

Abstrakt

Epigenetické mechanismy transkripční regulace a modulace genové exprese pomocí RNA interference se staly významnými nástroji pro studium řady buněčných mechanismů včetně nádorové progresse a virové latence

Pokroky v profilování genové exprese poskytují nástroj k detekci kandidátních genů zúčastněných v tomto komplexním procesu a přináší další možnosti v diagnostice a specifické léčbě nádorových onemocnění. V této práci porovnávám pomocí mikročipové technologie expresní profily metastázující a nemetastázující linie buněk transformovaných genem *v-src*. Transkripční faktor homeodomain only protein X (*HOPX*) byl identifikován jako jeden z diferenciálně exprimovaných genů. Aktivita genu *HOPX* v různých typech nádorů bývá kontolována zejména metylací jeho promotoru. Roli *HOPX* v metastatickém procesu jsem potvrdila inokulací buněk s modulovanou expresí *HOPX* do syngenních kuřat. Po snížení exprese *HOPX* pomocí shRNA vykazovala původně metastázující linie menší metastatickou kapacitu *in vivo*. Další genomová analýza identifikovala soubor genů ovlivněných sníženou expresí *HOPX*. Tato data demonstrují, že *HOPX* je gen asociovaný s metastázováním a snížení jeho exprese vede k potlačení metastatické aktivity buněk transformovaných genem *v-src* změnou expresních vzorců.

Ve druhém projektu jsem se věnovala latenci viru HIV-1. Antiretrovirová terapie (ART) efektivně zastavuje replikaci viru HIV-1. Nicméně virus HIV během ART perzistuje v transkripčně umlčené ale replikačně kompetentní formě díky dlouho žijícím a proliferujícím latentně infikovaným CD4⁺ T-buňkám. Jedna ze strategií k odstranění viru HIV-1 je aktivovat virovou transkripci s použitím látek revertujících latenci a potenciálně spustit cytolýzu nebo odstranění infikovaných buněk prostřednictvím imunitní odpovědi. Methylace CpG a přítomnost represivní histonové modifikace je pravděpodobně významným krokem ve vytvoření umlčeného stavu proviru. V této studii využíváme buněčný klon nesoucí latentní mini-provirus HIV-1, jehož reaktivace může být měřena dle procenta buněk pozitivních na GFP. Tento klon vykazuje vysoký stupeň methylace DNA na prvním ostrově CpG 5'LTR a latentní provirus je zde rezistentní k reaktivaci. V této modelové buněčné linii jsem pomocí siRNA snížila expresi DNA metyltransferázy 1

a 3B (*DNMT1* a *DNMT3B*), nebo histonové deacetylázy 2 (*HDAC2*) a analyzovala reaktivaci proviru HIV-1 pomocí látek spouštějící signální dráhu NF- κ B a stupeň metylace DNA na 5'LTR. Prokázala jsem, že snížené množství DNMT1, nikoli DNMT3B či HDAC2, přispívá k částečnému úbytku metylace na 5'LTR.

Třetí studie je zaměřená na metylaci DNA na 5'LTR lokusu endogenního retroviru ERVWE1 kódující lidský fúzogení glykoprotein *Syncytin-1*. Tento gen se účastní diferenciací placentálního syncytiotrofoblastu. Nicméně zvýšená exprese *Syncytinu-1* byla prokázána i v seminomech. Seminomy patří do skupiny tumorů testikulárních zárodečných buněk (TGCT), které vznikají z primordiálních zárodečných buněk, jež prošly procesem celkové demethylace. Předpokládáme, že obnovená exprese ERVWE1 může být přímým důsledkem hypomethylace genomu v buňkách seminomu. Analyzovala jsem proto hladinu 5-methylcytosinu (5-mC) a demetylačního intermediátu 5-hydroxymethylcytosinu (5-hmC) na promotoru ERVWE1 pomocí bisulfitového a oxidativního bisulfitového sekvenování v několika vzorcích seminomů. Z výsledků vyvozují, že demethylace DNA na promotoru *ERVWE1* v seminomech předchází expresi *Syncytinu-1*.

Klíčová slova: metastázování, HOPX, transforace *v-src*, latence viru HIV-1, antiretrovirová terapie, DNA metyltransferáza 1, Syncytin-1, 5-methylcytosin, 5-hydroxymethylcytosin, seminomy