



Univerzita Karlova v Praze

1. lékařská fakulta

Autoreferát dizertační práce

**TRANSKRIPČNÍ FAKTOR PU.1 JAKO CÍL
DIFERENCIAČNÍ TERAPIE
MYELOYDYSPLASTICKÉHO SYNDROMU
5-AZACYTIDINEM**

Mgr. Nikola Čuřík

Praha 2012

Doktorské studijní programy v biomedicině

*Univerzita Karlova v Praze a
Akademie věd České republiky*

Obor: Fyziologie a patofyziologie člověka

Předseda ob. rady: Prof. MUDr. Jaroslav Pokorný, DrSc.

Školící pracoviště: Ústav patologické fyziologie

Autor: Mgr. Nikola Čuřík

Školitel: Doc.MUDr. Tomáš Stopka, PhD

*S dizertací je možné se seznámit na děkanátě 1. lékařské fakulty
Univerzity Karlovy v Praze*

Obsah	Stránka
Obsah	3
Abstrakt (česká verze)	4
Abstract (anglická verze)	6
Úvod	7
Cíle práce	9
Materiál a metody	10
Výsledky a diskuze	13
Závěry práce	23
Odkazy na použitou literaturu	25
Publikace autora	30
Přednášková činnost, prezentace autora	31

ABSTRAKT

Transkripční faktor PU.1 je klíčovou molekulou řídící proces krvetvorby. Ztráta jeho funkce má za následek různé stupně poruchy diferenciacie prakticky všech krevních buněčných linií. S funkcí PU.1 v zajištění správného průběhu diferenciacie krevních buněk úzce souvisí také jeho role v potlačování procesu leukemogeneze. Snížená hladina PU.1 a poruchy schopnosti regulovat hladinu tohoto transkripčního faktoru v buňce jsou asociovány s různými formami akutní myeloidní leukémie (AML), ale také s dalšími hematologickými malignitami.

Myelodysplastický syndrom (MDS) je klonální onemocnění krvetvorby s výrazně variabilním projevem a průběhem, pro jehož patogenezi je typická porucha diferenciacie krevních buněk. Ta se projevuje ztrátou jejich funkce, vznikem elementů s morfologickými defekty (dysplasií) a hromaděním poškozených, nezralých buněk – blastů v kostní dřeni. Onemocnění MDS se často transformuje do AML. Charakteristickým rysem MDS je na molekulární úrovni potlačení exprese řady genů v důsledku aberantní zvýšené metylace DNA v jejich regulačních oblastech. Použití látek potlačujících metylaci DNA a obnovujících genovou expresi, jako je například 5-azacytidin (AZA), přináší v posledních letech klinicky významné výsledky při léčbě pacientů s MDS s vyšším rizikem (IPSS) a stalo se v podstatě již standardem. Navzdory řadě důležitých poznatků o působení AZA v MDS zůstává v porozumění mechanismům tohoto účinku mnoho nejasného. Komplikujícím faktorem poznání těchto mechanismů je především variabilita MDS na molekulární úrovni.

Podstatou této dizertační práce jsou nové poznatky o tom, že PU.1 patří mezi geny, jehož exprese je u významné části pacientů s MDS s vyšším rizikem potlačena vlivem metylace DNA v jeho regulační oblasti URE. Zjistili jsme, že hladina PU.1 v progenitorech pacientů s MDS významně souvisí s odpovědí těchto pacientů na léčbu AZA. AZA je schopen účinně demetylovat DNA v oblasti URE a iniciovat další epigenetické procesy na úrovni chromatinu. Tyto procesy ve svém souhrnu vedou ke zvýšení exprese PU.1 a k projevům iniciace myeloidní diferenciacie jak u

modelových buněčných linií pro MDS tak u progenitorů izolovaných *ex-vivo* z kostní dřeně z pacientů s MDS. Účinek AZA na expresi PU.1 a navození myeloidní diferenciacce lze dále ovlivňovat – zeslabovat i zesilovat – cytokiny včetně G-CSF, který je dnes intenzivně využíván v klinické praxi. AZA rovněž v modelových buněčných liniích pro MDS zastavuje buněčnou proliferaci a vyvolává v menší míře apoptózu.

Tato práce souhrnně přináší důležitá pozorování, která jsou v současnosti dále studována pro zjištění účinnosti AZA *in vitro*.

ABSTRACT

PU.1 is a key hematopoietic transcription factor. Knock-out of PU.1 in mouse is embryonic lethal due to complete depletion or several disruption of differentiation of multiple blood cell lineages. Low level of PU.1 and the disruption of its regulation are associated *in vivo* with acute myeloid leukemia and other hematologic malignancies.

Myelodysplastic syndrome (MDS) is hematopoietic stem cell disorder with extremely heterogeneous features and outcome. It is characterized by improper differentiation of blood cells resulting in loss of function, dysplasia and blasts accumulation in bone marrow. About one third of MDS cases transforms into AML. MDS is also characterized by silencing of gene expression caused by aberrant DNA hypermethylation. Using DNA Methyltransferase inhibitors (DNMTi) such as 5-azacitidine (AZA) has good clinical results for the MDS patients with higher risk of disease. Indeed, AZA became standard therapy of high risk MDS in recent years. Nonetheless, our understanding of molecular mechanisms of AZA remains incomplete.

This PhD thesis reports about the role of transcription factor PU.1 in MDS. We found that significant subset of high risk MDS patients express low level of PU.1 due to DNA hypermethylation of PU.1 upstream regulatory element (URE). We also found significant relationship between levels of PU.1 expression and response of patients to AZA treatment. AZA is capable to significantly demethylate DNA of URE and may also initiate other epigenetic changes on its chromatin such as histone modifications pattern. These changes result in upregulation of PU.1 expression and triggers myeloid differentiation of transformed MDS cell lines and CD34+ progenitors isolated *ex vivo* from a patient bone marrow. Effects of AZA on PU.1 expression and myeloid differentiation can be modified – attenuated or enhanced – by pre-stimulation with the cytokines including Granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF). AZA also inhibits cell proliferation and cause mild apoptosis in MDS cell lines.

This work collectively provides important observations, that are currently further studied to be used in the future for *in vitro* assessment of AZA efficiency.

ÚVOD

Proces myeloidní diferenciace pluripotentní krevní kmenové buňky je iniciován a řízen transkripčním faktorem PU.1 (Laslo et al., 2006). Ve fetální krvetvorbě je zásadní význam role PU.1 demonstrován tím, že delece části genu PU.1, která kóduje DNA vazebnou doménu, vede k pozdní embryonální resp. neonatální letalitě – den E18.5 (Scott et al., 1994). Homozygoti s delecí genu *PU.1* trpí vážným poškozením krvetvorby zasahující více linií. Byla u nich pozorována řada morfologických a funkčních defektů nebo vymizení prekurzorů monocytů, granulocytů, B a T lymfocytů a v některých případech i porucha zrání červených krvinek (Scott et al., 1994). PU.1 se váže svojí DNA vazebnou doménou na specifický vazebný motiv GGA(A/T) v promotorech svých cílových genů (Graves et Petersen, 1998) a přináší na DNA v těchto vazebných místech různé transkripční faktory stejně jako enzymy modifikující molekuly histonů a DNA (Yamamoto et al., 1999). PU.1 řídí liniovou determinaci a specifikaci v závislosti na hladině svojí exprese v buňkách (DeKoter et Singh, 2000; Kamath et al., 2008).

Exprese genu *PU.1* je řízena z několika regulačních oblastí. Mezi nimi zaujímá zásadní roli oblast URE, která obsahuje řadu vazebných míst pro různé transkripční faktory včetně PU.1 samotného (auto-stimulační vazba) (Okuno et al., 2005) Delece oblasti URE má za následek snížení exprese PU.1 o 80% a rozvoj akutní myeloidní leukémie (AML) (Rosenbauer et al., 2004) Mutace v genu PU.1 jsou spojeny s případy radiačně vyvolané AML u myši (Cook et al., 2004), stejně jako byly objeveny v 7% případů AML M4 a M5 ve vzorku pacientů japonské populace (Mueller et al., 2002). Mutace v oblasti URE, která brání nasednutí chromatin remodelujícího regulátoru SATB1 na DNA, je u člověka spojována s agresivními formami AML (Steidl et al., 2007). Hematologické malignity mohou souviset nejen s mutacemi ale také s epigenetickým utlumením exprese PU.1. V mnohočetném myelomu je hladina PU.1 snížena v důsledku aberantní zvýšené metylace DNA v oblastech URE a promotoru, která se podílí na vzniku transkripčně represivní struktury chromatinu (Tatetsu et al., 2007). Za metylaci DNA (na cytosinu v tzv. CpG ostrůvcích) jsou odpovědné enzymy DNA metyltransferázy DNMT1, DNMT3a a DNMT3b (Yoder et

al., 1997, Okano et al., 1998). DNA metyltransferázy funkčně asociují s řadou jiných proteinů, například deacetylázami nebo metyltransferázami histonů, které se rovněž podílí na represi genové exprese (Rountree et al., 2000; Smallwood et al., 2007).

Myelodysplastický syndrom (MDS) je onemocnění, při kterém dochází k poruše myeloidní diferenciaci krvetvorných progenitorů. V minulých deseti letech se u MDS prokázala snížená exprese řady genů potlačujících tumorigenezi a buněčné dělení, která byla důsledkem aberantní zvýšené metylace DNA jejich regulačních oblastí (Tessemá et al., 2003; Brakensiek et al., 2005) Novější práce následně prokázaly, že rozsah zvýšené DNA metylace v regulačních úsecích řady genů je u MDS velmi rozsáhlý a pozitivně koreluje s progresí onemocnění a jeho transformací do AML (Jiang et al., 2009) Aberantní metylace v promotoru genu *FZD9*, kódujícího receptor pro Wnt v rámci Wnt-signalizační dráhy, vysoce koreluje s progresí onemocnění a s celkovým přežitím pacientů a naopak negativně koreluje s expresí genu (Jiang et al., 2009). Zvýšená metylace DNA v regulačních oblastech genů u MDS/AML pacientů ve srovnání se zdravými jedinci byla prokázána i v celogenomové studii na 14 tisících různých promotorech (Figueroa et al., 2009).

5-azacytidin funguje jako inhibitor DNMT1. Po inkorporaci do DNA vytváří k DNMT1 kovalentní vazbu, která brání enzymu ve funkci a vede k jeho postupné depleci v buňce (Stresemann et al., 2008). Bylo prokázáno, že AZA je schopen snížit metylaci řady genů ve smíšené populaci mononukleárních buněk z periferní krve pacientů s MDS, přičemž tlumení metylace pozitivně koreluje s dobrou klinickou odpovědí na AZA a naopak přetrvávání zvýšené metylace těchto genů je spojeno se špatnou prognózou (Tran et al., 2011). Hladina exprese metylovaných genů u pacientů s MDS byla snížená oproti zdravým kontrolám a AZA byl schopen tuto hladinu po 3-5 cyklech působení zvýšit (Tran et al., 2011).

AZA se s úspěchem používá k léčbě pacientů s MDS s vyšším rizikem. Klinické výsledky použití AZA u pacientů s MDS/AML ukazují, že jde o účinnou terapii, která snižuje nutnost transfúzí krve a krevních destiček (Silverman et al., 2002) a především prodlužuje dobu celkového přežití pacientů a dobu progresse onemocnění do AML (Fenaux et al., 2009).

HYPOTÉZA A CÍLE PRÁCE

Podstatou dysplázie kostní dřeně v MDS je nedostatečná exprese transkripčního faktoru PU.1 v progenitorových buňkách. Tyto buňky nejsou schopné indukovat krvetvornou diferenciaci. Předpokládáme, že v potlačení transkripce PU.1 v MDS hraje roli aberantní zvýšená metylace DNA v oblasti URE, jež je klíčovou regulační oblastí pro expresi PU.1. Exprese PU.1, případně míra její inhibice, bude pravděpodobně ovlivňovat efektivitu léčby AZA a eventuálně s tím i přežívání pacientů s MDS. Cílem dizertační práce je:

- 1.** Určit hladinu PU.1 v modelových buněčných liniích pro MDS a v progenitorech pacientů s MDS se středním-II nebo vysokým rizikem (IPSS) a potvrdit její případný vztah k prognóze onemocnění MDS při léčbě AZA. Určit, zda je DNA regulační oblasti URE genu PU.1 v těchto buňkách zvýšeně metylovaná a zda má AZA vliv na rozsah této metylace.
- 2.** Určit, zda AZA zvyšuje expresi PU.1 v modelových buněčných liniích pro MDS a zda je tato exprese provázána buněčnou myeloidní (monocytárně-granulocytární) diferenciací, případně inhibicí proliferace a navozením apoptózy.
- 3.** Určit, zda lze případný efekt AZA na expresi PU.1 a navození myeloidní diferenciace v modelových buněčných liniích pro MDS ovlivňovat cytokiny podporujícími růst monocytárních a granulocytárních buněk. Určit, jak se tato manipulace bude promítat do epigenetické struktury oblasti URE.
- 4.** Určit, zda lze případný efekt AZA na expresi PU.1 a navození myeloidní diferenciace a případné ovlivnění tohoto efektu cytokiny podporujícími růst monocytárních a granulocytárních buněk pozorovat také v progenitorech získaných od pacientů s MDS.
- 5.** Určit, zda je přítomnost URE nepostradatelná pro případné působení AZA na hladinu PU.1.

MATERIÁL A METODY

Materiál:

Buněčné linie – modely MDS

OCI-M2; Lidské buňky AML. MDS buněčná linie transformovaná do erytroleukemie (AML M6). Byla vytvořena v roce 1984 z leukemických buněk 56-letého pacienta. (DSMZ, Braunschweig, Německo; ACC 635)

SKM-1; Lidské buňky AML. MDS buněčná linie transformovaná do akutní monoblastické leukémie (AML M5). Byla vytvořena v roce 1989 z periferní krve 76-letého japonského pacienta. (DSMZ, Braunschweig, Německo; ACC 547)

Vzorky pacientů s MDS/AML a kontroly

Od roku 2006 se na našem pracovišti zásluhou MUDr. Anny Jonášové z I. interní kliniky – kliniky hematologie Všeobecné fakultní nemocnice v Praze shromáždily vzorky kostní dřeně (a periferní krve) od 44 pacientů v 54 nezávislých vzorcích. Tato práce proběhla s podporou vedení kliniky, jmenovitě Prof. MUDr. Marka Trněného, CSc. Vzorky byly od pacientů získány na základě informovaného souhlasu (v souladu s požadavky Helsinské deklarace). Jde o pacienty s MDS ve vyšším riziku (střední-2/vysoké riziko podle IPSS) a AML. Soubor pacientů se skládá ze 32 mužů a 12 žen. Medián pacientů je 67 let (v rozmezí od 57 do 83 let). Diagnostické a prognostické zhodnocení bylo provedeno v souladu s postupem WHO: RAEB 1 (5 pacientů), RAEB 2 (17 pacientů), AML (s dysplázií ve třech liniích) s 20-30% blastů v kostní dřeni (12 pacientů), AML s dysplázií ve třech liniích a více než 30% blastů v kostní dřeni (9 pacientů) a erytroleukemií (1 pacient). Všechny patientské vzorky byly odebrány v době diagnózy onemocnění a před započatím léčby AZA. Jako kontroly bylo použito pět komerčně připravených a dodaných vzorků CD34+ progenitorů z normální lidské kostní dřeně od společnosti Lonza (kat. číslo 2M-101C).

Metody:

Pracovní postup při nakládání se vzorky pacientů s MDS, myšími c-Kit+ buňkami a modelovými buněčnými liniemi pro MDS

Vzorek odebrané kostní dřevě pacientů byl naředěn sterilním PBS v poměru 1:1. Naředěný vzorek byl v poměru 1:1 opatrně navrstven na separační roztok hydrofilního polymeru Biocoll v 50 ml centrifugační zkumavce. Takto nanesený vzorek byl centrifugován ve výkyvném rotoru za pokojové teploty 20 minut na 2000 otáč./min. Ze vzniklého hustotního gradientu na rozhraní dvou fází byla separována frakce mononukleárních buněk. Tato frakce byla promyta 10 ml PBS centrifugací 5 minut při 4°C na 1250 otáč./min. Tato přečištěná frakce byla 24 hodin kultivována při 37°C a 5% atmosféře CO₂ v médiu IMDM s 10% FBS, 1% roztokem NEAA, 1% roztokem antibiotik (penicilin-streptomycin) a stem cell factorem (20 ng/ml). Za 24 hodin se metodou průtokové cytometrie na BD FACSAria IIu separovaly a vytřídily progenitorové buňky CD34+. Použita byla protilátka PE-anti-human CD34 [581] (BD Biosciences).

Myší c-Kit+ (CD117+) buňky byly připraveny z vypreparovaných stehenních a holenních kostí myší PU.1^{UR^E-/-} a normálních wt myší. Kostí byly propláchnuty injekční stříkačkou s PBS. Z buněčné suspenze 1x10⁸ buněk byla následně vytříděna pomocí metody magnetického sortování na přístroji AutoMACS populace c-Kit+ buněk. Byla použita protilátka FITC-anti-mouse CD117 [2B8] (Biolegend) a následně byly buňky vytříděny pomocí magnetických anti-FITC MicroBeads dle návodu výrobce.

Buňky buněčných linií OCI-M2 a SKM-1 byly kultivovány při 37°C a 5% atmosféře CO₂ v médiu podle doporučení dodavatele. Počet buněk v kultuře byl stanoven jejich počítáním v Bürkreově komůrce.

Pracovní postup při testování AZA na modelových buněčných liniích pro MDS, myších c-kit+ buňkách z kostní dřeně a CD34+ progenitorech z pacientů MDS

Na buněčných kulturách linií OCI-M2 a SKM-1 byl proveden metodický experiment s ovlivněním buněk různými koncentracemi AZA po dobu 24 hodin a následným změřením buněčné životnosti na průtokovém cytometru. AZA byl připraven jako čerstvý roztok rozpuštěním 25 mg prášku v 10 ml sterilní destilované vody a následně přidán v příslušném objemu do 10 ml buněčné kultury tak, aby jeho výsledná koncentrace v kultuře dosáhla hodnot 0,5 μM , 1 μM , 2 μM , 5 μM , 10 μM nebo 20 μM . Na základě experimentu byly stanoveny tři subletální výsledné koncentrace AZA - 1 μM , 2 μM a 5 μM , které byly dále používány pro působení na buněčné linie, myší c-Kit+ buňky izolované z kostní dřeně a CD34+ progenitory ze vzorků kostní dřeně pacientů s MDS. Buňky byly ovlivňovány AZA po dobu tří dnů, každých 24 hodin ve třech stejných dávkách (1 μM , 2 μM nebo 5 μM). Roztok AZA byl před každým přidáním připraven jako čerstvý výše uvedeným způsobem. Při studiu vlivu cytokinů na buňky MDS se vždy 6 hodin před přidáním každé dávky AZA přidal k buňkám příslušný cytokin (G-SCF, GM-CSF a M-CSF) v takovém objemu, aby jeho výsledná koncentrace v kultuře byla 50 ng/ml.

Izolace RNA a přepis na cDNA

Kvantitativní PCR v reálném čase (qPCR) a vyhodnocení RNA exprese

Přenos proteinu a inkubace s protilátkou (Western Blott)

Chromatinová imunoprecipitace

Průtoková cytometrie

Analýza metylace DNA

VÝSLEDKY A DISKUZE

1. Exprese genu PU.1 v progenitorech získaných z pacientů s MDS. Vztah exprese PU.1 k odpovědi pacientů na léčbu AZA a k metylaci DNA v oblasti URE

Hladina transkripčního faktoru PU.1 je u řady hematologických malignit snížena. Úplné či výrazné (o 80%) potlačení exprese tohoto genu v dospělé krvetvorbě je asociované s AML. Položil jsem si proto otázku, zda se rovněž progenitory získané z pacientů MDS budou oproti buňkám se zdravých kontrol vyznačovat sníženou expresí PU.1. MDS je onemocnění vyznačující se mimořádně vysokou variabilitou svého průběhu, prognózy a odpovědi na léčbu. Soustředili jsme se proto na soubor pacientů s MDS s vyšším rizikem (střední-2/vysoké riziko podle IPSS), případně s transformací MDS do AML. U souboru těchto 44 pacientů (buňky byly získány v 54 nezávislých vzorcích) jsme stanovili řadu klinických údajů včetně reakce pacientů na léčbu AZA. Průtokovou cytometrií jsme izolovali populaci progenitorových, CD34+ buněk z kostní dřeně pacientů, změřili v nich expresí PU.1 na úrovni mRNA a srovnali ji s expresí v CD34+ buňkách od zdravých dárců. Zjistili jsme, že průměrná exprese PU.1 v souboru pacientů s MDS (N=54) byla prakticky shodná s průměrnou expresí PU.1 v souboru kontrol (N=5). Ve srovnání se zdravými dárci byla však úroveň exprese transkriptu PU.1 mRNA u MDS pacientů distribuována výrazně heterogenně. Hladiny genů, na které byla exprese PU.1 normalizována (HPRT1 a GAPDH), takovou fluktuaci nevykazovaly. Dále jsme změřili hladinu exprese mRNA transkriptu PU.1 v modelových buněčných systémech pro MDS – buňkách OCI-M2 a SKM-1 a zjistili jsme, že hladina PU.1 v těchto buňkách je nižší než hodnota průměru pro kontrolní CD34+ buňky.

Zajímalo nás, zda hladina PU.1 u pacientů s vyšším rizikem MDS má nějaký vztah k odpovědi těchto pacientů na léčbu AZA. Proto jsme ze souboru patientských vzorků vybrali 17 vzorků pacientů s vyšším rizikem MDS (střední-2/vysoké riziko podle IPSS) a MDS/AML léčených AZA, kteří již zemřeli. Podle výše exprese PU.1 v *ex vivo* izolovaných CD34+

progenitorech pacientů s MDS jsme pacienty rozdělili do dvou odlišných skupin – na skupinu s nízkou expresí PU.1 (hodnota exprese byla nižší než průměr mínus standardní chyba pro kontrolní CD34+ buňky; N=9) a skupinu zbývajících pacientů vykazujících podle tohoto rozdělení střední/vysokou expresí PU.1 (N=8). Přestože celkový počet pacientů v obou skupinách byl poměrně nízký, zaznamenali jsme významný trend směrem k delšímu přežití při léčbě AZA ve skupině pacientů se střední nebo vysokou úrovní exprese PU.1. Medián přežití při léčbě AZA činil ve skupině pacientů s nízkou hladinou PU.1 necelé 4 měsíce, zatímco ve skupině pacientů se střední a vysokou hladinou PU.1 dosáhl zhruba 10 měsíců. Významný pozitivně korelační trend mezi expresí PU.1 ve vzorcích pacientů s MDS a délkou jejich přežití na AZA byl zaznamenán nejen pro celé skupiny vzorků ale i pro jednotlivé vzorky.

Mechanismus rozhodující o snížení exprese PU.1 v MDS progenitorech byl dále studován ve smyslu zjištění míry DNA metylace v oblasti URE (19 CpG ostrůvků ~- 17 kb oblast) v buňkách OCI-M2. Tato buněčná linie představuje transformaci MDS s vysokým rizikem do AML M6. Hladina exprese mRNA transkriptu PU.1 v buňkách OCI-M2 se pohybovala na spodní úrovni v rámci námi definované skupiny buněk pacientů s MDS s nízkou hladinou PU.1. Oblast URE v buňkách OCI-M2 byla silně metylovaná s maximem metylace na CpG ostrůvcích 3-5 a 13-16. Tyto CpG ostrůvky sousedí s vazebnými místy pro PU.1 a AML1, která jsou nezbytná pro regulační (auto)stimulaci exprese PU.1.

Položili jsme si otázku, zda lze úroveň metylace DNA v URE snížit pomocí AZA. Působili jsme proto na buňky OCI-M2 AZA v koncentraci 5 μ M. AZA způsobil pokles DNA metylace v oblasti URE. V oblasti AML1 a PU.1 vazebných míst mělo působení AZA v některých případech na demetylaci pouze částečný účinek (CpG ostrůvek 14 a 18), zatímco jiné CpG ostrůvky (12, 13, 15, 16 a 19) těchto vazebných regionů jsou po působení AZA významně demetylované.

Na základě výsledků získaných experimentem na buňkách OCI-M2 jsme si položili otázku, zda úroveň exprese PU.1 v buňkách CD34+ progenitorů

získaných od pacientů s MDS odpovídají úrovni metylace DNA v oblasti URE (u těch samých pacientů). Analýza vzorků progenitorů pacientů s MDS, kde se podařilo změřit úroveň metylace DNA (N=9; z toho 5 ze skupiny s nízkou expresí PU.1 a 4 ze skupiny se střední/vysokou expresí PU.1), neukázala žádnou korelaci mezi úrovní metylace všech 19-ti CpG ostrůvků a expresí PU.1. Ukázala však signifikantní trend negativní korelace ($r = -0,37$) mezi expresí PU.1 a metylací DNA na CpG ostrůvcích 13-16 tj. v oblasti vazebných míst transkripčních faktorů PU.1 a AML.

2. Vliv AZA na expresi PU.1 v modelových buňkách pro MDS. Vliv AZA na buněčnou diferenciaci, apoptózu a proliferaci

Zjistili jsme, že existuje negativní korelace mezi úrovní metylace CpG ostrůvků 13-16 v oblasti URE a hladinou exprese PU.1 a že působení AZA snižuje metylaci v oblasti URE v modelové buněčné linii OCI-M2. Položil jsem si otázku, zda má působení AZA na modelové buněčné linie nějaký přímý efekt na expresi PU.1. Zjistili jsme, že působení AZA vede ke zvýšení exprese PU.1 v buňkách OCI-M2 a SKM-1 na úrovni mRNA transkriptů v závislosti na dávce. Dále jsme zjistili, že působení AZA vede ke zvýšení exprese PU.1 v buňkách OCI-M2 a SKM-1 i na úrovni proteinu. Působení AZA navíc vede k zapnutí transkripčního programu cílových genů PU.1 s viditelným zvýšením exprese CSF1R (Colony stimulating factor 1 receptor), CSF3R (Colony stimulating factor 3 receptor - granulocyte), EGR2 (Early growth response 2), FOS (FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog), MMP9 (Matrix metalloproteinase 9), CEBPA (CCAAT/enhancer binding protein alpha) a v buněčné linii OCI-M2 i genu MPO (Myeloperoxidase) na úrovni mRNA.

Zajímalo nás dále, zda je indukce transkripčního programu PU.1 způsobená AZA dostačující pro navození diferenciaci na úrovni buněčného fenotypu. Využili jsme proto analýzu metodou průtokové cytometrie s protilátkou proti antigenu myeloidní (monocytárně-granulocytární) diferenciaci CD11b. Zjistili jsme, že AZA významným způsobem indukuje proteinovou expresi CD11b v buňkách OCI-M2 i SKM-1.

U buněk OCI-M2 a SKM-1 jsme dále provedli analýzu vlivu AZA na proliferaci podle změny parametru počtu buněk v kultuře v čase působení AZA. Rozhodli jsme se rovněž stanovit pomocí průtokové cytometrie na liniích OCI-M2 a SKM-1 případnou indukci apoptózy vlivem AZA. Zjistili jsme, že vlivem AZA dochází k významné inhibici buněčné proliferace a poměrně nízké indukci apoptózy. Položili jsme si otázku, jakým potenciálním molekulárním mechanismem může AZA resp. zvýšení exprese PU.1 vést k zastavení buněčného dělení. Změřili jsme expresi mRNA transkriptu CDKN1A (Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A; p21), který funguje jako tumor-potlačující gen schopný v různých fázích zastavit buněčný cyklus. Zjistili jsme, že exprese p21 se po působení AZA zvýší v buňkách OCI-M2 více než šestkrát a v buňkách SKM-1 bezmála o 100%

3. Vliv cytokinů stimulujících růst myeloidních buněk na účinek AZA v modelových buněčných liniích pro MDS a mechanismy působení cytokinů na úrovni chromatinu v regulačních oblastech genu PU.1

Předchozí studie ukázala, že G-CSF, cytokin stimulující růst granulocytů, potencuje zvýšení hladiny PU.1 a myeloidní diferenciaci v normálních lidských CD34+ progenitorech (Hu et al., 2010). Položil jsem si proto otázku, zda tato situace platí i v modelových buněčných liniích pro MDS. Použili jsme buňky OCI-M2, přičemž kromě G-CSF jsme testovali také případný pro-diferenciační účinek cytokinů M-CSF a GM-CSF. Cílem experimentu bylo určit, zda specifické stádium buněčného cyklu MDS progenitorů může vykazovat různou citlivost k účinkům vyvolaným různými cytokiny.

Zjistili jsme, že všechny cytokiny (G-CSF, M-CSF a GM-CSF) výrazně zvyšují demetylační účinek AZA (v koncentraci 5 μ M) v oblasti URE buněk OCI-M2. Dále jsme zjistili, že cytokiny M-CSF a GM-CSF potencují v buňkách OCI-M2 účinek AZA při zvýšení exprese mRNA transkriptů pro PU.1 a jeho cílový gen EGR2. Ačkoliv cytokiny M-CSF a GM-CSF zvyšovaly efekt působení AZA na expresi PU.1 u buněk OCI-M2, k navození efektivní diferenciaci na buněčné úrovni (demonstované

změněním exprese CD11b průtokovou cytometrií) došlo pouze v buňkách ovlivněných působením GM-CSF společně s AZA.

Překvapivé bylo naše zjištění, že působení G-CSF v kombinaci s AZA v buněčné linii OCI-M2 spíše inhibuje indukci exprese PU.1 a EGR2 vyvolanou samotným AZA. Kombinace působení G-CSF a AZA rovněž vede u buněk OCI-M2 k inhibici exprese povrchové molekuly Cd11b, která představuje znak myeloidní diferenciace.

Vliv cytokinu G-CSF na expresi PU.1, EGR2 (na úrovni mRNA) a na expresi CD11b (na úrovni proteinu) jsme obdobně testovali i na buňkách SKM-1, nicméně dosažené výsledky nebyly s to poskytnout jasnou odpověď na otázku, zda G-CSF v tomto buněčném modelu potencuje nebo naopak inhibuje buněčnou diferenciaci.

Abychom pochopili komplexní dopady, které má působení AZA v kombinaci s cytokiny na epigenetický stav chromatinu v oblasti URE, provedli jsme metodou chromatinové imunoprecipitace (ChIP) detailní analýzu zaměřenou na histonové modifikace v této oblasti. Jako model jsme nyní použili pouze buňky OCI-M2. Důvodem bylo to, že výsledky na nich dosažené nás vedly k jasnější představě o potencujícím či naopak inhibičním účinku působení jednotlivých cytokinů v kombinaci s AZA na expresi PU.1 a jeho cílových genů.

Použili jsme amplikony pokrývající URE a další pozitivní regulační oblasti genu PU.1 nacházející se před místem jeho transkripčního počátku. ChIP analýzou zaměřenou na aktivní chromatinovou značku – trimetylaci lysinu K4 na histonu H3 (H3K4Me3), jsme zjistili, že tato značka je po působení AZA nabohacena v oblasti URE. Kombinace působení AZA s GM-CSF a M-CSF přítomnost histonové modifikace H3K4Me3 v oblasti URE nijak zásadněji nezměnila, zatímco kombinace působení AZA s G-CSF výskyt této značky v oblasti URE oproti samotnému působení AZA snížila. Dále jsme se zaměřili na aktivační značku stavu chromatinu ve vztahu k transkripci – acetylaci lysinu 9 histonu H3 (H3K9Ac), na regulačních

úsecích genu PU.1. Pouze kombinace působení AZA a GM-CSF zvyšovala přítomnost H3K9Ac přímo v URE (-16,6 kb).

4. Odpověď CD34+ progenitorů získaných od pacientů s MDS na AZA a stimulaci cytokinem G-CSF

Z údajů získaných na buněčném modelu OCI-M2 (a SKM-1) vyplývá, že AZA působí jako silný prostředek obnovující myeloidní diferenciační potenciál těchto buněk a že jeho účinek může být dále ovlivněn působením cytokinů.

Na základě těchto výsledků jsem se rozhodl studovat působení AZA a cytokinů (G-CSF) přímo na vzorcích CD34+ progenitorů získaných od pacientů s MDS se středním-II/vysokým rizikem. Náš zájem o práci na těchto vzorcích se soustředil na objasnění detailních procesů účinku AZA na úrovni chromatinové struktury a genové exprese. Dále nás zajímalo určení *in vitro* odpovědi na působení AZA v kombinaci se stimulačním cytokinem G-CSF.

Použili jsme pro tyto studie progenitorové buňky izolované *ex vivo* z kostní dřeně pacienta P302, 67-letého muže s MDS RAEB II (WHO), IPSS-střední-2 riziko. Pacient měl anemii se závislostí na transfuzích (4 TU/měsíc), neutropenii a nález 10% blastů v kostní dřeni (fenotypově charakterizovaných jako CD33+ CD34+ CD117+ HLADR+ CD45+). Blasty byly detekovatelné pomocí průtokové cytometrie také v periferní krvi. Vedle vzorku P302 jsme rovněž použili vzorek buněk pacienta P301 (69-letý muž s RAEB II).

Pacienti resp. vzorky P302 i P301 se podle exprese PU.1 v CD34+ progenitorech řadili do skupiny se střední/vysokou hladinou PU.1. Ačkoliv exprese PU.1 nebyla výrazně potlačena, CD34+ progenitory vykazovaly určité známky DNA metylace v oblasti URE. Důležitým zjištěním bylo, že exprese mRNA transkriptu PU.1 v buňkách ze vzorku P302 se působením AZA zvýšila zhruba o 30%, přičemž tento efekt jsme pozorovali jak v populaci všech izolovaných mononukleárních buněk z kostní dřeně, tak

na průtokovým cytometrem vyříděných populacích CD34+ progenitorů. Expres PU.1 v buňkách ze vzorku P301 se ve vyříděné CD34+ populaci působením AZA zvýšila zhruba o 10%. Ke zvýšení exprese PU.1 působením AZA o zhruba 30% došlo rovněž ve vyříděných CD11b+ buňkách pacienta P301 (nikoliv však P302), které vykazují vyšší stupeň myeloidní diferenciaci.

Zjistili jsme, že účinek AZA na zvýšení exprese PU.1 na úrovni mRNA byl zesílen působením G-CSF. I tento potencující efekt G-CSF jsme pozorovali jak v populaci všech izolovaných mononukleárních buněk z kostní dřeně, tak na průtokovým cytometrem vyříděných populacích CD34+ progenitorů a CD11b+ buněk vykazujících vyšší stupeň myeloidní diferenciaci. Také exprese CSF1R, cílového genu PU.1, byla v progenitorech ze vzorku pacienta P302 po působení AZA resp. AZA + G-CSF zvýšena zhruba o 60%.

Zatímco působením samotného AZA se v buňkách progenitorů zvýšila exprese KIT, což je známý znak kmenových buněk, inkubace progenitorů s AZA v kombinaci G-CSF naopak expresi KIT významně snižuje. Tento jev jsme pozorovali rovněž u buněk OCI-M2. Experimenty s využitím průtokové cytometrie ukázaly, že po působení AZA v kombinaci s G-CSF došlo u vzorku mononukleárních buněk kostní dřeně pocházejících od pacienta P302 k poklesu populace CD34+ buněk a nárůstu populace CD11b+ buněk. Zvýšenou expresi CD11b po působení AZA v kombinaci s G-CSF jsme pozorovali rovněž u buněk z kostní dřeně pacienta P301.

Analýza procesů na úrovni chromatinu (pomocí metody chromatinové imunoprecipitace) naznačuje, že v oblasti URE se v CD11b+ buňkách izolovaných z kostní dřeně pacientů P302 a P301 po působení AZA významným způsobem mění uspořádání histonových modifikací: dochází k nabohacení známky transkripčně aktivního chromatinu H3K9Ac a k poklesu známky transkripčně utlumeného chromatinu H3K9Me3. K těmto změnám dochází simultánně s derepresí genu PU.1 a rozsah těchto změn na úrovni chromatinu po působení AZA je dále zesílen působením G-CSF.

Naše výsledky získané v primárních CD34+ progenitorech z kostní dřeně pacientů s MDS ukazují, že AZA navozuje v těchto buňkách zvýšení exprese PU.1 a jeho cílových genů. Účinek působení AZA může být dále potencován působením cytokinu G-CSF, který vedle zesílení pro-diferenciačních efektů AZA zároveň potlačuje spouštění „kmenových“, pluripotentních genů (KIT) vyvolané AZA.

5. Význam oblasti URE pro působení AZA na hladinu exprese PU.1

Výše uvedené výsledky ve svém souhrnu ukazují na zásadní význam regulační oblasti URE jako místa děje řady vzájemně provázaných epigenetických procesů, v jejichž důsledku AZA zvyšuje expresi genu PU.1. Položil jsem otázku, zda je tato oblast pro zvýšení exprese PU.1 působením AZA nepostradatelná, respektive zda k zvýšení exprese PU.1 vlivem AZA dochází výhradně skrze působení AZA na chromatinovou strukturu v oblasti URE.

Odpověď na položenou otázku jsme hledali za využití modelu mutantních myší s deletovanou oblastí URE (^{URE-/-}). Jak bylo již dříve popsáno, u těchto myší se kvůli snížení exprese mRNA transkriptu PU.1 o 80% vyvíjí AML. Progenitory pocházející z kostní dřeně myší s AML byly magneticky selektovány na c-kit+ populaci tak, jak bylo již dříve popsáno (Rosenbauer et al., 2004). Buňky progenitorů byly *in vitro* stimulovány AZA a následně jsme v nich změřili hladinu mRNA genu PU.1, stejně jako hladinu mRNA genů Egr2 a Gfi1.

Získané údaje potvrzují, že hladina PU.1 v blastech AML v myši ^{URE-/-} je zhruba pětkrát nižší ve srovnání s hladinou PU.1 v c-kit+ progenitorech získaných z kostní dřeně zdravé, kontrolní myši (bez delece URE). Překvapivé nicméně bylo, že v nepřítomnosti URE došlo po stimulaci buněk AZA k indukci exprese PU.1 v závislosti na dávce v relativně podobném poměru jako u progenitorů ze zdravého zvířete. Různé hladiny PU.1 se promítaly také do změny exprese genů Egr2 a Gfi1 ve stejných vzorcích.

Naše výsledky ukazují, že ačkoliv je funkční oblast URE nezbytně nutná pro zajištění „normální“ hladiny PU.1 v buňce a pro manipulaci s touto „normální“ hladinou působením AZA, není už nepostradatelná pro dosažení jakéhokoliv efektu zvýšení hladiny PU.1 působením AZA na buňky AML. Účinek působení AZA při zvýšení exprese PU.1 je tedy kromě URE pravděpodobně závislý i na jiných regulačních oblastech genu PU.1, případně na dalších mechanismech.

6. Diskuze ke zjištěným vztahům mezi metylací DNA v URE, expresí PU.1 a přežíváním pacientů s MDS na léčbě s AZA

Zjistili jsme, že pacienti léčení AZA, jejichž hladina exprese PU.1 vykazovala před začátkem léčby velmi nízkou úroveň, měli ve srovnání s pacienty se střední a vyšší hladinou PU.1 v buňkách progenitorů z kostní dřeně výrazně kratší dobu přežití. Výsledky jiné skupiny ukázaly, že hladiny PU.1 v buňkách z kostní dřeně pacientů s MDS s nízkým a s vysokým rizikem podle IPSS se statisticky významně neliší (Huh et. al., 2009). To by naznačovalo, že hladina exprese PU.1 představuje významný prognostický faktor (ve vztahu k léčbě MDS pomocí AZA), který přitom není asociován s kategoriemi „rizika“ prognózy MDS podle IPSS.

Hladina PU.1 je spojována s pro-diferenčiací a apoptotickým účinkem Decitabinu, což je deoxy-analog AZA, v buňkách K562 představujících model lidské myeloidní leukémie. Výše hladiny PU.1 v buňkách K562 pozitivně koreluje se schopností Decitabinu navodit v těchto buňkách apoptosu a/nebo buněčnou diferenciaci (Aoyama et al., 2012). To by mohlo představovat analogickou situaci k námi pozorovanému vlivu hladiny PU.1 na působení AZA v buňkách progenitorů pacientů s MDS, kde by případná indukce diferenciaci/apoptózy asociovala s dobrou prognózou při léčbě s AZA. Je ovšem třeba brát v úvahu, že působení AZA a působení Decitabinu v modelových buněčných liniích pro AML se neukázalo být zcela identické (Hollenbach et al., 2010).

Hladina PU.1 v progenitorech pacientů s MDS s vyšším rizikem jeví trend negativní korelace k metylaci DNA v určitém úseku regulační oblasti URE. Metylace DNA inhibující genovou expresi byla v MDS zjištěna u několika genů hrajících roli ve Wnt signalizaci (*FZD9*) a v kontrole buněčného cyklu (*p15*, *p16*) (Jiang et al., 2009; Rodrigues et al., 2010). Stupeň metylace koreloval s progresí onemocnění a v případě genu *FZD9* zároveň negativně koreloval s hladinou genové exprese (Jiang et al., 2009). Úroveň metylace genu *p15* má navíc prediktivní hodnotu, kdy pacienti dosahující odpovědi na léčbu s AZA mají méně metylovanou DNA ve srovnání s těmi, kteří na léčbu AZA neodpovídají (Raj et al., 2007). Naše výsledky ukazující zvýšenou metylaci v oblasti URE u (některých) pacientů s MDS s vyšším rizikem lze srovnat s pozorováním zvýšené metylace URE u pacientů s mnohočetným myelomem, kde nízká hladina exprese PU.1 rovněž asociuje se špatnou prognózou onemocnění (Tatetsu et al., 2007).

Na základě námi zjištěných údajů o vztahu exprese mRNA transkriptu PU.1 k odpovědi pacientů na léčbu AZA, vztahu metylace v oblasti URE k expresi PU.1 v buňce a na základě zjištěného vztahu mezi metylací genu *p15* a odpovědi pacientů na léčbu AZA (Raj et al., 2007) lze vyslovit předpoklad, že pacienti s MDS ve vyšším riziku, jejichž progenitory se vyznačují silně transkripčně utlumeným chromatinem v oblasti URE, budou pro navození odpovědi vyžadovat vyšší dávky AZA, zatímco pacienti, jejichž s relativně otevřenou strukturou chromatinu, mohou vyžadovat dávky nižší.

Ukázali jsme, že působení AZA skutečně snižuje metylaci v oblasti URE v buněčné linii OCI-M2, což je doprovázeno obnovením exprese PU.1 a jeho cílových genů. Obnovení exprese PU.1 a jeho cílových genů jsme prokázali rovněž v progenitorech izolovaných z pacientů s MDS. To je v souladu se závěry dalších studií, které ukázaly, že AZA (nebo jeho analog Decitabin) svým působením zvyšuje hladinu PU.1 v buňkách, kde je DNA v oblasti regulačních úseků genu PU.1 metylována (Amaravadi et Klemsz, 1999; Tatetsu et al., 2007). Obdobný efekt působení AZA byl popsán u řady dalších aberantně metylovaných genů se sníženou expresí u MDS (Tran et al, 2011).

SHRnutí ZÁVĚRŮ DIZERTAČNÍ PRÁCE

Na konkrétně stanovené cíle dizertační práce jsem odpověděl takto:

1. Expres PU.1 v progenitorech získaných od pacientů s MDS se středním-II nebo vysokým rizikem (IPSS) je oproti zdravým kontrolám mnohem více heterogenní. Existují skupiny pacientů s vysokou i nízkou expresí PU.1 oproti zdravým kontrolám. Pacienti s nízkou hladinou exprese PU.1 mají významně horší prognózu při léčbě AZA pokud jde o dobu celkového přežití, než pacienti se střední a vysokou expresí PU.1. Expres PU.1 v modelových buněčných liniích pro MDS (OCI-M2, SKM-1) je oproti zdravým kontrolám nižší. Oblast URE je v buněčné linii OCI-M2 a v progenitorech z pacientů s MDS aberantně zvýšeně metylovaná. Mezi mírou metylace na CpG ostrůvkách při vazebných místech PU.1 a AML-1 v oblasti URE a mezi hladinou exprese PU.1 v progenitorech z pacientů s MDS existuje zřetelný trend nepřímé korelace. Působení AZA na MDS buňky OCI-M2 vede k výraznému potlačení metylace v oblasti URE.

2. AZA aktivita potlačenu expresi PU.1 a jeho cílových genů v modelových buněčných liniích MDS. Zvýšení exprese PU.1 na úrovni mRNA i proteinu je provázáno myeloidní diferenciací leukemických buněk. AZA rovněž inhibuje buněčné dělení a do jisté míry navozuje apoptózu.

3. Účinek AZA na zvýšení exprese PU.1 a navození myeloidní diferenciace v modelových buněčných liniích pro MDS lze ovlivňovat cytokiny podporujícími růst myeloidních kolonií. Předchozí stimulace buněk OCI-M2 ovlivněných AZA cytokiny M-CSF a GM-CSF dále zvyšuje expresi PU.1 a jeho cílových genů, ačkoliv k epigenetickým změnám histonových modifikací v oblasti URE, které by signalizovaly rozvolnění chromatinové struktury, dochází pouze v případě vlivu GM-CSF.

4. AZA aktivuje potlačenu expresi PU.1 a jeho cílových genů v progenitorech z MDS pacientů. Tento účinek AZA na zvýšení exprese

PU.1 a navození myeloidní diference lze ovlivňovat cytokiny podporujícími růst myeloidních kolonií. Předchozí stimulace progenitorů získaných od pacientů s MDS cytokinem G-CSF vede k snížení exprese genu KIT, která je indukována AZA, k dalšímu zvýšení exprese PU.1 a k epigenetickým změnám histonových modifikací v oblasti URE, signalizujícím otevření chromatinu.

5. Oblast URE je zásadní pro zajištění fyziologické hladiny exprese PU.1 a manipulování s touto „normální“ hladinou působením AZA. AZA nicméně ovlivňuje hladinu exprese PU.1 také skrze jiné mechanismy, pravděpodobně další regulační elementy genu PU.1.

ODKAZY NA POUŽITOU LITERATURU

Amaravadi L and Klemsz M J. DNA methylation and chromatin structure regulate PU.1 expression. *DNA Cell Biol.* **18** (1999): 875-884

Aoyama S, Nakano H, Danbara M, Higashihara M, Harigae H, Takahashi S. The differentiating and apoptotic effects of 2-aza-5'-deoxycytidine are dependent on the PU.1 expression level in PU.1 transgenic K562 cells. *Biochem Biophys Res Commun.* (2012) [Epub ahead of print]

Brakensiek K, Länger F, Schlegelberger B, Kreipe H, Lehmann U. Hypermethylation of the suppressor of cytokine signalling-1 (SOCS-1) in myelodysplastic syndrome. *Br J Haematol.* **130** (2005): 209-217

Cook W D, McCaw B J, Herring C, John D L, Foote S J, Nutt S L, Adams J M. PU.1 is a suppressor of myeloid leukemia, inactivated in mice by gene deletion and mutation of its DNA binding domain. *Blood* **104** (2004): 3437-3444

DeKoter R P, Singh H. Regulation of B lymphocyte and macrophage development by graded expression of PU.1. *Science* **288** (2000): 1439-1441

Fenaux P, Mufti G J, Hellstrom-Lindberg E, Santini V, Finelli C, Giagounidis A, Schoch R, Gattermann N, Sanz G, List A, Gore S D, Seymour J F, Bennett J M, Byrd J, Backstrom J, Zimmerman L, McKenzie D, Beach C, Silverman L R. International Vidaza High-Risk MDS Survival Study Group. Efficacy of azacitidine compared with that of conventional care regimens in the treatment of higher-risk myelodysplastic syndromes: a randomised, open-label, phase III study. *Lancet Oncol* **10** (2009): 223-232

Figueroa M E, Skrabanek L, Li Y, Jiemjit A, Fandy T E, Paietta E, Fernandez H, Tallman M S, Grealley J M, Carraway H, Licht J D, Gore S D, Melnick A. MDS and secondary AML display unique patterns and abundance of aberrant DNA methylation. *Blood* **144** (2009): 3448-3458

Graves B J and Petersen J M. Specificity within the ets family of transcription factors. *Adv. Cancer Res.* **75** (1998): 1–55

Hollenbach P W, Nguyen A N, Brady H, Williams M, Ning Y, Richard N, Krushel L, Aukerman S L, Heise C, MacBeth K J. A comparison of azacitidine and decitabine activities in acute myeloid cell lines. *PLoS ONE* **5** (2010): e9001

Hu Z, Negrotto S, Gu X, Mahfouz R, Ng K P, Ebrahim Q, Copelan E, Singh H, Maciejewski J P, Sauntharajah Y. Decitabine maintains hematopoietic precursor self-renewal by preventing repression of stem cell genes by a differentiation-inducing stimulus. *Mol Cancer Ther* **9** (2010): 1536-1543

Huh H J, Chae S L, Lee M, Hong K S, Mun Y C, Seong C M, Chung W S, Huh J W. CD34, RAB20, PU.1 and GF11 mRNA expression in myelodysplastic syndrome. *Int Jnl Lab Hem* **31** (2009): 344-351

Jiang Y, Dunbar A, Gondek L P, Mohan S, Rataul M, O'Keefe C, Sekers M, Sauntharajah Y and Maciejewski J P. Abberant DNA methylation is a dominant mechanism in MDS progression to AML. *Blood* **113** (2009): 1315-1325

Kamath M B, Houston I B, Janovski A J, Zhu X, Gowrisankar S, Jegga A G, DeKoter R P. Dose-dependent repression of T-cell and natural killer cell genes by PU.1 enforces myeloid and B-cell identity. *Leukemia* **22** (2008): 1214-1225

Laslo P, Spooner C J, Warmflash A, Lancki D W, Lee H J, Sciammas R, Gantner B N, Dinner A R and Singh H. Multilineage transcriptional priming and determination of alternate hematopoietic cell fates. *Cell* **126** (2006): 755-766

Mueller B U, Pabst T, Osato M, Asou N, Johansen L M, Minden M D, Behre G, Hiddemann W, Ito Y, Tenen D G. Heterozygous PU.1 mutations are associated with acute myeloid leukemia. *Blood* **100** (2002): 998-1007

Okano M, Xie S, Li E. Cloning and characterization of a family of novel mammalian DNA (cytosine-5) methyltransferases. *Nat Genet* **19** (1998): 219-220

Okuno Y, Huang G, Rosenbauer F, Evans E K, Radomska H S, Iwasaki H, Akashi K, Moreau-Gachelin F, Li Y, Zhang P, Gottgens B, and Tenen D G, Potential autoregulation of transcription factor PU.1 by an upstream regulatory element. *Mol Cell Biol* **25** (2005): 2832-2845

Raj K, John A, Ho A, Chronis C, Khan S, Samuel J, Pomplun S, Thomas N S, Mufti G J. CDKN2B methylation status and isolated chromosome 7 abnormalities predict responses to treatment with 5-azacytidine. *Leukemia* **21** (2007): 1937-1944

Rodrigues E F, Santos-Rebouças C B, Gonçalves Pimentel M M, Mencialha A L, Dobbin J, Da Costa E S, Fernandez Cde S, Bouzas L F, Abdelhay E, De Souza Fernandez T. Epigenetic alterations of p15(INK4B) and p16(INK4A) genes in pediatric primary myelodysplastic syndrome. *Leuk Lymphoma*. **51** (2010): 1887-1894

Rosenbauer F, Wagner K, Kutok J L, Iwasaki H, Le Beau M M, Okuno Y, Akashi K, Fiering S and Tenen D G. Acute myeloid leukemia induced by graded reduction of a lineage-specific transcription factor, PU.1. *Nat Genet* **36** (2004): 624-630

Rountree M R, Bachman K E, Baylin S B. DNMT1 binds HDAC2 and a new co-repressor, DMAP1, to form a complex at replication foci. *Nat Genet*. **25** (2000): 269-277

Scott E W, Simon M C, Anastasi J, and Singh H, Requirement of transcription factor PU.1 in the development of multiple hematopoietic lineages. *Science* **265** (1994): 1573-1577

Silverman L R, Demakos E P, Peterson B L, Kornblith A B, Holland J C, Odchimar-Reissig R, Stone R M, Nelson D, Powell B L, DeCastro C M, Ellerton J, Larson R A, Schiffer C A, Holland J F. Randomized controlled trial of azacitidine in patients with the myelodysplastic syndrome: a study of the cancer and leukemia group B. *J Clin Oncol* **20** (2002): 2429-2440

Smallwood A, Esteve P O, Pradhan S, Carey M. Functional cooperation between HP1 and DNMT1 mediates gene silencing. *Genes Dev* **21** (2007): 1169-1178

Steidl U, Steidl C, Ebralidze A, Chapuy B, Han H J, Will B, Rosenbauer F, Becker A, Wagner K, Koschmieder S, Kobayashi S, Costa D B, Schulz T, O'Brien K B, Verhaak R G, Delwel R, Haase D, Trumper L, Krauter J, Kohwi-Shigematsu T, Griesinger F and Tenen D G. A distal single nucleotide polymorphism alters long-range regulation of the PU.1 gene in acute myeloid leukemia. *J Clin Invest* **117** (2007): 2611-2620

Stresemann C, Bokelmann I, Mahlknecht U, Lyko F. Azacitidine causes complex DNA methylation responses in myeloid leukemia. *Mol Cancer Ther.* **7** (2008): 2998-3005

Tatetsu H, Ueno S, Hata H, Yamada Y, Takeya M, Mitsuya H, Tenen G H, Okuno Y. Down-regulation of PU.1 by methylation of distal regulatory elements and the promoter is required for myeloma cell growth. *Cancer Res* **67** (2007): 5328-5336

Tessema M, Länger F, Dingemann J, Ganser A, Kreipe H, Lehmann U. Aberrant methylation and impaired expression of the p15(INK4b) cell cycle regulatory gene in chronic myelomonocytic leukemia (CMML). *Leukemia* **17** (2003): 910-918

Tran H T, Kim H N, Lee I, Kim Y, Ahn J, Yang D, Lee J, Kim H. DNA methylation changes following 5-azacitidine treatment in patients with myelodysplastic syndrome. *Oncoogy & Hematology* **26** (2011): 207-213

Yamamoto H, Kihara-Negishi F, Yamada T, Hashimoto Y, Oikawa T. Physical and functional interactions between the transcription factor PU.1 and the coactivator CBP. *Oncogene* **18** (1999): 1495-1501

Yoder J A, Soman N, Verdine G V and Bestor T H. DNA methyltransferases in mouse tissue and cells. Studies with a mechanism-based probe. *J. Mol. Biol.* **270** (1997): 385-395

Publikace autora (s případným uvedením impakt faktoru časopisu):

Curik N, Burda P, Vargova K, Pospisil V, Belickova M, Vlckova P, Savvulidi F, Necas E, Hajkova H, Haskovec C, Cermak J, Krivjanska M, Trneny M, Laslo P, Jonasova A, Stopka T. 5-Azacitidine in aggressive myelodysplastic syndromes regulates chromatin structure at PU.1 gene and cell differentiation capacity. *Leukemia* (2012): doi: 10.1038/leu.2012.47. [Epub ahead of print] **IF = 8,99**

Nikola Čuřík, Pavel Burda, Karin Vargová, Vít Pospíšil, Mária Krivjanská, Marek Trněný, Anna Jonášová a Tomáš Stopka. Nové technologie v medicíně pomáhají pacientům s MDS. *Medical Tribune VIII* (2012): číslo 6, 2. dubna 2012

Vargova K, **Curik N**, Burda P, Basova P, Kulvait V, Pospisil V, Savvulidi F, Kokavec J, Necas E, Berkova A, Obrtlíkova P, Karban J, Mraz M, Pospisilova S, Mayer J, Trneny M, Zavadil J, Stopka T. MYB transcriptionally regulates the miR-155 host gene in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **117** (2011): 3816-3825. **IF = 10,432**

Burda P, **Curik N**, Kokavec J, Basova P, Mikulenkova D, Skoultchi AI, Zavadil J and Stopka T. PU.1 activation relieves GATA-1-mediated repression of Cebpa and Cbfb during leukemia differentiation. *Mol. Cancer Res.* **7** (2009): 1693-1703. **IF = 4,533**

Tomáš Stopka, Karin Vargová, **Nikola Čuřík**, Pavel Burda, Jiří Zavadil, Marek Trněný. Pokročíme v terapii CLL? *Medical tribune.VII* (2011): číslo 3, sešit B, 21. února 2011

Souhrnný impakt faktor publikací autora: **23,955**

Přednášková činnost, prezentace autora

Poster (spoluautor) - Pavel Burda*, Nikola Curik*, Juraj Kokavec, Jiri Berger, Vit Pospisil, Arthur I. Skoultchi, Jiri Zavadil, Tomas Stopka; Targets of mutual antagonism of GATA-1 and PU.1 mediate bipotential leukemia differentiation; 8. Studentská vědecká konference, 1.LF UK, Praha 2007 (* These authors contributed equally to this work)

Přednáška (přednášející) – Čuřík Nikola, Burda Pavel, Kokavec Juraj, Skoultchi Arthur I., Zavadil Jiří, Stopka Tomáš; Antagonismus transkripčních faktorů GATA-1 a PU.1 reguluje diferenciační kapacitu leukemických buněk. XXI. Olomoucké hematologické dny, Česká hematologická společnost ČLS JEP, Olomouc 2007

Přednáška (přednášející) - Čuřík N, Vargová K, Podskočová J, Burda P, Savvulidi FG, Ujhelly O, Skoultchi AI, Zavadil J, Stopka T; Retroviral rescue with PU.1 induces derepression of both PU.1 and miR155 target genes – possible therapeutic implications for CLL. XXII Olomoucké hematologické dny, Česka hematologická společnost ČSL JEP, Olomouc 2008

Přednáška (přednášející) - Čuřík N, Vargová K, Podskočová J, Burda P, Savvulidi FG, Ujhelly O, Skoultchi AI, Zavadil J, Stopka T; Retroviral rescue with PU.1 induces derepression of both PU.1 and miR155 target genes – possible therapeutic implications for CLL. CENTRAL EUROPEAN MEETING ON MOUSE EPIGENETICS, Nové Hradky 2008

Přednáška (přednášející) - Nikola Curik, Pavel Burda, Karin Vargova, Petra Basova, Juraj Kokavec, Jiri Zavadil, Tomas Stopka; PU.1 and E-box proteins cooperate to regulate BIC gene encoding microRNA-155. XXIII. Olomoucké hematologické dny, Česká hematologická společnost ČSL JEP, Olomouc 2009

Přednáška (přednášející) - Čuřík N, Burda P, Kokavec J, Bašová P, Mikulenková D, Zavadil J, Stopka T; PU.1 Activation Relieves GATA-1-

Mediated Repression of Cebpa and Cbfb during Leukemia Differentiation. 2nd CENTRAL EUROPEAN MEETING ON MOUSE EPIGENETICS, Nové Hradky 2009

Poster (spoluautor) - Tomas Stopka, MD, PhD, Karin Vargova, Nikola Curik, Pavel Burda, Petra Basova, Vit Pospisil, Vojtech Kulvait, Filipp Savvulidi, Emanuel Necas, MD, PhD, Adela Berkova, MD, Petra Obrtlíkova, MD, Josef Karban, MD, Marek Trneny, MD, PhD and Jiri Zavadil, PhD. Active Chromatin Structure near MYB Occupancy at the Mir-155 Host Gene Promoter Coincides with Increased Mir-155 and MYB Levels In Chronic Lymphocytic Leukemia. The American Society of Hematology, Orlando 2010

Poster (spoluautor) – Kokavec J, Majumdar R, Kapalova M., Curik N., Savvulidi F., Necas E., Skoultschi A.I. and Stopka T. ISWI Chromatin Remodeling ATPase Smarca 5 (Snf2h) is required for murine erythroid development and globin gene regulation. The American Society of Hematology, Orlando 2010

Přednáška (přednášející) - Nikola Čuřík, Pavel Burda, Karin Vargová, Vít Pospíšil, Hana Hájková, Petra Bašová, Filipp Savvulidi, Emanuel Nečas, Monika Beličková, Cedrik Haškovec, Jaroslav Čermák, Marek Trněný, Anna Jonášová, and Tomáš Stopka; 5-azacytidine mediates *in vitro* differentiation in Myelodysplastic Syndrome. XXV. Olomoucké hematologické dny, Česká hematologická společnost ČSL JEP, Olomouc 2011

Poster (spoluautor) – Tomáš Stopka, Nikola Čuřík, Pavel Burda, Karin Vargová, Vít Pospíšil, Petra Vlčková, Filipp Savvulidi, Emanuel Nečas, Monika Beličková, Hana Hájková, Cedrik Haškovec, Jaroslav Čermák, Marek Trněný, Anna Jonášová. Activation of chromatin structure upstream PU.1 gene and *in vitro* differentiation in high risk Myelodysplastic Syndrome following 5-azacytidine. The American Society of Hematology, San Diego 2011

