

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

JUDITA NUSSDORFER

MAGISTRSKA NALOGA

MAGISTRSKI PROGRAM LABORATORIJSKA BIOMEDICINA

Ljubljana, 2018

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

JUDITA NUSSDORFER

**PREUREDITVE GENA *MYC* PRI BOLNIKIHZ DISEMINIRANIM
PLAZMOCITOMOM**

***MYC* REARRANGEMENTS IN MULTIPLE MYELOMA PATIENTS**

MAGISTRSKI PROGRAM
LABORATORIJSKA BIOMEDICINA

Ljubljana, 2018

Magistrsko nalogo sem opravljala v Specializiranem hematološkem laboratoriju Kliničnega oddelka za hematologijo UKC Ljubljana, pod mentorstvom izr. prof. dr. Helene Podgornik, univ. dipl. inž. kem. inž., spec. med. biokem., spec. lab. med. gen. in somentorstvom izr. prof. dr. Sama Zvera, dr. med.

Zahvala

Iskreno se zahvaljujem mentorici izr. prof. dr. Heleni Podgornik za vso pomoč in vodenje tekom nastajanja magistrske naloge ter somentorju izr. prof. dr. Samu Zveru za strokovne napotke. Obenem se zahvaljujem laboratorijskemu osebju za izkazan čas in pomoč pri delu. Posebna zahvala gre staršema, ki sta mi študij omogočila in mi stala ob strani. Velika zahvala gre tudi fantu Dejanu in moji sestri Tadeji za vso podporo.

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. in somentorstvom izr. prof. dr. Sama Zvera, dr. med.

Naloga je del Terciarnega projekta UKC Ljubljana 2017 0126, pod vodstvom Helene Podgornik.

Judita Nussdorfer

Predsednica komisije: prof. dr. Marija Sollner Dolenc, mag. farm.

Član komisije: doc. dr. Jurij Trontelj, mag. farm.

KAZALO VSEBINE

1	UVOD	1
1.1	GEN <i>MYC</i>.....	1
1.1.1	VLOGA <i>MYC</i> V NORMALNEM DELOVANJU CELICE	1
1.1.2	ZGRADBA IN FUNKCIJA PROTEINA <i>MYC</i>	2
1.1.3	VLOGA GENA <i>MYC</i> PRI NASTANKU IN RAZVOJU RAKA	5
1.1.4	MEHANIZMI DEREGULACIJE	5
1.1.5	<i>MYC</i> KOT TARČA ZDRAVILNIH UČINKOVIN.....	7
1.2	DISEMINIRANI PLAZMOCITOM	7
1.2.1	SIMPTOMI IN ZDRAVLJENJE	9
1.2.2	CITOGENETSKE PREUREDITVE PRI DP.....	10
1.2.3	VLOGA PREUREDITEV GENA <i>MYC</i> PRI DP	11
2	NAMEN DELA	14
3	MATERIALI IN METODE	15
3.1	BIOLOŠKI VZORCI	15
3.2	PRIPOMOČKI IN APARATURE	15
3.3	IZOLACIJA PLAZMATK	16
3.3.1	Materiali	16
3.3.2	Priprava raztopin	17
3.3.3	Postopek izolacije plazmatk.....	17
3.4	HIPOTONIČNA OBDELAVA IN FIKSACIJA PLAZMATK	18
3.4.1	Materiali	18
3.4.2	Priprava raztopin	18
3.4.3	Postopek hipotonične obdelave in fiksacije plazmatk	18
3.5	FISH.....	19

3.5.1	Fluorescentno označena DNA sonda	19
3.5.2	Materiali	21
3.5.3	Priprava raztopin	21
3.5.4	Nanosi na stekla	22
3.5.5	Postopek FISH	23
3.5.5.1	Predpriprava stekel s tarčno DNA	23
3.5.5.2	Priprava sonde za nanos	24
3.5.5.3	Kodenaturacija vzorca in sonde.....	24
3.5.5.4	Spiranje stekel po hibridizaciji	24
3.5.5.5	Mikroskopiranje preparatov.....	25
4	REZULTATI IN RAZPRAVA.....	26
4.1	DOLOČITEV PRAŽNE VREDNOSTI ZA DNA SONDO	26
4.2	PRISOTNOST PREUREDITEV GENA <i>MYC</i>	29
4.2.1	POJAVNOST POSAMEZNIH PRELOMOV V GENU <i>MYC</i>	33
4.2.2	POJAVNOST PONAVLJAJOČIH CITOGENETSKIH SPREMENB PRI BOLNIKIHZ DP.....	35
5	SKLEPI	44
6	LITERATURA	46

KAZALO SLIK

Slika 1: Gen <i>MYC</i> se nahaja na daljši ročici (q) kromosoma 8 na segmentu 24.	1
Slika 2: Acetilacija in deacetilacija histonov.....	3
Slika 3: Od ravnega faktorja odvisna in neodvisna aktivnost <i>MYC</i>	4
Slika 4: Diagnostični kriteriji.....	9
Slika 5: Tribarvna sonda <i>MYC</i> (8q24)..	20
Slika 6: Signali sonde <i>MYC</i> vidni z uporabo različnih filtrov v kombinaciji z DAPI.....	25
Slika 7: Vzorec signalov pri normalni celici (dva normalna alela).....	25
Slika 8: Sprememba števila signalov za gen <i>MYC</i> : A) Pomnoženi signali. B) Izguba gena <i>MYC</i>	29
Slika 9: Delež preiskovancev s preureditvijo gena <i>MYC</i>	29
Slika 10: Vzorci signalov pri različnih prelomih v genu <i>MYC</i>	30

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica I: Diagnostična merila za diseminirani plazmocitom.	8
Preglednica II: Primarne in sekundarne citogenetske spremembe pri bolnikih z DP	11
Preglednica III: <i>c-MYC</i> preureditve pri bolnikih z DP.....	13
Preglednica IV: Informacije o posameznem fluoroforu tribarvne sonde Kreatech™ MYC 8q24.	20
Preglednica V: Pričakovani signali s tribarvno sondo Kreatech™ MYC (8q24).....	21
Preglednica VI: Določanje vzorca signalov na normalnih celicah za določitev prazne vrednosti za sondo MYC (8q24), Triple-Color, Break.....	27
Preglednica VII: Prazne vrednosti za posamezen signal.	28
Preglednica VIII: Vzorci signalov pri različnih prelomih v genu <i>MYC</i>	32
Preglednica IX: Podatki o vrstah prelomov in deležih (%) posameznih klonov pri bolnikih s preureditvijo gena <i>MYC</i>	33
Preglednica X: Število preiskovancev s posameznim vzorcem signala.	34
Preglednica XI: Citogenetske spremembe in njihov napovedni pomen pri preiskovanih bolnikih.....	35
Preglednica XII: Pojavnost posameznih citogenetskih sprememb pri bolnikih z DP.	40
Preglednica XIII: Preiskovanci s preureditvijo gena <i>MYC</i> in preostalimi citogenetskimi spremembami.	41
Preglednica XIV: Kontingenčne tabele	42
Preglednica XV: Podatki o porazdelitvi preiskovancev v skupinah z ugodnim, vmesnim in neugodnim napovednim pomenom	43

POVZETEK

Gen *MYC* se nahaja na 8. kromosomu na področju q24. Kodira transkripcijski faktor MYC, ki ima ključno vlogo v celičnem metabolizmu oziroma pri transkripciji specifičnih tarčnih genov. Deregulacija protoonkogeno ima pomembno vlogo pri razvoju različnih vrst raka.

Diseminirani plazmocitom (DP) je krvna bolezen, ki nastane iz rakavo, klonsko spremenjenih limfocitov B. Bolezen odkrijemo pri ljudeh, ki so najpogosteje stari od 60 do 70 let. Gre za drugo najpogostejšo rakavo krvno bolezen in v Sloveniji vsako leto zboli od 130 do 140 bolnikov. Za DP so značilne določene kromosomske preureditve oziroma citogenetske abnormalnosti, ki jih je mogoče zaznati z analizo proganih kromosomov ali s fluorescenčno *in situ* hibridizacijo (FISH). Bolnika lahko na podlagi teh podatkov uvrstimo v skupino z določenim tveganjem oziroma napovednim pomenom. Preureditve gena *MYC* sodijo med sekundarne preureditve pri DP.

Namen magistrske naloge je bilo ugotoviti pogostost preureditev gena *MYC* pri slovenskih bolnikih z DP. Preureditve smo zaznavali s fluorescentno označeno DNA sondo, ki vsebuje tri različne fluorofore in zazna tri različne prelomne točke oziroma morebitne preureditve na daljši ročici (q) 8. kromosoma na segmentu 24.

Analizirali smo 69 vzorcev, ki so bili pridobljeni iz kostnega mozga bolnikov z DP. Predhodno smo določili pražno vrednost za distalni ter za proksimalni prelom 2,3 %. Pri kontrolnih vzorcih nismo zaznali nobenega signala, ki ustreza prelomu kromosoma 8 na področju gena *MYC*, za ta pričakovan vzorec signala smo določili pražno vrednost 1,5 %. Pri pregledu kontrolnih vzorcev smo zaznali tudi drugačne vzorce signalov (1 fuzija, 3 ali več fuzij) in zanje določili pražno vrednost 4,4 %. Preureditve gena *MYC* so bile nad pražno vrednostjo pri 17,4 % (12/69) vseh analiziranih vzorcev. Pri pozitivnih vzorcih smo zasledili različne vrste in število signalov. Najpogostejšo izolirano spremembo pri posamezniku je predstavljal signal za distalni prelom (1F1GB1R), ki je bil tudi najpogosteje zastopan glavni klon preurejenih celic. Najpogosteje zaznana je bila distalna preureditev, ki smo jo zasledili pri 58 % (7/12) preiskovancev. Ugotovili smo tudi, da obstaja močna povezava med preureditvami gena *MYC* in sekundarnimi citogenetskimi spremembami. Nismo našli povezave med preureditvami gena *MYC* in skupinami preiskovancev z določenim tveganjem oziroma napovednim pomenom.

ABSTRACT

MYC gene maps to the chromosome 8 locus q24. This gene codes for protein MYC which is transcription factor and plays a key role in cell metabolism and in transcription of specific target genes. Deregulation of protooncogene plays an important role in the development of various types of cancer.

Multiple myeloma (MM) is a blood disease derived from cancer, clonally changed lymphocytes B. MM is usually found in older people, which are most commonly 60 to 70 years old. MM is the second most common cancerous blood disease, and in Slovenia every year from 130 to 140 patients fall ill. MM is characterized by certain chromosome rearrangements or cytogenetic abnormalities, which can be detected by chromosome analysis or fluorescence *in situ* hybridization (FISH). On the basis of these data, patient can be classified into a different risk groups that are linked to the prognosis of the disease. *MYC* gene rearrangements are secondary rearrangements in patients with MM.

The purpose of our project was to determine the frequency of *MYC* gene rearrangement in patients with MM. The rearrangements were detected by a fluorescently labeled DNA probe, which contains three different fluorophores in order to detect three different breakpoints or possible rearrangements on the long arm (q) of the chromosome 8.

We analyzed 69 samples derived from the bone marrow of patients with MM. We previously determined the cut-off value to be 2,3 % for the distal breakage and for the proximal breakage. In the control samples we didn't detect any signal, which can indicate the break of chromosome 8 in the region of *MYC* gene, therefore the cut-off was set to 1,5 %. Other type of signals (1 fusion, 3 or more fusions) was detected in the group of control samples and their cut-off value was set to 4,4 %. The rearrangements of the *MYC* gene were above the cut-off value in 17,4 % (12/69) of all analyzed samples. In positive samples we observed different types of signals and different size of clones. The most common isolated change in individual patient was the signal for distal breakage (1F1GB1R), which was also the most commonly represented as the main clone. The most commonly observed rearrangement was distal, which has been observed in 58 % (7/12) of patients. We noticed a strong association between the rearrangement of the *MYC* gene and the secondary cytogenetic changes. No association between the presence of *MYC* gene rearrangement and a certain risk group was found.

KLJUČNE BESEDE

Gen *MYC*, diseminirani plazmocitom, fluorescenčna *in situ* hibridizacija, preureditve gena *MYC*, citogenetske spremembe.

KEY WORDS

Gene *MYC*, multiple myeloma, fluorescence *in situ* hybridization, *MYC* rearrangements, cytogenetic changes.

SEZNAM OKRAJŠAV

add – addition; adicija

amp – amplification; amplifikacija

bHLHLZ – basic helix-loop-helix leucine zipper; bazična vijačnica-zanka-vijačnica levcinska zadruga

CD4⁺ – T helper cells; celice T pomagalke

DAPI – 4,6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride; 4,6-diamidino-2-fenilindol dihidroklorid

del – deletion; delecija

DP – diseminirani plazmocitom

E škatla – enhancer box; ojačevalna škatla

F – fusion; fuzija

FISH – fluorescence *in situ* hybridization; fluorescenčna *in situ* hibridizacija

HAT – histone acetyltransferases; histonska acetil transferaza

Ig – immunoglobulin; imunoglobulin

IgA – immunoglobulin A; imunoglobilin A

IgD – immunoglobulin D; imunoglobilin D

IgG – immunoglobulin G; imunoglobilin G

IGH – Immunoglobulin heavy locus; lokus za imunoglobulinsko težko verigo

IGK – Immunoglobulin kappa locus; lokus za imunoglobulin kapa (κ) lahko verigo

IGL – Immunoglobulin lambda locus; lokus za imunoglobulin lambda (λ) lahko verigo

IgM – immunoglobulin M; imunoglobilin M

KM – kostni mozeg

MAX – MYC associated factor X; z MYC povezan faktor X

MINP – monoclonal gammopathy of undetermined significance; monoklonska imunoglobulinemija neodrejenega pomena

mIg – monoclonal immunoglobulin; monoklonski imunoglobulin

PBT – phosphate buffered saline with Tween, fosfatno pufrana slanica s Tweenom

PBS – phosphate buffered saline, fosfatno pufrana slanica

PCL – primary plasma cell leukemia; plazmacelična levkemija

PCR – polymerase chain reaction; verižna reakcija s polimerazo

PD-L1 – programmed death-ligand 1; programirani celični smrtni ligand 1

PKMC – presaditev krvotvornih matičnih celic

SCC – saline sodium citrate; raztopina natrijevega citrata z natrijevim kloridom

SMM – smoldering multiple myeloma; tleči/asimptomatski plazmocitom

t – translocation; translokacija

1 UVOD

1.1 GEN *MYC*

Protoonkogen *MYC* je pomemben regulatorni gen, ki sodeluje pri celični proliferaciji, rasti, diferenciaciji in apoptozi (1). Deregulacija protoonkogenega *MYC* vodi do razvoja različnih vrst raka (2).

Gen *MYC* se nahaja na daljši ročici kromosoma 8 in kodira transkripcijski faktor, ki regulira napredovanje celičnega cikla, apoptozo in celično transformacijo (2, 3). Večina študij se je osredotočila na tri člane družine genov *MYC*: *c-MYC*, *L-MYC* (pri pljučnem karcinomu) in *N-MYC* (pri nevroblastomu). Najbolj preučevan je sicer gen *c-MYC* (celični) (2, 4, 5). Deregulirano izražanje *c-MYC* je eden od ključnih mehanizmov pri razvoju limfomov, sporadičnih oblik raka dojke in v različnih človeških, kakor tudi v živalskih tumorjih (6, 7).

Odkrili so, da *c-MYC* predstavlja celični homolog retrovirusnemu onkogenu *v-MYC* (5, 7, 8). Aviarni retrovirus naj bi povzročil nastanek mielocitomatoze (vrsta levkemije pri kokoših), kar podpira teorijo o virusni integraciji v genom gostitelja. Ta vodi do aktivacije gostiteljevega onkogenega. Človeški homolog gena *v-MYC*, poznan kot *c-MYC* je bil prvi odkriti celični onkogen, katerega povečano izražanje je lahko posledica vgradnje retrovirusa in z njo povezane mutageneze (5).



Slika 1: Gen *MYC* se nahaja na daljši ročici (q) kromosoma 8 na segmentu 24. Povzeto po 3.

1.1.1 VLOGA *MYC* V NORMALNEM DELOVANJU CELICE

MYC služi kot glavni regulator celičnega metabolizma in proliferacije celic (9). Kodira jedrni fosfoprotein, ki ima ključno vlogo v celičnem ciklu, apoptozi in pri transformaciji celice (3). *MYC* je multifunkcijski transkripcijski faktor, ki selektivno poveča izražanje določenih tarčnih genov, kar aktivira celično rast in proliferacijo (8, 9). Obenem preprečuje izražanje nekaterih genov, ki imajo antiproliferativno vlogo (9).

MYC je pomemben tudi kot regulator imunskega odziva, vendar natančen mehanizem, s katerim uravnava imunski odziv, ostaja neznan. Znano je, da povečano izražanje gena *MYC* proliferativnim celicam prepreči aktivacijo imunskega odziva, medtem ko pa inaktivacija *MYC* sproži imunski odziv posameznika (prepreči nadaljnjo celično proliferacijo in vodi v apoptozo). *MYC* vpliva predvsem na izražanje genov za antigena CD47 in PD-L1 (programirani celični smrtni ligand 1). Inaktivacija *MYC* zatorej povzroči zmanjšano regulacijo CD47 in PD-L1, kar nadaljnje vodi do aktivacije imunskega odziva oziroma celic CD4⁺ (celice T pomagalke) in makrofagov, ki dokončno odstranijo tumorsko celico in zaustavijo angiogenezo (10).

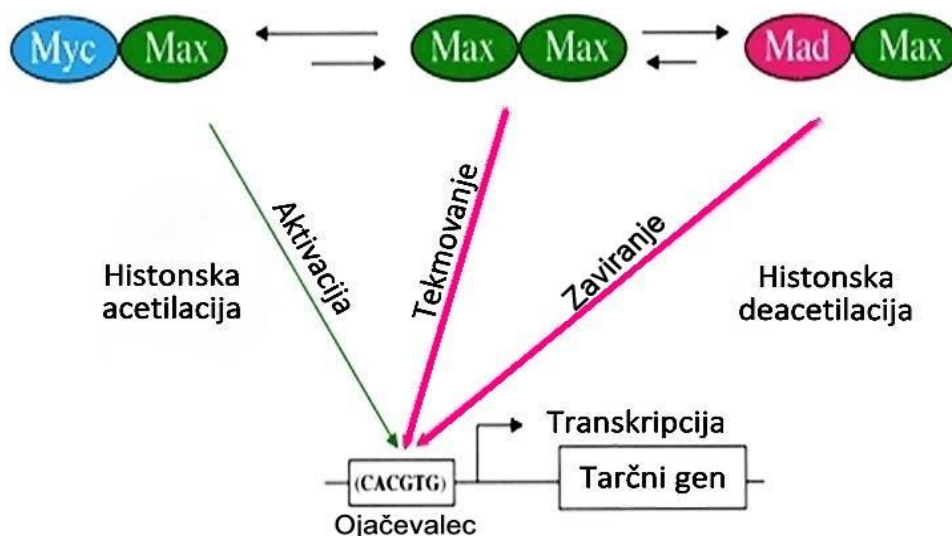
MYC je vključen v kontrolo celičnega cikla. Celice s poškodovano DNA so podvržene blokadi prehoda med fazama G1/S celičnega cikla, kar nadalje onemogoča podvajanje poškodovane DNA v fazi S. Blokada prehoda G2/M pa onemogoča vstop poškodovane DNA v mitozo (11). Zaradi onkogenega potenciala oziroma morebitne povzročitve celične apoptoze je *MYC* kot protoonkogen v normalnih celicah močno reguliran na transkripcijski in postranskripcijski ravni. Razpolovni čas (postranskripcijska regulacija) proteina *MYC* in njegovo transkripcijsko aktivnost uravnava kinaze, ubikvitin ligaze, acetiltransferaze in drugi. *MYC* je kot transkripcijski faktor ključnega pomena za prepoznavanje tarčnih mest na DNA, pri čemer tvori dimere z *MYC* povezanim faktorjem X (*MAX*), se poveže z DNA ter pri tem uravnava izražanje genov. *MYC* kot transkripcijski faktor stimulira metabolne poti, ki spodbujajo nastanek novih celičnih organelov, zlasti ribosomov in mitohondrijev. Celična rast je v veliki meri odvisna od zadostnega števila mitohondrijev, ki so namenjeni za proizvodnjo energije in drugih celičnih gradnikov. Ustrezno število ribosomov je pomembno za proces translacije in za nadaljnjo sintezo proteinov (8).

Normalne deleče se celice izražajo nizke ravni *MYC* mRNA. V odsotnosti pozitivnih regulatornih signalov je *MYC* mRNA kratkoživa, *MYC* transkripcija se tako zmanjša in raven proteina *MYC* je nizka, kar zavira proliferacijo celice (9, 12).

1.1.2 ZGRADBA IN FUNKCIJA PROTEINA MYC

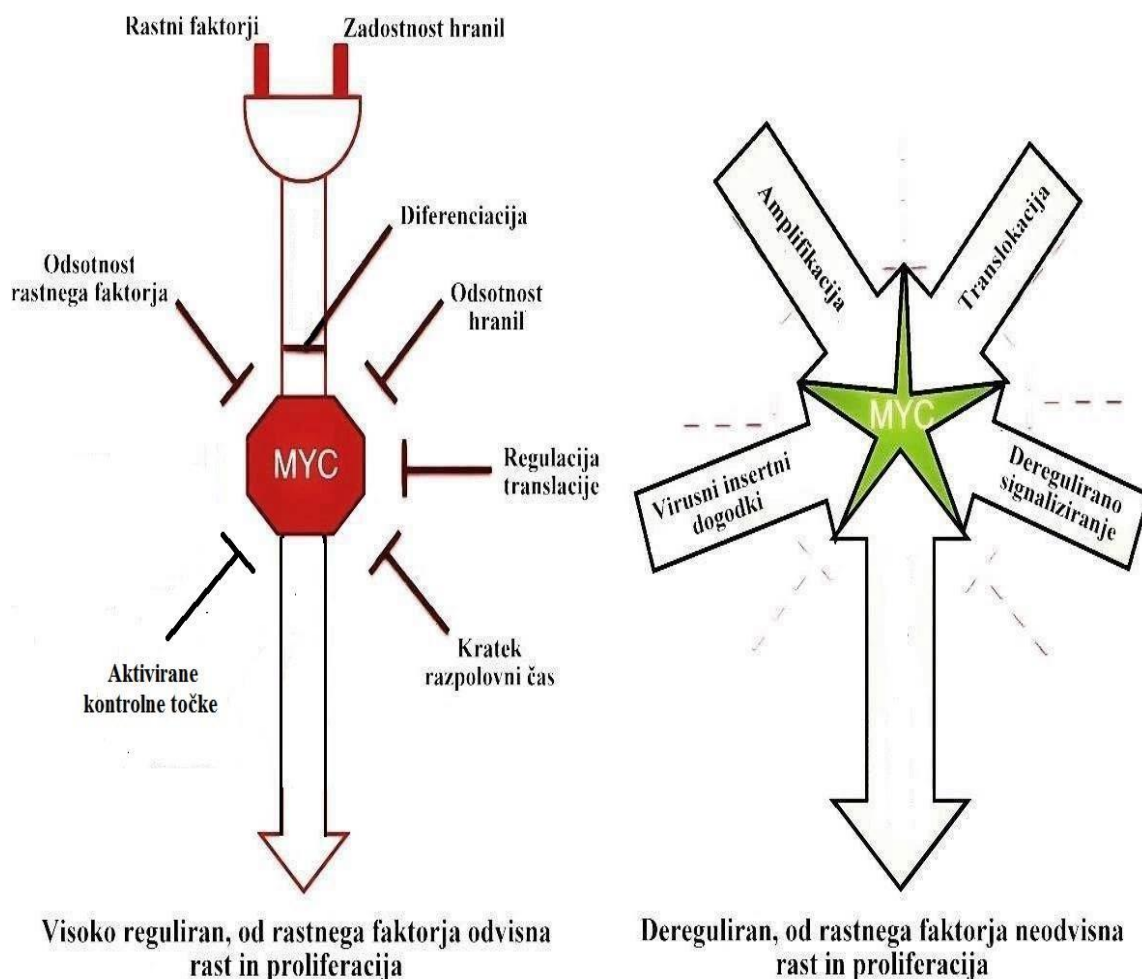
Protein *MYC* se izraža v skoraj vseh delečih se celicah, v embrionalnih kakor tudi v odraslih tkivih (13). Kot transkripcijski faktor povzroči izražanje ali utišanje približno 15 % vseh genov (13, 14). Ima okvirno velikost od 40 do 50 kDa (15). Sestavljen je iz dveh domen, in sicer iz N-terminalne in C-terminalne domene, pri čemer je slednja bazična vijačnica-zanka-vijačnica levcinska zadrga (bHLHLZ). Ta omogoča vezavo proteina na

DNA, medtem ko je N-terminalna domena potrebna za dimerizacijo proteina MYC s potrebnim partnerjem (protein MAX) in nadaljnjo aktivacijo transkripcije. Protein MAX prav tako vsebuje omenjeno strukturo (14). Dimerizacija teh dveh proteinov je predpogoj za nadaljnjo vezavo na kratko nukleotidno zaporedje DNA, natančneje na ojačevalec, ki vsebuje zaporedje 5'-CACGTG-3', kar aktivira transkripcijo tarčnega gena (13, 14, 15, 16, 17). Prepoznavna in vezava transkripcijskega faktorja MYC na omenjeno nukleotidno zaporedje povzroči sprostitvev polimeraze, ki je potrebna za začetek transkripcije (8). Pri mehanizmu delovanja proteina MYC je potrebno omeniti tudi njegov vpliv na strukturo kromatina. MYC namreč regulira delovanje histonske acetil transferaze (HAT), kar vodi do acetiliranja histonov in nadaljnega odprtja kromatina (18, 19). Pri tem postane DNA dostopna za vezavo transkripcijskih faktorjev na promotorje, kar se odraža v izražanju genov. V nasprotju z MYC, lahko MAX oblikuje homodimere, ki se vežejo na nukleotidno zaporedje ojačevalca, vendar MAX homodimere niso transkripcijsko aktivne. Odkrili so, da lahko protein MAX tvori heterodimere tudi s proteinom MAD, ki prav tako sodi v družino proteinov s strukturo bazična vijačnica-zanka-vijačnica levcinska zadrga. Heterodimeri MAX-MAD nasprotujejo funkciji MYC-MAX, kar vodi do zavrtja transkripcije tarčnega gena (20). Pri interakciji med proteinoma MAD in MAX je potrebna prisotnost korepresorja Sin3, kar nadalje vodi do histonske deacetilacije in posledično do utišanja tarčnega gena (19, 20). Funkcija proteina MYC je torej predvsem odvisna od dostopnosti njegovega heterodimernega partnerja MAX ter od koncentracije MAX-MAX homodimerov in MAX-MAD heterodimerov (19).



Slika 2: Acetilacija in deacetilacija histonov. Povzeto po 19.

Ob pomanjkanju hranil ali hipoksiji pride do zaviranja translacije MYC, proteinske stabilnosti in MYC-MAX dimerizacije (8). Potrebno je omeniti, da ima v primerjavi s proteinom MAX protein MYC krajšo razpolovno dobo. Protein MAX se pa izraža konstitutivno in je zelo stabilen. Transkripcijska aktivnost heterodimera MYC-MAX je posledično predvsem odvisna od koncentracije proteina MYC (14).



Slika 3: Od ravnega faktorja odvisna in neodvisna aktivnost MYC. Povzeto po 8.

Gen *MYC* je odziven na rastne faktorje. Faktorji, ki spodbujajo celično rast in delitev, povečajo izražanje gena *MYC*, medtem ko faktorji, ki inhibirajo celično rast, povzročijo utišanje gena (15). Poleg tega so rastni signali in ustrezne hranilne snovi v nekancerogenih celicah potrebne za aktivnost MYC. Obstaja več stopenj povratnih zank in kontrolnih točk, ki nadzirajo aktivnost MYC. V rakavih celicah izguba kontrolne točke, pomnoževanje gena, kromosomska translokacija, prisotnost enega ali več preostalih dereguliranih

signalnih dogodkov, vodi do presnovnih aktivnosti *MYC*, ki niso odvisne od ravnega faktorja. Slednje se odraža v neomejeni celični rasti in proliferaciji (8).

1.1.3 VLOGA GENA *MYC* PRI NASTANKU IN RAZVOJU RAKA

Skoraj vse genetske spremembe gena *MYC*, ki so povezane z rakom, vključujejo nekodirajoče regulatorne regije gena *MYC*, in ne sekvenc, ki kodirajo proteine. Zato deregulacija izražanja *MYC* močnejše vpliva na celične procese, kot pa mutirani gen za protein *MYC*. Mehanizmi, s katerimi onkoprotein *MYC* opravlja svoje funkcije, niso povsem pojasnjeni. V tumorskih celicah je funkcija *MYC* skoraj vedno povečana, bodisi zaradi mutacij v genu *MYC*, pogosteje pa zaradi povečanega izražanja preko drugih onkogenih poti (9).

1.1.4 MEHANIZMI DEREGULACIJE

Eden izmed prvih odkritih vzrokov deregulacije so bile translokacije gena *MYC* (12). Le te lahko razdelimo v tri ločene razrede. Lahko pride do translokacije kodirajoče regije protoonkogenega *MYC*, bodisi proksimalno ali distalno glede na lokus gena *MYC* (21). Kromosomska translokacija z enim od treh imunoglobulinskih lokusov (*IGH*, *IGK*, *IGL*) je verjetno primarni dogodek pri Burkittovem limfomu, medtem ko preureditve gena *MYC* pri diseminiranemu plazmocitomu (DP) sodijo med pozne dogodke. Translokacije nastanejo zaradi napake med somatsko rekombinacijo, ki je značilna za celice vrste B (22). Translokacija protoonkogenega *MYC* k lokusu gena, ki kodira težko verigo imunoglobulina (*IGH*), je klasičen primer (23, 24). Poleg gena *IGH*, sodita v to skupino tudi gena *IGL* in *IGK*. Gen *IGL* ima pozicijo na 22q11 ter kodira lahke verige λ (lambda). Gen *IGK* ima pozicijo na 2p12, pri čemer kodira lahke verige κ (kapa) (25). Vpliv *IG* lokusa na mehanizem deregulacije *MYC* še vedno ni točno pojasnjen. Najbolj uveljavljena hipoteza zaenkrat temelji na tem, da naj bi ojačevalnik gena *IG* ob prisotnem genu *MYC*, vodil v neprimerno transkripcijo le tega (26) oziroma v povečano izražanje gena *MYC* (27).

Med presnovne spremembe rakavo spremenjenih celic (predvsem zaradi povečanega izražanja gena *MYC*) sodi povečana potreba po nukleinskih kislinah, lipidih in beljakovinah, ki so potrebne za hitro celično proliferacijo. Istočasno lahko povečano izražanje gena *MYC* vodi v spremembe ravni izražanja številnih genov, kar povzroči povečano celično proliferacijo. Lahko rečemo, da se učinki ki jih sproži *MYC*, pojavijo bodisi zaradi t.i. primarnega onkogenega, ki se aktivira zaradi amplifikacije ali translokacije,

bodisi končni učinek odraža delovanje drugih aktiviranih onkogenov. *MYC* namreč kodira bazično vijačnico-zanko-vijačnico levcinske zadrge (bHLHLZ) transkripcijskega faktorja, ki dimerizira s proteinom MAX, kar povzroči povečano izražanje genov. Po drugi strani pa lahko *MYC* z vezavo transkripcijskega faktorja Miz-1 zavira izražanje ciljnih genov (9).

MYC je eden najpogostejših dereguliranih onkogenov, kar vodi do razvoja malignih celic. Deregulacijo *MYC* opredelimo kot spremembe, ki so posledica *MYC* mRNA ali proteinskih produktov, ki se ne odzivajo na negativne regulatorne dražljaje. Slednje ima za posledico stalno izražanje oziroma zvišano raven izražanja *MYC* (12). Čezmerno izražanje povzroči pomanjkanje nadzora celičnega cikla, pri čemer celice s poškodovanimi kromosomi (poškodovano DNA) preidejo v mitozo (11).

Izražanje gena *MYC* je pri raku prekomerno, zaradi določenih genetskih sprememb, kar vodi do povečane transkripcije *MYC* oziroma povečane stabilnosti *MYC* mRNA ter proteina. Vzrok deregulacije so lahko kromosomske translokacije, točkovne mutacije, genske amplifikacije in deregulacija transkripcijskih faktorjev, ki vplivajo na aktivnost promotorja gena *MYC*. *MYC* se veže na več sto genomskih lokusov, kar vodi v transkripcijo velikega števila genov. Stopnja deregulacije le teh je odvisna od izražene ravni *c-MYC*, vezavne afinitete na nukleotidno zaporedje ojačevalca, vrsto celice in nenazadnje od ravni proteina MAX (28).

V rakavih celicah lahko poveča raven *MYC* tudi konstitutivna aktivacija rastnega faktorja in izguba kontrolnih točk. To se odraža v vezavi *MYC*-MAX poleg mest za vezavo z visoko afiniteto tudi na mesta z nižjo afiniteto in ojačevalce (8).

Amplifikacija gena *MYC* je najpogosteje opažen vzrok deregulacije *MYC* pri raku, kar je pogosto povezano z agresivnostjo bolezni, metastatskim potencialom ter odpornostjo na zdravljenje. Pomnožitev vsakega izmed treh članov družine *MYC* je lahko prisotna pri raku, kar se odraža v različnih bioloških fenotipih. Amplifikacija predstavlja jasen znak deregulacije gena *MYC*, ki vodi v proces karcinogeneze, vendar vseeno ostaja mehanizem neznan. Najenostavnejša razlaga bi bila, da pomnoževanje gena *MYC* vodi do zvišane koncentracije *MYC* mRNA in proteina *MYC*, kar zadostuje za vzdrževanje proliferativnih in onkogenih transkripcijskih procesov. Študije poročajo, da lahko pride do povečane ravni *MYC* tudi zaradi transkripcijskih in postranskripcijskih mehanizmov (12).

1.1.5 MYC KOT TARČA ZDRAVILNIH UČINKOVIN

Povečano izražanje ni pomembno samo za napredovanje tumorja, temveč tudi za vzdrževanje tumorskega okolja. Zmanjšana raven MYC pa privede med drugim tudi do apoptoze. Vse te lastnosti predstavljajo molekulo MYC kot zelo privlačno tarčo pri zdravljenju raka. Poznanih je nekaj alternativnih strategij, pri čemer je poznan pristop v moteni vezavi MYC na MAX, kar povzroči inaktivacijo MYC. Takšen pristop je že v uporabi, saj so bile pri tem uspešno proizvedene različne molekule majhnih inhibitorjev, ki so posebej usmerjene proti MYC (13). Drug pristop temelji na zaviranju dimerov MYC-MAX, kateri se vežejo na ojačevalce v promotorjih različnih tarčnih genov MYC (13).

Ker je MYC pomemben tudi kot regulator imunskega odziva, predstavlja še večje zanimanje pri razvoju tovrstnih tarčnih terapij, ki bi lahko pripomogle k obnovitvi posameznikovega imunskega odziva pri nekaterih drugih vrstah raka (10).

1.2 DISEMINIRANI PLAZMOCITOM

Diseminirani plazmocitom (DP) je klonska rakava krvna bolezen, ki nastane iz rakavo spremenjenih limfocitov B, kateri so skoraj dosegli stadij plazmatk (29, 30). Plazmocitomske celice najpogosteje prizadenejo rdeči kostni mozeg skeleta, pri čemer je povprečna starost pri odkritju bolezni 60 do 70 let. Etiologija bolezni ni poznana, moški in temnopolti obolevajo pogosteje, Azijci pa bolj poredko (oba spola obolevata enako pogosto) (30). Pri večini bolnikov rakav klon izloča monoklonski imunoglobulin (IgG, IgA, IgD), kar opredelimo kot plazmocitom določene vrste imunoglobulinov. V 30 % primerov rakave plazmatke izločajo samo lahke verige kapa (κ) ali lambda (λ), kar imenujemo Bence-Jonesova proteinurija (29, 30, 31).

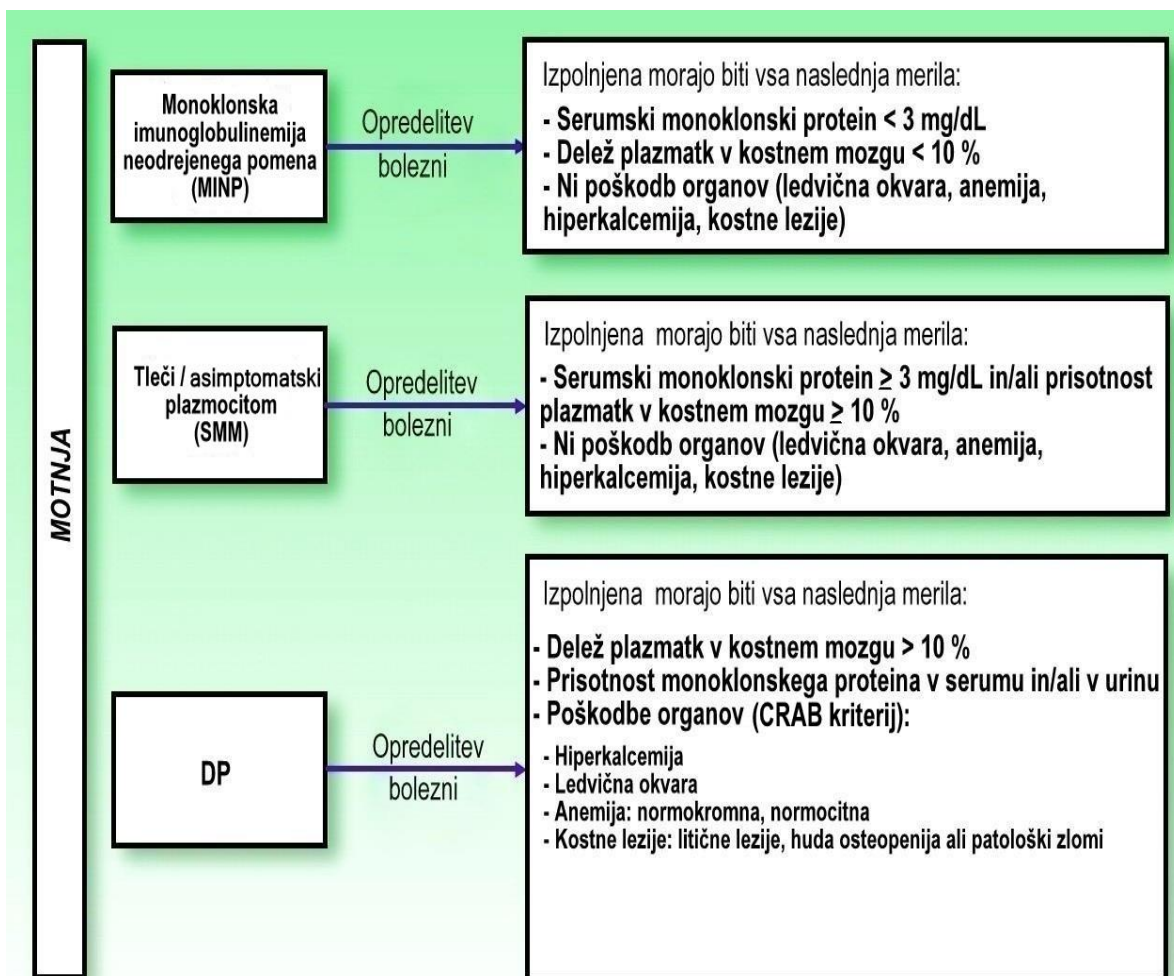
Preglednica I: Diagnostična merila za diseminirani plazmocitom. Povzeto po 30.

Veliki znaki	Mali znaki
> 30% plazmocitomskih celic v KM	10 – 30 % plazmocitomskih celic v KM
plazmocitomski infiltrat potrjen z biopsijo tkiva	mIg je prisoten, vendar v manjši koncentraciji
mIg: serum: IgG > 35g/L, IgA > 20g/L, urin: > 1 g/24 ur beljakovine Bence-Jones	osteolitične spremembe kosti
	zmanjšana koncentracija normalnih Ig (< 50 % normalne): IgG < 6 g/L, IgA < 1 g/L, IgM < 0,5 g/L

KM: kostni mozeg, mIg: monoklonski imunoglobulin

Prisotnost vsaj enega velikega in enega malega znaka, opredeljuje DP. Bolezen je potrjena tudi v primeru, če so prisotni trije mali znaki, vendar obvezno prva dva navedena v Preglednici I (30).

DP je potrebno razlikovati od MINP (monoklonska imunoglobulinemija neodrejenega pomena), SMM (tleči/asimptomatski plazmocitom) in PCL (plazmacelična levkemija), pri čemer slednja velja za bolj agresivno obliko bolezni (32).



Slika 4: Diagnostični kriteriji. Povzeto po 33.

1.2.1 SIMPTOMI IN ZDRAVLJENJE

Bolniki z DP imajo različne simptome. Pogosto se pojavi anemija, zaradi prevladujočih rakavih plazmatk v kostnem mozgu, kjer spodrivajo normalno hemopoezo (34). Plazmocitomske celice izločajo citokine, ki aktivirajo osteoklaste. Slednje vodi do povečane razgradnje skeleta, osteoliz in posledično do pogostih bolečin v predelu hrbtenice in reber, vendar je lahko pri tem prizadeta tudi katera koli druga kost. Pri bolnikih prihaja do lokalizirane razgradnje kosti in patoloških zlomov, kar običajno sovpada s pojavom hiperkalcemije. Pogoste so tudi ledvične okvare in počasnejši pretok krvi, zaradi visoke koncentracije monoklonskega imunoglobulina in tako povečane viskoznosti (34, 35).

Shema zdravljenja je odvisna od prizadetosti organskih sistemov in splošnega zdravstvenega stanja bolnika (34). DP velja za neozdravljivo bolezen, pri kateri bolniki

prejemajo podporno zdravljenje, ki jim pomaga okrepiti skelet, zmanjšati bolečine, zdraviti okužbe ter zmanjšati tveganje za nastanek potencialnih patoloških zlomov (34, 35). Ključno zdravljenje pri DP je avtologna presaditev krvotvornih matičnih celic (PKMC), pri kateri je relativna omejitev starost bolnikov nad 70 let (31, 34). Kljub zdravljenju z novimi načini in zdravili ne moremo vedno in v celoti preseči učinka neugodnih genetskih preureditev. Mnogo tarčnih terapij ostaja še v procesu razvoja, poleg tega je potrebno opraviti več dolgoročnih raziskav, ki so ključne za opredelitev učinkovitosti posamezne tarčne terapije. Cilj zdravljenja je podaljšati čas remisije pri bolnikih, ki imajo višje tveganje oziroma sodijo v skupino z neugodnim napovednim pomenom (36).

1.2.2 CITOGENETSKE PREUREDITVE PRI DP

DP je druga najpogostejša rakava krvna bolezen (za ne-Hodgkinovem limfomom), pri kateri so prisotne značilne določene kromosomske preureditve, ki jih je mogoče zaznati z analizo proganih kromosomov ali s fluorescenčno *in situ* hibridizacijo (FISH) (37). Bolnike lahko razvrstimo v skupino z neugodnim, vmesnim ali ugodnim napovednim pomenom. V kategorijo z ugodnim napovednim pomenom sodi hiperdiploidni kariotip in translokacija, ki vodi v zlitje genov *CCND1* (kodira ciklin D1) in *IGH*, kar zapišemo kot t(11;14)(q13;q32). Na splošno naj bi translokacije, ki vključujejo gen *IGH* (14q32), predstavljale 60 % vseh preureditev pri DP. V kategorijo z neugodnim napovednim pomenom sodi translokacija t(4;14)(p16;q32), ki vodi v zlitje gena *FGFR3* (kodira fibroblastni rastni faktor 3) in *IGH*, in vodi v deregulacijo onkogenega *FGFR3*. V isto kategorijo sodi tudi t(14;16)(q32;q23), ki vodi v deregulacijo onkogenega *c-MAF* ter je načeloma prisotna pri največ 7 % bolnikov z DP. Hipodiploidni kariotip je pogosto povezan z delecijo 13q (85 % bolnikov z DP ima prisotno monosomijo oziroma delecijo celotnega 13. kromosoma), kar označuje slabo prognozo. Neugoden napovedni pomen predstavlja tudi delecija lokusa 17p13, ki kodira tumorsupresorski gen *Tp53*. Ta je prisotna pri manjšem odstotku bolnikov (do 10 %), pogostost se z napredovanjem bolezni povečuje. Pri bolnikih z DP so pogoste preureditve kromosoma 1 (delecija 1p ali amplifikacija 1q), ki so napovedno neugodne (36).

Pri bolnikih z DP ločimo dve večji vrsti citogenetskih sprememb, bodisi primarne ali sekundarne (Preglednica II). Primarne citogenetske spremembe zasledimo v zgodnji fazi bolezni, ko normalna plazemska celica prehaja v klonalno, premaligno fazo. Večina sekundarnih citogenetskih sprememb se pojavi kasneje pri napredovanju bolezni (38).

Preglednica II: Primarne in sekundarne citogenetske spremembe pri bolnikih z DP.

Povzeto po 38.

Primarna citogenetska sprememba	Sekundarna citogenetska sprememba
t(11;14)(q13;q32)	del(13q)
t(4;14)(p16;q32)	del(17p)
t(14;16)(q32;q23)	amp(1q)
Druge translokacije, ki vključujejo gen <i>IGH</i>	del(1p)
Hiperdiploidnost	Preureditve gena <i>MYC</i>

amp: amplifikacija, del: delecija, t: translokacija

1.2.3 VLOGA PREUREDITEV GENA *MYC* PRI DP

Preureditve gena *MYC* sodijo v pozen bolezenski dogodek, natančneje med sekundarne genomske preureditve pri DP (22, 27, 39). Vloga funkcij raznih partnerskih genov še ni dobro raziskana, jasno pa je, da deregulacija gena *MYC* vpliva na gene, ki sodelujejo pri podvojevanju DNA, proliferaciji celic in apoptozi. Povečano izražanje gena *MYC* je neposredno povezana s poznimi bolezenskimi stadiji in posredno s slabo prognozo (27). Glavna posledica preureditev je deregulacija *MYC* v celotnem celičnem ciklu, kar vodi do pospešene celične proliferacije (37).

Pri DP je povečana aktivnost *MYC* povezana z napredovanjem bolezni, vendar natančen mehanizem, ki vodi do povečane aktivnosti *MYC*, ni dobro poznan (40). Preureditev gena *MYC* naj bi bila prisotna pri 15 % novoodkritih bolnikov z DP (23, 37). Pogostost pojavljanja preureditev gena *MYC* pa doseže 50 % pri napredovanju bolezni (27). Povečano izražanje gena *MYC*, naj bi bilo povezano z napredovanjem MINP v DP. Prav tako naj bi bilo preveliko izražanje *MYC* povezano z bolj agresivnim potekom DP, kot je na primer PCL (37).

Podatkov o partnerskih genih, ki so vključeni v preureditve gena *MYC* pri DP, ni veliko. Predpostavljajo, da poleg genov *IGH*, *IGL* in *IGK*, obstajajo vsaj še naslednji partnerski geni: *NSMCE2/TRIB1*, *TXNDC5*, *FAM46C*, *FOXO3*, *SNX5*, *NBEA* (22).

V eno izmed raziskav o vlogi *MYC* je bilo vključenih 23 bolnikov z diagnozo DP, pri katerih so s citogenetskimi metodami iskali preureditve *MYC*. 74 % preiskovancev je imelo uravnotežene translokacije, ki so vključevale 8q24.1. Najpogostejše so uravnotežene

translokacije gena *MYC* z geni *IG*: t(8;14)(q24.1;q32) (ugotovljena pri osmih preiskovancih, t(8;22)(q24.1;q11.2) (ugotovljena pri šestih preiskovancih) in t(2;8)(p12;q24) (ugotovljena pri treh preiskovancih). 26 % bolnikov je imelo neuravnotežene preureditve, ki so vključevale adicijo dela homolognega kromosoma add(8)(q24.1), kar je vodilo do delecije *c-MYC*. Poleg omenjenega, je imelo 30 % vključenih preiskovancev prisotne dodatne kromosomske nepravilnosti, ki predstavljajo veliko tveganje oziroma slabšo napoved oziroma prognozo. Pri petih preiskovancih so ugotovili delecijo daljše ročice kromosoma 13, ter v dveh primerih delecijo krajše ročice kromosoma 17. Le-te so bile sprva zaznane s kariotipizacijo, nakar so bile potrjene tudi s FISH (37).

Preureditve gena *MYC* so povezane z znatnim povečanjem izražanja, ki je monoalelno. Bolniki z DP, ki nimajo prisotne preureditve *MYC*, imajo v primerjavi z bolniki z MINP znatno povečano bialelno izražanje. Včasih je za prehod iz MINP v DP dovolj monoalelno izražanje *MYC*, v primeru, da obstaja preureditev gena *MYC*. Predpostavljajo, da *MYC* preureditve, ne glede na to, v katerem obdobju patogeneze DP se pojavijo, zagotovijo en dogodek, ki prispeva k avtonomiji tumorja (22).

Pri drugi raziskavi so s FISH analizirali veliko število bolnikov, med katerimi so bili na novo zboleli bolniki z DP (529 preiskovancev), bolniki s ponovitvijo bolezni oziroma relapsom DP (58 preiskovancev), bolniki s PCL (23 preiskovancev), bolniki z MINP (65 preiskovancev) in bolniki s simptomatsko motnjo klonskih plazemskih celic (24 preiskovancev). Pri tej študiji so ugotovili 15 % pojavnost preureditev *MYC* pri bolnikih z DP ali primarno PCL, neodvisno od stadija bolezni. Dve glavni translokaciji, t(8;14) in t(8;22), predstavljata 25 % preureditev *MYC*. Pri nekaterih preiskovancih ni bilo opaznih preureditev *MYC* z uporabo centromernih in telomernih sond. Neobičajno translokacijo t(8;14) so zaznali pri bolnikih, ki so imeli fuzijo *MYC-IGH*, vendar s pomočjo *c-MYC* telomernih in centromernih prob niso zaznali preureditev. V Preglednici III vrednosti predstavljajo število preiskovancev (23).

Preglednica III: *c-MYC* preureditve pri bolnikih z DP. Povzeto po 23.

Diagnoza	Ni opaznih preureditev <i>c-MYC</i>	Klasična translokacija t(8;14)	Klasična translokacija t(8;22)	Drugi partnerji <i>c-MYC</i>	Neobičajna translokacija t(8;14)	Vse preureditve <i>c-MYC</i> Delež bolnikov (%)
DP (novo diagnosticirani)	449	11	8	61	2	82 (13,5 %)
Relaps DP	52	1	0	4	1	6 (1 %)
Primarna PCL	20	0	0	3	0	3 (0,5 %)
MINP	63	0	0	2	0	2 (0,3 %)
SMM	23	0	0	1	0	1 (0,16 %)

MINP: monoklonska imunoglobulinemija neodrejenega pomena, PCL: primarna plazmacelična levkemija, SMM: tleči/asimptomatski plazmocitom

2 NAMEN DELA

Namen magistrske naloge je ugotoviti pogostost preureditev gena *MYC* pri slovenskih bolnikih z DP. Preureditve bomo zaznavali s preiskavo FISH s fluorescentno označeno DNA sondo, ki je komercialno dostopna. S pomočjo te bomo lahko zaznavali tri morebitne prelomne točke na daljši ročici (q) 8. kromosoma na segmentu 24.

Predhodno bomo določili prazno vrednost (angl. cut off) pri posamezni preureditvi za uporabljeno DNA sondo. Pozitiven izvid izdamo pri rezultatih, ki so nad prazno vrednostjo.

Pred analizo vzorcev bomo pridobili podatke o napovedno pomembnih citogenetskih preureditvah za vsakega posameznega bolnika in ga tako umestili v določeno skupino, glede na napovedni pomen:

- neugoden,
- vmesen,
- ugoden.

Na osnovi opravljenih poskusov bomo določili:

- delež bolnikov s preureditvijo v genu *MYC*,
- vrste prelomov na 8. kromosomu na področju q24,
- pogostost posameznih prelomov pri preiskovancih s preureditvijo gena *MYC*,
- vrsto preloma, ki je najpogostejši glavni klon preurejenih celic,
- velikost klona preurejenih plazemskih celic,
- pogostost izoliranih sprememb (edini vzorec signala pri posamezniku),
- pojavnost in povezavo z ostalimi citogenetskimi spremembami,
- pojavnost in povezavo med skupinami posameznega napovednega pomena.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 BIOLOŠKI VZORCI

Na 20-ih vzorcih celic zdravih preiskovancev smo določili prazno vrednost (angl. cut off) za uporabljeno DNA sondo. Pri zdravih preiskovancih smo analizirali vensko kri in naredili FISH analizo po enakem postopku kot za vzorce bolnikov. Nato smo analizirali 69 vzorcev (kostnih mozgov) bolnikov z DP, ki so bili pridobljeni med majem 2012 in januarjem 2018. Nekateri vzorci bolnikov so bili že ustrezno arhivirani v zamrzovalniku (- 20 °C), medtem ko smo na preostalih vzorcih izvedli postopek izolacije plazmatk. Temu je sledila hipotonična obdelava in fiksacija izoliranih celic. S postopkom fiksacije smo celice konzervirali za dolgotrajno hranjenje in jih nato shranili v zamrzovalniku (- 20 °C).

3.2 PRIPOMOČKI IN APARATURE

Pri eksperimentalnem delu smo rokovali z različnimi pripomočki in uporabljali aparature, ki so navedene v nadaljevanju.

Pripomočki:

- steklene bučke (50 mL, 100 mL, 1000 mL, 2000 mL),
- stekleni merilni valji (100, 250 mL),
- steklena čaša (1000 mL),
- steklena erlenmajerica (100 mL),
- 10, 20, 100, 1000 µL pipete Eppendorf s sterilnimi plastičnimi nastavki Eppendorf (Hamburg, Nemčija),
- 15 mL, 50 mL centrifugirke,
- diamantno rezilo,
- 18x18 mm², 24x50 mm² krovna stekla (Brand, Wertheim, Nemčija),
- objektna stekla (Brand, Wertheim, Nemčija),
- 5 mL in 10 mL sterilne steklene pipete Dispenser,
- 3 mL Pasteurjeve pipete,
- 14 mL polistirenske epruvete,
- gumijast cement Fixo Gum (Marabu, Nemčija),
- magneti EasySep,
- štoparice,

- stojala,
- staničevina,
- pincete,
- parafilm,
- steklene kivete,
- kadičke za objektna stekla,
- rokavice.

Aparature:

- laminarna komora (Iskra Pio, Slovenija),
- centrifuga miniSpin Eppendorf (Hamburg, Nemčija),
- centrifuga Centric 322A (Domel, Železniki, Slovenija),
- centrifuga Rotofix 32A (Hettich, Tuttlingen, Nemčija),
- analizna tehtnica Mettler Toledo (Ohio, ZDA),
- mešalnik Rotamix (vorteks),
- vodna kopel Termoproc (Ljubljana, Slovenija),
- pH meter Mettler Toledo (Ohio, ZDA),
- vodna kopel Julabo TW8 (Seelbach, Nemčija),
- grelna plošča Termoproc (Ljubljana, Slovenija),
- invertni mikroskop Nikon (Tokio, Japonska),
- hibridizator Thermobrite (Abbott molecular, Illinois, ZDA),
- OptiChrome komora (Euroclone, Milano, Italija),
- fluorescenčni mikroskop (Olympus, ZDA).

3.3 IZOLACIJA PLAZMATK

3.3.1 Materiali

Uporabili smo naslednje reagentne in raztopine:

- lizirni pufer,
- 10x PBS,
- 1x PBS z BSA (2 %),
- CD138 Selection Kit (Stemcell Technologies, Vancouver, Kanada),
- magnetni nanodelci (Stemcell Technologies, Vancouver, Kanada).

3.3.2 Priprava raztopin

- **Lizirni pufer:** 82,60 g/L NH_4Cl
10 g/L KHCO_3
0,37 g/L EDTA

Raztopimo v 1000 mL destilirane H_2O in steriliziramo.

- **10x PBS pufer:** 80 g/L NaCl
2 g/L KCl
2 g/L KH_2PO_4
14,41 g/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$
2,92 g/L EDTA

Dolijemo destilirano H_2O do 900 mL in uravnamo pH na 7,2. Dopolnimo z destilirano H_2O do oznake 1000 mL in steriliziramo.

- **1x PBS z BSA (2 %):** 100 mL 10x PBS zlijemo v 1000 mL stekleno bučko in dodamo 20 mL BSA. Dopolnimo z destilirano H_2O do oznake, pH uravnamo na 7,2.

3.3.3 Postopek izolacije plazmatk

Celicam, ki jih nismo dali na gojišče, dodamo 1x lizirni pufer in inkubiramo 10 minut pri sobni temperaturi. Centrifugiramo pri 1600 rpm/5min ($\text{RCF} = 407 \text{ g}$). Supernatant odlijemo in pazimo, da pri tem ne odlijemo sedimenta. Sediment ponovno speremo s PBS in centrifugiramo. Supernatant odlijemo in ponovimo postopek spiranja sedimenta s PBS. Po centrifugiranju odlijemo supernatant (41).

Sediment prenesemo v polistirensko epruveto in pripravimo 1 mL celične suspenzije v 1x PBS/BSA pufru. Dodamo 50 μL CD138 Selection Kit, premešamo s pipetiranjem in inkubiramo pri sobni temperaturi 15 minut. Dodamo 50 μL magnetnih nanodelcev, premešamo s pipetiranjem in inkubiramo 10 minut pri sobni temperaturi. V nastalo raztopino dodamo toliko PBS/BSA pufra, da je celotni volumen 5 mL. Ponovno premešamo s pipetiranjem in postavimo epruveto v magnet EasySep za 5 minut. Dvignemo magnet in odlijemo supernatant. Pri tem nič ne stresamo in pazimo, da označene celice ostanejo v epruveti. Odstranimo epruveto iz magnet in ponovno dodamo toliko pufra, da je celotni volumen znašal 5 mL. Premešamo s pipetiranjem in epruveto znova vstavimo v

magnet za 5 minut. Supernatant previdno odlijemo in odstranimo epruveto iz magneta ter ponovno dodamo pufer, da je celotni volumen 5 mL. Epruveto še zadnjič postavimo v magnet in po 5 minutah pazljivo odlijemo supernatant. Celice prenesemo v novo centrifugirko in resuspendiramo v 1 mL PBS/BSA pufra (41).

3.4 HIPOTONIČNA OBDELAVA IN FIKSACIJA PLAZMATK

3.4.1 Materiali

Uporabili smo naslednje reagente in raztopine:

- hipotonična raztopina KCl;
- destilirana H₂O,
- serum FBS (Sigma, St. Louis, ZDA),
- fiksativ;
- absolutni etanol (Sigma, St. Louis, ZDA),
- očetna kislina (Merck, Darmstadt, Nemčija).

3.4.2 Priprava raztopin

Hipotonična raztopina: 3,5 mL (0,075 M) KCl

3 mL destilirane H₂O

0,5 mL seruma FBS

Pripravimo svežo raztopino.

Raztopina za fiksacijo: Absolutni etanol : Očetna kislina v razmerju 3:1

Pripravimo svežo raztopino in jo zaščitimo s parafilmom.

3.4.3 Postopek hipotonične obdelave in fiksacije plazmatk

Pripravimo 7 mL hipotonične raztopine, predhodno segrete na 37°C v vodni kopeli. Omenjeno raztopino dodamo k vzorcu predhodno izoliranih plazmatk in inkubiramo v vodni kopeli pri 37 °C za 25 minut. Nato dodamo 3 kapljice fiksativa in centrifugiramo 1600 rpm/8 min (RCF = 421 g). Odlijemo supernatant in premešamo preostali sediment na vorteksu. Po kapljicah dodajamo 8 mL fiksativa in inkubiramo 15 minut pri sobni

temperaturi. Po omenjenem času ponovno centrifugiramo in pustimo v centrifugirki približno 1 mL supernatanta. Vzorec hranimo v zamrzovalniku (42).

3.5 FISH

S fluorescenčno označenimi sondami neposredno zaznamo preureditve želenega gena. Pri tem uporabimo FISH, ki temelji na hibridizaciji fluorescenčno označene DNA sonde na tarčno področje. Sonda sestoji iz komplementarne nukleotidne sekvence glede na sekvenco v metafaznih kromosomih. S to tehniko lahko zaznamo lokacijo iskanega gena na kromosomu (43). Ob denaturaciji se dvovijačna DNA preiskovanca razklene. Sledi hibridizacija sonde, ki vsebuje komplementarno sekvenco nukleotidov za tarčno DNA (44). Poznanih je več vrst sond: lokusno specifične sonde (vežejo se na specifične nukleotidne sekvence), centromerne ali telomerne (vežejo se na centromerno področje ali na telomere kromosomov). Na tržišču so tudi barvne sonde, ki so namenjene obarvanju celotnega kromosoma (mešanica različnih sond se veže na določena področja posameznega kromosoma, kar omogoča prepoznavanje kompleksnih kromosomskih sprememb). Fluorescenčno označene sonde opazujemo pod fluorescenčnim mikroskopom. S pomočjo FISH lahko zaznamo tudi manjše delecije, duplikacije in preureditve, ki niso vidne pod običajnim svetlobnim mikroskopom (43, 44).

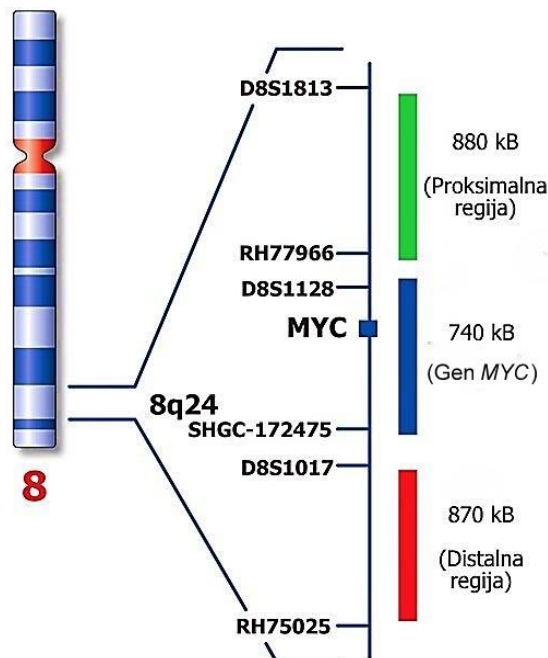
3.5.1 Fluorescentno označena DNA sonda

Uporabili smo tribarvno sondo KreatechTM MYC (8q24), ki je zgrajena tako, da zazna tri prelomne točke oziroma preureditve na daljši ročici (q) 8. kromosoma na segmentu 24. Sonda se veže na tri kritične regije na 8q24 in je označena s tremi različnimi fluorofori, ki se med seboj razlikujejo v valovni dolžini ekscitacije oziroma emisije (45, 46). Pri fluorescenčnem mikroskopu nam posamezen filter omogoča izbiro in prepušča optimalno svetlobo določene valovne dolžine, kar vodi do ekscitacije (vzbujanja) posameznega fluorofora. Posebno zrcalo usmeri vzbujevalno svetlobo proti objektivu (vzorcu) in posledično prepusti svetlobo z daljšo valovno dolžino. Pomemben je tudi emisijski filter, saj v okular prepusti le fluorescentno svetlobo, ki jo oddaja fluorofor (47). V spodnji preglednici (Preglednica IV) so predstavljeni podatki posameznega fluorofora.

Preglednica IV: Informacije o posameznem fluoroforu tribarvne sonde Kreatech™ MYC 8q24 (45, 46).

Področje vezave fluorofora in oddana svetloba	Ekscitacija (λ)	Emisija (λ)
Gen <i>MYC</i> (modra)	429 \pm 20 nm	470 \pm 30 nm
Proksimalna regija glede na gen <i>MYC</i> (zelena)	495 \pm 20 nm	525 \pm 30 nm
Distalna regija glede na gen <i>MYC</i> (rdeča)	546 \pm 12 nm	580 \pm 30 nm

Zelena označena sonda hibridizira z proksimalno regijo glede na gen *MYC*, medtem ko rdeče označena sonda hibridizira distalno glede na gen *MYC*. Modro označena sonda hibridizira z genom *MYC* (45).



Slika 5: Tribarvna sonda MYC (8q24). Povzeto po 45.

V primeru, da ni prisotne preureditve *MYC* oziroma zaznanih prelomov, vidimo mešanico omenjenih treh barv (zeleno, modro in rdečo) kot dve rožnato obarvani fuziji. Pri slednjem se sonda veže na oba 8. kromosoma na področje q24 oziroma na normalna alela. V primeru prelomov in preostalih sprememb lahko zaznamo različne vzorce in število signalov.

Preglednica V: Pričakovani signali s tribarvno sondo Kreatech™ MYC (8q24). Povzeto po 45.

	Normalen signal	Prelom v 8q24	Proksimalni prelom glede na 8q24	Distalni prelom glede na 8q24
Pričakovani signali	2F	1F1GB1RB	1F1G1RB	1F1GB1R

F: rožnata fuzija (mešanica barv iz zelene, modre in rdeče), G: (green) zelena, B: (blue) modra, R: (red) rdeča

3.5.2 Materiali

Uporabili smo naslednje reagente in raztopine:

- destilirana H₂O,
- 70 % etanol,
- 90 % etanol,
- absolutni etanol (Sigma, St. Louis, ZDA),
- 2x SSC, 20x SSC,
- NaCl (Kemika, Zagreb, Hrvaška),
- pepsin (Sigma, St. Louis, ZDA),
- HCl (Kemika, Zagreb, Hrvaška),
- MgCl₂ (Kemika, Zagreb, Hrvaška),
- 37 % formaldehid (Sigma, St. Louis, ZDA),
- DNA sonda, MYC (8q24), Triple-Color, Break (Kreatech Biotechnology, Amsterdam, Nizozemska),
- NP-40 (BDH Chemicals, Poole, Velika Britanija),
- PBT;
- Tween 20 (Sigma, St. Louis, ZDA),
- 6 % BSA (Kemika, Zagreb, Hrvaška),
- 1x PBS,
- DAPI (Abbott, Illinois, ZDA).

3.5.3 Priprava raztopin

- **20x SSC:** 175,3 g/L 3 M NaCl
88,25 g/L 0,3 M Na₃C₆H₅O₇ x 2H₂O

V 1000 mL bučko dolijemo destilirano H₂O in uravnamo pH na 6,3. Dopolnimo do oznake in prefiltriramo preko 0,45 µm filtra.

- **2x SSC:** 100 mL 20x SSC

850 mL destilirane H₂O

Uravnamo pH na 7,0 ± 0,2 in z destilirano vodo dopolnimo do oznake 1000 mL.

- **1x PBS:** 100 mL 10x PBS

V 1000 mL bučko dolijemo destilirano H₂O do oznake in uravnamo pH na 7,4.

- **Raztopina pepsina (0,005 %):** 99 mL destilirana H₂O

1 mL 1M HCl

Raztopino pripravimo v 100 mL bučko. Dodamo 200 µL koncentrirane raztopine pepsina.

- **Raztopina formaldehida:** 5 mL MgCl₂

2,5 mL 37% formaldehid

Raztopino pripravimo v 100 mL bučko. Do oznake napolnimo z 2x SSC.

- **70 % etanol**

- **90 % etanol**

- **Spiralna raztopina po hibridizaciji NP-40:** 0,9 g NP-40

60 mL 20x SSC

240 mL destilirane H₂O

V reagenčno steklenico si pripravimo raztopino in jo zaščitimo s parafilmom. Raztopino pustimo stati čez noč, da se detergent zanesljivo raztopi. Prefiltriramo preko 0,2 µm filtra in raztopino hranimo v hladilniku.

- **PBT:** 0,5 mL Tween 20

2 mL 6 % BSA

Raztopino pripravimo v 500 mL bučki in z 1x PBS dopolnimo do oznake. Raztopino pustimo stati čez noč, da se detergent zanesljivo raztopi. Prefiltriramo preko 0,2 µm filtra in raztopino hranimo v hladilniku.

3.5.4 Nanosi na stekla

Nova objektna stekla zložimo v stekleno ležečo kadičko in jih sprva spiramo 20 minut pod toplo vodo ter nato še 10 minut pod mrzlo vodo. Po omenjenem času objektna stekla speremo še z destilirano vodo in tako pripravljena pustimo v stekleni kadički, ki smo jo

predhodno napolnili z destilirano vodo. Vzorce odvajamo iz zamrzovalnika ter nato odpipetiramo 20 μ L suspenzije izoliranih plazmatk na mokro steklo. Predhodno na matirni rob napišemo ID in priimek preiskovanca. Steklo z nanešenim vzorcem čim hitreje položimo v komoro OptiChrome za 4 minute. Gostoto celic preverimo pod invertnim mikroskopom in s pomočjo diamantnega rezila označimo področje celic, na katerega bomo pozneje nanесли fluorescenčno označene sonde. Ko dosežemo ustrezno gostoto celic, sledi staranje stekel na grelni plošči; sprva za 30 minut na 60 °C in kasneje še 30 minut na 90 °C (48).

3.5.5 Postopek FISH

3.5.5.1 Predpriprava stekel s tarčno DNA

V vodni kopeli smo na 37 °C segreti stekleni kivet, ki sta bili napolnjeni vsaka po 100 mL predvidene raztopine. Prva kiveta je vsebovala 2x SSC, druga je bila napolnjena z raztopino pepsina. Objektna stekla z nanešenimi vzorci, smo v vsaki raztopini zaporedoma pustili 5 minut.

Na sobni temperaturi si pripravimo kivete z 2x SSC, raztopino formaldehida in raztopine različnih koncentracij etanola. Objektna stekla z nanešenimi vzorci zaporedoma prestavljamo v kivete po sledečem vrstnem redu:

- 2x SSC za 2 minuti,
- 2x SSC za 2 minuti,
- 2x SSC za 2 minuti,
- raztopina formaldehida za 10 minut,
- 2x SSC za 2 minuti,
- 2x SSC za 2 minuti,
- 2x SSC za 2 minuti,
- 70 % etanol za 2 minuti,
- 90 % etanol za 2 minuti,
- 100 % etanol za 2 minuti.

Objektna stekelca posušimo na zraku (44).

3.5.5.2 Priprava sonde za nanos

Sondo hranimo v hladilniku. Vsebino sonde (Kreatech™ MYC 8q24, Triple-Color, Break FISH probe) premešamo na vorteksu in centrifugiramo (49).

3.5.5.3 Kodenaturacija vzorca in sonde

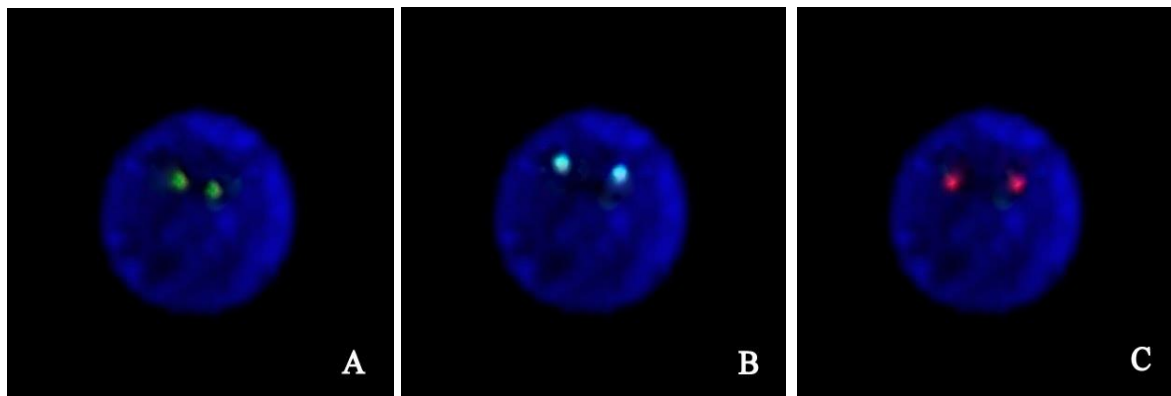
Na označeno področje posameznega objektnega stekla naneseemo 6,7 µL sonde in nanjo položimo krovno steklo (dimenzija 18x18 mm²). Robove krovnega stekla zalepimo z gumijastim cementom. Steklo nato položimo v hibridizator in izberemo ustrezen program. Vzorce denaturiramo 5 minut pri 78 °C in nato hibridiziramo čez noč (oziroma vsaj 16 ur) pri 37 °C (49).

3.5.5.4 Spiranje stekel po hibridizaciji

Po končani hibridizaciji s pinceto odstranimo krovna stekla in preostanek gumijastega cementa. Objektna stekla postavimo v spiralno raztopino NP-40, predhodno segreto na 73 °C. Po 4-ih minutah stekla prestavimo v kiveto s PBT na sobni temperaturi ter jih tam pustimo prav tako 4 minute. Mokra stekla odcedimo na staničevini in kanemo 10 µL DAPI ter nato položimo krovno steklo (dimenzija 24x50 mm²). Tako pripravljena objektna stekla položimo v črno škatlo in jih shranimo v zamrzovalniku (18). Preparate pregledamo pod fluorescenčnim mikroskopom pod 600-kratno povečavo. Vsak preparat pregledata dva analitika, pri čemer vsak prešteje in analizira 200 celic. Rezultat je povprečje dveh štetij (49). Pri štetju uporabljamo citogenetski sistem GenAsis.

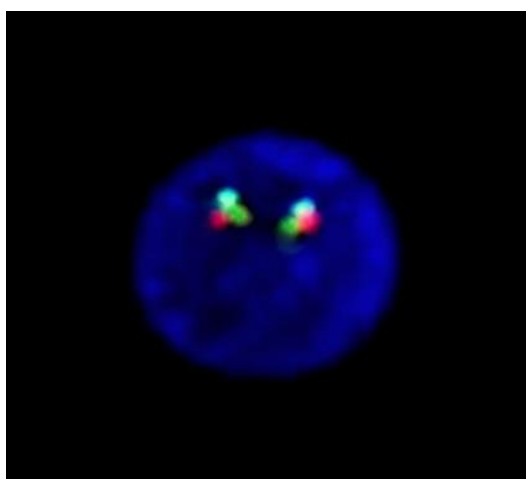
3.5.5.5 Mikroskopiranje preparatov

Pri pregledu preparatov smo vsako posamezno celico presvetlili pod posameznim ekscitacijskim filtrom in tako videli signale (Slika 6: A – C).



Slika 6: Signali sonde MYC vidni z uporabo različnih filtrov v kombinaciji z DAPI: **A)** Zeleni filter, **B)** Moder filter, **C)** Rdeči filter.

S pomočjo računalniških orodij citogenetskega sistema GenAasis smo lahko združili posnetke posameznih filtrov in tako sestavili skupno sliko. V zgornjem primeru so prikazani vzorci signalov (Slika 6: A – C) na normalni celici (Slika 7).



Slika 7: Vzorec signalov pri normalni celici (dva normalna alela).

4 REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1 DOLOČITEV PRAŽNE VREDNOSTI ZA DNA SONDO

Za izdajo izvida je treba predhodno določiti pražno vrednost (angl. cut off) za izbrano sondo oziroma opazovani vzorec signalov. FISH analizo s pomočjo tribarvne sonde KreatechTM MYC (8q24) smo izvedli na 20-ih vzorcih krvi zdravih posameznikov. Za vsak posamezen vzorec smo pod fluorescenčnim mikroskopom prešteli in ovrednotili različne vzorce signalov. Na koncu smo vse vrednosti zbrali v spodnji preglednici (Preglednica VI) in pri tem izločili najvišje pozitivne vrednosti za posamezen vzorec signala.

V računalniškem programu Microsoft Excel 2010 smo s pomočjo funkcije beta-inverzija določili mejno vrednost za posamezen signal. Pri izračunu smo upoštevali 95 % interval zaupanja (50).

$$\text{Mejna vrednost} = \text{BETAINV}(0,95; N+1; X)$$

N - največja določena vrednost za testirano DNA sondo

X – število prešteti signalov (200)

Preglednica VI: Določanje vzorca signalov na normalnih celicah za določitev prazne vrednosti za sondo MYC (8q24), Triple-Color, Break.

Zaporedna številka kontrolnega vzorca	Število celic s spremenjenim signalom / 200 celic	Število celic z neustreznim signalom / 200 celic	
		1F	3 (ali več) F
1	0	2	1
2	0	3	1
3	0	1	2
4	0	1	1
5	0	2	1
6	0	1	0
7	0	3	1
8	0	2	4
9	0	1	3
10	0	4	0
11	1 (1F1GB1R)	3	1
12	0	3	1
13	0	2	1
14	0	3	0
15	0	1	0
16	0	1	1
17	0	2	0
18	0	0	3
19	1 (1F1G1RB)	2	0
20	0	1	0

1F: ena rožnata fuzija, 3 (ali več) F: tri ali več rožnate fuzije

Iz Preglednice VI je razvidno, da smo z analizo FISH 20-ih kontrolnih vzorcev zaznali najvišje število naslednjih pričakovanih signalov:

- 1 signal 1F1GB1R (distalni prelom),
- 1 signal 1F1G1RB (proksimalni prelom).

Navedeno število signalov (v našem primeru 1) za posamezen pričakovan vzorec signala, predstavlja največjo pozitivno vrednost, ki jo uporabimo pri izračunu določitve prazne vrednosti. Pri tem upoštevamo, da je treba določiti prazno vrednost za vsak pričakovan vzorec signala posebej. Izračunali smo, da je prazna vrednost za distalni prelom 2,3 % ter za proksimalni prelom prav tako 2,3 %. To pomeni, da je vzorec preiskovanca pozitiven za oba preloma, če zasledimo omenjene signale pri več kot 2,3 % interfaznih jeder vseh prešteti celic.

Ker pri pregledu kontrolnih vzorcev nismo zaznali nobenega signala (N je torej 0), ki ustreza prelomu kromosoma 8 na področju gena *MYC*, smo pri tem upoštevali, da je največja pozitivna vrednost za testirano DNA sondo vrednost 1 (N+1). Tako smo za ta pričakovan vzorec signala določili prazno vrednost 1,5 %. V primeru, da zasledimo omenjen signal pri več kot 1,5 % interfaznih jeder, je vzorec pozitiven.

Iz razpredelnice (Preglednica VI) je obenem razvidno, da smo z analizo FISH 20-ih kontrolnih vzorcev, zaznali najvišje število sledečih neustreznih signalov:

- 4 celice 1F (1 rožnata fuzija),
- 4 celice 3F (3 ali več rožnate fuzije).

Ker lahko pri preiskovancih zaznamo spremembo v številu kromosomov (hipodiploiden ali hiperdiploiden kariotip), smo zato določili prazno vrednost tudi za vsak posamezen neustrezen vzorec signala. Pri tem smo izračunali, da je prazna vrednost v prisotnosti 1 fuzije ali 3-eh (oziroma več) fuzij 4,4 %. Vse prazne vrednosti so zbrane v spodnji preglednici (Preglednica VII).

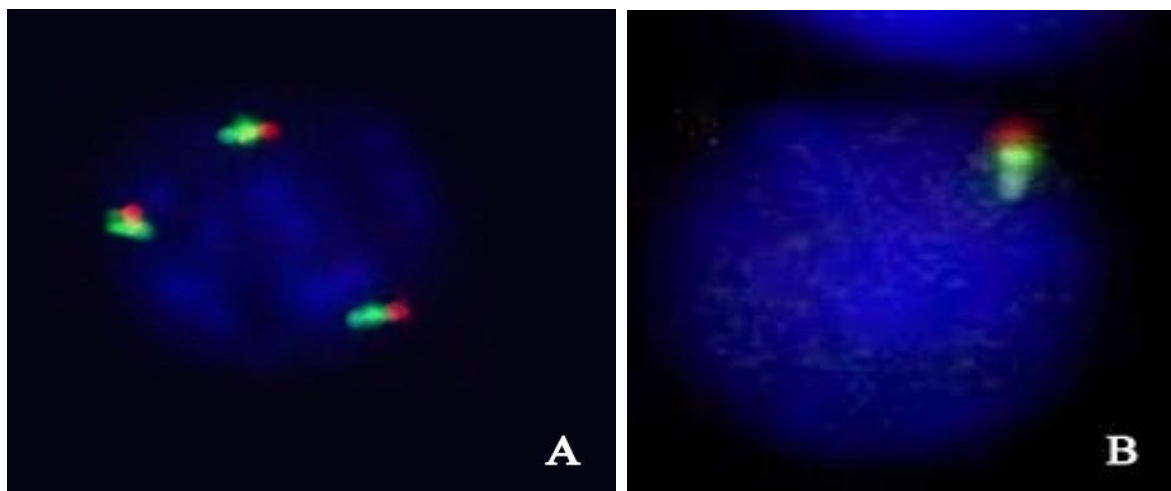
Preglednica VII: Prazne vrednosti za posamezen signal.

Vrsta signala	Prazna vrednost (%)
Proksimalni prelom (1F1G1RB)	2,3
Distalni prelom (1F1GB1R)	2,3
Prelom na področju gena <i>MYC</i> (1F1GB1RB)	1,5
Pomnoženi signali (3F)	4,4
Izguba gena <i>MYC</i> (1F)	4,4

1F: ena rožnata fuzija, 3 (ali več) F: tri ali več rožnate fuzije

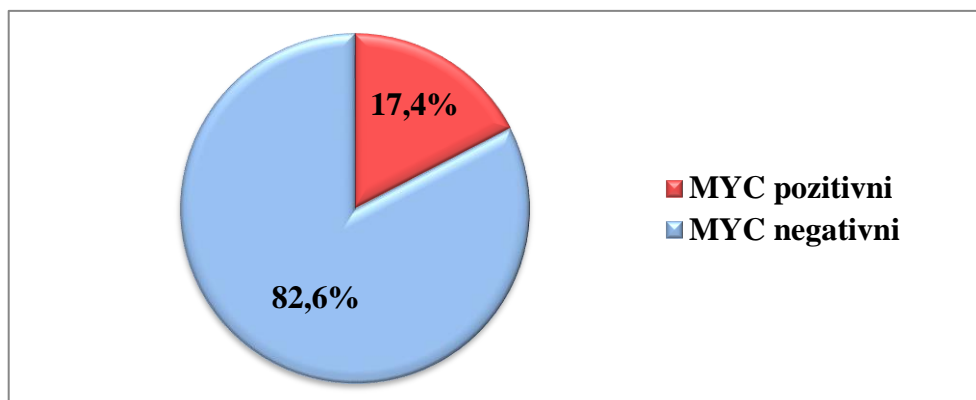
4.2 PRISOTNOST PREUREDITEV GENA *MYC*

Po določitvi praznih vrednosti smo se lotili določanja preureditev gena *MYC* na 69-ih vzorcih bolnikov z DP. Preureditev gena *MYC* smo izključili pri 82,6 % (57/69) vseh analiziranih vzorcev, pri osmih vzorcih smo določili prisotnost 3-eh (ali več fuzij) ter pri dveh prisotnost 1 fuzije (Slika 8: A, B).



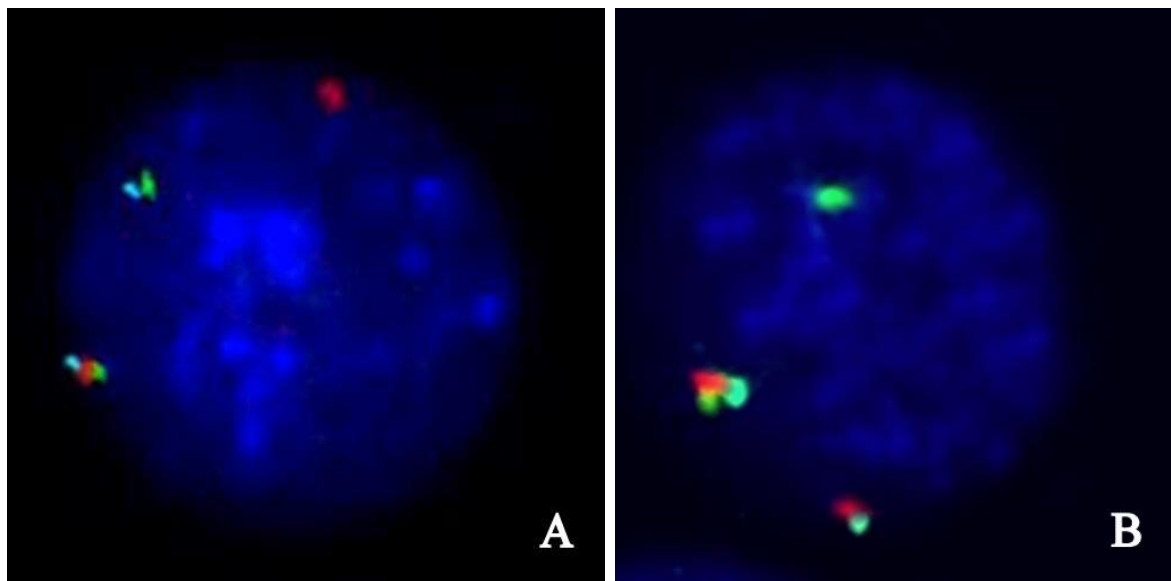
Slika 8: Sprememba števila signalov za gen *MYC*: **A)** Pomnoženi signali. **B)** Izguba gena *MYC*.

Preureditve gena *MYC* so bile nad praznimi vrednostmi pri 12-ih preiskovancih, kar predstavlja **17,4 % (12/69) vseh analiziranih vzorcev** (Slika 9, *MYC* pozitivni). Naš rezultat je skladen z literaturnimi navedbami, kjer so preureditev gena *MYC* našli pri približno 15 % bolnikov z novoodkritim DP (22, 24, 35). Tudi med našimi bolniki je bilo 95,7 % (66/69) novoodkritih. Vsi, razen treh bolnikov, so bili analizirani ob postavitvi diagnoze (novoodkriti). Pri enem preiskovancu smo določali preureditve gena *MYC* med zdravljenjem ter pri dveh bolnikih pred presaditvijo KMC.

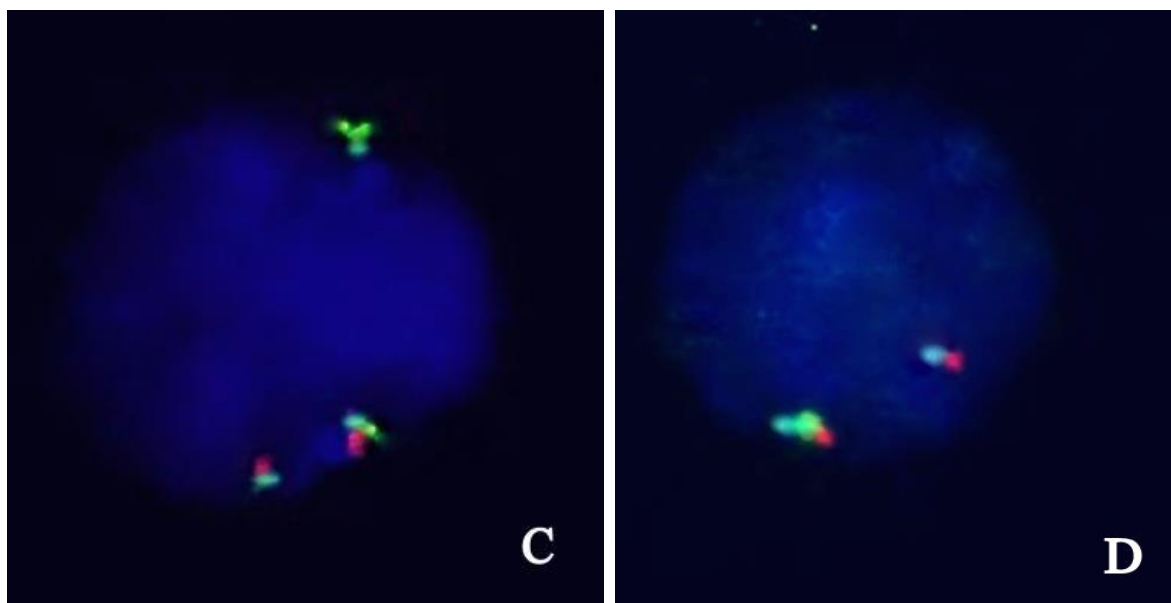


Slika 9: Delež preiskovancev s preureditvijo gena *MYC* (N = 69).

Pri vzorcih s preureditvijo gena *MYC* smo zasledili **različne vrste prelomov** oziroma preureditev (Slika 10: A – G).

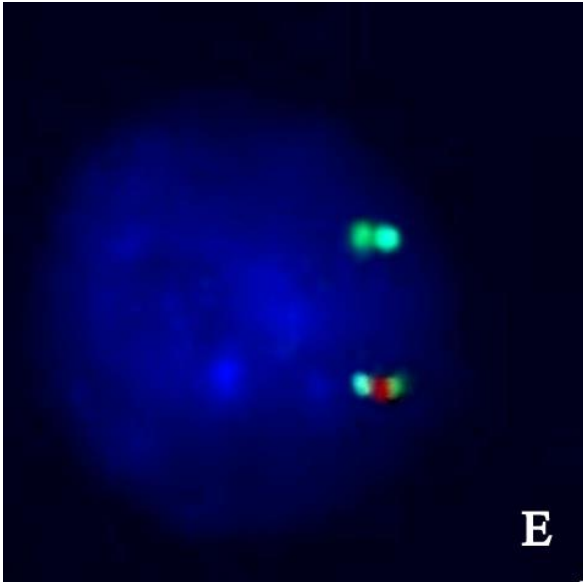


Slika 10: Vzorci signalov pri različnih prelomih v genu *MYC*: **A)** 1F1GB1R, **B)** 1F1G1RB,

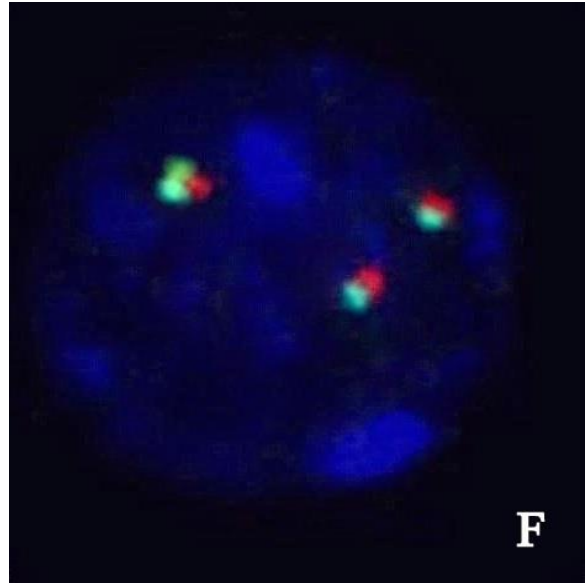


C) 1F1GB1RB,

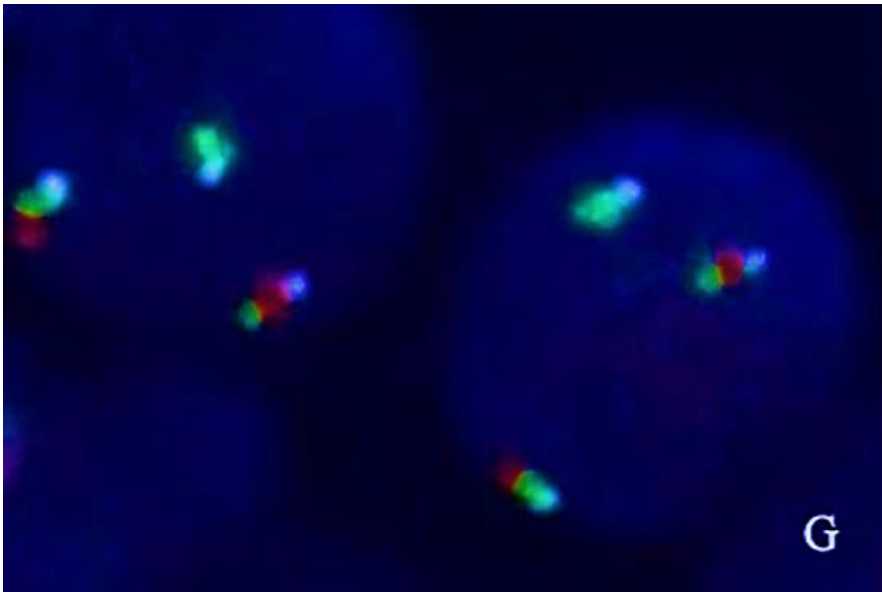
D) 1F1RB,



E) 1F1GB,



F) 1F2RB,



G) 2F1GB.

Med preureditve distalne regije glede na gen *MYC* štejemo distalni prelom (1F1GB1R), distalni prelom z delecijo (1F1GB) ter prisotnost distalnega preloma z delecijo in dodatnim normalnim alelom (2F1GB). K preureditvam proksimalne regije glede na gen *MYC* uvrščamo proksimalni prelom (1F1G1RB), proksimalni prelom z delecijo (1F1RB) ter podvojitev gena s proksimalnim prelomom z delecijo (1F2RB). Našli smo tudi prelom kromosoma 8 v genu *MYC* (8q24 prelom).

Preglednica VIII: Vzorci signalov pri različnih prelomih v genu *MYC*.

Vzorec nenormalnih signalov	Vrsta preloma
1F1GB1R	Distalni prelom
1F1G1RB	Proksimalni prelom
1F1GB1RB	Prelom kromosoma 8 v genu <i>MYC</i> (8q24)
1F1RB	Proksimalni prelom z delecijo
1F1GB	Distalni prelom z delecijo
1F2RB	Podvojitev gena s proksimalnim prelomom z delecijo
2F1GB	Distalni prelom z delecijo in dodatnim normalnim alelom

4.2.1 POJAVNOST POSAMEZNIH PRELOMOV V GENU *MYC*

Preglednica IX: Podatki o vrstah prelomov in deležih (%) posameznih klonov pri bolnikih s preureditvijo gena *MYC*.

Bolnik, spol (m/ž), starost (let)	Obseg klona (%)							
	Distalni prelom	Proksimalni prelom	Prelom v genu <i>MYC</i> (8q24)	Proksimalni prelom z delecijo	Distalni prelom z delecijo	Podvojitev gena s proksimalnim prelomom in delecijo	Distalni prelom z delecijo in dodatnim normalnim alelom	Celoten klon s preureditvijo <i>MYC</i>
1. ŽJ, m, 66,3	95							95,0
2. RM, ž, 82,9	1,2	38,2	15,5					54,9
3. KD, m, 44,6	1	9	18	40,3		26,5		94,8
4. PJ, m, 66,0					90,8			90,8
5. RS, m, 54,3	1,2	2,8	0,5	12,5				17,0
6. PB, m, 73,6	39,3							39,3
7. JV, ž, 51,7	93,8							93,8
8. IŠ, ž, 58,0	33,8		7,8					41,6
9. PS, ž, 66,5		0,8		98,3				99,1
10.KT, m, 60,3	3,2		11,7				64,3	79,2
11. ŠJ, m, 71,0	10,8							10,8
12. CB, m, 65,0	0,5	5,3						5,8

Iz Preglednice IX je razvidno, da je prevladujoča **distalna preureditev**, ki smo jo zasledili pri 58 % (7/12) preiskovancev. Nekateri preiskovanci so imeli prisoten le en vzorec signala, pri nekaterih smo pa zaznali več vzorcev nenormalnih signalov. Velikost klona preurejenih plazmatk je segala **od 5,8 % do 99,1 %**. Klon preurejenih celic je bil praviloma velik (mediana 67,05 %).

V spodnji preglednici (Preglednica X) smo povzeli število preiskovancev glede na posamezen prelom in glede na izolirano najdbo prelomov ter obseg klona.

Preglednica X: Število preiskovancev s posameznim vzorcem signala.

Vzorec signala	Vse najdene preureditve	Edini vzorec signala pri posamezniku	Največji klon preurejenih celic pri posamezniku
1F1GB1R (Distalni prelom)	10	4	5
1F1GB (Distalni prelom z delecijo)	1	1	1
2F1GB (Distalni prelom z delecijo in dodatnim normalnim alelom)	1	0	1
1F1G1RB (Proksimalni prelom)	5	0	2
1F1RB (Proksimalni prelom z delecijo)	3	0	3
1F2RB (Podvojitev gena s proksimalnim prelomom in delecijo)	1	0	0
1F1GB1RB (Prelom kromosoma 8 v genu <i>MYC</i>)	5	0	0

Najpogostejšo izolirano spremembo (edini vzorec signala) pri posamezniku predstavlja **distalni prelom** (1F1GB1R), ki smo ga našli pri 10/12 preiskovancev s preureditvijo gena *MYC*. Omenjen signal je tudi najpogosteje zastopan kot glavni klon preurejenih celic pri posamezniku.

4.2.2 POJAVNOST PONAVLJAJOČIH CITOGENETSKIH SPREMEMB PRI BOLNIKIHZ DP

Za vse bolnike smo pridobili podatke o predhodno določenih citogenetskih spremembah in ga tako umestili v določeno skupino glede na tveganje (Preglednica XI). Pri vseh bolnikih so bile določene spremembe: del(13q), del(17p) ter preureditve gena *IGH*. Pri nekaterih preiskovancih je bil zaradi premajhne količine materiala testiran le omejen nabor sond. Pri veliki večini še preureditve kromosoma 1, pri bolnikih z dovolj materiala pa še hiperdiploidnost z uporabo različnih sond.

Preglednica XI: Citogenetske spremembe in njihov napovedni pomen pri preiskovanih bolnikih.

Bolnik, spol (m/ž), starost (let)	Citogenetske spremembe	Napovedni pomen	<i>MYC</i>
1. ŽJ, m, 66,3	97% del(13q), 90% amp(15q), 8% del(1p), lahko hiperdiploiden	vmesen/ugoden	poz
2. RM, ž, 82,9	88% amp(1q), 97% del(6q), 96% del(13q)	neugoden	poz
3. KD, m, 44,6	47% amp(1q), 100% t(4;14), 96,8% del(6q), 98,5% del(13q)	neugoden	poz
4. PJ, m, 66,0	76% amp(1q), 97% amp(15q), 89% amp(6q)	neugoden	poz
5. RS, m, 54,3	Ni sprememb	vmesen	poz
6. PB, m, 73,6	33% del(13q), 76% amp(15q)	vmesen/ugoden	poz
7. JV, ž,	14% del(17p), 92% amp(15q)	neugoden	poz

51,7			
8. IŠ, ž, 58,0	12% del(1p), 98% amp(1q), 97% del(13q), 97% t(4;14)	neugoden	poz
9. PS, ž, 66,5	95% del(13q), 94% amp(1q)	neugoden	poz
10. KT, m, 60,3	Hiperdiploiden	ugoden	poz
11. ŠJ, m, 71,0	45% del(13q), 50% t(4;14)	neugoden	poz
12. CB, m, 65,0	Ni sprememb	vmesen	poz
13. MN, m, 90,9	80% del(13q), 90% del(6q) in del(15q), 80% amp(1q)	neugoden	neg
14. PM, m, 62,4	86% amp(1q), 16% amp(15q), 87% t(4;14)	neugoden	neg
15. RJ, m, 60,5	66% amp(1q), 17% del(17p), 95% del(13q), 78% amp(15q)	neugoden	neg (3F)
16. FT, ž, 69,1	Hiperdiploiden	ugoden	neg
17. TD, m, 66,8	Hiperdiploiden	ugoden	neg (3 – 4F)
18. RM, ž, 78,1	92% del(1p), 89% amp(1q), 90% amp(6q)	neugoden	neg
19. BE, ž, 76,2	97% amp(15q), lahko hiperdiploiden	vmesen/ugoden	neg
20. ŠJ, ž, 81,7	93% amp(1q), 94% amp(15q)	neugoden	neg
21. ZA, m, 80,4	84% amp(1q), 88% t(4;14), 99% del(13q)	neugoden	neg
22. JJ, m, 68,1	Hiperdiploiden	ugoden	neg (3 – 4F)
23. RI, m,	Hiperdiploiden	ugoden	neg

52,1			(1F)
24. ND, m, 52,0	46% amp(1q), 83% t(11;14), 95% del(13q), 71% amp(15q)	neugoden	neg (3F)
25. DF, m, 72,1	79% amp(1q) in (15q), 7% del(13q)	neugoden	neg
26. RP, m, 58,2	86% amp(1q), 90% amp(15q)	neugoden	neg
27. RJ, m, 70,0	96% del(17p), 87% amp(15q)	neugoden	neg
28. KL, m, 83,7	90% amp(1q), 90% amp(15q)	neugoden	neg
29. PF, m, 46,5	82% amp(1q), 94% t(4;14)	neugoden	neg
30. PZ, ž, 61,0	76% t(11;14)	ugoden	neg
31. ŽM, ž, 68,4	97% del (13q), hiperdiploiden	vmesen/ugoden	neg
32. DB, m, 53,2	95% del(13q), 22% amp(1q)	neugoden	neg
33. DK, m, 73,9	Ni sprememb	vmesen	neg
34. MM, m, 67,6	90% amp(1q), 90% amp(15q)	neugoden	neg (3 – 4F)
35. BA, m, 83,2	86% del(17p), 90% del(13q), 85% amp(1q), 82% amp(15q)	neugoden	neg
36. CJ, ž, 64,3	20% t(11;14)	ugoden	neg
37. ŠJ, m, 83,5	62% amp(1q), 91% amp(15q), 92% del(6q)	neugoden	neg
38. TM, ž, 72,5	Hiperdiploiden	ugoden	neg
39. SD, ž,	25% del(13q)	vmesen	neg

68,8			
40. VA, ž, 80,3	79% t(11;14)	ugoden	neg
41. DD, ž, 55,9	Ni sprememb	vmesen	neg
42. PE, ž, 71,5	14% del(13q)	vmesen	neg
43. RV, ž, 92,8	51% amp(1q)	neugoden	neg (3F)
44. KS, m, 74,3	Lahko hiperdiploiden	vmesen/ugoden	neg
45. VŠ, ž, 77,6	71% t(11;14)	ugoden	neg
46. OJ, m, 68,4	Hiperdiploiden	ugoden	neg
47. PJ, m, 69,2	78% pomn.signali za gen <i>IGH</i>	vmesen	neg
48. LA, ž, 63,8	59% amp(1q) , 93% t(11;14)	neugoden	neg
49. DD, m, 58,6	88% del(17p), 80% amp(1q)	neugoden	neg (3 – 4F)
50. PM, ž, 67,9	93% del(13q), 93% amp(1q)	neugoden	neg
51. PM, ž, 83,0	79% amp(1q), 50% amp(15q)	neugoden	neg
52. JJ, m, 77,9	96% del(17p)	neugoden	neg
53. VŽ, m, 65,0	Hiperdiploiden	ugoden	neg
54. PJ, m, 69,9	49% t(11;14)	ugoden	neg
55. JF, m, 69,9	84% del(13q), 86% del(17p),	neugoden	neg

64,0	18% amp(1q)		
56. TN, m, 70,8	Hiperdiploiden	ugoden	neg
57. MR, m, 57,8	Hiperdiploiden	ugoden	neg
58. IB, m, 67,4	59% del(17p), 51% del(13q)	neugoden	neg
59. PB, m, 77,4	78% del(13q)	vmesen	neg (1F)
60. KM, m, 53,8	44% amp(15q)	vmesen	neg
61. ŠP, m, 73,9	Ni sprememb	vmesen	neg
62. ŠF, m, 60,8	Ni sprememb	vmesen	neg
63. ŽM, ž, 61,2	Hiperdiploiden	ugoden	neg
64. ŠD, m, 53,8	92% del(13q), 96% t(4;14), 94% amp(1q)	neugoden	neg
65. PJ, m, 77,8	63% amp(1q), 86% t(4;14)	neugoden	neg
66. ŠM, ž, 71,3	87% amp(1q), 92% t(4;14), 85% del(13q), 22% del(6q)	neugoden	neg (3 – 6F)
67. ID, m, 47,4	15% del(13q), 5% t(4;14)	neugoden	neg
68. SM, ž, 61,8	Lahko hiperdiploiden	vmesen/ugoden	neg
69. PI, m, 57,6	23% del(13q)	vmesen	neg

amp: amplifikacija, del: delecija, t: translokacija, 1F: ena rožnata fuzija, 3 (ali več) F: tri ali več rožnate fuzije

Preglednica XII prikazuje pojavnost najpogostejših citogenetskih abnormalnosti: del(13q), del(17p), del(1p), amp(1q), t(11;14), t(4;14) in hiperdiploidnost. V omenjeno razpredelnico smo vključili tudi podatke o preureditvi gena *MYC*.

Preglednica XII: Pojavnost posameznih citogenetskih sprememb pri bolnikih z DP.

Citogenetska sprememba	Število bolnikov		
	Vsi	Najdene spremembe Delež bolnikov (%)	Edina sprememba pri posamezniku Delež bolnikov (%)
del(13q)	69	25 (36,2 %)	10 (14,5 %)
del(17p)	69	8 (11,6 %)	1 (1,5 %)
del(1p)	57	3 (5,3 %)	0 (0 %)
amp(1q)	65	29 (44,6 %)	1 (1,5 %)
t(11;14)	69	7 (10,1 %)	5 (7,2 %)
t(4;14)	69	10 (14,5 %)	0 (0 %)
Hiperdiploidnost	64	26 (40,6 %)	13 (20,3 %)
Preureditev gena <i>MYC</i>	69	12 (17,4 %)	2 (2,9 %)

amp: amplifikacija, del: delecija, t: translokacija

Pri dveh preiskovancih (2/12) je bila preureditev gena *MYC* edina najdena preureditev. Preostalih 10 preiskovancev (10/12) je imelo poleg preureditev gena *MYC* prisotne tudi nekatere druge citogenetske spremembe (Preglednica XIII).

Preglednica XIII: Preiskovanci s preureditvijo gena *MYC* in preostalimi citogenetskimi spremembami.

Citogenetski sprememba	Sprememba	Preiskovanci s preureditvijo <i>MYC</i>	Edina sprememba ob <i>MYC</i> pri posamezniku
del(13q)	Sekundarna	7	0
del(17p)	Sekundarna	1	1
del(1p)	Sekundarna	2	0
amp(1q)	Sekundarna	5	0
t(11;14)	Primarna	0	0
t(4;14)	Primarna	3	0
Hiperdiploidnost	Primarna	1	1

amp: amplifikacija, *del:* delecija, *t:* translokacija

Pri 9/10 preiskovancev s preurejenim *MYC* smo ugotovili prisotnost sekundarnih citogenetskih abnormalnosti in le pri enem preiskovancu (1/10) smo zaznali primarno spremembo (hiperdiploidnost). To nakazuje na močno povezavo med preureditvami gena *MYC* in sekundarnimi citogenetskimi spremembami. S Fisherjevim natančnim testom verjetnosti smo želeli ugotoviti, ali obstaja med skupinami statistično značilna povezava (Preglednica XIV, A.). Za izračune smo uporabljali program Social Science Statistics. Ničelna hipoteza (H_0) pravi, da med skupinami ni statistično značilne povezave v primeru $p > \alpha$ ($\alpha = 0,05$). Alternativna hipoteza (H_A) velja v primeru $p < \alpha$, kar pomeni, da obstaja med skupinami statistično značilna povezava.

Preglednica XIV: Kontingenčne tabele: **A.** primerjava med skupino preiskovancev, ki imajo prisotne primarne spremembe in skupino preiskovancev s sekundarnimi genetskimi abnormalnostmi.

A. $p = 0,0011$

	Primarne spremembe	Sekundarne spremembe
Prisotna sprememba	1	9
Odsotna sprememba	9	1

Razlika med skupinami je statistično značilna ($p < 0,05$).

Preiskovancem, pri katerih smo zaznali preureditve gena *MYC*, smo določili tudi sopojavnost z ostalimi citogenetskimi spremembami. Preureditve gena *MYC* se najpogosteje pojavljajo z naslednjima citogenetskima spremembama: amp(1q) in del(13q). S Fisherjevim natančnim testom verjetnosti smo želeli ugotoviti, ali je med spremenljivkami statistično značilna povezava. Pri tem smo primerjali skupino preiskovancev s prisotno del(13q) in skupino preiskovancev, ki nimajo prisotne del(13q) (**B.**). Sledila je primerjava med skupino preiskovancev s prisotno amp(1q) in skupino preiskovancev, ki nimajo amp(1q) (**C.**).

B. $p = 0,104$

	<i>MYC</i> negativen	<i>MYC</i> pozitiven
Del(13q) pozitivna	18	7
Del(13q) negativna	39	5

C. $p = 0,742$

	<i>MYC</i> negativen	<i>MYC</i> pozitiven
Amp(1q) pozitivna	24	5
Amp(1q) negativna	31	5

Na podlagi rezultatov smo ugotovili, da med spremenljivkami ni statistično značilne povezave ($p > 0,05$).

Pri preiskovancih smo določili tudi tveganje oziroma napovedni pomen (Preglednica XV).

Preglednica XV: Podatki o porazdelitvi preiskovancev v skupinah z ugodnim, vmesnim in neugodnim napovednim pomenom.

Napovedni pomen	Vsi preiskovanci	<i>MYC</i> pozitivni preiskovanci (12)
Neugoden	35	7
Vmesen (vključno vmesen/ugoden)	18	4
Ugoden	16	1

S Fisherjevim natančnim testom verjetnosti smo v nadaljevanju želeli ugotoviti, ali je razlika med temi skupinami statistično značilna. Pri smo primerjali skupino z neugodnim in vmesnim napovednim pomenom (**D.**). Sledila je primerjava med skupino z vmesnim in ugodnim napovednim pomenom (**E.**) ter primerjava med skupino preiskovancev z neugodnim in ugodnim napovednim pomenom (**F.**).

D.	p = 1,000		<i>MYC</i> negativen	<i>MYC</i> pozitiven
		Neugoden napov. pomen	28	7
		Vmesen napov. pomen	14	4

E.	p = 0,340		<i>MYC</i> negativen	<i>MYC</i> pozitiven
		Vmesen napov. pomen	14	4
		Ugoden napov. pomen	15	1

F.	p = 0,409		<i>MYC</i> negativen	<i>MYC</i> pozitiven
		Neugoden napov. pomen	28	7
		Ugoden napov. pomen	15	1

Na podlagi rezultatov smo ugotovili, da med skupinami ni statistično pomembnih razlik ($p > 0,05$).

5 SKLEPI

- Pražna vrednost za DNA tribarvno sondo Kreatech™ MYC (8q24) je tako za distalni kot za proksimalni prelom 2,3 %. Ker pri pregledu kontrolnih vzorcev nismo zaznali nobenega signala, ki ustreza prelomu kromosoma 8 na področju gena *MYC*, smo za ta pričakovani vzorec signala določili prazno vrednost 1,5 %.
- Ostalih neustreznih signalov (poleg 1 fuzije, 3-eh ali več fuzij) pri skupini kontrolnih vzorcev nismo zaznali.
- Preureditve gena *MYC* smo našli pri 12-ih bolnikih, kar predstavlja 17,4 % (12/69) vseh analiziranih vzorcev. Naši rezultati so skladni z literaturnimi navedbami, kjer so preureditev gena *MYC* našli pri približno 15 % novoodkritih bolnikov z DP. Tudi med našimi preiskovanci je bilo 95,7 % (66/69) bolnikov novoodkritih.
- Pri vzorcih s preureditvijo gena *MYC* smo zasledili različne vrste prelomov oziroma preureditev. Nekateri preiskovanci so imeli prisoten le en vzorec signala, ponekod smo pa zasledili večje število različnih vzorcev signalov.
- Najpogostejša izolirana sprememba (edini vzorec signala) pri posamezniku predstavlja distalni prelom (1F1GB1R). Omenjeni prelom je tudi najpogosteje zastopan kot glavni klon preurejenih celic pri posamezniku.
- Najpogosteje smo našli distalno preureditev, ki smo jo zasledili pri 58 % (7/12) preiskovancev.
- Velikost klona preurejenih plazmocitomskih celic je segala od 5,8 % do 99,1 %. Klon preurejenih celic je bil praviloma velik (mediana 67,05 %).
- Pri 83,3 % (10/12) preiskovancih s preureditvijo gena *MYC* smo ugotovili prisotnost drugih citogenetskih abnormalnosti. Od tega smo pri 75 % (9/12) preiskovancev s preureditvijo gena *MYC* potrdili pojavljanje sekundarnih citogenetskih abnormalnosti. To nakazuje na močno povezavo med preureditvami gena *MYC* in sekundarnimi citogenetskimi spremembami pri DP.
- Primerjali smo skupino preiskovancev s preureditvijo gena *MYC*, ki so imeli prisotne primarne spremembe in skupino preiskovancev s sekundarnimi genetskimi preureditvami. Pri tem smo ugotovili, da je razlika med skupinami statistično značilna in da se preureditev gena *MYC* večkrat pojavlja pri bolnikih s preostalimi sekundarnimi citogenetskimi spremembami.

- Preureditve gena *MYC* se najpogosteje pojavljajo z naslednjima citogenetskima spremembama: amp(1q) in del(13q).
- Med skupinami preiskovancev z ugodnim, vmesnim in neugodnim napovednim pomenom, ni statistično pomembnih razlik glede prisotnosti preureditev gena *MYC*.

6 LITERATURA

1. Levens D. Reconstructing MYC. *Genes & development*, 2003; 17: 1071–1077.
2. Ryan K, Birnie G. Myc oncogenes: the enigmatic family. *Biochemical Journal*, 1996; 314: 713–721.
3. Genecards human gene database. MYC Gene. <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=MYC>. Dostop: 6-9-2017.
4. Prendergast G. Myc Structure and Function. *Oncogenes as Transcriptional Regulators*, 1997, 1; 1–2.
5. Cheung L, Murray J, Haber M, Norris M. The MYCN onkogene. *Oncogene and Cancer From Bench to Clinic*, 2013; 18; 437–438.
6. Bronchud M, Foote M, Giaccone G, Olopade O, Workman P. C-MYC. *Principles of Molecular Oncology*, 2008; 93.
7. Dang C. c-Myc Target Genes Involved in Cell Growth, Apoptosis, and Metabolism. *Molecular and cellular biology*, 1999; 19: 1.
8. Stine Z, Walton E, Altman B, Hsieh a, Dang C. MYC, Metabolism, and Cancer. *Cancer discovery*, 2015; 5: 1024–1039.
9. Miller D, Thomas S, Islam A, Muench D, Sedoris K. c-Myc and Cancer Metabolism. *Clin Cancer Res*, 2012; 18: 5546–5550.
10. Casey S, Baylot V, Felsher D. The MYC oncogene is a global regulator of the immune response. *Blood*, 2018; 2012.
11. Sheen J, Woo J, Dickson R. c-Myc alters the DNA damage-induced G2/M arrest in human mammary epithelial cells. *British Journal of Cancer*, 2003; 89(8): 1479–1485.
12. Kalkat M, Melo J, Hickman K, Lourenco C, Redel C, Resetca D, Tamachi A, Tu W, Penn L. MYC Deregulation in Primary Human Cancers. *Genes*, 2017; 8: 2–30.
13. Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology. MYC (MYC proto-oncogene, bHLH transcription factor). <http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/MYCID27.html>. Dostop: 4-4-2018.
14. Bunz F. C-MYC is a downstream effector of multiple cancer gene pathways. *Principles of cancer genetics*, 2008; 239.
15. Gelmann E, Sawyers C, Rauscher F. The MYC oncogene family in human cancer. *Molecular oncology*, 2014; 313, 314.

16. Giordano A, Galderisi U. Myc-Mad Signaling Network. *Cell Cycle Regulation and Differentiation in Cardiovascular and Neural Systems*, 2010; 185-189.
17. Zeller K, Zhao X, Lee C, Chiu K, Fei Yao, Yustein J, Ooi H, Orlov Y, Shahab A, Yong H, Fu Y, Weng Z, Kuznetsov A, Sung W, Ruan Y, Dang C, Wei C. Global mapping of c-Myc binding sites and target gene networks in human B cells. *Pnas*, 2006; 103: 47.
18. SNPedia. MYC. <https://www.snpedia.com/index.php/MYC>. Dostop: 6-2-2018.
19. The Transcription Factor Myc Controls Metabolic Reprogramming Upon T Lymphocyte Activation. <http://slideplayer.com/slide/7906054/>. Dostop: 6-2-2018.
20. Walhout A, Gubbels J, Bernards R, Vliet P, Timmers H. c-Myc/Max heterodimers bind cooperatively to the E-box sequences located in the first intron of the rat ornithine decarboxylase (ODC) gene. *Nucleic Acids Research*, 1997; 25(8): 1500.
21. Woude G, Klein G. Myc Family Oncogenes in the Development of Normal and Neoplastic Cells. *Advances in Cancer Research*, 1991; 57: 25.
22. Affer M, Chesi M, Chen W, Keats J, Demchenko Y, Roschke A, Van Wier S, Fonseca R, Bergsagel L, Kuehl M. Promiscuous Rearrangements of the MYC Locus Hijack Enhancers and Super-Enhancers to Dysregulate MYC Expression in Multiple Myeloma. *Leukemia*, 2014; 28(8): 1725–1735.
23. Avet-Loiseau H, Gerson F, Magrangeas F, Minvielle S, Harousseau J, Bataille R for Intergroupe Francophone du Mye'lome. Rearrangements of the c-myc oncogene are present in 15% of primary human multiple myeloma tumors. *Blood*, 2001; 98(10): 3082–3086.
24. Spehalski E, Kovalchuk A, Collins J, Liang G, Dubois W, Morse H, Ferguson D, Casellas R, Dunnick W. Oncogenic Myc translocations are independent of chromosomal location and orientation of the immunoglobulin heavy chain locus. *Pnas*, 2012; 109(34): 13728.
25. Cruse J, Lewis R, Wang H. B cells, immunoglobulin genes and immunoglobulin structure. *Immunology Guidebook*, 2004; 277, 308.
26. Jain V, Judde J, Max E, Magrath I. Variable IgH chain enhancer activity in Burkitt's lymphomas suggests an additional, direct mechanism of c-myc deregulation. *The Journal of Immunology*, 1993; 150(12): 5418–5428.
27. Prideaux S, Conway O'Brien E, Chevassut T. The Genetic Architecture of Multiple Myeloma. *Advances in Hematology*, 2014; 1–16.

28. Rogulski K, Cohen D, Corcoran D, Benos Prochownik E. Deregulation of common genes by c-Myc and its direct target, MT-MC1. *Pnas*, 2005; 102(52): 18968.
29. Mlakar U, Andoljšek D, Fikfak N, Glaser M, Grat M, Grmek-Zemljic T, Preložnik-Zupan I, Pretnar j, Zver S. Smernice za odkrivanje in zdravljenje diseminiranega plazmocitoma. *Zdrav vestn*, 2006; 75: 3–8.
30. Košnik M, Mrevlje F, Štajer D, Koželj M, Černelč P. *Interna medicina*. 4. Izdaja, Littera picta; Slovensko medicinsko društvo, Ljubljana, 2011: 1331–1333.
31. Društvo bolnikov s krvnimi boleznimi Slovenije. Diseminirani plazmocitom. <http://www.drustvo-bkb.si/o-krvnih-bolezni/diseminirani-plazmocitom-2/>. Dostop: 5-9-2017.
32. Provan D, Gribben J. *Molecular Hematology. The molecular biology of multiple myeloma*, 2010; 127, 128.
33. Palumbo A, Attal M, Roussel M. Shifts in the Therapeutic Paradigm for Patients Newly Diagnosed with Multiple Myeloma: Maintenance Therapy and Overall Survival. *Clinical Cancer Research*, 2011; 1254.
34. Multiple Myeloma: Symptoms and Signs. <https://www.cancer.net/cancer-types/multiple-myeloma/symptoms-and-signs>. Dostop: 2-1-2018.
35. Edwards C, Zhuang J, Mundy G. The Pathogenesis of the Bone Disease of Multiple Myeloma. *Bone*, 2008; 42(6): 1007–1013.
36. Nadiminti K, Zhan F, Tricot G. Cytogenetics and Chromosomal Abnormalities in Multiple Myeloma-A Review. *Cloning & Transgenesis*, 2013; 1–3.
37. Glitza I, Lu G, Shah R, Bashir Q, Shah N, Champlin R, Shah J, Orłowski R, Qazilbash M. Chromosome 8q24.1/c-MYC Abnormality: A Marker for High-Risk Myeloma. *Leuk Lymphoma*, 2015; 56(3): 602–607.
38. Rajan A, Rajkuma S. Interpretation of cytogenetic results in multiple myeloma for clinical practice. *Blood Cancer Journal*, 2015; 2–5.
39. Gabrea A, Martelli M, Qi Y, Roschke A, Barlogie B, Shaughnessy J, Sawyer J, Kuehl W. Secondary genomic rearrangements involving immunoglobulin or MYC loci show similar prevalences in hyperdiploid and nonhyperdiploid myeloma tumors. *Genes Chromosomes Cancer*, 2008; 47(7): 573–590.
40. Holien T, Våtsveen T, Hella H, Waage A, Sundan A. Addiction to c-MYC in multiple myeloma. *Blood*, 2012; 120(12): 2450.

41. Standardni operativni postopek (SOP). Gojenje in izolacija celic pri plazmocitomu. SHL-60-017-02. Klinični oddelek za hematologijo, Specializirani hematološki laboratorij, UKC Ljubljana. Dostopano v laboratoriju: november 2017.
42. Standardni operativni postopek (SOP). Odvzem kulture, prenos v hipotonično raztopino in fiksiranje celic. SHL-60-005-03. Klinični oddelek za hematologijo, Specializirani hematološki laboratorij, UKC Ljubljana. Dostopano v laboratoriju: november 2017.
43. Karas Kuželički N. Zapiski in izročki predavanja z naslovom Kromosomske nepravilnosti pri izbirnem predmetu Biomedicinska genetika, Ljubljana 2015.
44. Mohammed S, Ogilvie C, Hultén M. Fluorescence in situ hybridisation (FISH). Unique, Understanding chromosome disorders. Rare Chromosome Disorder Support Group; 2013: 2–6.
45. Kreatech™ FISH probes. Product information sheet. MYC (8q24), Triple-Color, Break. https://www.leicabiosystems.com/fileadmin/img_uploads/kreatech/ifu/PI-KI-10611_D2.1.pdf. Dostop: 15-1-2018.
46. Kreatech™ FISH probes. Instructions for use. Leica Biosystems, Amsterdam, Nizozemska; 2015: 6.
47. Fluorescence filters for FISH. Fluorescence in situ hybridization. file:///C:/Users/Judita/Desktop/Fluorescence_Filters_for_FISH.pdf. Dostop: 26-3-2018.
48. Standardni operativni postopek (SOP). Nanosi na stekla. SHL-60-007-04. Klinični oddelek za hematologijo, Specializirani hematološki laboratorij, UKC Ljubljana. Dostopano v laboratoriju: november 2017.
49. Standardni operativni postopek (SOP). FISH. SHL-60-008-06. Klinični oddelek za hematologijo, Specializirani hematološki laboratorij, UKC Ljubljana. Dostopano v laboratoriju: november 2017.
50. Standardni operativni postopek (SOP). Določanje mejnih vrednosti za DNA sonde. SHL-60-014-03. Klinični oddelek za hematologijo, Specializirani hematološki laboratorij, UKC Ljubljana. Dostopano v laboratoriju: januar 2018.