

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

KAMBIČ MAJA

MAGISTRSKA NALOGA

MAGISTRSKI ŠTUDIJ
LABORATORIJSKE BIOMEDICINE

Ljubljana, 2017

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

KAMBIČ MAJA

**IZGUBE IN PREUREJITVE GENA *TET2*
PRI BOLNIKI Z MIELODISPLASTIČNIM SINDROMOM**

**ABERRATIONS AND DELETIONS OF *TET2*
IN PATIENTS WITH MYELOYDYSPLASTIC SYNDROME**

MAGISTRSKI ŠTUDIJ
LABORATORIJSKE BIOMEDICINE

Ljubljana, 2017

Magistrsko delo sem opravljala v Specializiranem hematološkem laboratoriju Kliničnega oddelka za hematologijo Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana pod mentorstvom izr. prof. dr. Helene Podgornik, univ. dipl. inž. kem. inž., spec. med. biokem, spec. lab. med. gen.

Zahvala

Za vso strokovno pomoč, usmerjanje in nasvete pri nastajanju magistrske naloge se zahvaljujem mentorici izr. prof. dr. Heleni Podgornik. Prav tako se zahvaljujem vsem zaposlenim v laboratoriju, za vso pomoč, napotke in čas, ki ste mi ga namenile. Velikanska zahvala gre družini, ki mi je omogočila študij ter me na poti vzpodbujala in mi stala ob strani. Hvala!

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom izr. prof. dr. Helene Podgornik, univ. dipl. inž. kem. inž., spec. med. biokem., spec. lab. med. gen.

Maja Kambič

Predsednica komisije: izr. prof. dr. Barbara Ostanek, mag. farm.

Član komisije: doc. dr. Igor Locatelli, mag. farm.

VSEBINA

POVZETEK	V
ABSTRACT	VI
SEZNAM OKRAJŠAV	VIII
1. UVOD	1
1.1. MIELODISPLASTIČNI SINDROM	1
1.1.1. Razdelitev MDS	1
1.1.2. Značilnosti, vzroki in klinična slika	2
1.1.3. Postavitev diagnoze MDS	3
1.1.4. Napovedni sistemi	3
1.1.5. Zdravljenje	7
1.2. GEN IN PROTEIN TET2	8
1.2.1. Metilacija in demetilacija DNA	8
1.2.2. Struktura in funkcije proteinov TET	11
1.3. VLOGA TET2 PRI MDS	12
1.3.1. Izocitrat dehidrogenaza (IDH)	13
1.3.2. O-GlcNAc transferaza (OGT)	14
1.3.3. TET kot tarča zdravičnih učinkovin	14
2. NAMEN DELA	16
3. MATERIALI IN METODE	17
3.1. VZORCI	17
3.2. FLUORESCENČNA <i>IN SITU</i> HIBRIDIZACIJA	17
3.2.1. Materiali	17
3.2.2. Pripomočki in aparature	19
3.2.3. Nanosi na stekla	20
3.2.4. Postopek FISH	21
3.2.5. Meje vrednosti za DNA-sondo	23
3.2.6. Specifičnost DNA-sonde	23
3.3. STATISTIČNE METODE	24
3.3.1. Določitev mejne vrednosti za DNA-sondo	24
3.3.2. Analiza rezultatov FISH	25

4. REZULTATI IN RAZPRAVA.....	26
4.1. DOLOČITEV SPECIFIČNOSTI DNA-SONDE.....	27
4.2. DOLOČITEV DEL(4)(Q24) PRI BOLNIKI Z MDS.....	27
4.2.1. Pojavnost del(4)(q24) glede na demografske značilnosti preiskovancev	29
4.2.2. Pojavnost del(4)(q24) glede na citogenetske značilnosti in tveganje	30
4.2.3. Primerjava rezultatov preiskave FISH s kriotipi preiskovancev z del(4)(q24)	32
4.3. NAPOVED POTEKA BOLEZNI IN PREHOD V SAML.....	38
4.4. USTREZNOST METODE FISH PRI ODKRIVANJU DELECIJE <i>TET2</i>	39
5. SKLEPI	41
6. LITERATURA	42
PRILOGA	45

KAZALO TABEL

Tabela I: Minimalna diagnostična merila za MDS.	3
Tabela II: MDS glede na tveganje.	4
Tabela III: Napovedni kazalci IPSS.	5
Tabela IV: Skupine tveganja po IPSS.	5
Tabela V: Napovedni kazalci IPSS-R.	6
Tabela VI: Skupine tveganja po IPSS-R.	7
Tabela VII: Določitev mejne vrednosti za DNA-sondo.	24
Tabela VIII: Podatki o preiskovancih in rezultati glede na podskupine preiskovancev.	28
Tabela IX: Kontingenčni tabeli za Fisherjev natančni test verjetnosti..	31
Tabela X: Kontingenčne tabele za Fisherjev natančni test verjetnosti..	32
Tabela XI: Preživetje preiskovank z del(4)(q24).....	39
Tabela XII: Demografski in citogenetski podatki analiziranih vzorcev s skupino tveganja po IPSS-R.	45

KAZALO SLIK

Slika 1: Lokacija gena <i>TET2</i>	8
Slika 2: Shematski prikaz metilacije in demetilacije DNA..	9
Slika 3: Shematski prikaz razlik med pasivno in aktivno demetilacijo..	10
Slika 4: Shematski prikaz strukture proteinov TET.....	12
Slika 5: Shematski prikaz inhibicije proteinov TET2 z mutirano IDH1/2..	13
Slika 6: Koraki v postopku FISH	21
Slika 7: Vzorec signalov pri normalni celici (A) in pri celici z delecijo 4q24 (B).	26
Slika 8: Vezava DNA-sonde na področje gena <i>TET2</i>	27
Slika 9: Delež bolnikov z delecijo <i>TET2</i>	29
Slika 10: Delež preiskovancev v posameznih citogenetskih skupinah.	30
Slika 11: Delež preiskovancev v skupinah tveganja.....	31
Slika 12: Kariotip preiskovanke A:46,XX,del(11)(q21q23)[19]/46,XX[5].	33
Slika 13: Kariotip preiskovanke B: 46,XX,inv(3)(q21q26)[24].	34
Slika 14: Kariotip preiskovanke C: 46,XX,t(4;12)(q24;q14)[5]/46,XX[16].	35
Slika 15: Kariotip preiskovanca Č: kompleksno preurejeni kariotip.	36
Slika 16: Kariotip preiskovanke D: kompleksno preurejeni kariotip.	37
Slika 17: Amplifikacija 4q24.....	38

POVZETEK

Mielodisplastični sindrom (MDS) je bolezen krvotvornih matičnih celic, nastane pa zaradi neučinkovite tvorbe krvnih celic. Diagnostično je lahko ključna citogenetska preiskava, ki je v osnovi nujna za oceno poteka bolezni. Resnost in potek bolezni se oceni s pomočjo enega izmed napovednih sistemov, trenutno se najbolj uporablja Mednarodni napovedni točkovni sistem (International Prognostic Scoring System) IPSS-R. Ta sistem upošteva 5 dejavnikov tveganja (odstotek blastov v kostnem mozgu, citogenetsko spremembo, koncentracijo hemoglobina, absolutno število nevtrofilcev in število trombocitov). Pri MDS opazimo izgubo funkcije proteinov TET2 pri 6–26 % bolnikov. Tumor supresorski gen *TET2* se nahaja 4. kromosomu na področju q24. Kodira protein TET2, ki je od α -ketoglutarata in železa odvisna dioksidgenaza. Proteini Tet2 imajo najpomembnejšo vlogo v aktivni demetilaciji DNA. Sodelujejo pri oksidaciji 5-metil citozina v baze, ki jih s skupnim imenom imenujemo oksi-metil citozini (5-hidroksimetil citozin, 5-formil citozin in 5-karboksil citozin).

Namen naloge je bil preveriti pogostost *TET2* delecij pri slovenskih bolnikih z MDS. Za preiskovance smo po IPSS-R določili citogenetske skupine in skupine tveganja, nato pa primerjali prisotnost del(4)(q24) znotraj teh skupin. Rezultate fluorescenčne *in situ* hibridizacije (FISH) smo primerjali s kariotipi preiskovancev in ugotavljali ali je FISH ustrezna metoda za odkrivanje delecij *TET2*.

Za določitev del(4)(q24) s postopkom FISH smo uporabili vzorce kostnega mozga bolnikov z diagnozo MDS. Uporabili smo DNA-sondo SureFish, za katero smo določili mejno vrednost 5,7 % in 100 % specifičnost. Del(4)(q24) smo odkrili pri 8,3 % vseh analiziranih vzorcev. Ugotovili smo, da spol ne vpliva na prisotnost delecije. Enaka je bila tudi porazdelitev starosti med skupino preiskovancev brez delecije in skupino z delecijo. Normalen kariotip je imelo 53,3 % preiskovancev, del(4)(q24) pa smo odkrili le pri preiskovancih s preurejenim kariotipom. Pri primerjavi med citogenetskimi skupinami smo našli povezavo med kompleksnejšim kariotipom in prisotnostjo delecije. Nismo pa našli povezave med prisotnostjo delecije in skupinami tveganja po IPSS-R. Ugotovili smo tudi, da je del(4)(q24) premajhna, da bi jo lahko zaznali samo s kariotipizacijo, zato je za določitev delecije *TET2* smiselna uporaba fluorescenčne *in situ* hibridizacije kot dodatek k standardni citogenetski preiskavi.

ABSTRACT

Myelodysplastic syndrome (MDS) is a haematopoietic stem cell disorder that develops due to the ineffective differentiation of haematopoietic cells. Cytogenetic examination which is essential for disease prognosis evaluation can be crucial element for diagnosis as well. Severity of patient's disease and disease prognosis are evaluated by different prognostic systems. Today most widely used prognostic system is the International Prognostic Scoring System IPSS-R which includes five risk factors (the percentage of leukemic blast cells in the marrow, the type of chromosomal changes, hemoglobin level, absolute neutrophil count and platelet count). Namely 6–26 % of all MDS patients exhibit the loss of TET2 protein function. Tumor suppressor *TET2* gene is located in the 4q24 region on the longer arm of chromosome 4. This gene codes for TET2 protein which is α -ketoglutarate/Fe(II)-dependent dioxygenase. TET2 proteins regulate DNA demethylation and oxidize 5-methylcytosine into bases which are known by the common name of oxi-methylcytosine (5-hydroxymethylcytosine, 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine).

The purpose of our project was to check the frequency of *TET2* deletions in Slovenian MDS patients. We defined IPSS-R cytogenetic and risk groups for the patients and then we compared the presence of deletion within those groups. Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) results were compared with the karyotypes and we tried to determine whether FISH is appropriate method for detection of *TET2* deletion.

In order to determine del(4)(q24) with FISH we used bone marrow samples of myelodysplastic syndrome patients. SureFish DNA probe was used for which we defined a specificity of 100 % and a cut-off value of 5,7 %. In 8,3 % of all analyzed samples del(4)(q24) was detected. We observed no significant influence between the gender and the presence of *TET2* deletion. Age distribution in groups with and without deletion was the same. 53,3 % of all the patients had normal karyotypes and del(4)(q24) was found only in patients with aberrant karyotypes. When comparing cytogenetic groups the association between complex karyotype and presence of *TET2* deletion was observed. No association between the presence of *TET2* deletion and IPSS-R risk groups was found. We confirmed that del(4)(q24) is too small to be detected only by karyotyping, therefore the use of fluorescence *in situ* hybridization as an additional analysis to conventional cytogenetics is reasonable.

KLJUČNE BESEDE

Mielodisplastični sindrom, IPSS-R, gen *TET2*, delecija del(4)(q24), fluorescenčna *in situ* hibridizacija.

KEY WORDS

Myelodysplastic syndrome, IPSS-R, *TET2* gene, deletion del(4)(q24), fluorescence *in situ* hybridization.

SEZNAM OKRAJŠAV

AML	akutna mieloblastna levkemija
BER	base excision repair; popravljanje z izrezom baze
del	delecija
DNA	deoksiribonukleinska kislina
DNMT	DNA metil transferaza
FISH	Fluorescence <i>in situ</i> hybridization; fluorescenčna <i>in situ</i> hibridizacija
GlnNAc	N-acetilglukozamin
H2B	histon 2B
IDH	izocitrat dehidrogenaza
inv	inverzija
IPSS, IPSS-R	International Prognostic Scoring System, Mednarodni napovedni točkovni sistem; Revised International Prognostic Scoring System, dopolnjeni Mednarodni napovedni točkovni sistem
KM	kostni mozeg
MDS, sMDS	mielodisplastični sindrom, sekundarni mielodisplastični sindrom
OGT	O-GlcNAc transferaza
PBS, PBT	phosphate-buffered saline, fosfatno pufrana slanica; phosphate-buffered saline/Tween, fosfatno pufrana slanica s Tween-om
SSC	saline-sodium citrate; raztopina natrijevega citrata z natrijevim kloridom
t	translokacija
TDG	timin DNA glikozilaza
TET, TET	ten-eleven translocation; translokacija med 10. in 11. kromosomom
WHO	World Health Organization; Svetovna zdravstvena organizacija
WPSS	WHO Prognostic Scoring System; Napovedni točkovni sistem Svetovne zdravstvene organizacije
α-KG	α -ketoglutarat
2-HG	2-hidroksiglutarat
2-OG	2-oksoglutarat
5-caC	5-karboksil citozin
5-fC	5-formil citozin
5-hmC	5-hidroksimetil citozin
5-mC	5-metil citozin

1. UVOD

1.1. MIELODISPLASTIČNI SINDROM

Mielodisplastični sindrom (MDS) je heterogena skupina bolezni krvotvornih matičnih celic, ki nastane zaradi neučinkovite tvorbe ene ali več vrst krvnih celic. Število teh celic v krvi je znižano, zaradi povečane proliferacije so prisotni znaki odpovedi kostnega mozga. Pogostost sindroma se povečuje s starostjo bolnikov, redko ga odkrijejo pred 50. letom starosti. Pogostejše zbolevalo moški (1, 2, 3).

1.1.1. RAZDELITEV MDS

MDS se po razvrstitvi Svetovne zdravstvene organizacije (ang. World Health Organization; WHO) deli glede na spremembe v (1, 3, 4):

- a) krvi (število eritrocitov, trombocitov, monocitov, nevtrofilcev, odstotek blastnih celic in prisotnost Auerjevih palčk v citoplazmi blastov);
- b) kostnem mozgu (odstotek prstanastih sideroblastov, odstotek levkemičnih blastnih celic, monocitov in promonocitov, diseritropoeza, disgranulopoeza, dismegakariopoeza, Auerjeve palčke v citoplazmi blastov);
- c) kariogramu.

Po tej razdelitvi, na osnovi morfoloških, citogenetskih in kliničnih značilnostih, sindrom od leta 2016 naprej po WHO klasifikaciji delimo na naslednje podvrste (5):

- MDS z displazijo v eni celični vrsti;
- MDS z displazijo v več celičnih vrstah;
- MDS s prstanastimi sideroblasti :
 - › MDS s prstanastimi sideroblasti z displazijo v eni celični vrsti,
 - › MDS s prstanastimi sideroblasti z displazijo v več celičnih vrstah;
- MDS z izolirano del(5q);
- MDS s presežkom blastov:
 - › MDS s presežkom blastov-1,
 - › MDS s presežkom blastov-2;

- Neklasificiran MDS:
 - > z 1% blastov v krvi,
 - > z displazijo v eni celični vrsti in pancitopenijo,
 - > glede na citogenetsko nepravilnost;
- Mieloične novotvorbe s predispozicijo v zarodni liniji.

1.1.2. ZNAČILNOSTI, VZROKI IN KLINIČNA SLIKA

Osnovna značilnost MDS je povečano razmnoževanje displastičnega kлона, kar se odraža v razrasti celic v kostnem mozgu, ki je hipercelularen. Značilno je tudi neravnovesje med proliferacijo in apoptozo, slednja je čezmerna in ima za posledico manj učinkovito hematopoezo in citopenijo v krvi (3, 6). Za razliko od akutne levkemije, celice pri MDS do neke mere dozorevajo (1). Skupne značilnosti vseh podvrst MDS so displazija v eni ali več mieloičnih celičnih vrstah, neučinkovita hematopoeza s citopenijo, različen delež blastov, ki ne presega 19 % vseh celic, ter prehod v akutno mieloično levkemijo (AML) (3).

MDS glede na vzrok nastanka delimo v primarne in sekundarne. Med primarnimi so najpogostejši tisti, katerih vzrok za nastanek ni poznan, imenujemo jih idiopatski MDS. Redko je vzrok za nastanek MDS predhodna bolezen, na primer aplastična anemija in paroksizmalna nočna hemoglobinurija. O sekundarnem MDS (sMDS) govorimo, ko je nastanek bolezni posledica izpostavljenosti toksičnim vplivom. Najpogostejši razlog sMDS je zdravljenje druge novotvorbe z obsevanjem in kemoterapijo (3).

Klinična slika MDS je posledica odpovedi kostnega mozga in kopičenja nedozorelih celic v jetrih in vranici. Izmed vseh znakov je najpogostejše opazna huda normokromna, makrocitna anemija. Zaradi hude trombocitopenije so prisotne krvavitve, zaradi nevtropenije pa okužbe. Pogosto bolniki sploh nimajo težav. V krvi bolnikov opazimo anizocitozo in poikilocitozo, bazofilne punktacije in agranulirane hiposegmentirane (pelgeroidna anomalija jeder) nevtrofilce. V kostnem mozgu, ki je hipercelularen, so značilni morfološko spremenjeni eritroblasti, večjedrni eritroblasti z nepravilno oblikovanimi jedri (diseritropoeza) in vakuole v citoplazmi celic rdeče vrste. Granulocitna vrsta je agranulirana in hiposegmentirana (1, 3, 6).

1.1.3. POSTAVITEV DIAGNOZE MDS

Za postavitev diagnoze MDS je poleg celotne krvne slike in barvanja na železo nujen citološki pregled kostnega mozga, za oceno poteka bolezni pa potrebujemo citogenetsko preiskavo, ki je lahko ključna tudi diagnostično. Poznamo minimalna diagnostična merila za MDS - izpolnjena morata biti oba predpogoja in eno od meril, ki so predstavljeni v spodnji tabeli (1, 3).

Tabela I: Minimalna diagnostična merila za MDS. Povzeto po (3).

Predpogoji	Merila
Pomembna citopenija	Displazija v ≥ 10 % celic v eni ali več vrstah mieloičnih celic ali ≥ 15 % prstanastih sideroblastov
Izključitev drugih vzrokov za citopenije	5–19 % blastov v KM Za MDS značilne citogenetske spremembe

KM: kostni mozeg; MDS: mielodisplastični sindrom

O pomembni citopeniji govorimo, ko je koncentracija hemoglobina v krvi pod 110 g/L, število nevtrofilcev pod $1,5 \times 10^9$ /L, število trombocitov pod 100×10^9 /L ali ko citopenije vztrajajo določeno časovno obdobje. Drugi vzroki za citopenije so megaloblastna anemija, toksične motnje (zloraba alkohola, zastrupitev s težkimi kovinami in zdravila), virusne okužbe (HIV, parvovirus B19) in druge klonske bolezni (paroksizmalna nočna hemoglobinurija, primarna mielofibroza, AML in druge). Za MDS so značilne tako neuravnotežene kot uravnotežene kromosomske spremembe. Med prve, ki so pogostejše, sodijo del(7q) ali izguba 7. kromosoma, del(5q) ali izguba 5. kromosoma, spremembe na 17. kromosomu, izguba 13. kromosoma, del(11q), del(12p), del(9q). Med druge pa t(11;16), t(3;21), t(1;3), t(2;11), t(6;9) in inv(3) (3).

1.1.4. NAPOVEDNI SISTEMI

Resnost in potek bolezni hematolog oceni s pomočjo enega izmed napovednih sistemov. Trenutno poznamo dva, in sicer:

- 1) Napovedni točkovni sistem Svetovne zdravstvene organizacije (angleško WHO Prognostic Scoring System; WPSS), ki temelji na treh napovednih kazalcih –

podvrsti MDS, karyotipu in odvisnosti od transfuzij ter omogoča oceno preživetja in tveganja za nastanek AML kadarkoli med potekom bolezni. Poznamo pet skupin po WPSS in sicer skupine, v katerih je tveganje: zelo visoko, visoko, vmesno, nizko in zelo nizko (3).

- 2) Mednarodni napovedni točkovni sistem (angleško International Prognostic Scoring System; IPSS), ki ga hematologi uporabljajo pogosteje in je podrobneje opisan v nadaljevanju.

Z vidika vsakdanje klinične prakse in zdravljenja je pomembno, da vse te skupine tveganja poenostavljeno razdelimo v dve večji skupini – skupino z nizkim in skupino z visokim tveganjem (Tabela II) (1, 3).

Tabela II: MDS glede na tveganje (1, 3, 7).

Visoko tveganje	Nizko tveganje
Visoko tveganje po IPSS	Nizko tveganje po IPSS
Vmesno-2 tveganje po IPSS	Vmesno-1 tveganje po IPSS
Zelo visoko tveganje po WPSS	Vmesno tveganje po WPSS
Visoko tveganje po WPSS	Nizko tveganje po WPSS
	Zelo nizko tveganje po WPSS

1.1.4.1. Mednarodni napovedni točkovni sistem IPSS

Mednarodni napovedni točkovni sistem (IPSS) je standard, s katerim ocenijo resnost MDS pri posameznemu bolniku, ki še ni zdravljeno. Sklicujoč na to oceno bolniku določijo načrt zdravljenja. IPSS sistem temelji na treh napovednih kazalcih, s katerimi napovemo resnost bolezni, in sicer (1, 7):

- odstotek blastnih celic v kostnem mozgu;
- kromosomske spremembe v karyotipu;
- citopenija ene ali več celičnih vrst v krvni sliki.

Vsakemu izmed teh kazalcev so določili točke. IPSS oceno posameznega bolnika predstavlja seštevek vseh posameznih točk treh zgoraj naštetih napovednih kazalcev (Tabela III) (7).

Tabela III: Napovedni kazalci IPSS (1, 7).

Napovedni kazalec	Opomba	Vrednosti	Točke
Blasti v KM (%)		<5	0
		5–10	0,5
		10–20	1,5
		21–30	2,0
Kariotip	normalen kariotip, -Y, del(5q), del(20q)	ugoden	0
	vse ostale spremembe	vmesen	0,5
	kompleksno preurejeni kariotip, spremembe 7. kromosoma, spremembe 3. kromosoma	neugoden	1,0
Citopenije^a	hemoglobin < 100 g/L	0 ali 1 2 ali 3	0 0,5

^aVrednost vsake citopenije je 1. KM: kostni mozeg

Skupna ocena pove, v katero skupino tveganja bolnik z MDS sodi (Tabela IV). Poznamo štiri IPSS skupine tveganja, in sicer skupine v katerih je tveganje (7):

- nizko;
- vmesno-1;
- vmesno-2;
- visoko.

Tabela IV: Skupine tveganja po IPSS (1, 7, 8).

IPSS ocena	Tveganje	Povprečno preživetje v letih
0	Nizko	7,0
0,5–1,0	Vmesno-1	3,6
1,5–2,0	Vmesno-2	1,5
≥2,5	Visoko	0,9

Zlasti zaradi slabo razdelanega pomena citogenetskih sprememb so IPSS sistem dopolnili, od takrat dalje obstaja kot sistem IPSS-R (angleško Revised International Prognostic Scoring System). Novi, obsežnejši sistem vsebuje iste napovedne dejavnike kot osnovni IPSS, le da so ti bolj specifično določeni. Prikazuje 5 dejavnikov tveganja: blaste, kariotip, hemoglobin, število nevtrofilcev in število trombocitov (Tabela V) (7, 8).

Tabela V: Napovedni kazalci IPSS-R (7, 8).

Napovedni kazalec	Opomba	Vrednost	Točke
Blasti v KM (%)		≤ 2	0
		3–4	1
		5–10	2
		>10	3
Kariotip	-Y, del(11q) – 1. citogenetska skupina	zelo ugoden	0
	normalen kariotip, del(5q), del(12p), del(20q)	ugoden	1
	– 2. citogenetska skupina		
	del(7q), +8, +19, i(17q), katerikoli drug neodvisen klon – 3. citogenetska skupina	vmesen	2
	-7, inv(3) ali +3 ali del(3q), 3 spremembe – 4. citogenetska skupina	neugoden	3
	kompleksno preurejeni kariotip (več kot 3 spremembe) – 5. citogenetska skupina	zelo neugoden	4
Citopenije	hemoglobin [g/L]	≥ 100	0
		80–<100	1
		<80	1,5
	absolutno število nevtrofilcev ($\times 10^9$ /L)	$\geq 0,8$	0
		<0,8	0,5
	število trombocitov ($\times 10^9$ /L)	≥ 100	0
		50– <100	0,5
		<50	1

Glede na IPSS-R oceno tveganja (Tabela VI) bolnike razdelimo v 5 skupin tveganja po IPSS-R – na tiste, ki imajo (7, 8):

- zelo nizko;
- nizko;
- vmesno;
- visoko;
- zelo visoko tveganje.

Tabela VI: Skupine tveganja po IPSS-R (7, 8).

IPSS-R ocena	Tveganje	Povprečno preživetje v letih
0–1,5	Zelo nizko	8,8
>1,5–3	Nizko	5,3
>3–4,5	Vmesno	3,0
>4,5–6	Visoko	1,6
> 6	Zelo visoko	0,8

Višja kot je ocena, večje je tveganje, slabši je potek bolezni oziroma krajše je preživetje.

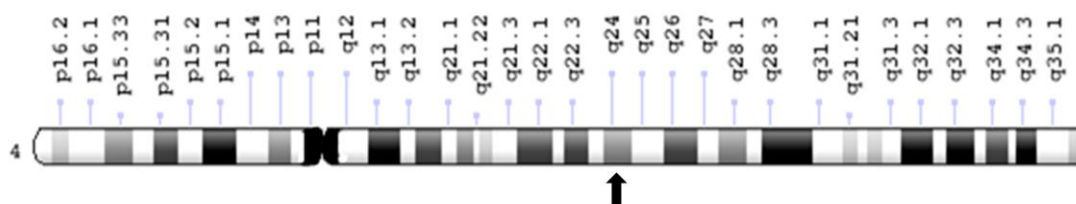
1.1.5. ZDRAVLJENJE

Bolezen zdravijo šele takrat, ko ima bolnik težave zaradi anemije, okužb ali krvavitev (1). Pomemben namen zdravljenja je namreč lajšanje težav in izboljšanje kakovosti življenja. Pri načrtovanju zdravljenja je pomembno upoštevati starost bolnika, njegovo telesno zmogljivost, pridružene bolezni in skupino tveganja. Izboljšanje bolnikovega stanja lahko dosežemo s podpornim zdravljenjem s transfuzijami, pri bolnikih z anemijo s transfuzijami eritrocitov in v primeru težav zaradi krvavitev s transfuzijami trombocitov. Okužbe pri febrilni neutropeniji zdravijo s širokospektralnimi baktericidnimi antibiotiki, ki so usmerjeni proti najverjetnejšim povzročiteljem okužbe. Druga možnost je zdravljenje, ki spodbudi hematopoezo in, če je to uspešno, govorimo o hematološkem izboljšanju. Tretji način zdravljenja pa je proti MDS usmerjeno zdravljenje, s katerim želimo spremeniti naravni potek bolezni, torej doseči popolno ali vsaj delno remisijo ter s tem podaljšati preživetje. Pri bolnikih z nizkim tveganjem je cilj zdravljenja vzpostavitev normalne hematopoeze z rastnimi dejavniki, imunosupresivi in imunomodulatorji. Pri bolnikih z

visokim tveganjem je cilj zdravljenja izboljšati preživetje, kar dosežemo z intenzivno kemoterapijo in alogensko presaditvijo krvotvornih matičnih celic, možno pa je tudi zdravljenje s hipometilacijskimi zdravili (zaviralci DNMT) (3, 6).

1.2. GEN IN PROTEIN TET2

V družini genov *TET* so 3 člani – *TET1*, *TET2* in *TET3*. Prvi je bil leta 2009 odkrit *TET1*, kot fuzijski partner gena *KMT2A* pri otroški AML, pri translokaciji t(10;11)(q22;q23). Po tej translokaciji (ang. ten-eleven translocation) ima celotna družina genov ime. Gen *TET2* se nahaja na četrtem kromosomu na področju 4q24 (Slika 1). Je tumor supresorski gen, ki kodira protein TET2. Proteini TET so od α -ketoglutarata (α -KG) in železa odvisne dioksidaze, vključene v pretvorbo 5-metil citozina (5-mC) v 5-hidroksimetil citozin (5-hmC), 5-formil citozin (5-fC) in 5-karboksil citozin (5-caC) (6, 9, 10, 11, 12).



Slika 1: Lokacija gena *TET2* (13).

1.2.1. METILACIJA IN DEMETILACIJA DNA

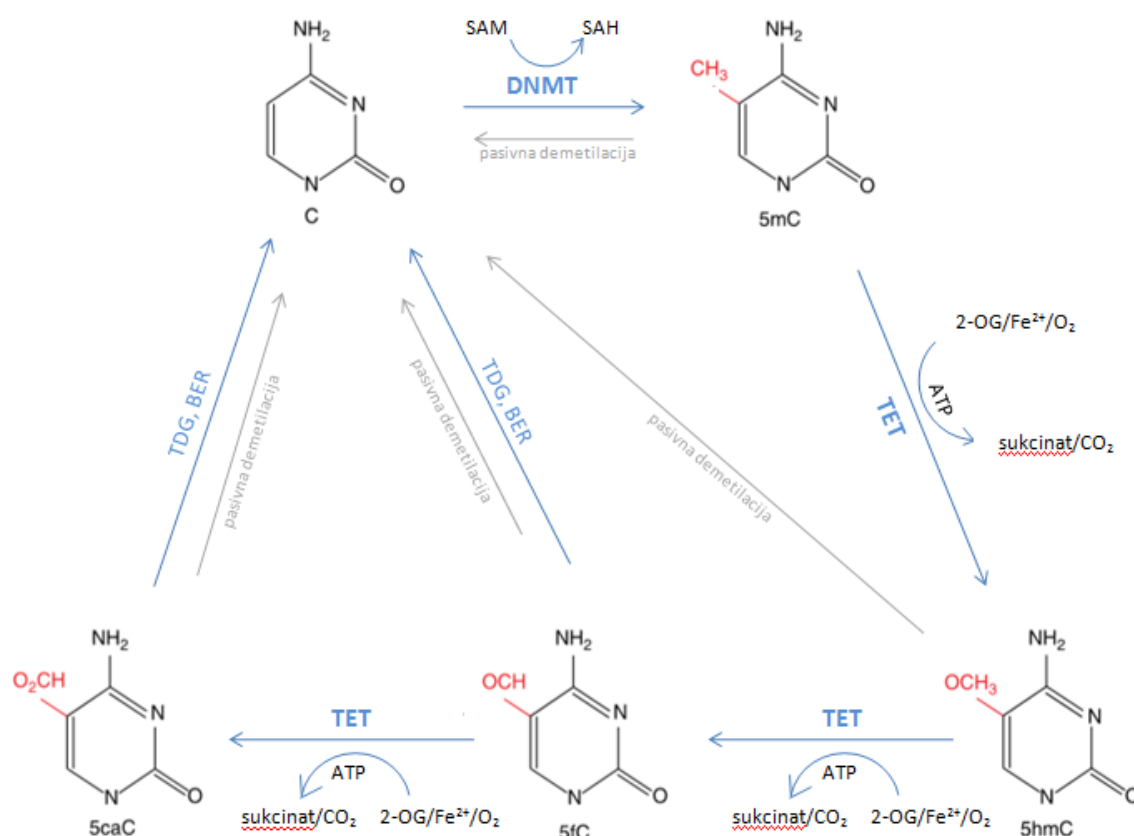
Proteini TET so ključni regulatorji demetilacije DNA (9). Neravnovesje med metilacijo in demetilacijo DNA je tesno vpleteno v nastanek in napredovanje novotvorb (14).

Metilacija citozinskih ostankov je ena najbolj kritičnih epigenetskih regulacij izražanja genov (9). Metilacija DNA kontrolira raznolike biološke procese, kot so inaktivacija kromosoma X, ekspresija in vtisnenje genov. Napačno regulirano metilacijo DNA opazimo pri rakastih celicah in obsega tako napačno utišanje tumor supresorskih genov zaradi hipermetilacije DNA v njihovih promotorjih, kot tudi globalno hipometilacijo DNA, ki vodi v zmanjšano genomsko stabilnost. Oba procesa pripomoreta k onkogenezi in napredovanju tumorja (14). Metilacija promotorja tumor supresorskih genov je eden ključnih mehanizmov za razvoj raka (9, 12).

V normalnih celicah je metilacija DNA posredovana z DNA metiltransferazami (DNMT), ki prenesejo metilno skupino iz S-adenozil metionina (SAM) na 5'-ogljik na citozinu (14).

DNMT1 je odgovorna za vzdrževanje vzorcev metilacije genomske DNA, DNMT3A in DNMT3B sta odgovorni za *de novo* metilacijo DNA, čeprav vsi ti encimi lahko pripomorejo tako k vzdrževalni kot tudi *de novo* metilaciji DNA (11). Metilacija DNA poteka skoraj vedno znotraj dinukleotida CpG, metiliranih je 70–80 % CpG (15). S tem, ko DNMT prenese metilno skupino iz SAM na citozin, nastane 5-mC, ki predstavlja približno 1 % vseh baz in približno 60 % vseh CpG dinukleotidov (14).

Proteini TET so ključni pri demetilaciji DNA. Oksidirajo 5-mC, nastanejo baze 5-hmC, 5-fC in 5-caC, ki jih s skupnim imenom poimenujemo okso-mC in so prikazane na Sliki 2 (6, 9, 14).

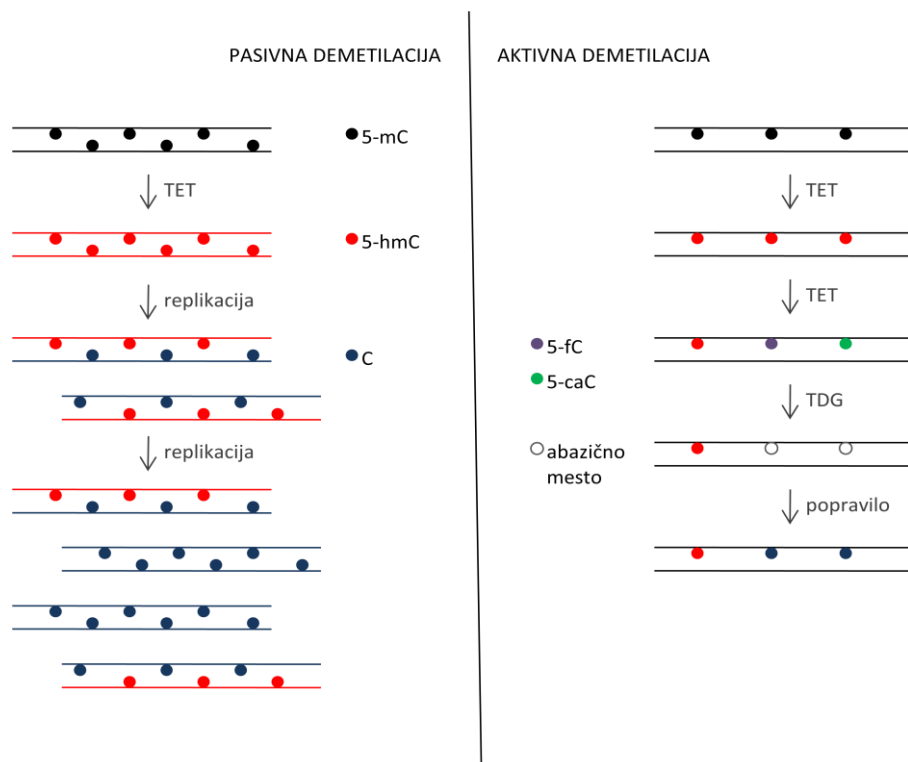


Slika 2: Shematski prikaz metilacije in demetilacije DNA. Povzeto po (14).

ATP: adenzin trifosfat; BER: popravljanje z izrezom baze (ang. base excision repair); DNMT: DNA metil transferaza; TDG: timin DNA glikozilaza; SAH: S-adenozil homocistein ; SAM: S-adenozil metionin; 2-OG: 2-oksoglutarat.

Demetilacijo DNA lahko razdelimo v dve vrsti (Slika 3) (11, 12, 14, 15):

- a) pasivna, od replikacije odvisna, in
- b) aktivna demetilacija DNA.



Slika 3: Shematski prikaz razlik med pasivno in aktivno demetilacijo. Povzeto po (15).

Pasivna demetilacija DNA se nanaša na izgubo 5-mC med uspešnimi serijami replikacije DNA v odsotnosti vzdrževalnega mehanizma metilacije DNA (15). Med replikacijo DNMT1 ne prepozna 5-hmC, zato pretvorba 5-mC v 5-hmC zavira vzdrževanje metilacijskih vzorcev in vodi v pasivno demetilacijo DNA v celicah, ki se razmnožujejo (12). Oksi-mC intermediati potencirajo pasivno demetilacijo DNA, s tem, ko preko kompleksa DNMT1/Uhrf1 interferirajo vzdrževalno metilacijo DNA (9, 14).

Aktivna demetilacija DNA se nanaša na encimski proces, ki odstrani oziroma spremeni metilno skupino iz 5-mC (15). Gre za od replikacije neodvisno pot, pri kateri imajo vlogo proteini TET (12). Pretvorbi 5-hmC v 5-fC in 5-caC sledi izrez slednjih dveh z DNA popravilnim encimom timin DNA glikozilazo (TDG), ki nima aktivnosti za izrez 5-hmC. Izrezu 5-fC ali 5-caC pa sledi povračilo spremenjenih baz v nespremenjen citozin preko

poti popravljanja z izrezom baze (BER) (12, 14). Aktivna demetilacija je v bistvu encimska pretvorba 5-mC v citozin (12).

Poleg pasivne in aktivne demetilacije DNA je hipotetično mogoča tudi prepoznavna 5-hmC z deaminazami AID/APOBEC in pretvorba v 5-hidroksimetil uracil (5-hmU). Tudi to bazo lahko izreže TDG, ki mu sledi BER (11, 12).

Proteini TET torej preko kontroliranega nastajanja oksi-mC oblik in njihove naknadne povezave s proteinskimi kompleksi, ki so vključeni v modulacijo kromatinske strukture ali popravilo DNA, regulirajo gensko transkripcijo (11).

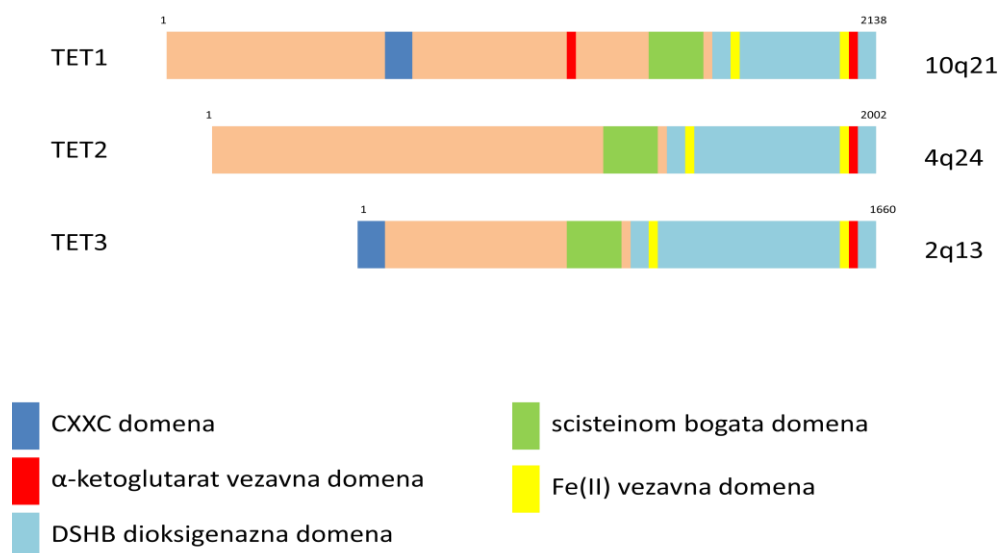
1.2.2. STRUKTURA IN FUNKCIJE PROTEINOV TET

Proteini TET so dioksisgenaze, odvisne od kosubstrata α -KG in kofaktorja železa. Njihova EC številka je 1.14.11.n2 (10, 14, 16, 17). Glavna funkcija proteinov TET je preprečiti nezaželeno metilacijo nemetiliranih področij DNA. Vsak izmed proteinov TET pa ima tudi specifične funkcije (11):

- TET1 oksidira 5-mC v 5-hmC;
- TET2 in TET3 stimulirata odstranitev 5-hmC.

Med seboj se člani proteinske družine TET razlikujejo v strukturi in področjih, kjer so bolj izraženi. Izmed vseh treh članov, se le TET2 nahaja predvsem v hematopoetskem tkivu (6, 11). Na Sliki 4 so prikazane skupine strukturne značilnosti proteinov TET (9, 11):

- C' terminalni del proteina ima katalitično dvojno verižno β heliks (DSBH) dioksisgenazno domeno, ki pretvori 5-mC. Ta domena vsebuje 1 vezavno mesto za α -KG in 3 za železo, ki sta nujna za katalitično aktivnost te domene in proteina samega.
- Na sredini proteina TET, tik pred DSHB, se nahaja domena, bogata s cisteinom, ki ima zaenkrat še neznano funkcijo.
- N' terminalna regija pri TET1 in TET3 vsebuje CXXC domeno, ki je nujna za vezavo na nemetilirane citozinske ostanke v DNA.
- TET2 CXXC domene nima, ta naj bi se v evoluciji odcepila in postala neodvisen CXXC kodirajoč gen *IDAX*, ki se nahaja na 5'-koncu gena *TET2* in služi za vezavo proteina TET2 na DNA preko fizične interakcije.



Slika 4: Shematski prikaz strukture proteinov TET. Povzeto po (9).

1.3. VLOGA TET2 PRI MDS

Zaradi genomskih delecij ali mutacij pri številnih odraslih bolnikih s hematološkimi mieloidnimi rakavimi obolenji, vključno z AML, MDS, mieloproliferativnimi neoplazmami (MPN), in limfatičnimi novotvorbami pride do inaktivacije proteina TET. Mutiran je predvsem TET2, TET1 in TET3 sta pri hematoloških novotvorbah večinoma intaktna. Pri MDS opazimo izgubo funkcije proteina TET2 pri 6–26 % bolnikov. Večina mutacij *TET2* je heterozigotnih, homozigotne so le pri enostarševski disomiji kromosomskega področja 4q24. Do mutacije (nesmiselne, drugačnosmiselne, premika okvirja) pride v katalitični domeni proteina. Mutacije v TET2 so povezane z zmanjšanjem števila 5-hmC in povečanjem števila 5-mC, glede na vzorce z nemutiranim TET2 (6, 9, 11, 14, 18, 19).

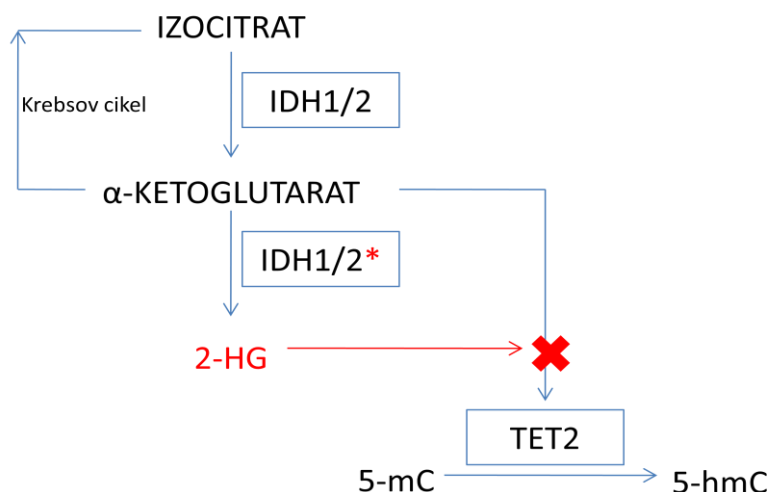
Mutacije v *TET2* so ene najpogostejših genetskih sprememb pri MDS (18, 20). Pri tej bolezni je mutacija v *TET2* zgodnji onkogeni dogodek, ki vodi v klonski razrast levkemičnih celic. Mutacija v *TET2* je močno povezana s povečano proliferacijo hematopoetskih progenitornih celic, vendar so za napredovanje malignega fenotipa poleg mutacije v *TET2* potrebne še mutacije v drugih genih (14, 21).

O izgubah gena *TET2* trenutno ni veliko znanega. Delecije *TET2* se pri MDS pojavljajo ponavljajoče a redko, prevalenca delecije pa se povečuje s starostjo (19). Izguba gena *TET2* naj bi imela po nekaterih podatkih ugoden vpliv na preživetje (18), čeprav v novejših

raziskavah navajajo, da povezave med prisotnostjo delecije in daljšim preživetjem ni (20, 21). Prav tako najdemo nasprotujoče si podatke o povezavi del(4)(q24) in prehodom MDS v sAML (18, 20). Izgube gena *TET2* lahko določamo z molekularni preiskavami in preiskavo FISH, kot dodatek k standardni citogenetski preiskavi (19,21).

1.3.1. IZOCITRAT DEHIDROGENAZA (IDH)

Geni *IDH* kodirajo ključne encime Krebsovega cikla, ki pretvarjajo izocitrat v α -KG oziroma 2-oksoglutarat (2-OG), ki je esencialni kofaktor proteinov *TET2*. Zaradi mutacije v *IDH1/2* dobi protein aktivnost, da ustvari nov onkometabolit 2-hidroksiglutarat (2-HG). 2-HG kompetitivno inhibira funkcijo vseh od α -KG odvisnih dioksigenaz (Slika 5). Mutirani proteini *IDH* inhibirajo encimsko aktivnost proteinov *TET2* in zmanjšajo raven 5-hmC (9, 11, 14).



Slika 5: Shematski prikaz inhibicije proteinov *TET2* z mutirano *IDH1/2*. Povzeto po (9).

Poznamo 3 encime *IDH*, pri hematoloških novotvorbah sta pogosto mutirana *IDH1* in *IDH2*. Mutacija v *IDH* ima za dioksigenaze dve posledici: zmanjša se koncentracija 2-OG in zveča koncentracija 2-HG. Koncentracija onkometabolita je v celicah brez mutacije pod 0,1 mM, v celicah z mutirano *IDH* pa doseže koncentracije 1–30 mM (14).

Mutacije v *TET2*, *IDH1* in *IDH2* so medsebojno izključujoče. Tako kot mutacija v *TET2*, tudi mutacija v *IDH* sama po sebi ni dovolj za nastanek in razvoj raka, nujne so še dodatne mutacije (11, 14).

1.3.2. O-GlcNAc TRANSFERAZA (OGT)

Rakaste celice imajo običajno spremenjen metabolizem, pri njih se poveča poraba glukoze in glutamina. Zaradi večje porabe glukoze se poveča nastajanje zadnjega produkta heksozaminske biosintezne poti, N-acetilglukozamina (GlcNAc) (14).

TET vezavni protein O-GlcNAc transferaza (OGT) je ključni encim za prenos N-acetilglukozaminske (O-GlnNAc) skupine na serinski ali treoninski aminokislinski ostanek tarčnih proteinov – npr. histon 2B (H2B) in »host cell factor 1« (HCF1). S tem prenosom OGT kontrolira lokalizacijo, stabilnost in encimsko aktivnost proteinov. Prenos O-GlnNAc skupine na serinski aminokislinski ostanek na H2B je eden izmed ključnih znakov aktivacije transkripcije gena. Prenos na HCF1 pa učinkuje na metilacijo lizinskega ostanka na histonu 3. Interakcija OGT s proteinom TET obogati katalitično aktivnost transferaze, poveča se prenos O-GlnNAc skupine na H2B in HCF1. OGT interagira s katalitično domeno proteina TET2, vendar ne vpliva na njegovo dioksidogenazno aktivnost. Modifikacija proteinov TET z O-GlnNAc poveča njihovo stabilnost, proteini TET pa olajšajo prenos O-GlnNAc na histone (9, 14).

Napačen metabolizem glukoze pri rakastih celicah spremeni acetilglukozaminacijo proteinov TET, s tem pa vpliva na njihovo stabilnost. Izguba funkcije TET pa vpliva na porazdelitev OGT, kar vpliva na stabilnost tumor supresorskih genov in onkogenov (14).

1.3.3. TET KOT TARČA ZDRAVILNIH UČINKOVIN

Pri različnih vrstah raka je ekspresija in aktivnost proteinov TET oslABLJENA oziroma okvarjena. Za zdravljenje bi bila smiselna uporaba učinkovin, ki bi omogočile modulacijo oslABLJENE aktivnosti proteinov. Trenutno so najbolj obetajoči inhibitorji DNMT in IDH, nekateri med njimi so že odobreni za uporabo v klinične namene. Za zdravljenje MDS z visokim tveganjem sta trenutno odobrena azacitidin in decitabin ter njuni derivati. Ta dva inhibitorja DNMT sta analoga citidina, ki imata dušik namesto ogljika na 5'-mestu pirimidinskega obroča. Naključno se vgradita v genomsko DNA, kovalentno vezeta in osiromašita DNMT ter s tem onemogočita demetilacijo DNA (6, 14).

Potencialno pa bi lahko uporabljali tudi spojine, ki povečajo ekspresijo genov *TET* ali potencirajo aktivnost proteinov TET. Med druge štejemo vitamin C, ki deluje na vse od 2-OG in Fe(II) odvisne dioksidogenaze. Je donor elektronov, najučinkovitejša spojina za

recikliranje Fe(II) med katalizo z dioksigenazami. Vitamin C poveča aktivnosti proteinov TET, saj deluje kot njihov kofaktor pri pretvorbi 5-mC v 5-hmC in s tem poveča nastanek slednjega. Na ekspresijo genov *TET* pa vitamin C ne učinkuje (14, 17).

2. NAMEN DELA

V nasprotju z drugimi mutacijami so delecije gena *TET2* malo raziskane. Naš namen bo preveriti njihovo pogostost pri slovenskih bolnikih z MDS.

Raziskavo bomo opravili s preiskavo FISH s komercialno dostopno DNA-sondo. Pred uporabo pri vzorcih bolnikov z MDS bomo določili:

- specifičnost za novo DNA-sondo,
- mejne vrednosti za DNA-sondo, pri kateri se izda pozitiven izvid.

Za oceno resnosti MDS oziroma oceno tveganja za slabši potek bolezni pri posameznemu bolniku uporabljamo IPSS-R (7). Zato bomo pred analizo vzorcev za vsakega preiskovanca po IPSS-R sistemu določili:

- citogenetsko skupino,
- skupino tveganja.

Po opravljeni analizi vzorcev pa bomo:

- primerjali prisotnost del(4)(q24) glede na citogenetsko skupino IPSS-R,
- primerjali prisotnost del(4)(q24) glede na skupino tveganja po IPSS-R,
- primerjali rezultate pridobljene z našo analizo metodo (FISH) z rezultati standardne citogenetske preiskave,
- ugotovili ali je FISH ustrezna metoda za odkrivanje delecij *TET2*.

3. MATERIALI IN METODE

3.1. VZORCI

Uporabili smo arhivirane vzorce 60-ih bolnikov, katerim so v Specializiranem hematološkem laboratoriju s standardno citogenetsko preiskavo in metodo FISH postavili diagnozo MDS po WHO kriterijih. Preiskavo smo izvedli na vzorcih, ki so bili pridobljeni med januarjem 2008 in julijem 2016. Vzorci so bili kostni mozeg, ki so ga ustrezno kultivirali, celice izolirali, jih obdelali s hipotonično raztopino in trajno fiksirali. Dodatno smo postopek izvedli še na 10-ih vzorcih zdravih preiskovancev, ki jih laboratorij pridobi za določitev mejnih vrednosti za DNA-sondo. Pri izbiri vzorcev smo poskusili zajeti vse citogenetske skupine (po IPSS-R). Raziskava je bila odobrena s strani Komisije za medicinsko etiko (KME 68/01/16).

3.2. FLUORESCENČNA *IN SITU* HIBRIDIZACIJA

Fluorescenčna *in situ* hibridizacija (FISH) je tehnika, ki omogoča identifikacijo specifičnih genetskih sprememb v celicah. FISH temelji na specifični interakciji med tarčnim zaporedjem DNA iz vzorca in predhodno označenim komplementarnim zaporedjem DNA, ki ga imenujemo DNA-sonda. Ker s fluorescenčnim barvilom označena sonda hibridizira na tarčno zaporedje, lahko vrednotimo rezultat s fluorescenčnim mikroskopom (22).

3.2.1. MATERIALI

Za izvedbo postopka FISH smo uporabili naslednje kemikalije in reagente:

- destilirana H₂O;
- absolutni etanol - Sigma, St. Louis, ZDA;
- očetna kislina - Merck, Darmstadt, Nemčija;
- 20x SSC, 2x SSC;
- NaCl- Kemika, Zagreb, Hrvaška
- Na₃C₆H₅O₇·2H₂O - Kemika, Zagreb, Hrvaška;
- MgCl₂- Kemika, Zagreb, Hrvaška;
- Pepsin - Sigma, St. Louis, ZDA;
- HCl - Kemika, Zagreb, Hrvaška;
- 37 % formaldehid - Sigma, St. Louis, ZDA;

- hibridizacijski pufer Vysis – Abbott, Illinois, ZDA;
- DNA-sonda SureFish4q24 TET2 - Agilent Technologies, Kalifornija, ZDA;
- detergent NP-40 - BDH Chemicals Ltd., Poole, Velika Britanija;
- PBT;
- 6 % raztopina BSA - Kemika, Zagreb, Hrvaška;
- Tween 20 - Sigma, St. Louis, ZDA;
- 10x PBS pufer, 1x PBS pufer;
- Barvilo DAPI - Abbott, Illinois, ZDA.

3.2.1.1. Priprava raztopin

- Raztopina za fiksacijo:
 - › absolutni etanol : očetna kislina (brezvodna) = 3:1
- 20x SSC:
 - › 3 M NaCl (175,3g/L)
 - › 0,3 M Na₃C₆H₅O₇·2H₂O (88,25 g/L)
 - › dolijemo vodo, uravnamo pH vrednost na 6.3 in dopolnimo do 1 L
 - › prefiltriramo preko 0,45 µm filtra
- 2x SSC:
 - › zmešamo 100 mL 20x SSC in 850 mL destilirane vode
 - › uravnamo pH vrednost na 7.0±0.2
 - › z destilirano vodo dopolnimo do 1000 mL
- Raztopina formaldehida:
 - › raztopino pripravimo v 100 mL bučko
 - › 5 mL 1M MgCl₂
 - › 2,5 mL 37 % formaldehida
 - › do 100 mL z 2x SSC
- Raztopina pepsina (0,005 %):
 - › raztopino pripravimo v 100 mL bučko
 - › 99 mL destilirane vode
 - › 1 mL 1M HCl
 - › dodamo 200 µL koncentrirane raztopine pepsina
- Spiralna raztopina po hibridizaciji NP-40:
 - › 0,9 g detergenta NP-40

- › 60 mL 20xSSC
- › 240 mL destilirane vode
- › raztopino pustimo čez noč, da se detergent zanesljivo raztopi
- › prefiltriramo preko 0,2 µm sterilnega filtra
- 10x PBS pufer:
 - › 80 g/L NaCl
 - › 2 g/L KCl
 - › 2 g/L KH₂PO₄
 - › 14,41 g/L Na₂HPO₄·2H₂O
 - › dolijemo destilirano vodo do 900 mL
 - › uravnamo pH vrednost na 7.4
 - › dolijemo destilirano vodo do 1000 mL
- 1x PBS pufer:
 - › 100 mL 10x PBS pufra
 - › dolijemo destilirano vodo do 1000 mL
 - › uravnamo pH vrednost na 7.4
- PBT:
 - › pripravimo v 1000 mL bučko
 - › 4 mL BSA (6 % raztopina)
 - › 1 mL Tween 20
 - › dopolnimo do oznake z 1 % PBS pufrom
 - › pustimo čez noč in prefiltriramo preko 0,2 µm filtra

3.2.2. PRIPOMOČKI IN APARATURE

Pripomočki:

- bučke (1000, 2000 mL);
- centrifugirke (15 mL) – Greiner Bio-One, Frickenhausen, Nemčija;
- črne mikrocetrifugirke (1,5 mL);
- diamantno rezilo;
- gumijast cement Fixo gum - Marabu, Tamm, Nemčija;
- krovna stekla (18x18 mm², 24x50 mm²) -Brand, Wertheim, Nemčija;
- merilni valji (100 mL);
- objektna stekla - Brand, Wertheim, Nemčija;

- parafilm;
- pasteurjeve pipete 3 mL - Falcon, Kalifornija, ZDA;
- pincete;
- pipete (10, 20, 100, 1000 μ L) z nastavki -Eppendorf, Hamburg, Nemčija;
- pipeta Easypet - Eppendorf, Hamburg, Nemčija;
- staničevina;
- steklene kivete za objektna stekla
- sterilne pipete Dispenser (5, 10 mL);
- štoparice;
- rokavice.

Aparature:

- centrifuga;
- centrifuga minispin - Eppendorf, Hamburg, Nemčija;
- fluorescenčni mikroskop BX41 -Olympus, Penssylvania, ZDA;
- grelna plošča -Termoproc, Ljubljana, Slovenija;
- hibridizator Thermobrite - Abbott, Illinois, ZDA;
- invertni mikroskop Eclipse - Nikon, Tokio, Japonska;
- laminarna komora - Iskra Pio, Šentjernej, Slovenija;
- OptiChrome komora -EuroClone, Milano, Italija;
- pH meter SevenEasy -Mettler Toledo, Ohio, ZDA;
- stresalnik Vortex,
- tehnica;
- vodna kopel.

3.2.3. NANOSI NA STEKLA

Da smo lahko izvedli postopek FISH, smo morali predhodno ustrezno izolirane in fiksirane celice nanesti na objektna stekla.

Nova stekla smo pred uporabo zložili v kadičko za objektna stekla in jih najprej pustili 20 min pod toplo tekočo vodo ter nato še 10 min pod mrzlo. Na koncu smo jih sprali z destilirano vodo in tako pripravljene pustili v kadički, ki smo jo napolnili z destilirano vodo.

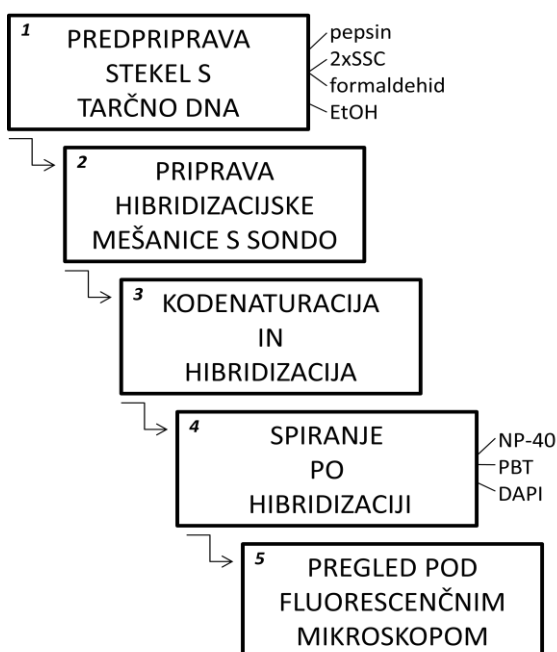
Vzorci smo med tem vzeli iz zamrzovalnika, jih prestavili v centrifugirke, jim dodali raztopino za fiksacijo in centrifugirali 10 min pri 1600 rpm. Nato smo odstranili toliko supernatanta, da smo dobili ustrezno gostoto celic.

20 μ L vzorca smo nato odpipetirali na še mokro steklo, ki smo ga nato položili v komoro Optichrom za 4 min. Pod invertnim mikroskopom smo preverili gostoto celic ter z diamantnim rezilom označili področje, kamor smo kasneje nanесли sonde.

Po tem smo stekla na termoplošči starali pol ure pri 60 °C in nato še pol ure pri 90 °C (23).

3.2.4. POSTOPEK FISH

Postopek FISH je sestavljen iz več korakov, ki so prikazani na spodnji sliki (Slika 6) in opisani v nadaljevanju.



Slika 6: Koraki v postopku FISH.

3.2.4.1. Predpriprava stekel s tarčno DNA

V vodni kopeli smo na 37 °C segreli kiveti za objektna stekla z 2x SSC in raztopino pepsina. Objektna stekla z vzorci smo v vsaki zaporedoma pustili 5 min.

Na sobni temperaturi smo pripravili kivete z 2x SSC, raztopino formaldehida in etanolom. Vanje smo zaporedoma prestavljali stekla z vzorci:

- 2x SSC, 2 min
- 2x SSC, 2 min
- 2x SSC, 2 min
- raztopina formaldehida, 10 min
- 2x SSC, 2 min
- 2x SSC, 2 min
- 2x SSC, 2 min
- 70 % EtOH, 2 min
- 90 % EtOH, 2 min
- 100 % EtOH, 2 min

Stekla smo posušili na zraku (24).

3.2.4.2. Priprava hibridizacijske mešanice s sondo

Sondo in pufer smo odtalili, ju na hitro premešali na vrtinčastem mešalu in centrifugirali. V črno epico smo za vsak vzorec odpipetirali:

- 3,5 μ L hibridizacijskega pufra,
- 0,5 μ L sonde,
- 1 μ L vode.

Pripravljeno mešanico smo premešali in centrifugirali, da se je vsa vsebina zbrala na dnu (24).

3.2.4.3. Kodonaturacija in hibridizacija

Na suha stekla z vzorcem smo dodali hibridizacijsko mešanico s sondo, po 5 μ L na vsako steklo, in prekrili s krovnim stekelcem (18x18 mm²). Krovna stekelca smo zalepili z gumijastim lepilom.

Stekla smo nato položili v hibridizator in denaturirali 5 minut pri 78°C ter nato čez noč hibridizirali pri 37 °C (24).

3.2.4.4. Spiranje stekel po hibridizaciji

Iz objektnih stekel smo odstranili krovna stekla in gumijasto lepilo. Postavili smo jih v:

- spiralno raztopino NP-40, ki smo jo predhodno segreli na 37 °C, za 4 min

- PBT na sobni temperaturi za 4 min.

Na mokro steklo smo nato kanili 10 μL DAPI in ga prekrili z velikim krovnim steklom (24x50 mm²). S staničevino smo popivnali in posušili stekla, jih položili v črno škatlo in jih pustili v hladilniku za pol ure.

Preparate smo pogledali pod fluorescenčnim mikroskopom pod 1000-kratno povečavo (24, 25). Vsak preparat sta pregledala dva analitika, vsak je analiziral 200 celic. Rezultat je povprečje teh dveh štetij.

3.2.5. MEJNE VREDNOSTI ZA DNA-SONDO

Za izdajo pozitivnega izvida moramo za vsako sondo posebej določiti njene mejne vrednosti. Za določitev mejnih vrednosti za DNA-sondo SureFish smo uporabili 10 vzorcev celic venske krvi zdravih darovalcev, za katere smo naredili analizo FISH po enakem postopku kot za vzorce bolnikov (26, 27).

3.2.6. SPECIFIČNOST DNA-SONDE

Za kontrolo kakovosti je pomembno, da poznamo specifičnost vsake DNA-sonde. Specifičnost sonde predstavlja delež vseh prešteti signalov, ki se pojavijo na pričakovani lokaciji. Poleg tega, da je specifičnost podana s strani proizvajalca, moramo vsako novo sondo testirati še sami. Mi smo specifičnost DNA-sonde SureFish določili s pregledom ustreznosti hibridizacije na ustrezno področje metafaznih kromosomov (26).

3.3. STATISTIČNE METODE

Pridobljene podatke smo obdelali z računalniškima programoma Microsoft Office Excel 2007 in IBM SPSS Statistics v24.

3.3.1. DOLOČITEV MEJNE VREDNOSTI ZA DNA-SONDO

Pri 10-ih vzorcih krvi zdravih posameznikov smo izvedli preiskavo FISH z DNA-sondo SureFish in pri vsakem prešteli signale ter določili delež pozitivnih. Rezultate vseh 10-ih kontrolnih vzorcev smo zbrali v tabeli (Tabela VII), izločili največjo pozitivno vrednost in na osnovi porazdelitve beta za to vrednost izračunali mejno vrednost po spodnji formuli:

$$MEJNA\ VREDNOST = BETAINV(0,95; N+1; X)$$

0,95-interval zaupanja

N-največja določena pozitivna vrednost za testirano sondo (6+1)

X-število prešteti signalov (200)

Tabela VII: Določitev mejne vrednosti za DNA-sondo.

kontrolni vzorec	število pozitivnih celic (na 200)	del(4)(q24), delež pozitivnih celic (%)
1	2	1
2	4	2
3	3	1,5
4	2	1
5	2	1
6	3	1,5
7	6	3
8	3	1,5
9	2	1
10	6	3

Iz podatkov v Tabeli VII smo izračunali, da je mejna vrednost za DNA-sondo SureFish 5,7 %. To pomeni, da je vzorec pozitiven, če je del(4)(q24) prisotna pri vsaj 5,7 % interfaznih jeder.

Pri izračunu mejnih vrednosti s funkcijo beta-inverzija se moramo zavedati, da omenjena funkcija postavi mejne vrednosti nekoliko višje in zaradi tega lahko pride do več lažno negativnih rezultatov zaradi manj lažno pozitivnih. Druga možnost za izračun mejnih

vrednosti je interval zaupanja, ki pa v nasprotju z beta-inverzijo postavi mejne vrednosti nekoliko nižje, kar posledično privede do manj lažno negativnih, vendar več lažno pozitivnih rezultatov (26).

3.3.2. ANALIZA REZULTATOV FISH

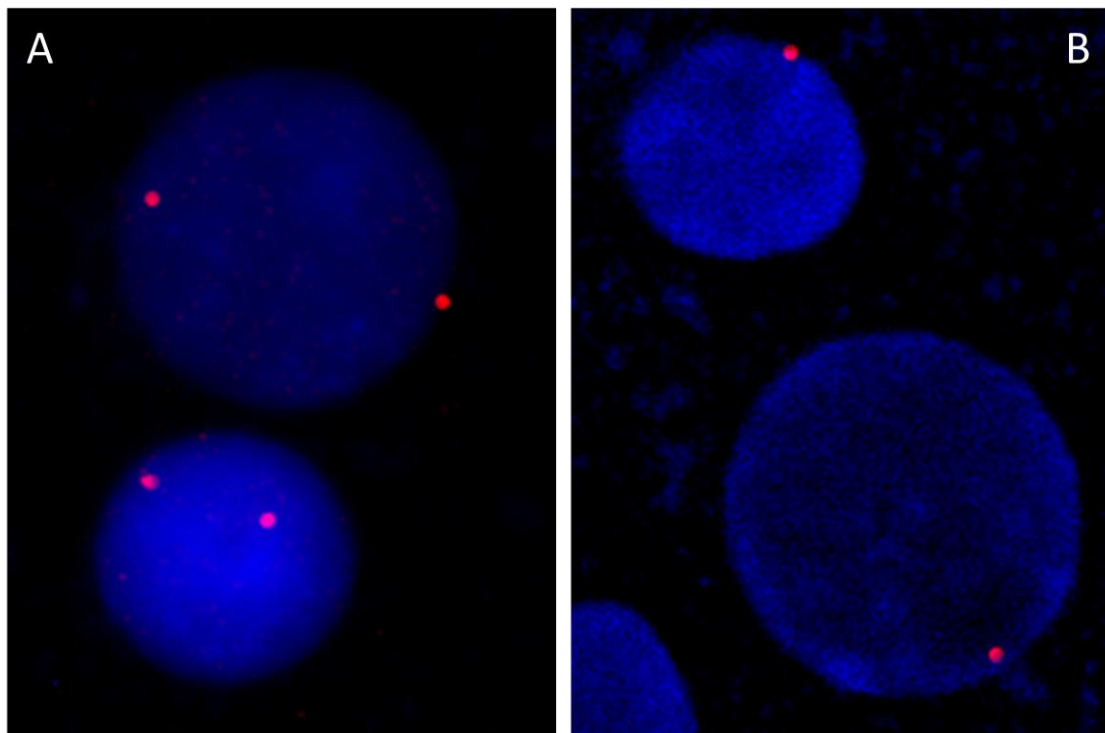
Za analizo zvezne spremenljivke starosti in prisotnost delecije *TET2* smo uporabili Mann-Whitney test. Ničelna hipoteza pravi, da je porazdelitev starosti med skupinama z in brez delecije enaka. Alternativno hipotezo, ki pravi, da porazdelitev med tema dvema skupinama ni enaka, smo sprejeli v primeru $p < 0,05$.

Ker smo imeli malo število vzorcev smo za analizo uporabili neparametrične teste. Vzorci so med seboj neodvisni, spremenljivke (spol, citogenetska skupina, skupina tveganja in prisotnost delecije) pa so nominalne. Zato smo uporabili Fisherjev natančni test verjetnosti. Postavili smo ničelno hipotezo (med spremenljivkami ni statistično značilne povezave) in alternativno (med spremenljivkami je statistično značilna povezava), ki smo jo sprejeli v primeru, ko je bila p vrednost $< 0,05$ (pri $\alpha = 0,05$). Ugotavljali smo povezavo med naslednjimi spremenljivkami:

- spol in delecija *TET2*,
- citogenetska skupina in delecija *TET2*,
- skupina tveganja in delecija *TET2*.

4. REZULTATI IN RAZPRAVA

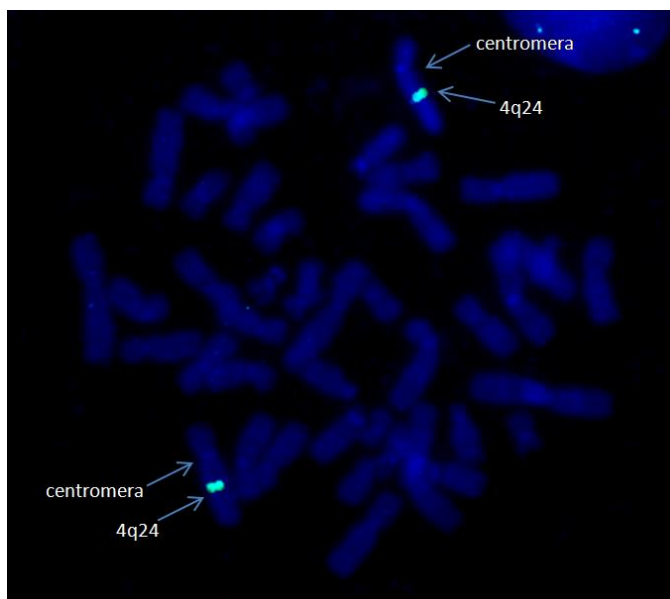
Z DNA-sondo SureFish smo določali del(4)(q24). Če je celica normalna, dobimo dva signala, saj se sonda veže na oba 4. kromosoma na področje q24 (Slika 7A). V primeru del(4)(q24) se sonda veže le na ostalo eno področje in dobimo le 1 signal (Slika 7B).



Slika 7: Vzorec signalov pri normalni celici (A) in pri celici z delecijo 4q24 (B).

4.1. DOLOČITEV SPECIFIČNOSTI DNA-SONDE

Za preverjanje specifičnosti DNA-sonde smo pregledali in poslikali 20 metafaz, na katere smo predhodno hibridizirali našo DNA-sondo. Določili smo delež tistih, kjer je hibridizacija potekla na pričakovano področje 4q24 (Slika 8) in delež tistih, kjer je potekla na neustrezno področje (26). Sonda je pri vseh metafazah hibridizirala na tarčno področje, zato je specifičnost DNA-sonde SureFish 100 %.



Slika 8: Vezava DNA-sonde na področje gena *TET2*.

4.2. DOLOČITEV del(4)(q24) PRI BOLNIKIHZ MDS

Ko smo določili mejno vrednost za del(4)(q24) in potrdili specifičnost vezave sonde, smo se lotili določanja delecije pri preiskovancih s potrjenim MDS. Delež bolnikov, ki sodijo v posamezno citogenetsko podskupino je skladen s pojavnostjo teh podskupin pri slovenskih bolnikih z MDS. Analizirali smo 60 vzorcev bolnikov z MDS, med njimi 29 žensk in 31 moških. Povprečna starost bolnikov ob postavitvi diagnoze MDS je bila 68,6 let. Skladna z literaturo (1, 3) je ugotovitev, da za MDS obolevajo predvsem starejši od 50 let (88,3 % (53/60) preiskovancev je starejših od 50 let).

Podatki o preiskovancih in rezultati so zbrani v Tabeli VIII.

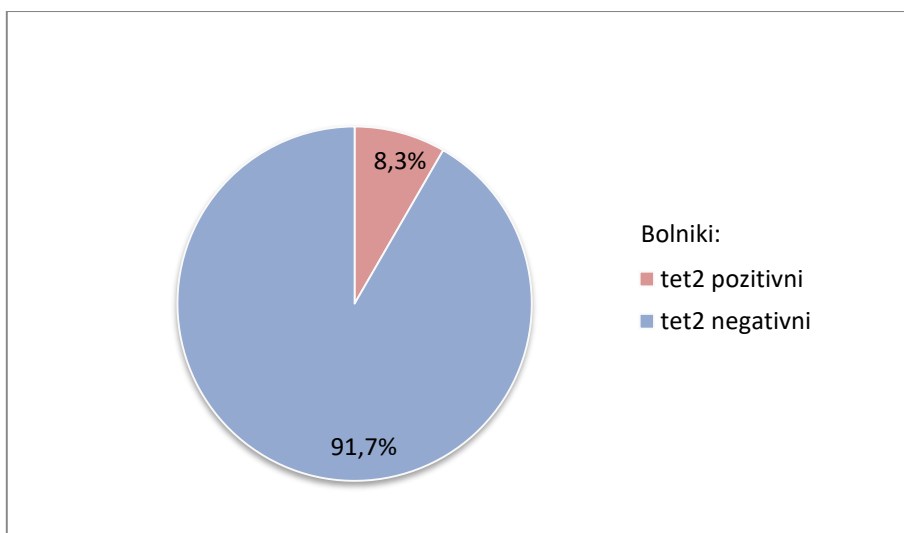
Tabela VIII: Podatki o preiskovancih in rezultati glede na podskupine preiskovancev.

	Vsi preiskovanci	Preiskovanci z del(4)(q24)
Število preiskovancev	60	5 (8,3 %)
Povprečna starost (razpon) v letih	68,6 (34–88)	65,5 (50–74)
Spol		
Ženski	29 (48,3 %)	4 (80 %)
Moški	31 (51,7 %)	1(20 %)
Kariotip		
Normalen	32 (53,3 %)	0 (0 %)
Spremenjen	28 (46,7 %)	5 (100 %)
Citogenetska skupina po IPSS-R		
1.	5	1
2.	38	0
3.	3	1
4.	4	1
5.	10	2
Skupina tveganja po IPSS-R^a		
Zelo nizko	27	0
Nizko	4	1
Vmesno	6	1
Visoko	7 + 4 ^b	1 ^b
Zelo visoko	7	1

^aZa 5 preiskovancev nismo mogli pridobiti podatka; ^bZa 4 preiskovance nismo mogli pridobiti dovolj podatkov za izračun IPSS-R ocene, vendar glede na kompleksen kariotip sodijo v skupino z vsaj visokim tveganjem.

4.2.1. POJAVNOST del(4)(q24) GLEDE NA DEMOGRAFSKE ZNAČILNOSTI PREISKOVANCEV

Del(4)(q24) smo odkrili pri 5-ih preiskovancih, kar predstavlja 8,3 % (5/60) vseh analiziranih vzorcev (Slika 9) in je skladno z literaturnimi navedbami, da se delecija pojavlja pri 5–23 % analiziranih bolnikih (18, 19, 28, 29). Delecijo smo zaznali pri enem moškem in 4-ih ženskah. Ugotovili smo, da ni statistično pomembnih razlik med spoloma in prisotnostjo delecije ($p = 0,188$).



Slika 9: Delež bolnikov z delecijo *TET2* (N = 60).

Porazdelitev starosti je med skupino preiskovancev brez delecije in skupino preiskovancev s prisotno delecijo enaka ($p = 0,203$). V našem primeru torej povezave med starostjo in prisotnostjo delecije *TET2* ni. V literaturi pa je opisana ugotovitev, da je prisotnost delecije povezana z višjo starostjo. Prevalenca mutacije v *TET2* se povečuje s starostjo, pri mladih do 30. leta je 7 %, pri starejših od 70 let pa 32 %. Slabši izid bolezni s starostjo bi lahko bil povezan z več motnjami v genomu hematopoetskih celic pri starejših osebah (20, 29).

Zaradi omejenega števila analiziranih vzorcev rezultati nujno ne odražajo stanja pri vseh slovenskih bolnikih z MDS in bi v primeru več analiziranih vzorcev lahko odkrili drugačne povezave.

4.2.2. POJAVNOST del(4)(q24) GLEDE NA CITOGENETSKE ZNAČILNOSTI IN TVEGANJE

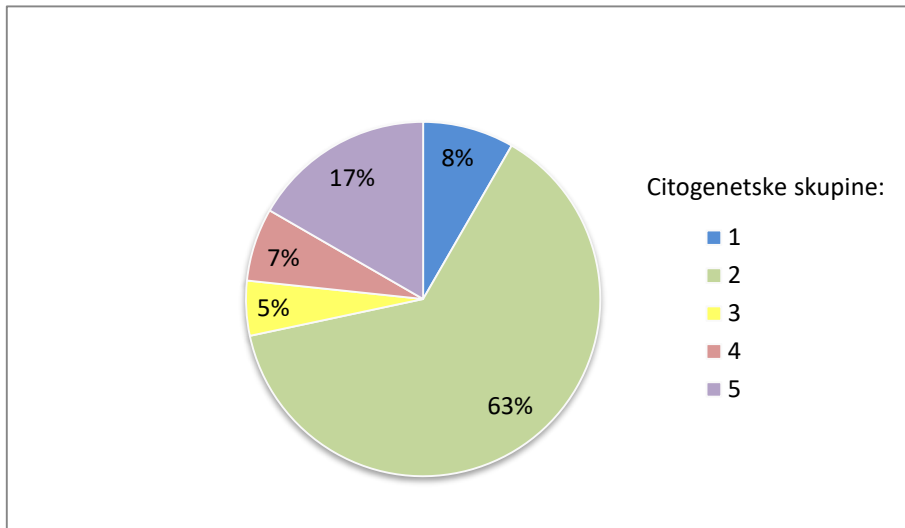
Normalen kariotip je imelo 53,3 % preiskovancev (32/60), kar je nekoliko več kot delež preiskovancev z normalnim kariotipom (22 %, 46 %) v drugih študijah (19, 29). Del(4)(q24) smo odkrili le pri preiskovancih s preurejenim kariotipom, pri preiskovancih z normalnim kariotipom delecije nismo našli. V našem primeru obstaja značilna povezava med delecijo in preurejenim kariotipom, literatura pa navaja, da so našli delecije tako pri normalnem kot preurejenem kariotipu (29).

Diagnozo MDS so bolnikom postavili po kriterijih WHO. Delecija *TET2* ne korelira s podvrstami MDS po WHO. Enako so ugotovili tudi drugi – med del(4)(q24) in podvrstami MDS ni povezave (18, 20, 28).

Za vsakega preiskovanca smo določili, v katero citogenetsko skupino in skupino tveganja po IPSS-R sodi; podatki so zbrani v Prilogi 1.

4.2.2.1. Primerjava med citogenetskimi skupinami

Število preiskovancev v posamezni citogenetski skupini je prikazano na Sliki 10.



Slika 10: Delež preiskovancev v posameznih citogenetskih skupinah (N = 60).

S Fisherjevim natančnim testom smo ugotovili, da so statistično pomembne razlike le med drugo in peto citogenetsko skupino ($p = 0,040$) – Tabela IXA. V drugo citogenetsko skupino uvrščamo bolnike, ki imajo normalen kariotip, del(5q), del(12p) ali del(20q) in teh je največ. V peto citogenetsko skupino pa uvrščamo bolnike, ki imajo kompleksno

preurejen kariotip. Obstaja torej povezava med kompleksno preurejenim kariotipom in prisotnostjo del(4)(q24).

Citogenetske skupine lahko glede na tveganje združimo v ugodno (prva in druga citogenetska skupina), vmesno (tretja citogenetska skupina) in neugodno (četrt in peta citogenetska skupina). Statistično pomembne razlike smo opazili med ugodno in neugodno skupino ($p = 0,042$) – Tabela IXB. Tudi ta primerjava potrjuje povezavo med kompleksno preurejenim kariotipom in prisotnostjo delecije *TET2*.

Tabela IX: **Kontingenčni tabeli za Fisherjev natančni test verjetnosti.** Primerjava (A) med 2. in 5. citogenetsko skupino in (B) med ugodno in neugodno citogenetsko skupino.

A	del <i>TET2</i> negativno	del <i>TET2</i> pozitivno
2. citogenetska skupina	38	0
5. citogenetska skupina	8	2

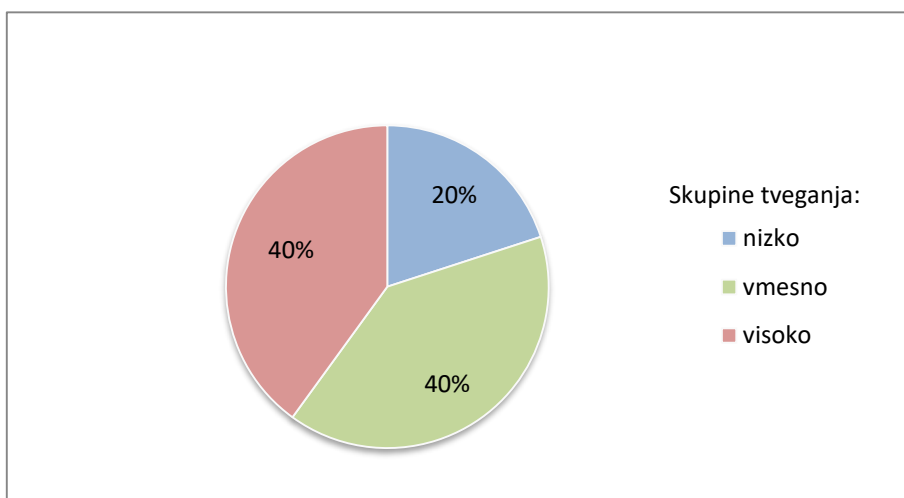
$p = 0,040$

B	del <i>TET2</i> negativno	del <i>TET2</i> pozitivno
Ugodna citogenetska skupina	42	1
Neugodna citogenetska skupina	11	3

$p = 0,042$

V drugih študijah povezave med delecijo in citogenetskimi skupinami niso odkrili (18, 20, 28).

4.2.2.2. Primerjava med skupinami tveganja



Slika 11: Delež preiskovancev v skupinah tveganja (N = 55).

Za klinično prakso je pomembno razlikovanje med nizkim in visokim tveganjem, zato 5 skupin tveganja po IPSS-R (skupina z zelo nizkim, nizkim, vmesnim, visokim in zelo visokim tveganjem) združimo v le 3 (skupina z nizkim, vmesnim in visokim tveganjem). Število preiskovancev v posamezni skupini tveganja je prikazano na Sliki 11.

S Fisherjevim natančnim testom smo ugotovili, da statistično pomembnih razlik med skupinami ni ($p > 0,05$) – Tabela X. Prav tako povezav med delecijo in skupinami tveganja niso odkrili v drugih študijah (18, 20, 28).

Tabela X: **Kontingenčne tabele za Fisherjev natančni test verjetnosti.** Primerjava (A) med skupino z nizkim in vmesnim tveganjem, (B) med skupino z vmesnim in visokim tveganjem in (C) med skupino z nizkim in visokim tveganjem.

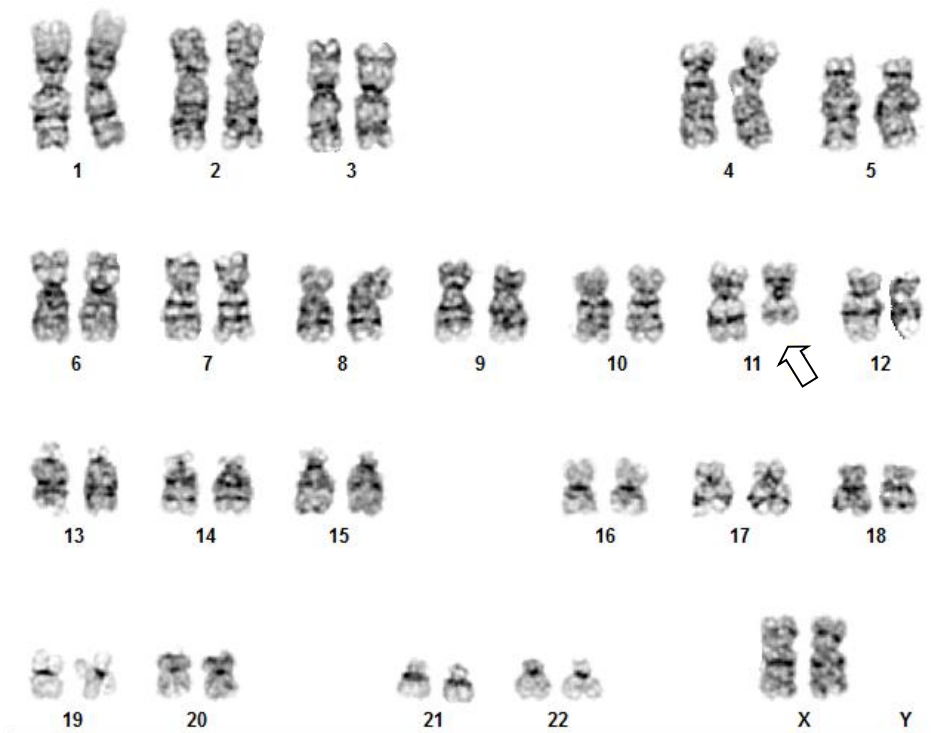
A	del <i>TET2</i>	
	negativno	pozitivno
Nizko tveganje	31	1
Vmesno tveganje	5	1
p = 0,294		

B	del <i>TET2</i>	
	negativno	pozitivno
Vmesno tveganje	5	1
Visoko tveganje	14	2
p = 1,000		

C	del <i>TET2</i>	
	negativno	pozitivno
Nizko tveganje	31	1
Visoko tveganje	14	2
p = 0,254		

4.2.3. PRIMERJAVA REZULTATOV PREISKAVE FISH S KARIOTIPI PREISKOVANCEV Z del(4)(q24)

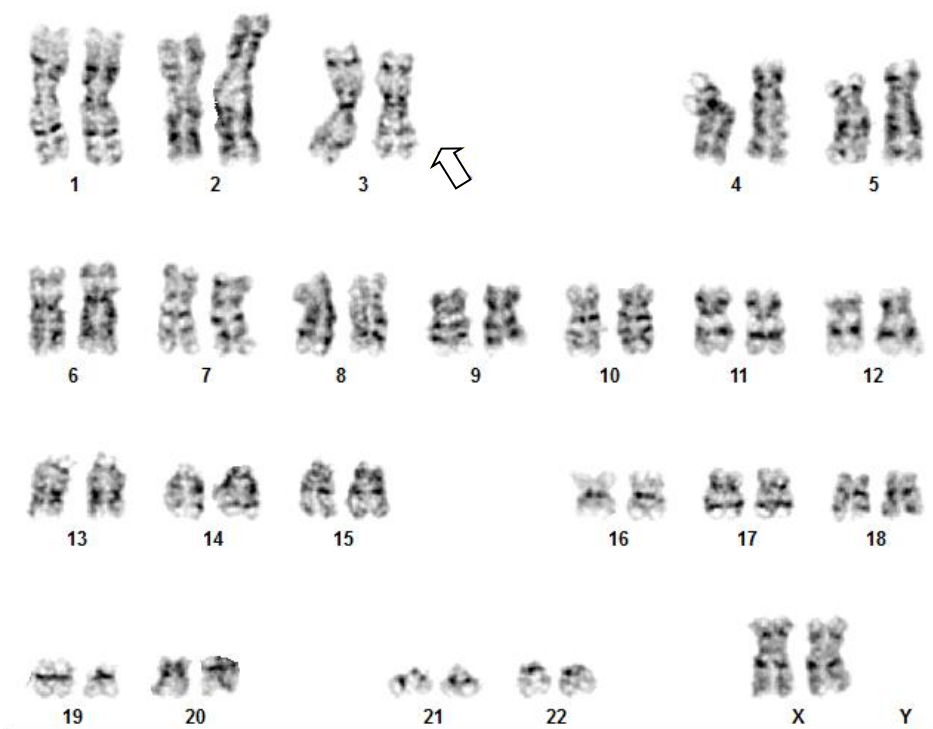
V nadaljevanju naloge smo primerjali rezultate pridobljene s preiskavo FISH z rezultati standardne analize proganih kromosomov, ki so jih v laboratoriju ugotovili s standardno citogenetsko preiskavo – kariotipizacijo.



Slika 12: Kariotip preiskovanke A:46,XX,del(11)(q21q23)[19]/46,XX[5].

Pri preiskovanki A, stari 74 let, so s standardno citogenetsko preiskavo (kariotipizacijo) ugotovili naslednji kariotip: **46,XX,del(11)(q21q23)[19]/46,XX[5]** – Slika 12. Preiskovanka sodi v najugodnejšo 1. citogenetsko skupino po IPSS-R. Za izračun skupine tveganja po IPSS-R nismo imeli dovolj podatkov.

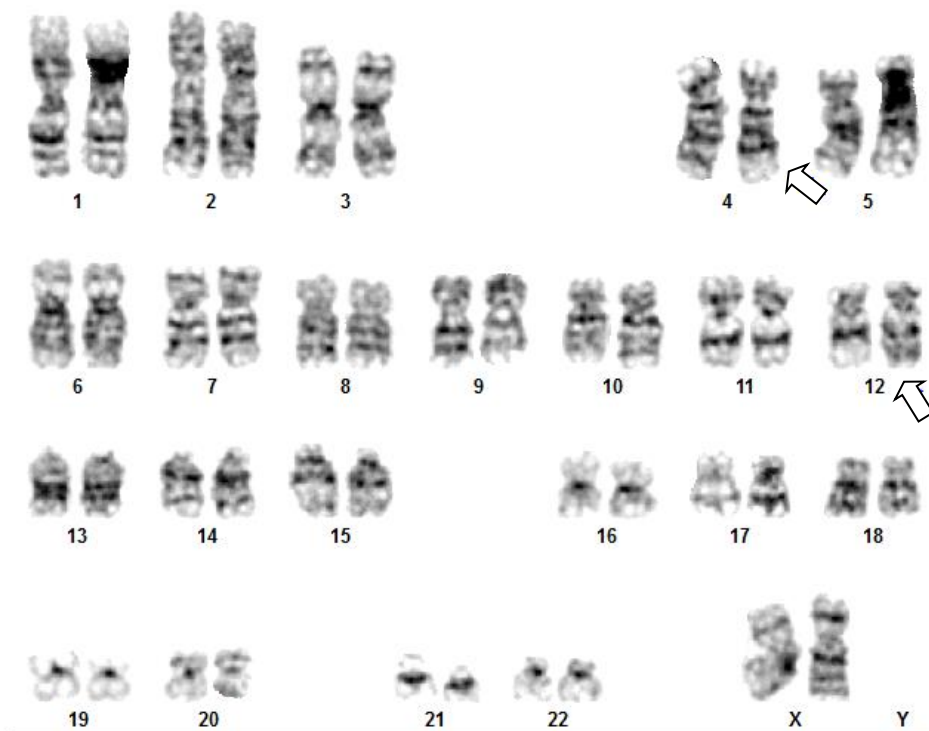
S preiskavo FISH smo določili 11 % celic z delecijo *TET2*. Samo s standardno citogenetsko preiskavo niso ugotovili nikakršne preureditve 4. kromosoma. Delecija 4q24 je premajhna, da bi jo zaznali samo s kariotipizacijo, zato je v tem primeru ključna uporaba preiskave FISH.



Slika 13: Kariotip preiskovanke B: 46,XX,inv(3)(q21q26)[24].

Pri preiskovanki B, stari 50 let, so s standardno citogenetsko preiskavo ugotovili naslednji kariotip: **46,XX,inv(3)(q21q26)[24]** – Slika 13. Preiskovanka sodi v 4. citogenetsko skupino in skupino z zelo visokim tveganjem po IPSS-R.

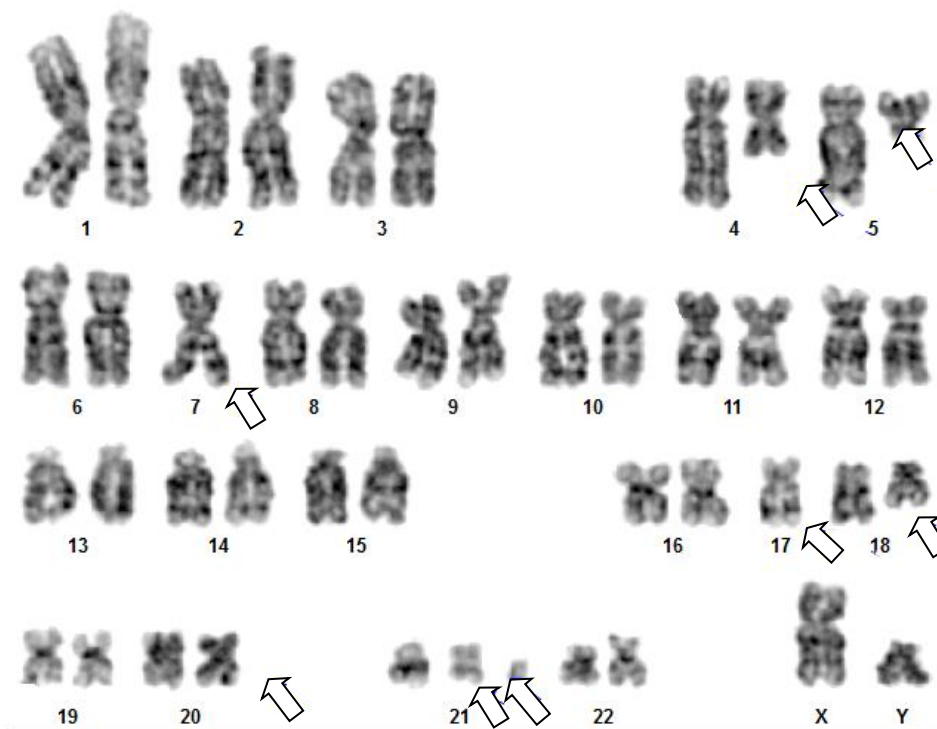
Pri preiskovanki je bila del(4)(q24) prisotna v 5,8 %, kar je tik nad mejno vrednostjo (5,7 %). S kariotipizacijo preureditve 4. kromosoma niso zaznali; kot smo že omenili, je del(4)(q24) premajhna, da bi bila vidna na kariogramu.



Slika 14: Kariotip preiskovanke C: 46,XX,t(4;12)(q24;q14)[5]/46,XX[16].

Pri preiskovanki C, stari 67 let, so s standardno citogenetsko preiskavo ugotovili naslednji kariotip: **46,XX,t(4;12)(q24;q14)[5]/46,XX[16]** – Slika 14. Preiskovanka sodi v 3. citogenetsko skupino in skupino z nizkim tveganjem po IPSS-R.

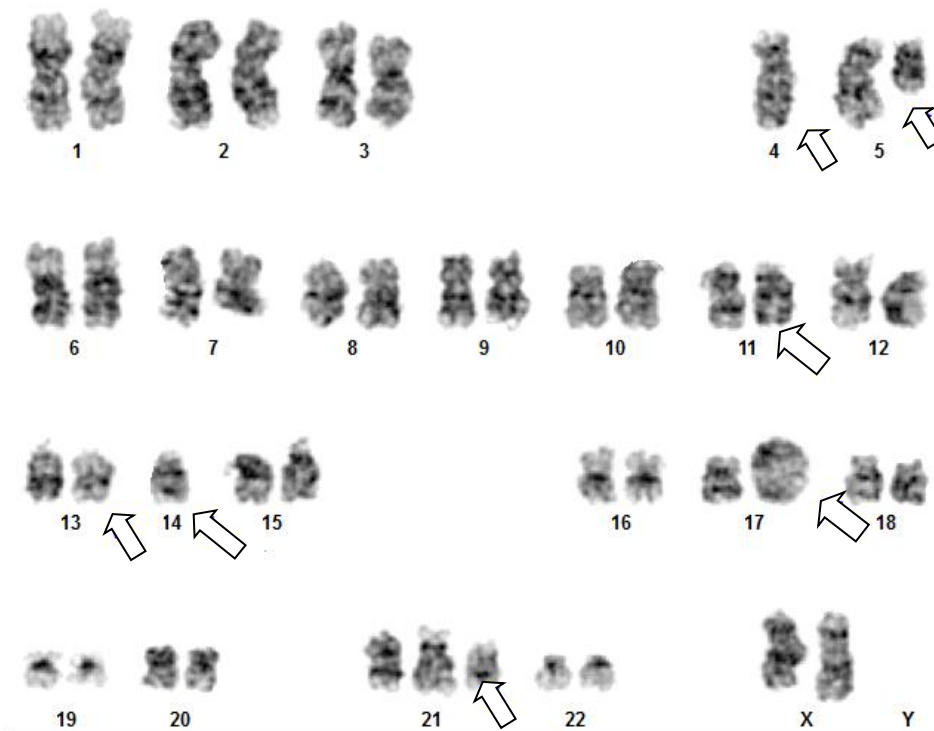
S standardno citogenetsko preiskavo so ugotovili, da gre pri bolnici za navidezno uravnoteženo translokacijo med področjema 4q24 in 12q14. S preiskavo FISH smo ugotovili, da je translokacija neuravnotežena, saj je prišlo do izgube področja q24 - del(4)(q24). Delež del(4)(q24) pozitivnih celic (15,5 %), določenih s preiskavo FISH, je skladen z deležem metafaz s translokacijo (5/21), določenih s kariotipizacijo.



Slika 15: Kariotip preiskovanca Č: kompleksno preurejeni kariotip.

Pri preiskovancu Č, staremu 66 let, so s standardno citogenetsko preiskavo ugotovili naslednji kariotip: **45~48,XY,der(4)t(4:11)(q22;q24),del(5)(q13q35),-7,-17,der(18)del(18)(q12q22),+der(18)?,der(20)t(17;20)(q24;q13),der(21)del(21)(q21),+der(21)?,+0~2mar[cp21]** – Slika 15. Preiskovanec sodi v 5. citogenetsko skupino po IPSS-R. Za izračun skupine tveganja po IPSS-R nismo imeli dovolj podatkov, vendar lahko glede na to, da zaradi kompleksno preurejenega kariotipa sodi v 5. citogenetsko skupino, sklepamo, da sodi v skupino z vsaj visokim tveganjem po IPSS-R.

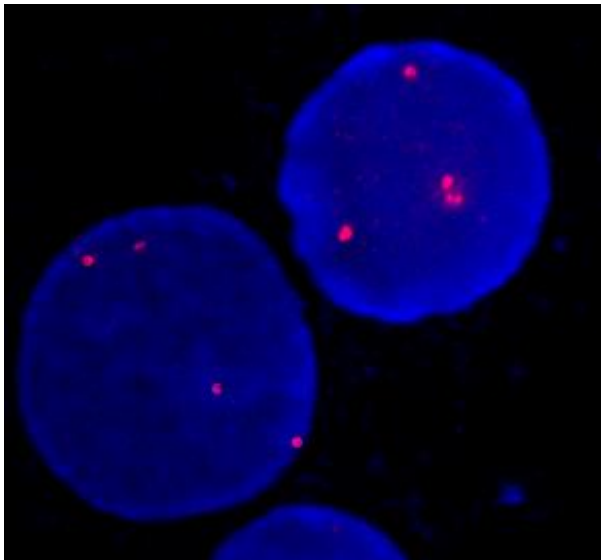
Pri preiskovancu so ugotovili kompleksno preurejeni kariotip (30), ki je že pokazal tudi odsotnost področja 4q24. S preiskavo FISH smo izgubo potrdili pri 51 % celic z delecijo *TET2*. S kariotipizacijo ugotovljena preureditev 4. kromosoma s translokacijo t(4;11)(q22;q24) se ujema z delecijo, ki smo jo zaznali s preiskavo FISH.



Slika 16: Kariotip preiskovanke D: kompleksno preurejeni kariotip.

Pri preiskovanki D, stari 56 let, so s standardno citogenetsko preiskavo ugotovili naslednji kariotip: **44~46,XX,-4,del(4)?(q26),del(5)(q13q31),der(11)ins(11)(q11;?),-13,-14,-17,r(17)?,der(18)?(q21;q21),der(21)t(14;21)(q11;q11),der(21)add(21)(p11),+der(21)?,+1~3mar,inc[cp11]/46,XX[12]** – Slika 16. Preiskovanka sodi v 5. citogenetsko skupino in skupino z vmesnim tveganjem po IPSS-R.

Preiskovanka ima kompleksno preurejeni kariotip. S preiskavo FISH smo določili 18,8 % celic z delecijo *TET2*. Naša ugotovitev, da je prisotna del(4)(q24) je skladna z izgubo 4. kromosoma – sonda se ni vezala, saj 4. kromosoma ni. Ugotovili so tudi, da ima preiskovanka pri ločenem klonu tudi delecijo daljšega kraka drugega 4. kromosoma, točno področje pa je iz kariotipa težko razbrati, vendar leži distalno glede na področje gena *TET2*.



Slika 17: **Amplifikacija 4q24.**

Pri enem izmed preiskovancev smo ugotovili podvojitev (amplifikacijo) 4. kromosomov. Bolnik z zaporedno številko 28, star 85 let, je imel naslednji kariotip: **85~90,XXYY,-4,-4,+8,-17,-20,+0~3mar[cp16]/46,XY[5]**. Preiskovanec je imel preurejeni kariotip z modalnim številom kromosomov blizu tetraploidnemu. Standardna citogenetska preiskava je sicer pokazala, da sta prisotna le dva kromosoma 4. S preiskavo FISH pa smo ugotovili, da je v večini celic (89,3 %) prisotna podvojitev signala (Slika 17), torej je tudi glede na gen *TET2* kariotip tetraploiden. Izguba 4. kromosoma, ki jo je pokazala kariotipizacija, torej ni prizadela celotnih kromosomov 4.

4.3. NAPOVED POTEKA BOLEZNI IN PREHOD V sAML

O vplivu delecije *TET2* na potek bolezni so ugotovili nasprotujoča si dejstva. Študija iz leta 2009 pravi, da je bilo pri bolnikih z delecijo *TET2* močno povišano preživetje – odsotnost delecije predstavlja petkratno višje tveganje za smrt. Prisotnost mutacije v *TET2* predstavlja od IPSS neodvisen kazalec za ugoden potek MDS (18). V drugih študijah v kasnejših letih pa so ugotovili, da med delecijo *TET2* in daljšim preživetjem ni povezave (20, 21, 31). Zaradi pomanjkanja korelacije med prisotnostjo delecije in napovedjo poteka bolezni lahko predvidevamo, da na fenotip MDS vplivajo še številni drugi faktorji (20).

V Tabeli XI so zbrani podatki o preživetju preiskovank. Za preiskovanca Č nimamo podatkov o preživetju.

Tabela XI: Preživetje preiskovank z del(4)(q24).

Preiskovanka	Preživetje v letih	Pričakovano preživetje v letih glede na IPSS-R
A	2,46→	ni podatka
B	0,83†	0,8
C	1,26→	5,3
D	0,3†	3

→še živi; † smrt

O preiskovanki A ne moremo sklepati ničesar, saj nismo mogli pridobiti podatka, v katero skupino tveganja po IPSS-R sodi in posledično ne vemo, kakšno je pričakovano preživetje. Preiskovanka B je umrla po pričakovanih 9–10-ih mesecih. Iz tega lahko sklepamo, da pri njej ni povezave med prisotnost delecije *TET2* in daljšim preživetjem. Pri preiskovanki C, ki ima pričakovano preživetje 5,3 leta, je v času pisanja naloge poteklo šele 1,26 leta od postavitve diagnoze in bolnica še živi, zato ne moremo reči, ali ima prisotnost delecije kakršenkoli vpliv na preživetje. Preiskovanka D pa je zaradi zapletov bolezni preminila pred pričakovanim časom. Obstaja verjetnost, da je imela pri tem vpliv tudi delecija *TET2*, vendar nimamo dovolj podatkov, da bi lahko to zagotovo rekli.

Do prehoda MDS v sekundarno AML (sAML) pride pri 25 % bolnikov (20). Glede povezave med delecijo *TET2* in prehodom v sAML najdemo nasprotujoče si podatke. Ena izmed študij navaja, da povezave med delecijo *TET2* in prehodom v AML ni (20). Druga navaja, da so mutacije *TET2* zelo pogoste pri prehodu MDS v sAML(29). V tretji študiji pa so ugotovili, da je pri bolnikih z del(4)(q24) manjši odstotek prehoda v sAML kot pri bolnikih brez delecije (18).

4.4. USTREZNOST METODE FISH PRI ODKRIVANJU DELECIE *TET2*

Uporaba metode FISH za odkrivanje delecije *TET2* je trenutno še vprašljiva. Temelj za oceno kromosomskih nepravilnosti je standardna citogenetska preiskava (analiza proganih kromosomov), preiskavo FISH pa v literaturi navajajo kot klinično uporabno za ugotavljanje tveganja in napoved bolezni (kazalec poteka bolezni) pri bolnikih z MDS, predvsem tistih, ki imajo normalen kariotip. Smiselna bi bila tudi uporaba preiskave FISH

kot pomoč pri postavitvi tarčne terapije. FISH je v primerjavi z metodami, ki so zelo učinkovite pri odkrivanju mutacij v genu *TET2* (test polimorfizma posameznih nukleotidov (SNP), primerjalna genomska hibridizacija (CGH), sekvenciranje naslednje generacije (NGS)) predvsem ekonomičen ter potrditveni (19, 21, 28, 29, 32). V literaturi navajajo, da so SNP, CGH in NGS sicer drage in dolgotrajne, vendar učinkovite metode za detekcijo delecije *TET2*, preiskavo FISH pa naj bi uporabljali za validacijo teh molekularnih rezultatov (19, 20, 21, 28, 33). Pri nas smo ugotovili, da je preiskava FISH uporabna kot dodatek k standardni citogenetski preiskavi. Da pa bi ugotovili, ali je dejansko učinkovita pri odkrivanju del(4)(q24), bi morali rezultate preiskave FISH primerjati z rezultati molekularno genetskih preiskav (npr. NGS ali CGH).

5. SKLEPI

- › DNA-sondi SureFish smo določili 100 % specifičnost. Mejna vrednost za omenjeno sondo, pri kateri izdamo pozitiven izvid za prisotnost delecije del(4)(q24), znaša 5,7 %.
- › Del(4)(q24) smo našli pri petih preiskovancih (8,3 %), najdba pa je skladna z literaturo, ki navaja, da se omenjena delecija pojavlja pri 5–23 % bolnikov z MDS.
- › Med prisotnostjo del(4)(q24) in spoloma ni statistično pomembnih razlik ($p = 0,188$), torej se delecija enako pogosto pojavlja pri ženskah in moških.
- › Povezave med prisotnostjo del(4)(q24) in starostjo ni, saj je porazdelitev starosti med skupino preiskovancev z in skupino brez delecije enaka ($p = 0,203$).
- › Delecijo *TET2* smo odkrili le pri preiskovancih s spremenjenim kariotipom, kar pomeni, da obstaja povezava med delecijo in preurejenim kariotipom. Med kompleksno preurejenim kariotipom in del(4)(q24) obstaja povezava. Statistično pomembne razlike glede prisotnosti delecije *TET2* smo našli med drugo in peto citogenetsko skupino ($p = 0,040$) ter med ugodno in neugodno citogenetsko skupino ($p = 0,042$).
- › Delecija *TET2* ni povezana s podvrstami MDS po WHO klasifikaciji.
- › Med skupinami tveganja po IPSS-R ni statistično pomembnih razlik glede prisotnosti delecije *TET2*.
- › Del(4)(q24) je premajhna, da bi jo zaznali samo s kariotipizacijo, zato je ključna uporaba preiskave FISH kot dodatek k standardni citogenetski preiskavi. V bodoče bo morda klinično uporabna za ugotavljanje tveganja in napoved poteka MDS ter kot pomoč pri izbiri morebitne tarčne terapije.

6. LITERATURA

1. Andoljšek D, et al. Bolezni krvi in krvotvornih organov. V: Košnik M, Mravlje F, Štajer D, et al. Interna medicina. 2. izdaja, Littera picta16, Ljubljana, 2011: 59–61.
2. Slovensko združenje bolnikov z limfomom in levkemijo. Mielodisplastični sindrom. Dostopno na spletu: <http://limfom-levkemija.org/mds/mielodisplastichni-sindrom-o-bolezni.html#> (dostopano november 2016).
3. Mlakar U. Smernice za odkrivanje in zdravljenje mielodisplastičnih sindromov pri odraslih. Zdrav Vest 2010; 79: 455–464.
4. Sever M, Podgornik H, Mlakar U, et al. Lastnosti bolnikov z mielodisplastičnim sindromom in njihova obravnava na kliničnem oddelku za hematologijo, UKC Ljubljana, v obdobju 2008–2012. ZdravVest 2012; 81: 41–48.
5. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. Blood 2016; 127: 2391–2405.
6. Shih AH, Levine RL. Molecular Biology of Myelodysplastic syndromes. Semin Oncol 2011; 38: 613–620.
7. Leukemia and Lymphoma Society. The International Prognostic Scoring System. Dostopno na spletu: <https://www.lls.org/disease-information/myelodysplastic-syndromes/diagnosis/the-international-prognostic-scoring-system> (dostopano november 2016).
8. Greenberg PL, Tuechler H, Schanz J, et al. Revised international prognostic scoring system for myelodysplastic syndromes. Blood 2012; 120: 2454–2465.
9. Nakajima H, Kunimoto H. TET2 as an epigenetic master regulator for normal and malignant hematopoiesis. Cancer Sci 2014; 15: 1094–1099.
10. Genatlas. Dostopno na spletu: <http://genatlas.medecine.univ-paris5.fr/fiche.php?onglet=1&n=32528> (dostopano november 2016).
11. Scourzic L, Mouly E, Bernard OA. TET proteins and the control of cytosine demethylation in cancer. Genome Med 2015; 7: 9.
12. Wu H, Zhang Y. Mechanisms and functions of TET protein-mediated 5-methylcytosine oxidation. Genes dev 2011; 25: 2436–2452.
13. TET2. Genetics Home Reference. Dostopno na spletu: <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/TET2> (dostopano december 2016).

14. Huang Y, Rao A. Connections between TET proteins and aberrant DNA modification in cancer. *Trends Genet.* 2014; 30: 464–474.
15. Kohli RM, Zhang Y. TET enzymes, TDG and the dynamics of DNA demethylation. *Nature* 2013;502: 472–479.
16. Enzyme. Dostopno na spletu: <http://enzyme.expasy.org/EC/1.14.11.n2> (dostopano november 2016).
17. Minor EA, Court BL, Young JI, Wang G. Ascorbate induces ten-eleven translocation (TET) methylcytosine dioxygenase-mediated generation of 5-hydroxymethylcytosine. *J Biol Chem* 2013; 288: 13669–13674.
18. Kosmider O, Gelsi-Boyer V, Cheok M. TET2 mutation is an independent favorable prognostic factor in myelodysplastic syndromes (MDSs). *Blood* 2009; 114: 3285–3291.
19. Bacher U, Weissmann S, Kohlmann A, et al. TET2 deletions are a recurrent but rare phenomenon in myeloid malignancies and are frequently accompanied by TET2 mutations on the remaining allele. *Br J Haematol* 2011; 154: 67–75.
20. Smith AE, Mohamedali AM, Kulasekararaj A, et al. Next-generation sequencing of the TET2 gene in 355 MDS and CMML patients reveals low-abundance mutant clones with early origins, but indicates no definite prognostic value. *Blood* 2010; 116: 3923–3932.
21. Jankowska AM, Szpurka H, Tiu RV, et al. Loss of heterozygosity 4q24 and TET2 mutations associated with myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms. *Blood* 2009; 113:6403–6410.
22. Rice G. Fluorescent In Situ Hybridization. Dostopno na spletu: http://serc.carleton.edu/microbelife/research_methods/microscopy/fish.html (dostopano december 2016)
23. Standardni operativni postopek. Nanosi na stekla (SHL-60-007-04). Dostopno v specializiranem hematološkem laboratoriju. (dostopano september 2016)
24. Standardni operativni postopek. FISH (SHL-60-008-06). Dostopno v specializiranem hematološkem laboratoriju. (dostopano september 2016)
25. SureFish protocol, Agilent. Dostopno na spletu: <http://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/Public/G9400-90000.pdf> (dostopano marec 2016)
26. Mascarello JT, Hirsch B, Kearney HM, et al. Section E9 of the American College of Medical Genetics technical standards and guidelines: Fluorescence in situ hybridization. *Genet Med* 2011; 13: 667–675.
27. Wolff DJ, Bagg A, Cooley LD, et al. Guidance for Fluorescence in situ hybridization in hematologic disorders. *J Mol Diag* 2007;9: 134–143.

28. Dambruoso I, Boni M, Rossi M, et al. Detection of TET2 abnormalities by fluorescence in situ hybridization in 41 patients with myelodysplastic syndrome. *Cancer Gen* 2012; 205: 285–294.
29. Morato de Oliveira F, Miguel CE, Lucena-Araujo AR, et al. FISH analysis for TET2 deletion in a cohort of 362 Brazilian myeloid malignancies: correlation with karyotype abnormalities. *Med Oncol* 2013; 30: 483–492.
30. Current protocols in human genetics. Composite Karyotype. Dostopno na spletu: <http://geguchadze.com/PDF/protocols/CPonline/Doc/10286-10286.html> (dostopano januar 2016)
31. Nibourel O, Kosmider O, Cheok M, et al. Incidence and prognostic value of TET2 alterations in de novo acute myeloid leukemia achieving complete remission. *Blood* 2010; 116: 1132–1135.
32. Park JH, Kim M, Kong SY, et al. Monitoring of the Clonal Fraction by Fluorescence In Situ Hybridization in Myelodysplastic Syndrome. *Arch Pathol Lab Med* 2016;140: 560–569.
33. Klaus M, Psaraki A, Mastrodemou S, et al. Evaluation of TET2 deletions in myeloid disorders: A fluorescence in situ hybridization analysis of 109 cases. *Leuk Res* 2011; 35: 413–415.

PRILOGA

Tabela XII: Demografski in citogenetski podatki analiziranih vzorcev s skupino tveganja po IPSS-R.

Številka vzorca	Spol	Starost	Kariotip	Citogenetska skupina	Tveganje po IPSS-R
1	M	47,2	49,XY,del(6)(q23q25),-9,+der(19)add(19)(q13.4),der(21)add(21)(p11)del(21)(q22),+der(21)add(21)(p11)del(21)(q22)x3[20].ish der(21)(RUNX1+)x4; nucish(RUNX1x5)[198/200]	5	zelo visoko
2	Ž	82,7	46,XX[20]	2	zelo nizko
3	Ž	84,8	46,XX[20]	2	srednje
4	Ž	82,7	46,XX,del(5)(q13q34)[3]	2	NP
5	M	80,8	46,XY[20]	2	zelo nizko
6	Ž	56,6	46,XX[20]	2	zelo nizko
7	M	81,2	46,XY,del(5)(q13q34)[3]/46,XY[17]	2	nizko
8	Ž	44,5	46,XX[20]	2	zelo nizko
9	M	66,4	46,XY[20]	2	visoko
10	Ž	82,7	46,XX[20]	2	zelo nizko
11	Ž	65,5	46,XX[21]	2	zelo nizko
12	M	48,3	46,XY[20]	2	visoko
13	Ž	80,7	46,XX,del(11)(q23q24)[17]/46,XX[3]	1	zelo nizko
14	Ž	65,6	46,XX[20]	2	zelo nizko
15	Ž	43,7	46,X,del(X)(q10),i(X)(q10),add(1)(p32),dic(2;4)((q11;q31),add(3)(q21),add(7)(q36),del(9)(q22),del(10)(p11),add(11)(p15),add(17)(p13),+mar[cp9]/46,XX[15]	5	visoko
16	M	51,8	46,XY[20]	2	zelo nizko
17	M	61,1	46,XY[22]	2	zelo nizko
18	Ž	82,5	45,X,-Y[18]/46,XY[2]	1	NP
19	Ž	83,3	47,XX,+11[13]/46,XX[8]	3	visoko
20	M	83,5	46,XY[21]	2	zelo nizko
21	M	66,2	46,XY[21]	2	zelo nizko
22	M	67,9	46,XY[22]	2	zelo nizko
23	M	39,3	46,XY[20]	2	zelo nizko
24 ^A	Ž	74,4	46,XX,del(11)(q21q23)[19]/46,XX[5]	1	NP
25 ^B	Ž	50,4	46,XX,inv(3)(q21q26)[24]	4	zelo visoko
26	M	34,1	46,XY[20]	2	srednje
27	M	79,1	46,XY[24]	2	zelo nizko
28	M	84,8	85~90,XXYY,-4,-4,+8,-17,-20,+0~3mar[cp16]/46,XY[5]	5	>visoko

29	M	76,2	46,XY[24]	2	zelo nizko
30	M	39,0	46,XY[20]	2	zelo nizko
31	Ž	70,4	46,XX[21]	2	srednje
32	Ž	63,0	46,XX[20]	2	zelo nizko
33	M	73,5	46,XY,del(5)(q22q32)[6]/46,XY[14]	2	nizko
34	Ž	87,7	46,XX,del(5)(q13q31)[11]/46,XX[9]	2	nizko
35	M	81,3	45,X,-Y[11]/46,XY[9]	1	zelo nizko
36	M	73,9	46,XY[22]	2	visoko
37	M	74,5	43~46,XY,add(1)(p36),del(5)(q22q31),-7,add(11)(p15),add(16)(q24),-17,-18,-19,-20,+1~3mar,+r,inc[cp15]. nuc ish(D5S721x2,EGR1x1)[44/200],(D7Z1,D7S522,D20S108)x2[200],(TP53,MPO)x2[200]	5	zelo visoko
38	M	68,8	46,XY[20]	2	zelo nizko
39	M	60,1	46,XY[20]	2	zelo nizko
40	M	73,2	45,X,-Y[13]/46,XY[9]	1	zelo nizko
41	Ž	50,4	46,XX,del(5)(q12q33)[14]/46,XX[6]	2	NP
42	Ž	84,0	46,XX[24]	2	visoko
43	Ž	64,6	46,XX[20]	2	zelo nizko
44	Ž	65,3	46,XX[20]	2	zelo nizko
45	M	62,6	46,XY[23]	2	visoko
46	Ž	80,2	45,XX,dic(5;19)(q21;p13),r(11)dup(11)(q23)(::p15-q25::q23-qter::qter-q23::q25-p15::),der(12)del(12)(p11)t(12;12)(p11;q21)[17]. ish der(19)(wcp5+), r(wcp11+,KMT2A amp)nucish(D5S721x2,EGR1x1)[172/200],(KMT2A amp)[184/200]	5	>visoko
47	M	71,9	46,XY[20]	2	zelo nizko
48 ^c	Ž	66,6	46,XX,t(4;12)(q24;q14)[5]/46,XX[16]	3	nizko
49 ^c	M	65,6	45~48,XY,der(4)t(4;11)(q22;q24),del(5)(q13q35),-7,-17,der(18)del(18)(q12q22),+der(18)?,der(20)t(17;20)(q24;q13),der(21)del(21)(q21),+der(21)?,+0~2mar[cp 21]	5	>visoko
50	M	80,8	46,XY[21]	2	srednje
51	Ž	81,1	46,XX[26]	2	zelo nizko
52 ^D	Ž	55,7	44~46,XX,-4,del(4)(?)(q26),del(5)(q13q31),der(11)ins(11)(q11;?),-13,-14,17,r(17)?,der(18)?(q21;q21),der(21)t(14;21)(q11:q11),der(21)add(21)(p11),+der(21)?,+1~3mar,inc[cp 11]/46,XX[12]	5	srednje
53	Ž	73,8	46,XX,del(5)(q14q23)[9]/46,XX[13]	2	zelo nizko

54	M	67,5	46,XY,del(7)(q22)[20]	3	srednje
55	Ž	71,1	46,XX,t(1;3)(p36;q21)[21]	4	zelo visoko
56	Ž	65,0	45,XX,der(5;17)(p10;q10)[7]/44,idem,- 14,der(14;18)(q11;q23)[3]/46,XX[14].nuc ish(D5S721x2,EGR1x1)[30/200]	4	>visoko
57	M	78,9	46,XY,del(5)(q13q31)[2]/42,XY,-5,- 7,t(9;14)(q22;q22),der(11)t(5;11)(q13;p15) del(5)(q31),der(12;17),-20[18].ish der(9)(WCP14+),der(11)(WCP5+),der(12)(WCP17+)	5	zelo visoko
58	Ž	73,1	45~46,XX,del(5)(q13q31),dic(9;11)(p24;q25)dup(11)(q13q23),-11,der(12)t(12;22)(p13;q11),- 13,der(22)dic(11;22)(q23;p11),+1~2mar[cp18]/46,XX [3]	5	zelo visoko
59	M	78,3	46,XY,del(9)(q13q32)[6]/45,XY,- 7,del(9)(q22q32)[13]/46,XY[1]	5	zelo visoko
60	M	NP	44,XY,del(5)(q14q31),der(13;16)(q10;p10),-17[22]	4	NP

A, B, C, Č, D oznaka vzorcev s prisotno del(4)(q24); spol: Ž-ženski, M-moški; NP-ni podatka