

PROFILOVÁNÍ GENOVÉ EXPRESU U MNOHOČETNÉHO MYELOMU.

GENE EXPRESSION PROFILING IN MULTIPLE MYELOMA.

DUDOVÁ S.^{1,2}, BÁRTOVÁ E.³, POUR L.^{1,2,4}, KREJČÍ J.², HÁJEK R.^{1,2,4}

¹ LEHABI (LABORATORY OF EXPERIMENTAL HEMATOLOGY AND IMMUNOTHERAPY)
ODDĚLENÍ KLINICKÉ HEMATOLOGIE FN BRNO

² LÉKAŘSKÁ FAKULTA MU BRNO

³ BIOFYZIKÁLNÍ ÚSTAV AKADEMIE VĚD ČESKÉ REPUBLIKY

⁴ INTERNÍ HEMATOONKOLOGICKÁ KLINIKA FN BRNO

Souhrn

V našem sdělení chceme informovat o použití dvou metodik ke studiu molekulárně genetické problematiky mnohočetného myelomu (MM). Prvně zmíníme využití DNA čipů (microarrays) a ve druhé části se zaměříme na chromatinovou imunoprecipitaci v analýzách epigenetických změn genů. Obě metodiky náš výzkumný tým používá, a proto představíme i první výstupy. Využití obou metodik je u MM stejné jako u všech ostatních nádorů. Představují možnost studia patogeneze maligních onemocnění na molekulární úrovni, klasifikaci jinak neodlišitelných prognostických skupin choroby, predikci léčebné odpovědi na daný terapeutický zásah a identifikaci možných molekulárních cílů protinádorové terapie.

Klíčová slova: DNA čipy, profil genové exprese, chromatinové imunoprecipitace, mnohočetný myelom.

Summary

This review informs about utilization of two methods used in molecular examination in multiple myeloma on genomic level: DNA microarrays and chromatin immunoprecipitation. The profit of both methods is very similar in myeloma as well as in other cancers. They allow to study disease pathogenesis, generate new disease classification, and try to predict effect of therapy. Also, they are used to find the new potential target of therapy in multiple myeloma.

Key words: DNA microarray, gene expression profile, chromatin immunoprecipitation, multiple myeloma.

DNA čipy u mnohočetného myelomu.

Profilování genové exprese fyziologické a maligní plasmatické buňky.

Genová exprese je určována nejenom faktory prostředí, ale rovněž genetickým pozadím. Proto byla metoda DNA čipů použita při srovnání profilů genové exprese (PGE) CD138+ buněk získaných z kostní dřeně pacienta s MM a CD138+ plasmatických buněk geneticky identického dvojčete. V CD138+ buňkách MM byla zjištěna zvýšená exprese u 296 genů, naopak snížená hladina transkriptů byla detekována u 103 genů, ve srovnání s fyziologickými plasmatickými buňkami (FPB) dvojčete (1).

Davies a kolektiv využili DNA čipovou analýzu k identifikaci procesů účastnících se při transformaci FPB na buňky monoklonální gamapatie nejasného významu (MGUS) a mnohočetnému myelomu. Sledováním genů, které vykazovaly velkou variabilitu mezi vzorky byly definovány dvě skupiny pacientů: kontrolní a MGUS/MM. Analýza prokázala 263 genů odlišně exprimovaných mezi buňkami MGUS a FPB, a 380 genů s odlišnou expresí mezi buňkami MM a FPB, ze kterých bylo 197 genů společných s první skupinou. Pouze u 74 genů byla zjištěna odlišná míra transkripce mezi buňkami MGUS a MM. Tato zjištění naznačují, že mezi MGUS a MM jsou menší rozdíly než mezi fyziologickým protějškem a MM nebo MGUS. Mezi geny s rozdílnou expresí převládaly: onkogeny, tumor supresorové geny, geny podílející se na signální transdukci, geny kódující vazebné proteiny a transkripční faktory DNA a geny podílející se na diferenciaci buňky (2). Profilování genové exprese tak nám pomáhá odhalovat genetické

změny probíhající v průběhu transformace FPB na buňku MGUS a MM (2-5). Sekvenování variabilní oblasti genů pro imunoglobuliny prokázalo, že plasmatické buňky od jednotlivých pacientů s MGUS vykazují intraklonální variabilitu, která ovšem není pozorována u myelomových buněk (6). Tato data jsou v souladu se zjištěním, že plasmatické buňky MGUS kontinuálně podléhají somatickým hypermutacím, zatímco u MM je jeden klon plasmatických buněk dominantní a expanduje v kostní dřeni.

Další studie prokázala celkem 156 genů se zvýšenou expresí v souvislosti s výskytem translokací t(4;14)(p16;q32), nebo t(11;14)(q13;q32). Získaná data umožňují rozdělit MM do čtyř odlišných podskupin: MM1, MM2, MM3 a MM4. Skupina MM4 má molekulární znaky jako buňky rychle proliferujících buněčných linií MM. Skupina MM1 nese znaky MGUS. Nejvýznamnější rozdíly v expresi mezi MM1 a MM4 byly nalezeny u genů, jejichž produkty se podílí na buněčném cyklu a metabolismu DNA. Jejich vysoká exprese byla detekována právě ve skupině MM4, u které je častěji detekován abnormální karyotyp a zvýšená hladina sérového κ -2-microglobulinu. Tyto parametry jsou v klinické praxi spojovány se špatnou prognózou (7).

Molekulární klasifikace MM na základě profilování genové exprese.

Plasmatické buňky byly dříve považovány za homogenní populaci terminálních stadií B-lymfocytů. Někteří autoři soudí, že MM buňky představují terminálně diferenciované potomstvo transformovaného B-lymfocyty. Poslední fenoty-

pové analýzy a profily genové exprese prokázaly, že plazmatické buňky izolované z určitých orgánů mohou patřit k odlišným stádiím svého vývoje (8,9). Mnohočetný myelom by tak představoval spektrum onemocnění s molekulárními otisky, které ukazují na jejich původ v odlišných stádiích vývoje pozdního B-lymfocyty. Alizadeh a kolektiv prokázali podobnou situaci u difuzního velkobuněčného B-lymfocytárního lymfomu (DLBCL), který v histopatologickém obraze představuje jednu diagnostickou jednotku, přičemž na molekulární úrovni může být rozdělen na dva základní podtypy: DLBCL vycházející z B-lymfocytů zárodečného centra (Germinal-centre B-cell like DLBCL) a z antigenem aktivovaných mitoticky aktivních B-lymfocytů

Activated B-cell like DLBCL) (10). Profilování genové exprese bylo použito rovněž pro odlišení pozdních stádií diferenciace B-lymfocytů, kdy byly identifikovány geny regulující časnou fázi buněčné diferenciace (*early-stage differentiation genes*, EDG), kdy dochází k přechodu nezralých B-lymfocytů do tzv. „tonsillar B-cells“, a geny pozdní fáze diferenciace (*late-stage differentiation genes*, LDG), které charakterizují přeměně „tonsillar B-cells“ na plazmatické buňky kostní dřeně (11, 12). Buňky MM vykazovaly variabilní expresi řady EDG a LDG genů. Na základě variability exprese EDG a LDG genů bylo stanoveno, že již dříve definované podtypy MM1 až MM4 mohou být přiřazeny k některé z „vývojových“ řad plazmatické buňky. Podtyp MM4 je z buněk podobných „tonsillar B-cells“. Podtyp MM3 je rovněž spojen s „tonsillar B-cells“, ale naopak MM2 sdílí podobnost s plazmatickými buňkami kostní dřeně. Tato data potvrzují hypotézu, že MM může být odvozen z buněk maligně transformovaných v různých stádiích vývoje. Funkční spektrum genů ze skupiny EDG bylo širší, než v případě LDG, a zahrnovalo geny, jejichž proteiny se účastní v procesech adheze, transkripce, vnitrobuněčné signální transdukce a metabolismu. Pouze několik málo genů bylo spojeno s buněčnou proliferací.

Vliv chromosomálních aberací na genovou expresi

V souvislosti s tzv. „genomovým chaosem“ myelomové buňky Shaughnessy a kolektiv sledovali ploiditu u MM buněk s abnormálními karyotypy (11). U 10% pacientů byla nalezena trizomie chromosomů 3, 5, 7, 9, 11, 15, 19 a 21, zatímco monozomie a delecce převážně q raménka postihovaly přednostně chromosom 6 (6%), 13 (13%), 16 (10%) a 22 (6%). Aby autoři určili, zda existuje souvislost mezi profilem genové exprese a chromosomálními aberacemi, pomocí DNA čipů srovnávali profily genové exprese plazmatických buněk získaných od pacientů s MM a od zdravých dárců. Pro analyzované geny byla stanovena chromozomální pozice a dále počty abnormálně exprimovaných genů na jednotlivých chromosomech. Autoři zjistili pozitivní korelaci mezi chromosomálními aberacemi a genovou expresí. Většina genů ležících na chromosomech 3, 5, 7, 9, 15 a 19 měla zvýšenou expresi, zatímco geny na chromosomech 10, 13, 14, 16 a 22 měly sníženou expresi, přičemž nejmarkantnější rozdíl byl u chromosomu 13. Počet kopií chromosomů se tak promítá do úrovně transkripce.

Podobně jako další nádory z B-lymfocytů, i MM vykazuje přítomnost alterací v oblasti 14q32, kde se nachází geny těžkého řetězce imunoglobulinu (*IGH*). DNA čipy byly proto použity ke sledování expresních hladin postižených genů, s cílem stanovení možných translokačních partnerů. Autoři se zaměřili na geny, které nejsou exprimovány normálními plazmatickými buňkami, ale ve vyšších hladinách jsou detekovány u pacientů s MM. Zvýšená exprese receptoru-3 fibroblastového růstového faktoru (*FGFR3*), cyklinu D1 a D3 (*CCND1*, *CCND3*) byla ve shodě s přítomností t(4;14)(p16;q32), t(11;14)(q13;q32) nebo t(6;14)(p21;q32) (7, 13-16). Při analýze nově diagnostikovaných případů MM byla zjištěna přítomnost *CCND1* a *FGFR3* exprese u 13%, homolog musculoaponeurotického fibrosarkomového onkogenu (*c-MAF*) u 7,5% a *CCND3* u 4,1%. U 34% myelomů byla nalezena zvý-

šená exprese jednoho ze čtyř partnerů *IGH* translokace. Tato procenta však naznačují, že musí existovat i jiné vysvětlení pro sledované jevy, například přítomnost bílelické 14q32 translokace uvnitř jedné buňky, či biklonální nádor, nebo možnost, že změna hladiny zmíněných genů vznikla mechanismem nesouvisejícím s translokací. Mnohočetný myelom podtypu MM3 úplně postrádá translokace zahrnující výše uvedené geny. Autoři rovněž zmiňují paralelní expresi *FGFR3* a *MMSET* u podtypů MM1 a MM2. *MMSET* exprese bez přítomnosti *FGFR3* byla zjištěna pouze u podtypu MM4. Ve více než 90% případů klonotypických plazmatických buněk došlo ke ztrátě *FGFR3*, což naznačuje, že tak muselo dojít v časně fázi vývoje onemocnění. Aktivace *MMSET* může být rozhodující událostí při vzniku t(4;14)(p16;q32). Její přítomnost vede k charakteristické expresi 21 genů včetně 4 známých translokačních partnerů, z nichž některé mohou představovat možné partnery u 14q32 translokace (17).

Monosomie chromosomu 13 je detekována u 50-60% pacientů s MM s delečním místem v oblasti 13q14. Pro stanovení, jestli změny v genové expresi genů lokalizovaných v dané oblasti chromosomu predikují jeho delecí, byla použita fluorescenční hybridizace (FISH) a profilování genové exprese (18, 19). Ze souboru vzorků s prokázanou delecí chromosomu 13 (FISH13-) a vzorků bez delecce (FISH13+) bylo identifikováno 36 kandidátních genů. Pětáctičet genů, z nichž 32 leželo na chromosomu 13, včetně genů v oblasti 13q14 (*GTF2F2*, *TSC22* a *RBI*), mělo sníženou hladinu exprese. Pouze 1 gen, *IGF1R* (receptor pro inzulinu podobný růstový faktor 1) vykazoval vyšší hladinu transkripce. Deset genů, včetně genu retinoblastomu 1 (*RBI*), bylo použito s 85% úspěšností ke stanovení delecce u pacientů s MM bez známého stavu genu určeného pomocí metody FISH. Data z této studie naznačují, že možný důsledek delecce chromosomu 13 je vznik haploinsuficience tumor supresorového genu *RBI*, a právě snížení hladiny jeho transkriptů se může podílet na vzniku nádoru. Normální plazmatické buňky kostní dřeně i myelomové buňky exprimují *IGF1*, zatímco u ostatních typů vyžralých B-lymfocytů nebyla jeho exprese nalezena (8). Autoři naznačují, že aktivace *IGF1R* u pacientů s delecí chromosomu 13 může vytvářet autokrinní růstový signál, což potvrzují studie, ve kterých jsou hladiny sérového *IGF1R* spojeny s přežíváním pacientů s MM (20).

Statistickou analýzou profilů genové exprese ze vzorků MM bez přítomnosti delecce chromosomu 13 a bez dalších karyotypových abnormalit (CA) a vzorků s delecí chromosomu 13 a s přítomností CA, bylo nalezeno 157 genů se změněnou expresí RNA. Většina genů (91%) měla vyšší expresi ve skupině s chromosomálními aberacemi, pouze 14 genů (8 z nich na chromosomu 13) mělo v dané skupině expresi menší. Nejvíce genů kódovalo proteiny, které se podílí na proliferaci, regulaci přechodu mezi G1/S fází buněčného cyklu, segregaci chromosomů a na replikaci DNA (18, 21).

Další otázka byla, zda hladiny exprese sledovaných genů mohou rozdělit MM na čtyři cytogenetické skupiny (FISH13+/CA-, FISH13+/CA+, FISH13-/CA-, a FISH13-/CA+). Za tímto účelem bylo sledováno třicet genů: dvacet rozdílně exprimovaných mezi FISH13-/CA+ a FISH13+/CA- a deset genů odlišujících FISH13- od FISH13+ (22). Autoři analyzovali 45 pacientů s MM FISH13-/CA-, u kterých zjistili nízkou expresi genů regulujících buněčný cyklus a genů na chromosomu 13. Naopak 30 pacientů ve skupině FISH13+/CA+ mělo relativně zvýšenou expresi těchto genů. Třetí skupina, 37 pacientů FISH13+/CA-, exprimovala geny na chromosomu 13 současně se sníženou expresí genů regulujících buněčný cyklus. U 34 pacientů s MM FISH13-/CA+ byly geny buněčného cyklu byly vysoce exprimované (více než u MM FISH13+/CA+), naopak geny lokalizované na chromosomu 13 měly nízkou expresi (méně než u skupiny FISH13-/CA-). Stanovením ploidie na základě profilu genové exprese hypodiploidních a hyperdiploidních vzorků, Shaughnessy a kolektiv identifikovali 14 genů, jejichž odlišná exprese může pre-

dikovat ploidii s více než 95% přesností u vzorků se známým karyotypem a s více než 83% přesností u neinformativních případů (18, 22).

Prediktivní a prognostické profily genové exprese u mnohočetného myelomu

V případě MM již byly identifikovány profily genové exprese charakterizující klinický průběh onemocnění, s rozdíly v přežití od 2 po více než 80 měsíců od stanovení diagnózy. Podobně byly stanoveny i prediktivní profily genové exprese, a to v souvislosti s účinností léčby založené na thalidomidu a vysokodávkované chemoterapii. Rovněž byly objeveny profily predikující odpověď na kombinovanou protinádorovou léčbu režimem VAD (vinkristin, adriamycin, dexamethazon), kde byli pacienti rozděleni na dvě skupiny podle hladiny exprese 11 genů regulujících buněčný cyklus. Sedmdesát procent pacientů s vyšší expresí minimálně 8 z 11 genů, dospělo po aplikaci výše uvedené chemoterapie do částečné, nebo kompletní remise. Naopak, pouze u 30% pacientů s expresí menší než medián u 8 z 11 těchto genů, byla zjištěna odpověď na léčbu. Podobně, i v případě inhibitoru proteazomu PS-341 bylo nalezeno 44 genů, jejichž exprese predikovala odpověď na uvedenou látku. Tyto studie naznačují možnosti využití profilování genové exprese k identifikaci rizikových pacientů a k predikci odpovědi na cílenou léčbu (23,25,26).

Současné chemoterapeutické postupy využívají kombinace několika léčiv, které interferují s vícero molekulárními mechanismy nezbytnými pro životaschopnost nádorové buňky. Pomocí DNA čipů lze identifikovat geny, jejichž exprese je cíleně regulována nádorovou buňkou právě po specifickém terapeutickém zásahu. Například po ošetření buněk MM dexamethazonem vykazoval gen pro adhezní molekulu destiček/endotheliálních buněk (*PECAM1*) sníženou expresi u 20 z 20 sledovaných případů a představoval největší odchylku v genové expresi vůbec. Téměř u všech pacientů léčených dexamethazonem byla zjištěna snížená exprese proangiogenního genu vaskulárního endoteliálního faktoru (*VEGF*) a sekvence 1 genu leukémie myeloidních buněk (*MCL1*), který má antiapoptotickou funkci.

PS-341 (bortezomib) vyvolával změny v expresi pouze 9 genů (2 se zvýšenou a 7 se sníženou expresí). Snížená exprese genu Cockaynova syndromu 1 (*CKN1*) představovala největší změnu. *CKN1* kóduje protein, který reaguje mimo jiné s podjednotkou transkripčního faktoru IIH RNA polymerázy II a jeho mutace jsou spojeny s defektní opravou transkripčně aktivních genů (24). Snížená transkripce *CKN1* účinkem PS-341 může mít negativní vliv na transkripci RNA polymerázou II a vysvětluje nízký počet genů se změněnou expresí v porovnání s účinky dexamethazonu, thalidomidu a IMiD. IMiD a CC-5013 thalidomidový analog vyvolávaly změny v expresi u 98 genů (41 genů se zvýšenou a 57 genů se sníženou hladinou), zatímco thalidomid způsobil změny u 57 genů (29 zvýšená a 28 snížená hladina). Šest genů bylo ovlivněno současně IMiD i thalidomidem (25).

Metodu DNA čipů lze využít rovněž pro identifikaci nových terapeutických cílů již existujících léčiv a rozšířit tak spektrum jejich indikace. Po aplikaci léčiv můžeme identifikovat přítomnost specifických transkriptů a zjistit společné rysy profilů genové exprese u nádorových buněk v souvislosti s odlišnou odpovědí na podání určité látky. Například v maligních plazmatických buňkách byla zjištěna vysoká transkripce farnesyltransferázy (*FNTA*) a onkogenu krysího sarkomu (*RAS*) (7). *FNTA* posttranskripčně modifikuje *RAS* tak, aby se *RAS* protein mohl vázat na plazmatickou membránu, kde je schopen vykonávat svou funkci. Proto mohou mít inhibitory *FNTA* velký význam u pacientů s MM s vysokou expresí *RAS* a/nebo *FNT* (26).

Profily genové exprese charakteristické pro mikroprostředí u MGUS a MM

Růst MM a stejně tak i jiných nádorových buněk je částečně závislý na svém mikroprostředí, a to zejména na stromálních buňkách v okolí, které produkují růstové faktory a různé sig-

nální molekuly. Mimo jiné tím poskytují cytoprotektivní účinek nádorovým buňkám, včetně ochrany před účinky chemoterapie (35). Změny v expresních profilech stromálních složek mikroprostředí kostní dřeně mohou být i v případě MM spojeny s predikcí progresse onemocnění. Jedna ze studií genové exprese z biopsií kostní dřeně pacientů s MGUS, MM a zdravých dárců odhalila 146 genů se sníženou a 86 genů se zvýšenou expresí u MM. Srovnání profilů genové exprese mezi vzorky z biopsií MM a purifikovanými plazmatickými buňkami téhož pacienta prokázalo 75 genů s rozdílnou expresí. Tyto geny byly funkčně spjaty s mikroprostředím MM (microenvironment-associated genes, MAG). Celkem 54 MAG mělo sníženou a 21 MAG zvýšenou expresi, přičemž dva z pěti genů s nejvyšší odchylkou exprese, *UMAG1* a *UMAG2*, kódují adhezní proteiny, které se podílejí na vzájemných interakcích myelomových a stromálních buněk. Oba geny byly exprimovány více než desetinásobně u MM biopsií s vysokým procentem plazmatických buněk (80%) v porovnání se vzorky s nízkým procentem (20%), nebo biopsiemi od zdravých dárců. Jejich exprese přitom nebyla zvýšena ani ve vzorcích MGUS (11). U obou genů byla prokázána významná role v nádorovém růst a rezistenci na léky (27, 28). Další MAG, *UMAG3*, je člen rodiny matrixových metalloproteináz (*MMP*). Vzorky MGUS biopsií vykazovaly variabilní expresi tohoto genu, v purifikovaných plazmatických buňkách nebyl detekovatelný. Zvýšená exprese *UMAG3* naznačuje působení *MMP* v odlišných oblastech patologie MM včetně angiogeneze nebo resorpce kostí (29, 30).

Využití chromatinové imunoprecipitace při studiu epigenetických změn genů významných pro diagnostiku mnohočetného myelomu

Chromatinová imunoprecipitace, kombinovaná s polymerázovou řetězovou reakcí (ChIP-PCR), představuje významnou molekulárně-biologickou metodu, která slouží ke studiu epigenetických modifikací chromatinu. Touto metodou je možné velice detailně analyzovat vazbu transkripčních faktorů na vybrané úseky DNA a nebo studovat změny v acetylacích, methylacích, fosforylacích a ubikvitinacích histonů. Histony H2A, H2B, H3 a H4, představující hlavní složku chromatinu, jsou součástí takzvaných nukleosomů, které tvoří dva základní typy chromatinu, tj. euchromatin (transkripčně aktivní DNA) a heterochromatin (kondenzované, transkripčně neaktivní chromosomální oblasti). Ty se od sebe odlišují nejenom množstvím GC párů bazí, mírou kondenzace, ale právě i specifickými modifikacemi histonů. Typickým markerem heterochromatinu je například deacetylase a nebo methylace histonu H3 v pozici lysinu 9, která je u lidských buněk zprostředkována enzymem zvaným histon methyl transferáza Suv39H1 (31). Na druhou stranu, pro euchromatin je velmi typická acetylase a také methylace histonu H3 v pozici lysinu 4. Za všechny tyto modifikace N-terminálních konců histonů jsou opět zodpovědné příslušné enzymy jako jsou například histon acetylázy a deacetylázy (HATs, HDACs) a nově objevený demethylující enzym LSD1 (32).

Epigenetický stav příslušné kódující oblasti a hlavně promotoru, jako místa iniciace transkripce, je zásadní právě pro regulaci transkripční aktivity genů. To vše, společně s transkripčními faktory, rozhoduje o optimální expresi genů. Je obecně známo, že nádorové buňky jsou charakteristické mnoha genetickými abnormalitami, včetně genových amplifikací, delecí nebo translokací chromosomů. Tyto genetické přestavby vedou k nekontrolované expresi některých genů a tudíž jsou doprovázeny rozsáhlými změnami v epigenetických profilech chromatinu (33, 34). Z tohoto důvodu se studium epigenetické regulace exprese genů zdá být velmi zásadní z hlediska pochopení maligní transformace buněk. Chromatinová imunoprecipitace, kombinovaná s PCR metodologií, představuje slibný krok v těchto studiích. S využitím ChIP-PCR metody je možné přesně stanovit míru methylace a acetylase promotoru nebo kódující sekvence prognosticky významných genů.

ChIP-PCR metodologie zahrnuje několik kroků vedoucích k optimálnímu stanovení epigenetických změn ve vybraných lokusech. Prvním krokem je vytvoření vazby mezi DNA a histony, takzvaný „cross link“, pomocí fixace buněk ve formaldehydu. Po lyzaci buněk je třeba DNA vázanou na histony fragmentovat na menších úseky, zhruba o velikosti do 200-1000 párů bazí. K tomuto účelu se používá přístroj zvaný sonikátor. Jako další krok následuje imunoprecipitace DNA-proteinového komplexu s příslušnou protilátkou, která má schopnost rozpoznat studovanou modifikaci histonů. Po odmytí přebytečné protilátky je při teplotě 65oC přerušena vazba mezi DNA a histony a pomocí DNA izolačních a purifikačních technik je získáno optimální množství DNA. Ta je dále použita v klasické PCR reakci navržené k detekci vybraných genových lokusů, které jsou zásadní v maligní transformaci studovaných nádorových buněk. Velmi slibnou metodou se v současné době jeví i kombinace ChIP metody s DNA mikročipy, tak zvaná „ChIP-on-chip“ technologie, která slouží ke stanovení epigenetických změn například v promotorových oblastech několika stovek genů (GeneChips, Affymetrix). V tomto případě metoda přináší velké množství dat o změnách v epigenetických profilech nádorových buněk. To vše poskytuje cenné informace o celkových rozdílech mezi normální a maligně transformovanou buňkou.

V naší laboratoři jsme se zaměřili na studium změn v methylacích a acetylaci histonu H3 v pozici lysinu 9 u genů c-myc a CCND1, které hrají důležitou úlohu v patogenezi mnohočetného myelomu. V současné době se zaměřujeme na optimální

zaci metody pro vzorky získané po magnetické separaci CD138- a CD138+ buněk mnohočetného myelomu. Provedli jsme již několik pilotních studií, které budou dále rozpracovány. Rovněž se zaměřujeme na studium změn v epigenetických stavech myelomových buněčných linií ovlivněných látkami, jako je například dexamethason, melfalan nebo Velcade, které mají nezastupitelný význam při léčbě mnohočetného myelomu.

Závěr:

I přes pokroky v léčbě mnohočetného myelomu, včetně vysokodávkované chemoterapie, autologní transplantace a zavedením nových léků do léčby relapsu onemocnění, toto onemocnění zůstává stále nevyléčitelné. Výše uvedené metody umožňují sledovat změny v celkové expresi genů i změny v epigenetickém uspořádání chromatinu s cílem identifikovat molekulární profily spojené se vznikem a vývojem maligního onemocnění. Uplatnění přístupu analýzy víceetapové patogeneze myelomu umožní lépe pochopit jak se mění exprese genů a epigenetické uspořádání chromatinu během různých stadií onemocnění a popsat terapeutické cíle na molekulární úrovni u jednotlivých pacientů. Charakterizace genetických jevů a jejich důsledků důležitých v růstu a přžití myelomových buněk spolu s porozuměním mechanismu citlivosti a rezistence na aplikovanou léčbu, může pomoci odhalit pacienty, kteří budou odpovídat na danou léčbu a stanovit další cíle nových terapeutických postupů.

Poděkování:

Práce byla podpořena : VC MŠMT ČR LC06027

Literatura

- Munshi N. C., Hideshima T., Carrasco D., Shamas M., Auclair D., Davies F., Mitsiades N., Mitsiades C., Kim R. S., Li C., Rajkumar S. V., Fonseca R., Bergsagel L., Chauhan D., Anderson K. C. Identification of genes modulated in multiple myeloma using genetically identical twin samples. *Blood*. 2004;103(5):1799-806
- Davies F. E., Dring A. M., Li C., Rawstron A. C., Shamas M. A., O'Connor S. M., Fenton J. A., Hideshima T., Chauhan D., Tai I. T., Robinson E., Auclair D., Rees K., Gonzalez D., Ashcroft A. J., Dasgupta R., Mitsiades C., Mitsiades N., Chen L. B., Wong W. H., Munshi N. C., Morgan G. J., Anderson K. C. Insights into the multistep transformation of MGUS to myeloma using microarray expression analysis. *Blood*. 2003;102(13):4504-11
- Hardin J., Waddell M., Page C. D., Zhan F., Barlogie B., Shaughnessy J., Crowley J. J. Evaluation of multiple models to distinguish closely related forms of disease using DNA microarray data: an application to multiple myeloma. *Stat Appl Genet Mol Biol*. 2004;3(1):Article10
- Claudio J. O., Masih-Khan E., Tang H., Goncalves J., Voralia M., Li Z. H., Nadeem V., Cukerman E., Francisco-Pabalan O., Liew C. C., Woodgett J. R., Stewart A. K. A molecular compendium of genes expressed in multiple myeloma. *Blood*. 2002;100(6):2175-86
- Shaughnessy J. D. Jr. Global gene expression profiling in the study of multiple myeloma. *Int J Hematol*. 2003;77(3):213-25a
- Stevenson F. K., Sahota S. S. B cell maturation in relation to multiple myeloma. *Pathol Biol*. 1999;47: 89-97
- Zhan F., Hardin J., Kordsmeier B., Bumm K., Zheng M., Tian E., Sander R., Yang Y., Wilson C., Zangari M., Anaissie E., Morris C., Muwalla F., van Rhee F., Fassas A., Crowley J., Tricot G., Barlogie B., Shaughnessy J. Jr. Global gene expression profiling of multiple myeloma, monoclonal gammopathy of undetermined significance, and normal bone marrow plasma cells. *Blood*. 2002;99(5):1745-57
- Zhan F., Tian E., Buml K., Smith R., Barlogie B., Shaughnessy J. Jr. Gene expression profiling of human plasma cell differentiation and classification of multiple myeloma based on similarities to distinct stages of late-stage B-cell development. *Blood*. 2003;101:1128-1140
- Medina F., Segundo C., Campos-Caro A., Gonzales-Garcia I., Brieve J. The heterogeneity shown by human plasma cells from tonsil, blood, and bone marrow reveals graded stages of increasing maturity, but local profiles of adhesion molecule expression. *Blood*. 2002;99:2154-2161
- Alizadeh A. A., Eisen M. B., Davis R. E., Ma C., Lossos I. S., Rosenwald A., Boldrick J. C., Sabet H., Tran T., Yu X., Powell J. I., Yang L., Marti G. E., Moore T., Hudson J. Jr., Lu L., Lewis D. B., Tibshirani R., Sherlock G., Chan W. C., Greiner T. C., Weisenburger D. D., Armitage J. O., Warnke R., Levy R., Wilson W., Grever M. R., Byrd J. C., Botstein D., Brown P. O., Staudt L. M. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature*. 2000;403(6769):503-11
- Anderson KC, Shaughnessy JD Jr, Barlogie B, Harousseau JL, Roodman GD. Multiple myeloma. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2002;1:214-40
- Tarte K., Zhan F., De Vos J., Klein B., Shaughnessy J. Jr. Gene expression profiling of plasma cells and plasmablasts: toward a better understanding of the late stages of B-cell differentiation. *Blood*. 2003 Jul 15;102(2):592-600
- Shaughnessy J., Gabrea A., Ying Q., Brents L., Zhan F., Tian E., Sawyer J., Barlogie B., Bergsagel P. L., Kuehl M. Cyclin D3 at 6p21 is dysregulated by recurrent Ig translocations in multiple myeloma. *Blood*. 2001;98(1):217-223
- Largo C., Alvarez S., Saez B., Blesa D., Martin-Subero J. I., Gonzalez-Garcia I., Brieve J. A., Dopazo J., Siebert R., Calasanz M. J., Cigudosa J. C. Identification of overexpressed genes in frequently gained/amplified chromosome regions in multiple myeloma. *Haematologica*. 2006;91(2):184-91
- Stewart J. P., Thompson A., Santra M., Barlogie B., Lippin T. R., Shaughnessy J. Jr. Correlation of TACC3, FGFR3, MMSET and p21 expression with the t(4;14)(p16.3;q32) in multiple myeloma. *Br J Haematol*. 2004 Jul;126(1):72-6
- Shaughnessy J., Tian E., Sawyer J., McCoy J., Tricot G., Jacobson J., Anaissie E., Badros A., Zangari A., Fassas A., Morris C., Muwalla F., Barlogie B. Prognostic Impact Of Cytogenetic And Interphase FISH Defined Chromosome 13 Deletion In Multiple Myeloma: Early Results Of Total Therapy II. *Br J Haematol*. 2003;120:44-52b
- Santra M., Zhan F., Tian E., Barlogie B., Shaughnessy J. Jr. A subset of multiple myeloma harboring the t(4;14)(p16;q32) translocation lacks FGFR3 expression but maintains an IGH/MMSET fusion transcript. *Blood*. 2003;101:2374-2376
- Shaughnessy J., Jacobson J., Sawyer J., McCoy J., Fassas A., Zhan F., Bumm K., Epstein J., Anaissie E., Jagannath S., Vesole D., Siegel D., Desikan R., Munshi N., Badros A., Tian E., Zangari M., Tricot G., Crowley J., Barlogie B. Continuous absence of metaphase-defined cytogenetic abnormalities, especially of chromosome 13 and hypodiploidy, ensures long-term survival in multiple myeloma treated with Total Therapy I: interpretation in the context of global gene expression. *Blood*. 2003;101(10):3849-56c
- Shaughnessy J., Tian E., Sawyer J., Bumm K., Landes R., Badros A., Morris C., Tricot G., Epstein J., Barlogie B. High Incidence of Chromosome 13 Deletion In Multiple Myeloma Detected by Multi-Probe Interphase FISH. *Blood*. 2000;96:1505-1511
- Standal T., Borset M., Lenhoff S., Wisloff F., Stordal B., Sundan A., Waage A., Seidel C. Serum insulinlike growth factor is not elevated in patients with multiple myeloma but is still a prognostic factor. *Blood*. 2002;100(12):3925-9
- Barlogie B. Jr., Shaughnessy J. D. Early results of total therapy II in mul-

- tiple myeloma: implications of cytogenetics and FISH. *Int J Hematol*. 2002;76 Suppl 1:337-9a
22. Shaughnessy J. Jr. Primer on medical genomics. Part IX: scientific and clinical applications of DNA microarrays-multiple myeloma as a disease model. *Mayo Clin Proc*. 2003;78(9):1098-109d
 23. Barlogie B., Shaughnessy J., Zangari M., Tricot G. High-dose therapy and immunomodulatory drugs in multiple myeloma. *Semin Oncol*. 2002;29(6 Suppl 17):26-33b
 24. Henning K. A., Li L., Iyer N., McDaniel L. D., Reagan M. S., Legerski R., Schultz R. A., Stefanini M., Lehmann A. R., Mayne L. V., Friedberg E. C. The Cockayne syndrome group A gene encodes a WD repeat protein that interacts with CSB protein and a subunit of RNA polymerase II TFIIH. *Cell*. 1995;82(4):555-64
 25. Shaughnessy J. Jr., Zhan F., Barlogie B., Stewart A. K. Gene expression profiling and multiple myeloma. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2005;18(4):537-52
 26. Barlogie B, Shaughnessy J, Zangari M, Tricot G. High-dose therapy and immunomodulatory drugs in multiple myeloma. *Semin Oncol*. 2002 Dec;29(6 Suppl 17):26-33
 27. Damiano J. S., Cress A. E., Hazlehurst L. A., Shil A. A., Dalton W. S. Cell adhesion mediated drug resistance (CAM-DR): role of integrins and resistance to apoptosis in human myeloma cell lines. *Blood*. 1999;93:1658-1667
 28. Shain K. H., Landowski T. H., Dalton W. S. The tumor microenvironment as a determinant of cancer cell survival: a possible mechanism for de novo drug resistance. *Curr Opin Oncol*. 2000;12:557-563
 29. Vacca A., Ribatti D., Presta M., Minischetti M., Iurlaro M., Ria R., Albini A., Bussolino F., Dammacco F. Bone marrow neovascularization, plasma cell angiogenic potential, and matrix metalloproteinase-2 secretion parallel progression of human multiple myeloma. *Blood*. 1999;93(9):3064-73
 30. Wahlgren J., Maisi P., Sorsa T., Sutinen M., Tervahartiala T., Pirila E., Teronen O., Hietanen J., Tjaderhane L., Salo T. Expression and induction of collagenases (MMP-8 and -13) in plasma cells associated with bone-destructive lesions. *J Pathol*. 2001;194(2):217-24
 31. Rice J. C., Allis C. D. Histone methylation versus histone acetylation: new insights into epigenetic regulation. *Curr. Opin. Cell Biol*. 2001;(3):263-273
 32. Shi Y., Lan F., Matson C., Mulligan P., Whetstone J. R., Cole P. A., Caseiro R. A., Shi Y. Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. *Cell* 2004;119(7):941-953
 33. Nguyen C. T., Gonzales F. A., Jones P. A. Altered chromatin structure associated with methylation-induced gene silencing in cancer cells: correlation of accessibility, methylation, MeCP2 binding and acetylation. *Nucleic Acids Res*. 2001;29(22):4598-4606
 34. Bártová E., Harničarová A., Pacherník J., Kozubek S. Nuclear topography and expression of the BCR/ABL fusion gene and its protein level influenced by cell differentiation and RNA interference. *Leuk. Res*. 2005;8:901-913