

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Laboratoř růstových regulátorů



**Funkční vztah mezi methyltransferasami DNA a methylačními markery
histonových modifikací u myelomových buněčných linií**

Diplomová práce

Autor:	Bc. Anna Valníčková
Studijní program:	N1501 Experimentální biologie
Studijní obor:	Experimentální biologie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Kateřina Smešný Trtková Ph.D.
Termín odevzdání práce:	2021

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Bc. Anna Valníčková
Název práce	Funkční vztah mezi methyltransferasami DNA a methylačními markery histonových modifikací u myelomových buněčných linií
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Laboratoř růstových regulátorů
Vedoucí práce	Kateřina Smešný Trtková Ph.D.
Rok obhajoby práce	2021
Abstrakt	Diplomová práce je zaměřena na funkční vztah mezi methyltransferasami DNA a methylačními markery histonových modifikací u buněk mnohočetného myelomu. Byly testovány myelomové buněčné linie KMS-12-PE, OPM-2 a U-266 po jejich ovlivnění dvěma typy demethylačních činidel - 5-aza-2'-deoxycytidin a 5-azacytidin. Přítomnost genů methyltransferas DNA – <i>DNMT1</i> , <i>DNMT3A</i> a <i>DNMT3B</i> v precipitovaných komplexech s protilátkami anti-H3K36me3/anti-H3K9me3 byla kvantifikována metodou RT-PCR a vyhodnocována statistickým Mann-Whitney testem.
Klíčová slova	DNA methyltransferasy, mnohočetný myelom, histonové modifikace
Počet stran	59
Počet příloh	0
Jazyk	Český (anglický)

Bibliographical identification

Author's first name and surname	Bc. Anna Valníčková
Title of thesis	Functional relationship between DNA methyltransferases and methylation markers of histone modifications in myeloma cell lines
Type of thesis	Master
Department	Laboratory of Growth Regulators
Supervisor	Kateřina Smešný Trtková Ph.D.
The year of presentation	2021
Abstract	The diploma thesis is focused on the functional relationship between DNA methyltransferases and methylation markers of histone modifications in multiple myeloma cells. Myeloma cell lines KMS-12-PE, OPM-2 and U266 were tested after their treatment with two types of demethylation agents - 5-aza-2'-deoxycytidine and 5- azacytidine. The presence of DNA methyltransferase genes - <i>DNMT1</i> , <i>DNMT3A</i> and <i>DNMT3B</i> in precipitated complexes with anti-H3K36me3/anti-H3K9me3 antibodies was quantified by RT-PCR and evaluated by statistical Mann-Whitney test.
Keywords	DNA methyltransferases, multiple myeloma, histone modifications
Number of pages	59
Number of appendices	0
Language	Czech (English)

Prohlašuji, že jsem předloženou diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením Kateřiny Smešný Trtkové Ph.D. za použití citované literatury.

V Olomouci dne

podpis.....

Poděkování

Ráda bych poděkovala vedoucí práce Kateřině Smešný Trtkové Ph.D. za cenné rady, odborné vedení, ochotu při zpracování diplomové práce a čas, který mi věnovala. Dále bych chtěla poděkovat pracovníkům Ústavu molekulární a klinické patologie LF UP v Olomouci za vstřícnost při vykonávání praktické části mé diplomové práce. A v neposlední řadě bych ráda poděkovala své rodině a hlavně mamince, která mě podporovala po celou dobu studia.

Pro zpracování diplomové práce byly využity prostředky z grantu NV18-03-005000 Ministerstva zdravotnictví České republiky, z projektu ENOCH No. CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_019/0000868 (the European Regional Development Fund) a studentského grantu LF_2020_0015.

OBSAH

Seznam zkratk	8
1 ÚVOD A CÍLE PRÁCE	10
2 TEORETICKÁ ČÁST	12
2.1 Mnohočetný myelom	12
2.2 Epigenetika a základní struktura nukleozomu	13
2.2.1 Histonové modifikace	14
2.2.1.1 Methylace	15
2.2.1.2 Acetylace	16
2.2.1.3 Fosforylace histonů	16
2.2.1.4 Ubikvitinace	16
2.2.1.5 SUMOylace	17
2.3 Demethylační činidla	17
2.3.1 Azacytidin	18
2.3.2 Decitabin	19
2.4 Myelomové buněčné linie	20
2.5 Chromatinová imunoprecipitace	22
2.6 RT-PCR	23
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	26
3.1 Použité chemikálie	26
3.2 Použité roztoky	27
3.3 Použité přístrojové vybavení a použitý materiál	30
3.4 Metody	31
3.4.1 Kultivace a ovlivnění buněčných linií	31
3.4.2 Sklizení buněk, získání chromatinového lyzátu	32
3.4.3 Sonikace buněčných lyzátů	33
3.4.4 Stanovení koncentrace proteinů metodou Bradfordové	34
3.4.5 Chromatin imunoprecipitační analýza s použitím Anti H3K9me3 a H3K36me3 protilátek	34
3.4.6 Přechištění a izolace DNA	35
3.4.7 Amplifikace DNA pomocí RT-PCR	36
4 VÝSLEDKY	38
4.1 Myelomová buněčná linie U-266	38
4.2 Myelomová buněčná linie KMS-12-PE	42
4.3 Myelomová buněčná linie OPM-2	46

5	DISKUZE.....	51
6	ZÁVĚR.....	53
7	SEZNAM LITERATURY.....	55

Seznam zkratek

AZA	5-azacytidin, Azacytidin
CCT	kombinovaná chemoterapie
cDNA	komplementární DNA
CpG	dinukleotid cytosin-fosfát-guanin
DAC	5-aza-2'-deoxycytidin, decitabin
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
<i>DNMT1</i>	gen DNA methyltransferasa 1
<i>DNMT3A</i>	gen DNA methyltransferasa 3A
<i>DNMT3B</i>	gen DNA methyltransferasa 3B
DNMTs	DNA methyltransferasy
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
EGTA	ethylenglykoltetraoctová kyselina
FBS	fetální hovězí sérum
HAT	histonové acetyltransferasy
HDAC	histonové deacetylasy
HDM	histonové demethylasy
HMT	histonové methyltransferasy
HSCT	transplantace hemopoetických kmenových buněk
ChIP	imunoprecipitace chromatinu
IgE	imunoglobulin E
IL-6	interleukin 6
MGUS	monoklonální gamapatie neurčeného významu
MM	mnohočetný myelom
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina
NAD	nikotinamidadenindinukleotid
PBS	fosfátový pufr
PCR	polymerázová řetězová reakce
pre-mRNA	primární transkript
PTM	posttranslační modifikace
RIPA	radioimunoprecipitační testovací pufr
RNA	ribonukleová kyselina
RT-PCR	kvantitativní polymerázová řetězová reakce v reálném čase

SDS	dodecylsírán sodný
ssDNA	salmon sperm DNA
SUMO	sumoylace
TET	enzymy rodiny „ten-eleven translocation“
Ub	ubikvitin

1 ÚVOD A CÍLE PRÁCE

Mnohočetný myelom (MM) je maligní onemocnění plazmatických buněk kostní dřeně, způsobující destrukci kostí (Joshua et al., 2019). Toto onemocnění je spojeno s vysokou úmrtností pacientů (Choudhury et al., 2020). Jedná se o jedno z nejčastějších hemato-onkologických onemocnění (Kazandjian, 2016). Jeho příčina je multifaktoriální a těžce definovatelná. Predispozicí může být vystavení organickým chemikáliím, toxinům a ionizujícímu záření. Byla pozorována i genetická predispozice, ale nejedná se o dědičný stav. Často jsou detekovány mutace v genech zodpovědných za potlačení či podporu růstu nádoru a tyto změny genetické informace mohou ovlivňovat prognózu a odpověď na léčbu (Mehta, 2015).

Epigenetické změny hrají důležitou roli ve vývoji a progresi maligních onemocnění (Hackanson et al., 2005). Důsledkem epigenetických regulací jsou změny genové exprese zprostředkované jinými mechanismy než změnami samotné sekvence deoxyribonukleové kyseliny (DNA) (Bhalla, 2005). V uplynulém desetiletí několik studií popsalo epigenetické mechanismy methylace DNA, histonových modifikací a nekódujících ribonukleových kyselin (RNA) jako předpokládané, ale doposud příliš neobjasněné faktory přispívající ke vzniku a rozvoji mnohočetnému myelomu (Alzrigat et al., 2018). Methylace DNA a histonové methylační modifikace jsou na sobě závislé a mohou společně ovlivňovat remodelaci chromatinu, což u buněk eukaryotních organismů může vést ke změnám v regulaci genové exprese (Amodio et al., 2017). U určitých specifických typů nádorů nebo za specifických fyziologických podmínek mohou enzymy, jež jsou nositeli methylačních skupin – methyltransferasy DNA, vyvolat změny struktury chromatinu a/nebo aktivity transkripčního faktoru, které mohou ovlivnit vznik nebo rozvoj nádorového onemocnění (Sarris et al., 2014).

Jedním ze základních mechanismů vedoucích k nádorové progresi je hypermethylovaná snížená exprese genu nebo přímo umlčení jeho transkripční aktivity zejména u genů s funkcí tumorových supresorů (Esteller, 2008). V poslední době se používají jako hypomethylační činidla Azacytidin (5'-Azacytidin, AZA) a Decitabin (5'-Aza-2'-deoxycytidine, DAC), která ovlivňují methylovanost na úrovni DNA (Krug et al., 2017). Azacytidin a Decitabin fungují jako inhibitory methyltransferas DNA a prokazují vysokou účinnost reaktivace epigeneticky umlčených nádorových supresorů *in vitro* (Stresemann a Lyko, 2008). Důvodem pro použití inhibitorů methyltransferas DNA je jejich účinek snížit hypermethylovanost způsobené umlčení genu, obnovení kontrolních mechanismů proliferace a citlivosti na apoptózu u maligního klonu (Mund et al., 2006).

Předkládaná diplomová práce je zaměřena na studium buněčných liniích mnohočetného myelomu, histonové kódy, účinek demethylačních činidel a stanovení exprese methyltransferas DNA – DNMT1, DNMT3A a DNMT3B. Praktická část diplomové práce byla zaměřena na precipitaci transkripčních komplexů vázajících se na metylace histonu H3 v místech lysinu 36 (H3K36me3) a lysinu 9 (H3K9me3) u myelomových buněčných linií KMS-12-PE, OPM-2 a U-266 ovlivněných demethylačními činidly 5-aza-2'-deoxycytidine (Decitabin) a 5-azacytidine (Azacytidin). Na základně chromatin imunoprecipitačních analýz s protilátkami anti-H3K36me3 a anti-H3K9me3 byla u precipitovaných komplexů transkripčních faktorů kvantifikována exprese DNMT1, DNMT3A a nebo DNMT3B metodou RT-PCR.

Stanovené cíle této práce byly:

- Vypracovat literární rešerši na zadané téma.
- Detekovat úroveň transkripčních komplexů s methylovaným histonem H3 v místě lysinu 36 a lysinu 9 u tří myelomových buněčných linií ovlivněných dvěma koncentracemi demethylačních činidel.
- Kvantifikovat úroveň exprese precipitovaných transkripčních komplexů s DNMT1, DNMT3A a DNMT3B metodou RT-PCR.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Mnohočetný myelom

Mnohočetný myelom je maligní onemocnění plazmatických buněk kostní dřeně (Joshua et al., 2019). I přes to, že se jedná o vzácné onemocnění, je MM jedním z nejčastějších hematologických malignit (Kazandjian, 2016). Plazmatické buňky jsou specificky zaměřeným typem bílých krvinek odvozených z B-lymfocytů tvořících protilátky. U MM plazmatické buňky přesahují 10 % všech buněk kostní dřeně. Tyto buňky vytvářejí abnormální protilátku, tzv. paraprotein, která slouží jako marker tohoto onemocnění (Mehta, 2015).

Diagnostikovanému onemocnění MM předchází obvykle fáze asymptomatické expanze klonálních plazmatických buněk, označovaná jako monoklonální gamapatie neurčeného významu (MGUS) (Furukawa a Kikuchi, 2015). Jedná se o benigní stav, charakterizovaný přítomností nízké hladiny paraproteinu. U 5-10 % pacientů s MGUS se po mnoha letech vyvíjí MM (Mehta, 2015).

Nejčastější výskyt mnohočetného myelomu byl zjištěn u afroameričanů, méně pak u asijských a evropských etnických skupin (Landgren et al., 2006). Toto onemocnění postihuje častěji muže než ženy, přibližně okolo 60-70 roku života (Mehta, 2015; Joshua et al., 2019).

Příčina MM je multifaktoriální a těžce definovatelná, stejně jako u ostatních typů nádorových onemocnění. Predispozicí může být vystavení organickým chemikáliím, toxinům a ionizujícímu záření. Byla pozorována i genetická predispozice, ale nejedná se o dědičný stav. Často jsou detekovány mutace v genech zodpovědných za potlačení či podporu růstu nádoru a tyto změny genetické informace mohou ovlivňovat prognózu a odpověď na léčbu (Mehta, 2015).

I přes aplikaci nových terapeutických látek, včetně inhibitorů proteazomu a imunomodulačních léků, a postupů, jako je vysokodávková chemoterapie s podporou kmenových buněk, je stále prognóza pacientů s MM horší než u většiny dalších hematologických malignit. Pro zlepšení výsledků léčby je proto nutné více porozumět molekulární patogenezi onemocnění (Furukawa a Kikuchi, 2015; Bringhen et al., 2013; Rajkumar, 2019).

Pro pacienty mladší 70 let s dobrou fyzickou kondicí je nejvhodnější počáteční léčbou kombinovaná chemoterapie (CCT) a následná autologní transplantace hemopoetických kmenových buněk (HSCT). Při počáteční CCT se využívá bortezomib (inhibitor proteazomu), steroidy a thalidomid/s nebo bez cyklofosfamidu. Doba trvání chemoterapie

je asi 4-6 měsíců, následuje HSCT s metfalanem. Pro starší pacienty se špatnou fyzickou kondicí se využívají léky poškozující shromažďování kmenových buněk v kombinaci s bortezomibem a steroidem nebo thalidomidem. Pro udržovací léčbu se využívá lenalidomid. Jedná se o thalidomidový derivát, obvykle využívající se při prvním nebo druhém relapsu, ale v mnoha studiích vykazuje vhodnou aktivitu i jako lék první linie nebo jako udržovací lék po počáteční CCT nebo HSCT (Mehta, 2015).

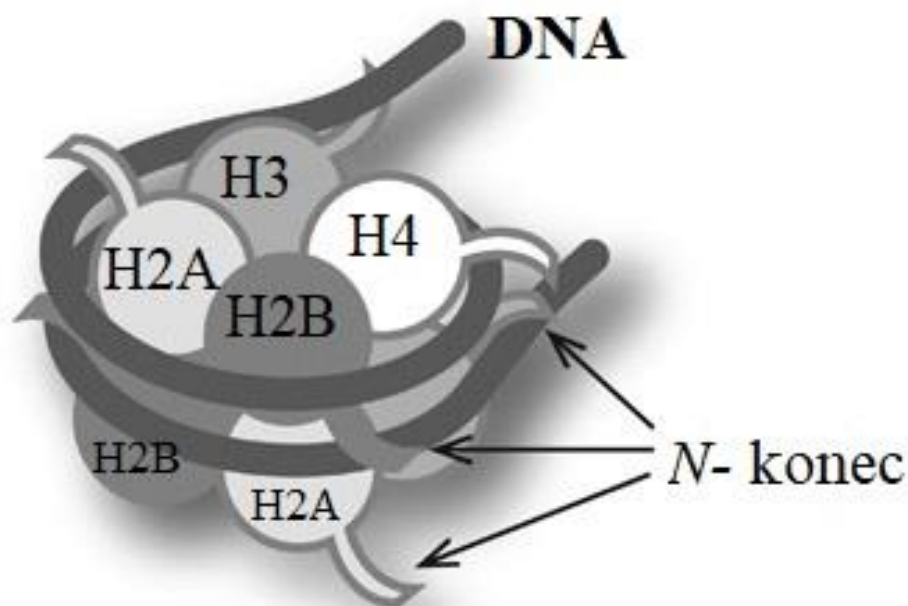
Mezi možné vedlejší účinky patří potlačení krevního obrazu, zvýšené riziko vzniku krevních sraženin a poškození nervů, zejména při použití bortezomibu a thalidomidu. Při užívání steroidů dochází ke zvýšení rizika infekce, zvyšování tělesné hmotnosti, změnám nálad, osteoporóze, peptidickým vředům a zpomalení hojení ran (Mehta, 2015).

Mezi obecné projevy charakterizujícími jak MM tak i většinu typů maligních onemocnění patří úbytek tělesné hmotnosti, ztráta chuti, únava. Mezi konkrétní příznaky mnohočetného myelomu patří kostní léze, bolesti kostí, bolesti zad a patologické zlomeniny, anémie. Dalším příznakem je hyperkalcemie, která může způsobit bolesti břicha, žížeň, nadměrnou ztrátu moči a následně až selhání ledvin. Poškození ledvin je taktéž způsobeno ukládáním paraproteinů. Následná infekce je způsobená generalizovanou redukcí imunoglobulinů a defektní funkcí bílých krvinek (Joshua, 2005; Mehta, 2015).

2.2 Epigenetika a základní struktura nukleozomu

U eukaryotických buněk je genomová DNA v buněčném jádře velmi účelně poskládána a komprimovaná histonovými a nehistonovými proteiny v dynamickém polymeru zvaném chromatin (Jenuwein a Allis, 2001). Chromatin je tvořen vysoce konzervovanými histonovými proteiny (H3, H4, H2A, H2B a H1), které fungují jako „lešení“ pro zabalení eukaryotické DNA do opakujících se nukleozomálních jednotek, které jsou složeny z chromatinu vyššího řádu (Obr. 1) (Strahl a Allis, 2000).

Histony jsou malé bazické nukleoproteiny, neboť obsahují hodně argininu a lysinu. Skládají se z globulární domény a pružnějšího nabitého NH₂- konce, který vyčnívá z nukleozomu (Jenuwein a Allis, 2001). NH₂- konce těchto histonových proteinů mohou být posttranslačně modifikovány – acetylací/deacetylací, methylací, fosforylací, SUMOylací a ubikvitinací (Strahl a Allis, 2000). Posttranslační modifikace mohou změnit elektronický náboj histonových konců, které se vážou na DNA. Mohou tak změnit stav chromatinu – rozvolnit nebo kondenzovat, a tím ovlivnit zahájení nebo umlčení genové transkripce (Zhang et al., 2021).



Obr. 1. Schématická struktura nukleozomu. Nukleozom se skládá ze dvou kopií každého jádra histonu (H3, H4, H2A a H2B) a B150 bp DNA. *N-* konec je vytlačen z nukleozomu (upraveno podle Kimura, 2013).

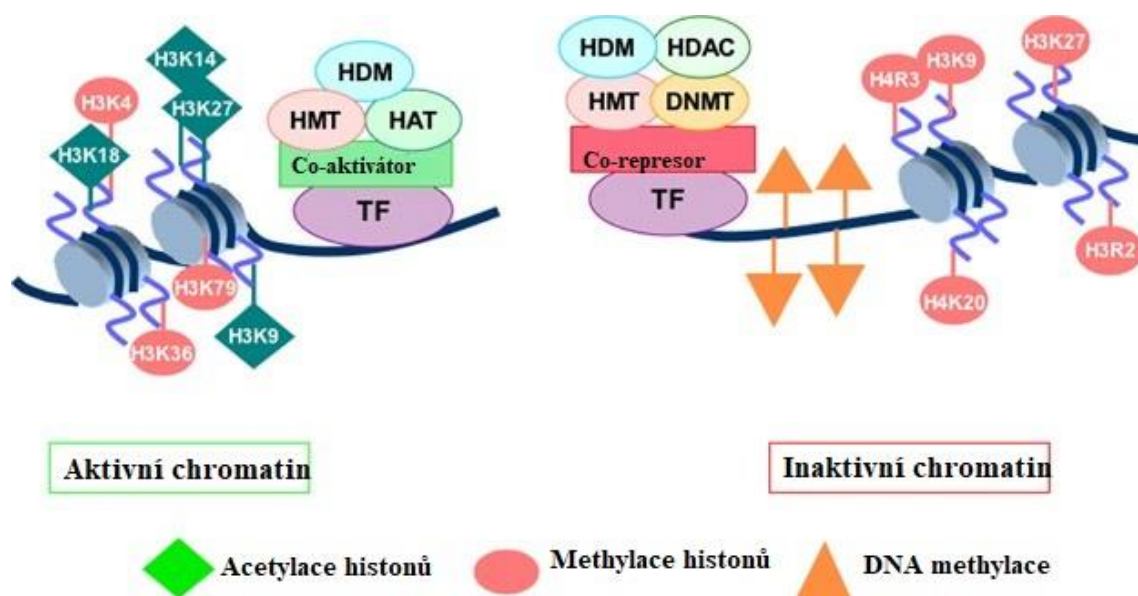
2.2.1 Histonové modifikace

Histony mohou být modifikovány na mnoha místech. Na histonech je více než 60 různých zbytků, kde byly modifikace detekovány buď specifickými protilátkami nebo hmotnostní spektrometrií (Kouzarides, 2007).

Některé histonové modifikace přímo ovlivňují strukturu chromatinu modulováním stability nukleozomů nebo struktury chromatinu vyššího řádu. Převážná většina modifikací však funguje tak, že rekrutuje nebo inaktivuje efektorové proteiny, které interagují s chromatinem (Long et al., 2014).

Histony fungují prostřednictvím histonových kódů jak pozitivně, tak negativně v regulaci genové exprese, a mohou sloužit jako epigenetické indikátory stavu chromatinu spojené s aktivací nebo represí genu.

Obecně bývají počátečními místy transkripce aktivně transkribovaných genů trimetylovaný lysin H3K4 (H3K4me3) a acetylovaný lysin H3K27 (H3K27ac) v úseku histonu H3. Aktivní zesilovače lze identifikovat jako monometylovaný lysin v pozici histonu H3K4 (H3K4me1) a acetylovaný lysin v pozici histonu H3K27ac. Transkripčně aktivní úseky transkribovaných genů jsou spojena s trimetylovaným úsekem H3K36 (H3K36m3). Represe genů pak bývá zprostředkována nejčastěji trimetylovaným úsekem H3K9 (H3K9me3) a trimetylovaným úsekem H3K27 (H3K27me3) (Obr. 2) (Kimura, 2013).



Obr. 2. Sekvenčně specifické transkripční faktory chovající se jako kotvící molekuly pro rekrutovanou DNA a modifikace histonů působící na cílené genové promotory. Aktivní transkripce je spojena s hyperacetylací a methylací H3K4, H3K79 a H3K36 v promotorových oblastech, zatímco genová represe je spojena s methylací, hypoacetylací a methylací DNA zbytků H3K9, H3K27 a H4K20. Tyto modifikace jsou zprostředkovány enzymy modifikujícími chromatin včetně DNA methyltransferasy (DNMT), histon-acetyltransferasy (HAT)/histon-deacetylasy (HDAC), histon-methyltransferasy (HMT) a histonové demethylasy (HDM) (upraveno podle Rice et al., 2007).

2.2.1.1 Methylace

Methylace DNA zahrnuje přidání methylové skupiny (-CH₃) na 5. uhlík cytosinu dinukleotidu cytosin-fosfát-guanin (CpG) a je katalyzována rodinou enzymů DNMTs (DNA methyltransferasy). DNMT1 přednostně cílí na hemi-methylovanou DNA a je důležitá pro udržování methylace během replikace DNA. DNMT3B a DNMT3A katalyzují methylaci nově vzniklých methylačních míst, velmi často jako důsledek nádorové progresse, a tyto enzymy jsou obvykle označovány jako *de novo* methyltransferasy (Okano et al., 1998). K methylaci histonu dochází obvykle na lysinových (K) a argininových (R) zbytcích histonů H3 a H4 přidáním methylové skupiny -CH₃. Lysinové zbytky histonů mohou být *mono-*, *di-*, *trimethylované* (me1, me2, me3) a působí jako aktivní nebo represivní značky genové transkripce (Greer a Shi, 2012).

K nejvíce studovaným místům methylace histonu patří histon H3 lysin 4 (H3K4), H3K36, H3K9, H3K27, H3K79 a H4K20.

Původně se předpokládalo, že methylace histonu je nevratnou – ireversibilní modifikací. Identifikací enzymů TET (Ten-eleven translocation) s demethylační funkcí (Tahiliani et al, 2009), kterou je přidání anebo odstranění methylových skupin z různých lysinových zbytků v úsecích histonů (Zee et al., 2010), je nyní mechanismus methylací považován za reversibilní proces.

2.2.1.2 Acetylace

Enzymy zapojené do acetylace a deacetylace histonů fungují jako regulátory acetylace metabolických enzymů. Klíčové metabolity, jako je acetyl-CoA a nikotinamidadenin dinukleotid (NAD) se účastní procesů acetylace a deacetylace proteinů, a jejich buněčné hladiny mohou regulovat aktivitu histon-acetyltransferas (HAT) a deacetylase (HDAC) (Shen et al., 2015).

Acetylace histonů je obecně spojena s aktivním chromatinem. Acetylace vláknitých konců histonů H3 a H4 konce označují promotorové úseky aktivních genů. Tyto modifikace zahrnují acetylaci histonu H3 na lysinu 27 (H3K27ac), který blokuje trimethylaci H3K27 (H3K27me3). H3K27ac se proto využívá k identifikaci aktivních enhancerů genů (Pradeepa et al., 2016).

2.2.1.3 Fosforylace histonů

Specifickým rysem fosforylace histonů H3 je regulace dvou protichůdných procesů: kondenzace mitotických chromozomů, jež je známkou transkripčně neaktivního stavu, a aktivace genu indukovanou signálem během interfáze. Přičemž úseky fosforylované mitotickými kinasami a úseky, jež jsou během interfáze cílem specifických efektorových enzymů aktivovaných v reakci na extracelulární signalizaci, jsou v podstatě stejné.

Globální fosforylace histonu H3 během mitózy je spojena se zhuštěním chromatinu, zatímco stimulací indukovaná fosforylace cílí pouze na nízký počet molekul histonu H3 s regulační funkcí (Sawicka a Seiser, 2012).

2.2.1.4 Ubikvitinace

Jedním z typů PTM (posttranslační modifikace) je vazba proteinu malé velikosti, ubikvitinu (Ub). Ubikvitin je 76-aminokyselinový protein, který je prostřednictvím isopeptidové vazby vytvořené mezi jeho C-koncovým karboxylátem a lysinem lokalizovaným v jeho postranním řetězci, připojen k substrátovému proteinu. V eukaryotických organismech je Ub připojen ke specifickým lysinovým zbytkům histonů H2A a H2B v modifikovaném úseku, který na rozdíl od mnoha jiných modifikací v buňce nesignalizuje jeho degradaci. Místo toho bylo prokázáno, že jak připojení, tak odstranění Ub těchto histonů ovlivňuje transkripci genů, sestřih pre-mRNA (primární transkript) a opravu poškozené DNA (Long et al., 2014).

Ubikvitin může být také připojen k jiným molekulám Ub za vzniku řetězců polyUb. Nicméně za určitých okolností jako je oprava poškozené DNA nebo spermatogeneze, byla zjištěna polyubikvitinace a degradace histonů. Hlavní funkcí ubikvitinace histonu je však připojení monoUb, které nevede k degradaci (Qian et al., 2013; Long et al., 2014).

Zatímco ubikvitinace H2A je spojena s transkripční represí a umlčováním genové exprese, ubikvitinace H2B je spojena s aktivně transkribovanými oblastmi, ovlivňuje iniciaci transkripce genu, má vliv na prodloužení a zpracování mediátorové ribonukleové kyseliny (mRNA) (Wright et al., 2012; Weake a Workman, 2008).

2.2.1.5 SUMOylace

Podobně jako ubikvitinace, je sumoylace (SUMO) založena na navázání modifikátorů podobných ubikvitinu kovalentní vazbou na specifické lysinové zbytky histonů. Bylo zjištěno, že SUMO má mnoho regulačních funkcí v biologických buněčných procesech (Sarge, 2016).

Několik stovek cílových proteinů sumoylace se tak účastní různých procesů, jako je organizace chromatinu, regulace transkripce, oprava poškozené DNA, intracelulární lokalizace a signální transdukce (Flotho a Melchior, 2013).

2.3 Demethylační činidla

Epigenetické změny hrají důležitou roli ve vývoji a progresi maligních onemocnění (Hackanson et al., 2005). Důsledkem epigenetických regulací jsou změny genové exprese zprostředkované jinými mechanismy než změnami samotné sekvence DNA. Těmito modifikačními procesy jsou methylace DNA, modifikace histonových konců a interference RNA (Bhalla, 2005).

Methylace DNA je založena na přidání methylové skupiny k 5. uhlíku cytosinu obvykle v oblastech označovaných jako oblasti nebo ostrůvky CpG (Hackanson a Daskalakis, 2014). Tato místa jsou často lokalizovaná v úsecích promotoru genů. Je známo, že fyziologická a aberantní methylace DNA může vést k umlčení genů. Jedním ze základních mechanismů vedoucích k nádorové progresi je právě hypermethylací indukované umlčení genů s funkcí tumorových supresorů (Esteller, 2008).

V poslední době se používají jako hypomethylační činidla Azacytidin (5'-Azacytidin, AZA) a Decitabin (5'-Aza-2'-deoxycytidine, DAC), která ovlivňují metylaci na úrovni DNA (Krug et al., 2017). Azacytidin a jeho deoxyderivát DAC jsou chemické analogy cytidinu, nukleosidu přítomného v DNA a RNA (Bohtl et al., 2018). Kromě AZA je DAC nejpoužívanějším inhibítorem methylace DNA, který spouští demethylaci vedoucí k následné reaktivaci epigeneticky umlčených tumor supresorových genů *in vitro* a *in vivo* (Hackanson a Daskalakis, 2014).

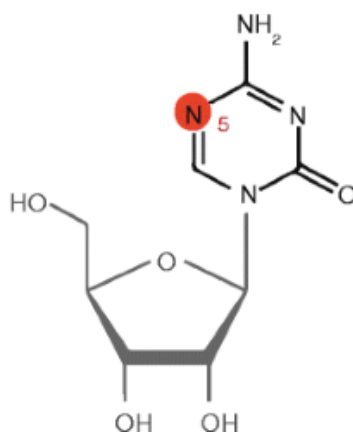
Azacytidin a Decitabin fungují jako inhibitory DNA methyltransferasy a prokazují vysokou účinnost reaktivace epigeneticky umlčených nádorových supresorů *in vitro*

(Stresemann a Lyko, 2008). Azanukleosidy zabudované do DNA vytvářejí kovalentní komplex s DNA methyltransferasou DNMT1, což způsobuje nevratnou blokádu enzymatické aktivity enzymu, která nakonec vede k hypomethylovaným řetězcům DNA (Santi et al., 1983; Diesch et al., 2016).

Doposud bylo obtížné definovat mechanismus účinku těchto látek u pacientů a zdá se, že klinické reakce jsou ovlivněny jak epigenetickými faktory, tak pro-apoptotickým potenciálem těchto činidel (Stresemann a Lyko, 2008). Důvodem pro použití inhibitorů DNA methyltransferasy je jejich účinek zvrátit hypermethylovaný umlčený gen, obnovit kontrolní mechanismy proliferace a citlivosti na apoptózu u maligního klonu (Mund et al., 2006).

2.3.1 Azacytidin

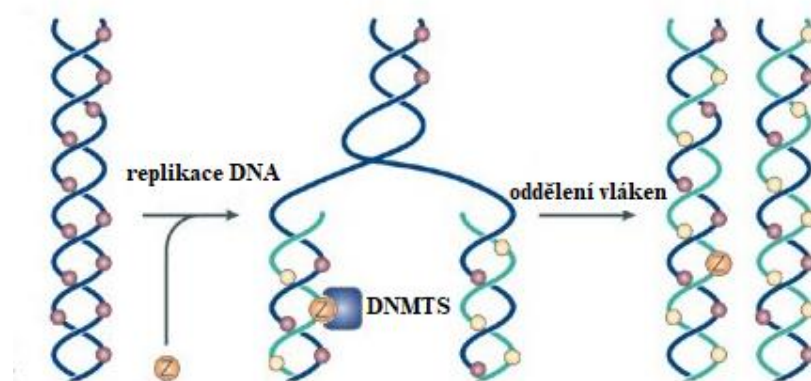
Azacytidin je analog pyrimidinového nukleosidu (Obr. 3), který byl objeven před více než 40 lety (Müller a Florek, 2010).



Obr. 3. Strukturální vzorec azacytidinu (Diesch et al., 2016).

Byl schválen americkým úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (FDA) pro léčbu myelodysplastického syndromu v květnu 2004. Jde o první lék schválený FDA pro léčbu této vzácné skupiny poruch kostní dřeně a byl označen statutem orphan-drug (léčivo pro vzácná onemocnění).

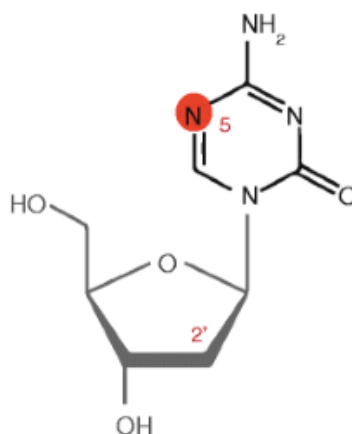
Azacytidin byl první z činidel, které působí na epigenetickými faktory (methylace DNA) způsobené umlčením genu, tedy – mechanismus, který nádorové buňky využívají k inhibici zejména tumor supresorových genů, které působí proti malignímu fenotypu. Svým účinkem specificky inhibuje metylaci DNA zachycením DNA methyltransferasy (Obr. 4) (Egger et al., 2004; Issa et al., 2005).



Obr. 4. DNA methylace. Rodina DNA methyltransferas DNMT katalyzuje methylaci polohy 5 cytosinového kruhu. Po intracelulární konverzi na decitabin je místo cytidinu do DNA začleněn azacytidin (Z), kde působí jako přímý a nevratný inhibitor DNMT. Buňky se poté rozdělí v nepřítomnosti DNMT, což vede k progresivní hypomethylaci DNA a reaktivaci dříve umlčených genů. Růžové kruhy – methylovaný CpG; žluté kruhy – nemethylovaný CpG (upraveno podle Egger et al., 2004; Issa et al., 2005).

2.3.2 Decitabin

Decitabin byl syntetizován v roce 1964 Sormem a spolupracovníky jako klasické cytostatikum (Pliml a Sorm, 1964). Jedná se o analog kruhu pyrimidinu nukleosidu 20-deoxycytidinu (Obr. 5).



Obr. 5. Strukturální vzorec decitabinu (Diesch et al., 2016).

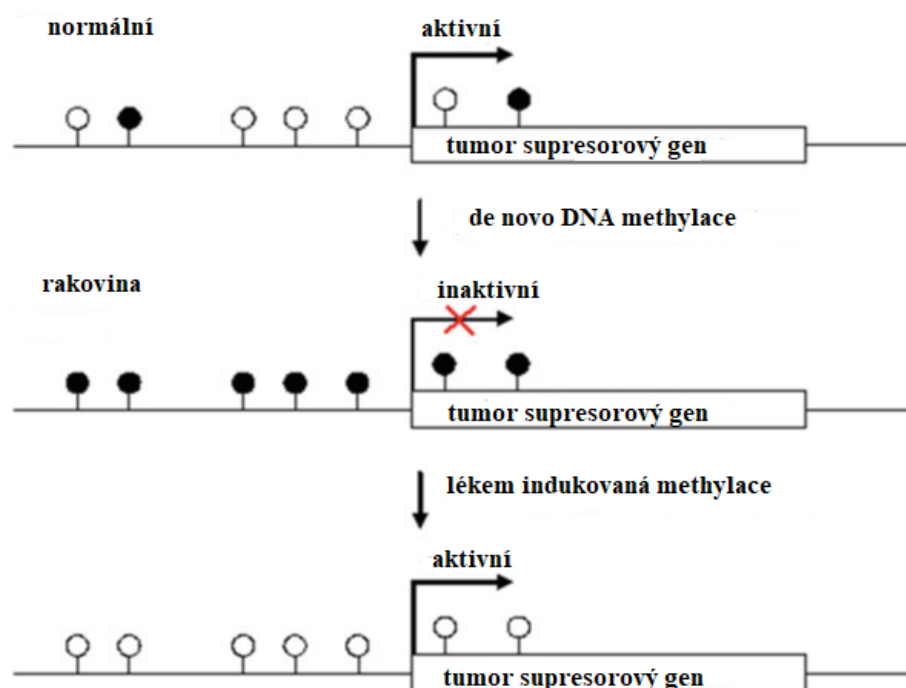
Jde o nestabilní látku, v důsledku deaminace je plazmatický poločas rozpadu DAC přibližně 35 minut (Rivard et al., 1981). Nicméně jeho stabilita byla testována *in vitro* při různých teplotách v neutrálním roztoku. Výsledky prokázaly značnou chemickou stabilitu (poločas 7 dnů při 4 ° C, 96 h při 20 ° C a 21 h při 37 ° C) a při skladování roztoku při pokojové teplotě byla prokázána dokonce účinná inhibice v methylaci cytosinu (Stresemann a Lyko, 2008).

Po buněčné absorpci transportním mechanismem specifickým pro nukleosidy je decitabin fosforylován deoxycytidinkinasou a metabolicky přeměněn na aktivní nukleotid

s funkcí inhibovat methylace DNA. Začleněním decitabinu do DNA se nově syntetizují hypometylované řetězce DNA (Hubeek et al., 2005; Hackanson a Daskalakis, 2014; Wilson et al., 1983). Po zabudování do DNA tvoří DAC kovalentní komplex s DNA methyltransferasou DNMT1, čímž se buňky zbaví její enzymatické aktivity (Santi et al., 1983; Diesch et al., 2016).

K inaktivaci léčiva dochází prostřednictvím deaminace cytidindeaminasou v lidských játrech a slezině, ale také v granulocytech, intestinálním epitelu a plazmě (Momparler et al., 1997). Při ekvimolárních koncentracích je decitabin při inhibici methylace nejméně dvakrát tak účinný jako azacytidin (Creusot et al., 1982).

I přes opakované podávání nízkých dávek DAC nebyla prokázána žádná systémová akumulace léčiva a profil toxicity byl předvídatelný a zvládnutelný (Cashen et al., 2008).



Obr. 6. Schématické shrnutí regulace genu exprese methylací promotoru a reversibilita epigenetického mechanismu za užití demethylačního činidla decitabinu (upraveno podle Hackanson a Daskalakis, 2014).

2.4 Myelomové buněčné linie

V posledních letech došlo k velkému pokroku v biologii a terapii MM. Mnoho z těchto objevů pochází ze studií provedených na myelomových buněčných liniích.

Existují však dlouhodobé otázky o spolehlivosti buněčných myelomových linií jako modelů skutečného onemocnění u pacientů s MM. Jedním z hlavních problémů je, že zatímco velká většina nádorových – plazmatických buněk MM sídlí v kostní dřeni, tak v podstatě všechny buněčné linie MM pocházely z onemocnění mimo kostní dřeň. Nicméně

veškeré pokusy založit dlouhodobou kulturu plazmatických buněk MM izolovaných z onemocnění lokalizovaného čistě v dřeni bylo do značné míry neúspěšné (Drexler a Matsuo, 2000; Sarin et al., 2020).

Vzhledem k těmto omezením byly izolovány myelomové buněčné linie, které zůstávají závislé na interleukinu-6 (IL-6), přičemž IL-6 je rozhodující faktor mikroprostředí kostní dřene podporující progresi MM. Tyto linie proto mohou být nositelé i dalších *in vivo* fenotypů, které se vyskytují v IL-6 nezávislých myelomových liniích. Souběžně probíhají studie, ve kterých jsou porovnávány detekované genetické změny v myelomových buněčných liniích, jako jsou translokace nebo mutace, se specifickými fenotypy, a následně jsou porovnávány s pacienty se stejnými genetickými modifikacemi. Nicméně, stále existují otázky týkající se jak kvalitativních, tak kvantitativních rozdílů mezi buněčnými liniemi MM a pacienty s MM (Sarin et al., 2020).

Myelomová buněčná linie U-266 byla vytvořena v roce 1968 z periferní krve 53-letého muže s myelomem vylučujícím imunoglobulin E (IgE). Jedná se o kulaté až polygonální buňky, které se mohou vyskytovat samostatně nebo tvořící shluky buněk. Doporučená inkubace je při 37 °C s 5% CO₂ a generační doba 55 hodin. Doporučené skladování je zmrazené s 70% médiem, 20% FBS (fetální hovězí sérum), 10% DMSO. Používané médium 90% RPMI 1640 + 10% FBS. Imunologie této linie: CD3 -, CD5 -, CD10 -, CD13 -, CD19 -, CD20 -, CD34 -, CD37 -, CD38 (+), CD138 +, HLA-DR +, sm/cyIgG -, sm/cyIgM -, sm/cykappa -, smlambda -, cylambda + (zdroj dsmz.de; dsmz no. ACC9, dne 02.08.2021).

Myelomová buněčná linie OPM-2 byla vytvořena v roce 1982 z periferní krve 56-leté ženy s mnohočetným myelomem v leukemické fázi. Jedná se o samostatné kulaté až polygonální buňky v suspenzi. Doporučená inkubace je při 37 °C s 5% CO₂ a generační doba 50-60 hodin. Doporučené skladování je zmrazené s 70% médiem, 20% FBS, 10% DMSO. Používané médium 90% RPMI 1640 + 10% FBS. Imunologie této linie: CD3 -, CD10 -, CD19 -, CD20 -, CD34 -, CD37 -, CD38 +, CD80 -, CD138 +, HLA-DR -, sm/cyIgG -, sm/cyIgM -, sm/cykappa -, sm/cylambda - (zdroj dsmz.de; dsmz no. ACC50, dne 02.08.2021).

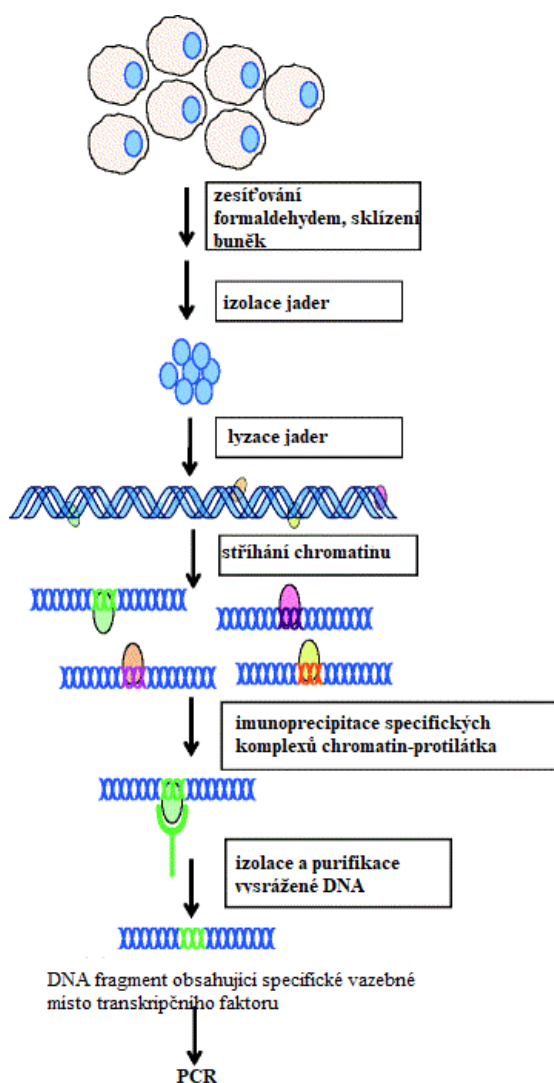
Myelomová buněčná linie KMS-12-PE byla vytvořena v roce 1987 z pleurálního výpotku 64-leté ženy s refrakterním terminálním mnohočetným myelomem (neprodukujícím imunoglobulin) po kombinované chemoterapii. Jedná se o malé kulaté buňky rostoucí jednotlivě nebo příležitostně v malých shlucích v suspenzi. Doporučená inkubace je při 37 °C s 5% CO₂ a generační doba 60-80 hodin. Doporučené skladování je zmrazené s 70% médiem, 20% FBS, 10% DMSO. Používané médium 80% RPMI 1640 + 20% FBS. Imunologie této linie: CD3 -, CD4 -, CD13 -, CD14 -, CD15 -, CD19 -,

CD20 -, CD34 -, CD38 +, CD138 +, HLA-DR + (zdroj dsmz.de; dsmz no. ACC606, dne 02.08.2021)

2.5 Chromatinová imunoprecipitace

Imunoprecipitace chromatinu (ChIP) je důležitou technikou pro studium interakcí proteinů a DNA *in vivo*. Chemické zasíťování DNA a jejích přidružených proteinů, následované izlovací a rozbitím – stříháním chromatinu, imunoprecipitací protilátkou proti požadovanému proteinu, izolací DNA a kvantifikací cílených úseků DNA RT-PCR, mohou identifikovat specifické interakce mezi proteinem a DNA nebo místa epigenetické alterace histonu. Transkripční faktory a epigenetické modifikace jsou klíčovými determinanty transkripce. Experimenty ChIP tedy mohou poskytnout mnoho poznatků k pochopení mechanismu genové exprese.

Podstatou chromatinové imunoprecipitace je kovalentní spojení mezi proteinem a DNA pomocí chemického zasíťování s formaldehydem. Buněčná jádra se následně izolují a chromatin, který obsahuje komplexy fixních proteinů a DNA, se stříhá – rozbíjí sonikací na fragmenty DNA. Takto rozstříhaný chromatin se následně inkubuje s protilátkami namířenými proti požadovanému proteinu a imunitní komplexy protilátek a chromatinu se vysráží pomocí kuliček proteinu A nebo G. Imunoprecipitované úseky DNA se poté izolují, čistí a kvantifikují pomocí RT-PCR. Hojnost proteinu v určité oblasti genomu je tak ovlivněna jeho obohacením DNA (Obr. 7) (Barish a Tangirala, 2013).



Obr. 7. Schématický přehled imunoprecipitace chromatinu. Buňky jsou fixovány na kovalentně zesíťovaný protein na DNA. Poté dochází k lyzi buněk a izolaci jader. Následuje lýze jader a chromatin se stříhá na malé fragmenty. Imunoprecipitace se provádí s použitím protilátky na specifický požadovaný protein vázaný na DNA. Sražená DNA se poté izoluje a purifikuje. Poté se provede PCR za účelem zjištění, zda se požadovaný protein váže na specifickou genomovou oblast (upraveno podle Barish a Tangirala, 2013).

Imunoprecipitace chromatinu byla použita v kombinaci s jinými technikami k objasnění *in vivo* interakcí DNA a proteinů. Ve standardním postupu ChIP jsou specifické sekvence DNA zkoumány pomocí PCR s genově specifickými primery. Je třeba nejprve předpokládat, že konkrétní promotor může být vázán sledovaným proteinem, aby bylo možné navrhnout primery specifické pro promotor nebo sondu. Tento protokol proto nelze použít k identifikaci neznámých genových sekvencí, které interagují s daným proteinem (Weinmann a Farnham, 2002; Das et al., 2004).

2.6 RT-PCR

Kvantitativní polymerázová řetězová reakce v reálném čase (RT-PCR) je technika pro současnou amplifikaci a kvantifikaci produktu cílové DNA nebo komplementární DNA

(cDNA), protože proces probíhá v reálném čase v systému s „uzavřenou trubicí“ (Singh a Roy-Chowdhuri, 2016).

Jedná se o techniku založenou na konvenční polymerázové řetězové reakci (PCR). Na rozdíl od konvenční metody PCR, ve které je kvantifikace, pokud je prováděna, založena na analýze „koncového bodu“ množství amplikonu, kdežto u RT-PCR umožňuje kvantifikaci produktu, protože proces probíhá v reálném čase.

Konvenční PCR s analýzou koncového bodu vyžaduje obvykle další kroky, jako je gelová elektroforéza k potvrzení produktu PCR – amplikonu na základě jeho velikosti. Amplifikaci lze provést, ale potvrzení amplikonu je spojeno s dalšími metodickými postupy. Naproti tomu RT-PCR umožňuje kvantifikaci a analýzu PCR během amplifikace a amplikon se měří v systému s „uzavřenou trubicí“ pomocí různých detekčních systémů, které používají křivky tání anebo fluorescenční detekční systémy (Nolan et al., 2006; Singh a Roy-Chowdhuri, 2006).

Optický termocykler se používá k monitorování fluorescenčních molekul prostřednictvím excitace a kvantifikace fluorescenční emise. Přestože je možné použít mnoho různých provedení pro fluorofory, včetně vazby na oligonukleotid za vzniku značeného primeru, sondy nebo přímé vazby na dvouvláknovou DNA, společným rysem je, že během PCR musí dojít ke změně fluorescence, která by umožnila detekci a kvantifikaci produktu v reálném čase. V optimalizované reakci RT-PCR obvykle koncentrace počátečního templátu určuje počet nezbytných cyklů, než dojde ke vzrůstu fluorescence. Počáteční exponenciální amplifikace není pozorovatelná, protože koncentrace jsou pod mezí detekce. Následuje fáze růstu a poté fáze plató. Bod maximálního zrychlení této růstové křivky koreluje s počáteční koncentrací templátu, a číslo frakčního cyklu je nepřímo úměrné počáteční koncentraci templátu (Burns et al., 2005; Singh a Roy-Chowdhuri, 2006).

Výhodou RT-PCR je jeho citlivost a velký dynamický rozsah s přesností 5-10 %. Specifikace závisí na kvalitě PCR a metodě detekce. Pro absolutní kvantifikaci lze zahrnout standardy pro poskytnutí přesného počtu kopií, pro většinu praktických účelů však relativní kvantifikace obvykle poskytuje potřebné informace. Jako biologická reference k normalizaci výsledků mezi různými experimenty se využívají „housekeeping“ geny (Huggett et al., 2005; Singh a Roy-Chowdhuri, 2006).

Výhodou použití relativního kvantifikačního přístupu je, že není třeba generovat standardní kalibrační křivku. Analýzu křivky tání lze použít ve spojení s RT-PCR jako předpokládanou identifikaci amplifikovaného cíle. Barvivo SYBR Green I je součástí reakce PCR a jak produkty tají konstantní rychlostí a dochází k disociaci vláken, lze sledovat pokles

fluorescence. Analýza tání sondy je výhodná genotypizační metoda, která využívá buď značené nebo neznačené oligonukleotidy (Ririe et al., 1997; Singh a Roy-Chowdhuri, 2006).

Kvantitativní polymerázovou řetězovou reakci v reálném čase lze také kombinovat s reverzní transkripcí za účelem kvantifikace mRNA nebo microRNA (Nolan et al., 2006). Proces reverzní transkripční polymerázové řetězové reakce generuje komplementární transkripty DNA a poskytuje kvalitativní výstup z hlediska genové exprese (Singh a Roy-Chowdhuri, 2006).

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Použité chemikálie

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, USA)

Deoxycholát sodný (Merck Life Science, Darmstadt, Německo)

Dimethylsulfoxid (DMSO) 100% (Merck Life Science, Darmstadt, Německo)

Dodecylsírán sodný (SDS) (Serva, Heidelberg, Německo)

Ethylendiamintetraoctová kyselina (EDTA) (Merck Life Science, Darmstadt, Německo)

Ethylenglykoltetraoctová kyselina (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)

Normal Mouse IgG (MerckMillipore Life Science, Darmstadt, Německo)

Normal Rabbit IgG (MerckMillipore Life Science, Darmstadt, Německo)

cOmplete™ Protease Inhibitor Coctail (Merck Life Science, Darmstadt, Německo)

Kyselina chlorovodíková (Lékárna Fakultní nemocnice Olomouc, Česká Republika)

Nonidet® P40 (Merck Life Science, Darmstadt, Německo)

Primery (Merck Life Science, Darmstadt, Německo)

- Primery kompatibilní se sondou *DNMT1*
 - Right 5'-TAATCCTGGGGCTAGGTGAA-3'
 - Left 5'-CAAACCCCTTCCAAACCTC-3'
- Primery kompatibilní se sondou *DNMT3A*
 - Right 5'-TGGTCTCCTTCTGTTCTTTGC-3'

- Left 5′–CCTGAAGCCTCAAGAGCAGT–3′
- Primery kompatibilní se sondou *DNMT3B*
- Right 5′–AATTTGTCTTGAGGCGCTTG–3′
- Left 5′–GGAAATTAGAATCAAGGAAATACGA–3′

Proteinase K (Bioline Meridian Bioscience, Memphis, Tennessee, USA)

Protilátky:

- Anti-H3K36me3 protilátka – monoklonální myší protilátka (Bioss Antibodies, Woburn, Massachusetts, USA)
- Anti-H3K9me3 protilátka – polyklonální králičí protilátka (Bioss Antibodies, Woburn, Massachusetts, USA)

Pyruvát sodný (P-Lab, Praha, Česká Republika)

QIAquick® PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden, Německo)

RNase A, DNase and protease-free (10 mg/mL) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)

Salmon sperm DNA/Protein A agarose (Merck Life Science, Darmstadt, Německo)

Sondy (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)

SsoAdvanced Universal SYBR® Green Supermixe (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Kalifornie, USA)

Tris (Serva, Heidelberg, Německo)

Triton X-100 (Merck Life Science, Darmstadt, Německo)

γ-globulin (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Kalifornie, USA)

3.2 Použité roztoky

0,5M Ethylendiaminotetraoctová kyselina (EDTA), pH 8,0

- 194,13 g EDTA
- Rozpustit v 800 ml deionizované vody a pomocí hydroxidu sodného upravit hodnotu pH na 8,0 pomocí pH metru
- Doplnit do 1 l deionizovanou vodou a upravit pH na hodnotu 8,0 pevným hydroxidem sodným nebo 35% kyselinou chlorovodíkovou

0,5M Ethylenglykoltetraoctová kyselina (EGTA)

- 1,902 g EGTA
- Rozpustit v 50 ml deionizované vody, uchovávat při 4 °C

11x Formaldehyd stock

- 2 ml 0,5M roztoku Hepes, pH 8,0
- 40 μ l 0,5M roztoku EDTA, pH 8,0
- 100 μ l 0,1M roztoku EGTA
- 2 ml 1M roztoku chloridu sodného
- 6,286 ml 35% roztoku formaldehydu
- Doplnit do 20 ml deionizovanou vodou

Eluční pufr pro ChIP

- 50 μ l 1M roztoku Tris, pH 8,0
- 2 μ l 0,5M roztoku EDTA, pH 8,0
- 100 μ l 10% roztoku SDS
- 100 μ l 1M roztoku chloridu sodného
- Doplnit do 1 ml deionizovanou vodou
- Připravovat čerstvý před použitím

High salt immune complex wash buffer

- 1 ml 10% roztoku SDS
- 1 ml Triton X-100
- 400 μ l 0,5M EDTA, pH 8,0
- 2 ml 1M roztoku Tris, pH 8,1
- 50 ml 1M roztoku chloridu sodného
- Doplnit do 100 ml deionizovanou vodou
- Uchovávat při 4 °C

ChIP lyzační pufr

- 20 ml 0,5M roztoku Hepes, pH 8,0
- 400 μ l 0,5M roztoku EDTA, pH 8,0
- 1 ml 0,1M EGTA
- 28 ml 1M roztoku chloridu sodného
- 20 ml 100% glycerolu
- 1 ml Nonidet[®] P40
- 500 μ l Triton X-100
- Doplnit do 20 ml deionizovanou vodou, uchovávat při 4 °C

Low salt immune complex wash buffer

- 1 ml 10% roztoku SDS
- 1 ml Triton X-100
- 400 μ l 0,5M EDTA
- 2 ml 1M roztoku Tris, pH 8,1
- 15 ml 1M roztoku chloridu sodného
- Doplnit do 100 ml deionizovanou vodou
- Uchovávat při 4 °C

Radioimmunoprecipitační testovací pufr (RIPA) s salmon sperm DNA (ssDNA)

- 990 μ l RIPA pufru
- 10 μ l salmon sperm DNA
- Udržovat na ledu

RIPA buffer

- 500 μ l 10% roztoku SDS
- 5 ml 1% roztoku deoxycholátu sodného
- 500 μ l Triton X-100
- 7 ml 1M roztoku chloridu sodného
- 250 μ l 0,1M roztoku EGTA
- 100 μ l 0,5M roztoku EDTA, pH 8,0
- 500 μ l 1M Tris, pH 8,0
- Doplnit do 50 ml deionizovanou vodou
- Přidat tabletu koktejlu inhibitoru proteas, nechat rozpustit
- Uchovávat při -20 °C

RPMI médium (10 % FBS)

- 10 ml roztoku FBS
- 1 ml roztoku 2mM glutaminu
- 1 ml roztoku antibiotik PenStrep
- 1 ml 100 mM 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 0,5M roztoku EDTA, pH 8,0
- 1670 µl 1M roztoku Tris, pH 8,0
- 16,7 ml 1M roztoku chloridu sodného
- Doplnit do 100 ml deionizovanou vodou, uchovávat při 4 °C

3.3 Použité přístrojové vybavení a použitý materiál

0,2ml a 1,5ml plastové mikrozkušavky (Eppendorf AG, Hamburg, Německo)

5ml a 10ml plastové pipety (TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Švýcarsko)

96-jamková titrační destička (TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Švýcarsko)

Biohazard box MSC-Advantage™ 1,8 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)

Centrifuga BR4i (DJB Labcare, Buckinghamshire, Velká Británie)

Centrifuga LMC-3000 (Biosan, Riga, Lotyšsko)

Centrifuga MiniSpin plus – (Eppendorf AG, Hamburg, Německo)

Centrifuga Multi-spin PCV-3000 (Keison products, Chelmsford, Velká Británie)

Centrifugační zkumavky o objemu 15 ml a 50 ml (TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Švýcarsko)

DNA/RNA UV-cleaner box UVC/T-AR (Biosan, Riga, Lotyšsko)

Chlazená centrifuga 3K3 (Merck Life Science, Darmstadt, Německo)

CO₂ inkubátor Heracell™ VIOS 160l (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)

Laboratorní sklo – kádinky, odměrné válce, plastové mikrozkušavky, jednorázové zkumavky (P-Lab, Praha, Česká Republika)

LightCycler® 480 (Merck Life Science, Darmstadt, Německo)

LightCycler® 480 multiwell plate 96 white, cat. No. 04729692001 (Merck Life Science, Darmstadt, Německo)

Micro Centrifuga Smart 15 (Hanil Scientific, Gimpo-si, Jižní Korea)

Mikropipety (Eppendorf AG, Hamburg, Německo)

Multi Rotátor PTR-35 (Keison products, Chelmsford, Velká Británie)

NanoDrop™ 1000 Spectrophotometre (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)

Petriho misky (TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Švýcarsko)
pH metr (Elisabeth Pharmacon, Croydon Surrey, Velká Británie)
PowerWave XS Microplate Spectrophotometer (BioTek U.S., Winooski, Vermont, USA)
Sonikátor UP200S (Hielscher Ultrasound technology GmbH, Teltow, Německo)
Sterilné jednorazové ihly 18G x 1 ½ " Luer–Lock (Chirana T.Injecta, Stará Turá, Slovensko)
Thermo shaker TS-100C (Biosan, Riga, Lotyšsko)
Váhy KERN (Kern & Sohn GmbH, Balingen, Německo)
Vortex Lab Dance (IKA, Staufen, Německo)

3.4 Metody

V experimentální části této práce byly použity tři myelomové buněčné linie, KMS12-PE, OPM2 a U266, která exprimuje IL-6.

Myelomové buněčné linie

- Myelomová buněčná linie U-266 (U266B1) je suspenzní linie. Byla zakoupena od společnosti American Type Collection (ATCC ®TIB-196™). Byla vytvořena z periferní krve 53-letého muže s mnohočetným myelomem vylučujícím imunoglobulin IgE (zdroj dsmz.de). Myelomové buňky linie U266 (U266B1) exprimují Interleukin-6 (Ingersoll et al., 2011).
- Myelomová buněčná linie KMS-12-PE je suspenzní linie. Byla získána z buněčné banky JCRB – Japanese Cancer Research Resources Bank (National Institute of Biomedical Innovation, Osaka, Japonsko) pod označením JCRB0430. Byla vytvořena z pleurálního výpotku 64-leté ženy v refrakterním terminálním stádiu mnohočetného myelomu (neprodukujícím imunoglobulin) po kombinované chemoterapii (zdroj dsmz.de).
- Myelomová buněčná linie OPM-2 (ACC50) je suspenzí linie. Byla zakoupena od společnosti DSMZ – German Collection of Microorganisms and Cell (Braunschweig, Německo). Byla vytvořena z periferní krve 56-leté ženy s mnohočetným myelomem v leukemické fázi (zdroj dsmz.de)

3.4.1 Kultivace a ovlivnění buněčných linií

Myelomové buněčné linie byly kultivované v inkubátoru při 37 °C v 5% atmosféře CO₂. Následně práce probíhala ve sterilních podmínkách v boxu s laminárním prouděním vzduchu.

Buňky myelomových linií KMS12-PE, OPM2 byly kultivovány v RPMI médiu s 10 % fetálním hovězím sérem (FBS), u linie U266 s 15 % FBS, a poté byly nasázeny na 10 x 10 ml Petriho misky v množství $5-9 \cdot 10^6$ buněk /8 ml média. Kontrolní misky obsahovaly 0,1% dimethylsulfoxid (DMSO). K ovlivnění buněk byly využity různé koncentrace demetylačních činidel, jejichž příprava je popsána uvedena v Tab. 1. Zásobní roztoky AZA a DAC byly 50mM. K přípravě používaných koncentrací k ovlivnění buněk byly použity 0,5mM roztoky AZA a DAC. Buňky byly opakovaně ovlivňovány po 24 a po 72 hodinách sklizeny.

Tab. 1. Příprava jednotlivých koncentrací ovlivnění

Ovlivnění	Médium [μ l]	Testované látky [μ l]
DMSO	4 812,50	187,50
5 μ M (DAC, AZA)	2 450,00	50,00
0,5 μ M (DAC, AZA)	3 750,00	1 250,00 5 μ M
0,2 μ M (DAC,AZA)	4 500,00	500,00 5 μ M

Postup práce:

1. RPMI médium s 10 % (15 %) FBS bylo vytemperováno na 37 °C ve vodní lázni;
2. Byl připraven 10% DMSO;
3. Byla připravena jednotlivá ovlivnění dle tabulky;
4. Buněčná suspenze v RPMI médium s FBS v počtu $5-9 \cdot 10^6$ buněk/na misku byla pipetována v objemu 8 ml/na misku;
5. Buňky všech Petriho misek byly ovlivněny 2 ml dané koncentrace příslušného demetylačního činidla. Každé ovlivnění bylo v duplikátu;
6. Ovlivněné buňky byly inkubovány po dobu 72 hodin při 37 °C v inkubátoru;
7. Po každých 24 hodinách bylo ovlivnění zopakováno.

3.4.2 Sklizení buněk, získání chromatinového lyzátu

Po 72 hodinách od prvního ovlivnění byly buňky zpracovávány podle následujícího postupu práce:

1. Do každé Petriho misky byl k 10 ml ovlivněné buněčné suspenze přidán 1 ml 11x Formaldehyd Stock. Následovala inkubace po dobu 30 minut při 4 °C;
2. Poté bylo napipetováno 687,5 μ l 2M glycinu s následnou inkubací po dobu 5 minut při pokojové teplotě;
3. Buněčná suspenze byla přenesena do kónické zkumavky s víčkem – falkonky o objemu 50 ml, práce probíhala na ledu;

4. Centrifuga při 600 g, 15 minut, 4 °C;
5. Z každé zkumavky byl odsát supernatant, tak aby nedošlo k poškození peletu;
6. K peletu bylo následně přidáno 8 ml vychlazeného fosfátového pufru (PBS);
7. Centrifuga při 600 g, 15 minut, 4 °C;
8. Pelet byl rozsuspendován v 6 ml CHIP lyzačním pufru;
9. Obsah 50ml zkumavky byl přenesen do 15ml plastové zkumavky;
10. Zkumavky byly umístěny na rotátor při 5 otáčkách/min po dobu 10 minut v chladové místnosti při 4 °C;
11. Centrifuga při 600 g, 15 minut, 4 °C;
12. Supernatant byl odstraněn, pelet byl resuspendován v 8 ml ředícího pufru (CHIP dilution buffer);
13. Rotátor v chladové místnosti při 4 °C po dobu 10 minut při 5 otáčkách/min;
14. Centrifuga při 600 g, 15 minut, 4 °C;
15. Supernatant byl odstraněn, pelet byl rozsuspendován ve 200–500 µl radioimunoprecipitačního testovacího pufru (RIPA pufr) v závislosti na jeho velikosti. Následně byl obsah zkumavek přenesen do plastových mikrozkušavek o objemu 1,5 ml;
16. Vzorky byly umístěny na Vortex po dobu 30 sekund a následně na rotátor 15 otáček/min po dobu 30 minut v chladové místnosti při 4 °C;
17. Vzorky byly uchovávány v mrazícím boxu při -80 °C.

3.4.3 Sonikace buněčných lyzátů

Buněčné lyzáty byly sonikovány na sonikátoru. První cyklus sonikace byl s účinností 80 % po dobu 20 sekund. Vzorky byly průběžně chlazeny na ledu. V dalším cyklu byly buňky sonikovány s účinností 90 % po dobu 20 sekund, poslední cyklus byla sonikace s účinností 100 % po dobu 20 sekund a poté znovu se stejnou účinností po dobu 10 sekund. U některých vzorků bylo nutné poslední cyklus (100 % účinnost po dobu 10 sekund) opakovat. Mezi jednotlivými cykly byly mikrozkušavky s lyzáty umístěny na ledu.

Po sonikaci byly vzorky centrifugovány při 16 000 g po dobu 10 minut ve vychlazené centrifuze na 4 °C. Supernatant byl přenesen do nové plastové mikrozkušavky o objemu 1,5 ml a uchováván v mrazícím boxu při -80 °C.

3.4.4 Stanovení koncentrace proteinů metodou Bradfordové

Bylo připraveno činidlo Bradfordové v poměru 1:4 (činidlo: deionizovaná voda). Objem činidla byl stanoven následně: 1 ml činidla/vzorek + 1,5 ml na „blank“ a kalibrační řadu. Výsledná hodnota objemu byla vydělena 5, tím byl stanoven objem činidla Bradfordové a podíl deionizované vody.

Do 96 jamkové mikrotitrační desky byla pipetována kalibrační řada standardu γ -globulinu o koncentraci 1 mg/ml. Standard byl nanesen do 6 jamek v následujícím pořadí: 1 μ l, 2 μ l, 3 μ l, 4 μ l, 5 μ l a 10 μ l a následně doplněn do objemu 10 μ l deionizovanou vodou. Poté bylo do každé jamky přidáno 200 μ l připraveného činidla Bradfordové.

Vzorky byly nanášeny v tripletech, do každé jamky byl nanesen 1 μ l vzorku + 1 μ l deionizované vody a 200 μ l činidla Bradfordové. Do tří jamek bylo naneseno pouze 200 μ l činidla Bradfordové a následně vyhodnocována jako „blank“.

Tímto způsobem pipetovaná mikrotitrační deska byla vložena do Elisa readeru a spektrofotometricky byla změřena absorbance jednotlivých vzorků. Z naměřených hodnot byla vytvořena kalibrační křivka a z ní odvozena koncentrace proteinů jednotlivých ovlivnění.

3.4.5 Chromatin imunoprecipitační analýza s použitím Anti H3K9me3 a H3K36me3 protilátek

Do mikrozkuhavky bylo napipetováno vypočítané množství vzorku obsahující 100 – 200 μ g proteinů a doplněno pufrům RIPA s inhibitory proteáz do objemu 250 μ l. Do mikrozkuhovek s jednotlivými ovlivněními bylo přidáno buď 2 μ l Anti-H3K36me3 (2 μ g) protilátky nebo 1,3 μ l Anti-H3K9me3 (2 μ g) protilátky, 2 μ l IgG (2 μ g) (Merck, Darmstadt, Německo) bylo používáno jako negativní kontrola. Precipitace proteinových vzorků s danou protilátkou probíhala přes noc na rotátor při 5 otáčkách/min po dobu 10 minut v chladové místnosti při 4 °C.

Mezi jednotlivými kroky byly vzorky uchovávány na ledu.

1. Do každé mikrozkuhavky bylo přidáno 20 μ l ssDNA (salmon sperm DNA), mikrozkuhavky byly umístěny na rotátor při nastavení 7 otáček/min po dobu 1 hodiny v chladové místnosti při 4 °C;
2. Centrifuga při 3 000 rpm, 4 °C, 3 minuty;
3. Supernatant byl opatrně odstraněn, k peletu bylo přidáno 500 μ l pufru RIPA obsahující ssDNA (na 1 vzorek: 5 μ l ssDNA + 495 μ l RIPA pufru);
4. Centrifuga při 3 000 rpm, 4 °C, 3 minuty;

5. Odstraněn supernatant, k peletu bylo přidáno 500 μ l pufru (Low salt immune complex wash buffer);
6. Centrifuga při 3 000 rpm, 4 $^{\circ}$ C, 3 minuty;
7. Odstraněn supernatant, k peletu bylo přidáno 500 μ l pufru (High salt immune complex wash buffer);
8. Odstraněn supernatant, k peletu bylo přidáno 500 μ l pufru RIPA obsahující ssDNA;
9. Centrifuga při 3 000 rpm, 4 $^{\circ}$ C, 3 minuty;
10. Odstraněn supernatant, k peletu bylo přidáno 50 μ l elučního pufru;
11. Vzorky byly umístěny na třepačku po dobu 15 minut;
12. Centrifuga při 2 000 g po dobu 1 minuty;
13. Supernatant byl přenesen do nové mikrozkuhavky a ke každému vzorku bylo přidáno 2,4 μ l 5M NaCl a 1 μ l RNase A (10 mg/ml);
14. Vzorky byly inkubovány na třepačce přes noc při 65 $^{\circ}$ C;
15. Následně byl ke vzorkům přidán 1 μ l Proteinase K (20 mg/ml), inkubace na třepačce při 60 $^{\circ}$ C po dobu 1 hodiny;
16. DNA byla přečištěna použitím kitu QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden, Germany) podle postupu uvedeného v balení.

3.4.6 Přečištění a izolace DNA

1. Byl dodržen postup uvedený v použitém QIAquick PCR Purification Kit;
2. Ke vzorkům byl přidán 5násobek PB pufru (250 μ l). Obsah mikrozkuhavky byl přepitován do kolonky;
3. Centrifuga při 13 000 rpm po dobu 1 minuty;
4. Odstraněn supernatant, na filtr bylo napipetováno 750 μ l PE pufru s ethanolem;
5. Centrifuga při 13 000 rpm po dobu 1 minuty;
6. Odstraněn supernatant, centrifuga při 13 000 rpm po dobu 1 minuty;
7. Filtr byl přendán do nové plastové mikrozkuhavky, bylo přidáno 15 μ l EB pufru;
8. Centrifuga při 13 000 rpm po dobu 1 minuty;
9. Eluce byla pipetována znovu do kolonky;
10. Centrifuga při 13 000 rpm po dobu 1 minuty;
11. Měření koncentrace na nanodropu.

3.4.7 Amplifikace DNA pomocí RT-PCR

Imunoprecipitovaná DNA byla amplifikována pomocí primerů specifických pro methyltransferasy DNMT1, DNMT3A a DNMT3B.

1. Práce byla prováděna za sterilních podmínek v boxu, vydezinfikování pracovní plochy;
2. Byla připravena PCR reakční směs podle Tab. 2, případně Tab. 3;
3. Reakční směs byla napipetována do 96-jamkové destičky a následně byla přidána DNA;
4. Destička byla přelepena fólií;
5. Centrifuga při 1000 g po dobu 1 minuty;
6. Destička byla umístěna do LightCycler[®]480 s nastaveným program (Tab. 4).

Tab. 2. Příprava reakční směsi pro RT-PCR analýzu pro geny *DNMT1*, *DNMT3A*, *DNMT3B* (*GAPDH* byl použit jako „housekeeping“ gen) v případě použití 3,00 μ l DNA

Reakční směs	Objem na jednu reakci [μ l]	Celkový objem [μ l]
SYBR Green	10,00	220,00
Forward primer	0,80	17,60
Reverse primer	0,80	17,60
Deionizovaná voda	4,40	96,80
Sonda 20x	1,00	22,00
reakční směs	17,00	374,00
DNA	3,00	

Tab. 3. Příprava reakční směsi pro RT-PCR analýzu pro geny *DNMT1*, *DNMT3A*, *DNMT3B* (*GAPDH* byl použit jako „housekeeping“ gen) v případě použití 2,50 μ l DNA

Reakční směs	Objem na jednu reakci [μ l]	Celkový objem [μ l]
SYBR Green	10,00	220,00
Forward primer	0,80	17,60
Reverse primer	0,80	17,60
Deionizovaná voda	4,90	107,80
Sonda 20x	1,00	22,00
reakční směs	17,50	385,00
DNA	2,50	

Tab. 4. Nastavení programu pro RT-PCR

Program	čas [hh:mm:ss]	teplota [°C]	počet cyklů
Pre-inkubace	0:00:10	95	1
Amplifikace			50
Denaturace	00:00:15	95	
Nasednutí primerů	00:00:30	60	
Prodlužování	00:00:35	72	

4 VÝSLEDKY

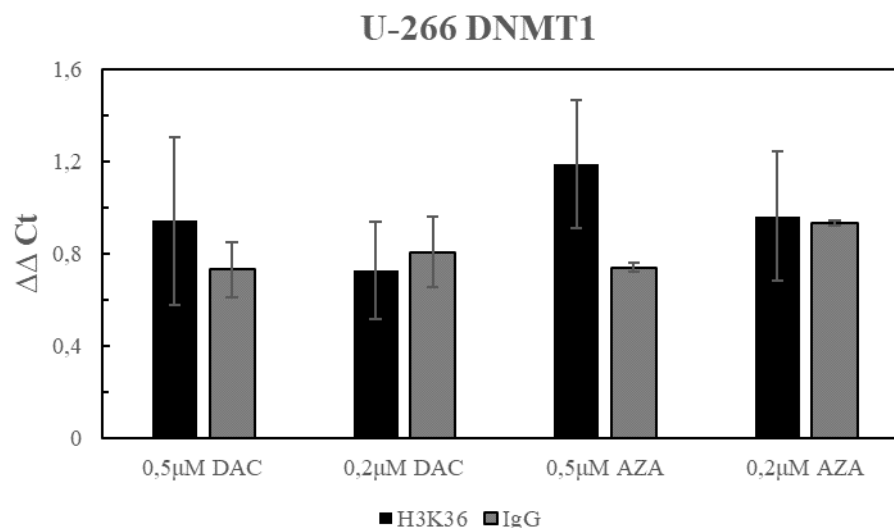
Praktická část diplomové práce byla zaměřena na detekci úrovně transkripčních komplexů vázajících se na methylace histonu H3 v místech lysinu 36 (H3K36me3) a lysinu 9 (H3K9me3) u myelomových buněčných linií KMS-12-PE, OPM-2 a U-266 ovlivněných po dobu 72 hodin demethylačními činidly 5-aza-2'-deoxycytidine (Decitabin) a 5-azacytidine (Azacytidin). Na základně chromatin imunoprecipitačních experimentů s protilátkami anti-H3K36me3 a anti-H3K9me3 byla kvantifikována úroveň exprese precipitovaných transkripčních komplexů s DNMT1, DNMT3A a DNMT3B metodou RT-PCR. Statistická analýza průkaznosti získaných dat exprese sledovaných genů a IgG byla provedena testem Mann-Whitney.

4.1 Myelomová buněčná linie U-266

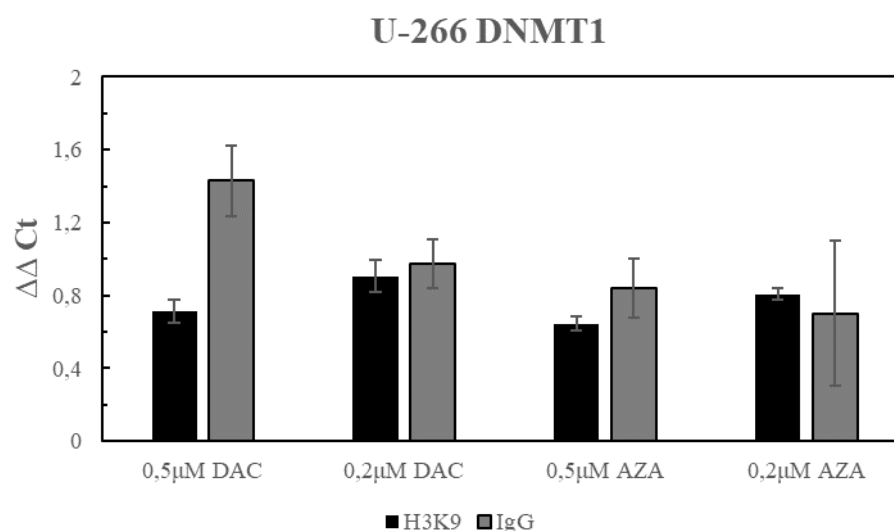
Buňky myelomové buněčné linie U-266 byly ovlivněny 0,2 μ M a 0,5 μ M roztoky 5'-Azacytidin (AZA) a 5'-Aza-2'deoxycytidin (DAC) po kultivaci v RPMI médiu s 15 % FBS. Buněčná linie byla ovlivněna a analyzována ve dvou na sobě nezávislých experimentech. Sonikovaný chromatinový lyzát (viz. Kapitola 3.4.2) byl precipitován buď anti-H3K9me3 nebo anti-H3K36me3 protilátkami. U obou protilátek bylo použito IgG, které sloužilo jako negativní kontrola. Relativní kvantifikace precipitovaných komplexů obsahujících jednotlivé methyltransferasy DNA – DNMT1, DNMT3A, DNMT3B (Obr. 8–13) byla provedena RT-PCR (GAPDH byl použit jako „housekeeping“ gen).

Tab. 5. Naměřené hodnoty koncentrace DNA u ovlivněné myelomové buněčné linie U-266 s přidanými protilátkami anti-H3K9me3 nebo anti-H3K36me3

U-266				
	H3K36	IgG	H3K9	IgG
vzorek	koncentrace [ng/ μ l]		koncentrace [ng/ μ l]	
DMSO	3,50	4,50	4,90	5,30
0,5 μ M DAC	3,40	8,80	7,60	5,00
0,2 μ M DAC	9,10	8,30	6,00	5,80
0,5 μ M AZA	6,00	9,20	5,20	6,00
0,2 μ M AZA	8,70	7,60	7,20	5,30



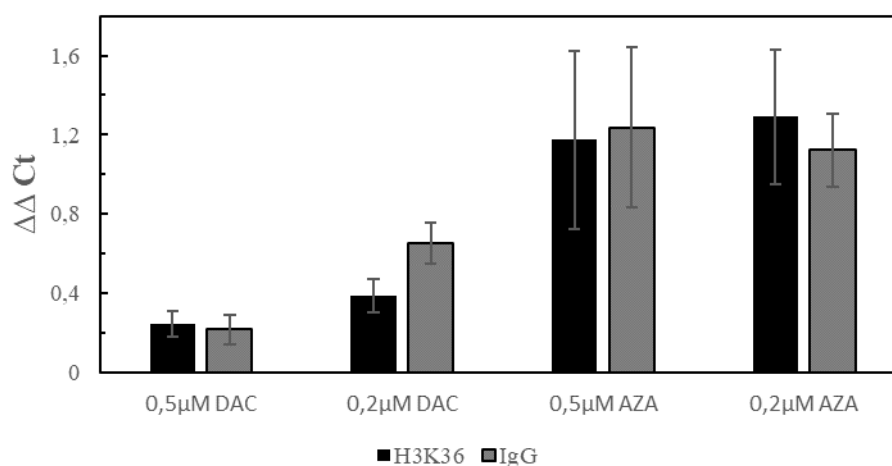
Obr. 8. Úroveň exprese genu DNMT1 u jednotlivých ovlivnění myelomové buněčné linie U-266 s protilátkou anti-H3K36me3 v porovnání s úrovní exprese kontrolního IgG



Obr. 9. Úroveň exprese genu DNMT1 u jednotlivých ovlivnění myelomové buněčné linie U-266 s protilátkou anti-H3K9me3 v porovnání s úrovní exprese kontrolního IgG

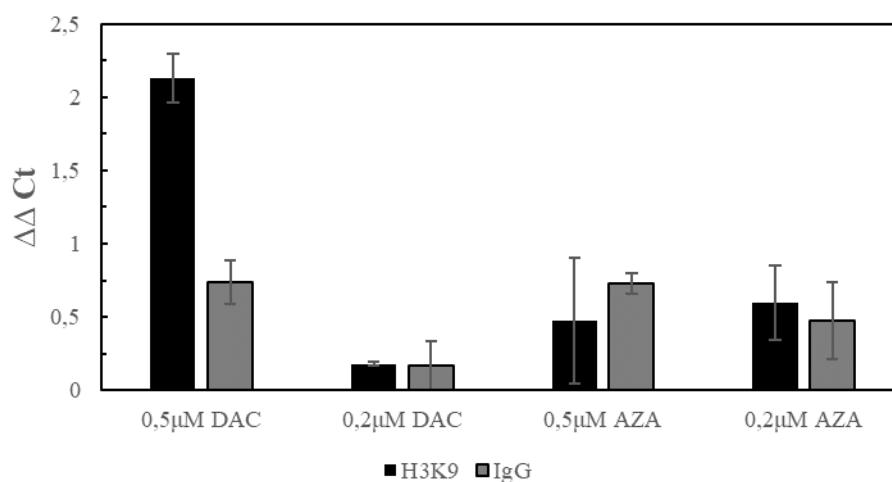
U precipitovaných komplexů H3K36me3 obsahujících pro-transkripční faktory, a precipitovaných komplexů vázajících se k H3K9me3, jež je znakem inhibice transkripce, se hladina exprese genu *DNMT1* pohybovala okolo hodnoty 1,00 (Obr. 8 a Obr. 9). Hodnoty negativní kontroly s IgG dosahovaly velmi podobných hodnot jako analyzované vzorky. U precipitátů s anti-H3K9me3 byly normalizované hodnoty, kromě ovlivnění s 0,2μM AZA, vyšší než exprese sledovaného genu. Byla detekována pouze mírně zvýšená exprese genu *DNMT1* ($\Delta\Delta Ct=1,19$) porovnáním s kontrolním IgG po ovlivnění 0,5μM AZA (anti-H3K36me3) (Obr. 8).

U-266 DNMT3A



Obr. 10. Úroveň exprese genu DNMT3A u jednotlivých ovlivnění myelomové buněčné linie U-266 s protilátkou anti-H3K36me3 v porovnání s úrovní exprese kontrolního IgG

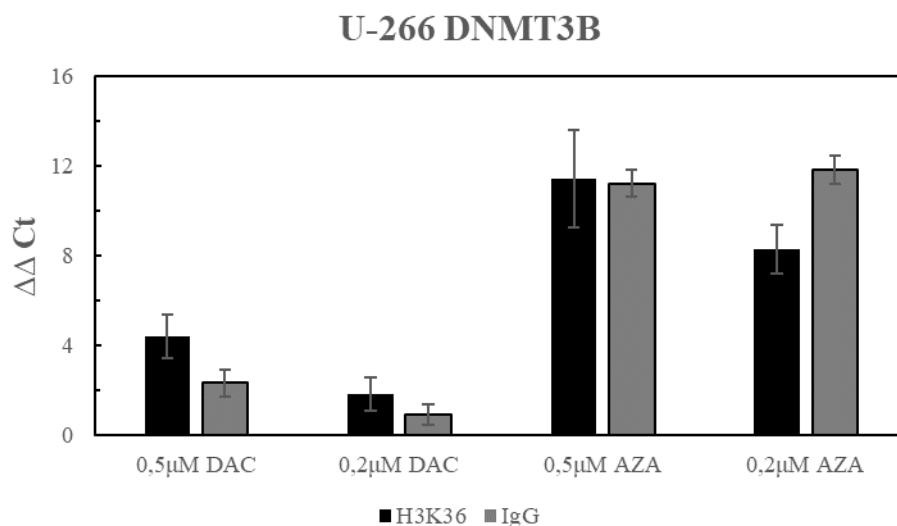
U-266 DNMT3A



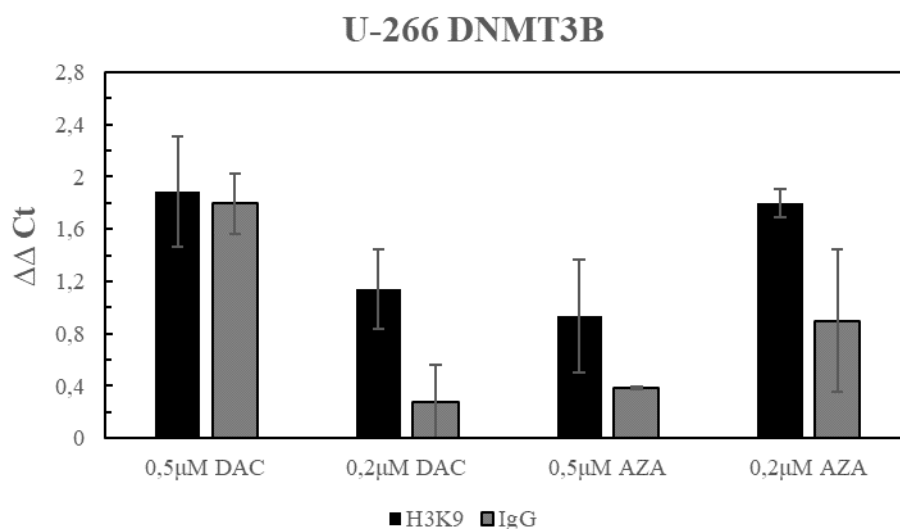
Obr. 11. Úroveň exprese genu DNMT3A u jednotlivých ovlivnění myelomové buněčné linie U-266 s protilátkou anti-H3K9me3 v porovnání s úrovní exprese kontrolního IgG

Pro-transkripční komplexy vykazují sníženou expresi genu *DNMT3A* při použití protilátky anti-H3K36me3 u ovlivnění Decitabinem (0,5 μ M DAC – $\Delta\Delta Ct=0,24$; 0,2 μ M DAC – $\Delta\Delta Ct=0,38$). Buňky U-266 ovlivněné Azacytidinem vykazují zvýšenou expresi genu *DNMT3A* porovnáním s ovlivněním DAC, nicméně úroveň hodnot $\Delta\Delta Ct$ se pohybuje kolem 1,00 (0,5 μ M AZA – $\Delta\Delta Ct=1,18$; 0,2 μ M AZA – $\Delta\Delta Ct=1,29$). Hladiny detekovaných IgG jsou statisticky neprůkazné ke všem příslušným typům ovlivnění, v případě ovlivnění 0,2 μ M DAC a 0,5 μ M AZA hladiny normalizovaných hodnot IgG převyšují úroveň normalizované exprese sledovaného genu (Obr. 10).

Při použití protilátky anti-H3K9me3 byl u precipitovaných komplexů inhibujících transkripci pozorovatelný signifikantní nárůst exprese genu *DNMT3A* u buněk U-266 buněk ovlivněných 0,5 μ M DAC ($\Delta\Delta Ct=2,133$, St.dev. 0,168) při porovnání s ovlivněním 0,2 μ M DAC (p -value 0,004, $p<0,01$) a 0,5 μ M AZA (p -value 0,044, $p<0,05$). Nicméně, u ovlivnění 0,5 μ M DAC je hodnota exprese genu *DNMT3A* ($\Delta\Delta Ct=2,13$) statisticky neprůkazná (p -value 0,198) oproti normalizované hodnotě IgG (Obr. 11).



Obr. 12. Úroveň exprese genu *DNMT3B* u jednotlivých ovlivnění myelomové buněčné linie U-266 s protilátkou anti-H3K36me3 v porovnání s úrovní exprese kontrolního IgG



Obr. 13. Úroveň exprese genu *DNMT3B* u jednotlivých ovlivnění myelomové buněčné linie U-266 s protilátkou anti-H3K9me3 v porovnání s úrovní exprese kontrolního IgG

U precipitovaných pro-transkripčních komplexů H3K36me3 byla detekována exprese genu *DNMT3B* přesahující hodnotu 1,00 u obou používaných ovlivnění DAC a AZA, a obou koncentrací (0,5 μ M a 0,2 μ M). Hodnota exprese $\Delta\Delta Ct=1,84$ u ovlivnění 0,2 μ M DAC je sice signifikantně nižší (p -value 0,005, $p < 0,01$) než hodnota exprese $\Delta\Delta Ct=11,063$ u buněk

ovlivněných 0,5 μ M AZA, ale hladina normalizovaných hodnot IgG příslušných ovlivnění je při porovnání s úrovní exprese genu *DNMT3B* statisticky neprůkazná (p -value 0,136 pro 0,2 μ M DAC; p -value 0,261 pro 0,5 μ M AZA) (Obr. 12).

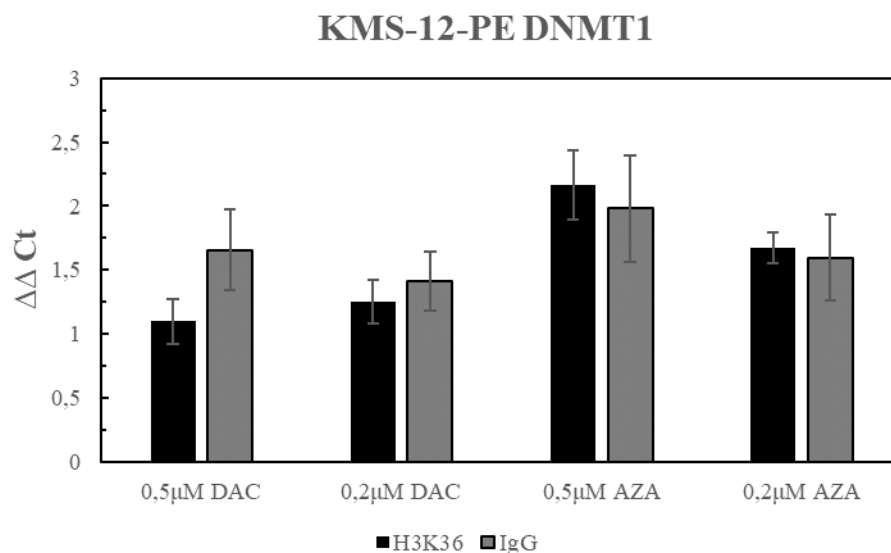
U precipitovaných komplexů s protilátkou anti-H3K9me3 (inhibice transkripce) dosahovala exprese genu *DNMT3B* hodnot $\Delta\Delta Ct=1,89$ u buněk ovlivněných 0,5 μ M DAC a hodnoty $\Delta\Delta Ct=1,80$ po ovlivnění buněk 0,2 μ M AZA (Obr. 13).

4.2 Myelomová buněčná linie KMS-12-PE

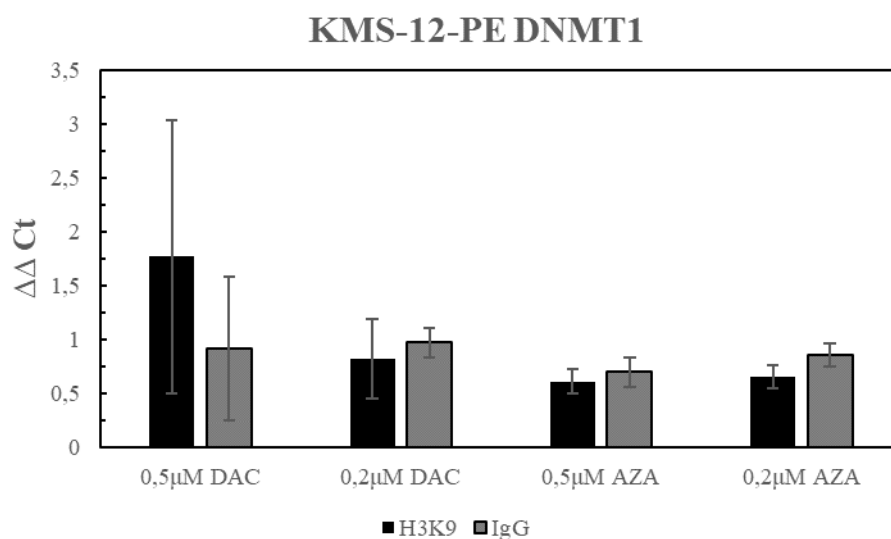
Buňky myelomové buněčné linie KMS-12-PE byly kultivovány v RPMI médiu s 10 % FBS, chromatinový lyzát byl izolován po jejich ovlivnění demethylačními činidly DAC a AZA, koncentracemi 0,2 μ M a 0,5 μ M, stejným postupem jako u ovlivněných buněk linie U-266 (viz. Kapitola 4.1). Koncentrace izolované precipitované DNA je uvedena v tabulce (Tab. 6). Úrovně exprese jednotlivých genů u linie KMS-12-PE jsou uvedeny v níže uvedených grafech (Obr. 14–19).

Tab. 6. Naměřené hodnoty koncentrace DNA u ovlivněné myelomové buněčné linie KMS-12-PE s přidanými protilátkami anti-H3K9me3 nebo anti-H3K36me3

KMS-12-PE				
	H3K36	IgG	H3K9	IgG
vzorek	koncentrace [ng/μl]		koncentrace [ng/μl]	
DMSO	2,50	1,50	0,90	3,10
0,5 μ M DAC	2,80	1,00	2,20	2,20
0,2 μ M DAC	1,40	0,90	1,70	3,50
0,5 μ M AZA	1,00	1,00	1,60	2,10
0,2 μ M AZA	1,40	1,50	1,70	1,60



Obr. 14. Úroveň exprese genu DNMT1 u jednotlivých ovlivnění myelomové buněčné linie KMS-12-PE s protilátkou anti-H3K36me3 v porovnání s úrovní exprese kontrolního IgG

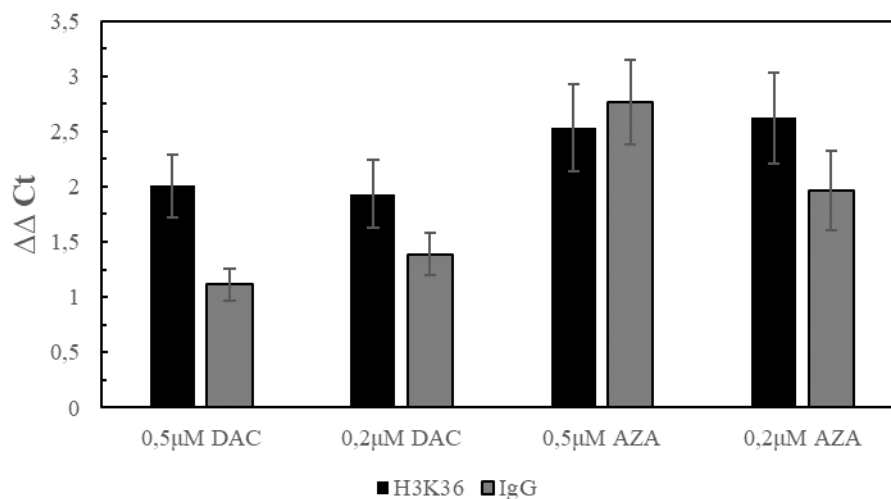


Obr. 15. Úroveň exprese genu DNMT1 u jednotlivých ovlivnění myelomové buněčné linie KMS-12-PE s protilátkou anti-H3K9me3 v porovnání s úrovní exprese kontrolního IgG

Obě použité koncentrace ovlivnění Azacytidinem (0,2 μM a 0,5 μM) u buněk linie KMS-12-PE vykazují po precipitaci protilátkou anti-H3K36me3 (znak aktivace transkripce) u genu *DNMT1* zvýšené hodnoty exprese proti 1,00 (0,2μM AZA – $\Delta\Delta Ct=1,67$; 0,5μM AZA – $\Delta\Delta Ct=2,17$). U buněk ovlivněných Decitabinem nebyly detekovány změny v expresi genu *DNMT1* (Obr. 14).

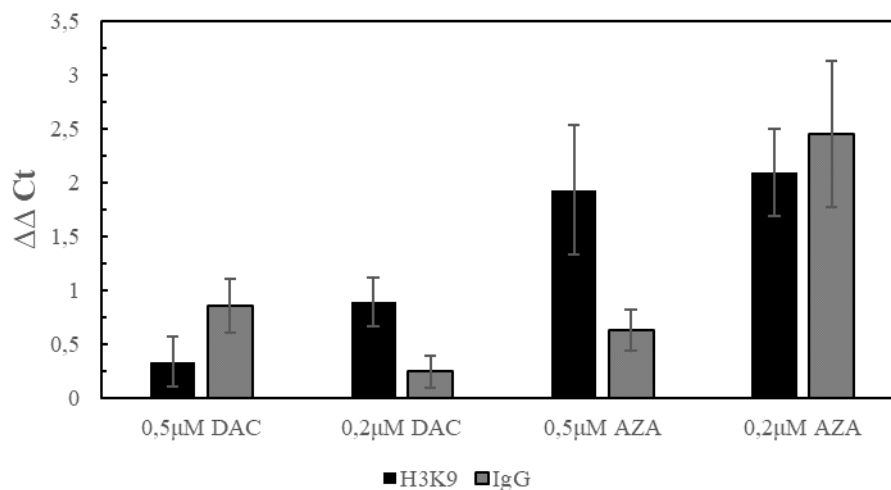
U precipitovaných komplexů s protilátkou anti-H3K9me3 (inhibice transkripce) lze pozorovat nezměněnou nebo sníženou expresi genu *DNMT1* oproti 1,00 u všech použitých ovlivnění. Zvýšená exprese sledovaného genu detekována u buněk KMS-12-PE ovlivněných 0,5μM DAC ($\Delta\Delta Ct=1,77$) není statisticky významná ve srovnání s ostatními typy ovlivnění (*p*-value 0,562; *p*-value 0,285; *p*-value 0,395) (Obr. 15).

KMS-12-PE DNMT3A



Obr. 16. Úroveň exprese genu DNMT3A u jednotlivých ovlivnění myelomové buněčné linie KMS-12-PE s protilátkou anti-H3K36me3 v porovnání s úrovní exprese kontrolního IgG

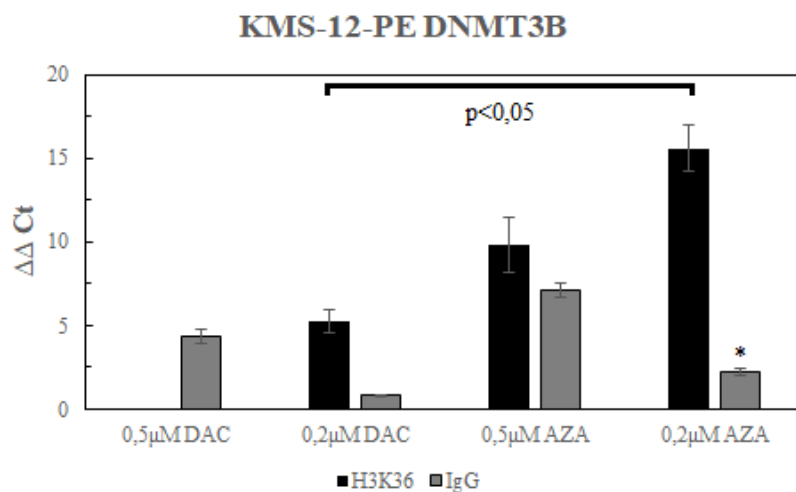
KMS-12-PE DNMT3A



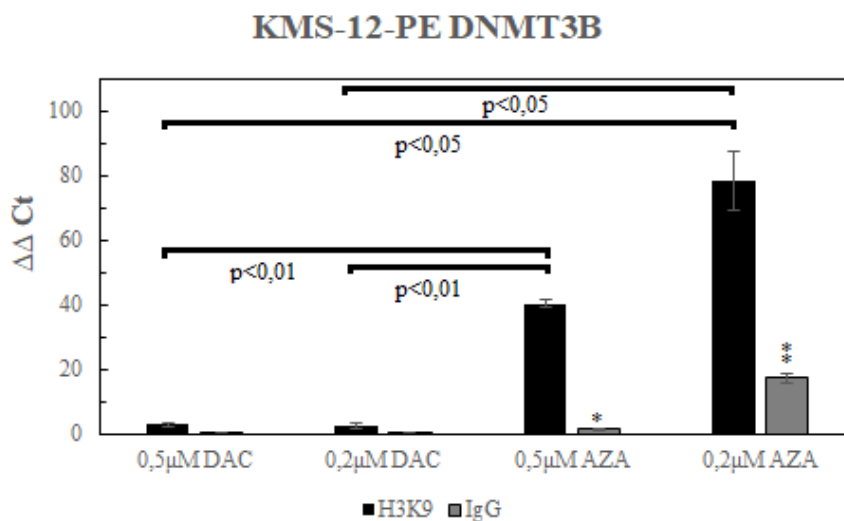
Obr. 17. Úroveň exprese genu DNMT3A u jednotlivých ovlivnění myelomové buněčné linie KMS-12-PE s protilátkou anti-H3K9me3 v porovnání s úrovní exprese kontrolního IgG

Gen *DNMT3A* vykazoval úroveň exprese vyšší než 1,00 u všech analyzovaných komplexů precipitovaných pro-transkripční protilátkou anti-H3K36me3. Hladiny detekovaných IgG jsou statisticky neprůkazné ke všem příslušným typům ovlivnění. Zvýšené hodnoty normalizovaných expresí genu *DNMT3A* u ovlivnění 0,5μM AZA ($\Delta\Delta Ct=2,53$) a 0,2μM AZA ($\Delta\Delta Ct=2,62$) jsou statisticky nevýznamné porovnáním s normalizovanými hodnotami u ovlivnění 0,5μM DAC a 0,2μM DAC (Obr. 16).

U precipitovaných komplexů s protilátkou anti-H3K9me3, markerem inhibice transkripce, je hodnota exprese genu *DNMT3A* ($\Delta\Delta Ct=2,31$) statisticky významná při $p<0,1$ (p -value 0,087) oproti normalizované hodnotě IgG u ovlivnění 0,5 μ M AZA (Obr. 17).



Obr. 18. Úroveň exprese genu *DNMT3B* u jednotlivých ovlivnění myelomové buněčné linie KMS-12-PE s protilátkou anti-H3K36me3 v porovnání s úrovní exprese kontrolního IgG, * $p<0,05$



Obr. 19. Úroveň exprese genu *DNMT3B* u jednotlivých ovlivnění myelomové buněčné linie KMS-12-PE s protilátkou anti-H3K9me3 v porovnání s úrovní exprese kontrolního IgG, * $p<0,05$; ** $p<0,01$

U precipitovaného komplexu s protilátkou anti-H3K36me3 izolovaného z buněk linie KMS-12-PE ovlivněných 0,5 μ M DAC se opakovaně nepodařilo stanovit expresi genu *DNMT3B*. Hodnota normalizované exprese genu *DNMT3B* ($\Delta\Delta Ct=15,56$) je statisticky významná při $p<0,05$ (p -value 0,016) oproti normalizované hodnotě IgG u ovlivnění 0,2 μ M AZA. Porovnání exprese sledovaného genu u ovlivnění 0,2 μ M DAC ($\Delta\Delta Ct=5,25$) a 0,2 μ M

AZA ($\Delta\Delta Ct=15,56$) po odečtení normalizovaných hodnot příslušných IgG je statisticky významná při $p<0,05$ (p -value 0,044) (Obr. 18).

U precipitátu s protilátkou anti-H3K9me3 izolovaného z buněk po ovlivnění 0,5 μ M AZA je hodnota exprese genu *DNMT3B* ($\Delta\Delta Ct=40,10$) statisticky významná při $p<0,05$ (p -value 0,027) ve srovnání s normalizovanou hodnotou IgG. Hodnota exprese sledovaného genu u ovlivnění 0,2 μ M AZA ($\Delta\Delta Ct=78,29$) je statisticky významná při $p<0,01$ (p -value 0,003) ve srovnání s normalizovanou hodnotou IgG. Porovnání expresí *DNMT3B* mezi ovlivněními 0,5 μ M AZA a Decitabinem (0,5 μ M a 0,2 μ M) po odečtení normalizovaných hodnot příslušných IgG je statisticky významná při $p<0,01$ (p -value 0,006 a p -value 0,001). Porovnání expresí *DNMT3B* mezi ovlivněními 0,2 μ M AZA a obou koncentrací DAC (0,5 μ M a 0,2 μ M) po odečtení normalizovaných hodnot příslušných IgG je statisticky významná při $p<0,05$ (p -value 0,005 a p -value=0,009) (Obr. 19).

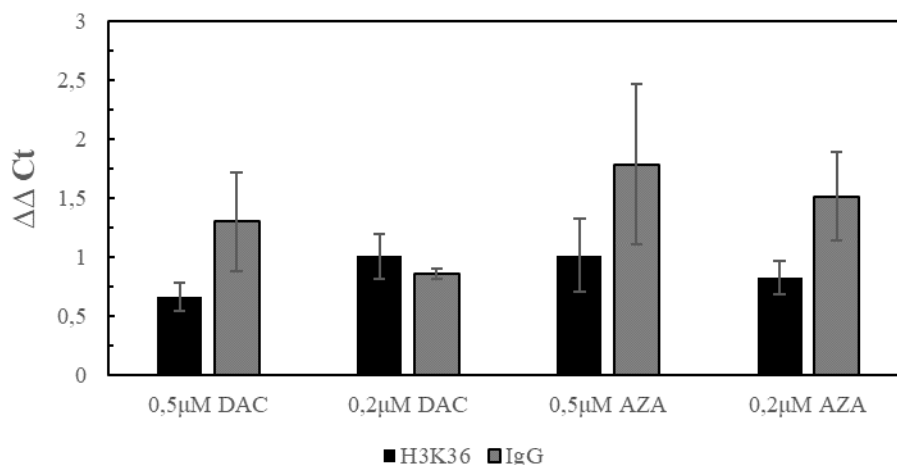
4.3 Myelomová buněčná linie OPM-2

Kultivace buněk, jejich ovlivnění a izolace chromatinového lyzátu z buněk myelomové linie OPM-2 byl shodný s postupem použitým u linie KMS-12-PE. Naměřené hodnoty koncentrace DNA jsou uvedeny v tabulce (Tab. 7) a úrovně exprese jednotlivých genů u linie OPM-2 jsou zaznamenány v grafech uvedených níže (Obr. 20–25).

Tab. 7. Naměřené hodnoty koncentrace DNA u ovlivněné myelomové buněčné linie OPM-2 s přidávanými protilátkami anti-H3K9me3 nebo anti-H3K36me3

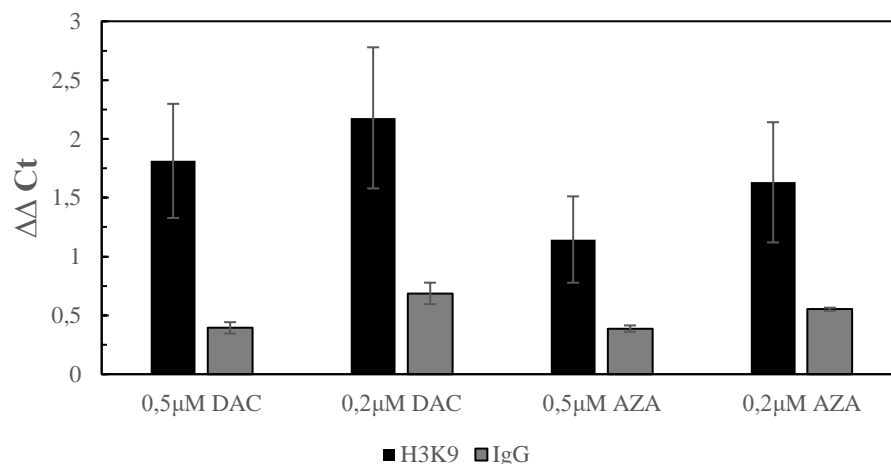
OPM-2				
	H3K36	IgG	H3K9	IgG
vzorek	koncentrace [ng/μl]		koncentrace [ng/μl]	
DMSO	9,60	10,70	11,70	15,60
0,5 μ M DAC	11,20	12,40	9,90	15,30
0,2 μ M DAC	10,10	14,70	13,00	13,10
0,5 μ M AZA	9,30	11,30	13,20	8,70
0,2 μ M AZA	12,00	8,50	9,60	10,70

OPM-2 DNMT1



Obr. 20. Úroveň exprese genu DNMT1 u jednotlivých ovlivnění myelomové buněčné linie OPM-2 s protilátkou anti-H3K36me3 v porovnání s úrovní exprese kontrolního IgG

OPM-2 DNMT1

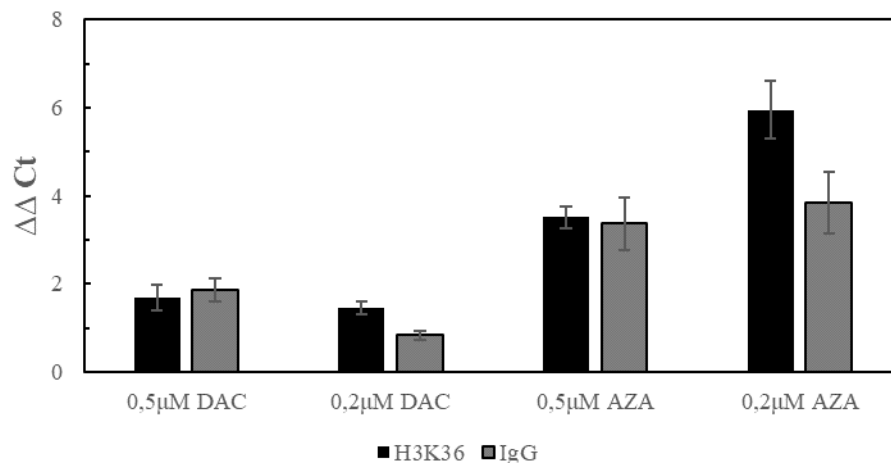


Obr. 21. Úroveň exprese genu DNMT1 u jednotlivých ovlivnění myelomové buněčné linie OPM-2 s protilátkou anti-H3K9me3 v porovnání s úrovní exprese kontrolního IgG

U všech typů ovlivnění buněk linie OPM-2 u precipitovaných komplexů protilátkou anti-H3K36me3, se normalizované hodnoty exprese genu *DNMT1* pohybovaly okolo 1,00. Hodnoty negativní kontroly s IgG dosahovaly buď velmi podobných hodnot (0,5 μ M AZA) nebo jejich úroveň převyšovala detekovanou expresi sledovaného genu (Obr. 20).

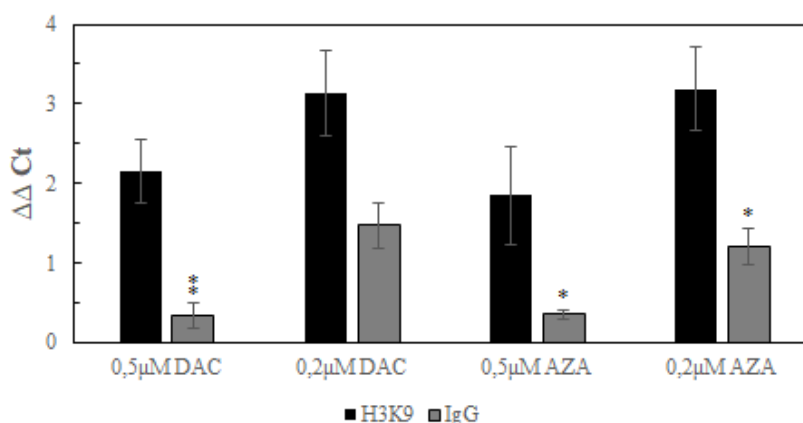
U precipitovaných komplexů s protilátkou anti-H3K9me3 byly detekovány normalizované hodnoty exprese genu *DNMT1* vyšší než $\Delta\Delta Ct=1,00$. Hladiny detekovaných IgG jsou statisticky neprůkazné ke všem příslušným typům ovlivnění (Obr. 21).

OPM-2 DNMT3A



Obr. 22. Úroveň exprese genu DNMT3A u jednotlivých ovlivnění myelomové buněčné linie OPM-2 s protilátkou anti-H3K36me3 v porovnání s úrovní exprese kontrolního IgG

OPM-2 DNMT3A

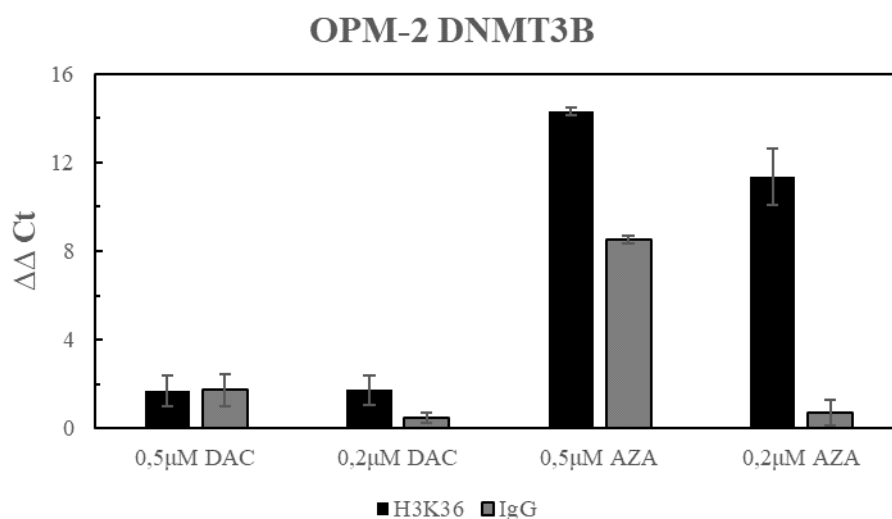


Obr. 23. Úroveň exprese genu DNMT3A u jednotlivých ovlivnění myelomové buněčné linie OPM-2 s protilátkou anti-H3K9me3 v porovnání s úrovní exprese kontrolního IgG, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

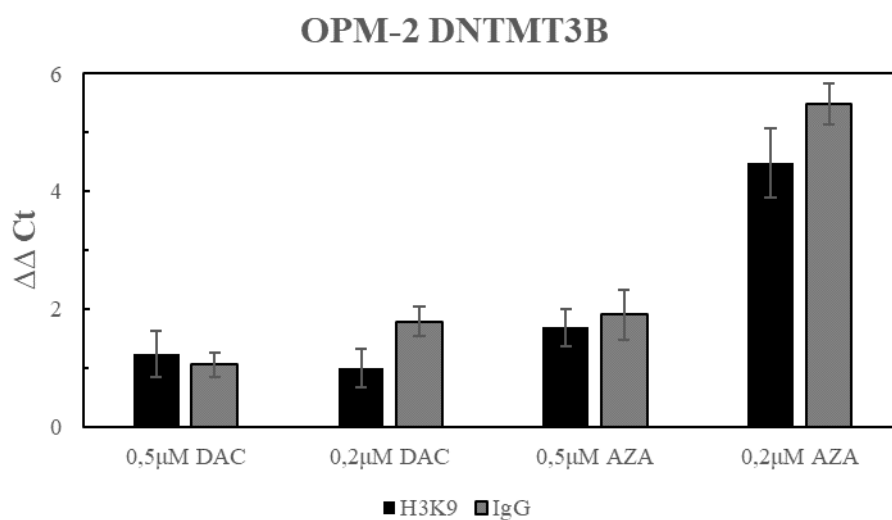
Expres genu *DNMT3A* u precipitovaných komplexů s protilátkou anti-H3K36me3 dosahovala zvýšených hodnot exprese u ovlivnění 0,5 μ M AZA ($\Delta\Delta Ct=3,51$) a 0,2 μ M AZA ($\Delta\Delta Ct=5,94$) při porovnání s normalizovanými hodnotami exprese u ovlivnění 0,5 μ M DAC ($\Delta\Delta Ct=1,70$) a 0,2 μ M DAC ($\Delta\Delta Ct=1,46$) (Obr. 22).

U precipitovaných komplexů s protilátkou anti-H3K9me3 po ovlivnění buněk 0,5 μ M DAC je hodnota exprese genu *DNMT3A* ($\Delta\Delta Ct=3,04$) statisticky významná při $p < 0,01$ (p -value 0,003) ve srovnání s normalizovanou hodnotou IgG. (Obr. 23), přičemž u ovlivněných buněk 0,2 μ M DAC byla hodnota exprese genu *DNMT3A* ($\Delta\Delta Ct=3,31$) statisticky významná při $p < 0,1$ (p -value 0,067) oproti normalizované hodnotě příslušného IgG. Normalizované hodnoty exprese sledovaného genu u obou použitých koncentrací Azacytidinu - 0,5 μ M AZA a 0,2 μ M AZA jsou statisticky významné při $p < 0,05$

(p -value 0,044 a p -value 0,034) při porovnání s normalizovanými hodnotami příslušných IgG.



Obr. 24. Úroveň exprese genu DNMT3B u jednotlivých ovlivnění myelomové buněčné linie OPM-2 s protilátkou anti-H3K36me3 v porovnání s úrovní exprese kontrolního IgG



Obr. 25. Úroveň exprese genu DNMT3B u jednotlivých ovlivnění myelomové buněčné linie OPM-2 s protilátkou anti-H3K9me3 v porovnání s úrovní exprese kontrolního IgG

Expresa genu *DNMT3B* u precipitovaných komplexů s protilátkou anti-H3K36me3 dosahovala zvýšených hodnot exprese sledovaného genu u ovlivnění 0,5μM AZA ($\Delta\Delta Ct=14,69$) a 0,2μM AZA ($\Delta\Delta Ct=13,64$) při porovnání s normalizovanými hodnotami exprese u ovlivnění 0,5μM DAC ($\Delta\Delta Ct=1,60$) a 0,2μM DAC ($\Delta\Delta Ct=1,72$) (Obr. 24).

U precipitovaných komplexů s protilátkou anti-H3K9me3 dosahovaly normalizované hodnoty IgG u obou použitých ovlivnění (AZA a DAC) a obou koncentrací (0,2 μM

a 0,5 μM) úrovně podobné (u ovlivnění 0,5 μM DAC) nebo převyšující normalizované hodnot exprese genu *DNMT3B* (Obr. 25).

5 DISKUZE

Hypermethylační stavy promotorových úseků genů jsou u eukaryotických organismů doprovázeny sníženou expresí příslušných genů vedoucí často až k jejich umlčení (Holliday a Ho, 2002; Esteller, 2008). Tyto umlčené geny lze za určitých podmínek znovu aktivovat použitím demethylačních činidel jako je 5-aza-2'-deoxycytidin a 5-azacytidin. Methylace DNA a histonů patří mezi posttranslační epigenetické modifikace, které jsou příčinou neaktivního nebo aktivního stavu genů, jež jsou stabilně dědičné (Holliday a Ho, 2002).

V této práci byla využita na ovlivnění myelomových buněčných linií KMS-12-PE, OPM-2 a U-266 dvě demethylační činidla - Azacytidin a Decitabin. Azacytidin a Decitabin jsou hypomethylační činidla na úrovni DNA s nejvyšší terapeutickou účinností u myelodysplastického syndromu a akutní myeloidní leukémie (Derissen et al., 2013). Mechanismus účinku těchto látek souvisí s jejich schopností interkalace do DNA nebo RNA v místech výskytu dinukleotidů CpG. Důsledkem je zachytávání methyltransferáz DNA, jejich degradace a s tím spojená hypomethylace genových úseků (Maes et al., 2014).

Cílem předkládané diplomové práce bylo sledovat vliv použitých demethylačních činidel na expresi genů *DNMT1*, *DNMT3A* a *DNMT3B* v precipitovaných komplexech transkripčních faktorů s protilátkami anti-H3K36me₃, která je znakem pro-transkripční aktivity genů, a anti-H3K9me₃, jež souvisí s represí genové transkripce. DNMT1 je důležitá pro udržování methylace během replikace. Naproti tomu, DNMT3B a DNMT3A katalyzují metylaci nově vzniklých methylačních míst, velmi často jako důsledek nádorové progresse, proto jsou tyto enzymy obvykle označovány jako *de novo* methyltransferasy (Okano et al., 1998). H3K36me₃ je možné považovat za pro-transkripční faktor, zatímco represe transkripční aktivity genů bývá nejčastěji zprostředkována trimethylovaným úsekem H3K9me₃ (Kimura, 2013).

V této diplomové práci jsme zjistili, že účinek Azacytidinu porovnáním s účinkem Decitabinu sice vedl u myelomových buněk linie U-266 v komplexech s pro-transkripční protilátkou anti-H3K36me₃ ke změně v expresi genů *DNMT3A* a *DNMT3B*, nicméně úroveň hodnot $\Delta\Delta Ct$ se pohybovala kolem 1,00 (Obr. 8). Porovnáním s negativní kontrolou příslušných IgG jsou normalizované hodnoty expresí těchto genů statisticky neprůkazné, podobně jako u genu *DNMT1*, kde nebyly hodnoty průkazné. Problémem mnoha analyzovaných vzorků byly vysoké hodnoty pozadí, tedy negativní kontroly IgG. Mohly být způsobeny firemním typem zvoleného normálního IgG, proto pro potvrzení nebo opakování získaných výsledků, by bylo vhodné použít jiný typ IgG.

Podobně, u buněk linie KMS-12-PE byl u pro-transkripčních komplexů s H3K36me₃ statisticky významný rozdíl při $p < 0,05$ (p -value 0,044) mezi vyššími hodnotami exprese

genu *DNMT3B* u ovlivnění 0,2 μ M AZA ($\Delta\Delta$ Ct=15,56) oproti účinku 0,2 Decitabinu ($\Delta\Delta$ Ct=5,25) (Obr. 18). Vliv Azacytidinu na zvýšenou hladinu *DNMT3B* byl podpořen statisticky významným rozdílem při $p < 0,05$ (p -value 0,016) oproti normalizované hodnotě příslušného IgG. Azacytidin ovlivňuje zvýšenou expresi genu *DNMT3B* i v komplexu s inhibičním markerem transkripce H3K9m3 a to statisticky významně při $p < 0,05$ (p -value 0,027) u buněk ovlivněných 0,5 μ M AZA a při $p < 0,01$ (p -value 0,003) u buněk ovlivněných 0,2 μ M AZA oproti normalizovaným hodnotám příslušných IgG. Porovnáním s Decitabinem ovlivněných buněk, jsou navíc hodnoty exprese genu *DNMT3B* mezi buňkami ovlivněnými AZA a DAC statisticky významné při obou hladinách významnosti (Obr. 19).

Zatímco u buněk myelomové linie KMS-12-PE má účinek Azacytidinu vliv na změny v expresi genu *DNMT3B* a může ovlivňovat jak aktivní, tak neaktivní proces transkripce, u myelomových buněk linie OPM-2 jsme detekovali statisticky významné vysoké hodnoty exprese genu *DNMT3A* u buněk ovlivněných jak Decitabinem, tak Azacytidinem v komplexu precipitátů s histonovým markerem inhibice transkripce.

Výsledky získané v této diplomové práci naznačují specifický vliv použitých demetylačních látek, Azacytidinu a Decitabinu, na expresi *de-novo* methyltransferas DNMT3A a DNMT3B u tří zvolených myelomových buněčných linií – KMS-12-PE, OPM-2 a U-266, které mohou ovlivňovat jejich účinek svým heterogenním založením typickým pro onemocnění mnohočetného myelomu. Nicméně, na rozdíl od myelodysplastického syndromu nebo akutní myeloidní leukémie, u námi testovaných myelomových buněčných liniích byl detekován vliv Azacytidinu na přítomnost DNMT3A a DNMT3B nejen v předpokládaných komplexech transkripčních faktorů s histonovým markerem inhibice transkripce – H3K9, ale i v pro-transkripčních komplexech nesoucích histonový kód H3K36.

6 ZÁVĚR

Předložená diplomová práce se ve své teoretické části zabývala odbornou rešerší na téma mnohočetného myelomu, histonových modifikací, demetylačních činidel a myelomových buněčných linií. Také zde byly popsány metody chromatinové imunoprecipitace a RT-PCR.

V rámci experimentální části byla detekována přítomnost methyltransferas DNA – DNMT1, DNMT3A a DNMT3B u precipitovaných komplexů transkripčních komplexů izolovaných z buněk myelomových linií KMS-12-PE, OPM-2 a U-266 po jejich ovlivnění demetylačními činidly Decitabinem a Azacytidinem. Na základě chromatin imunoprecipitačních experimentů s protilátkami anti-H3K36me3 a anti-H3K9me3 byla kvantifikována úroveň exprese transkripčních komplexů s DNMT1, DNMT3A a DNMT3B pomocí RT-PCR.

Buňky myelomové buněčné linie U-266 ovlivněné Azacytidinem v komplexu precipitátů s protilátkou anti-H3K36me3 vykazují mírné zvýšení exprese genu *DNMT1*. Při použití protilátky anti-H3K9me3 byl u precipitovaných komplexů inhibujících transkripci, detekován signifikantní nárůst exprese genu *DNMT3A* u buněk ovlivněných 0,5 μ M DAC při porovnání s ovlivněním 0,2 μ M DAC (p -value 0,004, $p < 0,01$) a 0,5 μ M AZA (p -value 0,044, $p < 0,05$). Nicméně, u ovlivnění 0,5 μ M DAC je hodnota exprese genu *DNMT3A* ($\Delta\Delta C_t = 2,13$) statisticky neprůkazná (p -value 0,198) oproti normalizované hodnotě IgG.

Azacytidin zřejmě ovlivňuje aktivaci genů, které jsou v komplexu s histonovým kódem H3K36me3 v přítomnosti genů *DNMT3A* a *DNMT3B*. U této linie byl viditelný problém s vysokými hodnotami negativní kontroly normálního IgG, které přispívaly k neprůkaznosti získaných dat.

U myelomové buněčné linie KMS-12-PE ovlivněné Azacytidinem (0,5 μ M) je u precipitovaných komplexů s protilátkou anti-H3K9me3, markerem inhibice transkripce, hodnota zvýšené exprese genu *DNMT3A* statisticky významná při $p < 0,1$ (p -value 0,087) oproti normalizované hodnotě IgG. Při ovlivnění 0,5 μ M AZA je zvýšená hodnota exprese genu *DNMT3B* je statisticky významná při $p < 0,05$ (p -value 0,027) a při ovlivnění 0,2 μ M AZA je statisticky významná při $p < 0,01$ (p -value 0,003) ve srovnání s normalizovanými hodnotami příslušných IgG. Porovnání expresí *DNMT3B* mezi ovlivněními 0,5 μ M AZA a Decitabinem (0,5 μ M a 0,2 μ M) po odečtení normalizovaných hodnot příslušných IgG je statisticky významná při $p < 0,01$ (p -value 0,006 a p -value 0,001). Porovnání expresí *DNMT3B* mezi ovlivněními 0,2 μ M AZA a obou koncentrací DAC (0,5 μ M a 0,2 μ M) po odečtení normalizovaných hodnot příslušných IgG je statisticky významná při $p < 0,05$ (p -value 0,005 a p -value=0,009).

U myelomové buněčné linie OPM-2 byl průkazný výsledek u precipitovaných komplexů s protilátkou anti-H3K9me3 po ovlivnění buněk 0,5 μ M DAC. Zvýšená hodnota exprese genu *DNMT3A* ($\Delta\Delta Ct=3,04$) byla statisticky významná při $p<0,01$ (p -value 0,003) a u ovlivněných buněk 0,2 μ M DAC byla zvýšená hodnota exprese genu *DNMT3A* statisticky významná při $p<0,1$ (p -value 0,067). Normalizované hodnoty exprese genu *DNMT3B* u buněk ovlivněných Azacytidinem - 0,5 μ M AZA a 0,2 μ M AZA jsou statisticky významné při $p<0,5$ (p -value 0,044 a p -value 0,034) při porovnání s normalizovanými hodnotami příslušných IgG.

Zatímco exprese genu DNMT1 nevykazovala žádné průkazné změny u použitých koncentrací obou demethylačních činidel u námi analyzovaných myelomových buněčných linií, Azacytidin má vliv na formování nejen komplexu přispívajícímu k inhibici transkripce s histonovým kódem H3K9, ale také k aktivaci pro-transkripčního komplexu s histonovým markerem H3K36, jehož součástí je DNMT3A a DNMT3B, což může přispívat k nádorové progresi myelomových buněk.

7 SEZNAM LITERATURY

- Alzrigat M., Párraga A.A., Jernberg-Wiklund H. (2018) Epigenetics in multiple myeloma: From mechanisms to therapy. *Semin Cancer Biol* **51**, 101–115.
- Amodio N., D'Aquila P., Passarino G., Tassone P., Bellizzi D. (2017) Epigenetic modifications in multiple myeloma: recent advances on the role of DNA and histone methylation. *Expert Opin Ther Targets* **21**, 91–101.
- Barish G.D., Tangirala R.K. (2013) Chromatin immunoprecipitation. *Methods Mol Biol* **1027**, 327–42.
- Bhalla K.N. (2005) Epigenetic and chromatin modifiers as targeted therapy of hematologic malignancies. *J Clin Oncol* **23**, 3971–93.
- Bohl S.R., Bullinger L., Rucker F.G. (2018) Epigenetic therapy: azacytidine and decitabine in acute myeloid leukemia. *Expert Rev Hematol* **11**, 361–371.
- Bringhen S., Mateos M.V., Zweegman S., Larocca A., Falcone A.P., Oriol A., Rossi D., Cavalli M., Wijermans P., Ria R., Offidani M., Lahuerta J.J., Liberati A.M., Mina R., Callea V., Schaafsma M., Cerrato C., Marasca R., Franceschini L., Evangelista A., Teruel A.I., van der Holt B., Montefusco V., Ciccone G., Boccadoro M., San Miguel J., Sonneveld P., Palumbo A. (2013) Age and organ damage correlate with poor survival in myeloma patients: meta-analysis of 1435 individual patient data from 4 randomized trials. *Haematologica* **98**, 980–7.
- Burns M.J., Nixon G.J., Foy C.A., Harris N. (2005) Standardisation of data from real-time quantitative PCR methods - evaluation of outliers and comparison of calibration curves. *BMC Biotechnol* **5**, 31.
- Cashen A.F., Shah A.K., Todt L., Fisher N., DiPersio J. (2008) Pharmacokinetics of decitabine administered as a 3-h infusion to patients with acute myeloid leukemia (AML) or myelodysplastic syndrome (MDS). *Cancer Chemother Pharmacol* **61**, 759–66.
- Creusot F., Acs G., Christman J.K. (1982) Inhibition of DNA methyltransferase and induction of Friend erythroleukemia cell differentiation by 5-azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine. *J Biol Chem* **257**, 2041–8.
- Das P.M., Ramachandran K., vanWert J., Singal R. (2004) Chromatin immunoprecipitation assay. *Biotechniques* **37**, 961–9.
- Derissen E.J., Beijnen J.H., Schellens J.H. (2013) Concise drug review: azacytidine and decitabine. *Oncologist* **18**, 619–24.

- Diesch J., Zwick A., Garz A.K., Palau A., Buschbeck M., Götze K.S. (2016) A clinical-molecular update on azanucleoside-based therapy for the treatment of hematologic cancers. *Clin Epigenetics* **8**, 71.
- Drexler H.G., Matsuo Y. (2000) Malignant hematopoietic cell lines: in vitro models for the study of multiple myeloma and plasma cell leukemia. *Leuk Res* **24**, 681–703.
- Egger G., Liang G., Aparicio A., Jones P.A. (2004) Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature* **429**, 457–63.
- Esteller M. (2008) Epigenetics in cancer. *N Engl J Med* **358**, 1148–59.
- Flotho A., Melchior F. (2013) Sumoylation: a regulatory protein modification in health and disease. *Annu Rev Biochem* **82**, 357–85.
- Furukawa Y., Kikuchi J. (2015) Molecular pathogenesis of multiple myeloma. *Int J Clin Oncol* **20**, 413–22.
- Greer E.L., Shi Y. (2012) Histone methylation: a dynamic mark in health, disease and inheritance. *Nat Rev Genet* **13**, 343–57.
- Hackanson B., Daskalakis M. (2014) Decitabine. *Recent Results Cancer Res* **201**, 269–97.
- Hackanson B., Guo Y., Lübbert M. (2005) The silence of the genes: epigenetic disturbances in haematopoietic malignancies. *Expert Opin Ther Targets* **9**, 45–61.
- Holliday R., Ho T. (2002) DNA methylation and epigenetic inheritance. *Methods* **27**, 179–83.
- Hubeek I., Stam R.W., Peters G.J., Broekhuizen R., Meijerink J.P., van Wering E.R., Gibson B.E., Creutzig U., Zwaan C.M., Cloos J., Kuik D.J., Pieters R., Kaspers G.J. (2005) The human equilibrative nucleoside transporter 1 mediates in vitro cytarabine sensitivity in childhood acute myeloid leukaemia. *Br J Cancer* **93**, 1388–94.
- Huggett J., Dheda K., Bustin S., Zumla A. (2005) Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. *Genes Immun* **6**, 279–84.
- Choudhury S.R., Ashby C., Tytarenko R., Bauer M., Wang Y., Deshpande S., Den J., Schinke C., Zangari M., Thanendrarajan S., Davies F.E., van Rhee F., Morgan G.J., Walker B.A. (2020) The functional epigenetic landscape of aberrant gene expression in molecular subgroups of newly diagnosed multiple myeloma. *J Hematol Oncol* **13**, 108.
- Ingersoll S.B., Ahmad S., Thoni N.D., Ahmed F.H., Monahan K.A., Edwards J.R. (2011) Targeting the IL-6 pathway in multiple myeloma and its implications in cancer-associated gene hypermethylation. *Med Chem* **7**, 473–9.
- Issa J.P., Kantarjian H.M., Kirkpatrick P. (2005) Azacitidine. *Nat Rev Drug Discov* **4**, 275–6.
- Jenuwein T., Allis C.D. (2001) Translating the histone code. *Science* **293**, 1074–80.
- Joshua D.E. (2005) Multiple myeloma: the present and the future. *Med J Aust* **183**, 344.

- Joshua D.E., Bryant C., Dix C., Gibson J., Ho J. (2019) Biology and therapy of multiple myeloma. *Med J Aust* **210**, 375–380.
- Kazandjian D. (2016) Multiple myeloma epidemiology and survival: A unique malignancy. *Semin Oncol* **43**, 676–681.
- Kimura H. (2013) Histone modifications of human epigenome analysis. *J Hum Genet* **58**, 439–45.
- Kouzarides T. (2007) Chromatin modifications and their function. *Cell* **128**, 693–705.
- Krug U., Gale R.P., Berdel W.E., Müller-Tidow C., Stelljes M., Metzeler K., Sauerland M.C., Hiddemann W., Büchner T. (2017) Therapy of older persons with acute myeloid leukaemia. *Leuk Res* **60**, 1–10.
- Landgren O., Gridley G., Turesson I., Caporaso N.E., Goldin L.R., Baris D., Fears T.R., Hoover R.N., Linet M.S. (2006) Risk of monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) and subsequent multiple myeloma among African American and white veterans in the United States. *Blood* **107**, 904–6.
- Long L., Furgason M., Yao T. (2014) Generation of nonhydrolyzable ubiquitin-histone mimics. *Methods* **70**, 134–8.
- Maes K., De Smedt E., Lemaire M., De Raeve H., Menu E., Van Valckenborgh E., McClue S., Vanderkerken K., De Bruyne E. (2014) The role of DNA damage and repair in decitabine-mediated apoptosis in multiple myeloma. *Oncotarget* **5**, 3115–29.
- Mehta A. (2015) Multiple myeloma. *Hematology* **20**, 58–9.
- Momparler R.L., Bouffard D.Y., Momparler L.F., Dionne J., Belanger K., Ayoub J. (1997) Pilot phase I-II study on 5-aza-2'-deoxycytidine (Decitabine) in patients with metastatic lung cancer. *Anticancer Drugs* **8**, 358–68.
- Müller A., Florek M. (2010) 5-Azacytidine/Azacitidine. *Recent Results Cancer Res* **184**, 159–70.
- Mund C., Brueckner B., Lyko F. (2006) Reactivation of epigenetically silenced genes by DNA methyltransferase inhibitors: basic concepts and clinical applications. *Epigenetics* **1**, 7–13.
- Nolan T., Hands R.E., Bustin S.A. (2006) Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nat Protoc* **1**, 1559–82.
- Okano M., Xie S., Li E. (1998) Cloning and characterization of a family of novel mammalian DNA (cytosine-5) methyltransferases. *Nat Genet* **19**, 219–20.
- Pliml J., Sorm F. (1964) Synthesis of 20-deoxy-D-ribofuranosyl-5-azacytosine. *Coll Czech Chem Commun* **29**, 2576–2577.

- Pradeepa M.M., Grimes G.R., Kumar Y., Olley G., Taylor G.C., Schneider R., Bickmore W.A. (2016) Histone H3 globular domain acetylation identifies a new class of enhancers. *Nat Genet* **48**, 681–6.
- Qian M.X., Pang Y., Liu C.H., Haratake K., Du B.Y., Ji D.Y., Wang G.F., Zhu Q.Q., Song W., Yu Y., Zhang X.X., Huang H.T., Miao S., Chen L.B., Zhang Z.H., Liang Y.N., Liu S., Cha H., Yang D., Zhai Y., Komatsu T., Tsuruta F., Li H., Cao C., Li W., Li G.H., Cheng Y., Chiba T., Wang L., Goldberg A.L., Shen Y., Qiu X.B. (2013) Acetylation-mediated proteasomal degradation of core histones during DNA repair and spermatogenesis. *Cell* **153**, 1012–24.
- Rajkumar S.V. (2019) Multiple myeloma: Every year a new standard? *Hematol Oncol* **37**, 62–65.
- Rice K.L., Hormaeche I., Licht J.D. (2007) Epigenetic regulation of normal and malignant hematopoiesis. *Oncogene* **26**, 6697–714.
- Ririe K.M., Rasmussen R.P., Wittwer C.T. (1997) Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Anal Biochem* **245**, 154–60.
- Rivard G.E., Momparler R.L., Demers J., Benoit P., Raymond R., Lin K., Momparler L.F. (1981) Phase I study on 5-aza-2'-deoxycytidine in children with acute leukemia. *Leuk Res* **5**, 453–62.
- Santi D.V., Garrett C.E., Barr P.J. (1983) On the mechanism of inhibition of DNA-cytosine methyltransferases by cytosine analogs. *Cell* **33**, 9–10.
- Sarge K.D. (2016) Analysis of Protein Sumoylation. *Curr Protoc Protein Sci* **83**, 14.8.1–14.8.8.
- Sarin V., Yu K., Ferguson I.D., Gugliemini O., Nix M.A., Hann B., Sirota M., Wiita A.P. (2020) Evaluating the efficacy of multiple myeloma cell lines as models for patient tumors via transcriptomic correlation analysis. *Leukemia* **34**, 2754–2765.
- Sarris M., Nikolaou K., Talianidis I. (2014) Context-specific regulation of cancer epigenomes by histone and transcription factor methylation. *Oncogene* **33**, 1207–17.
- Sawicka A., Seiser C. (2012) Histone H3 phosphorylation - a versatile chromatin modification for different occasions. *Biochimie* **94**, 2193–201.
- Shen Y., Wei W., Zhou D.X. (2015) Histone Acetylation Enzymes Coordinate Metabolism and Gene Expression. *Trends Plant Sci* **20**, 614–621.
- Singh C., Roy-Chowdhuri S. (2016) Quantitative Real-Time PCR: Recent Advances. *Methods Mol Biol* **1392**, 161–76.
- Strahl B.D., Allis C.D. (2000) The language of covalent histone modifications. *Nature* **403**, 41–5.

- Stresemann C., Lyko F. (2008) Modes of action of the DNA methyltransferase inhibitors azacytidine and decitabine. *Int J Cancer* **123**, 8–13.
- Tahiliani M., Koh K.P., Shen Y., Pastor W.A., Bandukwala H., Brudno Y., Agarwal S., Iyer L.M., Liu D.R., Aravind L., Rao A. (2009) Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science* **324**, 930–5.
- Weake V.M., Workman J.L. (2008) Histone ubiquitination: triggering gene activity. *Mol Cell* **29**, 653–63.
- Weinmann A.S., Farnham P.J. (2002) Identification of unknown target genes of human transcription factors using chromatin immunoprecipitation. *Methods* **26**, 37–47.
- Wilson V.L., Jones P.A., Momparler R.L. (1983) Inhibition of DNA methylation in L1210 leukemic cells by 5-aza-2'-deoxycytidine as a possible mechanism of chemotherapeutic action. *Cancer Res* **43**, 3493–6.
- Wright D.E., Wang C.Y., Kao C.F. (2012) Histone ubiquitylation and chromatin dynamics. *Front Biosci (Landmark Ed)* **17**, 1051–78.
- Zee B.M., Levin R.S., Xu B., LeRoy G., Wingreen N.S., Garcia B.A. (2010) In vivo residue-specific histone methylation dynamics. *J Biol Chem* **285**, 3341–50.
- Zhang Y., Sun Z., Jia J., Du T., Zhang N., Tang Y., Fang Y., Fang D. (2021) Overview of Histone Modification. *Adv Exp Med Biol* **1283**, 1–16.

myelomová buněčná linie U-266 [online] German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH <<https://www.dsmz.de/collection/catalogue/details/culture/ACC-9>> [cit. 2021-08-02] dsmz no. ACC9

myelomová buněčná linie OPM-2 [online] German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH <<https://www.dsmz.de/collection/catalogue/details/culture/ACC-50>> [cit. 2021-08-02] dsmz no. ACC50

myelomová buněčná linie KSM-12-PE [online] German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH <<https://www.dsmz.de/collection/catalogue/details/culture/ACC-606>> [cit. 2021-08-02] dsmz no. ACC606