

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2013

Kateřina Bučilová

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Molekulárně genetická analýza
myelodysplastického syndromu**

Bakalářská práce

Kateřina Bučilová

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2013

Vedoucí práce: RNDr. Martina Divoká

„Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením
RNDr. Martiny Divoké za použití citované literatury.“

V Olomouci dne.....

.....
Kateřina Bučilová

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala těm, kteří mi pomáhali a byli mi oporou při tvorbě bakalářské práce. Na prvním místě děkuji paní RNDr. Martině Divoké za příležitost pracovat na špičkovém pracovišti Hemato-onkologické kliniky Fakultní nemocnice Olomouc, za vedení celé bakalářské práce, odborné vedení experimentu a také za velkou ochotu, lidský přístup a trpělivost. Velmi děkuji všem pracovníkům a laborantkám Laboratoře molekulární biologie HOK FN Olomouc za cenné rady a připomínky. V neposlední řadě bych ráda poděkovala své rodině, která mi poskytla zázemí a podporu během celé doby mého studia. Děkuji také svému příteli za pochopení a oporu.

SOUHRN

Téma mé bakalářské práce je zaměřeno na analýzu molekulárně-genetických abnormalit u myelodysplastického syndromu (MDS), který je řazen mezi hemato-onkologické choroby. MDS je heterogenní skupina onemocnění, které vzniká jako důsledek akumulace genetických a epigenetických změn v hematopoetické kmenové buňce. Přesný mechanismus vzniku MDS není dodnes zcela znám a je předmětem výzkumu. MDS se častěji vyskytuje u starších lidí (mezi 65 – 70 lety), vzácněji se s tímto onemocněním setkáváme u mladších osob a dětí.

Experimentální část mé bakalářské práce je zaměřena na vyšetření genetických změn přítomných u pacientů řazených do jedné z podskupin MDS, u kterých došlo k delecí dlouhého raménka chromozomu 5 (tzv. 5q minus syndrom). Vyšetřovací metodou byla MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification), umožňující detekci změn počtu kopií genových sekvencí.

Cílem práce bylo zavést technologii MLPA pro genetickou analýzu nemocných s 5q- syndromem na Hemato-onkologické klinice LF a FN Olomouc a vyhodnocením výsledků zjistit, je-li MLPA vhodnou metodou pro detekci genetických změn u těchto pacientů. Praktická analýza nádorové DNA od 5 nemocných ukázala, že MLPA poskytne informace o některých diagnosticky a prognosticky významných genech, které se nacházejí na chromosomovém úseku 5q, a že může být u některých nemocných vhodnou doplňující metodou sloužící pro verifikaci diagnózy.

SUMMARY

The topic of my bachelor thesis is focused on molecular genetic abnormalities in myelodysplastic syndrome (MDS), a hemato-oncological disorder considered as “pre-leukemia” condition. MDS is a heterogeneous group of clonal myeloid neoplasms that arise from accumulation of genetic and/or epigenetic changes in hematopoietic stem cells and can progress to leukemia. The causes and the mechanisms of MDS development are not fully understood and are the subject of intense research. MDS is primarily a disease of the elderly, with most of the cases diagnosed between 65 – 70 years of age; only rarely is the disease seen in younger people and in childhood.

The experimental part of my bachelor thesis is aimed to the analysis of genetic alterations present in patients with one of the subtypes of MDS characterized by interstitial deletions of parts of the long arm of human chromosome 5, called 5q minus syndrome. A technique used to detect changes in gene copy number sequences was MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification).

The aim of this study was to introduce MLPA analysis for the 5q minus syndrome patients followed at the Dept. of Hemato-Oncology, Faculty Hospital, Olomouc, and to evaluate MLPA suitability for the detection of copy number changes of selected genes that are implicated in the etiopathogenesis of 5q minus syndrome. Our analysis of 5 patients revealed that MLPA provides information on diagnostically and prognostically important genes that are located in 5q chromosomal segment and that it could serve as a verification approach in the diagnosis of this type of MDS.

OBSAH

1	ÚVOD	8
2	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	9
2.1	Hematopoéza (krvetvorba)	9
2.1.1	Prenatální hematopoéza	9
2.1.2	Postnatální hematopoéza	10
2.1.3	Hematopoetické buňky	10
2.1.4	Řízení hematopoézy	12
2.2	Myelodysplastický syndrom	14
2.2.1	Primární a sekundární MDS	15
2.2.2	Diagnostika a klasifikace MDS	15
2.2.2.1	<i>FAB klasifikace</i>	19
2.2.2.2	<i>WHO klasifikace</i>	20
2.2.3	MDS s izolovanou delecí 5q (5q- syndrom).....	21
2.2.4	Prognóza	22
2.2.5	Patogeneze	22
2.2.5.1	<i>Molekulární patogeneze</i>	24
2.2.6	Léčba MDS.....	26
2.2.6.1	<i>Léčba nemocných s nižší mírou rizika</i>	26
2.2.6.2	<i>Léčba nemocných s vyšší mírou rizika</i>	27
2.3	MLPA	28
3	CÍL PRÁCE	31
4	MATERIÁL A METODIKA	32
4.1	Chemikálie	32
4.2	Roztoky	32

4.3	Vybavení laboratoře	34
4.4	Biologický materiál	34
4.5	Izolace DNA	34
4.6	Měření koncentrace DNA.....	35
4.7	MLPA.....	36
5	VÝSLEDKY	39
5.1	Výsledky analýzy u pacientů s 5q minus syndromem	39
6	DISKUZE	48
7	ZÁVĚR	50
8	LITERATURA	51
8.1	Vědecké publikace	51
8.2	Internetové zdroje.....	56
8.3	Firemní návody	56
9	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ.....	57

1 ÚVOD

Onkologické choroby patří mezi nejvíce rozšířená onemocnění dnešní doby. Je pro ně charakteristický autonomní růst buněk, který se vymyká kontrole. Na vzniku nádorů se podílí mnoho faktorů: dědičnost, věk, životní styl, a také vliv okolního prostředí. Významnou skupinu onkologických onemocnění představují také nádory hematologické. Podle světové zdravotnické organizace zastupují hematologické malignity 10 % všech nádorových onemocnění.

Myelodysplastický syndrom (MDS) je hemato-onkologické onemocnění kmenových krvetvorných buněk charakteristické vznikem patologického klonu a neefektivní hematopoézou v jedné nebo i ve více vývojových liniích s častou progresí do akutní myeloidní leukémie. Označuje se také jako preleukemický stav. Nedostatečná produkce resp. úbytek krevních buněk vede ke vzniku cytopenie.

MDS je onemocnění postihující především starší populaci a mechanismus jeho vzniku není dosud zcela objasněn. Pokud je člověk během svého života vystaven různým rizikovým faktorům a působení mutagenů, je u něj riziko výskytu MDS vyšší.

Na molekulárně-genetické úrovni je do etiopatogeneze MDS zapojena celá řada genů, které se podílejí na regulaci proliferace nebo apoptózy hematopoetických buněk; tyto geny jsou u MDS mutovány nebo často epigeneticky modifikovány. Důležitou roli při vzniku MDS hrají i defekty imunitního systému – produkce zánětlivých cytokinů a abnormální buněčná i humorální imunitní odpověď.

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 Hematopoéza (krvetvorba)

Hematopoéza (krvetvorba) je složitý proces, během kterého se hematopoetická kmenová buňka diferencuje do mnoha buněčných typů. Během krvinek dochází ke vzniku krevních buněk v krvinečných orgánech. Hematopoetická kmenová buňka je pluripotentní, má schopnost sebeobnovy a diferenciaci do různých buněčných populací po celý život člověka (Weissman a kol., 2001).

Hematopoézu rozdělujeme do dvou různých fází, které se od sebe liší charakterem a místem tvorby krevních elementů. První fází je krvinek prenatalní, se kterou se setkáváme již v raném stádiu embryogeneze, poté následuje druhá fáze, která je označována jako krvinek postnatalní a trvá od narození až do dospělosti jedince (Weissman a kol., 2001).

2.1.1 Prenatální hematopoéza

Prenatální krvinek se dále dělí na tři různá období. Prvním z nich je období mezoblastové, které nastává mezi 14. a 19. dnem těhotenství a probíhá v krevních ostrůvcích žloutkového vaku, kde je krvinek výhradně erytroidní povahy (Pecka, 2002). Vznikají zde velké erytroblasty, u kterých pozorujeme expresi embryonálních hemoglobinů Gower I, Gower II, Portland (který je podobný hemoglobinu A), a později také fetálního hemoglobinu (HbF). Krevní ostrůvky se skládají ze tří vrstev: endodermální vrstva, která podporuje růst, centrální vrstva, která se přeměňuje až na erytroblasty, a vrstva endoteliální, která tyto ostrůvky obklopuje (Dzierzak a kol., 1998). Extraembryonálně tak ve žloutkovém vaku vznikají hematopoetické kmenové buňky, které dávají vznik především erytroidním elementům. Mezoblastové období trvá od 3. do 10. týdne nitroděložního života. Během 6. týdne těhotenství vzniká thymus, který je osídlen hematopoetickými kmenovými buňkami, ze kterých vznikají mateřské buňky lymfocytů (Pecka, 2002).

Ve druhém hepatolinerárním období probíhá proces krvinek v játrech. Tento typ krvinek začíná mezi 5. a 6. týdnem embryogeneze a mezi třetím a šestým měsícem jsou játra stěžejním místem hematopoézy (Dzierzak a kol., 1998). Od 12. týdne se na krvinekbě

v menší míře podílí i slezina. V tomto období normoblasty vyzrávají v erytrocyty a tvoří se také mateřské buňky leukocytů a trombocytů (Pecka, 2002).

Poslední období prenatální krvetvorby se nazývá medulární a nastává od 20. týdne zárodečného života. Krevní elementy se vytváří i v kostní dřeni (Pecka, 2002). Nejprve pozorujeme krvetvorbu v klíčních kostech a později proniká do všech kostí lidského těla, ve kterých se vytvářejí centrální dutiny vyplněné prokrvenou pojivovou tkání, ve které se postupně objevují krvetvorné buňky. Extramedulární krvetvorba zaniká ve 2. – 3. týdnu po narození (Bulíková, 2000).

2.1.2 Postnatální hematopoéza

Postnatální krvetvorba probíhá v kostní dřeni, kde vznikají všechny druhy krevních elementů. Některé krevní elementy dozrávají mimo kostní dřeň, např. T-lymfocyty dozrávají v thymu. Při krvácivých stavech nebo různých onemocněních krvetvorby se i v dospělosti může obnovit krvetvorba v játrech a slezině (Pecka, 2002).

Po narození vznikají krevní buňky ve všech kostech lidského těla v tzv. aktivní červené kostní dřeni, která je se stoupajícím věkem nahrazena tukovou tkání. Hematopoéza je nejdéle zachována v hrudní kosti a obratlech (Bulíková, 2000).

2.1.3 Hematopoetické buňky

Krevní buňky se postupně vyvíjejí v kostní dřeni. Z pluripotentních kmenových buněk vznikají multipotentní kmenové buňky, z nich buňky progenitorové, až nakonec vzniknou buňky diferencované, vlastní krevní elementy, které se podílejí na důležitých životních procesech organismu (viz obr. 1). Erytrocyty, které jsou nezbytné pro transport kyslíku, trombocyty, které jsou zodpovědné za srážení krve, a v neposlední řadě také leukocyty, které jsou důležitou součástí imunitního systému člověka (Pecka, 2002).

Kmenové buňky (pluripotentní a multipotentní kmenové buňky a liniové progenitory) představují v kostní dřeni malou část, na 1000 buněk připadá pouze 1 buňka kmenová. Mimo kostní dřeň migrují kmenové buňky také v malém množství do sleziny, brzlíku, lymfatických uzlin a malá část se vyplavuje i do obvodové krve (Pecka, 2002). V průběhu života dochází

k obnově terminálně vydifferentovaných a posléze zaniklých krevních buněk právě díky aktivitě hematopoetických kmenových buněk (Pecka, 2002).

Mezi základní vlastnosti hematopoetických kmenových buněk patří schopnost sebeobnovy, diferenciace a proliferační aktivita, která přispívá k udržení konstantního množství kmenových buněk. Během mitózy se většina těchto buněk nachází v G_0 fázi (v tzv. dormanci), ale určitá část kmenových buněk vstupuje do buněčného cyklu. Výsledkem jejich mitotického dělení jsou dvě dceřinné buňky, kdy jedna se podle potřeby dále diferencuje a druhá zůstává buňkou kmenovou, a tím je zachován „pool“ kmenových buněk (tzv. asymetrické dělení kmenových buněk) (Kaushansky, 2010).

Buňka, ze které může vzniknout jakákoliv krevní buňka, je označována jako pluripotentní hematopoetická kmenová buňka. Jedná se o buňky, na jejichž povrchu se nenachází žádný liniově-specifický antigen a které je možné funkčně charakterizovat v kultuře, kde dávají vznik buňkám dlouhodobě schopným obnovit celou krevtvorbu, tzv. Long-Term Culture-Initiating Cell (LTC-IC). Z LTC-IC se po dalším dělení a diferenciaci vytváří kmenové buňky progenitorové. Na povrchu kmenových buněk různého stupně „kmenovosti“ (multipotentních i progenitorových) je přítomen antigen CD34 (Kaushansky, 2010). Tyto CD34 pozitivní buňky jsou klíčové pro účely transplantace kostní dřeně jako důležitého a nezastupitelného léčebného přístupu maligních i některých nemaligních chorob krevtvorby.

Progenitorové kmenové buňky mají schopnost diferenciace do jedné či více krevních řad, ale mají jen malou, velmi omezenou schopnost sebeobnovy (Pecka, 2002). V kultuře vytvářejí (v tzv. klonálním testu hematopoetických progenitorů) kolonie diferencovaných jaderných forem krevních elementů (tzv. Colony Forming Unit – CFU, Kaushansky, 2010). Mezi tyto buňky zařazujeme např. smíšený myeloidní progenitor (Colony Forming Unit Granulocyte Erythrocyte Macrophage Megakaryocyte – CFU-GEMM), který dává vznik granulocytům, erytrocytům, megakaryocytům a makrofágům, a také lymfoidní progenitor, který dává vznik T a B lymfocytům (Bulíková, 2000).

Determinované progenitorové kmenové buňky jsou určeny pro vznik jedné (výjimečně dvou) konkrétní buněčné řady. Mezi tyto buňky patří: granulocyto-makrofágový progenitor (CFU-GM), ze kterého se vytváří řada granulocytů a makrofágů; granulocytový progenitor (CFU-G), který dává vznik neutrofilům; monocytový progenitor (CFU-M), pro vznik buněk monocytární řady; eozinofilní progenitor (CFU-Eo); bazofilní progenitor (CFU-Ba);

progenitor pro megakaryocyty (CFU-Meg); primitivní progenitor červené krevní řady (BFU-E), který dává vznik velkým koloniím na rozdíl od erytroidního progenitoru (CFU-E), který dává vznik malým erytroidním koloniím v tkáňových kulturách (Bulíková, 2000).

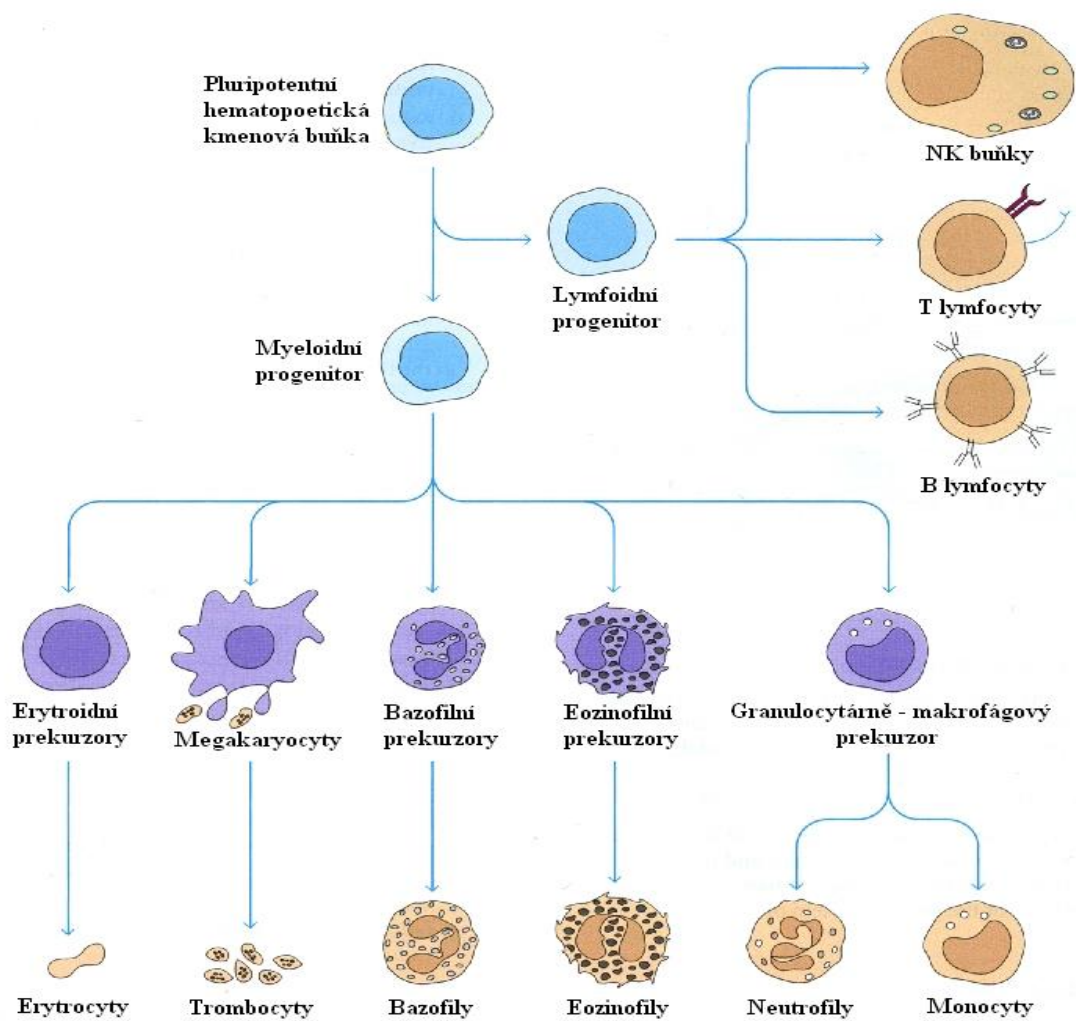
Prekursorové buňky, které se diferencují z progenitorů, jsou běžně přítomné v kostní dřeni a můžeme je pozorovat v nátěru fyziologické kostní dřene pod světelným mikroskopem. Konečným stádiem buněk jednotlivých řad jsou zralé efektorové buňky, nacházející se hlavně v periferní krvi. Tyto buňky již vykonávají funkce, pro které byly předurčeny (Bulíková, 2000).

2.1.4 Řízení hematopoézy

Hematopoéza je řízený proces, který probíhá tak, aby krevní elementy v obvodové krvi mohly plnit svou funkci. Za fyziologických podmínek má organismus tendenci udržovat stálý počet krevních buněk nebo ho v případě potřeby zvyšovat. Za regulaci hematopoézy jsou zodpovědné především hematopoetické růstové faktory, některé hormony a hematopoetické mikroprostředí kostní dřene (Kaushansky, 2010).

Růstové faktory (Colony Stimulating Factor – CSF), označované také jako cytokiny, jsou látky glykoproteinové povahy. Na základě jejich působení je zahájena diferenciace buněk do příslušných krvetvorných řad (Kaushansky, 2010). V dnešní době známe několik desítek růstových faktorů, z nichž některé hrají důležitou roli v aktivaci a vývoji krvetvorných buněk. Některé faktory, např. interleukiny 1, 3, 6 a 11 působí přímo na primitivní progenitorové buňky (Pecka, 2002). Mezi nejdůležitější hematopoetické růstové faktory patří: růstový faktor kmenových buněk (Stem Cell Factor – SCF), interleukiny 1 – 13 a faktory stimulující růst buněk v koloniích: GM-CFS – růstový faktor, který působí na progenitorové buňky granulocytů a makrofágů; G-CFS – růstový faktor, který působí na progenitorové buňky granulocytů; M-CFS – růstový faktor, který působí na progenitorové buňky makrofágů; trombopoetin a erytropoetin (Bulíková, 2000).

Hematopoetické růstové faktory jednak regulují buněčné děje, které by vedly ke spuštění apoptózy, ale také stimulují proliferaci buněk a spouští signální dráhy pro diferenciaci (Divoký a kol., 2002).



Obr. 1: Schéma hierarchie hematopoézy

Upraveno podle:

<http://www.d.umn.edu/~jfitzake/Lectures/DMED/CytAnt/Cytokines/HematopoieticAgents.html>

2.2 Myelodysplastický syndrom

Myelodysplastický syndrom (MDS) je skupina klonálních poruch krvetvorby a často bývá označován také jako preleukemický stav (Čermák, 2012). Klonální onemocnění krvetvorby, která spadají do klasifikace MDS, jsou charakterizována dysplázií a inefektivní krvetvorbou v jedné nebo více vývojových liniích, což je příčinou nedostatečné produkce adekvátního počtu krevních buněk navzdory buněčnosti kostní dřeně. Jedná se o onemocnění hematologické, protože až u jedné třetiny pacientů se MDS transformuje do akutní myeloidní leukémie. Postihuje především starší populaci (60 let a více), u které připadá 20 – 50 pacientů na 100 000 obyvatel (Neuwirtová, 2005). Výjimku ve výskytu MDS však nepředstavují ani mladí lidé a děti, avšak u těchto skupin populace se s výskytem MDS setkáváme pouze výjimečně (Červinek, 2010). U mužů je výskyt MDS nepatrně vyšší než u žen (Málek, 2005).

Etiologie MDS je multifaktoriální a v mnoha ohledech nejsou příčiny vzniku objasněny. Na vzniku MDS se podílejí různé rizikové faktory: záření, amoniak, ropné produkty, benzen. Pokud je člověk dlouhodobě vystaven těmto rizikovým faktorům, hrozí u něj vyšší riziko vzniku MDS. MDS může vzniknout také jako komplikace při chemoterapii či radioterapii nádorů (Málek, 2005).

Za normálních podmínek produkuje kostní dřeň nezralé krevní elementy – blasty, které se v procesu hematopoézy postupně vyvíjejí ve zralé buňky krvetvorby - erytrocyty, leukocyty a trombocyty, které plní řadu důležitých funkcí (Červinek, 2011). Při MDS dochází k mutaci hematopoetické kmenové buňky, což vede ke vzniku patologického klonu, který má růstovou výhodu. Mutace hematopoetické kmenové buňky vede ke vzniku abnormální imunitní odpovědi organismu. Dochází ke zvýšené produkci cytokinů, které způsobují apoptózu již zralých i nezralých forem krvetvorby (Čermák, 2012). Dochází také k abnormální diferenciaci krvetvorných buněk (Neuwirtová, 2005).

V kostní dřeni pozorujeme dysplázií, jejímž důsledkem je současný výskyt cytopenie, nedostatečná produkce jedné nebo více krevních řad. Snížení počtu erytrocytů se nazývá anémie, nízký počet trombocytů trombocytopenie a jako leukopenie je označován snížený počet leukocytů (Červinek, 2011). V důsledku anémie jsou pacienti bledí, pocítují dušnost a jejich fyzická výkonnost je snížena. Trombocytopenie má za následek zhoršenou srážlivost krve, která je doprovázena různými krvácivými projevy. Leukopenie má za následek

opakované bakteriální či virové infekce, které mohou způsobit i smrt pacienta. (Červinek, 2010).

2.2.1 Primární a sekundární MDS

Počet nemocných s MDS se neustále zvyšuje. Důvodem je prodlužující se věk populace, ale také mnoho rizikových faktorů, kterými jsme v dnešním moderním světě obklopeni (Neuwirtová, 2010).

Většina případů MDS se řadí mezi primární, u kterých není znám původ. Do skupiny sekundární MDS, který vzniká působením různých mutagenů poškozujících hematopoetickou kmenovou buňku, se řadí pouze malé procento pacientů (Neuwirtová, 2010). Sekundární MDS představuje závažnou pozdní komplikaci po prodělané radioterapii nebo chemoterapii, je charakterizován agresivním průběhem a častou transformací do AML. Medián přežití pacientů s diagnostikovaným sekundárním MDS je menší než 12 měsíců (Bělohávková a kol., 2009).

Záření a alkylační skupiny cytostatik způsobují poškození genomu hematopoetické kmenové buňky, důsledkem je vznik patologického klonu s defektem v diferenciaci buněk do zralějších forem krvetvorby. Chromozomální aberace jsou přítomny až u 80 % pacientů se sekundárním MDS, u primárního MDS je procento nižší - 40-60 %. Pro primární i sekundární MDS jsou charakteristické změny 5. a 7. chromozomu, ale prognóza je horší u sekundárního MDS (Neuwirtová, 2005). Sekundární MDS může vzniknout také po působení benzenu, organických rozpouštědel, těžkých kovů a pesticidů. Dochází také k poškození 17. chromozomu, na jehož krátkém rameni (17p) se nachází významný tumor supresorový gen *p53* s proapoptotickým účinkem. Nepřítomnost nebo poškození genu *p53* představuje vždy závažnou prognózu (Neuwirtová, 2010).

2.2.2 Diagnostika a klasifikace MDS

MDS je diagnostikován na základě mnoha vyšetření, z jejichž výsledků je možné stanovit přesnou diagnózu a prognózu nemocných, což je stěžejní pro zvolení vhodné a účinné léčby pacientů.

Mezi základní vyšetření pro stanovení diagnózy nemocných s MDS patří vyšetření krevního obrazu s manuálním diferenciatním rozpočtem. Krevní obraz je vyšetřován ze vzorku periferní krve, kde je následně stanoven počet, tvar a velikost jednotlivých krevních buněk. Vyšetření krevního obrazu je doplněno o biochemická vyšetření, která lékaři poskytují informace o funkci ledvin, jater a endokrinních orgánů. Dále je také stanoveno množství železa, erythropoetinu, vitamínu B12 a kyseliny listové (Červinek, 2011).

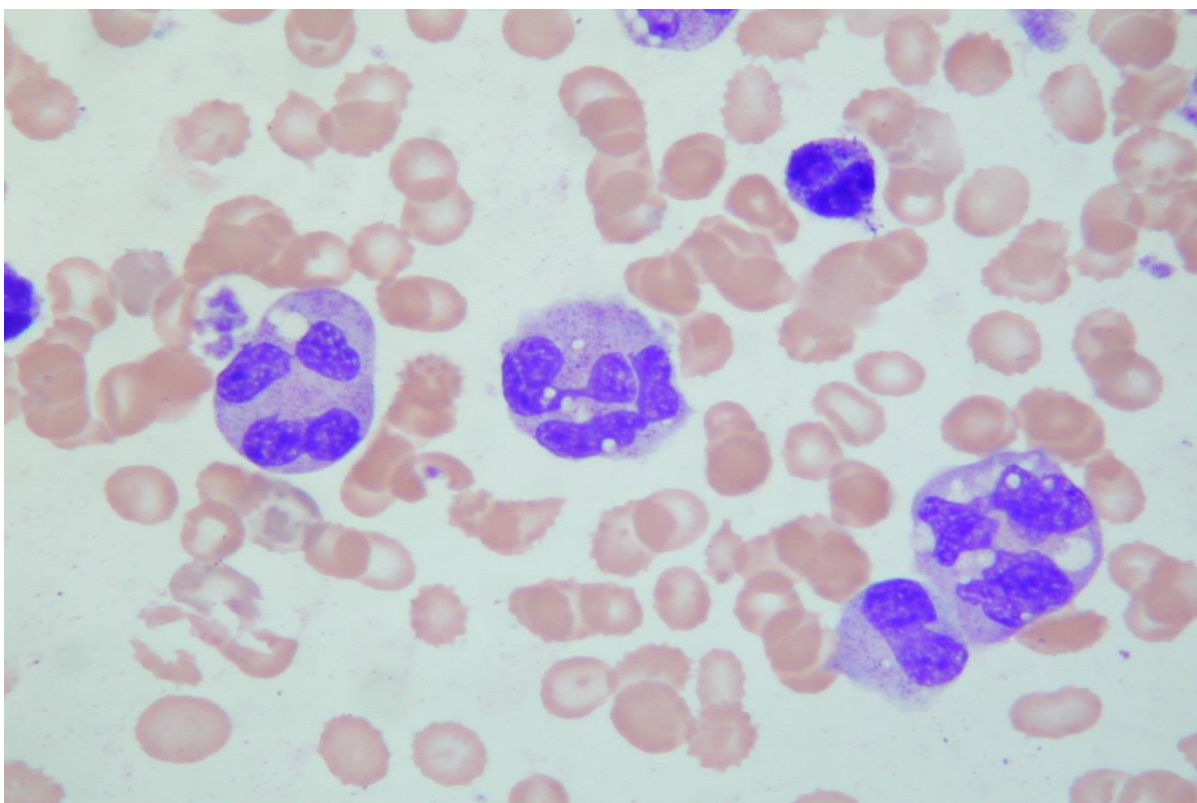
Pokud hodnoty krevního obrazu neodpovídají fyziologickým hodnotám a je prokázána anémie, provádí se vyšetření kostní dřeně. V kostní dřeni pozorujeme charakteristické morfologické změny buněk např. mezijaderné můstky, nepravidelnosti buněčného jádra, vakuolizace (viz obr. 2), vícejadernost, pupence, vícečetná laločnatá jádra, megaloidní změny (viz obr. 3). Typické jsou také prstenčité sideroblasty (viz obr. 4) nebo nálezy Auerových tyčí v myeloblastech (Čermák, 2012). Vzorky kostní dřeně jsou získávány sternální punkcí z hrudní kosti. Výsledky vyšetření kostní dřeně poskytují důležité informace o vývoji krevních buněk a jejich morfologických změnách. Kostní dřeň je získávána také trepanobiopsií z kyčelní kosti. Takto získaná kostní dřeň je vhodná pro důkladné histologické vyšetření. V trepanobiopsickém vzorku jsou potvrzeny dysplastické změny, je hodnocena buněčnost dřeně a přítomnost fibrózy (Čermák, 2012).

Vyšetření MDS může být obohaceno o doplňkové testy. Provádějí se virologická vyšetření, pomocí kterých zjišťujeme přítomnost retrovirů, viru hepatitidy B nebo parvoviry. Mezi další doplňkové testy patří koagulační vyšetření, díky kterým získáme informace o krevní srážlivosti, a také imunohematologická vyšetření na stanovení protilátek proti erytrocytům a trombocytům (Červinek, 2011).

Cytogenetické vyšetření má zásadní význam při diagnostice MDS. Chromozomové změny jsou detekovány u 50 % nemocných s MDS (Tiu a kol., 2011). Také metody molekulární cytogenetiky, mezi které patří fluorescenční in situ hybridizace (FISH) nebo komparativní genomová hybridizace (CGH), umožnily získat komplexní informace o genomu a stanovit přesnou lokalizaci poškozeného chromozomu (Čermák, 2012).

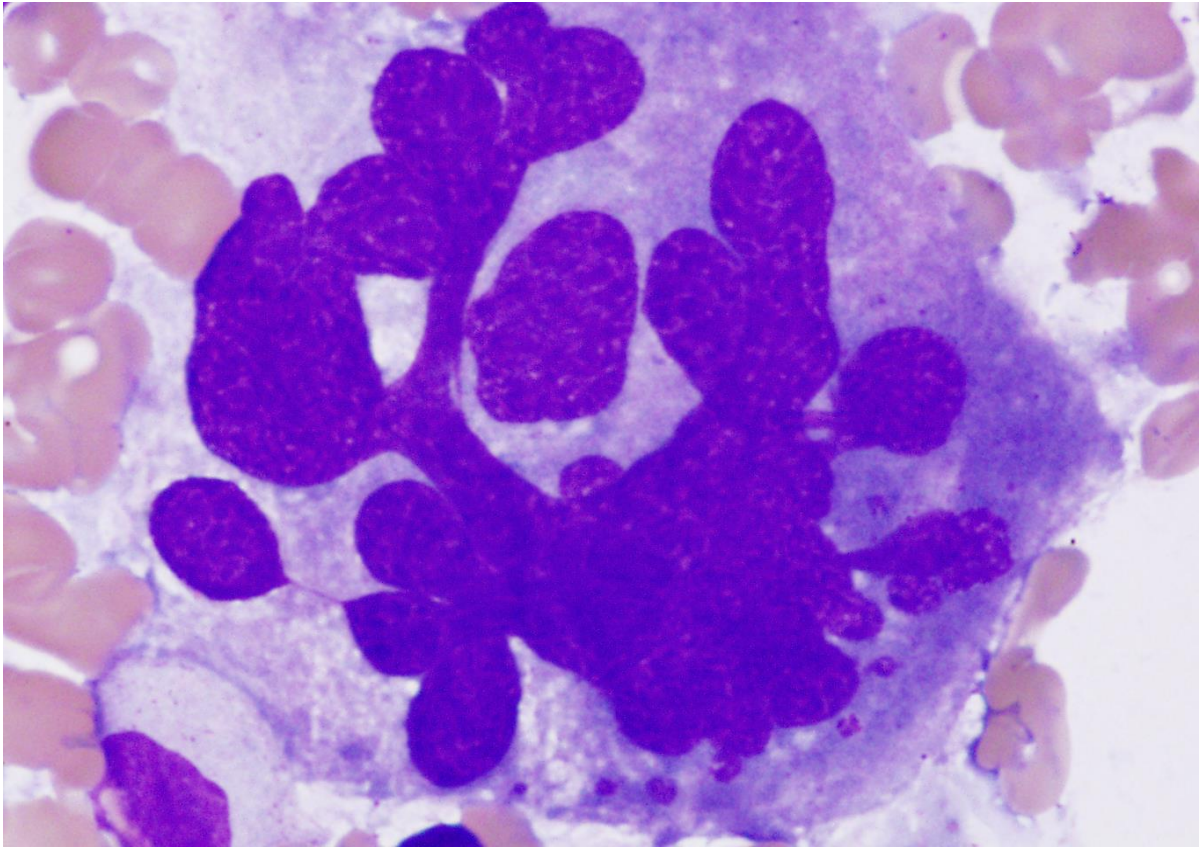
Molekulárně genetické metody mají význam pro studium mutací genů a změn genové exprese u MDS. Prozatím se nepodařilo identifikovat jeden gen nebo skupinu genů, které by měly univerzální význam pro diagnostiku. V posledních letech je intenzivně zkoumán proteinový profil ze séra nemocných s MDS na základě proteomiky (Čermák, 2012).

MDS se vyznačuje velkou heterogenitou a průběh tohoto onemocnění je u různých pacientů velmi odlišný. Výsledky vyšetření i klinický stav pacientů jsou stěžejní pro indikaci vhodné léčby. Mezi základní klasifikační schéma pacientů s MDS patří starší tzv. FAB klasifikace (francouzsko-americko-britská) a novější WHO klasifikace podle Světové zdravotnické organizace. Pro stanovení prognózy a agresivity tohoto onemocnění je používán Mezinárodní prognostický skórovací systém IPSS (Čermák, 2012).



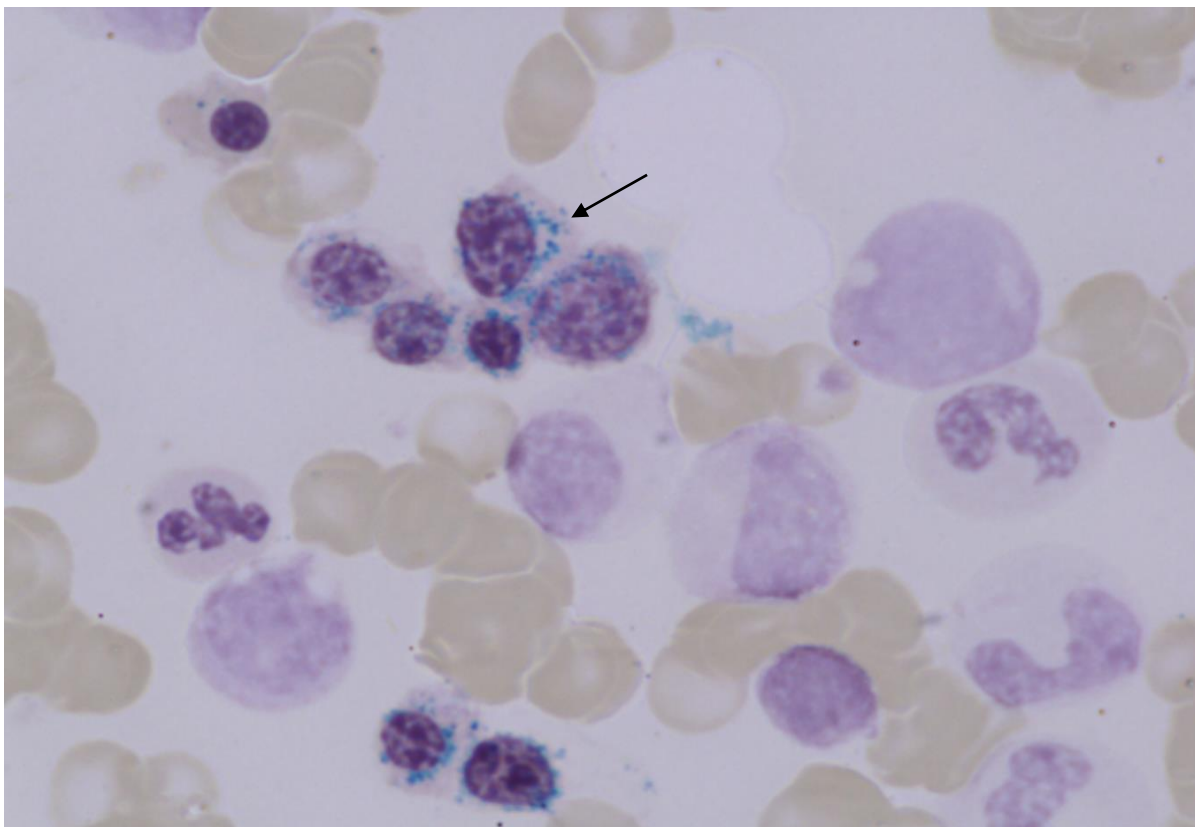
Obr. 2: Dysplastické změny granulocytární řady

(Převzato z databáze HOK FN v Olomouci)



Obr. 3: Dysplastické změny megakaryopoézy (atypická formace jader, nadměrná lobulizace jádra megakaryocytu)

(Převzato z databáze HOK FN v Olomouci)



Obr. 4: Prstenčité sideroblasty

(Převzato z databáze HOK FN v Olomouci)

2.2.2.1 FAB klasifikace

Francouzsko-americko-britská klasifikace vznikla v roce 1980, jejími autory je skupina hematologů z Francie, USA a Velké Británie (Červinek, 2011). Vychází z procentuálního zastoupení prstenčitých sideroblastů a blastů v periferní krvi a kostní dřeni, nerozlišuje počet dysplazií (Žídková a kol., 2010). Tento klasifikační systém rozděluje nemocné s MDS na 5 podskupin (viz tab. I) a umožňuje jejich členění na pacienty s prognózou lepší, u kterých hrozí nižší riziko transformace do AML. Do této skupiny patří pacienti s refrakterní anémií a refrakterní anémií s prstenčitými sideroblasty. Naopak pacienti s prognózou horší, u kterých je velká pravděpodobnost transformace do AML, patří do podskupiny s refrakterní anémií s nadbytkem blastů a refrakterní anémií s nadbytkem blastů v transformaci (Čermák, 2005).

Tab. I: FAB klasifikace (Žídková a kol., 2010)

FAB podskupina	Blasty v kostní dřeni (%)	Prstenčité sideroblasty (%)	Blasty v periferní krvi (%)
RA (refrakterní anémie)	< 5	< 15	< 1
RARS (refrakterní anémie se zmnožením prstenčitých sideroblastů)	< 5	> 15	< 1
RAEB (refrakterní anémie s nadbytkem blastů)	5 – 20	různé	< 5
RAEB-T (refrakterní anémie s nadbytkem blastů v transformaci)	21 – 30	různé	5 – 20
CMML (chronická myelomonocytární leukemie)	< 20 a zvýšený počet monocytárních buněk	různé	monocyty > $1 \cdot 10^9/l$

2.2.2.2 WHO klasifikace

Klasifikace světové zdravotnické organizace vychází z FAB klasifikace a přiřazuje nové podskupiny. První WHO klasifikace vyšla v roce 2002, druhá, revidovaná verze byla publikovaná v roce 2008 (Červinek, 2011). V této klasifikaci jsou již hodnoceny dysplazie v jednotlivých myeloidních řadách. Refrakterní anémie jsou rozděleny na RAEB 1 a RAEB 2 v závislosti na počtu blastů v kostní dřeni. Z důvodu vysokého počtu blastů v kostní dřeni (21 – 30 %) byla vyřazena RAEB-T, která podle WHO klasifikace již splňuje kritéria pro AML. Mezi nové subtypy zařazuje WHO MDS-U a MDS s izolovanou delecí 5q (viz tab. II) (Žídková a kol., 2010). Biologický materiál několika nemocných s MDS s izolovanou delecí 5q byl také předmětem mé experimentální analýzy (viz experimentální část práce).

Tab. II: WHO klasifikace z roku 2008 (upraveno podle Neuwirtová, 2010)

WHO podskupina	Nález v periferní krvi	Nález v kostní dřeni
RCUD (refrakterní cytopenie s unilineární dysplazií)	mono nebo bi-cytopenie, žádné nebo ojedinělé blasty (< 1 %)	unilineární dysplazie ≥ 10 % buněk jedné myeloidní řady, < 5 % blastů, < 15 % prstenčitých sideroblastů
RARS (refrakterní anémie s prstenčitými sideroblasty)	anémie, žádné blasty	erytroidní dysplazie, < 5 % blastů, ≥ 15 % prstenčitých sideroblastů
RCMD (refrakterní cytopenie s multilineární dysplazií)	cytopenie, žádné nebo ojedinělé blasty (< 1 %), < 1. 10 ⁹ /l monocytů	dysplazie ≥ 10 % buněk ve ≥2 myeloidních liniích, < 5 % blastů, prstenčité sideroblasty mohou i nemusí být přítomny
RAEB 1 (refrakterní anémie s nadbytkem blastů 1)	cytopenie, < 5 % blastů, < 1. 10 ⁹ /l monocytů	dysplazie v jedné nebo více myeloidních liniích, 5 – 9 % blastů
RAEB 2 (refrakterní anémie s nadbytkem blastů 2)	cytopenie, 5 – 19 % blastů, Auerovy tyče mohou nebo nemusí být přítomny, < 1. 10 ⁹ /l monocytů	dysplazie v jedné nebo více myeloidních liniích, 10 – 19 % blastů, Auerovy tyče mohou nebo nemusí být přítomny
MDS – U (MDS neidentifikovatelný)	pancytopenie ≤ 1 % blastů	jednoznačná dysplazie < 10 % buněk v jedné nebo více myeloidních liniích, pokud je doprovázena cytogenetickou abnormalitou považovanou za předpokládaný důkaz diagnózy MDS, blasty < 5 %
MDS s izolovanou delecí (5q)	anémie, normální nebo zvýšený počet trombocytů, žádné nebo ojedinělé blasty (< 1 %)	normální nebo zvýšený počet megakaryocytů s hypolobulovanými jádry, blasty < 5 %, izolovaná del(5q)

2.2.3 MDS s izolovanou delecí 5q (5q- syndrom)

Delece na dlouhém raménku chromozomu 5 je častým nálezem u pacientů s MDS. Tyto změny se mohou vyskytovat samostatně jako jediná chromozomová změna nebo jako součást komplexního karyotypu. Rozsah 5q delece je variabilní; izolovaná delece 5q31-33 (tvoří asi 10 – 15 % všech MDS případů) je spojována s příznivou prognózou a s nízkým rizikem (25 %) přechodu do AML. Pokud je delece dlouhého ramene chromozómu 5 tou

jedinou změnou v karyotypu, hovoříme o tzv. 5q- syndromu. Nejčastěji deletovanou oblastí (common deleted region, CDR) je lokus 5q31.1. Tato oblast obsahuje několik kandidátních genů, jejichž haploinsuficience by mohla být zodpovědná za fenotypové znaky onemocnění, mezi které patří erytroidní hypoplasie, trombocytóza, dysmegakaryopoéza a makrocytární anémie. Kandidátními geny jsou nejčastěji označovány *RSP14*, *SPARC*, *EGR1* a *IRF1* (viz dále) (Tefferi a Vardiman, 2009).

2.2.4 Prognóza

Pro stanovení prognózy nemocných s MDS se nejčastěji používají 2 skórovací systémy. Mezinárodní prognostický skórovací systém IPSS (International Prognostic Scoring System), který je založen na FAB klasifikaci, a novější prognostický systém podle světové zdravotnické organizace WPSS (WHO Classification Based Prognostic Scoring System). Prognóza pacientů je hodnocena na základě přítomnosti blastů v kostní dřeni, chromozomových aberací a cytopenie (Neuwirtová, 2010).

Podle IPSS jsou pacienti řazeni do čtyř různých skupin (nízké, střední I, střední II a vysoké riziko), které se liší v délce přežití a rizika transformace do AML. IPSS je objektivní pouze v době určení diagnózy a nebere v potaz progresi onemocnění, proto byl vytvořen prognostický systém WPSS, který je objektivní i v průběhu nemoci a navíc také hodnotí potřebu podání transfúze nemocným (Žídková a kol., 2010).

Na základě výzkumu bylo zjištěno, že opakované transfúze erytrocytů podávané při závažné anémii, představují významný rizikový faktor. Transfúze způsobují přetížení organismu železem, výrazně snižují dobu přežití a zvyšují riziko transformace do AML. Na základě WPSS jsou pacienti řazeni do pěti různých skupin (velmi nízké, nízké, střední, vysoké, velmi vysoké riziko). WPSS je dynamický systém a pro stanovení prognózy a vhodné léčby pacientů s MDS a je vhodnější než IPSS (Žídková a kol., 2010).

2.2.5 Patogeneze

Na vzniku MDS se podílí akumulace genetických a epigenetických změn v genomu hematopoetické kmenové buňky. Pravá příčina vzniku patologického klonu, myeloidní dysplázie a inefektivní hematopoézy není zcela objasněna, nejspíše se jedná o kombinaci

příčin genetických, epigenetických, poruch signálních molekul v buňce a faktorů působících z vnějšího prostředí (Neuwirtová, 2010; Mufti, 2004).

Poškození genomu přispívá k jeho nestabilitě a k postupné akumulaci mutací, které vedou k abnormálnímu růstu a diferenciaci blastů. Geny, které stimulují apoptózu, vykazují zvýšenou expresi u raných fází MDS a naopak sníženou expresi u pozdních fází MDS. Mezi tyto geny patří: *Bad*, *BAX* a *p38*. Tyto geny způsobují zvýšenou apoptózu při rané formě nemoci a naopak sníženou apoptózu u pozdní fáze nemoci. U antiapoptotických genů, mezi které patří gen *bcl-2*, byly popsány opačné změny v expresi, tzn., že u časného MDS je exprese genů i apoptóza snižena, zatímco u pokročilého MDS je exprese i apoptóza zvýšená (Čermák, 2010).

Poškození genomu může být zapříčiněno několika způsoby (Neuwirtová, 2010):

- Delece chromozomů, při které dochází ke ztrátě jeho části a tím pádem také ke ztrátě genů a jejich haploinsuficienci.
- Bodové mutace, které jsou zodpovědné za změnu funkce kódujících proteinů, čímž může dojít k aktivaci onkogenů a také k inaktivaci tumor-supresorových genů.
- Získaná uniparentální disomie, kdy dva homologní chromozomy nebo jejich části pocházejí pouze od jednoho rodiče.
- Translokace jsou pro MDS méně typické.
- Epigenetické procesy, kam můžeme zařadit umlčení genové exprese hypermetylací promotorů.
- Imunologická reakce způsobená produkcí zánětlivých cytokinů i abnormální produkcí cytotoxických a regulačních T-lymfocytů.

Přesné mechanismy patogeneze MDS nejsou díky heterogenitě tohoto onemocnění ještě zcela pochopeny a jsou v současné době intenzivně studovány (Liesveld a Lichtman, 2010).

2.2.5.1 Molekulární patogeneze

Pomocí moderních metod molekulární cytogenetiky a molekulární biologie byla objevena řada genů, které by v budoucnu mohly mít značný význam pro stanovení „molekulární“ diagnózy a prognózy nemocných s MDS. Tyto geny se účastní několika základních buněčných procesů:

➤ **Proapoptotické geny:**

Bad, BAX, p38 (viz předchozí kapitola 2.2.5)

➤ **Antiapoptotické geny:**

Do této skupiny patří genová rodina *Bcl-2*, která hraje důležitou roli v apoptóze. *Bcl-2* je exprimován u normálních lymfoidních buněk a myeloidních prekurzorů. Snížení exprese *Bcl-2* u zralých myeloidních buněk a naopak zvýšení exprese v blastech je spojena s horší prognózou u MDS (Greenberg, 1998).

➤ **Chromatin-remodelující faktory:**

Mezi tyto faktory patří *Asx* proteiny, ovlivňující expresi homeotických genů. Nejčastěji mutovaný gen kódující tyto proteiny je *ASX1* (až u 11 % pacientů s MDS a také často u myeloproliferativních neoplázií a AML). *ASX1* mutace vede ke ztrátě represivního chromatinového markeru u některých homeotických genů uplatňujících se v hematopoéze (Tab. III; Abdel-Wahab a kol., 2012).

➤ **Faktory ovlivňující metylaci genomu:**

Mezi tyto faktory patří proteiny Tet. Jedna z funkcí Tet proteinové rodiny je enzymatická katalýza konverze 5-methylcytosinu na 5-hydroxymethylcytosin. To znamená, že Tet hraje důležitou roli v regulaci DNA methylace. Konkrétně Tet2 je považován za epigenetický tumorový supresor (Moran-Crusio a spol., 2011). Mutace genu *TET2*, často nacházená u MDS i u myeloproliferativních neoplázií (Tab. III), má charakter ztráty funkce a může pomoci předpovědět citlivost na DNA hypomethylační látky jako je např. 5-azacitidin a decitabin (Holmfeldt a Mullighan, 2011).

➤ **Transkripční faktory:**

RUNX1 (Run-related transcription factor 1), označovaný také jako *AML1*, kóduje regulační transkripční faktor důležitý pro normální krvetvorbu (Tab. III). Runx1 reguluje expresi různých genů zapojených do hematopoézy, včetně *IL3*, *CSF2* a *CD4* (Shih a Levine, 2011). Bodové mutace *RUNX1*, které patří mezi nejčastěji detekované mutace MDS (nachází se téměř u 20 % nemocných), způsobují zvýšení myeloidních progenitorových buněk (Shih a Levine, 2011).

EGR1 (early growth response 1) kóduje transkripční faktor, který je mediátorem mezi stresovými faktory a expresí genů imunitní odpovědi (Yan a kol., 2000). Ztráta jedné alely (haploinsuficience) přispívá k fenotypu 5q- syndromu (Joslin a kol., 2007).

➤ **Geny kódující zánětlivé cytokiny**

IL4 – je jedním z nejdůležitějších cytokinů pro stanovení typu buněčné odpovědi. Gen *IL4* je lokalizován na dlouhém raménku chromosomu 5 (5q 23-31). Tento gen bývá často deletován u pacientů s myeloidními poruchami. Obsahuje 4 exony, 3 introny a jeho rozpětí je asi 10 kb (Matsuda a kol., 1993).

Mezi další geny, které kódují zánětlivé cytokiny, patří *TNF-alpha*, *TGF-beta*.

Tab. III: Přehled vybraných genů uplatňujících se v etiopatogenezi MDS (upraveno podle Davids a Steensma, 2010)

Gen	Frekvence výskytu (%)	Normální funkce	Speciální funkce
<i>ASXL1</i> (Associated Sex Combs Like-1)	11	Chromatin – vazebný protein, který se účastní tvorby represivního komplexu	Spojen s vyšším rizikem onemocnění, přispívá k myeloidní transformaci
<i>RUNX1</i> (Run-related transcription factor 1)	20	Kritický regulační transkripční faktor, složka nukleus-vazebného faktoru	Spojen se špatnou prognózou
<i>TET2</i> (Ten Eleven Translocation-2)	14-26	Katalyzuje přeměnu 5-methylcytosinu na 5-hydroxymethylcytosin	Spojen s příznivou prognózou

➤ **Další geny zahrnuté do molekulární patogeneze 5q minus syndromu**

Dalšími klíčovými geny určujícími 5q- fenotyp jsou haploinsuficience *RPS14* (Ebert a kol., 2008) a ztráta (haploinsuficience) některých mikroRNA, kódovaných v deletované oblasti, MIR145 a MIR146A (Starczynowski a kol., 2010). *RPS14* kóduje ribozomální protein S14. Haploinsuficience *RPS14* alteruje translaci řady genů a aktivuje p53 (Tefferi a Vardiman, 2009).

Přesné biologické funkce jednotlivých genů a jejich role v patogenezi MDS jsou předmětem výzkumu (Tiu a kol., 2011).

2.2.6 Léčba MDS

U MDS se na jedné straně setkáváme s indolentním průběhem onemocnění, kdy není potřeba pacientům nasazovat žádnou léčbu, avšak na straně druhé jsou pacienti, u kterých dochází k rychlé transformaci do AML, a léčba je v těchto případech nevyhnutelná. Pacienty rozlišujeme na základě prognostických skórovacích systémů IPSS nebo WPSS na pacienty s nižším a vyšším rizikem transformace do AML (Voglová, 2010).

Mezi další důležitá kritéria pro zvolení správné léčby nemocných řadíme také subtyp MDS, věk pacienta a případné komorbidity. U mladších pacientů je primárním cílem úplné vyléčení nemoci, zatímco u starších osob se snažíme docílit prodloužení a zlepšení kvality jejich života (Jonášová, 2010a).

2.2.6.1 Léčba nemocných s nižší mírou rizika

Pacienti patřící do této skupiny mohou být léčeni několika způsoby na základě vážnosti jejich zdravotního stavu. Mladším pacientům, u kterých byla zjištěna mírná cytopenie, postačí pouze sledování jejich zdravotního stavu, vývoj v krevním obraze, případně pozorování cytogenetických změn (Jonášová, 2010a).

Nemocným v této skupině může být indikována podpůrná terapie pomocí transfúzí erytrocytů (Jonášová, 2010a). Zde však hrozí vysoké riziko akumulace železa v organismu a následné poškození životně důležitých orgánů. Nejvíce je ohroženo srdce, játra, a také endokrinní orgány. Akumulace intracelulárního železa vede ke vzniku oxidativního stresu

buňky, který je zodpovědný za zvýšení apoptózy krvetvorných prekurzorů. Účinnou prevencí se stává chelatační terapie. Pacientům jsou podávány léky, které snižují množství železa v organismu a přispívají ke zlepšení cytopenie a celkového zdravotního stavu (Jonášová, 2009a). Mezi chelátory patří deferoxamin a deferipron (Jonášová, 2009b). V posledních letech se osvědčil chelatační přípravek deferaxirox, který přináší příznivé výsledky v léčbě pacientů s MDS (Jonášová, 2010b).

Léčba pomocí růstových faktorů je zvolena u pacientů, u kterých není potřebná transfúze erytrocytů. Mezi růstové faktory patří erytropoetiny, v České republice je používán epoetin- α , epoetin- β , a nově také darbepoetin. Účinky těchto růstových faktorů jsou rovnocenné. Kromě erytropoetinů jsou k dispozici také trombopoetiny, které stimulují trombopoézu. Trombocytopenie je přítomna téměř u 65 % nemocných a k její léčbě se používá v rámci klinických studií lék romiplostim (Jonášová, 2010a). U pacientů s nízkým počtem leukocytů v kombinaci s infekcí je vhodné podávat faktor stimulující kolonie granulocytů (G-CSF) jako růstový faktor bílých krvinek.

Imunomodulační terapie je zaměřena na dysregulaci a změnu hladiny cytokinů a na ovlivnění erytroidních prekurzorů (Jonášová, 2010a). Mezi imunomodulační léky patří lenalidomid, který přináší příznivé výsledky u nemocných s izolovanou delecí 5q, u kterých pomáhá snížit závislost na chronické transfúzní terapii. V roce 2005 bylo schváleno používání lenalidomidu v USA; v Evropě je prozatím používán pouze v rámci klinických studií (Červinek, 2010).

Imunosupresivní terapie pomocí antithymocytárního globulinu dosahuje příznivých výsledků u 30-40 % pacientů. Také epigenetická léčba zahrnující demetylační terapii by v budoucnu mohla být užitečná (Jonášová, 2010a).

2.2.6.2 Léčba nemocných s vyšší mírou rizika

U pacientů, kteří se řadí do této skupiny, hrozí velké riziko transformace do AML. Délka přežití nemocných jsou pouhé 4 měsíce a velký problém je rezistence na standardní léčbu. Na základě zdravotního stavu a věku pacienta je zvolen typ léčby (Jonášová, 2010c).

Epigenetická terapie ovlivňuje funkci a expresi genů. DNA hypermetylace a deacetylace histonů jsou procesy, které jsou pravděpodobně zodpovědné za poruchu exprese tumor supresorových genů a mohou být zodpovědné za vznik MDS. Inhibitory

metyltransferáz potlačují DNA hypermetylaci. Významným zástupcem je 5-azacitidin, který je v České republice používán k léčbě pacientů s vyšší mírou rizika transformace MDS do AML (Jonášová, 2010c).

Dalším léčebným přístupem je chemoterapie, která se však používá především ke snížení počtu blastů před allogenní transplantací (Jonášová, 2010c). Allogenní transplantace krvetvorných buněk je jediná forma léčby, která umožňuje vyléčení MDS, ale přináší s sebou riziko peritransplantační mortality a relapsu (Marková, 2010). Transplantace přináší pozitivní výsledky především u mladých pacientů s pokročilou formou MDS, u kterých bylo pozorované zlepšení celkového přežití (Čermák, 2012).

2.3 MLPA

MLPA (Multiplex ligation-dependent probe amplification) je nově vyvinutá metoda, pomocí které můžeme dokázat změny v počtu kopií lidských genů. Díky této skutečnosti může být MLPA použita v molekulární diagnostice některých genetických chorob, jejichž patogeneze se vztahuje k přítomnosti delece nebo duplikace konkrétních genů. Pomocí MLPA mohou být analyzovány současně větší počty genů, proto je tato metoda často využívána v molekulární diagnostice vybraných chorob (Stuppia a kol., 2012).

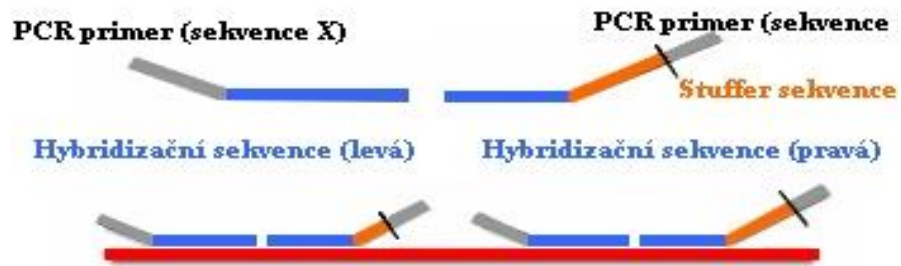
MLPA je tedy technika, pomocí které jsme schopni analyzovat v jedné reakci až 40 různých sekvencí DNA (Stuppia a kol., 2012). MLPA sondy rozpoznají cílové sekvence v délce 50 - 100 nukleotidů. Díky tomu je možné použít MLPA i na vysoce fragmentovanou DNA a k detekci malých delecí, zahrnujících pouze jeden nukleotid (Hömig-Hölzel a Savola, 2012). Prozatím je komerčně dostupných 300 sond specifických pro velmi širokou škálu běžných i vzácných genetických poruch (Stuppia a kol., 2012). Jedná se o spolehlivou a finančně relativně nenáročnou metodu, která je modifikací multiplexové polymerázové řetězové reakce a tudíž může být prováděna pomocí standardního termocycleru a kapilární elektroforézy. MLPA je založena na ligaci dvou sond s následující amplifikací. Každá sonda je tvořena částí, která je komplementární k cílové sekvenci, a z části obsahující univerzální sekvenci pro navázání PCR primeru. Kromě toho je každá sonda označena specifickou značkou v podobě tzv. „stuffer“ sekvence k následnému odlišení jednotlivých sond na kapilární elektroforéze podle délky produktu v párech bazí (bp) (Stuppia a kol., 2012).

Průběh MLPA lze rozdělit do čtyř kroků (viz obr. 5). V prvním kroku je DNA denaturována a inkubována se směsí specifických MLPA sond. Na cílovou sekvenci nasedají vždy dvě přiléhající sondy, které k ní hybridizují. Následně jsou sondy spojené ligací. (Hömig-Hölzel a Savola, 2012). Ve třetím kroku dochází k PCR amplifikaci, která se provádí za použití pouze jednoho páru PCR primerů, z nichž jeden je fluorescenčně značený. Během PCR reakce jsou amplifikovány pouze ligované sondy. PCR produkty jsou v dalším kroku odděleny na základě délky PCR produktu pomocí kapilární elektroforézy (Stuppia a kol., 2012). Rozdíly mezi různými vzorky DNA jsou zjišťovány porovnáním výsledných píků (Hömig-Hölzel a Savola, 2012). Měří se výška nebo plocha získaných píků. Klíčovým bodem v reakci MLPA je to, že nedochází k PCR amplifikaci cílové sekvence, nýbrž k hybridizaci a ligaci sond na cílové sekvence DNA (Stuppia a kol., 2012).

Je důležité si uvědomit, že MLPA je relativní technika a mohou být zjištěny pouze relativní rozdíly. Absolutní množství použité DNA není důležité. Podobné výsledky jsou získané při testování 50 nebo 250 ng vzorku. Závěry týkající se počtu kopií nelze vyvodit z jedné MLPA reakce. Srovnání s referenčními DNA vzorky je zásadní. Porovnáváme píky sond pro detekci testovaných genů s vrcholy referenčních sond. Referenční sondy detekují sekvence, u kterých se očekává normální počet kopií ve všech testovaných vzorcích. Referenční sondy jsou odvozeny od zdravých jedinců, u kterých se očekává, že mají normální počet kopií testovaných genů. Tímto způsobem je možné detekovat abnormální signály sond, které indikují delece nebo duplikace sekvencí testovaných pomocí MLPA. Výsledky MLPA závisí na několika faktorech včetně experimentálního nastavení (volba zkoušky, referenční vzorek), čistoty vzorku, nastavení přístroje a dat normalizace použité metody. Pro spolehlivé MLPA výsledky by standardní odchylka pro každou MLPA sondu měla být nižší než 10 %, pokud jsou testovány normální DNA vzorky (SALSA® MLPA® probemix P144/P145 Product description, 2013).

MLPA test se stal během několika málo let široce používanou technikou v laboratořích provádějících genetické testování pro molekulární diagnostiku různých chorob (Stuppia a kol., 2012). V posledních letech byla MLPA úspěšně použita v diagnostice nádorů a ve výzkumu rakoviny (Hömig-Hölzel a Savola, 2012).

1. Denaturace a hybridizace



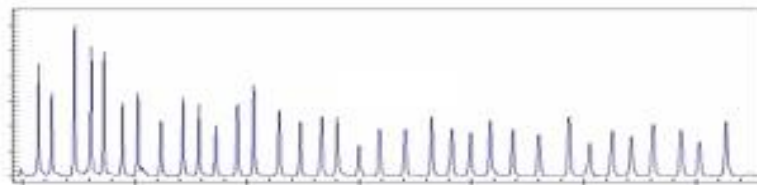
2. Ligace



3. PCR s univerzálními primery X a Y amplifikace ligované sondy



4. Fragmentová analýza



Obr. 5: Schéma MLPA

Upraveno podle: <http://www.biogen.cz/mlpa-kity>

3 CÍL PRÁCE

Cílem experimentální části bakalářské práce bylo:

- Prakticky zvládnout technologii MLPA.
- Metodou MLPA analyzovat DNA buněk kostní dřeně nebo periferní krve alespoň u 5 nemocných s 5q- syndromem a vyhodnocením výsledků zjistit, je-li MLPA molekulárně-genetickou metodou vhodně doplňující molekulárně-cytogenetické vyšetření (FISH) u těchto pacientů.

4 MATERIÁL A METODIKA

4.1 Chemikálie

Etanol (Lachner)

Fenol sycený roztokem Trisu, pH 7,8

Formamid (Amresco)

GeneTrace 500 ROX (Genomac, Praha)

KCl (Lachner)

KH_2PO_4 (Lachner)

Kyselina boritá (Lachner)

NaCl (Lachner)

Na_2HPO_4 (Lachner)

NH_4Cl (Lachner)

NH_4HCO_3 (Lachner)

SAVO (dezinfekční kapalný přípravek, 5% chlornan sodný)

Sterilní voda (v čistotě pro molekulárně genetické aplikace; Millipore, USA) EDTA (Sigma)

TRIS (Kulich HK)

Salsa MLPA probemix P144-A2/P145-A2 MDS (MRC-Holland)

EK1-FAM MLPA reagents (MRC-Holland)

MagNA Pure Compact Nucleid Acid Isolation Kit I (Roche)

4.2 Roztoky

10x lyzační roztok pro erytrocyty

1,55 mol/l NH_4Cl

0,1 mol/l NH_4HCO_3

0,01 mol/l EDTA, pH 8,0

PBS, pH 7,4 (Fosfátový fyziologický roztok)

137 mmol/l NaCl

2,7 mmol/l KCl

4,3 mmol/l Na₂HPO₄

1,4 mmol/l KH₂PO₄

10 mmol/l TRIS, pH 7,5**10% SDS**

10 g SDS

doplnit do 100 ml TK H₂O

STE

5,844 g NaCl

2 g NaCl

36,4 g Na₂HPO₄ · 12H₂O

Cloroform

chloroform : izoamylalkohol (24:1)

480 ml chloroformu + 20 ml izoamylalkoholu

Proteinasa K

40 mg proteinasy K

2 ml 10% SDS

40 µl 1M EDTA · Na₂, pH = 8,0

doplnit do 20 ml TK H₂O

70% Etanol

Příprava ředěním absolutního alkoholu (96%):

73 ml absolutního alkoholu / 100 ml roztoku

4.3 Vybavení laboratoře

Automatické pipety (10 µl, 20 µl, 200 µl, 1000 µl, Pipetman®, Gilson France) + špičky
Centrifuga pro 1,5 ml zkumavky BIOFUGE 22R (Heraeus, Německo)
Genetický analyzátor ABI PRISM 3100 (Applied Biosystems, USA)
Laboratorní centrifuga MEGAFUGE 1,0 R (Heraeus, Německo)
Laboratorní sklo (odměrné válce, kádinky) (SIMAX, Česká republika)
Ochranné laboratorní vinylové rukavice (Ansell, Velká Británie)
96 Well Plate pro genetický analyzátor ABI PRISM 3100 (Applied Biosystems, USA)
Lednice (4-8 °C)
Mikrozkumavky (2 ml; 1,5 ml; SARSTEDT, Německo)
Mrazicí boxy (-80°C, -20°C) (SANYO, Japonsko)
NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer (NanoDrop Technologies, USA)
PCR mikrozkumavky 0,2 ml (Applied Biosystems, USA)
Plastové centrifugační zkumavky (15 ml, 50 ml, TPP)
Plastové Pasteurovy pipety (Alpha Laboratories Limited, Velká Británie)
10x pufr s EDTA pro genetický analyzátor ABI PRISM 3100 (Applied Biosystems, USA)
Stolní mikrocentrifuga FORCE 7 (Denver Instrument Company, USA)
Thermal Cycler Veriti 96 Well (Applied Biosystems, USA)
Vortex CERTOMAT ® MV (B.Braun Biotech International)
Výrobník ledu Icematic F100 Compact (CASTELMAC SpA, Itálie)
Izolátor NK MagNA Pure Compact (Roche)
GeneMarker V1.85 (SoftGenetics LLC, USA)

4.4 Biologický materiál

Aspirát kostní dřeně (asi 1 ml)

Periferní krev (9 ml)

4.5 Izolace DNA

DNA byla izolována z periferní krve nebo z kostní dřeně pacientů. Vzorke byly odebrány do zkumavek s protisrážlivým činidlem EDTA. Do centrifugační zkumavky bylo

přeneseno 5 – 10 ml nesrážlivé krve a následně bylo množství doplněno do 50 ml chlazeným 1x lyzačním roztokem a vše bylo promícháno. Po dobu 30 – 40 min byly vzorky ponechány v lednici v kádince s vodou a ledem. Vzorky byly občasné promíchávány. Poté následovala centrifugace v chlazené centrifuze 15 min při 4 °C a 3 000 rpm. Po centrifugaci byl opatrně odebrán supernatant a sediment byl resuspendován v 10 – 15 ml 1 x PBS roztoku. Vzorky byly opět centrifugovány 15 min při 4 °C a 3 000 rpm. Supernatant byl opatrně odebrán a sediment byl resuspendován v 5 ml STE roztoku. Poté bylo přidáno 250 µl proteinázy K a 250 µl 10% SDS. Vzorky byly inkubovány v termostatu při 37 °C do druhého dne.

Druhý den bylo do každého vzorku přidáno 5 ml fenolu, po dobu 15 min byly vzorky opatrně promíchávány, poté byly umístěny na 5 min do ledu a následně centrifugovány po dobu 15 min při 3 000 rpm a teplotě 4 °C. Supernatant byl opatrně odebrán a přenesen do čisté Falconovy zkumavky. K supernatantu bylo přidáno 2,5 ml fenolu a 2,5 ml chloroformu a po dobu 15 min byly vzorky míchány. Po uplynulé době byly vzorky na 15 min umístěny na led a poté byly stejným způsobem centrifugovány. Supernatant byl odebrán a k sedimentu byl přidán 1 ml 70% etanolu, poté následovala centrifugace při 14 000 rpm po dobu 5 min při teplotě 4 – 8 °C. Supernatant byl opět odstraněn a vzorek byl krátce centrifugován po dobu 15 s při 10 000 rpm. Zbytek etanolu byl odstraněn Pasteurovou pipetou. Pelet DNA byl sušen 60 min při laboratorní teplotě. K vysušenému peletu byl přidán 10 mM TRIS pufr (100 – 800 µl) a pelet byl homogenizován na kývačce 2 – 3 dny při laboratorní teplotě.

4.6 Měření koncentrace DNA

Koncentrace izolované DNA byla měřena na přístroji NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer (NanoDrop Technologies, USA) a v případě potřeby byly vzorky naředěny 10mM Trisem pH 7.4 na požadovanou koncentraci 100 ng/µl.

4.7 MLPA

Denaturace DNA

Do 0,2 ml mikrozkušavek bylo napipetováno 5 μ l DNA v celkovém množství 100 -200 ng . Následně byly zkumavky umístěny do termocycleru na dobu 5 min při 98 °C. Po ochlazení teploty na 25 °C byly vzorky vytaženy z termocycleru.

Hybridizační reakce

Nejprve byl připraven hybridizační master mix pro každý vzorek smícháním 1,5 μ l MLPA pufru a 1,5 μ l probemixu obsahujícího směs hybridizačních prób. Hybridizační master mix byl zvortexován a přidán k denaturované DNA v množství 3 μ l. Poté byly vzorky opět vloženy do termocycleru, kde byly inkubovány 1 min při 95 °C a následně hybridizovány 16 – 20 hod při 60 °C.

Ligační reakce

Nejprve byl připraven ligační master mix smícháním pro každý vzorek 25 μ l TK vody, 3 μ l ligačního pufru A, 3 μ l ligačního pufru B, poté byl přidán 1 μ l enzymu ligázy-65. Připravený ligační master mix byl promíchán pouze pipetou, enzymy nikdy nesmí být vortexovány. Ligační master mix byl přidáván k jednotlivým vzorkům po 32 μ l při teplotě 54 °C přímo v termocycleru. Poté následovala inkubace 15 min při 54 °C a 5 min při 98 °C a následně byl při 20 °C přidán PCR master mix.

PCR reakce

Nejprve byl připraven polymerázový master mix smícháním 7,5 μ l TK vody, 2 μ l SALSA PCR primer mixu a 0,5 μ l SALSA polymerázy. Směs byla promíchána pouze pipetou a přidána ke vzorkům v termocycleru v množství 10 μ l. Poté proběhla PCR reakce: 35 cyklů – 30 sec při 95 °C; 30 sec při 60 °C; 60 sec při 72 °C. Následovalo 20 min při 72 °C a reakce byla poté zastavena při 15 °C.

Tab. IV: Teplotní profil pro MLPA reakci

Reakce	Teplota	Čas
Denaturace DNA	98 °C	5 min
	25 °C	pauza
Hybridizační reakce	95 °C	1 min
	60 °C	pauza
Ligační reakce	54 °C	pauza
	54 °C	15 min
	98 °C	5 min
	20 °C	pauza
PCR reakce (35 cyklů)	95 °C	30 s
	60 °C	30 s
	72 °C	60 s
Závěrečná reakce	72 °C	20 min
	15 °C	pauza

Kapilární elektroforéza

Po skončení PCR reakce byly vzorky vytaženy z termocycleru a krátce centrifugovány. Poté bylo do jednotlivých jamek mikrotitrační destičky rozpipetováno 9 μ l formamidu a 0,3 μ l markeru GeneTrace 500 ROX (Genomac, Praha) a nakonec bylo přidáno 0,7 μ l vzorku. Destička se vzorky byla krátce centrifugována a vložena do termocycleru na 3 min při 95 °C pro finální denaturaci vzorků. Následovalo ochlazení v ledu a separace PCR produktů na kapilární elektroforéze.

Vyhodnocení vzorků

Kvantitativní vyhodnocení jednotlivých vzorků bylo provedeno pomocí počítačového softwaru GeneMarker V1.85 (SoftGenetics LLC, USA) s využitím komerčních panelů (P144; P145; SoftGenetics LLC, USA) pro normalizaci. Plochy píků odpovídající množství PCR

produktu u pacientů byly porovnány s plochou píků u negativních kontrol. Hodnoty byly zaznamenány ve výsledném reportu.

5 VÝSLEDKY

Na Hemato-onkologické klinice (HOK) FN a LF UP v Olomouci jsem metodou MLPA vyšetřila 19 pacientů s diagnózou MDS. Spolupodílela jsem se na zavedení této metody do rutinní praxe. Ze skupiny 19 pacientů jsem pro vlastní vyhodnocení vybrala 5 nemocných, u kterých byl diagnostikován 5q minus syndrom. Vyšetření jsem provedla ze vzorků DNA připravených z buněk kostní dřeně nebo periferní krve z doby diagnózy.

Všichni pacienti byli v době diagnózy vyšetřeni v cytogenetické a molekulárně cytogenetické laboratoři HOK (laboratoř Prof. RNDr. Mgr. Marie Jarošové CSc.), kde byla provedena analýza chromozómů získaných z kostní dřeně pacientů včetně fluorescenční in situ hybridizace (FISH).

5.1 Výsledky analýzy u pacientů s 5q minus syndromem

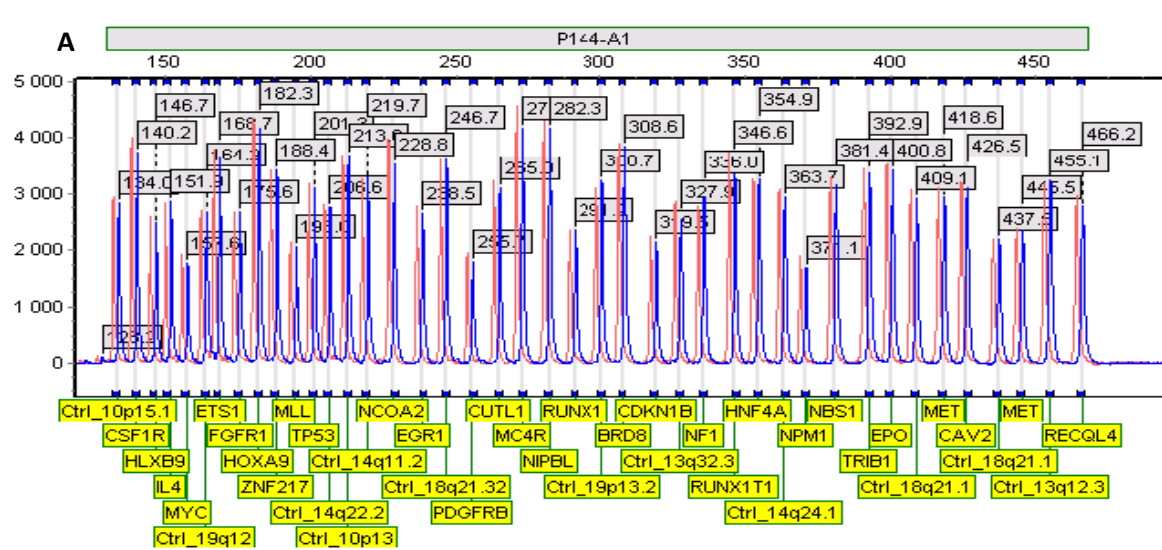
V souboru 19 pacientů, které jsem vyšetřila metodou MLPA, bylo pouze 5 nemocných, u kterých byl prokázán 5q minus syndrom (tab. V). Z těchto 5 pacientů byli 2 muži a 3 ženy. Všichni byli diagnostikováni na HOK FN Olomouc v letech 2008 – 2012. Věk pacientů v době diagnózy se pohyboval v rozmezí 62 – 73 let (medián 67 let). U nemocných se podíl buněk s delecí 5q31 segmentu zjištěný pomocí FISH pohyboval mezi 4.5 % (pacient č. 12) až po 91 % (pacient č. 15) (údaje poskytnuté laboratoří Prof. RNDr. Mgr. Marie Jarošové CSc., HOK).

Tab. V: Přehled pacientů s 5q syndromem, FISH

Pacient č.	Pohlaví	Věk	Subtyp MDS	FISH
8	Žena	65	RAEB II	delece oblasti 5q31 v 69 % buněk
11	Žena	69	RCMD	delece v oblasti 5q31 v 78 % buněk
12	Muž	62	MDS blíže nespec.	delece oblasti 5q31 v 4,5 % buněk, což je na hranici cut off pro použitou sondu
15	Muž	73	RAEBI/II	delece oblasti 5q31 v 91 % buněk + další cytogenetické změny
18	Žena	66	RAEB I	delece oblasti 5q31 v 34 % buněk

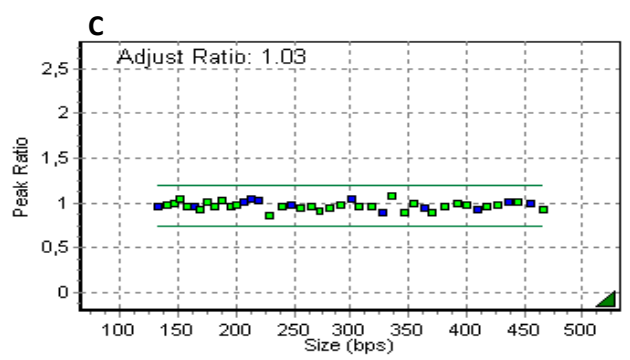
Legenda k tabulce: vysvětlení zkratk subtypů MDS viz kap. 2.2.2.1 a 2.2.2.2

Příklady testování normálních vzorků (vzorky s normálním genomem, s normálním počtem kopií genů) jsou uvedeny na obr. 6 (probemix P144-A2 MDS) a obr. 7 (probemix P145-A2 MDS). Normální vzorky byly testovány vůči referenčními DNA vzorkům, a jak je patrné z obr. 6 a obr. 7, skutečně nevykazovaly žádné změny počtu genových kopií. Výsledky MLPA byly vyhodnoceny jak je uvedeno výše v kapitolách 2.3 a 4.7.



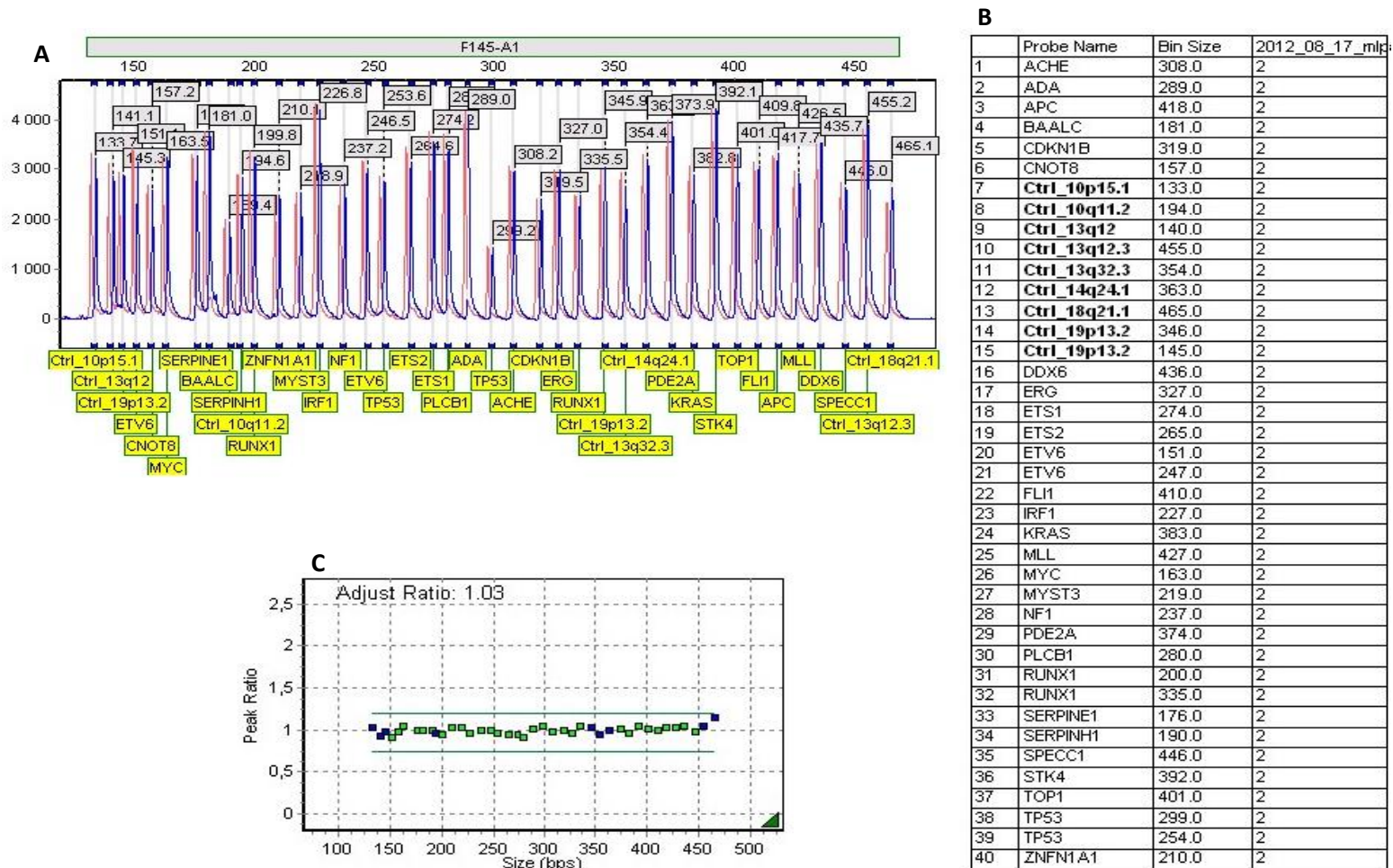
B

	Probe Name	Bin Size	2012_11_07_mlg
1	BRD8	308.0	2
2	CAV2	427.0	2
3	CDKN1B	319.0	2
4	CSF1R	140.0	2
5	CUTL1	265.0	2
6	Ctrl_10p13	213.0	2
7	Ctrl_10p15.1	133.0	2
8	Ctrl_13q12.3	455.0	2
9	Ctrl_13q32.3	328.0	2
10	Ctrl_14q11.2	219.0	2
11	Ctrl_14q22.2	206.0	2
12	Ctrl_14q24.1	364.0	2
13	Ctrl_18q21.1	437.0	2
14	Ctrl_18q21.1	409.0	2
15	Ctrl_18q21.32	247.0	2
16	Ctrl_19p13.2	301.0	2
17	Ctrl_19q12	164.0	2
18	EGR1	239.0	2
19	EPO	400.0	2
20	ETS1	168.0	2
21	FGFR1	175.0	2
22	HLXB9	146.0	2
23	HNF4A	355.0	2
24	HOXA9	182.0	2
25	IL4	151.0	2
26	MC4R	273.0	2
27	MET	418.0	2
28	MET	445.0	2
29	MLL	195.0	2
30	MYC	157.0	2
31	NBS1	381.0	2
32	NCOA2	229.0	2
33	NF1	336.0	2
34	NIPBL	282.0	2
35	NPM1	371.0	2
36	PDGFRB	256.0	2
37	RECQL4	466.0	2
38	RUNX1	291.0	2
39	RUNX1T1	347.0	2
40	TP53	201.0	2
41	TRIB1	393.0	2
42	ZNF217	188.0	2



Obr. 6: Počítačová analýza výsledků metody MLPA (probemix P144-A2 MDS) u negativního vzorku

A: elektroforetogram - píky odpovídající jednotlivým próbám pro detekci počtu kopií testovaných genů, modře je znázorněn vyšetřovaný negativní vzorek, červeně znázorněn kontrolní (referenční) vzorek. **B:** tabulka – normální počet kopií ve všech testovaných próbách (hodnoty píků odpovídají počtu 2 genové kopie). **C:** grafické znázornění normalizace.



Obr. 7: Počítačová analýza výsledků metody MLPA (probemix P145-A2 MDS) u negativního vzorku

A: elektroforetogram - píky odpovídající jednotlivým próbám pro detekci počtu kopií testovaných genů, modře je znázorněn vyšetřovaný negativní vzorek, červeně znázorněn kontrolní (referenční) vzorek. **B:** tabulka – normální počet kopií ve všech testovaných próbách (hodnoty píků odpovídají počtu 2 genové kopie). **C:** grafické znázornění normalizace.

Jednotlivé testované vzorky vyšetřovaných nemocných z tab. V pak byly testovány analogicky jako negativní vzorky. Opět byly použity oba **probemixy P144/P145-A2 MDS**. Výsledky těchto analýz, tj. zjištěné genové změny (delece) postihující geny, které leží v segmentu 5q31.1, jsou shrnuty v tab. VI. Na obr. 8 a obr. 9 jsou pak uvedeny příklady výstupů pro oba probemixy pro vybraného pacienta č. 18.

Tab. VI: Pacienti s 5q syndromem, MLPA

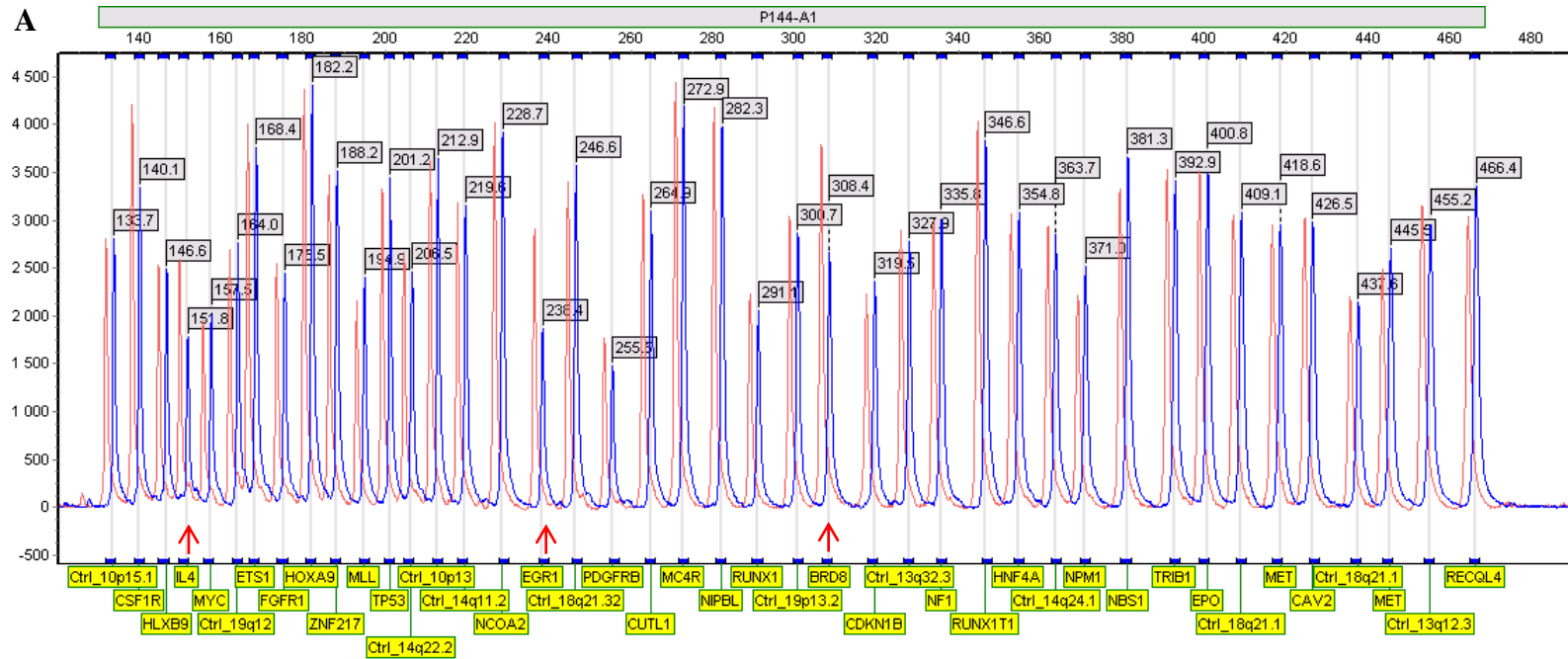
Próby MDS	Pacient č.				
	8	11	12	15	18
BRD8	DEL	DEL	OK	DEL	DEL
CSF1R	DEL	DEL	OK	DEL	OK
EGR1	DEL	DEL	OK	DEL	DEL
IL4	DEL	DEL	OK	DEL	DEL
NIPBL	OK	OK	OK	OK	OK
NPM1	OK	OK	OK	OK	OK
PDGFRB	OK	OK	OK	DEL	OK
APC	DEL	OK	OK	DEL	OK
CNOT8	DEL	DEL	OK	DEL	DEL
IRF1	DEL	OK	OK	DEL	OK

Legenda k tabulce:

žlutě jsou označené geny, které leží v lokusu 5q 31.1

DEL = delece

OK = fyziologický nález

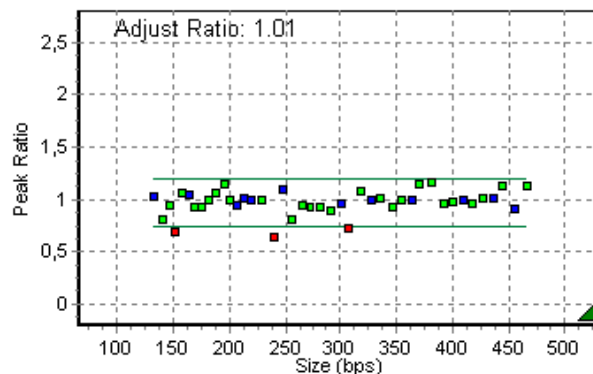


Obr. 8: Počítačová analýza výsledků metody MLPA (probemix P144-A2 MDS) u pacienta č. 18.

A: elektroforetogram - píky odpovídající jednotlivým próbám, modře je znázorněn vyšetřovaný vzorek, červeně je znázorněn kontrolní (referenční) vzorek. Šipky u jednotlivých píků (prób), které jsou nižší a značí delecii (menší dávka DNA).

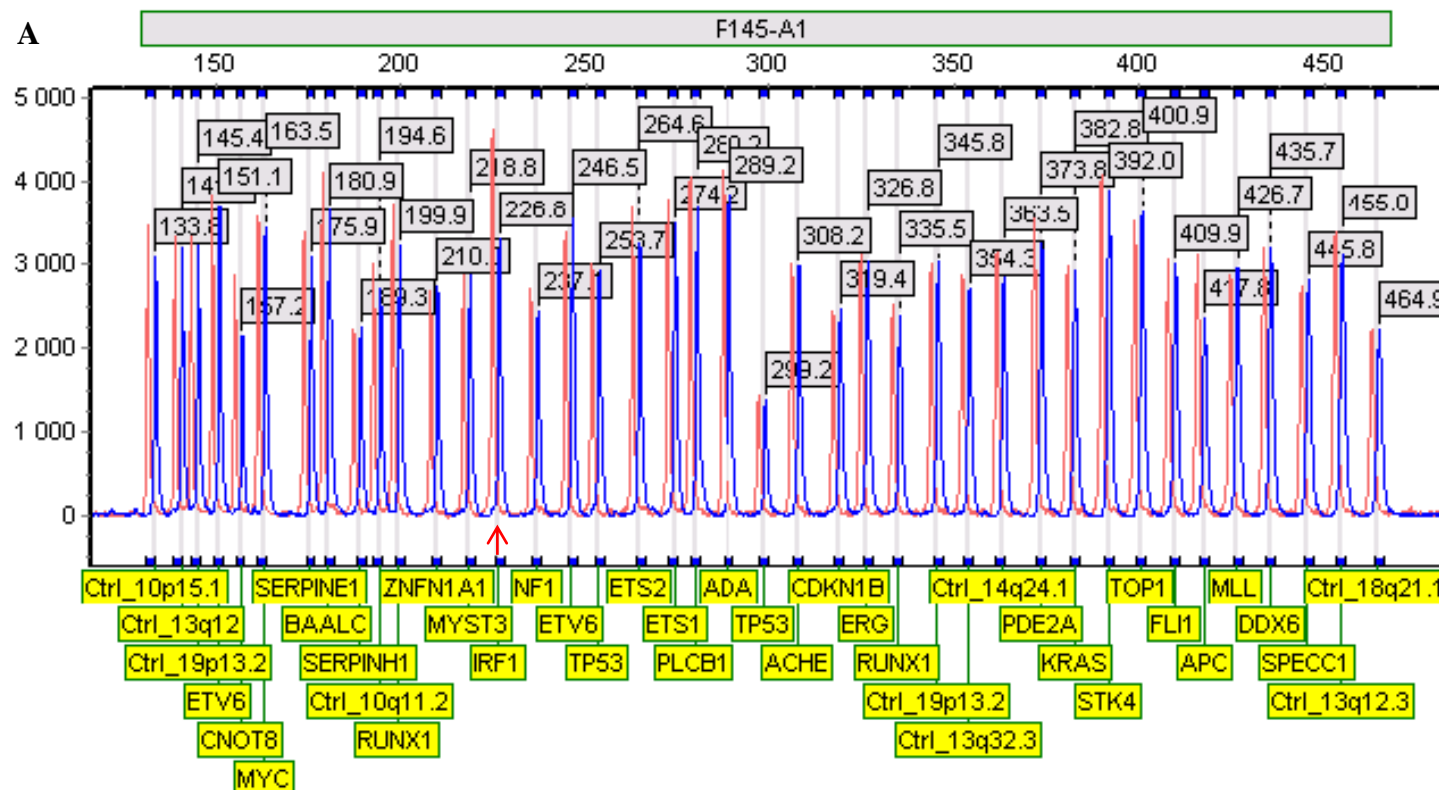
B**MLPA Analysis Summary**

	Probe Name	Size	# / Mean / SE	2012_11_28_ML PA_MDS_MD_F0 1_MDS1
1	BRD8	308.0	15 / 0.91 / 0.03	72%
2	CAV2	427.0	16 / 1.17 / 0.16	101%
3	CDKN1B	319.0	16 / 0.98 / 0.03	107%
4	CSF1R	140.0	15 / 0.96 / 0.04	81%
5	CUTL1	265.0	15 / 0.92 / 0.02	94%
6	Ctrl_10p13	213.0	16 / 1.12 / 0.13	101%
7	Ctrl_10p15	133.0	15 / 1.04 / 0.04	102%
8	Ctrl_13q12	455.0	16 / 0.94 / 0.04	91%
9	Ctrl_13q32	328.0	15 / 1.02 / 0.02	100%
10	Ctrl_14q11	219.0	16 / 1.13 / 0.13	99%
11	Ctrl_14q22	206.0	16 / 1.00 / 0.03	94%
12	Ctrl_14q24	364.0	16 / 1.02 / 0.05	100%
13	Ctrl_18q21	437.0	16 / 0.96 / 0.03	101%
14	Ctrl_18q21	409.0	16 / 0.96 / 0.03	100%
15	Ctrl_18q21	247.0	16 / 0.95 / 0.05	110%
16	Ctrl_19p13	301.0	16 / 1.13 / 0.08	97%
17	Ctrl_19q12	164.0	16 / 1.19 / 0.11	105%
18	EGR1	239.0	16 / 0.90 / 0.05	64%
19	EPO	400.0	16 / 0.95 / 0.04	97%
20	ETS1	168.0	16 / 0.95 / 0.03	93%
21	FGFR1	175.0	16 / 1.25 / 0.20	94%
22	HLXB9	146.0	16 / 1.38 / 0.43	94%
23	HNF4A	355.0	15 / 1.01 / 0.02	99%
24	HOXA9	182.0	16 / 0.97 / 0.04	100%
25	IL4	151.0	15 / 0.94 / 0.03	69%
26	MC4R	273.0	15 / 1.02 / 0.04	93%
27	MET	418.0	16 / 1.22 / 0.27	97%
28	MET	445.0	16 / 0.99 / 0.03	113%
29	MLL	195.0	15 / 1.04 / 0.03	115%
30	MYC	157.0	16 / 1.19 / 0.16	107%
31	NBS1	381.0	16 / 1.00 / 0.04	116%
32	NCOA2	229.0	16 / 0.94 / 0.05	100%
33	NF1	336.0	16 / 0.99 / 0.02	101%
34	NIPBL	282.0	16 / 0.97 / 0.04	92%
35	NPM1	371.0	16 / 1.26 / 0.26	116%
36	PDGFRB	256.0	16 / 1.02 / 0.05	81%
37	RECQL4	466.0	16 / 1.07 / 0.03	113%
38	RUNX1	291.0	15 / 1.04 / 0.04	90%
39	RUNX1T1	347.0	16 / 1.14 / 0.20	94%
40	TP53	201.0	16 / 1.02 / 0.04	100%
41	TRIB1	393.0	16 / 0.95 / 0.06	97%
42	ZNF217	188.0	15 / 0.98 / 0.02	106%

C

Obr. 9: Počítačová analýza výsledků metody MLPA (probemix P144-A2 MDS) u pacienta č. 18.

B: tabulka – nižší procento u úseků DNA detekovaných jednotlivými specifickými próbami značí možnou delecí. **C:** počítačové grafické vyznačení počtu genových kopií jednotlivých cílových sekvencí použitých prób, po normalizaci s kontrolními DNA úseky (modře). Tři červené body označují tři potenciálně deletované úseky, zeleně jsou vyznačeny úseky, které po normalizaci nevykazují rozdíly v počtu detekovaných DNA kopií ve srovnání s kontrolním vzorkem.



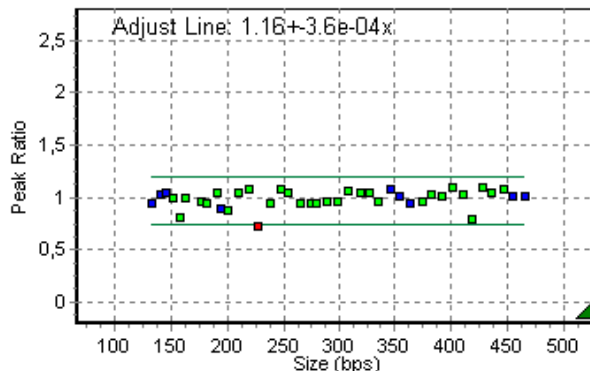
Obr. 10: Počítačová analýza výsledků metody MLPA (probemix P145-A2 MDS) u pacienta č. 18. A: elektroforetogram - píky odpovídající jednotlivým próbám, modře znázorněn vyšetřovaný vzorek, červeně znázorněn kontrolní (referenční) vzorek. Měří se plocha získaných píků. Šipka u píku (próby), jehož vrchol je nižší a značí delecii (menší počet kopií cílové DNA sekvence ve vyšetřovaném vzorku).

B

MLPA Analysis Summary

	Probe Name	Size	# / Mean / SE	2012_11_28_MLPA_MDS_MD_F03_MDS2_██████
1	ACHE	308.0	14 / 1.03 / 0.03	106%
2	ADA	289.0	14 / 0.93 / 0.02	97%
3	APC	418.0	14 / 0.94 / 0.04	80%
4	BAALC	181.0	15 / 1.13 / 0.07	94%
5	CDKN1B	319.0	15 / 0.91 / 0.06	105%
6	CNOT8	157.0	14 / 1.01 / 0.04	80%
7	Ctrl_10p15	133.0	15 / 1.01 / 0.02	95%
8	Ctrl_10q11	194.0	14 / 0.96 / 0.02	89%
9	Ctrl_13q12	140.0	14 / 1.02 / 0.01	103%
10	Ctrl_13q12	455.0	13 / 1.09 / 0.05	101%
11	Ctrl_13q32	354.0	14 / 1.03 / 0.02	101%
12	Ctrl_14q24	363.0	15 / 1.15 / 0.12	95%
13	Ctrl_18q21	465.0	13 / 0.91 / 0.03	102%
14	Ctrl_19p13	346.0	14 / 1.07 / 0.05	108%
15	Ctrl_19p13	145.0	14 / 1.03 / 0.02	104%
16	DDX6	436.0	15 / 0.94 / 0.07	105%
17	ERG	327.0	15 / 1.19 / 0.14	104%
18	ETS1	274.0	14 / 1.00 / 0.03	95%
19	ETS2	265.0	14 / 1.04 / 0.04	94%
20	ETV6	151.0	14 / 0.99 / 0.02	99%
21	ETV6	247.0	14 / 0.98 / 0.03	107%
22	FLI1	410.0	14 / 0.98 / 0.02	103%
23	IRF1	227.0	14 / 0.95 / 0.04	73%
24	KRAS	383.0	14 / 0.96 / 0.03	104%
25	MLL	427.0	14 / 0.96 / 0.03	110%
26	MYC	163.0	14 / 0.99 / 0.01	100%
27	MYST3	219.0	14 / 1.01 / 0.03	108%
28	NF1	237.0	14 / 0.97 / 0.04	95%
29	PDE2A	374.0	14 / 0.99 / 0.02	96%
30	PLCB1	280.0	14 / 0.98 / 0.03	95%
31	RUNX1	200.0	15 / 1.09 / 0.09	87%
32	RUNX1	335.0	14 / 1.00 / 0.02	97%
33	SERPINE1	176.0	15 / 0.97 / 0.06	97%
34	SERPINH1	190.0	14 / 1.02 / 0.02	105%
35	SPECC1	446.0	15 / 1.14 / 0.15	109%
36	STK4	392.0	14 / 1.00 / 0.02	101%
37	TOP1	401.0	14 / 0.93 / 0.05	109%
38	TP53	299.0	14 / 1.05 / 0.03	97%
39	TP53	254.0	14 / 0.98 / 0.02	105%
40	ZNFN1A1	210.0	14 / 0.95 / 0.03	105%

C



Obr. 11: Počítačová analýza výsledků metody MLPA (probemix P145-A2 MDS) u pacienta č. 18.

B: tabulka – nižší procento u úseků DNA detekovaných jednotlivými specifickými próbami značí možnou delecí. **C:** počítačové grafické vyznačení počtu genových kopií jednotlivých cílových sekvencí použitých prób, po normalizaci s kontrolními DNA úseky (modře).

Červený bod označuje potenciálně deletovaný úsek, zeleně jsou vyznačeny úseky, které po normalizaci nevykazují rozdíly v počtu detekovaných DNA kopií ve srovnání s kontrolním vzorkem.

6 DISKUZE

V této práci jsme vycházeli z pracovní hypotézy, že relativně nová technologie molekulární diagnostiky, označovaná jako MLPA, může sloužit jako komplementární diagnostický nástroj v molekulárně-genetické charakterizaci vybraných pacientů s MDS. V průběhu řešení bakalářské práce jsme vyšetřili technologií MLPA 19 nemocných s MDS, léčených na Hemato-onkologické klinice LF FN Olomouc. Konkrétně jsme se podrobně zabývali vyhodnocením výsledků u 5 z vyšetřených nemocných, kteří byli zařazeni na základě předchozích analýz do diagnostické skupiny MDS s izolovanou delecí 5q (5q- syndrom).

SALSA MLPA probemix P144-A2 MDS a P145-A2 MDS (MRC-Holland) umožňuje odhalit změny v počtu genových kopií (u 5q- syndromu se jedná o delecii jedné genové kopie vedoucí k haploinsuficienci) jen některých genů, které jsou implikovány v patogenezi 5q minus syndromu. V lokusu 5q31.1 jsou z analyzovaných genů lokalizovány BRD8, EGR1, IL4 a IRF1 (kap. 5.1, tab. VI). Zásadní význam pro fenotyp 5q- syndromu je přisuzován haploinsuficienci EGR1 (viz kap. 2.2.5.1). EGR1 delece jedné genové kopie (haploinsuficience) byla prokázána v DNA čtyř z pěti hodnocených pacientů; u pacienta č. 12 MLPA neodhalila nejen EGR1 delecii, ale ani delecii žádného dalšího genu v 5q31.1 segmentu. Tuto skutečnost si vysvětlujeme nízkým zastoupením nádorových buněk s cytogeneticky (FISH) prokázanou delecí 5q31.1 ve vyšetřovaném vzorku kostní dřeně (jen 4.5 %); takto nízké zastoupení nebylo možné zachytit ve vyšetřované DNA technologií MLPA. MLPA umožňuje analýzu změny počtu kopií genových sekvencí na základě porovnání počtu detekovaných genových kopií v kontrolních genech DNA celého vzorku, nikoliv změny počtu kopií na úrovni jednotlivých buněk. Druhé nejnižší zastoupení nádorového klonu s 5q delecí ve vyšetřovaném materiálu bylo 34 % u pac. č. 18; toto zastoupení již umožnilo zachycení delece jedné kopie příslušných genů (kap. 5.1, tab. V, tab. VI).

Další kandidátní geny, jejichž haploinsuficience je pravděpodobně zodpovědná za fenotyp 5q- syndromu, jako je RPS14, nejsou probami v SALSA MLPA probemix P144-A2 MDS a P145-A2 MDS detekovatelné. Použité kity MLPA pro MDS proto nejsou vhodné pro výzkumnou analýzu genetických příčin resp. genetické variability MDS, vč. MDS s izolovanou delecí 5q.

Praktická analýza nádorové DNA od 5 nemocných tedy ukázala, že MLPA může poskytnout informace o některých diagnosticky a prognosticky významných genech u 5q- syndromu, které se nacházejí na chromosomovém úseku 5q, a že může být u některých

nemocných vhodnou doplňující metodou sloužící pro verifikaci diagnózy. Limitem metody je nutnost dostatečného zastoupení nádorové DNA (resp. zastoupení nádorového klonu s 5q delecí) ve vyšetřovaném materiálu.

7 ZÁVĚR

Cílem bakalářské práce bylo shrnutí poznatků o myelodysplastickém syndromu, praktické zvládnutí a zavedení nové metody MLPA do rutinního provozu na HOK FN v Olomouci.

V této práci jsou obsaženy dostupné informace o hematopoéze, MDS a jeho klasifikaci, patogenezi, léčbě a molekulárně genetických abnormalitách.

Pomocí metody MLPA byla provedena analýza vzorků krve a kostní dřeně souboru 19 pacientů s MDS. Z tohoto souboru byl u 5 pacientů zjištěn 5q minus syndrom. Tyto výsledky byly následně porovnány s výsledky získanými z cytogenetické laboratoře HOK FN v Olomouci.

Na základě zjištěných výsledků usuzuji, že metoda MLPA má jen omezený potenciál v rutinním laboratorním vyšetření myelodysplastického syndromu, samostatné výsledky získané metodou MLPA nejsou bez dalších diagnostických dat získaných jinými přístupy dostatečně přínosné.

8 LITERATURA

8.1 Vědecké publikace

Abdel-Wahab, O., Adli, M., LaFave, L.M., Gao, J., Hricik, T., Shih, A.H., Pandey, S., Patel, J.P., Chung, Y.R., Koche, R., Perna, F., Zhao, X., Taylor, J.E., Park, C.Y., Carroll, M., Melnick, A., Nimer, S.D., Jaffe, J.D., Aifantis, I., Bernstein, B.E., Levine, R.L., (2012): ASXL1 mutations promote myeloid transformation through loss of PRC2-mediated gene repression. *Cancer Cell* 22(2):180 - 93.

Bělohávková, P., Neuwirtová, R., Čermák, J., Vondráková, J., Vozolubová, V., Krejčí, M., Seifertová, N., Maturová, M., Kadlčková, E., Smolíková, A., Šumná, E., Kessler, P., Mandáková, E., Polonyová, E., Libiger, J., Krejčová, H., Mužík, J., Voglová, J., Malý, J. (2009): Sekundární myelodysplastický syndrom: retrospektivní analýza dat z registru České pracovní MDS skupiny. *Transfúze a Hematologie Dnes* 15(4): 237 - 243.

Bulíková, A. (2000): Krvetvorba. In: Lexová, S., Bourková, L., Bulíková, A., Jarošová, M., Krahulcová, E.: *Hematologie pro zdravotní laboranty*, pp. 13 - 21, Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví v Brně, Brno.

Čermák, J. (2010): Myelodysplastický syndrom - novinky v diagnostice a léčbě. *Postgraduální Medicína* 12(6): 712 - 719.

Čermák, J. (2012): Myelodysplastický syndrom. Pokroky v diagnostice a léčbě během 30 let trvání registru nemocných s myelodysplastickým syndromem v ÚHKT. *Vnitřní Lékařství* 58(Suppl 2): 2S8 – 2S15.

Čermák, J., Vitek, A., Michalová, K., Březinová, J., Zemanová, Z. (2005): Myelodysplastický syndrom v novém tisíciletí. Jak klasifikovat a jak léčit nemocné? *Vnitřní Lékařství* 51(1): 20 - 30.

Červinek, L. (2010): Léčba nemocných s myelodysplastickým syndromem s nižším rizikem – imunomodulační léčba lenalidomem. In: Myelodysplastický syndrom a jeho léčba. Farmakoterapie 6 (monografie), pp. 25 - 27, Farmakon Press, Praha.

Červinek, L. (2011): Myelodysplastický syndrom. Postgraduální medicína 13(3): 338 – 343.

Davids, M. S., Steensma, D. P. (2010): The molecular pathogenesis of myelodysplastic syndromes. *Cancer Biology & Therapy* 10(4): 309 - 319.

Divoký V., Takáčová S., Priwitzerová M., Prchal J. T. (2002): Odhalování molekulární patofyziologie myeloproliferativních chorob: cílená mutageneze v embryonálních kmenových buňkách. *Transfuze a hematologie dnes* 8 (4), 145-148.

Dzierzak, E., Medvinsky, A., Bruijn, M. (1998): Qualitative and quantitative aspects of haematopoietic cell development in the mammalian embryo. *Immunology Today* 19(5):228-36.

Ebert, B. L., Pretz, J., Bosco, J., Chang, C. Y., Tamayo, P., Galili, N., Raza, A., Root, D. E., Attar, E., Ellis, S. R., Golub, T. R. (2008): Identification of RPS14 as a 5q- syndrome gene by RNA interference screen. *Nature* 451: 335-339.

Greenberg, P. L. (1998): Apoptosis and its role in the myelodysplastic syndromes: implications for disease natural history and treatment. *Leukemia Research* 22: 1123 – 1136.

Holmfeldt, L., Mullighan, C. G. (2011): The role of TET2 in hematologic neoplasms. *Cancer Cell* 20(1):1-2.

Hömig-Hölzel, C., Savola, S. (2012): Multiplex Ligation-dependent probe amplification (MLPA) in tumor diagnostics and prognostics. *Diagnostic Molecular Pathology* 21(4): 189 – 206.

Jonášová, A. (2009a): Novinky v terapii nízké rizikových nemocných s myelodysplastickým syndromem. *Transfuze a Hematologie Dnes* 15(2): 114 - 120.

Jonášová, A. (2009b): Zkušenosti s chelatační léčbou u myelodysplastického syndromu. *Farmakoterapie* 5(3): 315 - 318.

Jonášová, A. (2010a): Zásady léčby nemocných s časnými formami MDS. In: *Myelodysplastický syndrom a jeho léčba. Farmakoterapie 6 (monografie)*, pp. 12 - 15, Farmakon Press, Praha.

Jonášová, A. (2010b): Terapie pacientky s myelodysplastickým syndromem s přetížáním železem perorálním chelátorem deferasiroxem. *Farmakoterapie* 6(3): 263 - 266.

Jonášová, A. (2010c): Současné přístupy v léčbě nemocných s MDS s vyšším rizikem. In: *Myelodysplastický syndrom a jeho léčba. Farmakoterapie 6 (monografie)*, pp. 28 - 33, Farmakon Press, Praha.

Joslin, J.M., Fernald, A.A., Tennant, T.R., Davis, E.M., Kogan, S.C., Anastasi, J., Crispino, J.D., Le Beau, M.M., (2007): Haploinsufficiency of EGR1, a candidate gene in the del(5q), leads to the development of myeloid disorders. *Blood* 110(2):719-26.

Kaushansky, K. (2010): Hematopoietic stem cells, progenitors, and cytokines. In: *Williams Hematology* (ed. K. Kaushansky, L.M., Kipps TJ, Beutler E, Seligsohn U and Prchal JT.) pp. 231-250, McGraw Hill, New York.

Liesveld, J.L., Lichtman, M.A. (2010): Myelodysplastic Syndromes (Clonal Cytopenias and Oligoblastic Myelogenous Leukemia). In *Williams Hematology* (ed. K. Kaushansky, L.M., Kipps TJ, Beutler E, Seligsohn U and Prchal JT.) pp. 1249-1276, McGraw Hill, New York.

Málek, F. (2005): Myelodysplastický syndrom – pohled internisty. *Interní Medicína pro Praxi* 2: 65 - 69.

Marková, M. (2010): Transplantační léčba pacientů s myelodysplastickým syndromem. In: Myelodysplastický syndrom a jeho léčba. Farmakoterapie 6 (monografie), pp. 34 - 36, Farmakon Press, Praha.

Matsuda, I., Naito, Y., Arai, K., Arai, N. (1993): The structure of the IL4 gene and regulation of its expression. *Research in Immunology* 144(8): 569 – 575.

Moran-Crusio, K., Reavie, L., Shih, A., Abdel-Wahab, O., Ndiaye-Lobry, D., Lobry, C., Figueroa, M.E., Vasanthakumar, A., Patel, J., Zhao, X., Perna, F., Pandey, S., Madzo, J., Song, C., Dai, Q., He, C., Ibrahim, S., Beran, M., Zavadil, J., Nimer, S.D., Melnick, A., Godley, L.A., Aifantis, I., Levine, R.L. (2011): Tet2 loss leads to increased hematopoietic stem cell self-renewal and myeloid transformation. *Cancer Cell* 20(1):11-24.

Mufti, G. J. (2004): Pathobiology, classification, and diagnosis of myelodysplastic syndrome. *Best Practise & Research Clinical Hematology* 17: 543-557.

Neuwirtová, R. (2005): Myelodysplastický syndrom: Onkohematologické onemocnění vyššího věku. *Česká Geriatrická Revue* 3(2): 21 - 28.

Neuwirtová, R. (2010): Myelodysplastický syndrom – historie, klasifikace, epidemiologie; novinky v patogenezi z posledních let. In: Myelodysplastický syndrom a jeho léčba. Farmakoterapie 6 (monografie), pp. 3 - 7, Farmakon Press, Praha.

Pecka, M. (2002). Krvetvorba. In: Pecka, M.: Laboratorní hematologie v přehledu: Buňka a krvetvorba, pp. 68 - 95, Finidr, Český Těšín.

Shih, A. H., Levine, R. L. (2011): Molecular biology of myelodysplastic syndromes. *Seminars in Oncology* 38(5): 613 - 620.

Starczynowski, D. T., Kuchenbauer, F., Argiropoulos, B., Sung, S., Morin, R., Muranyi, A., Hirst, M., Hogge, D., Marra, M., Wells, R. A., Buckstein, R., Lam, W., Humphries, R. K.,

Karsan, A. (2010): Identification of miR-145 and miR-146a as mediators of the 5q- syndrome phenotype. *Nature Medicine* 16: 49 - 58.

Stuppia, L., Antonucci, I., Palka, G., Gatta, V. (2012). Use of the MLPA assay in the molecular diagnosis of gene copy number alterations in human genetic diseases. *International Journal of Molecular Sciences* 13(3): 3245 - 3276.

Tefferi, A., Vardiman, J.W. (2009): Myelodysplastic syndromes. *The New England Journal of Medicine* 361(19): 1872 – 1885.

Tiu, R. V., Visconte, V., Traina, F., Schwandt, A., Maciejewski, J. P. (2011): Updates in cytogenetics and molecular markers in MDS. *Current Hematologic Malignancy Reports* 6(2): 126 - 135.

Voglová, J. (2010): Principy léčby myelodysplastického syndromu. In: *Myelodysplastický syndrom a jeho léčba. Farmakoterapie 6 (monografie)*, pp. 8 - 11, Farmakon Press, Praha..

Weissman, I. L., Anderson, D. J., Gage, F. (2001): Stem and progenitor cells: origins, phenotypes, lineage commitments, and transdifferentiations. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* (17): 387 - 403.

Yan, S-F., Fujita, T., Lu, J., Okada, K., Zou, Y.S., Mackman, N., Pinsky, D.J., Stern, D.M. (2000): Egr-1, a master switch coordinating upregulation of divergent gene families underlying ischemic stress. *Nature Medicine* 6: 1355 - 1361.

Židková, M., Voglová, J., Bělohávková, P., Vrbacký, F. (2010): Novinky v klasifikaci MDS a stanovení prognózy dle WPSS. *Transfuze a Hematologie Dnes* 16(1): 42 - 46.

8.2 Internetové zdroje

ULR: <<http://www.linkos.cz/myelodysplasticky-syndrom-2/o-myelodysplastickem-syndromu/>> [cit. 2013-3-19]

ULR: <<http://www.d.umn.edu/~jfitzake/Lectures/DMED/CytAnt/Cytokines/HematopoieticAgents.html>> [cit. 2013-2-23]

URL: <<http://www.biogen.cz/mlpa-kity>>

8.3 Firemní návody

SALSA® MLPA® probemix P144/P145 Product description, MRC-Holland, Amsterdam, 2013, 9 stran.

9 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

AML	akutní myeloidní leukémie
bp	base pair; páry bází
CD	cluster of differentiation; diferenciační antigen
CDR	common deleted region
G-CFS	granulocyte colony forming stimulating factor; růstový faktor pro granulocyty
GM-CFS	granulocyte-macrophage colony forming stimulating factor; růstový faktor pro
M-CFS	
BFU-E	Burst Forming Unit - Erythroid; velmi časná fáze vývoje červené krvinky
CFU	Colony Forming Unit; progenitorová kmenová buňka
CFU-Ba	Colony Forming Unit – Basophil; progenitorová kmenová buňka, z níž vznikají bazofily
CFU-E	Colony Forming Unit - Erythroid; progenitorová kmenová buňka, z níž vzniká červená krevní řada
CFU-Eo	Colony Forming Unit - Eosinophil; progenitorová kmenová buňka, ze které vznikají eozinofily
CFU-G	Colony Forming Unit - Granulocyte; progenitorová kmenová buňka, z níž vznikají granulocyty
CFU-GEMM	Colony Forming Unit, G - granulocyte, E - erythrocyte, M - macrophage, M - megakaryocyte; progenitorové kmenové buňky, z nichž vznikají buňky myelopoézy
CFU-GM	Colony Forming Unit - Granulocyte Macrophage; bipotentní kmenová buňka pro makrofágovou a granulocytární řadu
CFU-M	Colony Forming Unit - Monocyte; progenitorová kmenová buňka, z níž vznikají buňky monocytární řady
CFU-Meg	Colony Forming Unit - Megakaryocyte; progenitorová kmenová buňka, z níž vznikají buňky megakaryocytové řady
CGH	komparativní genomová hybridizace
CMML	chronická myelomonocytární leukémie

CSF	Colony Stimulating Factor
DEL	delece
DNA	deoxyribonukleová kyselina
FAB klasifikace	Francouzsko-americko-britská klasifikace
FISH	fluorescenční in situ hybridizace
FN	fakultní nemocnice
HOK	Hemato-onkologická klinika Fakultní nemocnice v Olomouci
HSCs	Hematopoetic Stem Cells; hematopoetické kmenové buňky
IPSS	International Prognostic Scoring System; Mezinárodní Prognostický Skórovací systém
LTC-IC	Long-Term Culture-Initiating Cell; dlouhodobá kultura krvetvorných buněk
MAPK	mitogenem aktivovaná proteinkináza
MDS	myelodysplastický syndrom
MLPA	Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification
PBS	fosfátový fyziologický roztok
PCR	polymerázová řetězová reakce
RA	refraktory anemia; refrakterní anémie
RAEB	Refraktory anemia with excess of blasts; refrakterní anémie s nadbytkem blastů
RAEB-T	Refraktory anemia with excess of blasts in transformation; refrakterní anémie s nadbytkem blastů v transformaci
RARS	Refractory anemia with ring sideroblasts; refrakterní anémie se zmnožením prstenčitých sideroblastů
RCMD	Refractory cytopenia with multilineage dysplasia; refrakterní cytopenie s multilineární dysplazií
RCUD	Refractory anemia with unilineage dysplasia; refrakterní cytopenie s unilineární dysplazií
MDS –U	Unclassifiable myelodysplastic syndromes; neidentifikovatelný myelodysplastický syndrom
SCF	Stem Cell Factor
WHO	World Health Organization; Světová zdravotnická organizace

WPSS

WHO Classification Based Prognostic Scoring System; Prognostický systém podle Světové zdravotnické organizace