

Univerzita Palackého v Olomouci

Diplomová práce

Olomouc 2022

Bc. Michaela Němcová

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Úloha transkripčních faktorů Sp1 a Sp3
v aktivním demetylačním procesu u buněk
mnohočetného myelomu**

Diplomová práce

Bc. Michaela Němcová

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2022

Vedoucí práce: Ing. Kateřina Smešný Trtková, CSc.

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Akademický rok: 2020/2021

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: Bc. Michaela NĚMCOVÁ
Osobní číslo: R200530
Studijní program: N1501 Biologie
Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie
Téma práce: Úloha transkripčních faktorů Sp1 a Sp3 v aktivním demetylačním procesu u buněk mnohočetného myelomu
Zadávací katedra: Katedra buněčné biologie a genetiky

Zásady pro vypracování

1. Zpracování literární rešerše na zadané téma;
2. Izolace RNA a DNA z myelomových buněčných linií ovlivněných demetylačními činidly, a sortovaných buněčných populací pacientů s mnohočetným myelomem;
3. Příprava cDNA a následná expresní analýza genů demetylačních proteinů TET;
4. Chromatinová imunoprecipitace transkripčními faktory Sp1 a Sp3, a kvantifikace jejich komplexů s TET proteiny metodou kvantitativní RT-PCR
5. Stanovení metylačního (5-mC) a hydroxymetylačního (5-hmC) stavu analyzovaných úseků genů TET

Rozsah pracovní zprávy:

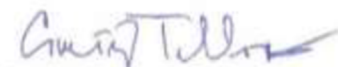
Rozsah grafických prací:

Forma zpracování diplomové práce: tištěná

Seznam doporučené literatury:

1. Li L, Davie JR. The role of Sp1 and Sp3 in normal and cancer cell biology. *Ann Anat.* 2010 Sep 20;192(5):275-83. doi: 10.1016/j.aanat.2010.07.010. Epub 2010 Aug 6. PMID: 20810260
2. Lou Z, Maher VM, McCormick JJ. Identification of the promoter of human transcription factor Sp3 and evidence of the role of factors Sp1 and Sp3 in the expression of Sp3 protein. *Gene.* 2005 May 23;351:51-9. doi: 10.1016/j.gene.2005.02.007. Epub 2005 Apr 25. PMID: 15857802
3. Li L, He S, Sun JM, Davie JR. Gene regulation by Sp1 and Sp3. *Biochem Cell Biol.* 2004 Aug;82(4):460-71. doi: 10.1139/o04-045. PMID: 15284899
4. Fulcinitti M, Amin S, Nanjappa P, Rodig S, Prabhala R, Li C, Minvielle S, Tai YT, Tassone P, Avet-Loiseau H, Hideshima T, Anderson KC, Munshi NC. Significant biological role of sp1 transactivation in multiple myeloma. *Clin Cancer Res.* 2011 Oct 15;17(20):6500-9. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-11-1036. Epub 2011 Aug 19. PMID: 21856768; PMCID: PMC4318245
5. Taylor SE, Smeriglio P, Dhulipala L, Rath M, Bhutani N. A global increase in 5-hydroxymethylcytosine levels marks osteoarthritic chondrocytes. *Arthritis Rheumatol.* 2014 Jan;66(1):90-100. doi: 10.1002/art.38200. PMID: 24449578
6. Wang P, Yan Y, Yu W, Zhang H. Role of ten-eleven translocation proteins and 5-hydroxymethylcytosine in hepatocellular carcinoma. *Cell Prolif.* 2019 Jul;52(4):e12626. doi: 10.1111/cpr.12626. Epub 2019 Apr 29. PMID: 31033072; PMCID: PMC6668972

Vedoucí diplomové práce:



Ing. Kateřina Smešný Trtková, CSc.

Ústav klinické a molekulární patologie

Oponent diplomové práce: **Mgr. Jiří Voller, Ph.D.**
Ústav molekulární a translační medicíny

Datum zadání diplomové práce: **2. listopadu 2020**

Termín odevzdání diplomové práce: **31. července 2022**

L.S.

doc. RNDr. Martin Kubala, Ph.D.
děkan

prof. RNDr. Zdeněk Dvořák, DrSc.
vedoucí katedry

V Olomouci dne 2. listopadu 2020

Bibliografické údaje

Jméno a příjmení: Bc. Michaela Němcová

Název práce: Úloha transkripčních faktorů Sp1 a Sp3 v aktivním demetylačním procesu u buněk mnohočetného myelomu

Typ práce: Diplomová

Pracoviště: Katedra buněčné biologie a genetiky

Vedoucí práce: Ing. Kateřina Smešný Trtková, CSc.

Rok obhajoby práce: 2022

Klíčová slova: Mnohočetný myelom, proteiny TET, metylace, hydroxymetylce, transkripční faktory

Počet stran: 55

Počet příloh: 0

Jazyk: čeština

Souhrn

Diplomová práce charakterizuje transkripční faktory Sp1 a Sp3 se zaměřením na jejich dosud nepopsanou úlohu v aktivním demetylačním procesu u buněk mnohočetného myelomu. Teoretická část nejprve shrnuje obecné poznatky o mnohočetném myelomu se zaměřením na projevy onemocnění a diagnostiku. Charakterizuje enzymy TET (*Ten-eleven* translocation) a detailněji zpracovává část věnovanou transkripčním faktorům Sp1 a Sp3 s důrazem na jejich strukturu, úlohu v procesech regulace transkripce genů, a posttranskripční modifikace. Experimentální část je zaměřena na expresní a metylační analýzy myelomových buněčných linií KMS12-PE a KMS12-BM ovlivněných demetylačními činidly, a nesortované populace buněk získané z aspirátu kostní dřeně pacientů monoklonální gamapatie nejasného významu a nově diagnostikovaných pacientů mnohočetného myelomu.

Pomocí imunoprecipitační analýzy bylo zjištěno, že u myelomových linií se transkripční faktor Sp1 po ovlivnění demetylačními činidly váže do promotorové sekvence genu *TET1*, zatímco vazba Sp3 na promotorový úsek sledovaných genů *TET* nebyla prokázána. Metylační změny byly nejčastěji detekovány v oblastech promotorů genů *TET2* a *TET3*, a to jak u myelomových linií po ovlivnění demetylačními činidly, tak u patientských vzorků. Signifikantní zvýšení exprese však bylo pozorováno u ovlivněných myelomových linií pouze v případě genu *TET2*. U vzorků MGUS byly hodnoty relativní exprese vyšší než hodnota 1,000 pozorovány u všech genů *TET*, a to i přes to, že v těchto případech byla detekovaná metylace CCGG ve sledovaných promotorových sekvencích.

Biobibliographical identification

Author's first name and surname: Bc. Michaela Němcová

Title: The role of transcription factors Sp1 and Sp3 in the active demethylation process of multiple myeloma cells

Type of thesis: Master

Department: Department of cell biology and genetics

Supervisor: Ing. Kateřina Smešný Trtková, CSc.

The year of presentation: 2022

Keywords: Multiple myeloma, TET proteins, methylation, hydroxymethylation, transcription factors

Number of pages: 55

Number of appendices: 0

Language: czech

Summary

This thesis characterizes the transcription factors Sp1 and Sp3, focusing on their role in the active demethylation process in multiple myeloma cells. The theoretical part summarizes information about multiple myeloma with a focus on disease manifestations and diagnosis. It characterizes TET enzymes and in detail focuses on transcription factors Sp1 and Sp3 with an emphasis on their structure, role in gene expression, and posttranscription modification. Myeloma cell lines KMS12-PE and KMS12-BM, and unsorted cell populations of multiple myeloma and monoclonal gammopathy of undetermined significance patients were analyzed.

The experimental part is focused on the still undescribed role of both transcription factors Sp1 and Sp3 in the active demethylation process in multiple myeloma cells, as well as determination of methylation and hydroxymethylation changes in the promoter regions of *TET1*, *TET2* and *TET3* genes. The results of ChIP analysis indicate that after treatment of the myeloma cells with demethylation agents, Sp1 binds to the promoter of *TET1*, while Sp3 binding to the *TET1* has not been found. Methylation changes were mostly detected in the promoters of *TET2* and *TET3* genes in both, treated cell lines and patient samples. On the contrary, in treated cell lines a significant increase in expression was detected only in case of *TET2*. An increase in relative expression was detected in some MGUS samples for all *TET* genes, despite the detecting of methylation changes in the analyzed promoters.

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

V Olomouci.....

.....

Bc. Michaela Němcová

Poděkování:

Tímto bych ráda poděkovala Ing. Kateřině Smešný Trtkové, CSc. za odborný dohled a vedení, cenné rady a čas, který mi během zpracování této diplomové práce věnovala. Dále bych ráda poděkovala zaměstnancům laboratoře molekulární patologie za vstřícný přístup při vykonávání praktické části této diplomové práce, a všem lidem, kteří mi byli oporou.

Obsah

1	Úvod.....	1
2	Cíle práce.....	2
3	Teoretický úvod.....	3
3.1	Charakteristika a diagnostika mnohočetného myelomu	3
3.1.1	Prognóza a léčba.....	4
3.2	TET proteiny a aktivní demethylace	7
3.2.1	DNA metylace a demetylační úloha TET enzymů	7
3.2.2	Obecná charakteristika TET enzymů	8
3.2.3	Struktura TET enzymů	9
3.2.4	TET1.....	9
3.2.5	TET2.....	9
3.2.6	TET3.....	9
3.3	Transkripční faktory Sp1 a Sp3	10
3.3.1	Struktura transkripčních faktorů Sp1 a Sp3.....	10
3.3.2	Funkční role Sp1 a Sp3.....	11
3.3.3	Sp1 a Sp3 modifikace.....	12
4	Materiál a metody.....	14
4.1	Biologický materiál	14
4.2	Použité chemikálie, soupravy a roztoky	14
4.3	Chromatinová imunoprecipitace.....	18
4.3.1	Kultivace buněčných linií a jejich ovlivnění demetylačními činidly	18
4.3.2	Izolace chromatinového lyzátu z ovlivněných buněk.....	18
4.3.3	Sonikace buněčných lyzátů	19
4.3.4	Stanovení koncentrace proteinů pomocí metody Bradfordové	19
4.3.5	Chromatin imunoprecipitační analýza s použitím Anti Sp1 a Sp3 protilátek.....	20
4.3.6	Purifikace a izolace DNA.....	21
4.3.7	Amplifikace imunoprecipitované DNA pomocí Real-Time PCR.....	21
4.4	Lokální metylační a hydroxymetylační analýza	23
4.4.1	Izolace genomové DNA z nesortované populace buněk aspirátu kostní dřeně.....	23
4.4.2	Izolace genomové DNA z buněk myelomových linií KMS12-PE a KMS12-BM ovlivněných demetylačními činidly	24
4.4.3	Stanovení hladiny 5-methylcytosinu a 5-hydroxymethylcytosinu	24
4.5	Expresní analýza genů TET.....	27
4.5.1	Izolace RNA z buněk myelomových linií KMS12-PE a KMS12-BM ovlivněných demetylačními činidly (a z nesortované populace buněk aspirátu kostní dřeně)	27
4.5.2	Reverzní transkripce (RT-PCR)	28

4.5.3	Kvantitativní RT-PCR	29
5	Výsledky.....	31
5.1	Zastoupení genů TET v komplexu s transkripčními faktory Sp1 a Sp3	31
5.2	Stanovení procentického zastoupení 5-mC a 5-hmC v promotoru genů <i>TET1</i> , <i>TET2</i> a <i>TET3</i>	34
5.3	Expresní profil genů <i>TET1</i> , <i>TET2</i> a <i>TET3</i> po ovlivnění demetylačními činidly	36
5.4	Porovnání procentuálního zastoupení 5-mC a 5-hmC v promotoru genů <i>TET1</i> , <i>TET2</i> a <i>TET3</i> s jejich expresí u patientských vzorků	38
6	Diskuze.....	42
7	Závěr.....	45
8	Literatura	47

Seznam symbolů a zkratk

AZA - Azacytidin

CA - chromozomální abnormalita

CpG - fosfodiesterová vazba mezi cytosinem a guaninem

CRAB - souhrné označení pro projevy mnohočetného myelomu (hyperkalcémie, selhání ledvin, anémie, kostní změny)

CT - výpočetní tomografie

DAC - Decitabin

DMSO - dimethylsulfoxid

DNMT - DNA metyltransferáza

FISH - fluorescenční in situ hybridizace

Ig - imunoglobuliny typu G, A, M, E, D

ISS - International Staging System

MGUS - Monoklonální gamapatie nejasného významu

MM - mnohočetný myelom

PBS - fosfátový pufr

PET-CT - Pozitronová emisní tomografie

TET enzymy - „Ten-eleven“ translokační proteiny

Seznam obrázků

Obrázek 1: Schéma demetylace DNA zprostředkované TET enzymy (převzato: Wu a Zhang, 2017).	8
Obrázek 2: Relativní hodnoty zastoupení promotorového úseku TET1 v komplexu s transkripčním faktorem Sp1 u myelomových buněk linie KMS12-PE v porovnání s kontrolním IgG.	32
Obrázek 3: Relativní hodnoty zastoupení promotorového úseku TET2 v komplexu s transkripčním faktorem Sp1 u myelomových buněk linie KMS12-PE v porovnání s kontrolním IgG.	32
Obrázek 4: Relativní hodnoty zastoupení promotorového úseku TET3 v komplexu s transkripčním faktorem Sp1 u myelomových buněk linie KMS12-PE v porovnání s kontrolním IgG.	33
Obrázek 5: Relativní hodnoty zastoupení promotorového úseku TET1 v komplexu s transkripčním faktorem Sp3 u myelomových buněk linie KMS12-PE v porovnání s kontrolním IgG.	33
Obrázek 6: Relativní hodnoty zastoupení promotorového úseku TET2 v komplexu s transkripčním faktorem Sp3 u myelomových buněk linie KMS12-PE v porovnání s kontrolním IgG.	33
Obrázek 7: Relativní hodnoty zastoupení promotorového úseku TET3 v komplexu s transkripčním faktorem Sp3 u myelomových buněk linie KMS12-PE v porovnání s kontrolním IgG.	34
Obrázek 8: Porovnání normalizovaných hodnot exprese genu TET1, TET2 a TET3 s procentickými hodnotami 5-mC a 5-hmC stanovených v CCGG sekvenci jejich promotorových úseků u pacientů MGUS a nově diagnostikovaných pacientů MM (nesortovaná buněčná populace).....	40
Obrázek 9: Porovnání normalizovaných hodnot exprese genu TET2 s procentickými hodnotami 5-mC a 5-hmC stanovených v CCGG sekvenci jejich promotorových úseků u pacientů MGUS a nově diagnostikovaných pacientů MM (nesortovaná buněčná populace).....	41
Obrázek 10: Porovnání normalizovaných hodnot exprese genu TET3 s procentickými hodnotami 5-mC a 5-hmC stanovených v CCGG sekvenci jejich promotorových úseků u pacientů MGUS a nově diagnostikovaných pacientů MM (nesortovaná buněčná populace).....	41

Seznam tabulek

Tabulka 1: Hodnocení faktorů rizik pro mnohočetný myelom (" <i>International Staging System</i> "); (přejato: Palumbo a kol., 2015)	5
Tabulka 2: Složení reakční směsi PCR pro amplifikaci precipitované DNA za použití primerů specifických pro promotorovou oblast genů <i>TET1</i> , <i>TET2</i> a <i>TET3</i>	22
Tabulka 3: Teplotní profil RT-PCR pro amplifikaci imunoprecipitované DNA cílené na promotorové oblasti genů <i>TET1</i> , <i>TET2</i> a <i>TET3</i>	22
Tabulka 4: Složení reakční směsi pro glukosylační reakci DNA	25
Tabulka 5: Schéma pro restriční štěpení glukosylované DNA	26
Tabulka 6: Sekvence primerů specifických pro promotorové oblasti genů <i>TET1</i> , <i>TET2</i> , a <i>TET3</i>	26
Tabulka 7: Složení reakční směsi PCR pro amplifikaci úseku glukosylované DNA za použití primerů specifických pro promotorové oblasti genů <i>TET1</i> , <i>TET2</i> a <i>TET3</i>	26
Tabulka 8: Teplotní profil Real Time PCR pro stanovení hladin metylace a hydroxymethylace promotorových sekvencí genů <i>TET1</i> , <i>TET2</i> a <i>TET3</i>	27
Tabulka 9: Složení reakční směsi pro reverzní transkripci vzorků RNA izolované z ovlivněných buněk myelomových linií (nebo nesortované buněčné populace získané od pacientů MGUS a MM (aspiráty kostní dřeně))	29
Tabulka 10: Složení reakční směsi qPCR pro expresní analýzu genů <i>TET1</i> , <i>TET2</i> a <i>TET3</i> u primerů specifických pro promotorové sekvence těchto genů	30
Tabulka 11: Teplotní profil qPCR pro stanovení exprese genů <i>TET1</i> , <i>TET2</i> a <i>TET3</i>	30
Tabulka 12: Výchozí hodnoty pro procentuální výpočet 5-mC a 5-hmC v promotorovém úseku genu <i>TET2</i> o velikosti 236 bp u vzorku M24 (nově diagnostikovaný pacient MM) a vzorku M31 (MGUS). DNA byla izolovaná z buněk nesortované populace	35
Tabulka 13: Porovnání poměru procentuálního zastoupení 5-mC a 5-hmC analyzovaných promotorových sekvencí genů <i>TET</i> , <i>TET2</i> a <i>TET3</i> mezi liniemi KMS12-PE a KMS12-BM ovlivněnými demetylačními činidly	36
Tabulka 14: Expresní profil genů <i>TET1</i> , <i>TET2</i> a <i>TET3</i> u buněk myelomových linií KMS12-PE a KMS12-BM po ovlivnění DAC ($0,5 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a $0,2 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) a AZA ($0,5 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a $0,2 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$). Statistická významnost byla stanovena pomocí nepárového Studentova t-testu s Bonferroniho korekcí. *P < 0,05, **P < 0,01; ***P < 0,001.	37

Tabulka 15: Expresní profil genů *TET1*, *TET2* a *TET3* u myelomových linií KMS12-PE a KMS12-BM po ovlivnění DAC ($0,5 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a $0,2 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) a AZA ($0,5 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a $0,2 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) za použití primerů cílených na promotorové oblasti genů. Statistická významnost byla stanovena pomocí nepárového Studentova t-testu s Bonferroniho korekcí. *P <0,05, **P <0,01; ***P <0,001. 38

Tabulka 16: Porovnání procentuálního zastoupení 5-mC a 5-hmC analyzovaných promotorových sekvencí genů *TET1*, *TET2* a *TET3* mezi pacienty MGUS a nově diagnostikovanými pacienty MM (nesortovaná buněčná populace). 39

Tabulka 17: Porovnání relativních genových expresí *TET1*, *TET2* a *TET3* mezi pacienty MGUS a nově diagnostikovanými pacienty MM (nesortovaná buněčná populace). 40

1 Úvod

Mnohočetný myelom je zhoubné onemocnění plasmatických buněk a tvoří více než 10 % hematologických malignit a je charakterický přítomností tzv. M-proteinu v krvi. U pacientů dochází v důsledku poruchy proliferace plasmatických buněk a přebytečného množství M-proteinu k orgánovému poškození, a to především kostí, ledvin a CNS. Charakteristické projevy onemocnění jsou dle „*International Myeloma Working Group*“ označovány jako CRAB (hyperkalcémie, selhání ledvin, anémie, kostní změny). Onemocnění je zatím neléčitelné, díky výraznému pokroku v terapii se však za poslední roky prodloužila délka přežití pacientů, a terapie se soustředí na zmírňování projevů.

Proteiny TET (*Ten-eleven translocation enzymes*) jsou enzymy zprostředkovávající konverzi 5-metylcytosinu (5-mC) na 5-hydroxymetylcytosin (5-hmC) a jeho další oxidaci na 5-formylcytosin (5-fC) a 5-karboxylcytosin (5-caC), tedy proces aktivní demethylace. Metylace cytosinů v rámci CpG ostrůvků promotorů genů bývá spojována s inhibicí transkripce příslušných genů. Při studii exprese genů tedy hraje procentické zastoupení 5-mC a 5-hmC v promotorových oblastech důležitou roli.

Transkripční faktory Sp1 a Sp3 hrají klíčovou roli v expresi genů zapojených do řady buněčných procesů včetně onkogeneze. Svou vazbou do promotorových oblastí jsou schopny regulace exprese jak v pozitivním, tak i v negativním smyslu, a jejich zvýšené hladiny byly detekovány u několika typů nádorových onemocnění. Jejich vliv na regulaci exprese genů *TET* u buněk mnohočetného myelomu však zatím nebyl popsán.

2 Cíle práce

- Zpracování literární rešerše na zadané téma.
- Izolace RNA a DNA z myelomových buněčných linií ovlivněných demetylačními činidly, a sortovaných buněčných populací pacientů s mnohočetným myelomem.
- Příprava cDNA a následná expresní analýza genů demetylačních proteinů TET.
- Chromatinová imunoprecipitace transkripčními faktory Sp1 a Sp3, a kvantifikace jejich komplexů s TET proteiny metodou kvantitativní RT-PCR.
- Stanovení metylačního (5-mC) a hydroxymetylačního (5-hmC) stavu analyzovaných úseků genů TET.

3 Teoretický úvod

3.1 Charakteristika a diagnostika mnohočetného myelomu

Mnohočetný myelom (MM), dříve také nazývaný jako Kahlerova nemoc, nebo pak v anglické literatuře označovaný jako „plasma cell myeloma“, je zhoubné onemocnění kostní dřeně. Jedná se o multifokální neoplastickou proliferaci plazmatických buněk, obvykle asociovanou s přítomností monoklonálního imunoglobulinu (M-protein) v séru, případně moči, a poškozením orgánů způsobeným následky poruchy produkce plazmatických buněk (Swerdlow a kol., 2017). Plazmatické buňky jsou konečným diferenciačním stádiem B-lymfocytů, které vznikají po té, co se setkají s cílovými antigeny, a mají schopnost tvorby protilátek (Penka a kol., 2011).

Mnohočetný myelom tvoří asi 1 % všech typů malignit a více než 10 % hematologických malignit. V roce 2019 bylo celosvětově zaznamenáno 155 688 nově diagnostikovaných případů mnohočetného myelomu, přičemž 54,3 % z nich tvořili muži. V porovnání s daty z roku 1990 se tak počet nově diagnostikovaných zvýšil z původních 65 940 případů 1,36x. Stoupající trend je také pozorován v počtu úmrtí pacientů MM, který v roce 1990 činil 51 862, zatímco statistiky z roku 2019 uvádějí až 113 474 případů ročních úmrtí celosvětově. Vzrůst incidence mnohočetného myelomu je přisuzován stárnutí populace, zatímco snižující se počet úmrtí je spojován s rozvojem diagnostických a terapeutických metod (Zhou a kol., 2021). Míra výskytu tohoto onemocnění je nejvyšší v oblastech Severní Ameriky, Austrálie, Nového Zélandu a západní Evropy, naopak nejméně případů bylo zaznamenáno v Asii (Ferlay a kol., 2012). Česká Republika se řadí mezi země se středním výskytem tohoto onemocnění (na základě dat z roku 2014), kdy incidence čítá 4,8 nově diagnostikovaných případů na 100 000 obyvatel (Malušková a kol., 2017). Medián věku, ve kterém je mnohočetný myelom diagnostikován, je přibližně 70 let; 37 % procent pacientů je starších 65 let, 26 % se nachází mezi 65–74 lety a 37 % pacientů je starších 75 let. Výskyt této nemoci u jedinců mladších 30 let je extrémně vzácný (Palumbo a Anderson, 2011).

Jasně příčiny vzniku mnohočetného myelomu jsou prozatím neznámé. Zvýšená četnost výskytu tohoto onemocnění je však spojována s expozicí jedinců specifickým toxickým látkám jako jsou dioxiny, činidlo Orange (Bumma a kol. 2020), radiace nebo obezita. Jak naznačují statistiky, mnohočetným myelomem trpí častěji muži než ženy. Zvýšené riziko vzniku MM je pozorováno u africké či afroamerické populace s incidencí 14 případů na 100 000 obyvatel (Lewis a kol., 1963; Linet a kol., 1987; Pesatori a kol., 2009; Birman a kol., 2017).

Základními kritérii pro diagnostiku mnohočetného myelomu dle *International Myeloma Working Group* jsou biopsie nebo stanovení procentuálního zastoupení klonálních plazmatických buněk v kostní dřeni jako ≥ 10 %. Dalšími kritérii je jedna nebo více z následujících charakteristik: hyperkalcémie (hladina vápníku v séru o více než 0,25 mmol/l vyšší než normální horní hranice nebo vyšší než 2,75 mmol/l); renální insuficience (odbourávání kreatininu < 40 ml/min, nebo hladina sérového kreatininu > 177 μ mol/l); anémie (hodnota hemoglobinu více než 20 g/l pod normální dolní

hranici, nebo jeho hladina < 100 g/l); kostní léze (přítomnost jedné nebo více osteolytických lézí prokazatelná radiografií, CT, PET-CT); klonální zastoupení plazmatických buněk kostní dřeni vyšší nebo rovno 60 %; podíl volného lehkého řetězce v séru vyšší nebo roven 100; více než jedna detekovaná ohnisková léze na MRI. Tyto charakteristické projevy jsou souhrnně označovány jako CRAB (Rajkumar a kol., 2014).

Téměř u všech pacientů mnohočetného myelomu se onemocnění nejdříve projevuje jako monoklonální gamapatie nejasného významu (*Monoclonal gammopathy of undetermined significance* – MGUS). Diagnostika MGUS je založena na detekci přítomnosti monoklonálního M-proteinu v séru nebo moči pacienta, avšak zároveň nedochází ke splnění diagnostických kritérií mnohočetného myelomu (Kyle a kol., (2005). Tento stav se tedy vyznačuje absencí příznaků a pomalou klonální a nezhoubnou proliferací plazmatických buněk produkujících M protein, který má ale maligní potenciál (Krizalkovicová a kol., 2008). Mezi rizikové faktory MGUS se řadí vyšší věk, mužské pohlaví, černošská populace nebo historie MGUS a příbuzných onemocnění v rodině (Kyle a kol., 2006; Landgren a kol., 2007; Landgren a kol., 2009).

Počáteční období onemocnění může být zcela asymptomatické a k diagnóze dochází až po detailnější prohlídce na základě zvýšené krevní sedimentace. Obecně se však jako klinické příznaky uvádějí bolest kostí, převážně pak páteře, snížená obranyschopnost – opakující se komplikované záněty – únava a krvácení. Častá je také přítomnost hyperkalcémie a snížená funkce ledvin. Typické je postižení zejména dlouhých kostí, lebky a páteře, kde dochází ke kompresním zlomeninám obratlů (Hájek a kol., 2011).

Plazmatické buňky proliferují v kostní dřeni a rozšiřují se do kostní tkáně, což způsobuje její destrukci vedoucí k bolesti kostí a jejich frakturám. Plazmatické buňky také mohou proliferovat do řady orgánů, které poškozují. Zvýšená produkce monoklonálního proteinu (M-proteinu) může vést k selhání ledvin jako důsledek přítomnosti Bence Jones bílkoviny v moči, nebo hyperviskozity, způsobené přebytečným množstvím M-proteinu v krvi a jeho hromadění v ledvinných tubulech (Kyle a kol., 2003).

Mnohočetný myelom ve velmi vzácných případech napadá i CNS, jedná se však o méně než 1 % pacientů MM. Nejčastější cytogenetické anomálie jsou v těchto případech delece na 13q a 17p (Jurczyszyn a kol., 2016).

3.1.1 Prognóza a léčba

Prognóza je stanovena na základě algoritmu, tzv. „*International Staging System*“, kombinujícího detekované hladiny specifických biomarkerů a genetických rizik (viz Délka přežití pacientů od doby diagnózy onemocnění se v posledních letech značně prodloužila, především díky výraznému pokroku v terapii. Před rokem 2000 se medián délky přežití blížil 30 měsícům (Bergsagel, 1988) Nejnovější data získaná na základě studie 1000 pacientů, kteří mezi roky 2007 a 2016

podstoupili léčbu, uvádějí medián celkového přežití 126,6 měsíců od doby diagnózy onemocnění (Joseph a kol., 2020).

Tabulka 1). Na základě naměřených hodnot a přítomnosti chromozomálních abnormalit jsou pacienti rozděleni do tří skupin závažnosti prognózy (Palumbo a kol., 2015).

Genetická analýza maligních plazmatických buněk pacientů může být použita k identifikaci genetických faktorů onemocnění, a následné stratifikaci rizik s nimi spojených. K těmto účelům se využívá metody FISH (Fluorescenční *in situ* hybridizace), která je založena na specifické vazbě fluorescenční sondy k analyzovaným oblastem chromozomů myelomových buněk. Tato metoda je však limitující z důvodu neexistence jednotného standardizovaného panelu sond. Stanovení karyotypu je rutinně používanou cytogenetickou metodou, citlivost je však pro detekci chromozomálních aberací relevantních pro mnohočetný myelom nízká (Saxe a kol., 2018;).

Délka přežití pacientů od doby diagnózy onemocnění se v posledních letech značně prodloužila, především díky výraznému pokroku v terapii. Před rokem 2000 se medián délky přežití blížil 30 měsícům (Bergsagel, 1988) Nejnovější data získaná na základě studie 1000 pacientů, kteří mezi roky 2007 a 2016 podstoupili léčbu, uvádějí medián celkového přežití 126,6 měsíců od doby diagnózy onemocnění (Joseph a kol., 2020).

Tabulka 1: Hodnocení faktorů rizik pro mnohočetný myelom ("*International Staging System*"); (přejato: Palumbo a kol., 2015)

Faktor	Kritéria
ISS skupina	
I	Sérový β_2 -mikroglobulin < 3,5 mg/l, sérový albumin \geq 3,5 g/dl
II	Hodnoty mezi skupinou I a III
III	Sérový β_2 -mikroglobulin \geq 5,5 mg/l
CA stanovené pomocí iFISH	
Vysoké riziko	Přítomnost delece del(17p) a/nebo translokace t(4;14) a/nebo translokace t(14;16)
Standardní riziko	Bez přítomnosti chromozomálních abnormalit vysokého rizika
LDH	
Normální	Sérová LDH < horní limit
Vysoká	Sérová LDH > horní limit
Revidovaný ISS (R-ISS)	
I	ISS skupina I a CA standardního rizika a normální LDH
II	Ne R-ISS skupina I nebo III
III	ISS skupina III a CA vysokého rizika nebo vysoká LDH

Legenda: CA – chromozomální abnormality; iFISH – interfázní fluorescenční *in situ* hybridizace; ISS – „International Staging Systém“; LDH – laktátdehydrogenáza; R-ISS – revidovaný „International Staging Systém“.

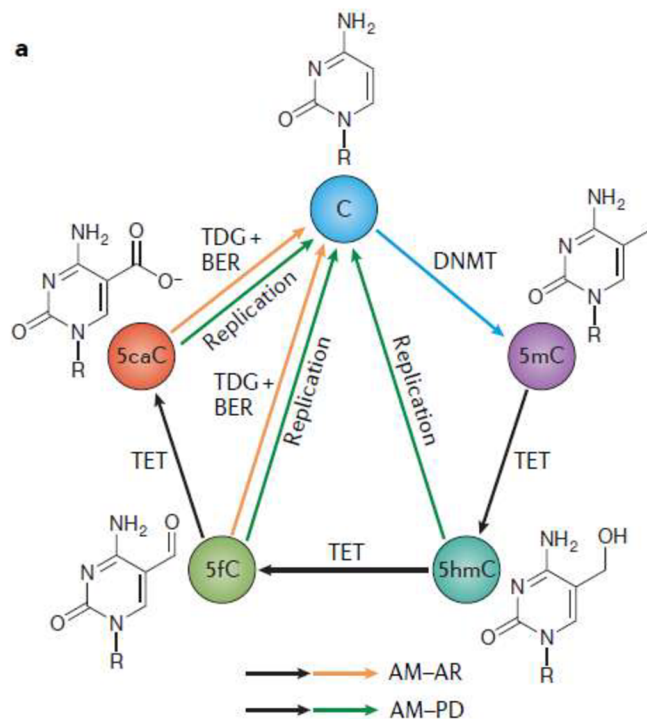
Vzhledem k tomu, že onemocnění je dosud neléčitelné, je primárním cílem terapie prodloužení doby přežití a zvýšení kvality života zmírněním zdravotních komplikací spojených s mnohočetným myelomem. Terapie se tak především soustředí na snížení nadbytku maligních plazmatických buněk v kostní dřeni (Lonial a Anderson, 2013).

3.2 TET proteiny a aktivní demethylace

3.2.1 DNA metylace a demetylační úloha TET enzymů

Jednou z nejčastěji studovaných epigenetických modifikací DNA u savců je metylace. Methylace DNA se projevuje přítomností metylové $-CH_3$ skupiny na pátém uhlíku cytosinu za vzniku metylcytosinu (5mC). Methylace má zásadní význam pro ontogenetický vývoj jedince, ovlivňuje expresi genů a hraje podstatnou roli v procesech umlčování genů. Je důležitá v procesu obnovy poškozené DNA, ochrany DNA před transponovatelnými elementy, udržování genomické stability během mitózy, imprintingu nebo inaktivace X-chromozomu. K modifikaci cytosinu dochází téměř výhradně v rámci CpG (fosfodiesterová vazba mezi cytosinem a guaninem) ostrůvků (*CpG islands*), kdy je 60-80 % cytosinů metylováno (Smith a Meissner., 2013; Li a Zhang., 2014). Tyto CpG ostrůvky se nacházejí v oblastech promotorů přibližně 60 % všech anotovaných genů (Antequera a Bird, 1993). Methylace promotorů bývá spojována s inhibicí transkripce příslušných genů, nemetylované promotory naopak s transkripčně aktivními geny. Methylace DNA také hraje důležitou roli v nádorové progresi, jelikož hypermethylace promotorových úseků genů tumorových supresorů vede k jejich snížené expresi a následně funkci (Esteller, 2008; Smith a Meissner, 2013). Donorem metylové skupiny je S-adenosyl-L-methionin (SAM) působením enzymů DNA metyltransferáz (DNMTs): *DNMT1*, *DNMT3A* a *DNMT3B* (Bestor a Ingram, 1983; Okano a kol., 1998; Clark a Melki, 2002).

Pasivní demethylace je proces, kdy se snižuje zastoupení modifikovaného cytosinu tak, že je narušena metylovační funkce DNMT1 během DNA replikace, kdy nově vznikající vlákno není metylováno. K demetylovači může docházet taktéž aktivními procesy, a to prostřednictvím tzv. TET enzymů (Holliday a Pugh, 1975; Wu a Zhang, 2017). TET enzymy (*Ten-eleven translocation enzymes*) jsou 2-oxoglutarát a Fe^{II} dependentní metylcytosin dioxigenázy, které zprostředkovávají konverzi 5-metylcytosinu (5-mC) na 5-hydroxymetylcytosin (5-hmC) a jeho další oxidaci na 5-formylcytosin (5-fC) a 5-karboxylcytosin (5-caC) (Tahiliani a kol., 2009; He a kol., 2011; Ito a kol., 2011). Excise 5-fC a 5-caC zprostředkovaná thymin DNA glykosylázou (TDG) a následovaná básovou excizní opravou (BER) taktéž vede k demetylovači (Wu a Zhang, 2014; Bochtler a kol., 2017) jako součást opravného procesu poškozené DNA (viz Obrázek 1). BER (*Base excision repair*) a NER (*Nucleotide excision repair*) jsou tak dalšími mechanismy aktivní demethylace. Působením 5-mC TDG nebo modifikací 5-mC deaminací (cytosin se mění na uracil, nepáruje se pak s guaninem) a nepárující se dvojice U-G je pak vyhledána opravným systémem.



Obrázek 1: Schéma demetylace DNA zprostředkované TET enzymy. DNA metyltransferázy (DNMTs) konvertují nemodifikovaný cytosin na 5-metylcytosin (5-mC), ten může být zpětně konvertován na nemodifikovaný cytosin pomocí TET enzymy zprostředkované oxidací na 5-hydroxymetylcytosin (5-hmC), 5-formylcytosin (5-fC) a 5-karboxylcytosin (5-caC), a následně excize 5-fC nebo 5-caC pomocí thymin DNA glykosylázy (TDG) spojené s excizní bázovou opravou (BER) (převzato: Wu a Zhang, 2017).

3.2.2 Obecná charakteristika TET enzymů

Skupina proteinů TET (*ten-eleven translocation enzymes*) je pojmenována podle translokace t(10;11)(q22;q23), která byla popsána ve vzácných případech u pacientů trpících akutní myeloidní a lymfoidní leukémií. Produktem translokace je fúze genu *MLL1* (*mixed lineage leukaemia*), nacházejícího se na lidském chromozomu 10, s genem pro *TET1*, který je lokalizován na lidském chromozomu 11 (Ono a kol., 2002; Lorschbach a kol., 2003). TET enzymy jsou 2-oxoglutarát a Fe^{II} -dependentní metylcytosin dioxigenázy, přičemž u savců byly popsány tři enzymy této skupiny proteinů: TET1, TET2 a TET3. Proteiny TET jsou důležité v mnoha biologických procesech, které zahrnují například epigenetickou regulaci genové transkripce, embryonální vývoj, diferenciaci a transformaci kmenových buněk nebo rakovinotvorné procesy. Řada těchto procesů však dosud nebyla detailně popsána (Tahiliani a kol., 2009; Cimmino a kol., 2011).

3.2.3 Struktura TET enzymů

Katalytická doména enzymu se nachází na jeho karboxylovém C-konci a skládá se ze dvou strukturních domén: dvouvláknové β -helix šroubovice (DSBH; *Double-stranded β -helix domain*) a domény bohaté na cystein. Funkcí domény DSBH je zprostředkování interakce Fe^{II} , α -ketoglutarátu a 5-metylcytosinu v oxidačním procesu substrátu. Doména bohatá na cystein pak hraje roli ve stabilizaci celé struktury a ve zprostředkování interakce enzymu s DNA tím, že se obtáčí kolem domény DSBH (Pastor a kol., 2013). Protože kontaktní místo mezi TET a DNA nezahrnuje samotnou metylovou skupinu cytosinu, může docházet k interakci TET enzymů i s modifikovaným cytosinem (Hu a kol., 2013).

3.2.4 TET1

TET1 je vysoce a specificky exprimován v embryonálních kmenových buňkách, v buňkách vnitřní stěny blastocysty a v primordiálních zárodečných buňkách. Katalytická aktivita enzymu je tedy důležitá pro normální diferenciaci kmenových buněk, během níž hladina exprese tohoto enzymu postupně klesá (Koh a kol., 2011).

3.2.5 TET2

Stejně jako TET1 má i TET2 významou funkci v procesu diferenciaci embryonálních kmenových buněk, kde je exprimován. Bylo na myším modelu prokázáno, že mutace genu *Tet2* jsou asociovány s aberantními metylacemi DNA a myeloidními malignitami (Delhommeau a kol., 2009). Tento fakt poukazuje na důležitou roli TET2 v procesu diferenciaci hematopoetických kmenových buněk (Ko a kol., 2010),

3.2.6 TET3

Enzym TET3 lze jako jediný detekovat ihned po fertilizaci vajíčka, kde zprostředkovává hromadnou oxidaci cytosinu samčího prvojádra, což má za následek snížení jeho hladin v genomu. (Gu a kol., 2011, Iqbal a kol., 2011). Během následné replikace však dochází ke ztrátě těchto oxidovaných 5-mC otcovského genomu a 5-mC mateřského genomů. Metylační vzory u dceřiných molekul DNA jsou následně po implantaci vajíčka obnoveny pomocí *de novo* DNA metylace zprostředkované TET1 a TET2 (Inoue a Zhang, 2011).

3.3 Transkripční faktory Sp1 a Sp3

Transkripční faktory Sp1 a Sp3 se svou vazbou na promotorové úseky genů podílí na regulaci transkripční aktivity genů zapojených do buněčné diferenciaci, buněčného cyklu a onkogeneze. (Davie a kol., 2008). Bylo prokázáno, že hladina těchto proteinů je u nádorových buněk ve srovnání s buňkami normálními často zvýšená, jak bylo popsáno u nádoru prsu, štítné žlázy, slinivky, žaludku, plic, hepatocelulárního karcinomu a kolorektálního karcinomu (Davie a kol., 2008; Chuang a kol., 2009; Kong a kol., 2010).

3.3.1 Struktura transkripčních faktorů Sp1 a Sp3

Sp1 a Sp3 jsou transkripční faktory o velikosti 105 a 115 kDa (Lin a kol., 2004), k jejichž expresi dochází ve všech savčích buňkách. Tyto transkripční faktory náleží do rodiny „*Specificity Protein/Krüppel-like Factor*“ (SP/KLF), která je charakteristická svojí vysoce konzervovanou DNA vazebnou doménou (sekvence shodná z více než 65 %) v oblasti C-konce proteinu (Suske, 2005). Sp1 a Sp3 jsou z více než 90 % homologní v oblasti DNA vazebné domény a vážou se tedy do stejné oblasti DNA, Sp1/3 vazebného místa, s podobnou afinitou (Lin a kol., 2004; Davie a kol., 2008). Proteiny Sp mají několik podjednotek se specifickou funkcí (Lin a kol., 2004). Vlastní transaktivační doména proteinů Sp1 a Sp3 se skládá ze dvou podjednotek (A a B), přičemž každá z těchto podjednotek může stimulovat transkripci. K transaktivačnímu potenciálu Sp pravděpodobně také přispívá „*Buttonhead*“ (BTD) element v rámci domény C. Na karboxylovém konci domény C se nachází již zmíněná vazebná doména, jejíž strukturní motiv je představován třemi Cys₂His₂ zinkovými prsty. Tato doména umožňuje sekvenčně specifickou vazbu proteinu na DNA v oblasti promotoru bohaté na guanin a cytosin (Courey a Tjian, 1988). Doména D, nacházející se na C-konci proteinu, je potřebná pro samotnou aktivaci transkripčního faktoru (Pascal a Tjian, 1991). Inhibiční doména proteinu se v případě Sp1 nachází v oblasti N-konce, zatímco v případě Sp3 před motivem zinkových prstů. Rozdíl v pozici inhibiční domény u obou proteinů je považován za důvod jejich odlišné funkce (Dennig a kol., 1996; Suske, 1999).

V případě Sp3 byly, kromě dlouhé izoformy (115 kDa), popsány další dvě kratší isoformy o velikosti 80 kDa (M1) a 78 kDa (M2). Bylo prokázáno, že tyto isoformy nemají původ v alternativním sestřihu Sp3 RNA nebo proteolytické degradaci Sp3 proteinu, ale jsou produktem alternativního počátku translace v rámci Sp3 mRNA molekuly (Kennett a kol., 1997). Stejně jako dlouhá izoforma Sp3, jsou M1 a M2 exprimovány ve všech savčích buňkách. Předpokládá se, že tyto krátké Sp3 isoformy mají funkci transkripčního represoru, zatímco dlouhá izoforma slouží jako aktivátor transkripce (Kennett a kol., 2002).

3.3.2 Funkční role Sp1 a Sp3

Lidský genom obsahuje minimálně 12 000 vazebných míst pro Sp1/3, přičemž tato místa jsou asociována s geny podílejícími se na téměř všech buněčných procesech (Cawley a kol., 2004). Geny transkripčních faktorů Sp1 a Sp3 jsou autoregulované. Jsou schopny vázat se do CpG oblastí promotorových sekvencí vlastních genů, čímž regulují jejich expresi. (Nicolás a kol., 2001).

První studie docházely k závěru, že Sp1 má aktivační funkci, zatímco Sp3 je represor transkripce, případně pouze slabý aktivátor (Suske, 1999). Nejnovější poznatky však poukazují na schopnost obou transkripčních faktorů účastnit se jak aktivace transkripce, tak i její represe (Bilsland a kol., 2006; Jaiswal a kol., 2006; Lin a Davie, 2008; Lee a kol., 2009). Výzkum zaměřený na promotorovou oblast proteinkinázy R (PKR; *Protein kinase RNA-activated*), která váže Sp1 i Sp3, ukázal, že pouze Sp3 byl součástí indukibilního komplexu. Vazba Sp3 do promotorové oblasti byla na rozdíl od Sp1 závislá na přítomnosti interferonu, se kterým tvoří komplex (Ward a Samuel, 2003). Sp3 se také ukazuje být silnějším transaktivátorem promotoru *CDKN1A*, kódující p21^{WAF/CIP} (Sowa a kol., 1999; Gartel a kol., 2000).

Další vlastností rozlišující Sp1 a Sp3 je jejich odlišná lokalizace v interfázním jádře buňky, prokázána fluorescenční mikroskopií. Jejich rozdílná jaderná distribuce pravděpodobně hraje roli v načasování a délce udržení vazby transkripčního faktoru na promotor genu. Například, jak Sp1, tak i Sp3 se účastní regulace genové exprese TFF1 (*Trefoil factor 1*), ale vazba jednoho znemožňuje vazbu druhého. Je tedy možné, že prostorové umístění promotoru v interfázním jádře vedle Sp1 nebo Sp3 domény ovlivňuje, který z transkripčních faktorů obsadí vazebnou doménu promotoru a bude regulovat genovou expresi (He a kol., 2005). Tato odlišná lokalizace Sp1 a Sp3 musí být po mitotickém dělení zachována i v dceřiných buňkách. Dle He a Davie (2006) si oba transkripční faktory během mitózy (od profáze pro telofázi) zachovávají jejich zřetelná charakteristická ohniska, ale jejich umístění se liší. V profázi, kdy se chromatin začíná kondenzovat, bylo pozorováno přemístění Sp1/3 ohnisek do oblastí jádra neobsahující chromozomy, během prometafáze (druhé fázi mitózy následující po profázi) se pak šíří do celé buňky, kde se vyskytují společně s F-aktinem mikrofilament. Rozmístění SP1/3 ohnisek se potom v pozdní telofázi z velké části vrací do původního stavu. Dále bylo prokázáno, že přemístění ohnisek Sp3 zpátky do nově vzniklých dceřiných jader buněk se děje dříve, než je tomu u Sp1.

Expresí genů řízená transkripčními faktory Sp1/3 je regulována jejich relativními hladinami. Toto zjištění bylo potvrzeno experimenty na imortalizované linii epiteliálních buněk mléčné žlázy HBL-100 a buněčné linii lidských epitelových buněk HeLa (Grinstein a kol., 2002). Nízké hladiny proteinu byly pozorovány během fází buněčného cyklu S a G2, nicméně exprese Sp1 byla výrazně zvýšená ve fázi G1. Dále bylo prokázáno, že během buněčného cyklu se nemění pouze hladina exprese proteinu, ale i vazebná aktivita DNA (Grinstein a kol., 2002). Jelikož Sp1 reguluje expresi některých růstových faktorů (Vallian a kol., 1998; Xu a kol., 1993), hraje tak roli v řízení buněčné proliferace

a diferenciaci (Grinstein a kol., 2002). Na základě analýzy buněčného cyklu buněk linie nádoru prsu MCF-7 bylo zjištěno, že jsou hladiny Sp1 během celého buněčného cyklu neměnné (Linn a kol., 2004). Je tedy možné, že změny hladin proteinu Sp1 v průběhu buněčného cyklu jsou tkáňově specifické. Relativní hodnoty úrovně Sp1/3 také ovlivňují expresi monoaminoxidázy typu B (MAO B; *Monoamine oxidase B*) během diferenciaci epitelálních buněk Caco-2 odvozených z kolorektálních buněk adenokarcinomu. MAO B katalyzuje oxidativní deaminaci monoaminů, jako jsou serotonin, tyramin nebo fenylethylamin. Sp3 s funkcí represoru se váže na promotorovou oblast genu *MAOB* a zatímco poměr hladin Sp3/1 během buněčného cyklu klesá, exprese genu *MAOB* se zvyšuje (Wong a kol., 2003).

Abnormální hladiny Sp1 a Sp3 proteinů jsou pozorovány u několika typů nádorů a korelují s pokročilejším stádiem a horší prognózou onemocnění. V případě raného stádia nádoru žaludku je hladina exprese genu *SP1* v buněčných jádrech ve srovnání se zdravými buňkami žaludku snižena nebo žádná, zatímco pro pokročilejší stádia nemoci byla typická jeho zvýšená exprese (Wang a kol., 2003; Yao a kol., 2004).

3.3.3 Sp1 a Sp3 modifikace

U transkripčního faktoru Sp1 byly popsány post-translační modifikace fosforylace, glykosylace a acetylace, zatímco post-translační modifikace Sp3 zahrnují fosforylaci, sumoylaci a acetylaci (Jackson a kol., 1988; Merchant a kol., 1999; Suzuki a kol., 2000; Braun a kol., 2001; Zheng a kol., 2001; Ross a kol., 2002; Ko a kol., 2003; Verger a kol., 2003).

Fosforylace těchto transkripčních faktorů má za následek snížení nebo zvýšení jejich transkripční aktivity a následně tak regulaci transkripce cílových genů (Ge a kol., 2003; Lam a kol., 2003) tím, že mění jejich vazebnou aktivitu k DNA (Arinze a Kawai, 2003; Chu a kol., 2003). Abnormálně vysoká exprese genu *SPNS2* (*Sphingosine-1-phosphate transporter spinster homolog 2*) u hepatocelulárního karcinomu jater je spojována s posílením schopnosti nádoru metastazovat. Deficience železa zvyšuje fosforylaci Sp1, což vede také ke zvýšení vazebné aktivity proteinu na promotor cílového genu *SPNS2* (Wang a kol., 2022). Fosforylace Sp1 a Sp3 probíhá v rámci signální dráhy MAPK/ERK. (Ko a kol., 2003; Merchant a kol., 1999). Tato dráha zahrnuje mnoho proteinů, jako jsou mitogenem aktivované proteinkinázy (MAPK), původně nazývané extracelulární, signálem regulované kinázy (ERK), které komunikují přidáním fosfátových skupin k sousednímu proteinu (fosforylují jej), čímž působí jako „on“ nebo „off“ vypínač. Fosforylace Sp1 je dále spojována s expresí genu *APOA1* (Apo-AI; *Apolipoprotein AI*) indukovanou epidermálním růstovým faktorem (EGF; *Epidermal growth factor*) (Zheng a kol., 2001), nebo cytokinem interleukin-21 (Wu a kol., 2005). Fosforylace je tedy zprostředkována různými typy kináz jako jsou cyklin-dependentní kinázy (CDKs; *Cyclin dependent kinases*) (Fojas a kol., 2001), kinázy ERK (ERKs; *Extracellular signal-regulated kinases*) (Bonello a kol., 2004), proteinová kináza CKII (CK2; *Casein kinase II*) (Armstrong a kol., 1997) nebo DNA-dependentní proteinovou kinázu (Chun a kol., 1998). Fosforylace

a defosforylace Sp1/3 je dynamická. Za defosforylaci jsou zodpovědné některé fosfatázy, jako například protein fosfatáza 1 (PP1) v případě buněk plicního epitelu (Chu a kol., 2003) nebo protein serin/treonin fosfatáza 2A (PP2A) u primárních T-lymfocytárních buněk (Lacroix a kol., 2002).

Glykosylace se vyskytuje na vazbách *O*-GlcNAc serinových a threoninových zbytcích proteinu Sp1 a stejně jako fosforylace může pozitivně či negativně ovlivňovat vazbu DNA a transkripční faktor a následnou úroveň transkripce (Jackson a kol., 1988). Glykosylace Sp1 je pravděpodobně důležitá pro lokalizaci Sp1 do buněčného jádra a jeho hypoglykosylace vede k proteolytické degradaci transkripčního faktoru. To naznačuje, že glykosylace hraje významnou úlohu v kontrole buněčného cyklu jako nutriční checkpoint (Han a Kudlow, 1997; Majumdar a kol., 2006).

Proteiny SUMO (*Small ubiquitin-related modifiers*) jsou strukturně i velikostně podobné ubiquitinu, ale liší se od něj svoji funkcí. Funkčně se totiž jedná spíše o molekuly podílející se na procesech buněčné kompartmentace, stabilitě proteinů, regulace struktury chromatinu a aktivity transkripčních faktorů (Gill, 2003; Verger a kol., 2003). Sumoylace transkripčních faktorů Sp1/3 má negativní efekt na jejich aktivitu (Verger a kol., 2003) a dochází k ní na jednom lysinu lokalizovaném v inhibiční doméně proteinu (Sapetschnig a kol., 2002). Vliv sumoylace na aktivitu inhibiční domény proteinu je fakt, SUMO-1 proteáza štěpí vazbu mezi SUMO a Sp3, což vede ke zvýšení transkripční aktivity Sp3 (Ross a kol., 2002).

Lysin, který v inhibiční doméně Sp3 podléhá sumoylaci, je také cílem acetylace zprostředkované histonovou H3K27 acetyltransferázou p300 (Braun a kol., 2001; Ammanamanchi a kol., 2003). Acetylaci také podléhá vazebná doména DNA transkripčního faktoru Sp1 (Suzuki a kol., 2000), což vede ke zvýšení aktivity DNA-vazebné domény. Acetylace Sp1 umocněná použitím inhibitorů histonových deacetyláz (HDACs; *Histone deacetylases*) je také zodpovědná za zvýšení jeho transkripční aktivity (Lin a kol., 2004).

4 Materiál a metody

4.1 Biologický materiál

- Buněčná linie KMS12-PE (JCRB0430) poskytnuté buněčnou bankou JCRB – Japanese Cancer Research Resources Bank (National Institute of Biomedical Innovation, Osaka, Japonsko)
- Buněčná linie KMS12-BM (JCRB0429) poskytnuté buněčnou bankou JCRB – Japanese Cancer Research Resources Bank (National Institute of Biomedical Innovation, Osaka, Japonsko)

4.2 Použité chemikálie, soupravy a roztoky

Použité chemikálie

- 2x SsoAdvanced universal Syber Green supermix (Sigma Aldrich)
- 5-aza-2'-deoxycytidin (Merck Life Science, Darmstadt, Německo)
- 5-azacytidin (Merck Life Science, Darmstadt, Německo)
- Antibiotika PenStrep (Merck Life Science, Darmstadt, Německo)
- Činidlo Bradfordové (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Kalifornie, U.S.A.)
- ddH₂O
- Deoxycholát sodný (Merck Life Science, Darmstadt, Německo)
- DepcH₂O
- Dimethylsulfoxid (DMSO) 100% (Merck, Life Science, Darmstadt, Německo)
- Dodecylsírán sodný (SDS) (Serva, Heidelberg, Německo)
- Etanol (98%, 70%)
- Ethylendiamintetraoctová kyselina (EDTA) (Merck Life Science, Darmstadt, Německo)
- Ethylenglykoltetraoctová kyselina (EGTA) (Merck Life Science, Darmstadt, Německo)
- Fetální hovězí sérum (FBS) (Merck Life Science, Darmstadt, Německo)
- Formaldehyd 35% (EURO-ŠARM, Šenov, Česká Republika)
- L-glutamin (Merck Life Science, Darmstadt, Německo)
- Glycerol (Merck Life Science, Darmstadt, Německo)
- Glycin (Merck Life Science, Darmstadt, Německo)
- Hepes (Merck Life Science, Darmstadt, Německo)
- Hydrogenfosforečnan draselný (Carl Roth, Karlsruhe, Německo)
- Hydrogenfosforečnan sodný (Carl Roth, Karlsruhe, Německo)
- Hydroxid draselný (Lachema, Brno, Česká Republika)
- Hydroxid sodný (Lachema, Brno, Česká Republika)

- Chlorid draselný (Mikrochem, Pezinok, Slovensko)
- Chlorid sodný (Mikrochem, Pezinok, Slovensko)
- Chlorovodíková kyselina (lékárna Fakultní nemocnice Olomouc, Česká Republika)
- Inhibitor proteáz (Roche, Basel, Švýcarsko)
- Izopropanol
- Nonidet[®] P40 (Merck Life Science, Darmstadt, Německo)
- Normal Rabbit IgG (MerckMillipore Life Science, Darmstadt, Německo)
- Primery specifické pro promotorové sekvence genů *TET1*, *TET2* a *TET3* (Sigma Aldrich, Darmstadt, Německo)
 - *TET1* (F: ACTCCCTGAGGTCTGTCCTG; R: CAGGTAGGGCTGCATGACTT)
 - *TET2* (F: GAAGGTGGGCCCGGGCGG; R: GAGAGGGTGTGCTGCTGAAT)
 - *TET3* (F: AAAGGCCATGGTAGGAAGT; R: TGAAGTAGCGCTGTCCAGAA)
- Protein AG Plus-Agarose (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, U.S.A.)
- Proteinase K (20 mg·ml⁻¹) Biorline Meridian Bioscience, Memphis, USA)
- Protilátky
 - Anti-Sp1 antibody – ab13370 (Abcam, Cambridge, Velká Británie)
 - Anti-Sp3 antibody – ab227856 (Abcam, Cambridge, Velká Británie)
- Pyruvát sodný (P-Lab, Praha, Česká Republika)
- RNase A, DNase and protease-free (10 mg·ml⁻¹) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)
- RNase ZAP (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Německo)
- Salmon sperm DNA/Protein A agarose (Merck Life Science, Darmstadt, Německo)
- Sondy (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, U.S.A.)
 - TET1 (Hs04189344_g1)
 - TET2 (Hs00766782_s1)
 - TET3 (Hs00896441_m1)
- SsoAdvanced Universal SYBR[®] Green Supermix (Bio-Rad Laboratories, Kalifornie, USA)
- Tri Reagent[®] RT-Blood (Molecular Research Center, Inc., OH, U.S.A.)
- Tris (Serva, Heidelberg, Německo)
- Triton X-100 (Merck Life Science, Darmstadt, Německo)
- Xceed qPCR Probe 2x Mix Lo-ROX (Institute of applied biotechnologies, Praha, Česká Republika)
- γ -globulin (Bio-Rad Laboratories, Kalifornie, USA)

Použité roztoky

- $0,5\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Ethylendiaminotetraoctová kyselina EDTA, pH 8,0 (194,13 g EDTA rozpustit v 800 ml neionizované vody a pomocí hydroxidu sodného upravit hodnotu pH na 8,0; doplnit do 1 l neionizovanou vodou a upravit pH na hodnotu 8,0; uchovávat při 4°C)
- $0,5\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Ethylenglykoltetraoctová kyselina (EGTA) (1,902 g EGTA rozpustit v 50 ml neionizované vody, uchovávat při 4°C)
- 11x Formaldehyf stock 2 ml $0,5\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ roztoku Hepes, pH 8,0; 40 μl $0,5\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ roztoku EDTA, pH 8,0; 100 μl $0,1\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ roztoku EGTA; 2 ml $1\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ roztoku NaCl; 6,286 ml 35% roztoku formaldehydu; doplnit do 20 ml neionizovanou vodou)
- Eluční pufr pro CHIP (50 μl $1\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ roztoku Tris, pH 8,0; 2 μl $0,5\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ roztoku EDTA, pH 8,0; 100 μl $1\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ roztoku NaCl; doplnit do 1 ml neionizovanou vodou)
- High salt immune complex wash buffer (1 ml 10% roztoku SDS; 1 ml Triton X-100; 400 μl $0,5\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ roztoku EDTA, pH 8,0; 2ml $1\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ roztoku Tris, pH 8,1; 50 ml $1\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ roztoku NaCl; doplnit do 100 ml deionizovanou vodou a uchovávat při 4°C)
- Chip lyzační pufr (20 ml 2 ml $0,5\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ roztoku Hepes, pH 8,0; 400 μl $0,5\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ roztoku EDTA, pH 8,0; 1 ml $0,1\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ roztoku EGTA; 28 ml $1\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ roztoku NaCl; 20 ml 100% glycerolu, 1 ml Nonidet P40; 500 μl Triton X-100; doplnit do 20 ml deionizovanou vodou, uchovávat při 4°C)
- Low salt immune komplex cash buffer (1 ml 10% roztoku SDS; 1 ml Triton X-100; 400 μl $0,5\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ roztoku EDTA, pH 8,0 2ml $1\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ roztoku Tris, pH 8,1; 15 ml $1\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ roztoku NaCl; doplnit do 100 ml deionizovanou vodou a uchovávat při 4°C)
- PBS roztok ($1,37\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl; $27\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ KCl; $18\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ KH_2PO_4 ; $100\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Na_2HPO_4 ; dH_2O ; sterilizováno autoklávováním)
- Radioimunoprecipitační testovací pufr (RIPA) s salmon sperm DNA (ssDNA) (990 μl RIPA pufru; 10 μl salmon sperm DNA; udržovat na ledu)
- RIPA pufr (500 μl 10% roztoku SDS; 5 ml 1% roztoku deoxycholátu sodného; 500 μl Triton X-100; 7 ml $1\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ roztoku chloridu sodného; 250 μl $0,1\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ roztoku EGTA; 100 μl $0,5\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ roztoku EDTA, pH 8,0; 500 μl $1\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Tris, pH 8,0; doplnit do 50 ml neionizovanou vodou a přidat tabletu inhibitorů proteáz, uchovávat při -20°C)
- RPMI médium (10 % FBS) (10 ml roztoku FBS; 1 ml roztoku 2 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ glutaminu; 1 ml roztoku antibiotik PenStrep; 1 ml 100 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ roztoku pyruvátu sodného; doplnit do 100 ml RPMI médium, uchovávat při 4°C)
- Ředící pufr (CHIP dilution buffer) (100 μl 10% roztoku SDS; 1,1 ml Triton X-100; 240 μl $0,5\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ roztoku EDTA, pH 8,0; 1670 μl $1\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ roztoku Tris, pH 8,0; 16,7 ml $1\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ roztoku NaCl; doplnit do 100 ml deionizovanou vodou a uchovávat při 4°C)

Použité soupravy

- QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden, Germany)
- QIAGEN Blood and Cell Culture DNA Kit (Qiagen, Hilden, Germany)
- EpiMark 5-hmC and 5-mC Analysis Kit (Epigentek, Inc., Farmingdale, NY, U.S.A).
- Transcription First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche, Germany).
- Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega)

Použité přístroje

- Biohazard box MSC-Advantage™ 1,8, Thermo Fisher Scientific
- Centrifuga 3K30, Sigma
- Centrifuga BR4i (DJB Labcare)
- Centrifuga LMC-3000, Biosan
- Centrifuga MiniSpin plus, Eppendorf
- Centrifuga Multi-spin PCV-3000, Grant-Bio
- CO₂ inkubátor Heracell™ VIOS 160I, Thermo Fisher Scientific
- Digestoř M/900 M2, Merci
- DNA/RNA UV-cleaner box UVC/T-AR, Biosan
- Inkubátor Dry Bath MD-02N, Major Science
- Light-Cycler®480 Systém, Roche, Basel, Švýcarsko
- Mikropipety Pipetman® Neo 0,2–1000 µl, Gilson
- Mikropipety Research® plus, 0,1–1000 µl, Eppendorf
- Multi Rotátor PTR-35, Keison products
- Mraznička 900 series froma, Thermo Scientific
- PowerWave XS Microplate Spectrophotometer, BioTek
- Spectrafuge™ mini C1301-B, Labnet
- Spektrofotometr NanoDrop™-1000, Thermo Scientific
- Termocykler C-1000™, Bio-Rad
- Thermo shaker TS-100C. Biosan
- Váhy KERN, Kern
- Vortex Lab Dance, IKA

4.3 Chromatinová imunoprecipitace

4.3.1 Kultivace buněčných linií a jejich ovlivnění demetylačními činidly

Pro experimentální část práce byly vybrány buněčné linie KMS12-PE (JCRB0430) a KMS12-BM (JCRB0429), které pocházejí z buněčné banky JCRB – Japanese Cancer Research Resources Bank (National Institute of Biomedical Innovation, Osaka, Japonsko). Myelomové buněčné linie byly kultivovány v Petriho miskách v inkubátoru při 37°C a 5% atmosféře CO₂. Veškerá další manipulace s buňkami byla prováděna ve sterilních podmínkách v laminárním boxu.

Buňky každé linie byly kultivovány v 10ml Petriho miskách v množství 9–10·10⁶ buněk na 8 ml média. Jako kultivační médium bylo použito RPMI s 10% fetálním hovězím sérem (FBS). K ovlivnění buněčných linií byla použita demetylační činidla 5-aza-2'-deoxycytidin (Decitabin, DAC) a 5-azacytidin (azacytidin, AZA) o koncentracích 0,5 μM a 0,2 μM. Ovlivnění demetylačními činidly bylo opakováno po 24 hodinách, ovlivněné buňky byly po 72 hodinách sklizeny. Kontrolní misky obsahovaly dimethylsulfoxid (DMSO) ve finální koncentraci, ve které byly ovlivněné buňky použité pro izolaci chromatinového lyzátu.

Kultivace a ovlivnění buněk

- Médium RPMI s 10% FBS bylo ve vodní lázni temperováno na 37°C.
- Byl připraven 10% DMSO a jednotlivá ovlivnění.
- Do Petriho misek bylo pipetováno 8 ml buněčné suspenze v médiu RPMI v počtu 9–10·10⁶ buněk na misku.
- Do každé Petriho misky byly přidány 2 ml daného demetylačního činidla/DMSO o příslušné koncentraci. Každé ovlivnění bylo provedeno v duplikátu.
- Ovlivněné buňky byly kultivovány v 37°C po dobu 72 hodin, každých 24 hodin bylo ovlivnění zopakováno.
 - Při každém ovlivnění bylo z Petriho misky odpipetováno 100 μl buněčné suspenze a následně přidáno 100 μl čerstvě připraveného demetylačního činidla/DMSO v koncentraci, která zachovala původní finální koncentraci ovlivnění.

4.3.2 Izolace chromatinového lyzátu z ovlivněných buněk

Po 72 hodinách od prvního ovlivnění byl podle následujícího postupu z kontrolních neovlivněných (DMSO) a ovlivněných buněk izolován chromatinový lyzáat.

- Do každé Petriho misky s 10 ml ovlivněné buněčné suspenze byl přidán 1 ml 11x Formaldehyd Stock Solution. Směs byla inkubována po dobu 30 minut při 4°C.
- K buněčné suspenzi bylo dále přidáno 687,5 μl 2M glycinu. Směs byla inkubována pět minut při pokojové teplotě.

- Buněčná suspenze byla přenesena do kónických zkumavek s víčkem, které byly uchovávány na ledu.
- Centrifugace při 600 g po dobu 15 minut při 4°C .
- Z každé zkumavky byl odebrán supernatant, pelet byl promyt 8 ml vychlazeného fosfátového pufru (PBS).
- Centrifugace při 600 g po dobu 15 minut při 4°C .
- Pelet by resuspendován v 6 ml ChIP lyzačním pufru.
- Směs byla přenesena do 15ml plastových zkumavek.
- Směs byla inkubována na rotátoru při 5 otáčkách za minutu v chladové místnosti (4°C) po dobu 10 minut.
- Centrifugace při 600 g po dobu 15 minut při 4°C .
- Supernatant byl odstraněn a pelet resuspendován v 8 ml ředícího pufru (ChIP dilution buffer).
- Směs byla inkubována na rotátoru při 5 otáčkách za minutu v chladové místnosti (4°C) po dobu 10 minut.
- Centrifugace při 600 g po dobu 15 minut při 4°C .
- Supernatant byl odstraněn a pelet (v závislosti na jeho velikosti) resuspendován ve 200–500 µl radioimunoprecipitačního testovacího pufru (RIPA). Obsah zkumavek byl následně přenesen do 1,5ml plastových mikrozkušavek.
- Vzorky byly po dobu 30 sekund protřepány na Vortex a následně inkubovány na rotátoru při 15 otáčkách za minutu v chladové místnosti (4°C).
- Vzorky byly uchovávány při -80°C.

4.3.3 Sonikace buněčných lyzátů

Za účelem štěpení chromatinového vlákna byly buněčné lyzáty sonikovány na sonikátoru. Sonikace probíhala ve čtyřech cyklech s účinností 80, 90 a dvakrát 100 %, vždy po 20 sekundách. Tato série cyklů byla opakována celkem třikrát. Po dobu celé práce byly mikrozkušavky s buněčným lyzátem uchovávány na ledu. Vzorky byly dále centrifugovány při 14 000 g po dobu 15 minut při 4°C . Supernatant byl přenesen do nových 1,5ml plastových mikrozkušavek a uchováván při -80°C.

4.3.4 Stanovení koncentrace proteinů pomocí metody Bradfordové

Pro stanovení koncentrace proteinů bylo nutno připravit činidlo Bradfordové v poměru 1:4 (činidlo:deionizovaná voda). Pro výpočet požadovaného objemu činidla se vycházelo s potřeby 1 ml činidla k analýze jednoho vzorku, a 1,5 ml pro slepý (*Blank*) vzorek a kalibrační řadu. Celkový objem byl následně vydělen 5, čímž byl stanoven objem činidla a deionizované vody tak, aby byl zachován potřebný poměr.

Pro vytvoření kalibrační řady byl jako standard použit γ -globulin o koncentraci 1 mg·ml⁻¹. Standard byl nanesen na 96-ti jamkovou mikrotitrační destičku v objemech 1, 2, 3, 4, 5 a 10 µl, každá

jamka byla následně doplněna deionizovanou vodou do objemu 10 µl. Poté bylo do každé jamky přidáno 200 µl činidla Bradfordové.

Na mikrotitrační destičku bylo dále nanášeno vždy 1 µl vzorku + 1 µl deionizované vody a 200 µl činidla Bradfordové. Vzorky byly pipetovány v tripletech. Jako slepý vzorek bylo použito 200 µl činidla Bradfordové ve třech opakováních.

Následně byla spektrofotometricky pomocí Elisa reader stanovena absorbance jednotlivých vzorků, včetně kalibrační řady a slepých vzorků. Ze získaných hodnot absorbance byla vytvořena kalibrační křivka a na jejích základech vypočítána koncentrace proteinů jednotlivých vzorků.

4.3.5 Chromatin imunoprecipitační analýza s použitím Anti Sp1 a Sp3 protilátek

Chromatinový lyzát izolovaný z jednotlivých ovlivnění byl použit pro chromatin imunoprecipitační (ChIP) analýzu. Vzorky byly precipitovány s Anti-Sp1 a Anti-Sp3 protilátkami, IgG sloužil jako negativní kontrola. Vzorky byly uchovávány na ledu.

- Do 1,5ml plastové mikrozkušavky bylo napipetováno stanovené množství vzorku obsahující 100–200 ng proteinů.
- K jednotlivým vzorkům byl přidán pufr RIPA s inhibitory proteáz (Roche, Basel, Švýcarsko) o objemu 200–300 µl.
- Ke směsi byly přidány 2 µl o výsledné koncentraci protilátky 2 µg (Anti-Sp1 nebo Anti-Sp3).
- Jako negativní kontrola byly použity 2 µl IgG (2 µg) (Merck, Darmstadt, Německo).
- Vzorky byly precipitovány s příslušnou protilátkou přes noc na rotátoru v chladové místnosti při 5 otáčkách/minutu a 4°C.
- Ke každému vzorku bylo přidáno 20 µl Protein AG Plus-Agarose (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, U.S.A.) a následně promýváno na rotátoru v chladové místnosti při 3 otáčkách/minutu a 4°C.
- Centrifugace při 3000 rpm po dobu 3 minut při 4°C.
- Supernatant byl odstraněn a k peletu bylo přidáno 500 µl pufru RIPA a ssDNA (5 µl carrier salmon sperm DNA + 495 µl pufr RIPA).
- Směs byla promývána na rotátoru při 4 otáčkách/minutu po dobu 30 minut při pokojové teplotě.
- Centrifugace při 3000 rpm po dobu 3 minut při 4°C.
- Supernatant byl odstraněn a k peletu bylo přidáno 500 µl pufru (*Low salt immune complex wash buffer*).
- Centrifugace při 3000 rpm po dobu 3 minut při 4°C.
- Supernatant byl odstraněn a k peletu bylo přidáno 500 µl pufru (*High salt immune complex wash buffer*).
- Centrifugace při 3000 rpm po dobu 3 minut při 4°C.

- Supernatant byl odstraněn a k peletu bylo přidáno 500 μ l pufru RIPA a ssDNA (5 μ l carrier salmon sperm DNA + 495 μ l pufru RIPA).
- Centrifugace při 3000 rpm po dobu 3 minut při 4°C.
- Supernatant byl odstraněn a k peletu bylo přidáno 50 μ l elučního pufru
- Vzorby byly umístěny na třepačku po dobu 15 minut.
- Centrifugace při 2000 g po dobu 1 minuty.
- Supernatant byl přenesen do nových 1,5ml plastových zkumavek a ke vzorkům bylo přidáno 2,4 μ l 5M NaCl a 1 μ l RNase A (10 mg/ml).
- Vzorby byly promývány na třepačce přes noc při 65°C.
- K jednotlivým vzorkům byl přidán 1 μ l Proteinase K (20 mg/ml), následovala inkubace na třepačce po dobu 1 hodiny při 60°C.
- Precipitovaná DNA byla purifikována pomocí QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden, Německo) dle pokynů výrobce.

4.3.6 Purifikace a izolace DNA

DNA byla izolována precipitovaného komplexu proteinů a purifikována pomocí QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden, Německo) dle pokynů výrobce.

- Ke vzorkům byl přidán pětinašobek objemu pufru PB (obvykle 250 μ l pufru PB na jeden vzorek). Obsah 1,5ml plastové mikrozkušavky byl přenesen na kolonku, která byla vložena do sběrné zkumavky.
- Centrifugace při 13 000 rpm po dobu 1 minuty.
- Supernatant byl odstraněn a na kolonku naneseo 750 μ l pufru PE obsahujícího etanol. Centrifugace při 13 000 rpm po dobu 1 minuty. Krok byl opakován dvakrát.
- Supernatant byl odstraněn a vzorky byly centrifugovány při 13 000 rpm po dobu 1 minuty.
- Kolonka byla umístěna do 1,5ml mikrozkušavky, na kolonku bylo naneseo 15 μ l pufru EB (eluční pufr).
- Centrifugace při 13 000 rpm po dobu 1 minuty.
- Eluovaná DNA byla znovu naneseo na kolonku.
- Centrifugace při 13 000 rpm po dobu 1 minuty.
- Čistota izolované DNA byla stanovena spektrofotometricky pomocí přístroje Nanodrop.
- DNA byla krátkodobě uchovávána v lednici při 4°C.

4.3.7 Amplifikace imunoprecipitované DNA pomocí Real-Time PCR

Imunoprecipitovaná DNA byla amplifikována za použití primerů specifických pro promotorové sekvence genů *TET1*, *TET2* a *TET3*.

- Práce byla prováděna ve sterilních podmínkách.

- Pro každý analyzovaný gen byla připravena reakční směs PCR obsahující jednotlivé složky a primery specifické pro promotorové oblasti genů *TET1*, *TET2* a *TET3* (viz Tabulka 2).
- Reakční směsi lišící se primery pro jednotlivé geny *TET* byly rozpipetována po 17 μl do 96-jamkové destičky. K reakční směsi byly následně připipetovány 3 μl precipitované DNA. Vzorky byly nanášeny v duplikátech.
- Destička byla zalepena fólií a krátce centrifugována při 1000 g po dobu 1 minuty.
- Amplifikace precipitované DNA probíhala pomocí přístroje Light-Cycler®480 System (Roche, Basel, Švýcarsko) podle podmínek uvedených v Tabulce 3.

Tabulka 2: Složení reakční směsi PCR pro amplifikaci precipitované DNA za použití primerů specifických pro promotorovou oblast genů *TET1*, *TET2* a *TET3*.

Položka	Objem pro jeden test [μl]	Výsledná koncentrace
2x SsoAdvanced universal Syber Green supermix	10	1x
Left primer ($10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)	0,8	$400 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$
Right primer ($10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)	0,8	$400 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$
Sonda 20x	1.0	
Deionizovaná H_2O	4,4	
Celkem	17	

Tabulka 3: Teplotní profil Real-Time PCR pro amplifikaci imunoprecipitované DNA cílené na promotorové oblasti genů *TET1*, *TET2* a *TET3*.

Proces	Teplota [$^{\circ}\text{C}$]	Čas	Počet cyklů
Pre-inkubace	95	10 min	1
Amplifikace			
Denaturace	95	15 s	50
Nasednutí primerů	60	30 s	
Elongace	72	35 s	

4.4 Lokální metylační a hydroxymetylační analýza

4.4.1 Izolace genomové DNA z nesortované populace buněk aspirátu kostní dřeně

Genomová DNA byla izolována z nesortované buněčné populace aspirátu kostní dřeně 8 jedinců MGUS a 2 nově diagnostikovaných pacientů MM pomocí QIAGEN Blood and Cell Culture DNA Kit (Qiagen, Hilden, Německo) podle upravených pokynů výrobce:

- Do mikrozkušavky o objemu 1,5 ml obsahující buněčný pelet bylo přidáno 90 μ l roztoku PBS.
- K buněčné suspenzi byl pipetován 1 μ l proteinázy K (20 mg/ml).
- Vzorek byl inkubován po dobu 10 min při 56 °C.
- Do mikrozkušavky bylo přidáno 200 μ l 98% etanolu.
- Vzorek byl promíchán na Vortex po dobu 10 s.
- Kolonka byla ekvilibrována 1 ml pufru QBT.
- Vzorek byl nanesen na kolonku umístěnou ve sběrné zkumavce.
- Kolonka se vzorkem byla 3x promyta 1 ml pufru QC.
- DNA byla eluována do čisté 1,5ml plastové mikrozkušavky nanesením 1 ml pufru GQ, který byl temperován na teplotu 50 °C. Eluce DNA byla opakována.
- Eluovaná DNA byla rozpipetována do 2 plastových mikrozkušavek o objemu 2 ml.
- Do každé mikrozkušavky bylo přidáno 0,7 ml izopropanolu temperovaného na pokojovou teplotu.
- DNA byla precipitována promícháním a následnou centrifugací při 7 500 g a 4°C po dobu 15 min.
- Supernatant byl odstraněn a pelet DNA byl promyt 1 ml 70% etanolu.
- Vzorek byl centrifugován při 7 500 g a 4°C po dobu 5 min.
- Supernatant byl odstraněn a pelet DNA vysušen.
- Pelet DNA byla resuspendována v 10 μ l dH₂O a DNA byla rehydratována při 55 °C po dobu 2 hodin.
- Koncentrace a čistota izolované DNA byla stanovena spektrofotometricky pomocí přístroje NanoDrop.
- Izolovaná DNA byla uchována při -20°C.
- Lokální metylační a hydroxymetylační analýza byla provedena podle postupu uvedeného v kapitole 4.4.3.

4.4.2 Izolace genomové DNA z buněk myelomových linií KMS12-PE a KMS12-BM ovlivněných demetylačními činidly

Genomová DNA byla izolována z buněk myelomových linií KMS12-PE a KMS12-BM ovlivněných demetylačními činidly - 0,5 μ M a 0,2 μ M DAC; 0,5 μ M a 0,2 μ M AZA, pomocí Wizard[®] Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, WI, U.S.A.) za účelem lokální metylační a hydroxymetylační analýzy. Buňky obou buněčných linií byly kultivovány v médiu RPMI s 10% fetálním hovězím sérem (FBS) a ovlivněny ve 24-jamkových destičkách v počtu 500 000 buněk na jamku.

- Buňky byly z kultivační misky přeneseny do plastové 1,5ml mikrozkušavky a centrifugovány při 1 400 rpm po dobu 5 minut. Supernatant byl odstraněn.
- Buněčný pelet byl promyt 200 μ l PBS, následovala centrifugace při 1 400 rpm po dobu 5 minut. Supernatant byl odstraněn.
- Pelet byl resuspendován pomocí Vortex.
- Do zkumavky bylo přidáno 600 μ l lyzačního pufru (*Nucleic lysis solution*).
- K lyzátu byly následně přidány 3 μ l roztoku RNase, vzorek byl převrácením mikrozkušavky promíchán.
- Směs byla inkubována 15–30 minut při teplotě 37°C. Následně byl temperován na pokojovou teplotu.
- Ke vzorku bylo přidáno 200 μ l roztoku k precipitaci proteinů (*Protein precipitation solution*). Následně byl vzorek vortexován a ponechán na ledu po dobu 5 minut.
- Vzorek byl centrifugován 4 minuty při 13 000 rpm.
- Supernatant obsahující DNA byl přenesen do čisté 1,5ml plastové mikrozkušavky obsahující 600 μ l izopropanolu. Vzorek byl jemně několikrát obrácen.
- Centrifugace 1 minutu při 13 000 g a následně bylo přidáno 600 μ l 70% etanolu. Znovu byla provedena centrifugace.
- Supernatant byl odstraněn.
- Pelet byl vysušen, rozpuštěn v dH₂O a rehydratován přes noc při 4°C.
- Koncentrace a čistota izolované DNA byla stanovena spektrofotometricky pomocí přístroje NanoDrop.
- Lokální metylační a hydroxymetylační analýza byla provedena podle postupu uvedeného v kapitole 4.4.3.

4.4.3 Stanovení hladiny 5-metylcytosinu a 5-hydroxymetylcytosinu

Izolovaná DNA byla dále podrobena lokální metylační a hydroxymetylační analýze. Pro stanovení hladin metylace a hydroxymetylace v cílených promotorových úsecích genů *TET1*, *TET2*

a *TET3* byl použit EpiMark 5-hmC and 5-mC Analysis Kit (Epigentek, Inc., Farmingdale, NY, U.S.A.).

Glukosylace DNA a kontrolní reakce

- Byla připravena reakční směs (viz Tabulka 4).
- Reakční směs byla rozdělena po 155 μ l do dvou plastových mikrozkušavek o objemu 1,5 ml.
- Do jedné mikrozkušavky byly přidány 3 μ l T4- β -glukosyltransferázy (T4-BGT).
- Do druhé mikrozkušavky byly přidány 3 μ l deionizované vody. Tato směs sloužila jako kontrolní reakce.
- Obsah obou zkušavek byl inkubován při 37°C po dobu 12–18 hodin.

Tabulka 4: Složení reakční směsi pro glukosylační reakci DNA

Položka	Množství
Genomová DNA	500-1000 ng
20 x UDP-Glukóza	12,4 μ l
10x NEBuffer 4	31 μ l
Deionizovaná H ₂ O	Doplnit do objemu 310 μ l
Celkem	310 μ l

Štěpení restrikními endonukleázami

- Objem 50 μ l reakční směsi obsahující T4-BGT byl přenesen do 0,2 ml PCR mikrozkušavek, které byly označeny čísly 1–3.
- Postup byl zopakován pro směs bez T4-BGT. Mikrozkušavky byly označeny čísly 4–6.
- Do zkušavek č. 1 a 4 byl přidán 1 μ l MspI. Směs byla promíchána.
- Do zkušavek č. 2 a 5 byl přidán 1 μ l HpaII.
- Zkušavky č. 3 a 6 sloužily jako kontroly, nebyl přidán enzym.
- Schéma pipetování viz Tabulka 5.
- Reakční směsi byly inkubovány při teplotě 37°C po dobu 4–16 hodin.
- Do každé mikrozkušavky byl přidán 1 μ l proteinázy K (20 mg/ml) a směs byla inkubována při 40 °C po dobu 30 minut. Inaktivace proteinázy K proběhla inkubací reakční směsi při 95°C po dobu 10 minut.

Tabulka 5: Schéma pro restrikční štěpení glukosylované DNA

DNA + T4-BGT + UDP-Glukóza			DNA + UDP-Glukóza		
1	2	3	4	5	6
MspI	HpaII	Kontrola	MspI	HpaII	Kontrola

Kvantitativní RT-PCR

- Práce byla prováděna ve sterilních podmínkách.
- Pro každý analyzovaný gen byla připravena reakční směs PCR obsahující jednotlivé složky a primery specifické pro promotorové oblasti (Tabulka 6) jednotlivých genů *TET1*, *TET2* a *TET3* (viz Tabulka 7).
- Reakční směs byla rozpipetována po 19 μl do 96-ti jamkové destičky.
- Do každé jamky byl ve dvou opakováních přidán 1 μl DNA z mikrozkuvek 1–6.
- Destička byla zalepena fólií a centrifugována při 1000 g po dobu 1 minuty.
- Amplifikace DNA probíhala pomocí přístroje Light-Cycler®480 System (Roche, Basel, Švýcarsko) podle podmínek uvedených v Tabulce 8.

Tabulka 6: Sekvence primerů specifických pro promotorové oblasti genů *TET1*, *TET2*, a *TET3*.

Gen	Sekvence primeru 5' - 3'
<i>TET1</i>	Forward: ACTCCCTGAGGTCTGTCCTG
	Reverse: CAGGTAGGGCTGCATGACTT
<i>TET2</i>	Forward: GAAGGTGGGCCGGGGCGG
	Reverse: GAGAGGGTGTGCTGCTGAAT
<i>TET3</i>	Forward: AAAGGCCATGGTAGGAAGT
	Reverse: TGAAGTAGCGCTGTCCAGAA

Tabulka 7: Složení reakční směsi PCR pro amplifikaci úseku glukosylované DNA za použití primerů specifických pro promotorové oblasti genů *TET1*, *TET2* a *TET3*.

Položka	Objem pro jeden test [μl]	Výsledná koncentrace
2x SsoAdvanced universal Syber Green supermix	10	1x
Left primer ($10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)	0,8	$400 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$
Right primer ($10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)	0,8	$400 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$
Deionizovaná H_2O	7,4	
Celkem	19	

Tabulka 8: Teplotní profil Real Time PCR pro stanovení hladin metylace a hydroxymethylace promotorových sekvencí genů TET1, TET2 a TET3.

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

4.5 Expresní analýza genů TET

Buňky obou buněčných linií KMS12-PE a KMS12-BM byly kultivovány v médiu RPMI s 10% fetálním hovězím sérem (FBS) a ovlivněny demetylačními činidly - 0,5 μM a 0,2 μM DAC; 0,5 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a 0,2 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ AZA ve 24-jamkových destičkách v počtu 500 000 buněk na jamku. Podmínky kultivace a ovlivnění buněk demetylačními činidly viz kapitola 4.3.1. Způsob kultivace a ovlivnění buněk byl proveden za účelem analýzy exprese genů *TET* a byl shodný se způsobem kultivace a ovlivnění buněk za účelem izolace DNA pro metylační a hydroxymetylační analýzy (viz kapitola 4.4.2).

4.5.1 Izolace RNA z buněk myelomových linií KMS12-PE a KMS12-BM ovlivněných demetylačními činidly (a z nesortované populace buněk aspirátu kostní dřeně)

RNA byla izolována z kontrolních neovlivněných a ovlivněných buněk obou myelomových linií pomocí Tri Reagent[®] RT-Blood (Molecular Research Center, Inc., OH, U.S.A.). Práce probíhala v digestoři, pracovní plochy mimo digestoř byly ošetřeny roztokem RNase ZAP (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Německo).

- Buňky byly přeneseny do 1,5ml plastové mikrozkušavky a centrifugovány při 1 400 rpm po dobu 5 minut. Supernatant byl odstraněn.
- Buněčný pelet byl promyt 3 ml PBS, následovala centrifugace při 1 400 rpm po dobu 5 minut. Supernatant byl odstraněn.
- Buněčný pelet byl resuspendován v 200 μl PBS.
- V 1,5ml plastové mikrozkušavce bylo k 200 μl roztoku buněčné suspenze v PBS pipetováno 750 μl roztoku TRI-reagent RT-Blood. (U nesortované populace buněk bylo pipetováno 125 μl aspirátu kostní dřeně a 375 μl roztoku TRI-reagent RT-Blood).
- Následně bylo do zkumavky pipetováno 100 μl BCP (1-bromo-3-chloropropan). (U nesortované populace buněk bylo pipetováno 50 μl BCP).
- Vzniklý buněčný lyzát byl homogenizován 15 sekund pomocí Vortex a následně inkubován po dobu 5 minut při pokojové teplotě.
- Vzorek byl centrifugován při 12 000 g po dobu 15 minut při 4°C.

- Vzorek byl po centrifugaci rozdělen na tři fáze, přičemž horní (vodná) fáze obsahovala RNA.
- Vodná fáze byla přenesena do nové 1,5ml plastové mikrozkušavky.
- Ke vzorku bylo přidáno 500 μ l izopropanolu (na 750 μ l ml použitého TRI-reagent RT-Blood roztoku). Vzorek byl inkubován po dobu 10 minut při pokojové teplotě.
- Vzorek byl centrifugován při 12 000 g po dobu 8 minut při 4°C.
- Supernatant byl odstraněn a zbylý buněčný pelet byl promyt 1 ml 75% etanolu.
- Vzorek byl centrifugován při 7 500 g po dobu 5 minut při 4°C.
- Supernatant byl odstraněn a vysušený pelet byl resuspendován v závislosti na jeho velikosti ve 20–40 μ l depeH₂O.
- RNA byla inkubována 10–15 minut při 55 °C.
- Koncentrace a čistota izolované RNA byla stanovena spektrofotometricky pomocí přístroje NanoDrop.
- Izolovaná RNA byla uchovávána při -20°C.

4.5.2 Reverzní transkripce (RT-PCR)

Izolovaná RNA byla použita pro syntézu komplementární DNA (cDNA) pomocí Transcription First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche, Basel, Švýcarsko). Práce s RNA probíhala na ledu a ve sterilním prostředí boxu s možností záření UV.

- Do 1,5 ml plastové mikrozkušavky o objemu 0,2 μ l byl pipetován 1 μ l hexamer random primeru a 100–200 ng izolované RNA. Objem byl následně doplněn deionizovanou H₂O do 14,5 μ l.
- Obsah mikrozkušavky byl inkubován v termocykleru 10 minut při teplotě 65°C. Mikrozkušavky byly po inkubaci velmi rychle umístěny do chladicího bloku nebo ledu.
- Do mikrozkušavky byly postupně pipetovány zbývající komponenty reakční směsi (viz Tabulka 9).
- Obsah zkumavky byl následně inkubován v termocykleru při teplotě 25°C po dobu 10 minut, 55 °C po dobu 30 minut a 85°C po dobu 5 minut.
- Získaná cDNA byla uchovávána při -20°C po dobu maximálně 1 měsíce.

Tabulka 9: Složení reakční směsi pro reverzní transkripci vzorků RNA izolované z ovlivněných buněk myelomových linií (nebo nesortované buněčné populace získané od pacientů MGUS a MM (aspiráty kostní dřeně).

Položka	Objem pro jeden test [μl]	Výsledná koncentrace
5x Transcriptor reverse pufr	4,0	1x
Deoxynukleotidy ($10 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$)	0,5	$0,2 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$
Transcriptor reverse transkriptáza s obsahem inhibitorů RNase	1,0	
Celkem (+ 13 μl z předchozího kroku)	20	

4.5.3 Kvantitativní RT-PCR

Pro stanovení exprese genů *TET1*, *TET2* a *TET3* pomocí kvantitativní RT-PCR (qPCR) byl použit Xceed qPCR Probe 2x Mix Lo-ROX (Institute of applied biotechnologies) a cDNA získaná přepisem z RNA ovlivněných buněk dvou myelomových linií nebo RNA izolované z nesortované populace buněk aspirátů kostní dřeně od pacientů MGUS a MM. Byly připraveny dva typy reakčních směsí lišících se použitými primery. První pár primerů byl specifický pro promotorové oblasti analyzovaných genů, druhý pár pro kódující oblasti genů. Použité sondy obsahovaly primery pro kódující sekvence analyzovaných genů.

- Práce byla prováděna ve sterilních podmínkách boxu s možností záření UV.
- Pro analyzované geny byla připravena reakční směs qPCR obsahující jednotlivé komponenty (viz Tabulka 10).
- Reakční směs pro jednotlivé geny byla rozpipetována po 19 μl do 96-ti jamkové destičky.
- Do každé jamky byl ve dvou opakováních přidán 1 μl cDNA.
- Destička byla zalepena fólií a centrifugována při 1000 g po dobu 1 minuty.
- Amplifikace cDNA probíhala pomocí přístroje Light-Cycler®480 System (Roche, Basel, Švýcarsko) podle podmínek uvedených v Tabulce 11.

Tabulka 10: Složení reakční směsi qPCR pro expresní analýzu genů *TET1*, *TET2* a *TET3* u primerů specifických pro promotorové sekvence těchto genů.

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

Tabulka 11: Teplotní profil qPCR pro stanovení exprese genů *TET1*, *TET2* a *TET3*.

Proces	Teplota [$^{\circ}\text{C}$]	Čas	Počet cyklů
Aktivace polymerázy	95	2 min	1
Denaturace	95	5 s	45
Nasednutí primerů a elongace	60	25 s	

5 Výsledky

Experimentální část diplomové práce byla zaměřena na analýzu vlivu demetylačních činidel při tvorbě komplexů transkripčních faktorů Sp1 nebo Sp3, a demetylačních enzymů TET1, TET2 a TET3 u ovlivněných myelomových buněk. Buňky linie KMS12-PE byly ovlivněny po dobu 72 hodin demetylačními činidly 5-Aza-2'-deoxycytidin (DAC) a 5-Azacytidin (AZA). Zastoupení jednotlivých genů *TET* v úseku s GC-boxy jejich promotorových oblastí v komplexu se sledovanými transkripčními faktory bylo stanoveno pomocí chromatinové imunoprecipitace s protilátkami Anti-Sp1 a Anti-Sp3, a kvantifikováno RT-PCR.

Dalším cílem diplomové práce bylo stanovení procentuálního zastoupení 5-methylcytosinu a 5-hydroxymethylcytosinu v sekvenci CCGG v promotorovém úseku genů *TET1*, *TET2* a *TET3*. Pro metylační a hydroxymetylační analýzu byly použity myelomové linie KMS12-PE a KMS12-BM po 72 hodinovém ovlivnění demetylačními činidly 5-Aza-2'-deoxycytidin a 5-Azacytidin.

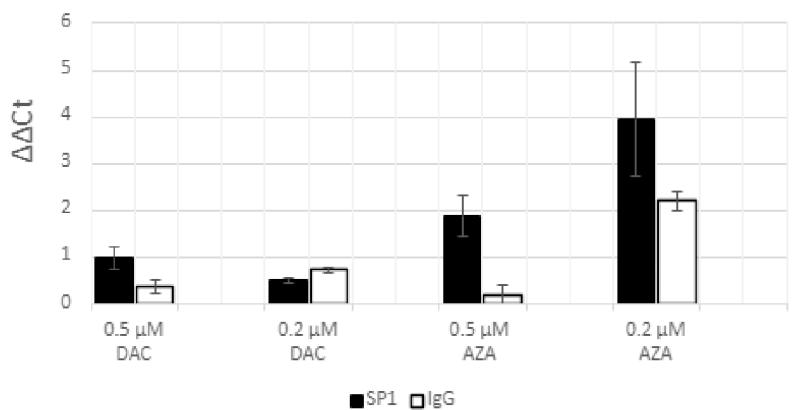
5.1 Zastoupení genů TET v komplexu s transkripčními faktory Sp1 a Sp3

Buňky linie KMS12-PE byly ovlivněny 0,5 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a 0,2 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ roztoky DAC a AZA podle pracovního postupu (viz kapitola 4.3.1.). Získaný chromatinový lyzát byl po sonikaci precipitován s Anti-Sp1 nebo Anti-Sp3 protilátkami, jako negativní kontrola sloužil králičí IgG. Z precipitátového komplexu byla izolována DNA, která byla následně přečištěna pomocí QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden, Německo). Koncentrace a čistota precipitované DNA byla stanovena v rozmezí 25,6–50,8 $\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$. Parametrem pro určení kvality izolované DNA byl poměr absorbancí při 260 a 280 nm, ten u vzorků pocházejících z buněčné linie KMS12-PE činil 1,71–1,92.

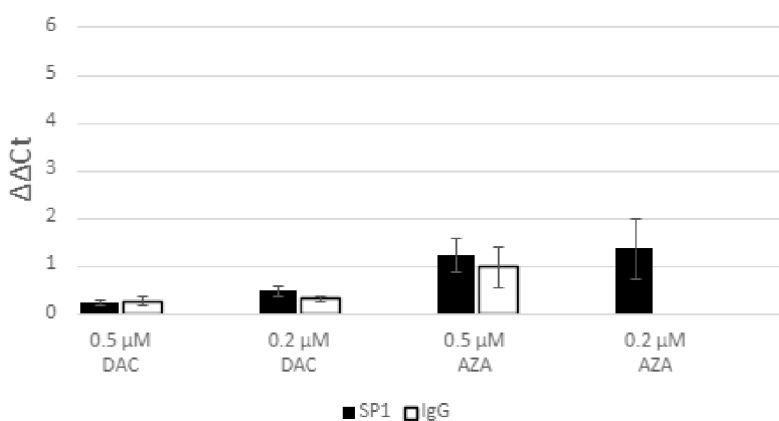
Pomocí RT-PCR bylo kvantifikováno zastoupení genů *TET1*, *TET2* a *TET3* v komplexu s transkripčními faktory Sp1 nebo Sp3. Zastoupení genů *TET* v komplexu s transkripčními faktory bylo specifikováno na promotorovou oblast těchto genů za použití primerů specifických pro promotorové oblasti jednotlivých genů. Jako „housekeeping“ gen byl použit β 2-mikroglobulin.

Výsledkem ChIP analýzy bylo relativní zvýšení výskytu genu *TET1* (sekvence DNA promotorového úseku) v komplexu s transkripčním faktorem Sp1 po ovlivnění 0,5 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ AZA a 0,2 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ AZA (Obrázek 2). Normalizovaná hodnota zastoupení promotorového úseku genu *TET1* u ovlivnění 0,5 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ AZA činí 1,891, u ovlivnění 0,2 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ AZA je 3,963. Nicméně, porovnáním s relativními hodnotami počtu kopií cílené promotorové sekvence genu *TET1* u obou ovlivnění DAC (0,977 - 0,5 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ DAC, 0,501 - 0,2 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ DAC) byly zvýšené relativní hodnoty po ovlivnění AZA statisticky neprůkazné (Mann-Whitney test). Rovněž po ovlivnění 5-Azacytidinem (0,5 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a 0,2 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) relativní hladina zastoupení promotorového úseku genů *TET2* a *TET3* vykazovala zvýšené hodnoty ve srovnání s relativními hodnotami po ovlivnění 5-Aza-2'-deoxycytidin (Obrázek 3 a Obrázek 4). V případě genu *TET3* a ovlivnění 0,2 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ AZA, kdy hodnota $\Delta\Delta\text{Ct}$ se rovnala 2,00, ale negativní kontrola (IgG) nebyla stanovena, nebylo možné provést vyhodnocení. Na

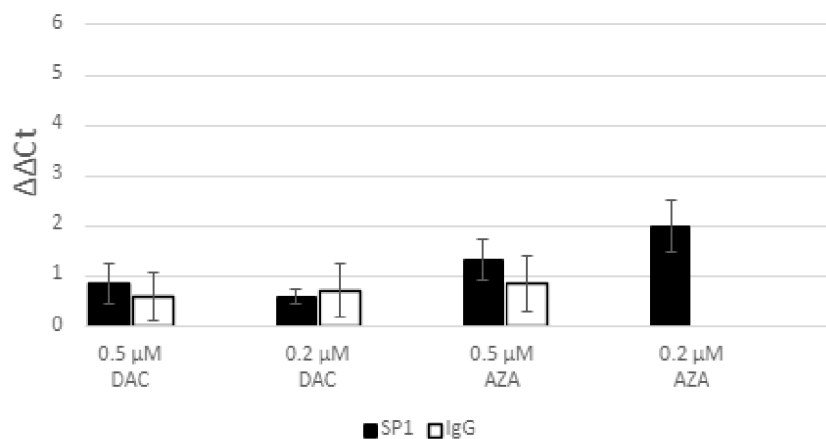
rozdíl od transkripčního faktoru Sp1, v precipitovaném komplexu s transkripčním faktorem Sp3 byly detekovány normalizované hodnoty zastoupení promotorového úseku analyzovaných genů TET1, TET2 a TET3 nižší než 1,000 (Obrázek 5, Obrázek 6 a Obrázek 7).



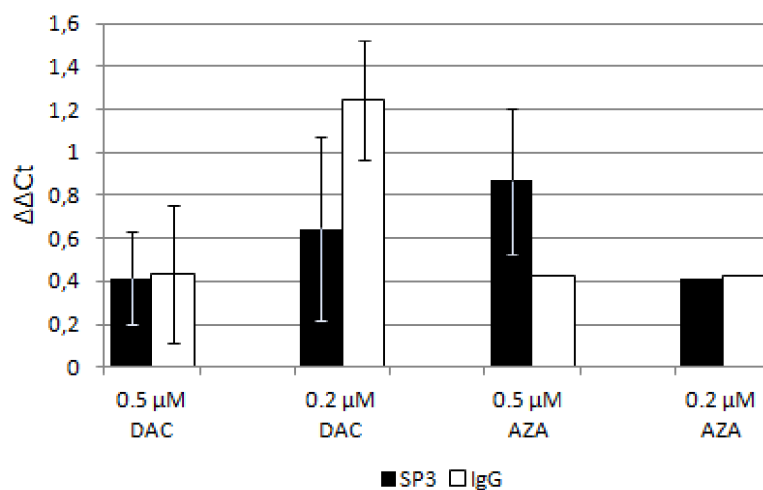
Obrázek 2: Relativní hodnoty zastoupení promotorového úseku TET1 v komplexu s transkripčním faktorem Sp1 u myelomových buněk linie KMS12-PE v porovnání s kontrolním IgG.



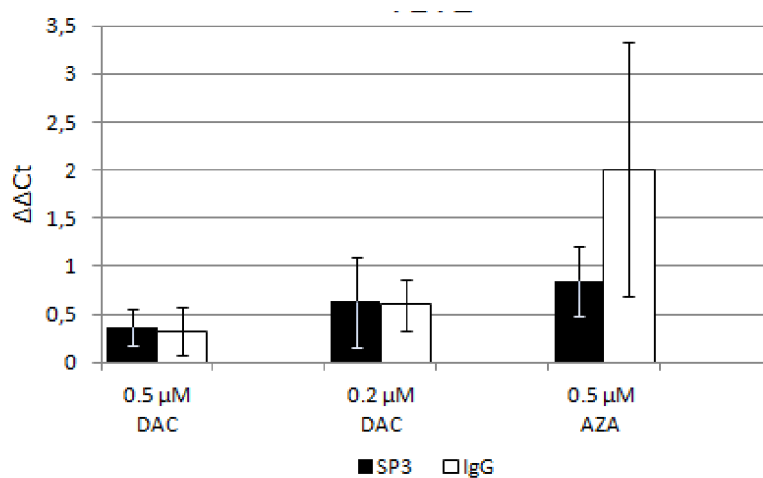
Obrázek 3: Relativní hodnoty zastoupení promotorového úseku TET2 v komplexu s transkripčním faktorem Sp1 u myelomových buněk linie KMS12-PE v porovnání s kontrolním IgG.



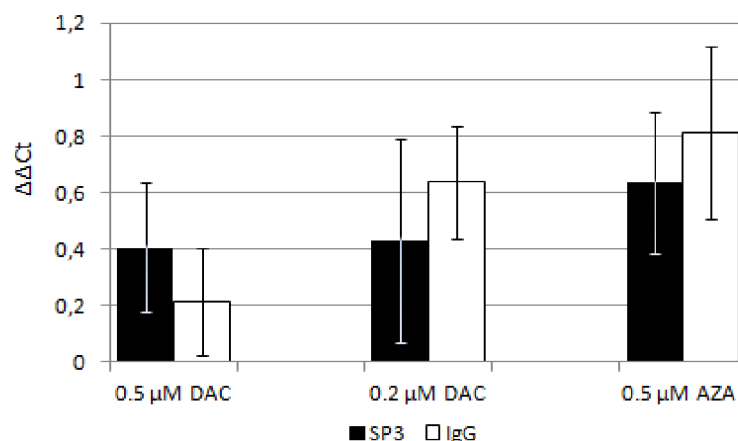
Obrázek 4: Relativní hodnoty zastoupení promotorového úseku TET3 v komplexu s transkripčním faktorem Sp1 u myelomových buněk linie KMS12-PE v porovnání s kontrolním IgG.



Obrázek 5: Relativní hodnoty zastoupení promotorového úseku TET1 v komplexu s transkripčním faktorem Sp3 u myelomových buněk linie KMS12-PE v porovnání s kontrolním IgG.



Obrázek 6: Relativní hodnoty zastoupení promotorového úseku TET2 v komplexu s transkripčním faktorem Sp3 u myelomových buněk linie KMS12-PE v porovnání s kontrolním IgG.



Obrázek 7: Relativní hodnoty zastoupení promotorového úseku *TET3* v komplexu s transkripčním faktorem Sp3 u myelomových buněk linie KMS12-PE v porovnání s kontrolním IgG.

5.2 Stanovení procentického zastoupení 5-mC a 5-hmC v promotoru genů *TET1*, *TET2* a *TET3*

Pro stanovení procentuálního zastoupení 5-metylcytosinu (5-mC) a 5-hydroxymetylcytosinu (5-hmC) v CCGG sekvenci promotorové oblasti genů *TET1*, *TET2* a *TET3* byla použita DNA izolovaná z buněk myelomových linií KMS12-PE a KMS12-BM ovlivněných demetylačními činidly - 0,5 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a 0,2 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ DAC, a 0,5 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a 0,2 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ AZA (kapitola 4.5). Koncentrace izolované DNA se pohybovaly v rozmezí 639,8–1 792,6 $\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$, poměr absorbancí při 260 a 280 nm činil 2,07–2,1. Hladina 5-mC a 5-hmC byla určena na základě postupu kitu EpiMark 5-hmC and 5-mC Analysis Kit (Epigentek, Inc., Farmingdale, NY, U.S.A.). Pro výpočet procentického zastoupení 5-mC a 5-hmC byly použity následující vzorce s dosazenými hodnotami C_t jednotlivých vzorků (Tabulka 12):

$$5\text{-mC (\%)} = [H1 - M2 \cdot (C1 / C2)] / C1 \cdot 100$$

$$5\text{-hmC (\%)} = [M2 \cdot (C1 / C2) - M1] / C1 \cdot 100$$

M2 = zkumavka č. 1 (T4-BGT, MspI) obsahující DNA štěpenou v sekvenci CCGG s nemodifikovaným cytosinem nebo 5-mC;

H2 = zkumavka č. 2 (T4-BGT, HpaII) obsahující DNA štěpenou v sekvenci CCGG s nemodifikovaným cytosinem;

C2 = zkumavka č. 3 (T4-BGT) obsahující kontrolní neštěpenou DNA;

M1 = zkumavka č. 4 (MspI) obsahující DNA štěpenou v sekvenci CCGG s nemodifikovaným cytosinem, 5-mC nebo 5-hmC;

H1 = zkumavka č. 5 (HpaII) obsahující DNA štěpenou v CCGG sekvencích s nemodifikovaným cytosinem;

C = zkumavka č. 6 (žádný enzym) obsahující kontrolní neštěpenou DNA.

Tabulka 12: Výchozí hodnoty pro procentuální výpočet 5-mC a 5-hmC v promotorovém úseku genu *TET2* o velikosti 236 bp u vzorku M24 (nově diagnostikovaný pacient MM) a vzorku M31 (MGUS). DNA byla izolovaná z buněk nesortované populace.

Vzorek	Pacient Diagnoza	Cílový gen	Hodnota Ct/ referenč. gen	Hodnota Ct/ cílový gen	Relativní hodnota $\Delta\Delta Ct$
M24/3	Nově diagn. MM	TET2_CTRL	23,832 M2	23,481 M1	1,00
M24/1		TET2_CTRL	26,915 H2	26,905 H1	1,267 (5-hmC)
M24/2		TET2_CTRL	23,811 C2	24,359 C1	1,866 (5-hmC + 5-mC)
M31/3	MGUS	TET2_CTRL	21,516 M2	21,528 M1	1,000
M31/2		TET2_CTRL	24,720 H2	24,633 H1	0,934 (5-hmC)
M31/2		TET2_CTRL	22,121 C2	22,800 C1	1,588 (5-hmC + 5-mC)

Získané procentuální hodnoty hladin 5-mC a 5-hmC jsou uvedeny v Tabulce 12. U myelomových buněk linie KMS12-PE byly metylace detekovány v CCGG sekvenci promotorových úseků všech tří genů *TET*. U genu *TET1* byla stanovena procentická hodnota 5-mC 3,14 % u ovlivnění 0,5 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ AZA. Naproti tomu, procentické hodnoty 5-mC genů *TET2* a *TET3* se pohybovaly v rozmezí 8,19 %–3,11 % pro gen *TET2*, a 9,13 %–11,28 % pro gen *TET3*, a významně se nelišily od procentických hodnot u kontrolních buněk (DMSO). V promotorové CCGG sekvenci genů *TET1* a *TET3* byly stanoveny hydroxymetylační změny (5-hmC) - procentické hodnoty 5,81 % 5-hmC u DMSO genu *TET1* a 4,01 % u DMSO genu *TET3*. Procentické hodnoty 5-hmC pro promotorou oblast genu *TET1* při ovlivnění 0,5 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ DAC a 0,2 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ AZA nemohly být vyhodnoceny

Rovněž buněčná linie KMS12-BM vykazovala zvýšené hladiny metylace (5-mC) detekované v promotorových CCGG sekvencích u všech tří genů *TET*, ale bez významnějších rozdílů při porovnání s procentickými hodnotami stanovenými u kontrolních neovlivněných buněk (DMSO). Rozsah 6,32 %–11,99 % 5-mC u genu *TET1* vykazoval nižší procentické hodnoty při srovnání s hodnotami 12,74 %–18,55 % u genu *TET2*, a 17,41 %–19,32 % u genu *TET3*. Změny v hydroxymetylacích byly u genu *TET1* detekovány po ovlivnění buněk 0,2 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ DAC (6,67 % 5-hmC) a 0,2 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ AZA (0,12 % 5-hmC) při porovnání s 1,72 % 5-hmC u kontrolního ovlivnění (DMSO) (Tabulka 13).

Tabulka 13: Porovnání poměru procentuálního zastoupení 5-mC a 5-hmC analyzovaných promotorových sekvencí genů *TET1*, *TET2* a *TET3* mezi liniemi KMS12-PE a KMS12-BM ovlivněnými demetylačními činidly.

	Ovlivnění [$\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$]	KMS12-PE	KMS12-BM
		5-mC/5-hmC (%)	5-mC/5-hmC (%)
TET1 (175 bp)	DMSO	0,46/ 5,81	4,24/ 1,72
	0,5 DAC	N/ A	6,32/ 0,00
	0,2 DAC	0,00/ 0,00	0,00/ 6,67
	0,5 AZA	3,14/ 0,00	11,99/ 0,00
	0,2 AZA	N/ A	8,31/ 0,12
TET2 (241 bp)	DMSO	11,54/ 0,00	N/ A
	0,5 DAC	11,65/ 0,00	13,28/ 0,00
	0,2 DAC	13,10/ 0,00	12,74/ 0,00
	0,5 AZA	13,11/ 0,00	18,55/ 0,00
	0,2 AZA	8,19/ 0,97	13,28/ 0,00
TET3 (160 bp)	DMSO	8,88/ 4,01	14,03/ 0,52
	0,5 DAC	10,37/ 1,05	18,48/ 0,00
	0,2 DAC	10,65/ 0,00	19,34/ 0,00
	0,5 AZA	11,28/ 0,00	17,41/ 0,00
	0,2 AZA	9,13/ 0,00	17,61/ 0,00

5.3 Expresní profil genů *TET1*, *TET2* a *TET3* po ovlivnění demetylačními činidly

Koncentrace RNA izolované z ovlivněných buněk linie KMS12-PE dosahovala hodnot 31,6–504,5 $\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ a absorbance při 260/280 nm byla 1,75–2,07, zatímco koncentrace RNA izolované z ovlivněných buněk linie KMS12-BM činila 112,5 – 752,1 $\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ a absorbance při 260/280 byla 1,85–1,93. Následně byla provedena RT-PCR pomocí Transcription First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche, Basel, Švýcarsko). Hladina exprese genů *TET1*, *TE2* a *TET3* byla kvantifikována pomocí qPCR, jako „housekeeping“ gen byl použit β 2-mikroglobulin. Exprese byla následně vypočítána pomocí Livakova vzorce $2^{-\Delta\Delta C_t}$ za předpokladu, že účinnost amplifikace cílového i referenčního genu se blížila 100 %. Vzorčky byly nanášeny v duplikátech.

U buněk ovlivněných použitými demetylačními činidly - 0,5 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a 0,2 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ DAC, a 0,5 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a 0,2 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ AZA, obou buněčných linií jsme detekovali signifikantně vyšší normalizované hodnoty exprese genu *TET2* v porovnání s normalizovanými hodnotami exprese genů *TET1* a *TET3* při hladinách významosti $P < 0,01$ a $P < 0,001$ (Tabulka 14).

Tabulka 14: Expresní profil genů *TET1*, *TET2* a *TET3* u buněk myelomových linií KMS12-PE a KMS12-BM po ovlivnění DAC ($0,5 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a $0,2 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) a AZA ($0,5 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a $0,2 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$). Statistická významnost byla stanovena pomocí nepárového Studentova t-testu s Bonferroniho korekcí. *P < 0,05, **P < 0,01; ***P < 0,001.

Ovlivnění [$\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$]	TET1	TET2	TET3
KMS12-PE			
0,5 DAC	1,081±0,11	4,099±0,7***(p<0,004)	0,774±0,29
0,2 DAC	0,752±0,11	1,578±0,92**(p<0,04)	0,481±0,15
0,5 AZA	0,949±0,09	3,574±0,37***(p<0,004)	0,541±0,22
0,2 AZA	1,580±0,18**(p<0,004)	3,934±0,06**(p=0,009)	0,708±0,22
KMS12-BM			
0,5 DAC	0,649±0,05	1,506±0,08**(p<0,004)	0,515±0,05
0,2 DAC	1,428±0,05	3,823±0,18***(p<0,004)	1,147±0,13
0,5 AZA	1,089±0,01	1,614±0,14**(p=0,0041)	0,947±0,10
0,2 AZA	0,936±0,06	1,559±0,14**(p<0,004)	0,963±0,13

Analýza expresního profilu genů *TET1*, *TET2* a *TET3* byla dále provedena s použitím primerů specifických pro promotorou oblast genů a sondy obsahující primery cílené na kódující oblast genů. Stanovení expresního profilů genů *TET1*, *TET2* a *TET3* tímto způsobem bylo provedeno za účelem srovnání úrovní relativní exprese genů *TET* a procentických hodnot 5-mC a 5-hmC stanovených lokální metylační a hydroxymetylační analýzou jejich promotorových úseků. Jednotlivé typy ovlivnění a výsledné hodnoty exprese jsou uvedeny v Tabulce 12. Zvýšené normalizované hodnoty exprese genů *TET2* jsou u obou experimentů srovnatelné a nevykazují statisticky signifikantní rozdíl. Normalizovaná hodnota hladiny exprese genu *TET2* byla vyhodnocena jako signifikantně zvýšená v porovnání s normalizovanými hodnotami exprese genů *TET1* a *TET3* při hladinách významnosti P<0,01 a P<0,05. Normalizované hodnoty exprese všech analyzovaných genů *TET* u buněčné linie KMS12-BM, po ovlivnění $0,2 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ AZA nebylo možno vyhodnotit (Tabulka 15).

Tabulka 15: Expresní profil genů *TET1*, *TET2* a *TET3* u myelomových linií KMS12-PE a KMS12-BM po ovlivnění DAC ($0,5 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a $0,2 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) a AZA ($0,5 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a $0,2 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) za použití primerů cílených na promotorové oblasti genů. Statistická významnost byla stanovena pomocí nepárového Studentova t-testu s Bonferroniho korekcí. *P <0,05, **P <0,01; ***P <0,001.

Ovlivnění [$\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$]	TET1	TET2	TET3
KMS12-PE			
0,5 DAC	1,398±0,12	3,755±0,13***($p<0,004$)	0,985±0,17
0,2 DAC	1,121±0,13	3,550±0,11***($p<0,004$)	0,469±0,09
0,5 AZA	1,079±0,13	2,6608±0,33***($p<0,004$)	1,035±0,18
0,2 AZA	1,321±0,16	5,146±0,29***($p<0,004$)	1,005±0,19
KMS12-BM			
0,5 DAC	0,810±0,28	1,707±0,49**($p<0,04$)	0,525±0,09
0,2 DAC	1,034±0,06	2,151±0,15***($p=0,001$)	0,675±0,03
0,5 AZA	1,096±0,04	1,511±0,16**($p<0,04$)	0,874±0,03
0,2 AZA	N/A	N/A	N/A

5.4 Porovnání procentuálního zastoupení 5-mC a 5-hmC v promotoru genů TET1, TET2 a TET 3 s jejich expresí u patientských vzorků

Pro stanovení procentuálního zastoupení 5-metylcytosinu (5-mC) a 5-hydroxymetylcytosinu (5-hmC) v CCGG sekvenci promotorové oblasti genů *TET1*, *TET2* a *TET3* byla použita DNA izolovaná z nesortované buněčné populace aspirátu kostní dřene 7 jedinců MGUS a 2 nově diagnostikovaných pacientů MM, jelikož izolace nukleových kyselin ze sortované populace buněk aspirátu kostní dřene pacientů MM nebyla dostatečná nejen pro nízký počet pacientů MM, ale zejména z důvodu potřeby současného provedení expresních a metylačních analýz. Koncentrace izolované DNA se pohybovaly v rozmezí $13,2\text{--}180,1 \text{ ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$, poměr absorbancí při 260 a 280 nm činil 1,56–1,98. Hladina 5-mC a 5-hmC byla určena na základě postupu kitu EpiMark 5-hmC and 5-mC Analysis Kit (Epigentek, Inc., Farmingdale, NY, U.S.A.). Získané procentuální hodnoty hladin 5-mC a 5-hmC jsou uvedeny v Tabulce 16.

U pacientů MGUS byly metylace v promotorové oblasti genu *TET1* detekovány u vzorků M73 a M74, přítomnost hydroxymetylačních změn byla detekována u vzorku M74. Porovnáním s procentickým zastoupením 5-mC a 5-hmC u MGUS a dvou nově diagnostikovaných pacientů MM, dosahovaly nízkých hodnot. V promotorové sekvenci genu *TET2* byly metylační změny detekovány ve všech případech, kromě vzorku M31, hydroxymetylace byla zjištěna u vzorků M60 a M74. V případě genu *TET3* byly pozorovány metylační i hydroxymetylační změny u všech analyzovaných vzorků, přičemž u pacientů MGUS rozmezí procentických hodnot 5-mC 6,50 – 18,12, a 5-mC 0,70 – 9,32 přesahovalo rozmezí procentických hodnot 5-mC a 5-hmC u genů *TET1* a *TET2*. U některých

vzorků nemohly být hladiny metylačních a hydroxymetylačních změn vyhodnoceny, a proto nebyly zařazeny do výsledků.

Dva námi analyzované vzorky nesortované buněčné populace nově diagnostikovaných pacientů M24 a M56 vykazovaly metylační změny v CCGG sekvenci promotorových úseků všech tří genů *TET*. Hydroxymetylační změny, tedy přítomnost 5-hmC byla detekována u genu *TET2* u obou vzorků, a u genu *TET3* u vzorku M56 (0,40 %). Gen *TET1* tedy vykazoval v porovnání s geny *TET2* a *TET3* menší zastoupení metylačních i hydroxymetylačních změn jak u pacientů MGUS, tak nově diagnostikovaných pacientů mnohočetného myelomu (Tabulka 16).

Tabulka 16: Porovnání procentuálního zastoupení 5-mC a 5-hmC analyzovaných promotorových sekvencí genů *TET1*, *TET2* a *TET3* mezi pacienty MGUS a nově diagnostikovanými pacienty MM (nesortovaná buněčná populace).

	MGUS (nesortované)	Nově diagnostikovaní MM pacienti (nesortované)
	5-mC/ 5-hmC (%)	5-mC/ 5-hmC (%)
TET1 (175 bp)	0,00/ 0,00 (M14)	
	0,00/ 0,00 (M31)	5,22/ 0,00 (M24)
	0,00 /0,00 (M34)	2,26/ 0,00 (M56)
	8,51/ 0,00 (M73)	
	2,10/ 2,31 (M74)	
TET2 (241 bp)	14,70/ 0,00 (M14)	
	0,00/ 0,00 (M31)	10,36/ 3,70 (M24)
	8,16/ 1,82 (M60)	8,50/ 2,30 (M56)
	16,64/ 0,00 (M73)	
	2,06/ 1,26 (M74)	
TET3 (160 bp)	15,80/ 0,00 (M112)	
	15,65/ 1,03 (M14)	
	6,50/ 0,70 (M34)	22,08/ 0,00 (M24)
	11,10/ 1,60 (M73)	27,61/ 0,40 (M56)
	18,12/ 9,32 (M71)	
	7,57/ 3,14 (M74)	
	4,95/ 2,61 (M112)	

Legenda: 5-mC - 5-metylcytosin, 5-hmC - 5-hydroxymetylcytosin, MGUS - monoklonální gamapatie nejasného významu, M14–M112 - vzorky pacientů.

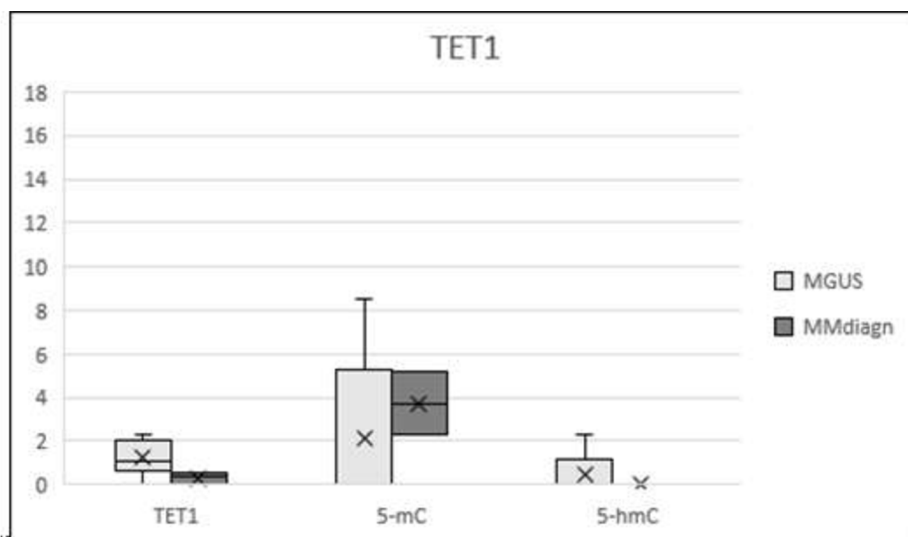
Analýza expresního profilu genů *TET1*, *TET2* a *TET3* byla provedena v případě vzorků MGUS M14, M31, M34, M74 a u nově diagnostikovaných pacientů M24 a M56. Koncentrace RNA dosahovala hodnot 61,4 – 546,6 ng·μl⁻¹ a absorbance při 260/280 byla v rozmezí 1,54–1,95. RT-PCR byla následně provedena pomocí Transcription First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche, Basel, Švýcarsko). Hladina exprese genů *TET1*, *TE2* a *TET3* byla kvantifikována pomocí qPCR, jako „housekeeping“ gen byl použit β2-mikroglobulin. Hladiny detekovaných relativních expresí jsou uvedeny v Tabulce 17.

Normalizované hodnoty exprese vyšší než u patientských vzorků MGUS byly pozorovány u všech genů *TET* a to i přesto, že byla ve všech případech detekovaná metylace CCGG promotorových sekvencí. Srovnání relativních hladin exprese genů *TET* s jejich metylačními a hydroxymetylačními hladinami viz Obrázek 8., Obrázek 9 a Obrázek 10.

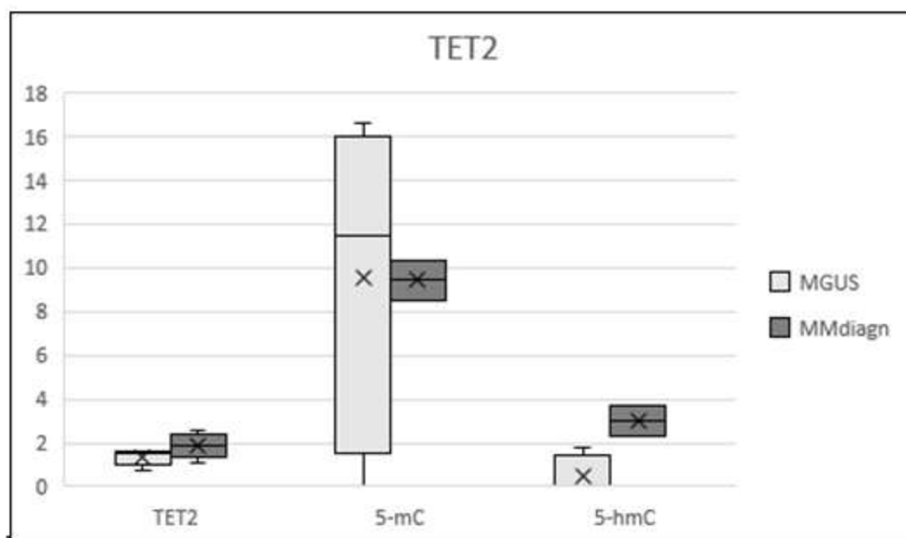
Tabulka 17: Porovnání relativních genových expresí TET1, TET2 a TET3 mezi pacienty MGUS a nově diagnostikovanými pacienty MM (nesortovaná buněčná populace).

	MGUS (nesortované)	Nově diagnostikovaní MM pacienti (nesortované)
	$\Delta\Delta Ct$	$\Delta\Delta Ct$
TET1 (175 bp)	0,39; 0,51* ; 0,98 (M14) 1,20* (M31) 1,98 (M34) 2,10; 2,31 (M74)	0,36 (M24) 0,53 (M56)
TET2 (241 bp)	1,60; 1,49 (M14) 1,59* (M31) 1,31; 0,75 (M34)	2,31; 1,87* (M24) 1,10; 2,56; 1,55* (M56)
TET3 (160 bp)	1,27; 1,09 (M14) 1,06* (M31) 1,93; 3,95; 2,53 (M34)	1,78 (M24) 2,01 (M56)

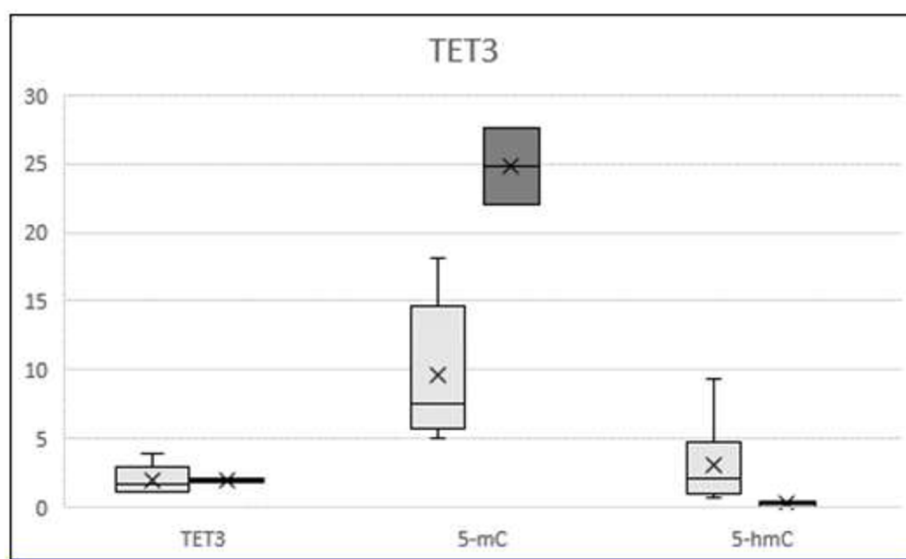
Legenda: * Hodnoty genové exprese získané postupem uvedeným v Tabulce 12.



Obrázek 8: Porovnání normalizovaných hodnot exprese genuů TET1, TET2 a TET3 s procentickými hodnotami 5-mC a 5-hmC stanovených v CCGG sekvenci jejich promotorových úseků u pacientů MGUS a nově diagnostikovaných pacientů MM (nesortovaná buněčná populace).



Obrázek 9: Porovnání normalizovaných hodnot exprese genu TET2 s procentickými hodnotami 5-mC a 5-hmC stanovených v CCGG sekvenci jejich promotorových úseků u pacientů MGUS a nově diagnostikovaných pacientů MM (nesortovaná buněčná populace).



Obrázek 10: Porovnání normalizovaných hodnot exprese genu TET3 s procentickými hodnotami 5-mC a 5-hmC stanovených v CCGG sekvenci jejich promotorových úseků u pacientů MGUS a nově diagnostikovaných pacientů MM (nesortovaná buněčná populace).

6 Diskuze

Cílem diplomové práce bylo popsání úlohy transkripčních faktorů Sp1 a Sp3 v aktivním demetylačním procesu buněk mnohočetného myelomu a stanovení procentického zastoupení 5-mC (5-metylcytosin) a 5-hmC (5-hydroxymetylcytosin) v promotorových oblastech genů *TET1*, *TET2* a *TET3*. Zvýšené hladiny transkripčních faktorů Sp1 a Sp3 byly pozorovány u různých typů nádorových onemocnění (Chuang a kol., 2009; Kong a kol., 2010), avšak jejich úloha, v případě mnohočetného myelomu, dosud nebyla detailně popsána. Pro práci byly využity myelomové linie KMS12-PE a KMS12-BM ovlivněné demetylačními činidly 5-Azacytidin (AZA) a 5-Aza-2'-deoxycytidin (DAC), z nichž 5-Aza-2'-deoxycytidin prokazuje terapeutickou účinnost u akutní myeloidní leukémie (Berthon a kol., 2020) a v klinických studiích u mnohočetného myelomu (Berthon a kol., 2020; Shoumariyeh a kol., 2021).

Buňky linie KMS12-PE, ovlivněné $0,5\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a $0,2\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ roztoky DAC a AZA, byly použity k detekci a kvantifikaci zastoupení genů *TET1*, *TET2* a *TET3* v komplexu s transkripčními faktory Sp1 nebo Sp3, které bylo specifikováno na promotorovou oblast těchto genů za použití primerů specifických pro promotorové úseky jednotlivých genů. Poměrně problémová se ukázala izolace DNA ze sonikovaného chromatinového lyzátu, kdy hodnoty koncentrace dosahovaly poměrně nízkých hodnot, a to $25,6\text{--}50,8\text{ ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$. Pro další práci a potvrzení získaných hodnot by mohly pomoci další modifikace metodického postupu. Analýza metodou ChIP prokázala relativní zvýšení výskytu genu *TET1* (sekvence promotorového úseku) v komplexu s transkripčním faktorem Sp1 po ovlivnění $0,5\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ AZA a $0,2\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ AZA, kdy normalizované hodnoty činily u ovlivnění $0,5\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ AZA 1,891 a u ovlivnění $0,2\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ AZA 3,963. Sp1 je tedy po ovlivnění demetylačními činidly, přednostně 5-Azacytidinem, schopna vázat se do promotorové oblasti *TET1* a potenciálně přispívat k jeho transkripci. Nicméně, srovnáním s relativními hodnotami vzorků po ovlivnění DAC ($0,977 - 0,5\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ DAC, $0,502 - 0,2\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ DAC) byly zvýšené relativní hodnoty po ovlivnění AZA statisticky neprůkazné (Obrázek 2). Ze získaných výsledků je také patrné, že v porovnání s 5'-Aza-2-deoxycytidinem je 5-Azacytin účinnější, a to i potvrzením specifčnosti vazby promotorových úseků všech námi analyzovaných genů *TET* s transkripčním faktorem Sp1. V případě transkripčního faktoru Sp3 byly normalizované hodnoty výskytu promotorového úseku genů *TET* nižší než 1,000 (Obrázek 5, Obrázek 6, Obrázek 7), což poukazuje na jeho menší nebo žádné zastoupení v komplexech s promotory analyzovaných genu porovnáním se Sp1, a předpokládanou represivní funkci Sp3 v transkripci cílených genů. Problémem se v některých případech ukázalo také použití IgG jako negativní kontroly (Obrázek 5), kdy v některých případech relativní hodnoty dosahovaly až extrémního převýšení hodnoty 1,000. Pro další analýzu by tedy bylo vhodné zvážit použití jiného srovnatelného typu negativní kontroly, případně modifikovat tuto část metodického postupu použitím tzv. inputu.

Zvýšená hladina metylace v oblastech promotorových úseků genů nádorových supresorů vede ke snížené expresi těchto genů (Esteller, 2008; Smith a Meissner, 2013; Wen a kol., 2022). Pro stanovení vlivu demetylačních činidel na výskyt 5-mC a 5-hmC v promotorových úsecích genů *TET* byla použita DNA izolovaná z buněk myelomových linií KMS12-PE a KMS12-BM ovlivněných výše uvedenými demetylačními činidly v koncentracích 0,5 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a 0,2 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Předmětem metylační a hydroxymetylační analýzy byly CCGG úseky v promotorové oblasti genů *TET1*, *TET2* a *TET3*. Methylace, tedy zastoupení 5-metylcytosinu v analyzované sekvenci DNA byly detekovány u ovlivněných buněk obou myelomových linií (Tabulka 13). Vyšší hladiny metylace byly pozorovány zejména u genů *TET2* (12,74 %-18,55 %) a *TET3* (17,41 %-19,32 %), které se však významně neodlišovaly od procentických hodnot kontrolních buněk (DMSO). Na rozdíl od buněk linie KMS12-PE, byly u buněk KMS12-BM detekovány změny v procentickém zastoupení 5-hmC při porovnání s 1,72 % 5-hmC u kontrolního ovlivnění (DMSO); konkrétně u genu *TET1* po ovlivnění buněk 0,2 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ DAC (6,67 % 5-hmC) a 0,2 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ AZA (0,12 % 5-hmC). Důležitým faktorem při hodnocení hladin 5-mC a 5-hmC mohou být počty CCGG míst v promotorové sekvenci analyzovaných genů. U genu *TET1* obsahuje analyzovaný promotorový úsek čtyři CCGG místa, která mohou být metylována - hydroxymetylována, zatímco u genů *TET2* a *TET3* obsahovali cílené promotorové sekvence po jednom úseku CCGG. Pro potvrzení detekovaných metylačních a hydroxymetylačních změn u ovlivněných myelomových buněk i vzorků DNA pacientů s mnohočetným myelomem by mohly být navrženy primery pro promotorové sekvence s větším počtem míst CCGG a nebo provedena detailnější metylační analýza například typu pyrosekvenování.

Na základě námi provedené ChIP analýzy jsme předpokládali u ovlivněných myelomových buněk zvýšenou expresi genu *TET1*. Signifikantní zvýšení exprese však bylo zjištěno u genu *TET2* a to u buněk linie KMS12-PE, tak i KMS12-BM, u všech ovlivněných DAC (0,5 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a 0,2 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) i AZA (0,5 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a 0,2 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$). Normalizované hodnoty exprese genu *TET2* se pohybovaly v rozmezí 1,578–4,099 (KMS12-PE) a 1,506–3,823 (KMS12-BM) a vykazovaly vysokou statistickou významnost, která byla stanovena pomocí nepárového Studentova t-testu s Bonferroniho korekcí. Normalizované hodnoty exprese genů *TET1* a *TET3* byly zvýšené, ale v porovnání s hodnotami genu *TET2* stanovený rozdíl nebyl signifikantní. (Tabulka 15). Ovlivnění demetylačními činidly tedy vedlo k demetylaci promotorové sekvence genu *TET2*, což mohlo mít za následek zvýšení exprese genu *TET2*. To poukazuje na terapeutický účinek použitých činidel, jako v případě studie Shoumariyeh a kol. (2021).

Výsledky tedy naznačují, že u myelomových buněk po 72hodinovém ovlivnění použitými demetylačními činidly dochází k vazbě transkripčního faktoru Sp1 do oblasti promotoru genu *TET1*, která se ale neprojevuje zvýšením jeho exprese. Pro další studium úlohy transkripčního faktoru Sp1 v procesu demethylace u myelomových buněk a jeho schopnosti vázat se do promotorových oblastí genů *TET* by bylo vhodné provést experiment s prodlouženou dobou ovlivnění buněk demetylačními činidly a následnou analýzou ChIP.

Dalším cílem diplomové práce bylo stanovení procentických hodnot 5-mC a 5-hmC v sekvenci CCGG promotorové oblasti genů *TET1*, *TET2* a *TET3* a následná srovnávací expresní analýza těchto genů u pacientů s mnohočetným myelomem. Současné provedení metylačních a expresních analýz se ukázalo jako problémové z důvodu nízké výtěžnosti nukleových kyselin izolovaných ze vzorku sortované populace buněk. Z toho důvodu jsme zvolili vzorky nesortované buněčné populace, u kterých sice izolujeme dostatečné koncentrace nukleových kyselin, nevýhodou je ovšem kontaminace cílené populace plazmatických buněk jinými buněčnými typy. U pacientů MGUS byly v promotorové sekvenci genu *TET1*, stejně jako u analyzovaných myelomových linií, detekovány nižší hodnoty 5-mC v porovnání s geny *TET2* a *TET3* (Tabulka 14 a Tabulka 16). I přesto, že jsme si vědomi limitujících faktorů, které s sebou přináší použití nesortované populace buněk pro experimentální stanovení, vykazuje gen *TET1* v porovnání s geny *TET2* a *TET3* menší zastoupení metylačních i hydroxymetylačních změn jak u pacientů MGUS, tak nově diagnostikovaných pacientů mnohočetného myelomu, a může naznačovat fungující gen. Naproti tomu u genů *TET2* a *TET3*, jak u ovlivněných myelomových buněk, tak pacientů MGUS a MM, jsme zjistili v promotorových úsecích vyšší hodnoty 5-mC i 5-hmC (gen *TET2*) oproti genu *TET1* (Tabulka 16). Normalizované hodnoty exprese vyšší než hodnota 1,000 u některých patientských vzorků MGUS byly pozorovány u všech genů *TET* a to i přes to, že v těchto případech byla detekovaná metylace CCGG ve sledovaných promotorových sekvencích (např. M74; Tabulka 19 a Tabulka 17). U genů *TET2* a *TET3*, jak již bylo uvedeno, jsme na rozdíl od promotoru *TET1* však analyzovali vždy pouze jedno místo CCGG. U vzorku M74, v promotoru genu *TET1* jsme sice zaznamenali přítomnost 5-hmC (2,31 %; Tabulka 16), nicméně hydroxymetylační změny byly ve větším množství detekovány u pacientů MGUS v promotoru genu *TET3*, což může vysvětlovat vyšší hodnoty exprese (M34) ve srovnání s geny *TET1* a *TET 2* (Tabulka 17 a Obrázek 10).

7 Závěr

V rámci této diplomové práce byly analyzovány myelomové buněčné linie KMS12-PE a KMS12-BM ovlivněné demetylacemi činidly 5-Azacytidin (AZA) a 5-Aza-2'-deoxycytidin (DAC), a dále vzorky nesortované populace buněk pacientů mnohočetného myelomu (MM) a monoklonální gamapatie nejasného významu (MGUS). Experimentálně byla studována existence vazby transkripčních faktorů Sp1 a Sp3 v promotorových oblastech genů *TET* u ovlivněných myelomových linií. Lokální metylační a hydroxymetylační analýza promotorových oblastí genů byla provedena v návaznosti na stanovení exprese studovaných genů jak u ovlivněných myelomových linií, tak i vzorků MGUS a mnohočetného myelomu.

Výsledkem diplomové práce je detekce vazby genu *TET1* (sekvence promotorového úseku) v komplexu s transkripčním faktorem Sp1 po ovlivnění 0,5 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ AZA a 0,2 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ AZA, kdy normalizované hodnoty činily u ovlivnění 0,5 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ AZA 1,891 a u ovlivnění 0,2 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ AZA 3,963. Zdá se, že Sp1 je po ovlivnění demetylačními činidly, přednostně 5-Azacytidem, schopna vázat se do promotorové oblasti *TET1* a potenciálně tak přispívat k jeho transkripci, zatímco Sp3 se pravděpodobně neexpresi genů *TET* nepodílí nebo má represivní funkci. Metylace CCGG úseků, tedy zastoupení 5-metylcytosinu, v analyzované sekvenci promotoru genů *TET* byly detekovány po ovlivnění u obou analyzovaných buněčných linií, zejména u genů *TET2* (12,74 %–18,55 %) a *TET3* (17,41 %–19,32 %), které se však významně neodlišovaly od procentických hodnot kontrolních buněk. Limitujícím faktorem při hodnocení hladin 5-mC a 5-hmC mohou být počty CCGG míst v promotorové sekvenci analyzovaných genů, které byly u námi sledovaných promotorových úseků genů *TET2* a *TET3* ve srovnání s genem *TET1* v minimálním počtu.

V naší práci jsme detekovali signifikantní zvýšení exprese genu *TET2* u ovlivněných buněk linie KMS12-PE a KMS12-BM, u všech ovlivněních DAC (0,5 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a 0,2 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) i AZA (0,5 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a 0,2 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$). Normalizované hodnoty exprese genu *TET2* se pohybovaly v rozmezí 1,578–4,099 (KMS12-PE) a 1,506–3,823 (KMS12-BM). Ovlivnění demetylačními činidly tedy vedlo ke zvýšení exprese genu *TET2*. Výsledky naznačují, že Sp1 se po 72hodinovém ovlivnění sice váže do promotorové oblasti genu *TET1*, ale v tomto časovém intervalu nemá vliv na významné zvýšení exprese genu *TET1*.

Z lokální metylační a hydroxymetylační analýzy promotorových sekvencí vyplývá, že gen *TET1* vykazuje v porovnání s geny *TET2* a *TET3* menší zastoupení metylačních i hydroxymetylačních změn jak u pacientů MGUS, tak nově diagnostikovaných pacientů mnohočetného myelomu. Normalizované hodnoty exprese vyšší než hodnota 1,000 u vzorků MGUS byly i přes detekci 5-mC v místě CCGG analyzovaných promotorových sekvencí pozorovány u všech genů *TET*. Přítomnost 5-hmC v promotorovém úseku genu *TET3* by pak mohla souviset s mírně zvýšenými hodnotami exprese tohoto genu porovnáním s geny *TET1* a *TET2*. V promotorové sekvenci genu *TET1* byly detekovány nižší hodnoty 5-mC v porovnání s geny *TET2* a *TET3*, stejně jako u analyzovaných myelomových linií.

Použití nesortované populace buněk pro experimentální stanovení s sebou nese řadu limitací, i přes to vykazuje gen *TET1* v porovnání s geny *TET2* a *TET3* menší zastoupení metylačních i hydroxymetylačních změn jak u pacientů MGUS, tak nově diagnostikovaných pacientů mnohočetného myelomu, což může naznačovat fungující gen.

8 Literatura

Ammanamanchi S., Freeman J. W., Brattain M. G. (2003): Acetylated Sp3 is a transcriptional activator. *Journal of Biological Chemistry* 278: 3 5775–35 780.

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

Arinze I. J., Kawai Y (2003): Sp family of transcription factors is involved in valproic acid-induced expression of Galphai2. *Journal of Biological Chemistry* 278: 17 785–17 791.

Bergsagel D. E. (1988): Is Aggressive Chemotherapy More Effective in the Treatment of Plasma Cell Myeloma? *European Journal of Cancer and Clinical Oncology* 25(2): 159–161-

Berthon C., Nudel M., Boyle E. M., Goursaud L., Quesnel B., Boyer T., Marceau A. (2020): Acute myeloid leukemia synchronous with multiple myeloma successfully treated by azacytidine/lenalidomide and daratumumab without a decrease in myeloid clone size. *Leukemia Research Reports* 13.

Bestor T. H., Ingram V. M. (1998): Two DNA methyltransferases from murine erythroleukemia cells: purification, sequence specificity, and mode of interaction with DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 80: 5559–5563.

Bilsland A. E., Stevenson K., Atkinson S., Kolch W., Keith W. N. (2006): Transcriptional Repression of Telomerase RNA Gene Expression by c-Jun-NH₂-Kinase and SP1/Sp3. *Cancer Research* 66(3): 1363–1370.

Birmann B. M., Andreotti G., De Roos A. J., Camp N. J., Chiu B. C. H., Spinelli J. J., Becker N., Luzon V. B., Bhatti P., Boffetta P., Brennan P., Brown E. E., Cocco P., Costas L., Cozen W., de Sanjosé S., Foretová L., Giles G. G., Maynadié M., Moysich K., Nieters A., Staines A., Tricot G., Weisenburger D., Zhang Y., Baris D., Purdue M. P. (2017): Young adult and usual adult body mass index and multiple myeloma risk: a pooled analysis in the international Multiple Myeloma Consortium (IMMC). *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention* 26: 876–885.

Bonello M. R., Bobryshev Y. V., Khachigian L. M. (2004): Fibroblast growth factor-2 represses platelet-derived growth factor receptor-alpha (PDGFR-alpha) transcription via ERK1/2-dependent Sp1 phosphorylation and an atypical cis-acting element in the proximal PDGFR-alpha promoter. *Journal of Biological Chemistry* 279: 2377–2382.

Braun H., Koop R., Ertmer A., Nacht S., Suske G. (2001): Transcription factor Sp3 is regulated by acetylation. *Nucleic Acid Research* 29: 4994–5000.

Cawley S., Bekiranov S., Ng H. H., Kapranov P., Sekinger E. A., Kampa D., Piccolboni A., Sementchenko V., Cheng J., Williams A. J., Wheeler R., Wong B., Drenkow J., Yamanaka M., Patel

S., Brubaker S., Tammana H., Helt G., Struhl K., Gingeras T. R. (2004): Unbiased mapping of transcription factor binding sites along human chromosomes 21 and 22 points to widespread regulation of noncoding RNAs. *Cell* 116: 499–509.

Chu S., Cockrell C. A., Ferro T. J. (2003): Expression of alpha-ENaC2 is dependent on an upstream Sp1 binding motif and is modulated by protein phosphatase 1 in lung epithelial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 303: 1159–1168.

Chuang J. Y., Wu C. H., Lai M. D., Chang W. C., Hung J. J. (2009): Overexpression of Sp1 leads to p53-dependent apoptosis in cancer cells. *International Journal of Cancer* 125: 2066–2076.

Chun R. F., Semmes O. J., Neuveut C., Jeang K. T. (1998): Modulation of Sp1 phosphorylation by human immunodeficiency virus type 1 Tat. *Journal of Virology* 72: 2615–2629.

Cimmino L., Abdel.Wahab O., Levine R. L., Aifantis I. (2011): TET family proteins and their role in stem cell differentiation and transformation. *Cell Stem Cell* 9: 193–204.

Clark S. J., Melki J. (2002): DNA methylation and gene silencing in cancer: which is the guilty party? *Oncogene* 21: 5380–5397.

Courey A. J., Tjian R. (1988): Analysis of Sp1 in vivo reveals multiple domains, including a novel glutamine-rich activation motif. *Cell* 55: 887–898.

Davie J. R., He S., Li L., Sekhavat A., Espino P., Drobic B., Dunn K. L., Sun J-M., Chen H. Y., Yu J., Pritchard S., Wang X. (2008): Nuclear organization and chromatin dynamics – Sp1, Sp3 and histone deacetylases. *Advances In Enzyme Regulation* 48: 189–208.

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

Dennig J., Beato M., Suske G. (1996): An inhibitor domain in Sp3 regulates its glutamine-rich activation domains. *The European Molecular Biology Organization Journal* 15: 5659–5667.

Esteller M. (2008): Epigenetics in cancer. *The New England Journal of Medicine* 358: 1148–1159.

Ferlay J., Soerjomataram I., Dikshit R., Eser S., Mathers C., Rebelo M., Parkin D. M., Forman D., Bray F. (2012): Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International Journal of Cancer* 136: 359–386.

Fojas de Borja P., Collins N. K., Du P., Azizkhan-Clifford J., Mudryj M. (2001): Cyclin A-CDK phosphorylates Sp1 and enhance Sp1-mediated transcription. *The EMBO Journal* 20: 5737–5747.

Gartel A. L., Ye X., Goufman E., Shianov P., Hay N., Najmabadi F., Tyner A. L. (2001): Myc represses the p21(WAF1/CIP1) promoter and interacts with Sp1/Sp3. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 98: 4510–4515.

Ge Y., Jensen T. L., Matherly L. H., Taub J. W. (2003): Transcriptional regulation of the cystathionine-beta-synthase gene in Down syndrome and non-Down syndrome megakaryocytic leukemia cell lines. *Blood* 101: 1551–1557.

Gill G. (2003): Post-transcriptional modification by the small ubiquitin-related modifier SUMO has big effects on transcription factor activity. *Current Opinion in Genetics and Development* 13: 108–113.

Grinstein E., Jundt F., Weiner I., Wernet P., Royer H.-D. (2002): Sp as G1 cycle phase specific transcription factor in epithelial cells. *Oncogene* 21: 1485–1492.

Gu T.-P., Guo F., Yang H., Wu H.-P., Xu G.-F., Liu W., Xie Z.-G., Shi L., He X., Jin S.-G., Iqbal K., Shi Y. G., Deng Z., Szabó P. E., Pfeifer G. P., Li J., Xu G.-L. (2011): The role of Tet3 DNA dioxygenase in epigenetic reprogramming by oocytes. *Nature* 477: 606–610.

Han I., Kudlow J. E. (1997): Reduced O glycosylation of Sp1 is associated with increased proteasome susceptibility. *Molecular and Cellular Biology* 17: 2550–2558.

Hájek R., Krejčí M., Pour L., Adam Z. (2011): Multiple Myeloma. *Klinická Onkologie* 24: 10–13.

He S., Sun J., Li M., Davie J. R. (2005): Differential intranuclear organization of transcription factors Sp1 and Sp3. *Molecular Biology of the Cell* 16: 4073–4083.

He S., Davie J. R. (2006): Sp1 and SP3 foci distribution throughout mitosis. *Journal of Cell Science* 119: 1063–1070.

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

Holliday R., Pugh J. E. (1975): DNA Modification Mechanisms and Gene Activity during Development. *Science* 187(4173): 226–232.

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

Inoue A., Zhang Y. (2011): Replication-dependent loss of 5-hydroxymethylcytosine in mouse preimplantation embryos. *Science* 334: 194.

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

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

Jackson S. O., Tjian R., (1988): O-glycosylation of eucaryotic transcription factors: implications for mechanisms of transcriptional regulation. *Cell* 55: 125–133.

Jaiswal A. S., Balusu R., Narayan S. (2006): 7,12-Dimethylbenzanthracene-dependent transcriptional regulation of adenomatous polyposis coli (APC) gene expression in normal breast epithelial cells mediated by GC-box binding protein Sp3. *Carcinogenesis* 27: 252–261.

Joseph N. S., Kaufman J. L., Dhodapkar M. V., Hofmeister C. C., Almaula D. K., Heffner L. T., Gupta V. A., Boise L. H., Lonial S., Nooka A. K. (2020): Long-Term Follow-Up Results of Lenalidomide, Bortezomib, and Dexamethasone Induction Therapy and Risk-Adapted Maintenance Approach in Newly Diagnosed Multiple Myeloma. *Journal of Clinical Oncology* 38(17): 1928–1937.

Jurczyszyn A., Grzasko N., Gozzetti A., Czepiel J., Cerase A., Hungria V., Crusoe E., Diaz A. L. M. S., Vij R., Fiala M. A., Caers J., Rasche L., Nooka A. K., Lonial S., Vesole D. H., Philip S., Gangatharan S., Druzd-Sitek A., Walewski J., Corso A., Cocito F., Vekemans M. M., Atila E., Beksac M., Leleu X., Davila J., Badros A., Aneja E., Abildgaard N., Kastiris E, Fantl D., Schutz N., Pika T., Butrym A., Olszewska-Szopa M., Usnarska-Zubkiewicz L., Usmani S., Nahi H., Chim C. S., Shustik C., Madry K, Lentzsch S., Swiderska A., Helbig G., Guzicka-Kazimierczak R., Lendvai N., Waage A., Andersen K. T., Murakami H, Zweegman S., Castillo J. J. (2016): Central nervous system involvement by multiple myeloma: A multi-institutional retrospective study of 172 patients in daily clinical practice. *American Journal of Hematology* 91(6): 575–580.

Kennett S. B., Udvardi A. J., Horowitz J. M. (1997): Sp3 encodes multiple proteins that differ in their capacity to stimulate or repress transcription. *Nucleic Acids Research* 25(15): 3110–3117.

Kennett S. B., Moorefield S., Horowitz J. M. (2002). Sp3 Represses Gene Expression via the Titration of Promoter-specific Transcription Factors. *The Journal of Biological Chemistry* 277(12): 9780–9789.

Ko M., Huang Y., Jankowska A. M., Pape U. J., Tahiliani M., Bandukwala H. S., An J., Lamperti E. D., Koh K. P. Genetzky R., Liu X. S., Aravind L., Agarwal S., Maciejewski J. P., Rao A.

(2010): Impaired hydroxylation of 5-methylcytosine in myeloid cancers with mutant TET2. *Nature* 468: 839–843.

Ko J. L., Liu H. C., Loh H. H. (2003): Role of an AP-2-like element in transcriptional regulation of mouse micro-opioid receptor gene. *Molecular Brain Research* 112: 153–162.

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

Kong L. M., Liao C. G., Fei D., Guo X., Xing J. L., Chen Z. N. (2010): Transcription factor Sp1 regulates expression of cancer-associated molecule CD147 in human lung cancer. *Cancer Science* 101: 1463–1470.

Krizalkovicová V., Maisnar V. Pour L., Radocha J. (2008): Monoclonal gammopathies of undetermined significance. *Klinická onkologie* 21(4): 160–164.

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

Kyle R. A., Therneau T. M., Rajkumar S. V., Larson D. R., Plevak M. F., Offord J. R., Dispenzieri A., Katzmann J. A., Melton L. J. (2006): Prevalence of monoclonal gammopathy of undetermined significance. *The New England Journal of Medicine* 354(13): 1362–1369.

Kyle R. A., Rajkumar S. V. (2005): Monoclonal gammopathies of undertermined significance. *Best Practice and Research on Clinical Haematology* 18(4): 689–707.

Lacroix I., Lipcey C., Imbert J., Kahn.Perles B. (2002): Sp1 transcriptional activity is up-regulated by phosphatase 2A in dividing T lymphocytes. *Journal of Biological Chemistry* 277: 9598–9605.

Lam J. K., Matsubara S., Mihara K., Zheng X. L., Mooradian A. D., Wong N. C. (2003): Insulin induction of apolipoprotein AI, role of Sp1. *Biochemistry* 42: 2680–2690.

Landgren O., Katzmann J A., Hsing A. W., Pfeiffer R. M., Kyle R. A., Yeboah E. D., Britwum R. B., Tettey Y., Adjei A. A., Larson D. R., Dispenzieri A., Melton L. J., Goldin L. R., McMaster M. L., Caporaso N. E., Rajkumar S. V. (2007): Prevalence of Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance Among Men in Ghana. *Mayo Clinic Proceedings* 82(12): 1468–1473.

Landgren O., Kristinsson S. Y., Goldin L. R., Caporaso N. E., Blimark C., Mellqvist U.-H., Wahlin A., Bjorkholm M., Turesson I. (2009): Risk of plasma cell and lymphoproliferative disorders

among 14621 first-degree relatives of 4458 patients with monoclonal gammopathy of undetermined significance in Sweden. *Blood* 114: 791–795.

Lee V. H., Chow B. K., Lo K. W., Chow L. S., Man C., Tsao S. W., Lee L. T. (2009): Regulation of RASSF1A in nasopharyngeal cells and its response to UV irradiation. *Gene* 443: 55–63.

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

Li E., Zhang Y. (2014): DNA methylation in mammals. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 6(5): a019133.

Lin L., He S., Sun J-M., Davie J. R. (2004): Gene regulation by Sp1 and Sp3. *Biochemistry and Cell Biology* 82: 460–471.

Lin L., Davie J. R. (2008): Association of Sp3 and estrogen receptor alpha with the transcriptionally active trefoil factor 1 promoter in MCF-7 breast cancer cells. *Journal of Cellular Biochemistry* 105 :365–369.

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

Lonial S., Anderson K. C. (2013): Association of response endpoints with survival outcomes in multiple myeloma. *Leukemia* 28: 258–268.

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

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

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

Pastor W. A., Aravind L., Rao A. (2013): TETonic shift: biological role of TET proteins in DNA demethylation and transcription. *Molecular Cell Biology* 14: 341–356.

Pesatori A. C., Consonni D., Rubafotti M., Grillo P., Bertazzi P. A. (2009): Cancer incidence in the population exposed to dioxin after the „Seveso accident“: twenty years of follow-up. *Environmental Health* 8(1): 39.

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

Mellors P. W., Binder M., Kettering R. P., Greipp P. T., Baughn L. B., Peterson J. F., Jevremovic D., Pearce K. E., Buadi F. K., Lacy M. Q., Gertz M. A., Dispenzieri A., Hayman S. R., Kapoor P., Gonsalves W. I., Hwa Y. L., Fonder A., Hobbs M., Kourelis T., Warsame R., Lust J. A., Leung N., Go R. S., Kyle R. A., Rajkumar S. V., Kumar S. K. (2020). Metaphase cytogenetics and plasma cell proliferation index for risk stratification in newly diagnosed multiple myeloma. *Blood Advances* 4(10): 2236–2244.

Merchant J. L., Du M., Todisco A (1999): Sp1 phosphorylation by Erk 2 stimulates DNA binding. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 254: 454–461.

Nicolás M., Noé V., Jensen K., Ciudad C. J. (2001): Cloning and Characterization of the 5'-Flanking Region of the Human Transcription Factor Sp1 Gene. *Journal of Biological Chemistry* (25): 22 126–32.

Palumbo A., Anderson K. (2011): Multiple Myeloma. *The New England Journal of Medicine* 364: 1046–1060.

Palumbo A., Avet-Loiseau H., Oliva S., Lokhorst H. M., Goldschmidt H., Rosinol L., Richardson P., Caltagirone S., Lahuerta J. J., Facon T., Bringhen S., Gay F., Attal M., Passera R., Spencer A., Offidani M., Kumar S., Musto P., Lonial S., Petrucci M. T., Orłowski R. Z., Zamagni E., Morgan G., Dimopoulos M. A., Durie B. G. M., Anderson K. C., Sonneveld P., San Miguel J., Cavo M., Rajkumar S. V., Moreau P. (2015): Revised International Staging System for Multiple Myeloma: A Report From International Myeloma Working Group. *Journal of Clinical Oncology*.

Pascal E., Tjian R. (1991): Different activation domains of Sp1 govern formation of multimers and mediate transcriptional synergism. *Genes and Development* 5: 1646–1656.

Penka M., Tesařová E., Blatný J., Bourková L., Budliková A., Čech Z., Jelínková M., Kissová J., Kořístek Z., Kovářová L., Kuglík P., Matýšková M., Novotný J., Pospíšilová Š., Slánská M., Smejkal P., Trnavská I., Zapletal O., Závřelová (2011): *Hematologie a transfúzní lékařství I. 1. Vydání*, Praha: Grada, 488 s. ISBN 978-80-247-3459-0.

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

Ross S., Best J. L., Zon L. I., Gill G. (2002): SUMO-1 modification represses Sp3 transcriptional activation and modulates its subnuclear localization. *Molecular Cell* 10: 831–842.

Sapetschnig A., Rischitor G., Braun H., Doll A., Schergaut M., Melchior F., Suske G. (2002): Transcription factor Sp3 is silenced through SUMO modification by PIAS1. *The EMBO Journal* 21: 5206–5251.

Saxe D., Seo E.-J., Beaulieu Bergeron M., Han J.-Y. (2018). Recent advances in cytogenetic characterization of multiple myeloma. *International Journal of Laboratory Hematology*: 1-10.

Shoumariyeh K., Jung J., Rassner M., Dold S. M., Riebl V., Pantic M., Herget G., Marks R., Lübbert M., Wäsch R., Engelhardt M. (2021): Treatment of therapy-related acute myeloid leukemia and underlying multiple myeloma with decitabine/venetoclax and daratumumab. *Annals of Hematology* 100(6): 1637–1640.

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

Sowa Y., Orita T., Minamikawa-Hiranabe S., Mizuno T., Nomura H., Sakai T. (1999): Sp3, but not Sp1, mediates the transcriptional activation of the p21/WAF1/Cip1 gene promoter by histone deacetylase inhibitor. *Cancer Research* 59: 4266–4270.

Suske G. (1999): The Sp-family of transcription factors. *Gene* 238: 291–300.

Suske G., Bruford E., Philipsen S. (2005): Mammalian SP/KLF transcription factors: bring in the family. *Genomics* 85: 551–556.

Suzuki T., Kimura A., Nagai R., Horikoshi M. (2000): Regulation of interaction of the acetyltransferase region of p300 and the DNA-binding domain of Sp1 on and through DNA binding. *Genes to Cells* 5: 29–41.

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

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

Taylor S. E. B., Smergilio P., Dhulipala L., Rath M., Bhutani N. (2014): A global Increase in 5-Hydroxymethylcytosine Levels Marks Osteoarthritic Chondrocytes. *Arthritis and Rheumatology* 66: 90–100.

Vallian S., Chin K.-V., Chang K.-S. (1998): The Promyelocytic Leukemia Protein Interacts with Sp1 and Inhibits Its Transactivation of the Epidermal Growth Factor Receptor Promoter. *Molecular and Cellular Biology* 18: 7147–7156.

Wang L., Wei D., Huang S., Peng Z., Le X., Wu T. T., Yao J., Ajani J., Xie K. (2003): Transcription Factor Sp1 Expression is a Significant Predictor of Survival in Human Gastric Cancer. *Clinical Cancer Research* 9(17): 6371–6380.

Wang D., Li M., Shen ., Yang J., Gao Z., Tang Y. (2022): Iron Deficiency Increases Phosphorylation of Sp1 to Upregulate SPNS2 Expression in Hepatocellular Carcinoma. *Biological Trace Element Research*. PMID: 35614326.

Ward Visosky S., Samuel C. E. (2003): The pkr kinase promoter binds both Sp1 and Sp3, but only Sp3 functions as part of the interferon-inducible complex with ISGF-3 proteins. *Virology* 313(2): 553–566.

Wen J., Deng S., Bi Y., Qiao L., Xu H. (2022): Association between multiple gene promoter hypermethylation and the risk of gastric cancer: A systematic review. *Digestive and Liver Disease* 18: 1590–8658.

Wong W. K., Chen K., Shih J. C. (2003): Decreased Methylation and Transcription Repressor Sp3 Up-regulated Human Monoamine oxidase (MAO) B Expression during Caco-2 Differentiation. *The Journal of Biological Chemistry* 278(19): 36 227–36 235.

Wu Z., Kim H. P., Xue H. H., Liu H., Zhao K., Leonard W. J. (2005): Interleukin-21 receptor gene induction in human T cells is mediated by T-cell receptor-induced Sp1 activity. *Molecular and Cellular Biology* 25: 9741–9752.

Wu X., Zhang Y. (2017): TET-mediated active DNA demethylation: mechanism, function and beyond. *Nature Reviews Genetics* 18(9): 517–534.

Xu J., Thompson K. L., Shephard L. B., Hudson L. G., Gill G. N. (1993): T3 receptor suppression of Sp1-dependent transcription from the epidermal growth factor receptor promoter via overlapping DNA-binding sites. *Journal of Biological Chemistry* 268: 16 065–16 073.

Yao J. C., Wang L., Wei D., Gong W., Hassan M., Wu T.-T., Mansfield P., Ajani J., Xie K. (2004): Association between Expression of Transcription Factor Sp1 and Increased Vascular Endothelial Growth Factor Expression in Advanced Stage, and Poor Survival in Patients with Resected Gastric Cancer. *Clinical Cancer Research* 10: 4109–4117.

Zheng X. L., Matsubara S., Diao C., Hollenberg M. D., Wong N. C. (2001): Epidermal growth factor induction of apolipoprotein Aii is mediated by the Ras-MAP kinase cascade and Sp1. *Journal of Biological Chemistry* 276: 13 822–13 829.

Zhou L., Yu Q., Wei G., Wang L., Huang Y., Hu K., Hu Y., Huang H. (2021): Measuring the global, regional, and national burden of multiple myeloma from 1990 to 2019. *BioMed Central* 21: 606.