fibroblastov, získaných z kostnej drene zdravého 30-ročného muža. Ako house-keepingový gén bol použitý gén *GAPDH*. Meranie bolo vykonané v niekoľkých opakovaníach a v tripletoch.

Na expresnú analýzu bolo použitých 6 myelómových bunkových línii KMS-12-BM, RPMI-8226, KMS-12-PE, U266, MM.1S a OPM2. Pri práci boli vykonané dve opakovania stanovenia expresie sledovaných génov u bunkovej línie KMS-12-BM, ale pre výpočty bola použitá len jedna. Z výsledkov boli vypočítané relatívne (normalizované) hodnoty expresií a $2 - \Delta\Delta\text{Ct}$ hodnoty expresií sledovaných génov (viď Tab. č. 14, 15 a 16).

Pri porovnávaní relatívnych hodnôt expresií sledovaných génov u myelómových bunkových línii bolo pozorované kolísanie expresií génov *DNMT3A* a *DNMT3B* u niektorých myelómových bunkových línii. Hodnoty porovnávaných expresií génu *DNMT1* boli vyššie v všetkých testovaných línii a pohybovali sa v rozmedzí približne 6–13. Rozdiely hodnôt expresie génov *DNMT3A* a *DNMT3B* je dobre viditeľný, hodnoty sú vyššie od nuly a zároveň sú menšie ako 9 (viď Graf č. 7).

Pri porovnávaní $2 - \Delta\Delta\text{Ct}$ hodnôt expresií sledovaných génov u myelómových bunkových línii bolo viditeľné, že hodnota expresie génu *DNMT1* je pomerne nízka, avšak je vyššia ako hodnoty expresií génov *DNMT3A* a *DNMT3B*. Hodnoty expresie génov *DNMT3A* a *DNMT3B* sú veľmi nízke, takmer nedetekovateľné (viď Graf. č. 8).

Tabuľka č. 14: Výsledky expresie génu *DNMT1* a smerodajná odchýlka v myelómových bunkových líniah

Typ línie	Relatívne hodnoty expresie	$2 - \Delta\Delta\text{Ct}$ hodnoty expresie	Smerodajná odchýlka
KMS-12-BM	12,4802	0,2000	0,5233
RPMI-8226	8,5278	0,1334	0,4060
KMS-12-PE	11,7784	0,1697	0,4336
U-266	13,1053	0,1999	0,4944
MM.1S	10,1135	0,1719	0,4996
OPM-2	5,9257	0,0984	0,4618
KMS-12-BM***	11,1245	0,2029	0,4822

KMS-12-BM*** - opakovaná línia

Tabuľka č. 15: Výsledky expresie génu *DNMT3A* a smerodajná odchýlka v myelómových bunkových líniah

Typ línie	Relatívne hodnoty expresie	2 – $\Delta\Delta\text{Ct}$ hodnoty expresie	Smerodajná odchýlka
KMS-12-BM	6,4919	0,0084	0,4852
RPMI-8226	8,3271	0,0141	0,5561
KMS-12-PE	3,2394	0,0069	0,5769
U-266	4,8612	0,0094	0,0996
MM.1S	4,5761	0,0116	0,4633
OPM-2	1,2766	0,0032	0,1636
KMS-12-BM***	4,1810	0,0098	4,1810

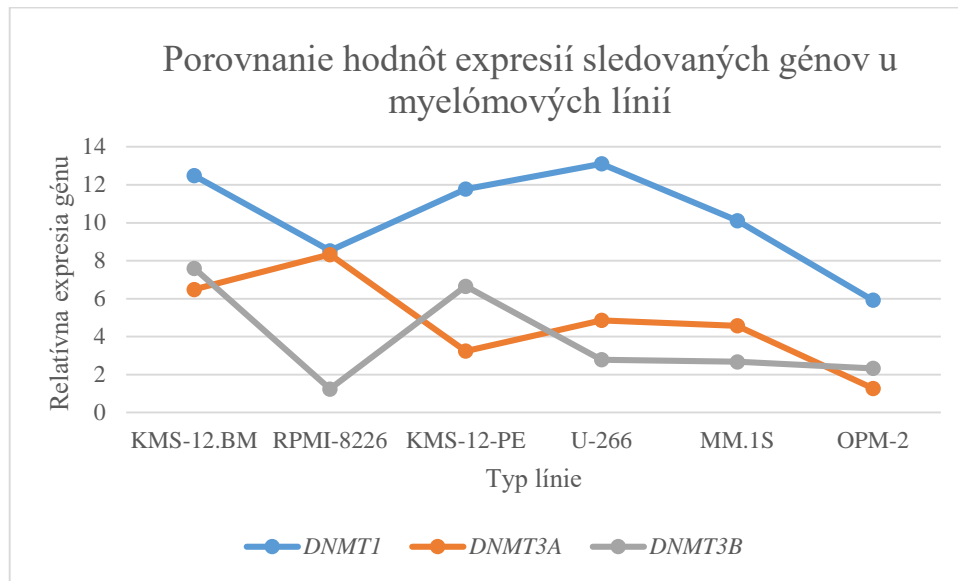
KMS-12-BM*** - opakovaná línia

Tabuľka č. 16: Výsledky expresie génu *DNMT3B* a smerodajná odchýlka v myelómových bunkových líniah

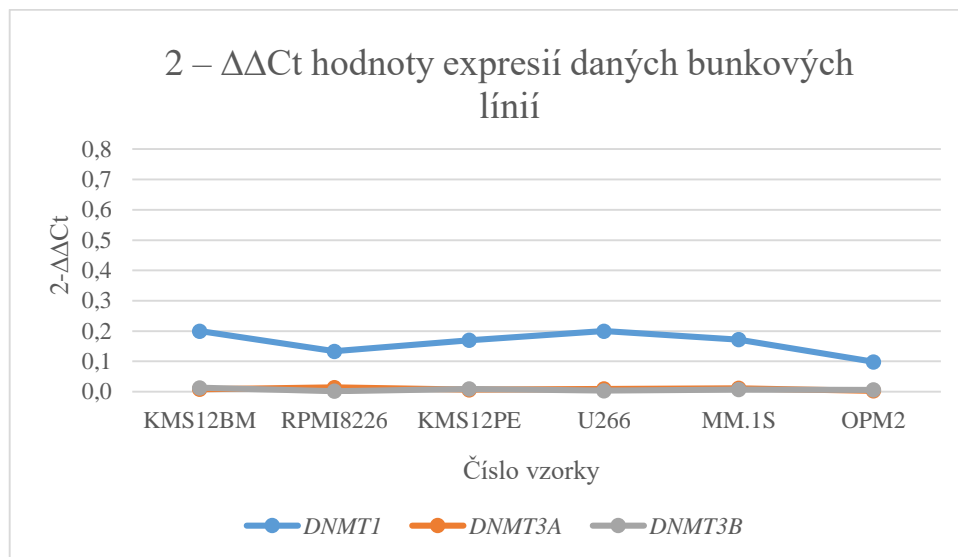
Typ línie	Relatívne hodnoty expresie	2 – $\Delta\Delta\text{Ct}$ hodnoty expresie	Smerodajná odchýlka
KMS-12-BM	7,6045	0,0131	0,5880
RPMI-8226	1,2429	0,0020	0,2838
KMS-12-PE	6,6573	0,0092	0,1383
U-266	2,7842	0,0049	0,4445
MM.1S	2,6758	0,0074	0,3202
OPM-2	2,3331	0,0064	0,0975
KMS-12-BM***	3,7277	0,0122	0,4459

KMS-12-BM*** - opakovaná línia

Graf č. 7: Porovnanie normalizovaných hodnôt expresií bunkových línií KMS-12-PE, MM.1S, OPM2, KMS 12 BM, RPMI-8226 a U266



Graf č. 8: Porovnanie $2^{-\Delta\Delta Ct}$ hodnôt expresií bunkových línií KMS-12-PE, MM.1S, OPM2, KMS 12 BM, RPMI-8226 a U266



6 DISKUSIA

Cieľom bakalárskej práce bolo zistiť a porovnať génové expresie vybraných DNA metyltransferáz u pacientov s diagnostikovaným mnohopočetným myelómom a u myelómových bunkových línií.

Valentina Bollati *et al.* (2009) pozorovali okrem iného aj expresie DNA metyltransferáz (konkrétne *DNMT1*, *DNMT3A* a *DNMT3B*) vo vzorkách od pacientov s diagnostikovaným mnohopočetným myelómom, s diagnostikovanou leukémiou plazmatických buniek, zdravých pacientov a vzorkách myelómových bunkových línií. Táto štúdia bola založená na kvantitatívnej analýze metylácie DNA pomocou pyrosekvencovania, a boli tu použité odlišné postupy.

V tejto práci (Bollati V. *et al.*, 2009) bol skúmaný vzťah medzi hypometyláciou DNA a expresiou DNA metyltransferáz pomocou vyhodnotenia absolútnej úrovne expresie troch odlišných génov – *DNMT1*, *DNMT3A* a *DNMT3B*.

V štúdiu sa zistilo, že expresia génu *DNMT1* bola zvýšená u vzoriek pacientov s diagnostikovaným mnohopočetným myelómom, s diagnostikovanou leukémiou plazmatických buniek, a tiež u myelómových bunkových línií v porovnaní so vzorkami zdravých pacientov.

Podobne sa v našom experimente ukázalo, že $2 - \Delta\Delta Ct$ hodnota expresie génu *DNMT1* v porovnaní s $2 - \Delta\Delta Ct$ hodnotami expresií génov *DNMT3A* a *DNMT3B* bola zvýšená u pacientov s novo diagnostikovaným mnohopočetným myelómom (viď Graf č. 4) a u pacientov s diagnostikovaným relabujúcim mnohopočetným myelómom (viď Graf č. 5). Napriek tomu, relatívne hodnoty expresie génu *DNMT1* u pacientov s novo diagnostikovaným mnohopočetným myelómom boli viditeľne nižšie ako relatívna hodnota génu *DNMT3A* (viď Graf č. 1), kedy zvýšená expresia génu *DNMT3A* tak môže byť dôležitým diagnostickým markerom u novo diagnostikovaných pacientov s mnohopočetným myelómom. Z týchto výsledkov môžeme usudzovať, že pre relatívne hodnoty expresie je veľmi dôležité k akej vzorke sa dané hodnoty normalizujú, a teda aká vzorka slúži ako kontrola – v našom prípade sme použili vzorku kostnej drene zdravých jedincov, populácie normálnych B-lymfocytov (problémová kultivácia, a s tým spojený nedostatok buniek pre izoláciu RNA) a populáciu fibroblastov (bunková línia fibroblastov HS-5).

Hodnoty expresie génu *DNMT1* u myelómových línií boli zvýšené rovnako ako v spomínanej štúdiu (Bollati V. *et al.*, 2009) (viď Graf č. 7 a 8).

Jedným z vysvetlení tejto skutočnosti je, že zvýšené hladiny expresie génu *DNMT1* môžu odrážať progresívne zvyšovanie proliferatívnej aktivity v rôznych kategóriách skôr ako jej účasť na hypometylácii DNA, nakoľko je *DNMT1* zodpovedný za kopírovanie metylačných vzorcov po syntéze DNA (Bashtrykov P. *et al.*, 2012). Toto vysvetlenie súhlasí s ďalšími štúdiami na rôznych typoch

ľudskej rakoviny, ktoré potvrdili závislosť génu *DNMT1* na proliferácii (Jones PA, 1986; Li S *et al.*, 2003).

V tejto práci sme na základe našich experimentov zistili u pacientov s novo diagnostikovaným mnohopočetným myelómom zvýšené relatívne hodnoty expresií génu *DNMT3A* oproti génom *DNMT3B* a *DNMT1* (vid' Graf č. 1 a 3). Okrem toho, u oboch testovaných skupín pacientov boli detekované znížené hodnoty expresie génov *DNMT3A* a *DNMT3B* pri $2 - \Delta\Delta Ct$ hodnotách expresií (vid' Graf č. 4, 5 a 6). Relatívne hodnoty expresií génov *DNMT3A* a *DNMT3B* u myelómových bunkových línii boli kolísavé (vid' Graf č. 7), ale nižšie ako relatívne hodnoty expresií génu *DNMT1* (vid' Graf č. 7). Podobne, $2 - \Delta\Delta Ct$ hodnoty expresií génu *DNMT1* boli vyššie oproti génom *DNMT3A* a *DNMT3B*, ktorých $2 - \Delta\Delta Ct$ hodnoty boli veľmi nízke až nedetekovateľné (vid' Graf č. 8).

V našom experimente boli porovnávané expresie pozorovaných génov u pacientov s novo diagnostikovaným mnohopočetným myelómom a pacientov s diagnostikovaným relabujúcim mnohopočetným myelómom.

Porovnaním normalizovaných hodnôt expresií sledovaných génov u vzoriek pacientov s novo diagnostikovaným mnohopočetným myelómom bola zistená hodnota expresie génu *DNMT1*, ktorá sa pohybovala okolo hodnoty 1. Hodnota expresie génu *DNMT3A* bola zvýšená v porovnaní s ostatnými dvomi pozorovanými génmi a hodnota expresie génu *DNMT3B* bola kolísavá (vid' Graf č. 1). Relatívne hodnoty expresií sledovaných génov u vzoriek pacientov s diagnostikovaným relabujúcim mnohopočetným myelómom boli veľmi kolísavé a rozptyl hodnôt bol veľký, čo mohlo byť spôsobené prácou s heterogénnou populáciou buniek zastúpenou vo vzorkách sledovaných pacientov (vid' Graf č. 2). Na expresné analýzy sledovaných génov v skupine pacientov s diagnostikovaným relabujúcim mnohopočetným myelómom boli použité len tri vzorky pacientov, nakoľko zvyšné vzorky (18, 22) neposkytovali detekovateľný výsledok (vid' Tab. č. 11). U myelómových bunkových línii boli pozorované opäť kolísavé hodnoty expresií sledovaných génov, ktorá mohla byť spôsobená bunkovou líniiu fibroblastov HS-5. Fibroblast je zrejme najmenej špecializovanou bunkou zo všetkých spojivových buniek. Z toho vyplýva, že sa môže za určitých podmienok premeniť na jednu z mnohých ďalších spojivových buniek, ako je osteoblast (bunka vytvárajúca kostné tkanivo), adipocyt (tuková bunka) alebo chondrocyty (bunka chrupavky). Z vyššie uvedených dôvodov bola táto líniiu fibroblastov zvolená pre normalizáciu expresie génov DNA metyltransferáz u myelómových bunkových líniiu, pretože pokusy s kultiváciou populácie normálnych B-lymfocytov neboli opakovane úspešné. Použitím RNA z bunkovej líniiu HS-5 odvodenej z transformovaných fibroblastov, ktoré sú na inom vývojom stupni ako B-lymfocyty, boli vypočítané relatívne hodnoty expresie génov a porovnaním s $2 - \Delta\Delta Ct$ hodnotami sa ukázali ako veľmi podobné. Z týchto výsledkov vyplýva, že fibroblasty z líniiu HS-5 môžu slúžiť na normalizáciu myelómových buniek namiesto populácie B-lymfocytov, nakoľko pri kultivácii

B-lymfocytov často nastávajú problémy, čo sa potvrdilo aj počas nášho experimentu. Táto skutočnosť sa však musí ešte overiť, a preto by mohla byť cieľom ďalšieho pozorovania.

Je ale možné, že použitím najmenej špecializovanej bunkovej populácie pre normalizáciu hodnôt expresií sledovaných génov, boli detekované pomerne vysoké úrovne expresie sledovaných DNA metyltransferáz v porovnaní s hodnotami u patientskych vzoriek (viď Graf č. 7).

Pri porovnaní $2 - \Delta\Delta\text{Ct}$ hodnôt expresií pozorovaných génov vzoriek pacientov s novo diagnostikovaným mnohopočetným myelómom bola hodnota expresie génu *DNMT1* vyššia v porovnaní s ostatnými pozorovanými génmi (viď Graf č. 4) (Kruskal-Wallis, p-value = 0,46448), avšak v porovnaní s $2 - \Delta\Delta\text{Ct}$ hodnotami expresií u vzoriek pacientov s diagnostikovaným relabujúcim mnohopočetným myelómom a myelómových bunkových línií sú tieto hodnoty nižšie (viď Graf č. 5 a 8) (Kruskal-Wallis, p-value = 0,04158, $p < 0,05$). Ďalšie štatistické analýzy u vykonávaných expresných analýz nebolo možné vykonať z dôvodu malého počtu patientskych vzoriek v oboch testovaných skupinách.

Pri $2 - \Delta\Delta\text{Ct}$ hodnotách expresií pozorovaných génov vzoriek pacientov s diagnostikovaným relabujúcim mnohopočetným myelómom bol rozdiel v expresiách génov je viac očividný. Hodnoty expresie génu *DNMT1* sú opäť najvyššie (viď Graf č. 5) Tieto hodnoty expresií sú viditeľne vyššie ako hodnoty z grafu č. 4. Získané $2 - \Delta\Delta\text{Ct}$ hodnoty expresií génu *DNMT1* v myelómových bunkových líniách boli opäť najvyššie, avšak $2 - \Delta\Delta\text{Ct}$ hodnoty expresií génov *DNMT3A* a *DNMT3B* boli takmer nedetekovateľné (viď Graf č. 8).

Získané výsledky naznačujú, že pacienti s diagnostikovaným relabujúcim mnohopočetným myelómom, teda s agresívnym typom ochorenia, majú zvýšené hodnoty expresií všetkých troch pozorovaných génov v porovnaní s pacientami s novo diagnostikovaným mnohopočetným myelómom (viď Graf č. 3 a 6). Avšak, relatívne hodnoty expresií génov *DNMT3A* a *DNMT3B* sa blížia k relatívnym hodnotám expresií *DNMT1*, dokonca u $2 - \Delta\Delta\text{Ct}$ hodnôt expresií génov *DNMT3A* a *DNMT3B* sú výrazne nižšie v porovnaní s $2 - \Delta\Delta\text{Ct}$ hodnotami expresií génu *DNMT1*. Znížené hodnoty *de novo* DNA metyltransferáz *DNMT3A* a *DNMT3B* tak môžu byť dôsledkom absolvovanej liečby u skupín pacientov s diagnostikovaným relabujúcim mnohopočetným myelómom.

7 ZÁVER

Cieľom bakalárskej práce bolo porovnať expresný profil DNA metyltransferáz *DNMT1*, *DNMT3A* a *DNMT3B* vo vzorkách pacientov s diagnostikovaným mnohopočetným myelómom a myelómových bunkových línii.

V teoretickej časti bola vypracovaná literárna rešerš zameraná na základnú charakteristiku DNA metyltransferáz, reguláciu ich aktivity a ich funkcie. Druhá časť literárnej rešerše sa týkala ochorenia mnohopočetný myelóm, jeho diagnostiky, štádií ochorenia a možnostiach liečby.

V experimentálnej časti boli vypracované expresné analýzy vzoriek pacientov s diagnostikovaným mnohopočetným myelómom a myelómových bunkových línii. Expresné profily génov *DNMT1*, *DNMT3A* a *DNMT3B* boli stanovené pomocou metódy kvantitatívnej real-time PCR. V rámci týchto experimentov sme zistili, že u pacientov s novo diagnostikovaným mnohopočetným myelómom je zvýšená expresia génu *DNMT3A*, čo môže byť dôležitým diagnostickým markerom u novo diagnostikovaných pacientov s mnohopočetným myelómom. Pacienti s diagnostikovaným relabujúcim mnohopočetným myelómom mali hodnoty expresií génov *DNMT3A* a *DNMT3B* nižšie ako bola hodnota expresie génu *DNMT1* v porovnaní s pacientami s novo diagnostikovaným mnohopočetným myelómom. Znížené hodnoty *de novo* DNA metyltransferáz *DNMT3A* a *DNMT3B* tak môžu byť dôsledkom absolvovanej liečby u tejto skupiny pacientov. Na základe získaných výsledkov môžeme tiež usudzovať, že na normalizáciu myelómových buniek môžu byť použité fibroblasty z línie HS-5 namiesto B-lymfocytov, s ktorými sú často spojené komplikácie pri kultivácii.

8 LITERATURA

Arand, J. et al. *In vivo* control of CpG and non-CpG DNA methylation by DNA methyltransferases. *PLoS Genet.* 8, e1002750 (2012).

Baets, J. et al. Defects of mutant DNMT1 are linked to a spectrum of neurological disorders. *Brain* **138**, 845–861 (2015).

Bashtrykov P, Jankevicius G, Smarandache A, Jurkowska RZ, Ragozin S, Jeltsch A. Specificity of Dnmt1 for methylation of hemimethylated CpG sites resides in its catalytic domain. *Chem Biol.* 2012 May 25;19(5):572-8.

Bergsagel PL, Keuhl WM. Chromosome translocations in multiple myeloma. *Oncogene* 2001;**20**:5611–5622.

Bestor, T., Laudano, A., Mattaliano, R. & Ingram, V. Cloning and sequencing of a cDNA encoding DNA methyltransferase of mouse cells. The carboxyl-terminal domain of the mammalian enzymes is related to bacterial restriction methyltransferases. *J. Mol. Biol.* **203**, 971–983 (1988).

Bostick, M. et al. UHRF1 plays a role in maintaining DNA methylation in mammalian cells. *Science* **317**, 1760–1764 (2007).

Catania, S. et al. Epigenetic maintenance of DNA methylation after evolutionary loss of the *de novo* methyltransferase. Preprint at <http://www.biorxiv.org/content/early/2017/06/13/149385> (2017).

Chen, L. et al. MeCP2 binds to non-CG methylated DNA as neurons mature, influencing transcription and the timing of onset for Rett syndrome. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **112**, 5509–5514 (2015).

Chen, T., Ueda, Y., Dodge, J. E., Wang, Z. & Li, E. Establishment and maintenance of genomic methylation patterns in mouse embryonic stem cells by Dnmt3a and Dnmt3b. *Mol. Cell. Biol.* **23**, 5594–5605 (2003).

Di Ruscio, A. et al. DNMT1-interacting RNAs block gene-specific DNA methylation. *Nature* **503**, 371–376 (2013).

Fonseca R, Bailey RJ, Ahmann GJ, et al. Genomic abnormalities in monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Blood* 2002;**100**:1417–1424.

Gabel, H. W. et al. Disruption of DNA-methylation-dependent long gene repression in Rett syndrome. *Nature* **522**, 89–93 (2015).

Gifford, C. A. et al. Transcriptional and epigenetic dynamics during specification of human embryonic stem cells. *Cell* **153**, 1149–1163 (2013).

Goll, M. G. et al. Methylation of tRNA^{Asp} by the DNA methyltransferase homolog Dnmt2. *Science* **311**, 395–398 (2006).

Hansen, R. S. et al. The *DNMT3B* DNA methyltransferase gene is mutated in the ICF immunodeficiency syndrome. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **96**, 14412–14417 (1999).

Huff, J. T. & Zilberman, D. Dnmt1-independent CG methylation contributes to nucleosome positioning in diverse eukaryotes. *Cell* **156**, 1286–1297 (2014).

Jia, D., Jurkowska, R. Z., Zhang, X., Jeltsch, A. & Cheng, X. Structure of Dnmt3a bound to Dnmt3L suggests a model for *de novo* DNA methylation. *Nature* **449**, 248–251 (2007).

Jones PA. DNA methylation and cancer, *Cancer Res.*, 1986, vol. 46

Katzmann JA, Disperzner A, Kyle R, et al. Elimination of the need for urine studies in the screening algorithm for monoclonal gammopathies by using serum immunofixation and free light chain assays. *Mayo Clin Proc* 2006;**81**:1575–1110.

Keown, C. L. et al. Allele-specific non-CG DNA methylation marks domains of active chromatin in female mouse brain. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **114**, E2882–E2890 (2017).

Klein, C. J. et al. Mutations in DNMT1 cause hereditary sensory neuropathy with dementia and hearing loss. *Nat. Genet.* **43**, 595–600 (2011).

Kuehl EM, Bergsagel PL. Multiple myeloma: Evolving genetic events and host interactions. *Nat Rev Cancer* 2002;**2**:175–187.

Kumar S, Fonseca R, Ketterling RP, et al. Trisomies in multiple myeloma: Impact on survival in patients with high-risk cytogenetics. *Blood* 2012;**119**:2100–2105.

Kumar SK, Mikhael JR, Buadi FK, et al. Management of newly diagnosed symptomatic multiple myeloma: Updated mayo stratification of myeloma and risk-adapted therapy (msmart) consensus guidelines. *Mayo Clin Proc* 2009;**84**:1095–1110.

Kyle RA, Gertz MA, Witzig TE, et al. Review of 1, 027 patients with newly diagnosed multiple myeloma. *Mayo Clinic Proc* 2003;**78**:21–33.

Landgren O, Kyle RA, Pfeiffer RM, Katzmann JA, Caporaso NE, Hayes RB, Disperzner A, Kumar S, Clark RJ, Baris D, Hoover R, Rajkumar SV. Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) consistently precedes multiple myeloma: a prospective study. *Blood*. 2009 May 28

Law, J. A. & Jacobsen, S. E. Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals. *Nat. Rev. Genet.* **11**, 204–220 (2010).

Lei, H. et al. *De novo* DNA cytosine methyltransferase activities in mouse embryonic stem cells. *Development* **122**, 3195–3205 (1996).

Ley, T. J. et al. DNMT3A mutations in acute myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.* **363**, 2424–2433 (2010).

Li E. Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development. *Nat Rev Genet.* 2002 Sep;3(9):662–673.

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

Li S, et al. DNA hypomethylation and imbalanced expression of DNA methyltransferases (DNMT1, 3A, and 3B) in human uterine leiomyoma, *Gynecol. Oncol.*, 2003, vol. 90

Liao, J. et al. Targeted disruption of DNMT1, DNMT3A and DNMT3B in human embryonic stem cells. *Nat. Genet.* **47**, 469–478 (2015).

Lister, R. et al. Global epigenomic reconfiguration during mammalian brain development. *Science* **341**, 1237905 (2013).

Lyko, F. The DNA methyltransferase family: a versatile toolkit for epigenetic regulation. *Nat Rev Genet* **19**, 81–92 (2018).

Mateos M-V, Hernández M-T, Giraldo P, et al. Lenalidomide plus dexamethasone for high-risk smoldering multiple myeloma. *N Engl J Med* 2013;**369**:438–447.

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

Ooi, S. K. et al. DNMT3L connects unmethylated lysine 4 of histone H3 to *de novo* methylation of DNA. *Nature* **448**, 714–717 (2007).

Palumbo A, et al. *J Clin Oncol*;2015;33:2863–2869.

Ponger, L. & Li, W. H. Evolutionary diversification of DNA methyltransferases in eukaryotic genomes. *Mol. Biol. Evol.* **22**, 1119–1128 (2005).

Posfai, J., Bhagwat, A. S., Posfai, G. & Roberts, R. J. Predictive motifs derived from cytosine methyltransferases. *Nucleic Acids Res.* **17**, 2421–2435 (1989).

Raddatz, G., Gao, Q., Bender, S., Jaenisch, R. & Lyko, F. Dnmt3a protects active chromosome domains against cancer-associated hypomethylation. *PLoS Genet.* **8**, e1003146 (2012).

Rajan AM, Rajkumar SV. Interpretation of cytogenetic results in multiple myeloma for clinical practice. *Blood Cancer J* 2015;**5**:e365.

Rajkumar SV. MGUS and smoldering multiple myeloma: update on pathogenesis, natural history, and management. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2005:340-5

Rajkumar SV, Dimopoulos MA, Palumbo A, Blade J, Merlini G, Mateos MV, Kumar S, Hillengass J, Kastiris E, Richardson P, Landgren O, Paiva B, Dispenzieri A, Weiss B, LeLeu X, Zweegman S, Lonial S, Rosinol L, Zamagni E, Jagannath S, Sezer O, Kristinsson SY, Caers J, Usmani SZ, Lahuerta JJ, Johnsen HE, Beksac M, Cavo M, Goldschmidt H, Terpos E, Kyle RA, Anderson KC, Durie BG, Miguel JF. International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. *Lancet Oncol*. 2014 Nov;**15**(12):e538-48.

Roodman GD. Pathogenesis of myeloma bone disease. *Leukemia* 2009;**23**:435–441.

Rountree, M. R., Bachman, K. E. & Baylin, S. B. DNMT1 binds HDAC2 and a new co-repressor, DMAP1, to form a complex at replication foci. *Nat. Genet.* **25**, 269–277 (2000).

Russel SJ, Rajkumar SV. Multiple myeloma and the road to personalised medicine. *Lancet Oncol* 2011;**12**:617–619.

Seidl S, Kaufmann H, Drach J. New insights into the pathophysiology of multiple myeloma. *Lancet Oncol* 2003;**4**:557–564.

Sharif, J. et al. The SRA protein Np95 mediates epigenetic inheritance by recruiting Dnmt1 to methylated DNA. *Nature* **450**, 908–912 (2007).

Tsumura, A. et al. Maintenance of self-renewal ability of mouse embryonic stem cells in the absence of DNA methyltransferases Dnmt1, Dnmt3a and Dnmt3b. *Genes Cells* **11**, 805–814 (2006).

Thijssen, P. E. et al. Mutations in CDCA7 and HELLS cause immunodeficiency-centromeric instability-facial anomalies syndrome. *Nat. Commun.* **6**, 7870 (2015).

Tatton-Brown, K. et al. Mutations in the DNA methyltransferase gene DNMT3A cause an overgrowth syndrome with intellectual disability. *Nat. Genet.* **46**, 385–388 (2014).

Valentina Bollati, Sonia Fabris, Valeria Pegoraro, Domenica Ronchetti, Laura Mosca, Giorgio Lambertenghi Delilieri, Valeria Motta, Pier Alberto Bertazzi, Andrea Baccarelli, Antonino Neri, Differential repetitive DNA methylation in multiple myeloma molecular subgroups, *Carcinogenesis*, Volume 30, Issue 8, August 2009

Vu T, Gonsalves W, Kumar S, et al. Characteristics of exceptional responders to lenalidomide-based therapy in multiple myeloma. *Blood Cancer J* 2015;**5**:e363.

Wu, J. C. & Santi, D. V. On the mechanism and inhibition of DNA cytosine methyltransferases. *Prog. Clin. Biol. Res.* **198**, 119–129 (1985).

Wu, H. et al. Converging disease genes in ICF syndrome: ZBTB24 controls expression of CDCA7 in mammals. *Hum. Mol. Genet.* **25**, 4041–4051 (2016).

Xie, W. et al. Epigenomic analysis of multilineage differentiation of human embryonic stem cells. *Cell* **153**, 1134–1148 (2013).

Xu, G. L. et al. Chromosome instability and immunodeficiency syndrome caused by mutations in a DNA methyltransferase gene. *Nature* **402**, 187–191 (1999).