

Univerzita Karlova v Praze

1. lékařská fakulta

Studijní program: Biomedicína

Studijní obor: Fyziologie a patofyziologie člověka



Mgr. Martina Dluhošová

Epigenetické regulační faktory CTCF a SMARCA5 kontrolují expresi hematopoetického transkripčního faktoru SPI1 v buňkách akutní myeloidní leukémie a myelodysplastického syndromu.

Epigenetic factors CTCF and SMARCA5 control expression of hematopoietic transcription factor SPI1 in cells of acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome

Dizertační práce

Školitel: Prof. MUDr. Tomáš Stopka, Ph.D.

Praha 2017

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze 15.3.2017 Martina Dluhošová

Podpis:

Identifikační záznam:

DLUHOŠOVÁ, Martina. *Epigenetické regulační faktory CTCF a SMARCA5 kontrolují expresi hematopoetického transkripčního faktoru SPI1 v buňkách akutní myeloidní leukémie a myelodysplastického syndromu [Epigenetic factors CTCF and SMARCA5 control expression of hematopoietic transcription factor SPI1 in cells of acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome]*. Praha 2015, 131 s., Dizertační práce (PhD), Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta, Ústav patologické fyziologie. Školitel: Prof. MUDr. Tomáš Stopka, Ph.D.

Poděkování:

Tímto bych chtěla velmi poděkovat svému vedoucímu dizertační práce a přednostovi Ústavu Biocev prof. MUDr. Tomášovi Stopkovi PhD. za jeho pomoc, konzultace, odborné vedení, trpělivost a veškerou podporu, kterou mi poskytl při tvorbě této dizertační práce. Dále bych mu ráda poděkovala za jeho nikdy neutuchající nadšení pro řešení otázek mé vědecké práce.

Dále bych ráda poděkovala všem kolegyním a kolegům především z naší laboratoře a též ústavu za pomoc a přátelské prostředí. Jmemovitě pak: Dr. Karině Vargové, Dr. Petře Bašové, Dr. Jarmile Vargové, Mgr. Heleně Paszekové, Dr. Nikolovi Čuříkovi, Dr. Pavlovi Burdovi, Dr. Vítovi Pospíšilovi, Mgr. Tomášovi Zikmundovi, Bc. Filippu Savvulidimu, Mgr. Vojtovi Kulvaitovi a Mgr. Haně Huškové. Ráda bych poděkovala přednostovi Ústavu patologické fyziologie 1.LF UK Doc. MUDr. Martinu Vokurkovi, CSc. a bývalému přednostovi Prof. MUDr. Emanuelovi Nečasovi, DrSc. za přátelské pracovní prostředí.

Mé velké poděkování patří mému manželovi Michalovi Dluhošovi a rodině, která mi byla při studiu velkou oporou. Děkuji jim za pochopení, trpělivost, povzbuzení a především důvěru. Svým rodičům děkuji za jejich podporu v celém mém dosavadním životě.

OBSAH

PROHLÁŠENÍ:	2
IDENTIFIKAČNÍ ZÁZNAM:	3
PODĚKOVÁNÍ:	4
OBSAH	5
SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	9
ABSTRAKT	12
ABSTRACT	13
1. VŠEOBECNÝ ÚVOD	14
Myelodysplastický syndrom	14
Myelodysplastický syndrom	14
Metylace DNA	18
Hypometylační terapie MDS	20
Hematopoetický faktor SPI1	22
Struktura SPI1	22
Regulace genové exprese SPI1	23
Úloha transkripčního faktoru SPI1 v krvine tvorbě	26
Úloha SPI1 při vzniku leukémie	27
Transkripční faktor CTCF	29
Vazba CTCF na DNA	29
Regulace vazby CTCF na DNA	30

Aktivity CTCF	32
Úloha CTCF přivzniku leukémie	36
Chromatin remodelační faktor SMARCA5	38
Struktura SMARCA5	39
Regulace vazby SMARCA5 na chromatin	40
Aktivity SMARCA5	42
Úloha SMARCA5 při krvetvorbě a při vzniku leukémie	46
2. HYPOTÉZA A CÍLE DIZERTAČNÍ PRÁCE	49
Podklady pro zformulování hypotézy	49
Hypotéza	51
3. MATERIÁL A METODY	53
Materiál	53
DNA plasmidy	53
Bakteriální kmeny	58
Buněčné linie	59
Vzorky pacientů s MDS/AML a kontroly	60
Primery a hydrolizační sondy	61
Protilátky	68
Metody	73
Pracovní postup při nakládání s modelovými buněčnými liniemi a se vzorky pacientů s MDS, AML a zdravých jedinců.	73
Transientní transfekce	74

Izolace RNA a přepis do cDNA	77
Kvantitativní PCR v reálném čase (RT-qPCR) a vyhodnocení mRNA exprese	78
Přenos proteinu a inkubace s protilátkou (Western Blott)	79
Ko-imunoprecipitace	80
Chromatinová imunoprecipitace (ChIP)	81
Stanovení luciferázové aktivity (exprese reportérového genu)	82
Analýza metylace DNA	83
Imunofluoresceční mikroskopie	85
4. VÝSLEDKY	86
4.1 Vazba Ctcf do oblasti ICR je v leukemických buňkách řízena chromatin remodelačním faktorem Smarca5.	86
4.2 SMARCA5 funkčně spolupracuje se CTCF	91
4.3 Smarca5 reguluje transkripci cílových genů Ctcf	93
4.4 CTCF a SMARCA5 se vážou na další cíl CTCF: gen <i>SPI1</i>	96
4.5 Členové kohezinového komplexu se vážou na gen <i>SPI1</i> společně se CTCF a SMARCA5	100
4.6 V buňkách AML je vazebné místo CTCF a SMARCA5 na genu <i>SPI1</i> metylováno a AZA způsobuje jeho demetylaci	103
4.7 Manipulování hladiny CTCF nebo SMARCA5 ovlivňuje transkripci genu <i>SPI1</i>	107
4.8 Doplnující výsledkové obrázky	109
5. DISKUZE	116
6. SHRNUTÍ ZÁVĚRŮ DIZERTAČNÍ PRÁCE	125
7. ODKAZY	128

SEZNAM PUBLIKACÍ AUTORA	145
PŘÍLOHY	146

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ACF	ATP-utilising chromatin remodeling and assembly factor
AML	Akutní myeloidní leukémie
AZA	5-azacytidin
CML	Chronická myeloidní leukémie
CMML	Chronická myelomonocytární leukémie
CR	Kompletní odpověď (remise)
CRI	Kompletní odpověď (ne ve všech parametrech)
CTCF	CCCTC-vazebný faktor
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DEC	5-aza-2'-deoxycytidin
DOX	Doxycyklin
DMR	Rozdílně metylovaná oblast (Differentially methylated region)
FBS	Fetální hovězí sérum (Fetal Bovine Serum)
G-CSF	Faktor stimulující růst granulocytárních kolonií
GFP	Zelený fluorescenční protein
GM-CSF	Faktor stimulující růst gran. a makr. kolonií
H2A	Histon 2A
H2B	Histon 2B
H3	Histon 3
H4	Histon 4
HDAC	Histonová deacetyláza
HI	Hematologické zlepšení

ChIP	Chromatinová imunoprecipitace
CHRAC	Chromatin remodeling and assembly complex
ICR	Kontrolní oblast imprintingu (Imprinting Control Region)
Igf2	Inzulínu podobný růstový faktor 2
IPSS	Mezinárodní bodovací systém prognózy (MDS)
ISWI	Imitation SWI/SNF
FAB	Francouzsko- Americko- Britská klasifikace AML
LacZ	Beta-galaktosidáza
M-CSF	Faktor stimulující růst makrofágových kolonií
MDS	Myelodysplastický syndrom
MEL	Myší erytroleukemická buněčná linie
PBS	Fosfátový pufr (Phosphate buffered saline)
PCR	Polymerázová řetězová reakce (Polymerase chain reaction)
pCTCF	Expresní vektor cDNA Ctcf
PD	Vývoj nemoci
PR	Částečná odpověď (remise)
NHEJ	Nehomologické spojování konců
NoRC	Nucleolar remodeling complex
RAEB	Refrakterní anémie s nadbytkem blastů
RARS	Refrakterní anémie s prstenčitými sideroblasty
RARS-t	Refrakterní anémie s prstenčitými sideroblasty a trombocytózou
RCMD	Refrakterní cytopenie s multilineární dysplazií

RSF	Remodeling and spacing factor
RT-qPCR	Kvantitativní polymerázová řetězová reakce v reálném čase (Reverse transcription quantitative polymerase chain reaction)
SE	Standardní chyba (Standard error)
SFFV	Virus myši leukémie Friendové (Spleen focus forming virus)
Spi-1	Spleen focus forming virus proviral integration oncogene (<i>Mus musculus</i>)
shRNA	krátká vlásenková RNA (Short hairpin RNA)
siRNA	krátká interferující RNA (Small interfering RNA)
SMARCA5	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 5
SPI1	Spleen focus forming virus proviral integration oncogene (<i>Homo sapiens</i>)
URE	Upstream Regulatory Element (5' regulační oblast)
WHO	Světová zdravotnická organizace (World health organisation)
WICH	WSTF–ISWI chromatin remodeling complex
WSTF	William syndrome transcription factor
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-galaktopyranosid

ABSTRAKT

CCCTC-vázající faktor (CTCF) má schopnost aktivovat a tlumit transkripci genů mechanismem vytváření chromatinových smyček, jež spojují regulační oblasti s promotory, na nichž je zahájena transkripce RNA. Metylace DNA představuje modifikaci cytosinových nukleotidů, jež má regulační vlastnosti a je vytvářena jaderným enzymatickým aparátem. Regulační role CTCF tkví ve vazbě na nemetylovanou DNA a interakci s dalšími bílkovinami kohezinového komplexu vedoucí k ovlivnění transkripce sousedících genů; například genů pro *H19* a *Igf2*. Role CTCF v krvetvorbě je předpokládána a řada prací ukazuje i na význam CTCF pro vznik leukemické transformace a nadměrné produkci klonálních myeloblastů, avšak přesný mechanismus těchto procesů není znám. Imprinting je epigenetický mechanismus pro regulaci transkripce skrze metylaci DNA a CTCF, jež je využívána při maternálním a paternálním přenosu genetické informace do zygoty. Mezi molekulární mechanismy CTCF patří takzvaný blokující efekt, kterým CTCF odstraní vliv regulační zesilovací („enhancerové“) sekvence na funkci promotoru. V naší výzkumné práci jsme si položili otázky vedoucí ke zjištění role CTCF v krvetvorbě.

Výsledky mé práce potvrzují, že se CTCF váže do kontrolní oblasti pro geny *H19* a *Igf2*. V mé práci jsme identifikovali nového vazebného partnera pro CTCF, kterým je chromatin remodelační faktor z rodiny ISWI ATPáz Smarca5, který taktéž interaguje s kohezinovým komplexem a umožňuje vazbu CTCF na jeho vazebná místa na DNA. Navíc Smarca5 funkčně podporuje Ctf a je nezbytný pro jeho enhancer-blokující aktivitu v kontrolní oblasti *H19/Igf2*. Dále jsme identifikovali nový CTCF-regulovaný lokus v oblasti klíčového hematopoetického regulátoru *SPI1* (PU.1) a prokázali, že v normálně diferencujících myeloidních buňkách jsou CTCF a SMARCA5 společně s členy kohezinového komplexu vázány na enhancer pro gen *SPI1*. Vazba k *SPI1* je závislá na metylaci DNA a v myeloblastech je znemožněna hypermetylací, jež je reverzibilní po působení DNA demetylačního činidla Azacytidinu.

ABSTRACT

CCCTC-binding factor (CTCF) can both activate as well as inhibit transcription by forming chromatin loops between regulatory regions and promoters. In this regard, Ctf binding on the non-methylated DNA and its interaction with the Cohesin complex results in differential regulation of the *H19/Igf2* locus. Similarly, a role for CTCF has been established in normal hematopoietic development; however its involvement, despite mutations in CTCF and Cohesin complex were identified in leukemia, remains elusive. CTCF regulates transcription dependently on DNA methylation status and can if bound block interactions of enhancers and promoters.

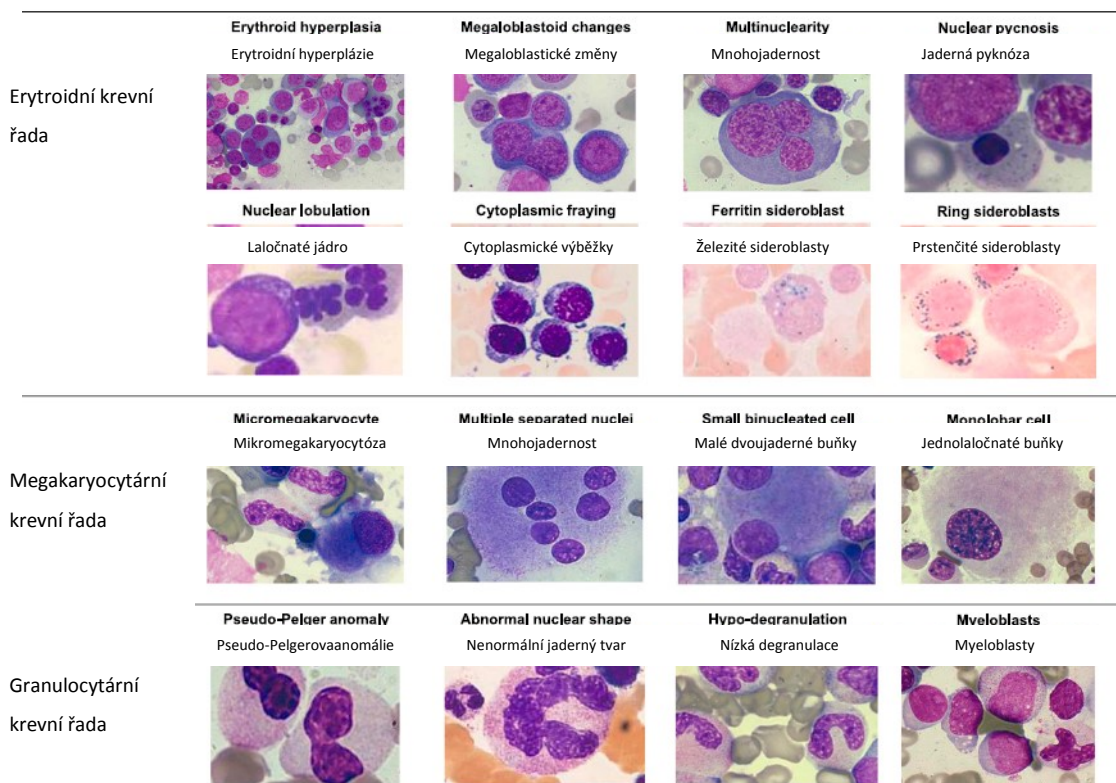
Here, we show that in hematopoietic cells CTCF binds to the imprinting control region of *H19/Igf2* and found that chromatin remodeller Smarca5, which also associates with the Cohesin complex, facilitates Ctf binding and regulatory effects. Furthermore, Smarca5 supports CTCF functionally and is needed for enhancer-blocking effect at imprinting control region. We identified new CTCF-recognized locus near hematopoietic regulator SPI1 (PU.1) in normally differentiating myeloid cells together with members of the Cohesin complex. Due to DNA methylation, CTCF binding to the *SPI1* gene is reduced in AML blasts and this effect was reversible by DNA methylation inhibitor 5-azacitidine.

1. VŠEOBECNÝ ÚVOD

Myelodysplastický syndrom

Myelodysplastický syndrom

Myelodysplastický syndrom (MDS) je klonální onemocnění pluripotentní kmenové buňky vedoucí k poruše krve tvorby a následně ke vzniku akutní myeloidní leukémie (AML) s potenciálně heterogenními molekulárními mechanismy patogeneze a značně variabilním klinickým projevem a prognózou. Společným rysem pro MDS je neefektivní krev tvorba a cytomorfologická dysplázie krev tvorných buněk (Obrázek 1). Nezralé krev ní prekursorové buňky, které mají narušené vyzrávání, se hromadí v kostní dřeni. Zatímco v periferní krvi je pozorována cytopenie jedné či více krev tvorných řad, zpravidla jde o erytrocyty, granulocyty a krev ní destičky, nebo je pozorována přítomnost nezralých a nefunkčních buněk. Prohlubování patologických projevů myelodysplastických buněk vede ve třetině případů k přechodu do AML, jež zpravidla nereaguje na léčbu a vede k úmrtí do několika měsíců života. 40-65 % případů MDS přechází do dřeňové aplázie a postižený umírá na cytopenie vedoucí k závažným infektům, transfúzní dependenci a krvácivým stavům (Silverman, 2001).



Obrázek1: Reprezentativní příklady cytomorfologických abnormalit myelodysplázie. Barvení May-Grünwald Giemsa, pro prstenčité sideroblasty použito Perlsovo barvení. Horní panel představuje změny v erytroidní linii s mnohojaderností, jadernou pyknózou, zneokrouhlením a ukládáním železa do mitochondrií. Střední panel představuje dysplázie destičkové řady s unilobulárními a hyperlobulárními megakaryocyty či atypii jádra. Dolní panel představuje poruchy granulocytární řady s pseudopelgeroidními formacemi, hypogranularitou a akumulací myeloblastů, blíže viz popisky u obrázků. Zvětšení 200x-1000x. Převzato a upraveno od (Cazzola et al., 2013).

V roce 1982 byl vytvořen klasifikační systém FAB (francouzsko-americko-britský), který rozčleňuje heterogenní skupinu chorob skrývajících se pod MDS do pěti specifických podtypů. Podtypy jsou definované na základě parametrů jako je buněčná morfologie, cytogenetický nálezný a kombinace „rizikových faktorů“ určující prognózu (Silverman, 2001). Nyní se častěji využívá klasifikační systém Světové zdravotní organizace (World Health Organization, WHO), který vznikl v roce 2001 a

jeho podoba byla revidována roku 2008 a též zcela recentně v roce 2016 (Arber et al., 2016). WHO klasifikace 2008, jež je jistě aktuálně nejpoužívanější, upřesňuje původní FAB systém o sledování specifických cytogenetických aberací představující delece dlouhých ramének chromozómu 5 (Harris et al., 1999). Srovnání klasifikace MDS systémem FAB a WHO 2008 je shrnuto v Tabulce 1.

FAB klasifikace	WHO klasifikace
Refrakterní anémie (RA) < 5% blastů	Refrakterní anémie (RA) Refrakterní cytopenie s multilineární dysplázií (RCMD) MDS- neklasifikovatelný (MDS-U) MDS s izolovanou del(5q)
Refrakterní anémie s prstenčitými sideroblasty (RARS) < 5 % blastů a > 15 % prstenčitých sideroblastů	Refrakterní anémie s prstenčitými sideroblasty (RARS) Refrakterní cytopenie s multilineární dysplázií a prstenčitými sideroblasty (RCMD-RS)
Refrakterní anémie s nadbytkem blastů (RAEB) 5-20 % blastů	Refrakterní anémie s nadbytkem blastů I (RAEB I) 5- 9 % blastů Refrakterní anémie s nadbytkem blastů II (RAEB II) 10- 19 % blastů
RAEB v transformaci (RAEB-t) 21 - 30 % blastů	Akutní myeloidní leukémie (AML) > 20 % blastů

Tabulka 1: Srovnání původní FAB klasifikace a současné WHO 2008 klasifikace myelodysplastického syndromu. Z FAB klasifikace byla odstraněna chronická myelomonocytární leukémie – CMML, jež je však vedena samostatně. Převzato a upraveno z časopisu Interní medicína pro praxi, <http://www.internimedicina.cz/pdfs/int/2005/02/02.pdf>.

Klasifikační systém WHO 2008 je rozšířen o Mezinárodní prognostický bodovací systém, jež byl revidován na základě nových poznatků v oblasti cytogenetiky (International Prognostic Scoring System-Revised IPSS-R), který rozděluje pacienty dle rizika prognózy onemocnění do 5 skupin. Skupina s velmi nízkým rizikem, nízkým rizikem, středním rizikem, vysokým rizikem a velmi vysokým rizikem rozlišuje pacienty podle mediánu celkového přežití a dobou progresu

onemocnění do AML. Riziko prognózy se vypočítává jako kombinace hodnot cytogenetického vyšetření aberací buněk kostní dřeně, procenta blastů v kostní dřeni, a rozsahu cytopenií: množství hemoglobinu, krevních destiček a neutrofilů v periferní krvi (Greenberg et al., 2012).

Nejen cytogenetické vyšetření ale též vyšetření sekvence DNA se uplatňuje při studiu patogeneze MDS. Během posledních 7 let celo-genomové sekvenování primárních vzorků MDS (vzorků získaných od pacientů) odhalilo desítky mutovaných genů (Bejar et al., 2011b) a další práce navazovaly (Cazzola et al., 2013; Garcia-Manero, 2014; Zhang et al., 2015). Rozeznané mutované geny modifikují mnoho esenciálních buněčných procesů, mimo jiné sestřih nově produkované RNA tzv. ‚splicing‘, odpověď na poškození DNA, některé signální dráhy a metylaci DNA a histonů, jež jsou řízeny transkripčními faktory a ostatní epigenetickými regulátory. Mezi mutované geny kódující spliceozom patří *SF3B1*, *SRSF2* a *U2AF1*. Mezi mutované geny kódující transkripční faktory patří *RUNX1*, *p53*, *CEBPA*, *WT1* a mezi geny kódující ostatní epigenetické regulátory patří *ASXL1*, *EZH2*, *DNMT3A*, *TET2*, *IDH1,2* a kohezinový komplex (Bejar et al., 2011a; Lindsley and Ebert, 2013; Taskesen et al., 2014; Zhang et al., 2015). Mezi identifikované mutované geny s frekvencí výskytu vyšší než 10% u pacientů s MDS patří geny *TET2*, *SF3B1*, *ASXL1*, *SRSF2*, *DNMT3A* a *RUNX1*. Jedná se zejména o geny, jež jsou zapojeny v procesu metylace DNA a modifikace histonových konců (Papaemmanuil et al., 2013).

Současně bylo ukázáno, že MDS a sekundární AML jsou na rozdíl od normálních hematopoetických progenitorů a *de novo* AML asociovány s rozsáhlými změnami v metylaci DNA (Figueroa et al., 2009). Vysoce metylované oblasti DNA vedou u MDS a AML k utlumení klíčových genů buněčné diferenciace a tumor supresorových genů (Bejar et al., 2011a). Rozsah abnormálně vysoké metylace v promotorových oblastech vykazuje vztah s některými charakteristikami onemocnění MDS a s pravděpodobností transformace do AML (Jiang et al., 2009).

Metylace DNA

Metylace DNA je důležitý epigenetický mechanismus ovlivňující genovou expresi během rozličných procesů, mezi které patří inaktivace chromozómu X, genový imprinting nebo buněčná diferenciace. K metylaci DNA dochází na uhlíku v páté pozici cytosinu především na sekvencích dinukleotidu CG, tzv. CpG ostrůvků (Bestor, 2000). Genomické rozmístění CpG ostrůvků není homogenní. CpG ostrůvky se nacházejí zejména v promotorových oblastech a dalších regulačních oblastech řídících transkripci, které mohou být i značně vzdálené od transkripčního počátku příslušného genu. U obratlovců, kam patří i lidé, je přibližně 80% všech CpG většinou metylovaných a tudíž je v každém buněčném dělení nutno tuto metylaci udržet a to vyžaduje značně funkční DNA metylační aparát ale i aparát DNA demetylační (odstraňující DNA metylaci). Metylace DNA je především represivní značkou chromatinu, svou přítomností na CG zasahuje do oblasti velkého žlábků DNA, čímž brání nasednutí transkripčních faktorů a RNA polymerázy II (Bird, 2002). Naopak nemetylovaná DNA je transkripčně spíše aktivní, vyskytuje se především v promotorových oblastech a umožňuje i nasednutí enzymům, které dále zvýrazňují přístupnost ke komplexu pro polymeraci RNA (Bird, 2011).

Metylaci DNA zajišťují DNA metyltransferázy DNMT1, DNMT3A a DNMT3B. Enzym *DNA metyl transferáza 1* DNMT1 udržuje metylační vzorec DNA během buněčného dělení, jež je nezbytný při tzv. genomickém imprintingu, inaktivaci chromozómu X a celkové stabilitě chromatinové struktury (Li et al., 1992; Yoder et al., 1997). DNA metyltransferázy DNMT3A a DNMT3B zprostředkovávají metylaci DNA *de novo*, která je klíčovým epigenetickým mechanismem řídící transkripci genů během buněčné diferenciace (Okano et al., 1999; Okano et al., 1998). Regulace transkripce během takových procesů představuje velmi důležitý parametr, jež umožňuje, aby se pozitivně regulovaly jen některé geny, zatímco jiné byly efektivně inhibovány. První krok při odstranění metylace (=demetylaci) DNA zajišťuje enzym *tet metylcytosindioxygenáza 2* (TET2), který metylovou skupinu na cytosinu hydroxyluje, vzniklý 5-hydroxymetylcytosin (5hmC) je následně dále oxidován za

účasti enzymů Krebsova cyklu: *Isocitrát dehydrogenázy 1 a 2* (IDH1/IDH2) (Cadet and Wagner, 2013).

Dynamika a proměnlivost metylačního profilu DNA je velmi důležitá během buněčné diferenciaci. U buněk v rozhodujícím okamžiku při výběru určité vývojové řady probíhá metylace promotorů netranskribovaných genů, které jsou specifické pro odlišnou vývojovou linii, a trvale inhibují jejich transkripci. Naopak geny, které jsou klíčové pro vybranou specifickou vývojovou linii, jsou udržovány nemetylované. Neodpovídající metylační profil DNA může být příčinou abnormálních transkripčních programů, které mohou vést k rozvoji malignit. Tíšení exprese genů vlivem DNA metylace probíhá několika mechanismy, které zahrnují deacetylaci včetně zapojení dalších represivních modifikací na úrovni přilehlých histonových proteinů (Kouzarides, 2002).

Methylace DNA může přímo interferovat s vazbou transkripčních faktorů na DNA. Mezi tyto metyl-DNA senzitivní transkripční faktory patří AP-2, c-Myc, NF-κB, E2F1, CREB a CTCF (Bell and Felsenfeld, 2000; Menafra and Stunnenberg, 2014). Dosud nejznámějším příkladem je vazba CTCF na kontrolní oblast imprintingu (Imprinted Control Region- ICR) v genovém lokusu genů *H19 a Igf2*. Metylovaná DNA ICR na paternální alele brání interakci transkripčního faktoru CTCF s jeho vazebným místem. Důsledkem toho je tlumení transkripce genu *H19* a současně probíhající stimulace transkripce genu *Igf2* (Bell and Felsenfeld, 2000).

Na druhé straně existují proteiny, které rozpoznávají a působí právě na metylované DNA. S metylovaným cytosinem v oblasti velkého žlábků DNA interagují transkripčně-represivní metyl CpG vazebné proteiny (methylCpG-binding proteins, MBP). Do této skupiny proteinů patří MeCP2, MBD1, MBD2 a MBD4, které v přítomnosti DNMT, specifických transkripčních faktorů a chromatin modifikujících enzymů tlumí genovou transkripci (Menafra and Stunnenberg, 2014; Spruijt et al., 2013). Například MeCP2 interaguje s transkripčním korepresorem Sin3A a histonovými deacetylázami (HDAC) a společně brání transkripčnímu faktoru SPI1 rozpoznat jeho vazebné místo a aktivovat transkripci (Rice et al., 2007).

Metylace DNA může ovlivňovat také umístění nukleozómů na vláknu DNA (Davey et al., 2003; Huff and Zilberman, 2014). Pozice nukleozómů rovněž zpětně ovlivňují nasednutí transkripčních faktorů na DNA a tímto je regulace transkripce komplexním jevem, který na jedné straně reguluje chromatinovou strukturu a na druhé straně je chromatinovou strukturou regulován. Centrální části nukleozómů se u řady obratlovců vyznačují nemetylovanou DNA, zatímco v místech spojovacího vlákna DNA mezi dvěma nukleozómy byla pozorována zvýšená aktivita DNA metyltransferáz (Huff and Zilberman, 2014).

Hypometylační terapie MDS

Vysoká úroveň metylace genomu pacientů s MDS a AML je důvodem aplikace hypometylační terapie. 5-azacytidin (AZA) je pod názvem Vidaza používanou hypometylační látkou v léčbě nádorů od roku 2004, přestože byl objeven mnohem dříve. AZA je analogem cytidinu, jehož atom uhlíku je v páté pozici pyrimidinového jádra nahrazen atomem dusíku. AZA byl poprvé syntetizován v Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR v Praze v roce 1964 (Sorm et al., 1964) a mechanismus jeho účinku ve smyslu proti-nádorové léčby je stále předmětem výzkumu. Terapie AZA se používá jako terapie první volby především u pacientů s MDS ve vyšším riziku přechodu do AML (Fenaux et al., 2009) a také u starších pacientů s AML (do 30% blastů) s dysplázií ve více buněčných liniích a to proto, že prodlužuje přežívání a navozuje u části pacientů kompletní remise (Fenaux et al., 2010). AZA se podává podkožně v dávce 75mg/kg 7 dní v 28 denních cyklech. Výsledky mezinárodní studie AZA-001 fáze III ukazují, že pacienti s MDS i AML léčení AZA dosahovali celkového přežití 24 měsíců, zatímco pacienti léčení konvenční léčbou jen 15-16 měsíců. Ze sledované skupiny 50% pacientů léčených AZA a 16-26% pacientů léčených konvenční terapií dosáhlo celkového přežití 24 měsíců (Fenaux et al., 2009; Fenaux et al., 2010). AZA významně zlepšuje kvalitu života a oddaluje progresi MDS do AML. Medián progresi MDS do AML byl u pacientů léčených AZA 17,8 měsíců, zatímco u pacientů léčených konvenční léčbou dosáhl 11,5 měsíců (Fenaux et al., 2009). Účinky AZA se v mnoha případech dostavují

s časovým odstupem, medián odpovědi na léčbu AZA jsou 2-3 měsíce (Silverman et al., 2011). Odpověď na terapii AZA byla pozorována u 51% pacientů, kteří v 17% reagovali kompletní remisí, 12% částečnou remisí a 21% zlepšením hematologických parametrů. Samotné hematologické zlepšení je na rozdíl od případů reagujících kompletní nebo částečnou remisí spojováno s lepším přežíváním pacientů (Gore et al., 2013). Naopak selhání léčby AZA je doprovázeno zhoršením prognózy. Neúspěšná léčba MDS zkrátila medián doby celkového přežití na 5,6 měsíců a pravděpodobnost dožití dvou let byla 15%. Ještě horší prognózu po selhání léčby s AZA měli pacienti s AML. Medián doby celkového přežití těchto pacientů byl 3,4 měsíců a pravděpodobnost dožití jednoho roku byla 8% (Prebet et al., 2011).

Dosavadní poznatky ukazují, že 80% AZA se ve své fosforylované formě začleňuje do nově vznikající molekuly RNA. Zbýlých 20% se transformuje do decitabinu čili 5-aza-2'-deoxycytidinu (DEC), jehož fosforylovaná forma se začleňuje do nově vznikající molekuly DNA. DEC začleněný do vlákna DNA vytváří kovalentní vazbu s DNA metyltransferázami (DNMT), čímž inhibuje jejich aktivitu (Aimiwu et al., 2012). Navíc AZA a DEC působí specifickou a rychlou degradaci DNMT1 (Ghoshal et al., 2002).

Potlačení aktivity DNMT způsobuje globální a specifickou hypometylaci v buňkách MDS a AML (Curik et al., 2012; Stresemann et al., 2008). Porovnání CD34+ blastů pacienta s MDS a normálního jedince ukázalo 32 155 rozdílně metylovaných oblastí, z nichž většina oblastí (89%) byla vysoce metylovaná právě u MDS pacienta. Působení AZA změnilo metylaci na 15 531 místech DNA, z čehož 96% se projevilo poklesem metylace (Grovdal et al., 2013). Nejvyšší stupeň demethylace DNA byl pozorován v oblastech s nejvyšším výskytem metylace, mezi tyto sekvence DNA patří regulační oblasti genové transkripce a koncové části chromozómů (Klco et al., 2013).

AZA mění expresi 1 424 genů, ale pouze u 121 genů dochází ke změně exprese mRNA v souvislosti s demetylovanou promotorovou oblastí. Demethylace DNA může být spojena jak s aktivací (10,6% genů), tak s inhibicí přepisu DNA (8,3%

genů). Z jiného úhlu pohledu existují také AZA demetylované promotory genů, jejichž exprese se nemění (Grovdal et al., 2013).

AZA a jeho metabolit DEC je schopen specificky snížit metylaci a obnovit expresi genů zapojených v buněčné diferenciaci (*SPI1*, *GATA1*, *CEBPA*, *RUNX1*) a proliferaci (*C-MYC*, *MAX*), buněčném cyklu (*E2F1*, *CDKN1C*), apoptóze (*C-MYC*), buněčné signalizaci (*RARA*, *JAK2*, *PRKCA*, *PRKD2*, *CSF3R*, *SOCS3*), adhezi (*THBS1*, *CD44*, *SLIT2*, *SLIT3*, *ROBO*) a imunitní odpovědi (*LYZ*, *MPO*, *ELANE*) (Curik et al., 2012; Flotho et al., 2009; Tsai et al., 2012)

Hematopoetický faktor SPI1

Gen kódující hematopoetický transkripční faktor SPI1 (celým názvem: Spi-1 protoonkogen, též známý jako PU.1, SFPI1, u myši Spi-1, Sfpi1) se nachází na lidském chromozómu 11 v oblasti 11q22 (u myši na chromozómu 2) a tvoří ho pět exonů. Lidský protein SPI1 je tvořen 264 aminokyselinami. Myší protein má dvě transkripční varianty tvořené 266 anebo 272 aminokyselinami (Gupta et al., 2009). Delece pátého exonu *SPI1* kódujícího DNA vazebnou doménu v myším modelu vede k embryonální letalitě v 18,5 dnu embryonálního života. Další pozorování homozygotů s delecí *SPI1* odhalilo závažnou poruchu krvetvorby myeloidní a lymfoidní vývojové řady. Morfologické a funkční defekty nebo snížená produkce byly pozorovány u monocytů, granulocytů, T a B lymfocytů (Scott et al., 1994) a erytrocytů (Kim et al., 2004). Pro normální myeloidní diferenciaci je též nezbytná N koncová trans-aktivační doména, jejíž delece může vést k dediferenciaci myeloidních buněk (Klemsz and Maki, 1996).

Struktura SPI1

Transkripční faktor SPI1 patří do ETS rodiny transkripčních faktorů. U těchto faktorů se na C koncovém úseku nachází evolučně vysoce konzervovaná ETS doména vázající sekvence DNA se specifickým vazebným motivem GGA(A/T) (Graves and Petersen, 1998). Na N koncovém úseku se nachází trans-aktivační

doména tvořená třemi doménami s vysokým výskytem kyselých aminokyselin a jednou doménou glutaminu. Ve středu molekuly uložená PEST doména je bohatá na přítomnost prolinu, glutamátu, serinu a threoninu (Klemsz and Maki, 1996). Trans-aktivační a PEST doména se účastní interakce s ostatními regulačními proteiny, přítomnost SPI1 na DNA vazebných místech se tak stává signální molekulou pro vazbu dalších transkripčních faktorů a enzymů modifikujících DNA a histony (Yamamoto et al., 1999). Přítomnost interagujících proteinů pravděpodobně zvyšuje slabou trans-aktivační kapacitu domény SPI1 a přispívá tak k plnohodnotné funkci SPI1 (Tenen et al., 1997).

Regulace genové exprese SPI1

Genová exprese SPI1 je řízena jen částečně z oblasti vlastního promotoru a dále z několika vzdálených regulačních oblastí skrze vazbu transkripčních faktorů, modelování složitějších struktur chromatinu a také na post-transkripční úrovni. Přesná regulace exprese SPI1 je kritická pro jasné rozlišení buněčné hladiny proteinu SPI1, jejíž úroveň hraje důležitou roli v rozhodování buněčného osudu v průběhu vývoje krevních buněk a to tak, že rozličné dávky PU.1 proteinu rozhodují o tom, jaký typ maturované myeloidní buňky vznikne (Dahl and Simon, 2003).

Promotor genu *Spi-1* (u myši 290 bp, u člověka velikosti 334 bp) obsahuje dvě oblasti s konzervovanými vazebnými místy pro sebe sama (protein Spi-1) a další transkripční faktory Oct, Sp1, Cebp α . Význam vazebných míst a přítomnost transkripčních faktorů dokládají experimenty s využitím mutací vazebných sekvencí. Vazebná místa pro Spi-1 jsou součástí autoregulační pozitivní smyčky exprese Spi-1, která je za účasti dalšího kofaktoru, Sp1, zcela zásadní pro vývoj myeloidních buněk (Chen et al., 1995). Spi1 je důležitý též pro vývoj lymfocytů. V B lymfocytech je pro účinnou expresi Spi-1 důležitá přítomnost Oct-1 a jeho liniově specifického koaktivátoru OBF-1/Bob1/OCA-B (Chen et al., 1996). Vazba Cebp α se podílí na zvyšování exprese Spi-1 především granulocyto-monocytových progenitorových buněk a tím podporuje vývoj myeloidních buněk a současně brání vývoji B lymfocytů

(Kummalue and Friedman, 2003). Zásadní aktivita promotoru *Spi-1* je ale spíše ovlivňována vzdálenými regulačními oblastmi.

Do této doby nejvýznamnější známou vzdálenou regulační oblastí genu kódujícího *SPI1* je 5' regulační oblast URE (Upstream Regulatory Element). Tato regulační oblast se nachází u myši v pozici -14 kb a u člověka v pozici -17,3 kb ve směru 5' od transkripčního startu *Spi-1/SPI1* (Li et al., 2001). Oblast URE umožňuje interakci RNA polymerázy II s promotorem *SPI1* (Hoogenkamp et al., 2007) a reguluje zhruba 80% celkové exprese genu *SPI1* (Rosenbauer et al., 2004). Oblast URE se skládá ze dvou vysoce konzervovaných částí, proximální (3' pozice) a distální (5' pozice). Proximální (236 bp) a distální (296 bp) část odděluje spíše nekonzervovaná 540 bp sekvence, ve které se nachází integrační místo myšího leukemického retroviru Friendové (Spleen focus forming virus, SFFV) (Bonadies et al., 2010; Okuno et al., 2005), jež má roli při rozvoji myší erytroleukémie.

V konzervovaných oblastech URE se nachází vazebná místa pro řadu klíčových transkripčních faktorů: Elf-1, FLI-1, Cebp α , Runx-1/AML1, Nf- κ b, Tcf a opět sebe sama (*SPI1*) (Bonadies et al., 2010; Hoogenkamp et al., 2007; Okuno et al., 2005; Yeaman et al., 2007). Kombinace vázajících se transkripčních faktorů do oblasti URE je liniově specifická, tedy jiný vzorec vázajících faktorů na URE je zjištěn u myeloidních buněk a jiný v B lymfocytech (Hoogenkamp et al., 2007). Vazba Cebp α v proximální URE je vysoce důležitá pro myeloidní vývoj a indukuje vývoj monocytární řady (Hoogenkamp et al., 2007). Vazba AML1 (*RUNX1*) na proximální URE reguluje 80% exprese *SPI1* a je důležitá především v prekurzorových buňkách pro iniciaci exprese, zatímco v diferencovaných elementech je faktor AML1 nežádoucí. S postupným vyžíváním buněk proto vazba AML1 klesá (Huang et al., 2008). V proximální URE se nachází i vazebné místo pro *SPI1*, které má rovněž autoregulační pozitivní vliv na svoji vlastní expresi (Okuno et al., 2005). Přítomnost *SPI1* na URE je klíčová pro modelování chromatinové smyčky spojující oblast URE a promotoru genu *SPI1* v kmenových krevních buňkách a progenitorových buňkách ne však už ve zralých makrofázích (Staber et al., 2013).

Expresi Spi-1 v myši řídí elementy lokalizované na úsecích (či elementech) v pozicích -12, -10, -9, -8 kb před transkripčním počátkem genu *Spi-1* (Leddin et al., 2011). Tyto elementy jsou charakteristické svou lokalizací na místech, které vykazovaly citlivost k DNAze 1 a vazbou proteinu Spi-1. Pro elementy -12, -10 kb je navíc společná vazba histonové acetyltransferázy p300, jejíž přítomnost je typická pro aktivní oblasti enhancerů (enhancer je krátká sekvence DNA, která váže transkripční faktory a zesiluje expresi cílových genů na dlouhé vzdálenosti bez ohledu na jejich orientaci cis nebo trans). Ze jmenovaných elementů má nejvýraznější vliv na expresi Spi-1 enhancer -12 kb. Spolupráce oblasti URE s enhancerem -12 kb je nezbytná pro vývoj myeloidních buněk vyžadující zvýšenou expresi Spi-1. Liniově specifickou vazbu Spi-1 na enhancer -12 kb a následné otevření chromatinu, jejíž známkou je H3K9ac, řídí přítomnost Cebpa v oblasti URE (Leddin et al., 2011).

Vazbu transkripčních faktorů regulující expresi lidského genu pro SPI1 ovlivňují epigenetické změny chromatinu zahrnující metylaci DNA a modifikace histonových konců. V prvním exonu genu *SPI1* byla pozorována korelace mezi zvyšující se úrovní metylace DNA a stupněm vyzrání u T lymfocytů, při kterém exprese SPI1 klesá (Amaravadi and Klemsz, 1999). U buněčné linie z MDS transformované do AML-M6 (OCI-M2), jež se projevuje nízkou hladinou SPI1, byla v oblasti URE pozorována vysoká úroveň metylace DNA, která pravděpodobně brání nasednutí proteinu SPI1 a AML1 a jejich následné (auto)stimulaci exprese SPI1 (Curik et al., 2012). V normálně diferencujících buňkách byla v oblasti URE zjištěna acetylace lysinu K9 a trimetylace lysinu K4 histonu H3, které jsou známkami transkripčně aktivního chromatinu a buněčné specifity (Hoogenkamp et al., 2007).

Exprese SPI1 je regulována také peri-transkripčními a post-transkripčními mechanismy. Příkladem je nekódující anti-sense transkript RNA, jehož transkripční počátek se nachází ve třetím intronu genu *SPI1*. Syntéza této molekuly je řízena rovněž oblastí URE. Anti-sense transkript RNA brání translaci mRNA kódující protein SPI1 (Ebralidze et al., 2008). Dalším příkladem je narušení translace SPI1 specifickou

vazbou a inhibicí od mikroRNA-155 na 3'koncový nepřekládaný úsek mRNA traskriptu kódující protein SPI1 (Vargova et al., 2011; Vigorito et al., 2007).

Úloha transkripčního faktoru SPI1 v krvetvorbě

Úloha SPI1 v diferenciaci krevních buněk je přísně závislá na jeho buněčné koncentraci. Syntéza proteinu SPI1 je zahájena v krvetvorných kmenových buňkách a jeho syntéza podobně jako v multipotentních progenitorech, společných myeloidních progenitorech, společných lymfocytárních progenitorech a granulocytárně-makrofágových progenitorech dosahuje vyšších hladin. Vyšší hladina SPI1 v těchto buňkách je klíčová pravděpodobně pro jejich diferenciací aktivitu (Akashi et al., 2000; Nutt et al., 2005). Produkce SPI1 se dále zvyšuje u progenitorových buněk, jejichž diferenciací směřuje do monocytární a makrofágové vývojové řady (Laslo et al., 2006). Střední hladina SPI1 zůstává v buňkách diferencujících do granulocytární vývojové řady (Dahl and Simon, 2003; DeKoter et al., 2007). O směru vývoje monocytárně-granulocytárních progenitorů rozhoduje regulační vztah mezi hladinami SPI1 a CEBP α . Vysoká hladina CEBP α stimuluje expresi GFI-1, jež inhibuje transkripci *SPI1* a tím zajišťuje zahájení granulocytárního transkripčního programu (Dahl et al., 2007; Laslo et al., 2008).

Nižší hladina SPI1 aktivuje diferenciací B lymfocytů a v průběhu zrání B lymfocytů dále klesá (Back et al., 2005; DeKoter et al., 2007). V buňkách diferencujících do T lymfocytů je ve stádiu DN3 syntéza Spi-1 silně potlačována a ve zralých Th2 a CD8 lymfocytech je zcela vypnuta (Anderson et al., 2002; Gerlach et al., 2014). Naopak konečné vyžívání specifické skupiny Th9 pomocných lymfocytů produkujících IL-9 vyžaduje zvýšenou hladinu proteinu Spi-1 (Gerlach et al., 2014). Tlumení exprese Spi-1 v lymfoidních buňkách probíhá také pod vlivem vazby proteinu Runx1 do oblasti silenceru (= sekvence snižující genovou transkripci) lokalizované mezi genovým promotorem *Spi-1* a oblastí URE (Zarnegar et al., 2010).

Zvýšená hladina SPI1 v progenitorových buňkách klesá v průběhu diferenciací erytroidně-megakaryocytární vývojové řady (Nutt et al., 2005). Protein SPI1 se účastní vyžívání erytrocytů až do stádia erytroblastu, kde tlumí erytroidní

transkripční program (Hromas et al., 1993; Moreau-Gachelin et al., 1996). Toto tlumení způsobuje SPI1 svou interakcí s transkripčním faktorem GATA-1 na jeho cílových genech, kde působí vznik represivní chromatinové struktury (Stopka et al., 2005; Zhang et al., 2000). Naopak zahájení erytroidní diferenciacce nastává mechanismem, kdy GATA-1 blokuje interakci SPI1 s dalšími transkripčními faktory, které zvyšují transaktivační kapacitu SPI1 a dochází tak k negativní autoregulaci transkripce *SPI1* (Zhang et al., 1999).

Z předchozího textu vyplývá, že SPI1 je klíčový transkripční protein v řízení buněčného vývoje většiny krevních buněk. Jeho přísně kontrolovaná buněčná koncentrace je nezbytná pro fyziologické vyžívání makrofágů, granulocytů a B-lymfocytů. SPI1 přispívá též ke vzniku T lymfocytů a erytrocytů, ale relativně záhy musí být jeho vliv umlčen, aby diferenciacce mohla proběhnout.

Úloha SPI1 při vzniku leukémie

SPI1 působí jako nádorově supresorový gen. Abnormální hladiny SPI1 způsobují vznik nádorových onemocnění lidské a myší krvetvorby a to tak, že nedosahují hladin potřebných pro vznik diferencovaných elementů. Kondičální delece genu *SPI1* u dospělého myšího jedince není letální, ale vede ke vzniku myeloproliferativního stavu (Metcalf et al., 2006). Podobně homozygotní delece oblasti URE u myši způsobuje snížení exprese SPI1 o 80% (tedy asi na 20%) a vznik AML (Rosenbauer et al., 2004), v některých případech též vznik T-buněčného lymfomu a B-lymfoproliferativního syndromu (Rosenbauer et al., 2006). Pokles exprese SPI1 o 50% u myši s heterozygotní delecí oblasti URE se ale projevuje normálním fenotypem (Rosenbauer et al., 2004). Také myší myeloidní leukémie indukovaná radiačním zářením vzniká pod vlivem delece *SPI1* na jedné alele, která je u 87% případů doprovázena bodovou mutací genu SPI1 na druhé alele (Cook et al., 2004).

Mutace lidského genu kódujícího *SPI1* se vyskytují velmi vzácně. Několik nezávislých studií testovalo celkem 628 vzorků lidské AML (Cook et al., 2004). Jediná

studie se 129 lidskými vzorky AML odhalila 9 případů (7% incidence) mutovaného genu *SPI1*, z čehož u 7 případů se zachovala jedna zdravá alela. Mutace byly zjištěny v oblasti kódující DNA vazebnou, trans-aktivační a PEST doménou. Tyto mutace vedou k narušení funkce SPI1 při vazbě na DNA a při interakci s dalšími proteiny a koaktivátory na cílových genech SPI1 (Mueller et al., 2002).

V oblasti URE byly pozorovány jednonukleotidové polymorfismy, které narušují vazbu aktivátorů exprese SPI1. Bodová mutace postihuje vazebné místo pro transkripční faktor NF- κ B (Bonadies et al., 2010). Další bodová mutace brání nasednutí chromatin remodelujícího regulátoru SATB1, který se účastní vytváření chromatinových smyček, a jeho ztráta v oblasti URE je u člověka spojována s agresivní formou AML (Steidl et al., 2007).

Výrazně snížená hladina SPI1 byla zjištěna v buňkách promyelocytární leukémie s translokací t(15;17) (Mueller et al., 2002) a v primárních buňkách pacientů s AML s translokací t(8;21) (Vangala et al., 2003).

U myši byla zjištěna integrace DNA viru SFFV do oblasti URE, která způsobuje neregulovanou stálou expresi středně nízké hladiny SPI1. Ta vede k zablokování erytroidní diferenciace (mechanismem inhibice transkripčního faktoru GATA-1) ve stádiu proerytoblastu a vzniku myši erytroleukémie (MEL) (Moreau-Gachelin et al., 1988).

Nenormální hladina SPI1 může vznikat také vlivem nepřiměřeně metylované DNA. U buněčné MDS linie a pacientů s MDS s vysokým rizikem transformace do AML je nízká hladina SPI1 spojována s vysoce metylovanou oblastí URE. Na modelové buněčné linii MDS byl ukázán vliv hypometylační látky AZA v oblasti URE. AZA demetyluje DNA v oblasti URE a zvyšuje v této oblasti výskyt aktivních chromatinových značek H3K4Me3 a H3K9Ac. Terapie AZA znovu obnovuje tlumenou expresi SPI1 a jeho cílových genů (*EGR-2*, *FOS*, *CSF1R*, *CSF3R*, *CEBP α* , *MPO*) a navozuje diferenciaci progenitorových buněk. Současné použití růstových faktorů stimulující růst granulocytárních a makrofágových kolonií (GM-CSF), makrofágových

kolonií (M-CSF) a granulocytárních kolonií (G-CSF) zvyšují myeloidní prodiferenční efekt AZA (Curik et al., 2012).

Transkripční faktor CTCF

Gen kódující transkripční faktor CTCF (CCCTC-vazající faktor, také znám jako MRD21) se nachází na lidském chromozómu 16 v oblasti 16q21-q22.3 (na myším chromozómu 8) a tvoří ho 12 exonů. Genetický kód CTCF je podkladem pro dvě lidské izoformy proteinu CTCF. První izoforma proteinu CTCF je tvořena 727 aminokyselinami, druhá izoforma proteinu CTCF je tvořena 399 aminokyselinami. Myší protein CTCF je tvořen 736 aminokyselinami. Transkripční faktor CTCF je evolučně vysoce konzervovaný. Ptačí a savčí protein CTCF obsahuje 93% identických aminokyselin. CTCF je členem rodiny transkripčních faktorů, které jsou charakteristické svou vazebnou doménou se strukturním motivem zinkového prstu (Filippova et al., 1996), a je přítomen v řadě lidských tkáních a nádorových liniích (Filippova et al., 1998).

Vazba CTCF na DNA

Vazebná doména proteinu CTCF je tvořena 11 oblastmi zinkových prstů, které jsou vysoce konzervované (obsah aminokyselin vazebné domény dosahuje mezi ptáky a savci téměř 100% shody). Vazebná doména CTCF je schopná zapojit různé kombinace zinkových prstů při interakci ať už s cílovou sekvencí DNA nebo jinými proteiny (Filippova et al., 1996). Vzhledem k této vlastnosti je CTCF popisován jako mnoho-vazebný transkripční faktor.

Proměnlivá kombinace zinkových prstů účastnící se vazby umožňuje interakci CTCF s různými cílovými sekvencemi DNA. Ve více jak 20 různých buněčných typech lidského a myšího genomu byl CTCF zjištěn na přibližně 55 000 odlišných vazebných místech (Chen et al., 2012). Přibližně 5000 těchto míst je konzervováno napříč savci

a různými tkáněmi, zatímco 30-60% vazebných míst pro CTCF je specifických pro určitý buněčný typ (Barski et al., 2007; Chen et al., 2008; Kim et al., 2007). Variabilita polohy vazebných míst CTCF odpovídá variabilitě funkcí, které CTCF zastává. Přibližně 50% vazebných míst CTCF bylo pozorováno v intergenových oblastech, 15% bylo lokalizováno v blízkosti promotorů a 40% v intragenových oblastech (uvnitř exonů a intronů) (Chen et al., 2012; Chen et al., 2008). U obratlovců je CTCF jediným známým transkripčním faktorem, který se váže na oblasti nazývané insulátor (Felsenfeld et al., 2004). Insulátory jsou sekvence DNA s vyšším výskytem hypersenzitivních míst k DNáze I, které se vyznačují schopností chránit geny před nevhodnými signály (West et al., 2002). Dále byla přítomnost CTCF pozorována v místech enhancerů, což je v souvislosti s hlavní úlohou CTCF představující blokování komunikace enhanceru s promotorem relativně překvapivé (DeMare et al., 2013).

Regulace vazby CTCF na DNA

Metylace DNA

Počítačové a biochemické analýzy odhalily, že pro vazbu CTCF je klíčová 20 bp dlouhá sekvence DNA bohatá na cytosinové a guanosinové báze (Kim et al., 2007). Další studium mechanismu vazby CTCF na DNA ukázalo, že dinukleotid CG, který má metylovaný cytosin v pozici pátého uhlíku, brání interakci CTCF s řetězcem DNA (Bell and Felsenfeld, 2000; Filippova et al., 2001; Hark et al., 2000; Kanduri et al., 2000). Methylace DNA tím ovlivňuje přítomnost CTCF na DNA na mnoha genech, mezi které patří např. *CDKN2A* kódující *INK4A* a *ARF* (Rodriguez et al., 2010), *BCL6* (Lai et al., 2010) a genový lokus *H19/Igf2* (Bell and Felsenfeld, 2000; Hark et al., 2000). Bisulfitové sekvenování 19 druhů lidských buněk, z čehož 12 druhů představovalo normální primární buňky a 7 druhů nádorové linie, ukázalo, že přítomnost CTCF na DNA je specifická pro daný buněčný druh a tato místa ve 41% souvisí s diferenciální metylací DNA (Wang et al., 2012). Z tohoto pozorování vyplývá, že kromě metylace DNA existuje ještě další mechanismus, který reguluje

vazbu CTCF na DNA. Zároveň byly pozorovány velké rozdíly v rozmístění vazby CTCF na DNA mezi normálními a nádorovými buňkami. U nádorových buněk byla vazba CTCF narušena v souvislosti se zvýšenou metylací DNA (Wang et al., 2012).

DNA společně s histony tvoří nukleozóm

Interakce CTCF s vláknem DNA je úzce spjata se sekundární strukturou chromatinu. CTCF se váže pouze do spojovacích oblastí DNA mezi dvěma nukleozómy, pozice nukleozómů obklopující CTCF je pravidelná a přesně definovaná sekvencí DNA (Filippova et al., 2001; Kanduri et al., 2002). Nukleozóm lokalizovaný v místě vazebné sekvence CTCF brání interakci CTCF s řetězcem DNA (Cuddapah et al., 2009). První práce ukazují, že umístění nukleozómů řídí vazbu CTCF (Kanduri et al., 2002), avšak pozdější práce také dokumentují, že CTCF řídí remodelování chromatinu a určuje umístění nukleozómů (Fu et al., 2008). Zůstává tedy otázkou, zda se CTCF váže na vlákno DNA s předem uspořádanými nukleozómy nebo zda jsou nukleozómy umísťovány na vlákno DNA pod vlivem vazby CTCF. Vzhledem k těmto aktivitám můžeme předpokládat zapojení CTCF do komplexů s chromatin-remodelačními proteiny.

Vazba CTCF s dalšími proteiny

Dalším mechanismem, který řídí vazbu CTCF na DNA během buněčné diferenciaci může být interakce s dalšími proteiny. Takové proteiny pak můžeme nazývat partnery, které buď působí jen na vybraných genových lokusech nebo působí na mnoha místech v genomu.

Mezi specifické partnery, které přispívají k funkci CTCF, patří například transkripční faktor Yin a Yang 1 (YY1) (Donohoe et al., 2007), transkripční faktor Kaiso (Defossez et al., 2005), transaktivátor MHC třídy II (CIITA) (Majumder et al., 2006; Majumder et al., 2008), chromatin remodelační faktor Vazebný protein 8 chromodoménové DNA helikázy (CHD8) (Ishihara et al., 2006), nukleofosmin (Yusufzai et al., 2004) nebo poly(ADP-ribóza) polymeráza 1 (PARP1) (Yusufzai et al., 2004).

Partnerem, který interaguje s CTCF na celogenomové úrovni, je kohezinový komplex (Parelho et al., 2008; Rubio et al., 2008; Stedman et al., 2008; Wendt and Peters, 2009). Kohezinový komplex, který je známý především svou klíčovou úlohou v kohezi a segregaci sesterských chromatid během buněčného dělení (od okamžiku replikace DNA v S fázi až do anafáze mitotického nebo meiotického dělení), se skládá ze čtyř podjednotek: SMC1 a SMC3 udržují strukturu chromozómů, RAD21 a STAG2 se podílejí se na vzniku kruhové struktury kolem dvou chromatid (Michaelis et al., 1997). Další studium ko-lokalizace CTCF a kohezinu odhalilo vzájemnou závislost v průběhu působení na DNA. CTCF pro svou funkci insulátoru v oblasti *H19/IGF2* vyžaduje přítomnost kohezinového komplexu, zatímco interakce kohezinu s DNA vyžaduje přítomnost CTCF (Nativio et al., 2009; Wendt et al., 2008).

Aktivity CTCF

CTCF disponuje mnoha funkčními mechanismy, kterými se zapojuje v epigenetické regulaci exprese genů. Je schopen řídit transkripční aktivaci (Bell et al., 1999) i její represi (Filippova et al., 1996) a to i skrze blokování chromatinových komunikací (Xie et al., 2007), genomický imprinting (Bell and Felsenfeld, 2000) a inaktivaci chromozómu X (Donohoe et al., 2007; Chao et al., 2002).

Nejvíce studovaná aktivita CTCF je spjata s ovlivněním transkripce skrze interakce se sekvencí insulátoru. Insulátor neboli chromatinový izolátor je krátká sekvence DNA bohatá na CG baze, která rozděluje chromozóm na samostatné regulační oblasti. Interakce CTCF se sekvencí insulátoru chrání transkripčně aktivní geny od vlivu svého okolí dvěma způsoby. Prvním způsobem působí CTCF jako blokátor komunikace mezi promotorem a sekvencí enhanceru nebo silenceru (to jsou sekvence, které svým působením na promotor zesilují nebo tlumí genovou expresi). Blokování enhanceru/silenceru probíhá pouze v případě, když je insulátor umístěn mezi enhancerem/silencerem a promotorem. Blokování vzniká přestavbou chromatinové struktury. CTCF v přítomnosti kohezinu zprostředkovává kontakt dvou vzdálených míst chromatinu. Vznikají tak chromatinové smyčky, které dělí

chromatin na transkripčně aktivní a neaktivní oblasti, přibližují nebo naopak oddalují příslušné regulační oblasti genů. Geny, které jsou umístěny uvnitř chromatinové smyčky, mohou být ovlivněny pouze regulačními oblastmi umístěnými v dané chromatinové smyčce (Nativio et al., 2009). Z toho vyplývá, že CTCF může na insulátorech působit jako transkripční aktivátor nebo represor, charakter jeho působení je specifický pro konkrétní místo v genomu. Druhým způsobem působí CTCF jako bariéra. CTCF na sekvenci insulátoru chrání DNA před *de novo* metylací (Guastafierro et al., 2008; Zampieri et al., 2012) a brání šíření nežádoucí metylace DNA (šíření heterochromatinu) do regulačních částí tumor supresorových genů (Recillas-Targa et al., 2006). Vzhledem k schopnostem CTCF regulovat rozsah metylace DNA a jelikož je mutován v AML (Welch et al., 2012), lze také CTCF považovat za potenciálně nádorově supresorový gen.

Aktivita transkripčního faktoru CTCF byla pozorována na řadě specifických genů důležitých pro buněčnou diferenciaci. Prvně byla zjištěna na promotorech lidského, myšího a ptačího onkogenu *MYC* (Klenova et al., 1993; Lobanenkov and Gudvin, 1989; Lobanenkov et al., 1990), kde působí jako represor (Filippova et al., 1996).

Později byla aktivita CTCF zjištěna na genových lokusech klíčových pro vývoj krevních buněk. V myeloidních progenitorových buňkách tlumí expresi *Egr-1* a s tím spjatou myeloidní diferenciaci (Ouboussad et al., 2013), v erytroidních buňkách aktivuje expresi β -globinu (Bell et al., 1999; Chung et al., 1993; Splinter et al., 2006). V makrofázích stimuluje produkci tumor nekrotizujícího faktoru (TNF) a cytokinů IL-10, IL-19, IL-20, IL-24 (Nikolic et al., 2014). V lymfocytech reguluje expresi genů MHC třídy II (Majumder et al., 2008) a interferonu gama (IFNG) (Hadjur et al., 2009). V B lymfocytech se v mezi-genové kontrolní oblasti 1 podílí na rekombinaci těžkého imunoglobulinového řetězce (*Igh*) (Degner et al., 2011; Guo et al., 2011a; Guo et al., 2011b) a inhibuje expresi onkogenu *BCL6* (Batlle-Lopez et al., 2015; Lai et al., 2010).

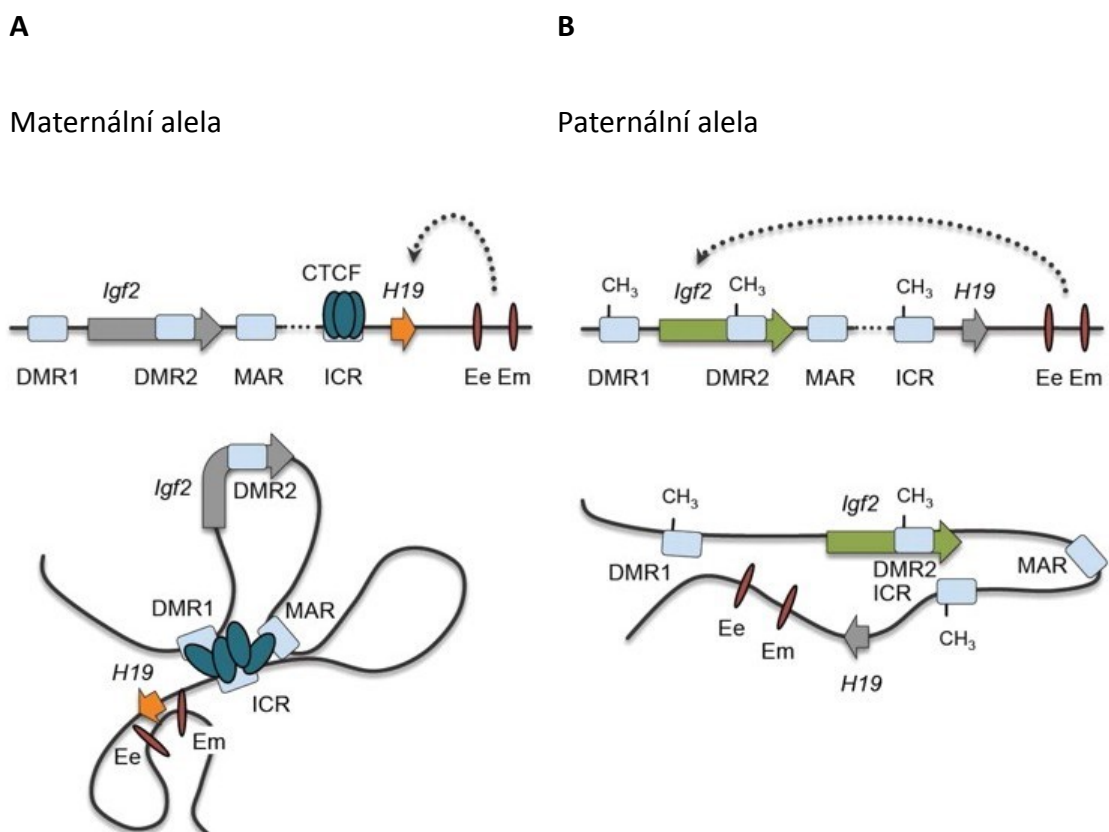
V neposlední řadě byla aktivita CTCF zjištěna na již zmíněném imprintovaném genovém lokusu *H19/Igf2*, kde je vazba CTCF řízena metylací DNA v oblasti ICR, jež je zároveň insulátorem (Bell and Felsenfeld, 2000; Hark et al., 2000;

Kanduri et al., 2000). Genový lokus *H19/Igf2* je zásadní pro fetální vývoj. *Igf2* (Inzulínu podobný růstový faktor 2) je nezbytný pro placentální a fetální růst, zatímco *H19*, který je exprimován ve formě nekódující RNA (*mir-675*), pozastavuje fetální růst.

Genový lokus *H19/Igf2* byl jedním z prvních objevených imprintovaných genů (Bartolomei et al., 1991; DeChiara et al., 1991). Imprintované geny jsou na rozdíl od ostatních genů exprimované pouze z jedné alely v závislosti na původu rodičovské alely a na stavu metylace. V průběhu tvorby pohlavních buněk, právě tehdy když jsou rodičovské alely v oddělených prostorech, jsou imprintované geny na rodičovských alelách rozdílně označeny metylací DNA. Jedna alela genu zůstává nemetylována. Druhá alela genu je inaktivována metylací, tuto alelu označujeme jako imprintovanou. Z toho vyplývá, že genový imprinting je určitý druh epigenetické regulace genové exprese. V kontrolní oblasti imprintingu dochází k metylaci na místech označovaných jako rozdílně metylované oblasti (DMR – differentially methylated regions), jež jsou charakteristické vysokým obsahem CG dinukleotidů. V zárodečných buňkách dochází k *de novo* metylaci DNA v DMR metyltransferázami DNMT3a, DNMT3b a DNMT3L. V somatických buňkách metylaci DNA v DMR zajišťuje metyltransferáza DNMT1. Jakým způsobem metylační aparát vyhledává a určuje specifické CG dinukleotidy v oblastech DMR není doposud zcela objasněno. Výsledky několika prací naznačují, že působení DNMT v DMR mohou ovlivňovat histonové modifikace na konkrétních nukleozómech. Příkladem je DNMT3L, která působí na nukleozómech s nemetylovanými histonovými konci H3K4 (Abramowitz and Bartolomei, 2012).

Gen *Igf2* se nachází -90 kb od transkripčního počátku genu *H19* na myším chromozómu 7. *H19* je exprimován pouze z maternální alely, *Igf2* je přepisován naopak pouze z paternální alely. ICR se nachází mezi geny *H19* a *Igf2* v pozici -2 kb až -4 kb od transkripčního počátku *H19* (Tremblay et al., 1997; Tremblay et al., 1995). V oblasti ICR se nachází čtyři vazebná místa pro CTCF (Hark et al., 2000). Jestliže je ICR metylovaná, pak není přístupná pro CTCF (Bell and Felsenfeld, 2000). Geny *H19* a *Igf2* sdílí skupinu enhancerů, které jsou v pozici +10 kb od

transkripčního počátku *H19*, které stimulují pouze jeden gen na dané alele (Webber et al., 1998). Na maternální alele není ICR metylovaná, CTCF se váže na ICR a působí zde jako insulátor- blokuje vliv enhancerů na promotor *Igf2*, přepisován je pouze gen *H19*. Vzniklá nekódující RNA *H19* tlumí expresi genu *Igf2*, jež je vzhledem k poloze *H19* v pozici *cis*. V případě paternální alely je ICR metylovaná, CTCF se zde nemůže vázat a enhancery mohou aktivovat promotor *Igf2*, pod vlivem metylace ICR dochází také k metylaci promotoru genu *H19* a zastavení jeho transkripce (Abramowitz and Bartolomei, 2012) (Obrázek 2). Struktura a mechanismus imprintingu lokusu *H19/Igf2* jsou evolučně konzervované a u myši a člověka jsou totožné (Arney et al., 2006).



Obrázek 2: Genový imprinting myšního lokusu *H19/Igf2*. Rozdílně metylovaná specifická alela řídí vazbu CTCF, smyčkování chromatinu a expresi cílových genů *H19* a *Igf2*. **A** Maternální alela s nemetylovaným ICR váže CTCF, následkem je aktivovaný gen *H19*. **B** Paternální alela s metylovaným ICR neváže CTCF, následkem je

aktivovaný gen *Igf2*. DMR =rozdílně metylovaná oblast, Ee = endodermální tkáňový enhancer, Em= mezodermální tkáňový enhancer, ICR =kontrolní oblast imprintingu, CH₃= metylovaná DNA, MAR= oblast DNA k uchycení jaderné matrice. Převzato a upraveno od (Ribeiro de Almeida et al., 2012).

Porucha imprintingu projevující se nadměrnou expresí *Igf2* vede ke vzniku Beckwithova-Wiedemannova syndromu, jež se projevuje nadměrným růstem a zvýšeným rizikem vzniku nádorů (Sparago et al., 2004). Naopak porucha imprintingu projevující se nadměrnou expresí *H19* je známá jako Silverův-Russellův syndrom a projevuje se zpomaleným fetálním a postnatálním růstem (Gicquel et al., 2005).

V neposlední řadě genový lokus *H19/Igf2* zastává důležitou úlohu při krvetvorbě. *mir-675* (= mRNA nekódující produkt genu *H19*) tlumí translaci *Igf1r* (=receptoru pro *Igf2*) a zachovává klidový stav hematopoetické kmenové buňky, která je schopná dlouhodobé obnovy (buňky označované jako LT-HSC). Pokud dojde k delecii maternální ICR, která zajišťuje aktivaci exprese *H19* a tlumení exprese *Igf2*, zvyšuje se transkripce *Igf2* a translace *Igf1r*. Vazba růstového faktoru *Igf2* na jeho receptor *Igf1r* spouští signální dráhu PI3K-Akt, která fosforyluje a inaktivuje transkripční faktor FoxO3. Následkem toho buňky LT-HSC vstupují do buněčného cyklu, aktivují se a prolifерují. V kostní dřeni LT-HSC a následně i ST-HSC (kmenové hematopoetické buňky s krátkodobou schopností obnovy) ztrácí schopnost obnovy, diferencují a prolifерují do multipotentní progenitorové buňky a dalších krevních elementů (Venkatraman et al., 2013).

Úloha CTCF přivzniku leukémie

CTCF je známý svou aktivitou na genech důležitých pro vyzrávání krevních buněk, avšak jen velmi málo prací ukazuje jeho vztah ke vzniku, průběhu a léčbě leukémie.

Expese CTCF je v různých nádorových myeloidních liniích (chronické myeloidní leukémii v blastické krizi: K562, KU812, KBM5, MEG01; akutní myeloidní

leukémii: HEL, HL60, U937, THP1, NB4; Burkittových lymfomech: Raji CA46, Manca a Daudi) na srovnatelné úrovni a během terminální diferenciace exprese CTCF u použitých linií (HL-60, U937, K562) podobným způsobem klesá. To však neplatí pro post-translační modifikace CTCF. Profil fosforylace CTCF se mezi nádorovými liniemi (THP1 a U937) dramaticky liší v závislosti na dosaženém stupni diferenciace (Delgado et al., 1999). Zvýšená exprese CTCF v buněčné linii chronické myeloidní leukémie K562 stimuluje diferenciaci erytroidní vývojové řady působí skrze svůj cílový gen *MYC* blokování buněčného cyklu a zpomalování buněčného růstu avšak bez indukce buněčné apoptózy (Rasko et al., 2001; Torrano et al., 2005). Úloha CTCF v procesu apoptózy se zdá být specifická pro buněčnou linii, protože jak bylo ukázáno na buněčné linii B buněčného lymfomu WEHI 231, zvýšená hladina CTCF vedle inhibice *MYC* indukovala expresi p27, p21, p53, a p19(ARF) s následným zastavením buněčného růstu a zahájením apoptózy (Qi et al., 2003).

Použití nových sekvenačních metod (Next-generation sequencing, NGS) pro analýzu genových mutací v mononukleárních buňkách od 52 pacientů s AML odhalilo mutace genů zapojených v epigenetické regulaci transkripce. Nejvyšší incidence mutací byla pozorována u genů účastnících se vzniku chromatinových modifikací a chromozómové organizace. Mezinově identifikované mutované geny patří i CTCF a jeho partnerský protein RAD21 (frekvence výskytu mutací RAD21 je srovnatelná s výskytem mutací genu DNMT3A (Dolnik et al., 2012). Rozvoj AML může být důsledkem mutací CTCF, které vedou k narušení procesu alternativního sestřihu pre-mRNA genu CD45 v hematopoetických buňkách (Shukla et al., 2011).

Vedle již zmíněných mutací u AML (Welch et al., 2012) vedlo sekvenování vzorků DNA od 23 pacientů s akutní lymfoidní leukémií (nejčastější dětské maligní onemocnění) v době diagnózy a v době relapsu onemocnění k odhalení nově vzniklé mutace CTCF ve vzorcích relabovaných pacientů (Mullighan et al., 2011).

Nově byly také odhaleny mutace genu *CTCF* a genů kohezinového komplexu (*STAG2*, *RAD21*, *SMC3* a *SMC1A*) u pacientů s MDS. Mutace CTCF a kohezinu byly pozorovány nejčastěji u pacientů s klasifikací RAEB II a RAEB I. Na základě všech zjištěných genetických aberací u 875 pacientů byl navržen nový prognostický model,

který ukazuje, že mutace genu CTCF, STAG2 a SMC1A mohou negativně ovlivňovat celkové přežití pacientů (Haferlach et al., 2014).

Studie se 100 vzorků lidských tumorů určila výskyt čtyř bodových mutací CTCF postihující aminokyseliny v oblastech zinkových prstů v nádorových buňkách prsu, prostaty a Wilmsova tumoru. Každá mutace domény zinkového prstu selektivně měnila CTCF vazebnou specifitu bez kompletní ztráty aktivity CTCF na insulátorech nebo promotorech genů řídících buněčnou proliferaci (*MYC*, *p19ARF* a *Igf2*). Deregulace těchto genů může přispívat k rozvoji maligního fenotypu buňky (Filippova et al., 2002). Podobné mutace předpokládáme i u krevních nádorů, jelikož mutace způsobující kompletní ztrátu funkce CTCF vedou k buněčné smrti normálních i nádorových buněk. Tento předpoklad podporuje fakt, že homozygotní inaktivace CTCF v myši vede k embryonální letalitě v časně fázi preimplantace (Burcin et al., 1997).

Další práce pouze nepřímo naznačují jak CTCF může ovlivňovat patogenezu krevních malignit jako je chronická myeloidní leukémie (CML) nebo AML, u kterých dochází k porušení imprintingu genu *IGF2*. Ztráta monoalelické exprese *IGF2* byla stanovena u 50% vzorků získaných od 24 pacientů s AML, vztah k progresi onemocnění v této studii nebyl sledován (Wu et al., 1997). Jiná práce naznačuje, že ztráta imprintingu koreluje s progresí CML. U pacientů s pokročilým stádiem CML byla zjištěna nenormální bialeická exprese *IGF2* v nádorových buňkách, zatímco u vzorků pacientů ve stabilní fázi onemocnění byl imprinting *IGF2* zachován (Randhawa et al., 1998).

Chromatin remodelační faktor SMARCA5

Chromatin remodelační faktor SMARCA5 (celým názvem: SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 5; také známý jako SNF2H) je členem nadrodiny SF, rodiny Snf2 a významné podrodiny ISWI (Imitation SWI/SNF). ISWI je jedna z nejvíce konzervovaných podrodin Snf2 (Corona and Tamkun, 2004). SMARCA5 se nachází na lidském chromozómu 4

v oblasti 4q31.1-q31.2 (u myši na chromozómu 8) a tvoří ho 24 exonů. Lidský protein SMARCA5 je tvořen 1052 aminokyselinami, myší protein Smarca5 je tvořen 403 aminokyselinami. Protein Smarca5 se vyskytuje v řadě lidských tkání (Aihara et al., 1998). Jeho exprese je vyšší v proliferujících buňkách během embryogeneze, v časně fázi postnatálního života a v jaderných krevních buňkách dospělého organismu (Lazzaro and Picketts, 2001; Stopka et al., 2000). Homozygotní inaktivace Smarca5 je letální, myší embrya s genotypem Smarca5 $-/-$ se dožívala 7,5 dne embryonálního života. Pozorování izolovaných myších blastocyst s genotypem Smarca5 $-/-$ odhalilo příčinu zániku embryí v časném stádiu periimplantace. Deplece Smarca5 vedla k zastavení proliferace trofoblastu a embryoblastu blastocysty a následně k jejich buněčné smrti (Stopka and Skoultchi, 2003). Další novější práce ukazují, že Smarca5 je důležitý faktor pro proliferaci a vývoj krevních kmenových buněk do myeloidních a erytroidních elementů (Kokavec et al., 2017).

Struktura SMARCA5

Protein SMARCA5 stejně jako další členové ISWI je tvořen 4 částmi: ATPázovou doménou, HAND, SANT a SLIDE doménami. Konzervovaná ATPázová doména patří do nadrodiny DEAD/H (Asp-Glu-Ala-Asp/His) helikáz a je lokalizovaná v N koncovém úseku proteinu. Helikáza hydrolyzuje molekulu ATP a spotřebovává uvolněnou energii pro rozvinutí dvoušroubovice DNA. HAND, SANT (Swi3 Ada2 N-CoR TFIIIB) a SLIDE (SANT-like ISWI) domény jsou umístěny v C koncovém úseku proteinu a jsou nezbytné pro protein-proteinovou interakci a rozpoznání a interakci s nukleozomální DNA a histonovým jádrem. To znamená, že HAND-SANT-SLIDE doména spojuje helikázu s nukleozomální DNA a histonovým jádrem a umožňuje tak remodelaci chromatinu (Boyer et al., 2004; Grune et al., 2003; Hota and Bartholomew, 2011).



Obrázek 3: Funkční domény chromatin remodelačních faktorů rodiny Imitation-switch (ISWI). N koncový úsek proteinu obsahuje doménu podobnou histonovému konci H4 (AutoN), která brání hydrolýze ATP, když ATPáza není navázána na nukleozómy. DEXD ATPázová/helikázová doména tvoří enzymatické jádro remodelačního faktoru, je vysoce konzervovaná jak sekvenčně tak i funkčně a je součástí všech chromatin remodelačních faktorů, které byly dosud studovány. DEXD označuje sekvenci aminokyselin (Asp-Glu-X-Asp) uvnitř ATPázové domény. Negativní C doména (NegC) brání translokaci proteinu, když enzym není v kontaktu s extranukleozomální DNA. C koncový úsek proteinu se účastní vazby extranukleozomální DNA. HAND-SANT-SLIDE domény vážou sekvence DNA. Převzato a upraveno od (Petty and Pillus, 2013).

Regulace vazby SMARCA5 na chromatin

Sekvence DNA

Výsledky několika prací ukazují, že sekvence a konformace DNA určují místo působení remodelační aktivity ISWI proteinů (Partensky and Narlikar, 2009; Rippe et al., 2007). Například umístování nukleozómů zprostředkovávané komplexem ACF (ATP-utilising chromatin remodeling and assembly factor) může být určované sekvencí DNA, která se projevuje velkým vnitřním zakřivením. Dále nekatalytické podjednotky komplexů ISWI mohou mít vůči sekvenci DNA různou vazebnou afinitu, protože obsahují různé DNA vazebné motivy (Fyodorov and Kadonaga, 2002a; Poot et al., 2000; Strohner et al., 2001). Z toho vyplývá, že katalytické proteiny a s nimi spojované podjednotky chromatin remodelačních komplexů pravděpodobně mění míru vazebné afinity příslušných komplexů vůči chromatinu v závislosti na DNA sekvenci. Nicméně význam a souvislosti těchto pozorování zatím nebyly potvrzeny v žijících buňkách.

Histonové modifikace a metylace DNA

Post-translační histonové modifikace zahrnují ubiquitinaci, acetylaci, metylaci a fosforylaci a dále metylace DNA jsou zapojeny v remodelaci chromatinu. Řada prací ukazuje, že vazba Smarca5 na chromatin je řízena metylací DNA i některými histonovými modifikacemi.

První experiment odhalil, že Smarca5 rozpoznává (nebo spíše jeho partnerské proteiny, jež obsahují bromodoménu, např. Acf1, což ve zmíněných pracích není uvedeno) metylované lysinové konce K4 histonu H3 a acetylované histony H3 a nebo H4 na vymezených transpozonálních Alu repeticích. Výskyt těchto modifikací koreluje s vazbou Smarca5 (a kohezinem) na chromatinu (Hakimi et al., 2002). Protože výskyt Alu repeticí je neobvykle vysoký na dinukleotidech CG, další experiment testoval vliv metylované DNA na vazbu Smarca5. Demethylace DNA, která byla navozena působením AZA, umožnila nové vazby Smarca5 na sekvencích DNA (Hakimi et al., 2002). Další práce upřesnila, že SMARCA5 v HeLa buňkách rozeznává di- a tri- metylovaný lysin K4 histonu H3 ale nerozeznává nemetylovaný H3K4 (Santos-Rosa et al., 2003). Methylace lysinu K4 histonu H3 vzniká také na místech dvojitými zlomy poškozené DNA, jež je označena monoubikvitinací histonu H2B (zprostředkovanou ubikvitin ligázou RNF20). Na takto označenou poškozenou DNA se váže Smarca5, který zde umožňuje vazbu DNA reparačních proteinů BRCA1 a RAD51 a zahájení opravy poškozené DNA homologní rekombinací (Nakamura et al., 2011).

Histonové jádro a histonové varianty

Smarca5 při procesu posouvání nukleozómu interaguje se spojovací DNA (linker DNA) a s prvními 50 bp sekvence DNA uvnitř nukleozómu (Langst and Becker, 2001).

V blízkosti kontaktu Smarca5 a nukleozómu se nachází C koncový úsek histonu H2A, který jak se ukázalo, je nezbytný pro úspěšné posunutí nukleozómu.

Samotný protein Smarca5 není schopen posunout nukleozómem bez přítomnosti C koncového úseku histonu H2A. Avšak dva molekulární motory v komplexu ACF, jehož součástí je Smarca5, umožňují tento defekt překonat (Vogler et al., 2010).

SMARCA5 má schopnost rozlišovat histon H2A a jeho histonovou variantu H2A.Z. Fyzická interakce SMARCA5 a H2A.Z má rozdílnou afinitu dle konkrétního komplexu ISWI. Přítomnost H2A.Z stimuluje hydrolýzu ATP prováděnou SMARCA5 a nukleozómy obsahující H2A.Z podobným způsobem zvyšují chromatin remodelační aktivitu komplexů se SMARCA5 *in vitro* (Goldman et al., 2010).

Aktivity SMARCA5

Chromatin remodelační komplexy jsou zapojeny v různých biologických funkcích. Remodelační komplexy obsahující SMARCA5 (ACF, RSF, NoRC, WICH, CHRAC a B-WICH jsou uvedeny v souhrnné Tabulce 2) se účastní replikace DNA, opravy poškozené DNA, regulace transkripce a regulace chromozómové struktury. ATPáza SMARCA5 je výjimečná svou schopností sestavovat a posunovat nukleozómy podél vlákna DNA, čímž v remodelačních komplexech zastává roli motoru, další podjednotky komplexů rozeznávají cílový substrát, to je nukleozomální DNA a histonové jádro. Z toho vyplývá, že složení remodelačního komplexu je zásadní pro určování jeho funkce neboli funkci SMARCA5 určují proteiny rozeznávající chromatin.

Komplex	Členové komplexu	Funkce komplexu
ACF	ACF1	Replikace DNA Regulace transkripce Sestavování chromatinu
RSF	RSF1	Umísťování nukleozómů Chromózosomová struktura
NoRC	TIP5	Represe transkripce
CHRAC	ACF1, CHRAC15, CHRAC17	Oprava DNA Sestavování chromatinu
WICH	WSTF	Replikace DNA Oprava DNA Sestavování chromatinu
B-WICH	WSTF, jaderný myozin 1	Aktivace transkripce
Kohezin	RAD21, HDAC1, HDAC2, SMC1, SMC3, CHD3/4, MBD2, MBD3, MTA1, MTA2, RBAP46, RBAP48	Segregace chromozómů

Tabulka 2: Shrnutí remodelačních komplexů obsahující protein SMARCA5: vlevo jsou uvedeny názvy komplexů, uprostřed interakční partneři a vpravo funkce daných komplexů.

Replikace DNA

Replikace DNA je proces během, kterého dochází k značnému přestavování chromatinové struktury. V S fázi buněčného cyklu probíhá zdvojování DNA, nasedání histonů na nascentní DNA, modifikování histonových konců a nasedání chromatin remodelačních faktorů do replikačního ohniska. Smarca5 zde působí v komplexu ACF, kde společně s Acf1 (ATP-dependent chromatin assembly factor) zajišťují, aby do replikace a po replikaci docházelo k pravidelnému uspořádání nukleozómů. Význam Smarca5 při replikaci potvrzují další práce (Collins et al., 2002). Komplex WICH (WSTF–ISWI chromatin remodelling complex) tvořený Smarca5 a WSTF (Williams syndrome transcription factor) zajišťuje uspořádání nukleozómů po replikaci DNA (Poot et al., 2004).

Z výše uvedené části vyplývá, že ACF a WICH se vzájemně doplňují v udržování rozvolněné struktury chromatinu na obou stranách replikační vidličky a řídí tak přístup dalších faktorů nezbytných pro replikaci DNA.

Oprava DNA

Oprava poškozené DNA je proces, který obvykle provází lokální změna chromatinové struktury. Poškozenou DNA nejdříve identifikují příslušné senzorké proteiny a následně se navážou enzymy s katalytickou aktivitou, jež zprostředkovávají samotnou opravu. Mezi důležité chromatin-remodelační enzymy během opravy DNA patří také chromatin remodelační faktor Smarca5 v komplexu CHRAC (Chromatin remodeling and assembly complex) (Erdel and Rippe, 2011a, b; Lan et al., 2010) a WICH (Xiao et al., 2009).

Komplex CHRAC (ACF1/SMARCA5) se váže do míst dvouřetězcových zlomů DNA a je nezbytný pro opravu poškozené DNA v lidských buňkách. Snížená exprese SMARCA5 nebo ACF1 v buňkách ozářených rentgenovými paprsky významně zvyšuje vznik DNA zlomů a snižuje účinnost opravy DNA zlomů formou nehomologického spojování konců (NHEJ) a homologní rekombinace. Komplex CHRAC dále přímo interaguje s komplexem KU70/80 po indukovaném poškození DNA. Komplexy KU jsou enzymy známé tím, že zahajují reparační proces formou NHEJ (Lan et al., 2010).

Komplex WICH (WSTF/SMARCA5) interaguje s histonem 2A variantou X (H2A.X) v místě poškozené DNA. Kináza WSTF fosforyluje Tyr142 histonu H2A.X a poskytuje tím signál pro další enzymy zapojené v procesu opravy poškozené DNA (Xiao et al., 2009).

Ze zmíněných příkladů vyplývá, že působení SMARCA5 se během opravy poškozené DNA neomezuje jen na přesouvání nukleozómů, ale že má také schopnost zprostředkovávat signál o poškozené DNA dalším faktorům zapojených v procesu opravy DNA.

Regulace transkripce

SMARCA5 zastává důležitou úlohu v regulaci transkripce. Přemístěním nukleozómu může blokovat nebo odhalovat některá vazebná místa regulačních oblastí a měnit tak vazbu transkripčních faktorů a tím expresi příslušných genů. Tato chromatin remodelační aktivita může být v buňkách spouštěna různými signály

například metabolickým stavem buňky nebo hormony. SMARCA5 se účastní regulace transkripce v těchto komplexech a to podle toho, jaký typ RNA polymerázy je ovlivněn: ACF, RSF (Remodelling and spacing factor), NoRC (Nucleolar remodelling complex) a WICH (Arzenani et al., 2011; Choi et al., 2009; Precht et al., 2010). Několik konkrétních příkladů regulace transkripce, které byly pozorovány v různých buněčných druzích, uvádím níže.

Smarca5 v myších T lymfocytech se váže a mění chromatinovou strukturu na promotorech a dalších regulačních oblastech cytokinů IL-2 a IL-3. Vazba Smarca5 do těchto oblastí brání expresi IL-2 a zároveň aktivuje expresi IL-3 (Precht et al., 2010).

Komplex RSF (Rsf1/Smarca5) v buňkách ovariálního karcinomu snižuje expresi skupiny genů (OPN, CYR61 a CTGF), která je pravděpodobně zodpovědná za vznik lékové rezistence (Choi et al., 2009).

Komplex NoRC (TIP5/Smarca5) působí jako represor transkripce ribozomální RNA, kterou zprostředkovává RNA polymeráza I. Mechanismus jeho působení je kombinací chromatinové remodelace a vazby histonové deacetylázy 1 (HDAC1) a DNA metyltransferázy Dnmt1 a Dnmt3b (Li et al., 2006; Strohner et al., 2001; Zhou et al., 2002).

Komplex WICH řídí regulaci transkripce zprostředkovanou RNA polymerázami I a III. Členové WICH, Smarca5 a WSTF, byly pozorovány v multiproteinovém komplexu B-WICH, jehož součástí je jaderný myozin 1. Totožné rozložení proteinů B-WICH a RNA polymerázy I v jadérku umožňuje vzájemnou interakci a aktivaci transkripce ribozomální DNA (Percipalle et al., 2006). Dále WICH svou vazbou do regulační oblasti 5S rRNA a 7SL RNA umožňuje nasednutí a zahájení transkripce pomocí RNA polymerázy III (Cavellan et al., 2006).

V předchozích odstavcích jsem zmínila několik příkladů regulace transkripce, kterých se účastní Smarca5. Na základě těchto příkladů můžeme říci, že remodelační

komplexy obsahující Smarca5 mají různé role v regulaci transkripce, mohou stimulovat nebo inhibovat transkripci genů kódující proteiny nebo rRNA.

Regulace chromozomové struktury

Komplex RSF (RSF1/SMARCA5) má schopnost regulovat strukturu chromozómu. V buňkách HeLa byla zjištěna interakce RSF s centromerovým proteinovým A (CENP-A) histonem. CENP-A je podkladem pro sestavení chromozomové centromery, která je důležitá pro správné sestavení kinetochorů a rovnoměrnou segregaci chromozómů do dceřiných buněk (Perpelescu et al., 2009).

Smarca5 společně s proteinem Acf1 umožňují vazbu kohezinového komplexu na centromerickou DNA mitotického chromozómu. Přítomnost kohezinu v místě centromery je důležitá v průběhu mitózy, kde zajišťuje spojení dvou sesterských chromatid. Vazbu kohezinu na chromatin podporuje přítomnost histonových modifikací jako je acetylace histonu H3a H4, trimetylace lysinu K4 na histonu H3, naopak metylace DNA brání v interakci kohezinu s DNA (Hakimi et al., 2002).

Z uvedeného vyplývá, že SMARCA5 má klíčovou úlohu při modelaci mitotického chromozómu a jeho přítomnost je nezbytná pro zdárný průběh segregace chromozómů. Je pravděpodobné, že Smarca5 spolupracuje s enzymy, které modifikují histony a DNA při regulaci chromozomové struktury.

Úloha SMARCA5 při krvetvorbě a při vzniku leukémie

Změna v expresi nebo aktivitě chromatin remodelačních faktorů má významný dopad na regulaci transkripce způsobující změny v expresním profilu buňky a může vést k patofyziologickým procesům v krvetvorbě.

SMARCA5 je klíčovou molekulou pro diferenciaci a proliferaci erytroidních progenitorových buněk. Jeho vysoká hladina je důležitá pro zahájení diferenciace a

proliferace. V normálních lidských primárních prekurzorových CD34+ buňkách kostní dřeně dochází v časně fázi indukované diferenciaci a proliferaci ke zvyšování exprese SMARCA5. S pokročilým stádiem buněčného vyžívání (u terminálně diferencovaných erytroidních buněk) hladina SMARCA5 klesá. Naopak snížená hladina SMARCA5, která byla navozena pomocí antisense oligonukleotidů, brání expresi normální hladiny β -globinu a normální diferenciaci erytroidních prekurzorů. (Stopka and Skoultchi, 2003).

Na myším modelu s kondicionální delecí Smarca5 (*Smarca5*^{flox5/ Δ 5-9} Vav-iCre) bylo pozorováno zablokování diferenciaci a proliferaci erytroidních prekurzorů v časných stádiích definitivní hematopoézy. Schopnost diferenciaci je narušena na úrovni multipotentní progenitorové buňky, která nevyžívá do specifické krevní řady. Mutantní prekurzorové buňky jsou zablokovány ve fázi G2/M buněčného cyklu a vyznačují se abnormálním počtem chromozómů (tetraploidii) a dysplastickými změnami (dvoujaderností, změnou velikosti a tvaru buněk). V periferní krvi mutantních myší bylo pozorováno snížené množství zralých erytrocytů a současně velké množství jaderných erytrocytů. Porucha proliferaci se projevuje na úrovni progenitorové buňky, jež není schopna tvořit krevní kolonie. Tato neefektivní erythropoéza vede k závažné anémii a embryonální letalitě v 18,5 dnu embryonálního života (Kokavec et al., 2017).

U prekurzorových myších buněk s deletovaným Smarca5 byla pozorována nízká hladina mRNA hematopoetických faktorů (*Gata2*, *Gata1*, *Klf1* a *Nfe2l3*) a jejich cílových genů (*Hba-a1*, *Hbb-b1*, *Alas2* a *Epor*). Ztráta Smarca5 v hematopoetických kmenových buňkách, multipotentních progenitorových buňkách a erytroidních buňkách vede k aktivaci exprese p53, jež je označen aktivními modifikacemi S18^{Phos} (asociováno s poškozením DNA) a K382^{Ac} (asociováno s acetylázou CBP/p300) a následně aktivaci jeho cílových genů, jež jsou zapojeny v procesech buněčného stresu, poškození DNA, opravě DNA, apoptózy a hypoxie. Mutantní buňky s aktivovaným p53 nakonec podléhají apoptóze (Kokavec et al., 2017).

V CD34+ buňkách pacientů s AML byla v porovnání s normálními jedinci zjištěna zvýšená exprese SMARCA5. Po dosažení kompletní remise AML byl

pozorován pokles vysoké hladiny mRNA SMARCA5. Podobné bylo pozorováno i v buňkách MEL, kde byl po indukci erytroidní diferenciace pozorován pokles exprese Smarca5. U myšího modelu s indukovanou anémií byl pokles hematokritu kompenzován zrychlenou erythropoézou, jež byla doprovázena dramatickým poklesem Smarca5 (Stopka et al., 2000).

2. HYPOTÉZA A CÍLE DIZERTAČNÍ PRÁCE

Podklady pro zformulování hypotézy

Podkladem pro vznik nádorového onemocnění je změna uspořádání a exprese správné genetické informace. Změny v genomu buňky mohou probíhat přímo v sekvenci kódující příslušné geny nebo v sekvencích regulačních oblastí, které kontrolují expresi příslušných genů. U MDS byly pozorovány mutace genů, které jsou zapojeny v epigenetickém procesu metylace DNA a modifikace histonových konců. Význam konkrétních mutací DNA pro vznik nádorového onemocnění krve však zůstává zatím nejasný. Významné jsou také patofyziologické aktivity epigenetických faktorů, které způsobují abnormální změny chromatinové struktury a tím mění expresivitu genetické informace. Sekundární chromatinová struktura řízená epigenetickými mechanismy, jako je metylace DNA a histonové modifikace, ovlivňuje vazbu transkripčních faktorů a dalších epigenetických regulátorů na vlákno DNA.

Transkripční faktory jsou klíčovými iniciátory krvetvorby, které svou vazbou na DNA přitahují enzymatické komplexy zajišťující transkripci, replikaci a opravu DNA, jež ve výsledku vede ke konečným fenotypickým změnám krevních buněk. Správná kombinace epigenetického aparátu je ve fyziologických pochodech v dokonalé souhře, jež vede k zahájení nebo potlačení transkripce konkrétních genů a ke správné expresi nezbytných genů důležitých pro fyziologický projev daného procesu buňky, tkáně a organismu.

Transkripční faktor SPI1 a jeho hladina v krevních buňkách představuje důležitou molekulu, která v procesu diferenciaci řídí a potlačuje vznik nádorů. Nízká hladina SPI1 je spojována se vznikem AML (Rosenbauer et al., 2004), rovněž je pozorována v CD34+ buňkách u pacientů s MDS s vysokým rizikem přechodu do AML (podle IPSS) a u modelové buněčné linie MDS/AML OCI-M2 (Curik et al., 2012).

Regulace exprese SPI1 je komplexní děj, který není zcela objasněn. Prozatím experimentální práce ukazují, že transkripci *SPI1* řídí několik liniově specifických

transkripčních faktorů (GATA-1, SATB1, OCT-1, C/EBP α , Runx1, Sp1 a autoregulačně SPI1), které se vážou do několika regulačních oblastí: proximálního promotoru, regulační oblasti URE a dalších méně známých enhancerů (Hoogenkamp et al., 2007; Leddin et al., 2011). Oblast URE komunikuje s enhancerem -12 kb (v myším genomu) a promotorem genu *Spi-1*, společně vytváří chromatinové smyčky, jež zvyšují expresi *Spi-1* (Ebralidze et al., 2008; Leddin et al., 2011; Staber et al., 2013).

U AML je nízká hladina SPI1 spojována s delecí nebo mutací oblasti URE ale též i s mutacemi genů transkripčních faktorů (AML1/RUNX1, CEBPA, CTCF a dalších) vážící URE. U MDS souvisí nízká hladina SPI1 s abnormálně vysokou metylací DNA v oblasti URE a též s nízkou terapeutickou odpovědí na AZA (Curik et al., 2012). Pacienti s MDS s vysokým a středně vysokým rizikem přechodu do AML a pacienti s AML s dysplázií ve více buněčných liniích (podle IPSS) jsou léčeni hypometylační látkou AZA (Fenaux et al., 2010), která zvyšuje expresi SPI1 v důsledku snížené metylace DNA v oblasti URE. Obnovená hladina SPI1 umožňuje nádorovým buňkám znovu zahájit diferenciaci (Curik et al., 2012).

Navzdory zmíněným pozitivním účinkům AZA zůstává tato hypometylační terapie u pacientů s MDS z lékařského hlediska neuspokojivá. Výše popsané pro-diferenciační účinky AZA na leukemické buňky dobře fungují v iniciační fázi terapie pacientů, avšak v průběhu času AZA postupně selhává a dochází k nekontrolované propagaci leukemického klonu a smrti pacienta. Mechanismy selhání léčby AZA jsou neznámé. Rovněž komplexní vztahy epigenetických faktorů určující obnovení transkripce *SPI1* vlivem AZA terapie nejsou zcela objasněny.

Multifunkční transkripční faktor CTCF má ve spolupráci s kohezinovým komplexem schopnost vytvářet chromatinové smyčky, které rozdělují chromatin na transkripčně aktivní a neaktivní domény. To vysvětluje, že CTCF může působit jako transkripční represor i jako transkripční aktivátor (Filippova et al., 1996; Splinter et al., 2006). CTCF je výjimečný svou vazbou na sekvenci označovanou jako insulátor, která blokuje působení enhancerů a silencerů, sekvencí DNA, které zesilují nebo potlačují transkripci vyjadřovaných genů (Ohlsson et al., 2001).

Vazba CTCF na DNA je zpravidla možná na nemetylované vazebné místo, které se nachází na vlákně DNA mezi pravidelně rozmístěnými nukleozómy a v místech s vyšším výskytem histonové varianty H2A.Z (Filippova et al., 2001; Kanduri et al., 2002)

Sestavování a umístování nukleozómů zprostředkovává chromatin remodelační faktor SMARCA5, jehož hydrolytickou aktivitu stimuluje histonová varianta H2A.Z. SMARCA5 je také nezbytný pro interakci kohezinového komplexu s DNA, přičemž vazbu SMARCA5 společně s kohezinem negativně ovlivňuje metylace DNA (Hakimi et al., 2002).

Na základě výše uvedeného lze předpokládat, že CTCF bude zapojen do komplexního epigenetického aparátu řídicího expresi genu *SPI1* v buňkách MDS/AML během terapie AZA. Vazbu CTCF na DNA v leukemických buňkách bude ovlivňovat chromatin remodelační faktor SMARCA5 a metylace DNA. Je pravděpodobné, že AZA bude zprostředkovávat demetylaci vazebných míst CTCF a umožní jeho vazbu na DNA v nádorových buňkách MDS/AML.

Hypotéza

Na základě souhrnu výše uvedených zjištění jsem vytvořila pracovní hypotézu této dizertační práce:

Hlavní hypotézou mé práce je, že chromatin remodelační faktor SMARCA5 se účastní vzniku leukemického klonu skrze spolupráci s transkripčním faktorem CTCF. Leukemická transformace je umožněna nízkou hladinou prodiferenčního hematopoetického proteinu SPI1, jež je způsobena abnormální metylací regulační oblasti genu *SPI1*. Předpokládáme, že CTCF může být v přítomnosti spolupracujícího partnera SMARCA5 kandidátním transkripčním faktorem, který je zapojen v regulaci transkripce genu *SPI1* v nádorových buňkách MDS/AML během terapie AZA. CTCF může ovlivňovat expresi SPI1 při terapii AZA buď v pozitivním nebo negativním smyslu v závislosti na funkci CTCF na genovém lokusu *SPI1*.

Specifické cíle navazující na hypotézu jsou následující:

1. Určit, zda CTCF a SMARCA5 vzájemně interagují na DNA v krevních buňkách. Určit v jakém sledu probíhá jejich vazba na DNA.
2. Určit, jaký význam má interakce CTCF a SMARCA5 v regulaci genové transkripce.
3. Určit, zda CTCF a SMARCA5 interagují na DNA v oblasti genu *SPI1* v buňkách u normálních jedinců a v buňkách MDS a AML.
4. Určit, zda AZA demetyluje DNA i v jiných regulačních oblastech genu *SPI1* než v oblasti URE.
5. Určit, zda k demethylaci DNA dochází na vazebných místech CTCF. Zjistit, zda metylace DNA ovlivňuje vazbu CTCF a SMARCA5 do regulačních oblastí genu *SPI1*.
6. Určit jakým způsobem CTCF a SMARCA5 regulují expresi *SPI1* v buňkách MDS a AML.

3. MATERIÁL A METODY

Materiál

DNA plasmidy

Modelové DNA plasmidy pro studování regulačních vlastností

Plasmidy obsahující vazebné domény a gen pro luciferázu: pIHLE, pIHLIE a pIHLME byly použity v experimentech testujících funkci insulátoru (Ishihara et al., 2006; Wendt and Peters, 2009). V naší práci byly tyto tzv. „reporterové“ plasmidy pIHLE, pIHLIE a pIHLME použity pro testování funkčního vztahu CTCF a SMARCA5 v oblasti insulátoru genu *H19*. Plasmidy pIHLE, pIHLIE a pIHLME byly vytvořeny a nám poskytnuty z laboratoře prof. Mitsuyoshi Nakao. Základní kostrou pro tyto plasmidy je vektor pGL3basic (Promega) s vloženým mnohočetným klonovacím místem plasmidu pBluescriptII SK (Promega), jež je ohraničené restričními místy NotI-KpnI. Modelový vektor pIHLE je tvořen genem kódující enzym luciferázu pocházející ze světlušky (*Photinus pyralis*). Enzym světluškové luciferázy katalyzuje bioluminiscenční reakci. Transkripci světluškové luciferázy řídí promotor myšního genu *H19* (-818 až +6 bp od transkripčního počátku genu *H19*), enhancer SV40 a 1,8 kb dlouhý fragment ohraničený restričními místy AatII-HindIII obsahující insulátorovou oblast genu *H19*. Vektor pIHLIE obsahuje druhou insulátorovou oblast umístěnou mezi genem luciferázy a enhancerem. U testovacího vektoru pIHLME, který je konstrukčně totožný s vektorem pIHLIE, byla v insulátorové oblasti uloženy mezi enhancerem a luciferázovým genem provedena mutagenese čtyř vazebných míst proteinu CTCF. Vazebné sekvence pro CTCF 5'-GGA GTT GCC GCG TGG TGG CAG CAA-3', 5'-AGG GTT GCC GCA CGG CGG CAG TGA-3', 5'-GGA TGC TAC CGC GCG GTG GCA GCA-3' a 5'-AGA CGA TGC CGC GTG GTG GCA GTA-3' byly konvertovány na 5'-GAA GTT GCC GAG CAG CGA CCA GTG C-3' (Ishihara et al., 2006).

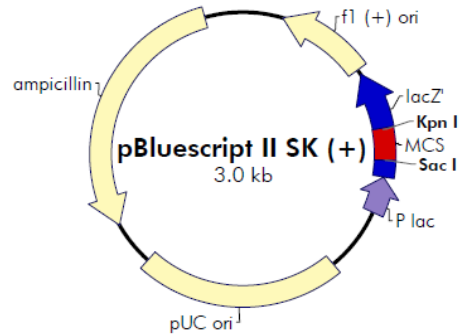
Renilový kontrolní vektor (pRL TK)

Renilový kontrolní vektor je vektor kódující cDNA luciferázy korálovce *Renilla reniformis*. Vektor konstitutivně produkuje enzym renilovou luciferázu, který katalyzuje bioluminiscenční reakci. Renilový vektor se transfekuje do savčích buněk společně s vektorem exprimujícím světluškovou luciferázu. Exprese renilové luciferázy poskytuje vnitřní kontrolní hodnotu, na níž se normalizuje množství experimentální světluškové luciferázy. pRL-TK obsahuje promotor tymidinové kinázy herpes simplex viru (HSV-TK), který umožňuje nízkou až středně vysokou úroveň exprese renilové luciferázy v transfekovaných buňkách. Vektor je komerčně dostupný u firmy Promega (katalog. číslo E2241).

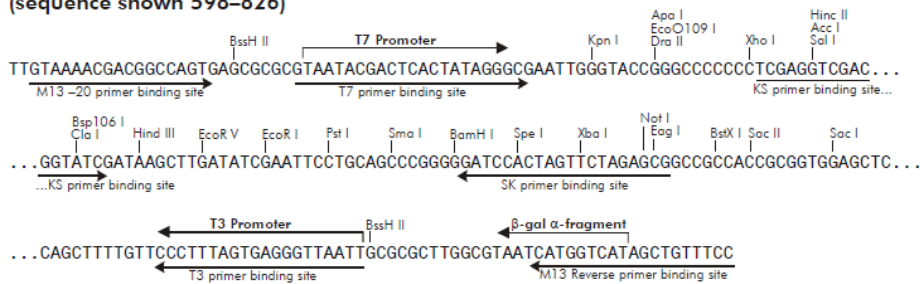
pBluescript II SK (+)(pBSK+)

pBSK+ je tradiční komerční plasmid s replikačním počátkem bakteriofága f1. Jedná se o standardní klonovací vektor s orientací (+) intergenové oblasti F1, jež umožňuje přepis sense řetězce jednovláknové DNA. V naší práci byl tento vektor použit prázdný jako kontrolní plasmid u experimentů s transfekcemi expresních plasmidů (Obrázek 4). Plasmid je komerčně dostupný u firmy Agilent Technologies (katalog. číslo 212205).

f1 (+) origin 135–441
β-galactosidase α-fragment 460–816
multiple cloning site 653–760
lac promoter 817–938
pUC origin 1158–1825
ampicillin resistance (bla) ORF 1976–2833



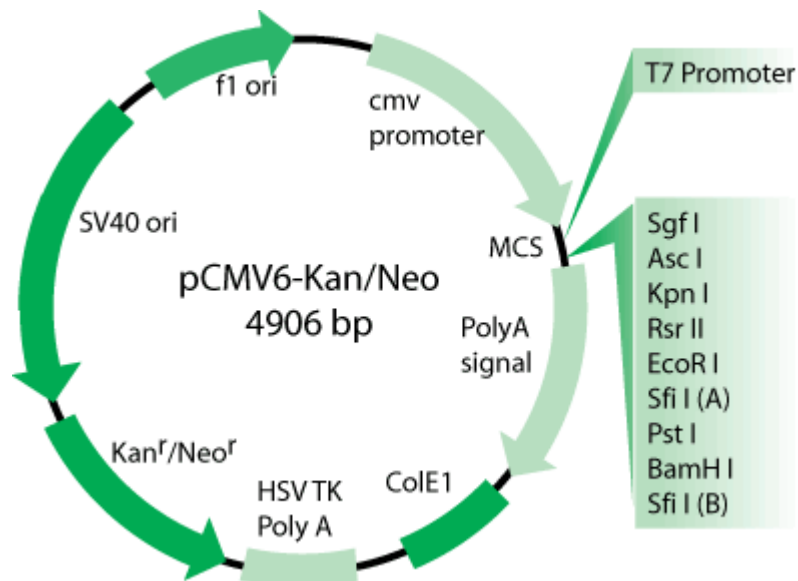
pBluescript II SK (+/-) Multiple Cloning Site Region (sequence shown 598–826)



Obrázek 4: Schéma DNA vektoru pBSK+.Schéma podrobně znázorňuje pořadí míst pro restriční endonukleázy v mnočetném klonovacím místě, replikační počátek bakteriofága f1, gen kódující rezistenci vůči ampicilinu a další vlastnosti plasmidu.Obrázek byl převzat z webových stránek: http://www.genomics.agilent.com/files/Vectors/Maps/pdf/pBluescript_SK_plus.pdf

Expresní vektor cDNA Ctcf (pCTCF)

pCTCF je expresní plasmid kódující cDNA Ctcf. cDNA Ctcf pochází z knihovny cDNA různých myších tkání a je zaklonována do vektoru pCMV6 mezi restričními místy EcoR I a Not I. Inset je veliký 2211 bp. Expresi insertu cDNA Ctcf kontroluje CMV promotor. Vektor disponuje rezistencí vůči kanamycinu a neomycinu (Obrázek 5). Vektor je komerčně dostupný u firmy Origene (katalog. číslo MC202667).

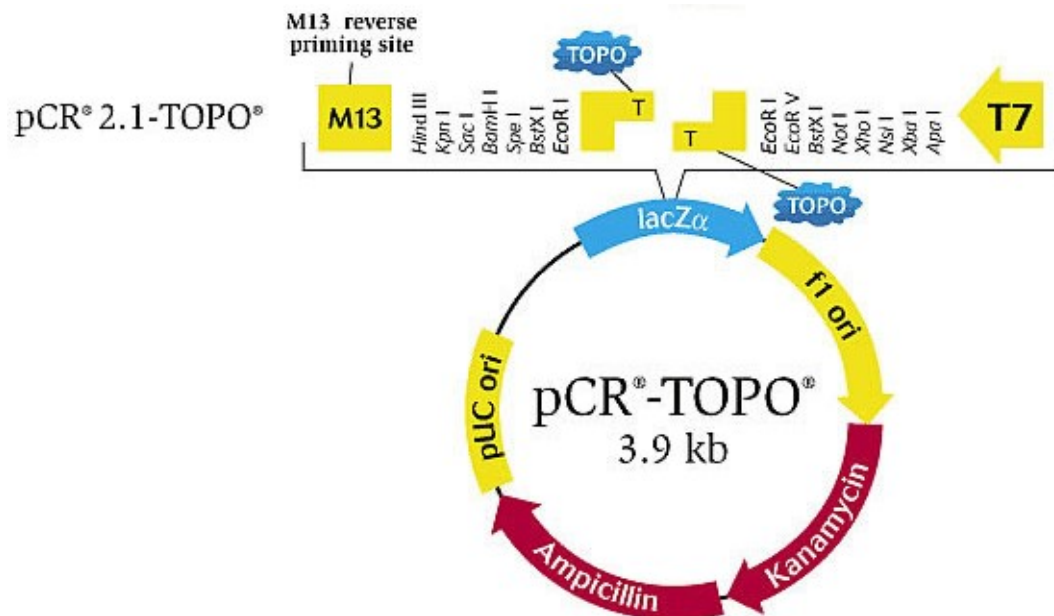


Obrázek 5: Schéma DNA vektoru pCTCF a uspořádání jeho klonovacího místa. Schéma znázorňuje pořadí míst pro restriční endonukleázy v klonovacím místě, promotor CMV, replikační počátky: bakteriofágový f1, savčí SV40, bakteriální ColE1; a geny kódující rezistenci na ampicilin a kanamycin a další vlastnosti plasmidu. Obrázek byl v upravené podobě převzat z webových stránek: <http://www.origene.com/assets/Images/MouseClones/pCMV6-KanNeosfii.gif>

pCR 2.1[®]-TOPO[®] vektor

Vektor pCR 2.1[®]-TOPO[®] se používá k přímému klonování produktů PCR, které byly namnoženy *Taq* polymerázou. *Taq* polymeráza zakončuje PCR přidáním jedné molekuly deoxyadeninu (A) na 3'- konce namnožených úseků DNA. Vektor pCR 2.1[®]-TOPO[®] se dodává v rozvolněné formě a obsahuje nepárový přečnívající konec s deoxythymidiem (T). Zaklonování produktu PCR do vektoru pCR 2.1[®]-TOPO[®] probíhá za účasti kovalentně vázaných molekul enzymu topoizomerázy I. Plasmid obsahuje ampicilinovou i kanamycinovou rezistenci a gen kódující alfa-fragment (polypeptid) beta-galaktosidázy (*LacZα*), který je používán pro barevnou selekci bakterií s úspěšně vnesenou cizí DNA do vektoru. Gen *LacZα* je uložen v mnohočetném klonovacím místě vektoru (Obrázek 6). Vložením PCR produktu do mnohočetného klonovacího místa se naruší gen *LacZα*, čímž nedochází k produkci

funkčního enzymu beta-galaktosidázy (bílé kolonie). Vektor bez vneseného PCR produktu kóduje funkční enzym beta-galaktosidázu a štěpí substrát 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-galaktopyranosid (X-Gal) (modré kolonie). Vektor je komerčně dostupný u firmy Life technologies (katalog. číslo K4550-01).

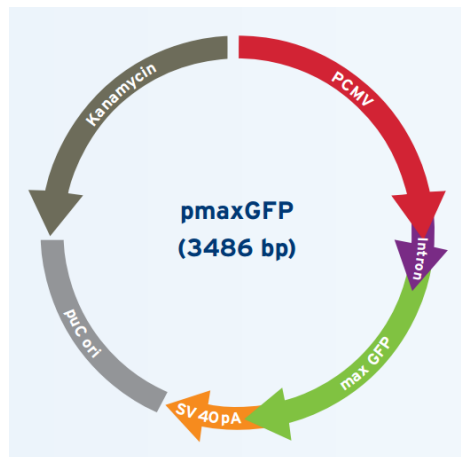


Obrázek 6: Schéma DNA vektoru pCR 2.1[®]-TOPO[®] a uspořádání jeho klonovacího místa. Schéma znázorňuje pořadí míst pro restriční endonukleázy v klonovacím místě, naznačené přečnívající 3'-deoxythymidiny (T) s kovalentně vázanými molekulami topoizomerázy I, geny kódující rezistenci na ampicilin a kanamycin a další vlastnosti plasmidu. Obrázek byl v upravené podobě převzat z web. stránek: <https://www.lifetechnologies.com/order/catalog/product/450641>

Plasmid maxGFP (pmaxGFP)

pmaxGFP kóduje zelený fluorescenční protein (maxGFP), který pochází z korýše buchanky (*Pontellina p.*). Plasmid se používá k jednoduchému sledování úspěšnosti transfekce pomocí cytometrie nebo fluorescenční mikroskopie. Vektor

disponuje kanamycinovou rezistencí (Obrázek 7). Vektor je komerčně dostupný u firmy Lonza a je součástí nukleofekčních kitů.



Obrázek 7: Schéma DNA vektoru pmaxGFP. Schéma znázorňuje gen kódující maxGFP, rezistenci na kanamycin a další vlastnosti plasmidu. Obrázek byl převzat z web. stránek: http://bio.lonza.com/fileadmin/groups/FAQs/public/Technology_Flyer.pdf

Bakteriální kmeny

***Escherichia Coli* One Shot TOP 10**

Genotyp: F-*mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) Φ 80*lacZ* Δ M15 Δ *lacX74 recA1 araD139* Δ (*araleu*) 7697 *galU galK rpsL* (Str^R) *endA1 nupG*

Escherichia Coli One Shot TOP 10 jsou chemicky kompetentní buňky používané pro klonování a následnou selekci na základě barvy kolonií. *Escherichia Coli* One Shot TOP 10 vyžaduje přidání substrátu X-Gal pro enzym beta-galaktosidázu (LacZ) avšak nevyžaduje přidání induktoru exprese LacZ isopropyl-beta-D-thiogalaktopyranosid (IPTG) do živné půdy. Bakterie s vneseným funkčním enzymem beta-galaktosidázou štěpí X-Gal, tyto kolonie se zbarví výrazně modře, bakterie s nefunkčním enzymem beta-galaktosidázou se zbarví bíle (bíle zbarvená kolonie obsahuje zaklonovaný DNA produkt, modře zbarvená jej neobsahuje).

Escherichia Coli One Shot TOP10 je komerčně dostupný bakteriální kmen, jež dodává společnost Life Technologies (kat. číslo C4040-03).

Escherichia Coli DH5α

Genotyp: *F- Φ80lacZΔM15Δ(Lacha-argF)U169 recA1 endA1 hsdR17(rk,mk+) - phoAsupE44 thi-1 gyrA96 relA1 λ-*

Escherichia Coli DH5α je univerzální kmen kompetentních buněk využívaných pro rutinní postupy při klonování. V naší práci byl tento kmen používán k transformaci a množení plasmidové DNA. *Escherichia Coli DH5α* je komerčně dostupný bakteriální kmen, jež dodává Invitrogen (kat. číslo 18265-017).

Buněčné linie

MEL

Myší erytroleukemické buňky. Jedná se o erytroidní prekurzory zablokované v pozdějším stádiu erytroidní diferenciaci (podle FAB klasifikace jde o transformovanou AML-M6b). Buňky MEL jsou transformované retrovirem SFFV. Retrovirus je integrovaný do regulační oblasti URE genu *SPI1* a narušuje jeho fyziologickou expresi (Moreau-Gachelin, 2006)(DSMZ, Braunschweig, Německo; ACC 501). Buňky MEL stabilně transfekované cDNA obsahující tři kopie krátké vlásenkové RNA (shRNA) komplementární k mRNA Smarca5 (MEL-shSmarca5) nám byly poskytnuty z laboratoře profesora Arthur I. Skoultchi. Exprese Smarca5shRNA je aktivována v přítomnosti doxycyklinu (DOX), který působí na reverzní tetracyklinem kontrolovaný transaktivátor rtTA v systému Tet-On.

K562

Lidské buňky chronické myeloidní leukémie. Jedná se o buňky, které byly izolovány z buněk 53-leté ženy s chronickou myeloidní leukémií v blastické krizi v roce 1970. (DSMZ, Braunschweig, Německo; ACC 10)

HeLa

Lidské buňky adenokarcinomu děložního čípku. Jedná se o epitelální buňky, které byly izolovány z buněk 31-leté ženy (Henrietty Lacks) v roce 1951. (DSMZ, Braunschweig, Německo; ACC 57)

OCI-M2

Lidské buňky AML. Jedná se o buňky MDS transformované do erytroleukémie (AML-M6). Buňky OCI-M2 mohou po indukci diferencovat do erytroidní nebo megakaryocytárně/monocytární vývojové řady. Buňky OCI-M2 byly izolovány z leukemických buněk 56-letého muže v roce 1984. (DSMZ, Braunschweig, Německo; ACC 619)

Vzorky pacientů s MDS/AML a kontroly

Naše pracoviště úzce spolupracuje s I. interní klinikou – kliniky hematologie Všeobecné fakultní nemocnice v Praze. Za podpory MUDr. Anny Jonášové a Prof. MUDr. Marka Trněného, CSc. se od roku 2006 na našem pracovišti shromažďují vzorky kostní dřeně (a periferní krve) pacientů s MDS, AML a dalšími hematologickými malignitami. Vzorky byly od pacientů získány na základě informovaného souhlasu (v souladu s požadavky Helsinské deklarace). V tomto projektu jsme zkoumali dva pacienty s pokročilým stádiem MDS ve vyšším riziku a dva pacienty s AML s myelodysplastickými rysy. Soubor pacientů se skládá ze 3 mužů a 1 ženy. Medián pacientů je 71 let (v rozmezí od 65-72). Diagnostické a prognostické zhodnocení bylo provedeno pomocí klasifikace WHO 2008: RAEB 1 (1 pacient), RAEB 2 (1 pacient), AML s myelodysplastickými rysy (1 pacient), AML s genetickou abnormalitou (inv(3)(q21;q26.2) nebo t(3;3)(q21;q26.2); RPN1-EV11) (1 pacient). Vzorky pacientů byly odebrány v době diagnózy onemocnění a před započítím léčby AZA a nebo po terapii AZA. Klinické parametry pacientů jsou popsány níže (Tabulka 12). Jako kontroly byly použity CD34+ progenitorové buňky jednoho dárce periferní krve a směs normálně vyžívajících myeloidních buněk

získaných z periferní krve (95% zastoupení myeloidních buněk) jednoho dárce v kompletní remisi po lymfomu, který byl v době odběru stimulován terapií G-CSF.

Primery a hydrolizační sondy

Primery normalizačních (house-keeping) genů pro RT-qPCR.

Označení primeru	Sekvence primeru	Roche sonda
mGapdh(mRNA)-F#77	ACTTTGTCAAGCTCATTTCCTGGTATG	#77
mGapdh(mRNA)-R#77	TTTCTTACTCCTTGGAGGCCATGTAG	#77
mHprt1(mRNA)-F#95	CTTCCTCCTCAGACCGCTTTTTGCC	#95
mHprt1(mRNA)-R#95	TAACCTGGTTCATCATCGCTAATCACG	#95
hGAPDH-F#60	AGCCACATCGCTCAGACAC	#60
hGAPDH-R#60	GCCCAATACGACCAAATCC	#60
hHPRT-F#73	TGACCTTGATTTATTTTGCATACC	#73
hHPRT-R#73	CGAGCAAGACGTTTCAGTCCT	#73

Tabulka 3. Primery normalizačních (house-keeping) genů pro RT-qPCR. Primery, jejichž označení začíná písmenem m (murine; myší), byly použity jako normalizační kontroly pro stanovení exprese mRNA vybraných genů v buňkách MEL-shSmarca5. Primery, jejichž označení začíná písmenem h (human; lidské), byly použity jako normalizační kontroly pro stanovení exprese mRNA vybraných genů v OCI-M2 buněčné linii MDS/AML. V každé dvojici primerů je jeden označen jako F (forward, vpřed) a druhý jako R (reverse, zpět). Primery byly navrženy s pomocí programu ProbeFinder Version 2.45.

Primery pro stanovení exprese mRNA vybraných genů metodou RT-qPCR.

Označení primeru	Sekvence primeru	Roche sonda
mSnf2h(mRNA)WM-F#88	TGCTTTCAGTTGGAGATTACCGACACC	#88
mSnf2h(mRNA)W-R1#88	TGATGGAGAATCTTCAAATCGAGTACAAAC	#88
mIgf2(mRNA)-F2#40	ACGCTTCAGTTTGTCTGTTCCGGACC	#40
mIgf2(mRNA)-R2#40	AAGCAGCACTCTTCCACGATGCCAC	#40
mH19(mRNA)-F#67	GTCTCGAAGAGCTCGGACTG	#67
mH19(mRNA)-R#67	ACTGGCAGGCACATCCAC	#67
mSfpi1(mRNA)-F#94	CTGATGGAGAAGCTGATGGCTTGG	#94
mSfpi1(mRNA)-R#94	AGCAGGAAGTGGTACAGGCGAATC	#94
mCebpa(mRNA)-F#67	AAACAACGCAACGTGGAGA	#67
mCebpa(mRNA)-R#67	GCGGTCATTGTCACTGGTC	#67
hSPI1 #27 F	CCACTGGAGGTGTCTGACG	#27
hSPI1 #27 R	CTGGTACAGGCGGATCTTCT	#27
hCEBPA F #28	GGAGCTGAGATCCCGACA	#28
hCEBPA R #28	TTCTAAGGACAGGCGTGGAG	#28
hITGAM(mRNA)-F#36	ACCCCTGGTTCACCTCCT	#36
hITGAM(mRNA)-R#36	CATGACATAAGGTCAAGGCTGT	#36
hMPO(mRNA)-F#38	CGTCAACTGCGAGACCAG	#38
hMPO(mRNA)-R#38	GTCATTGGGCGGGATCTT	#38
hGelBmRNAp6F	GAACCAATCTCACCGAGG	#6
hGelBmRNAp6R	GCCACCCGAGTGTAACCATA	#6
hCSF1R F #14	TCTGGTCCTATGGCATCCTC	#14
hCSF1R R #14	TGCCAGGGTAGGGATTCA	#14
hCSF3R F #18	GTCCAAGATCACAAAGCTGGT	#18
hCSF3R R #18	CCGCACTCCTCCAGACTTC	#18
hFOS F #67	CTACCACTCACCCGCAGACT	#67
hFOS R #67	AGGTCCGTGCAGAAGTCCT	#67
hEGR2(mRNA)-F#3	AACGGAGTGGCCGGAGATGGCATG	#3

hEGR2(mRNA)-R#3	TGCAGAGACGGGAGCAAAGCTGCTG	#3
hCTCF (mRNA)-F#55	CCAGAGCCTCAGCCTGTGACCC	#55
hCTCF (mRNA)-R#55	CAACCTGAATGATAGCTGTTGGCTGG	#55
hSMARCA5(mRNA)-F#32	AGTAACCAACAGTGGCAAATGGTG	#32
hSMARCA5(mRNA)-R#32	TGACTGAAGATTAGTACTCGTGAACC	#32

Tabulka 4. Primery pro stanovení exprese mRNA vybraných genů metodou RT-qPCR. Primery, jejichž označení začíná písmenem m (murine; myši), byly použity pro stanovení exprese mRNA vybraných genů buňkách MEL-shSmarca5. Primery, jejichž označení začíná písmenem h (human; lidské), byly použity pro stanovení exprese mRNA vybraných genů OCI-M2 buněčné linii MDS/AML. V každé dvojici primerů je jeden označen jako F (forwad, vpřed) a druhý jako R (reverse, zpět). Primery používající Roche hydrolyzační sondy byly navrženy s pomocí programu ProbeFinder Version 2.45.

Hydrolyzační sondy Roche (TaqMan) použité pro kvantifikaci exprese mRNA vybraných genů.

Název sondy	Sekvence sondy	Katalogové číslo
#3	CCCAGCAG	#04685008001
#6	TTCCTCTG	#04685024001
#14	CTGGGAGA	#04685130001
#18	TCCTGCTG	#04686918001
#27	CAGGCAGC	#04687582001
#28	CCAGCCGC	#04687604001
#32	CTGCTCCC	#04687655001
#36	CTGGCTCC	#04687949001
#38	CTGCTTCC	#04687965001
#40	CAGCAGGC	#04687990001
#55	TCCTCTCC	#04688520001
#60	CTTCCCA	#04688589001
#67	TGCTGGAG	#04688660001
#73	TCCTCAGC	#04688961001
#77	CCACCACC	#04689003001
#88	CATCCTCC	#04689135001
#94	CTGTCTCC	#04692110001
#95	CTGGGACT	#04692128001

Tabulka 5. Hydrolyzační sondy Roche

Primery použité v metodě chromatinové imunoprecipitace (ChIP) pro mapování vazby epigenetických faktorů v oblasti ICR genového lokusu *H19/Igf2*.

Označení primeru	Sekvence primeru
mH19(-2,2kb)-F	GTTCACTCTCCACGCTGTGCAG
mH19(-2,2kb)-R	TCACAGCGGACCCCAACCTATG
mH19(-2,6kb)-F	CAAACCAGCCAGTGTGGCTCAC
mH19(-2,6kb)-R	AGTTGGCAGCATTGGGCCACG
mH19(-3,1kb)-F	TGGCTGGTTTGTGGCAGATAATCG
mH19(-3,1kb)-R	GCATAGGTGTCCTGCCTTCTGC
mH19(-3,7kb)-F	CAACAAGGTCGGCTTACTCTCTGC
mH19(-3,7kb)-R	CCGTTTTAGGACTGCGATGTACGAG

Tabulka 6. Primery použité v metodě ChIP pro mapování přítomnosti Ctfc a Smarca5 v oblasti ICR genového lokusu *H19/Igf2*. V každé dvojici primerů pokrývajících určitou oblast (její lokalizace uvedená v závorce je vztažena k místu počátku transkripce genu *H19*) je jeden označen jako F (forwad, vpřed) a druhý jako R (reverse, zpět). Primery pro metodu ChIP byly navrženy pomocí programu Primer3. Pro určení Ctfc a Smarca5 metodou ChIP jsme využili Fast SYBR Green master Mix. SYBR Green je fluorescenční kyaninové barvivo, které se nespecificky váže na menší žlábkovité dvojřetězcové DNA. Výhodou tohoto systému je, že nevyžaduje použití sondy (pro každou unikátní namnoženou sekvenci), ale zároveň se vyznačuje vysokou senzitivitou.

Primery použité v metoděChIP pro mapování vazby epigenetických faktorů ve vzdálených regulačních oblastech genu *SPI1*.

Označení primeru	Sekvence primeru
hPU.1 (-17.5kb)-F	GGATGGCTGAGGTTGATGGTTGA
hPU.1 (-17.5kb)-R	CAGCAGACAGGGATGAAGACAGAAGA
hPU.1 (-17.2kb)-F	CCGCACTCCTCCAGACTTC
hPU.1 (-17.2kb)-R	CATGGGGACCTGCCAGGCAG
hPU.1 (-16,6)-F	CCTGACCCACATTCTGATT
hPU.1 (-16,6)-R	CTTCTTCTGGGCTCTCAGC
hPU.1 (-15,62)-F	ATCTGGGAGGACTAGGCTTT
hPU.1 (-15,62)-R	AATGACCGCGTCTTCTTTCT
hPU.1 (-15,28)-F	GCTTCTGGTCAAGTTTGCTG
hPU.1 (-15,28)-R	GGACTTGGGTTTTAGGGGAG
hPU.1 (-14,36)-F	TCATGCTTGGAAACACTCCA
hPU.1 (-14,36)-R	TGTCTGCTTGAAGGTCAAGG
hPU.1 (-13,7kb)-F	GGCAGGAAGATCACTTGAGCCAG
hPU.1 (-13,7kb)-R	GCAATCCTCCCACCTCAGCTTCC
hPU.1 (-13.4kb)-F	TGTGACCAGGGCAGGAGCAGG
hPU.1 (-13.4kb)-R	GCCAGCCAGGGAAGGTAACAGG
hPU.1 (-13,3kb)-F	CCTCCTGACCAGTCCCAACTGAGG
hPU.1 (-13,3kb)-R	TGTAGAAACAGCTTGTGCCCAGCAC
hPU.1 (-12,47kb)-F	GGGCATCCCTGCACTGTTCTTG
hPU.1 (-12,47kb)-R	CTGAGTGTGTGCCTTGAGCCCTTG
hPU.1 (-11.0kb)-F	TGGCAGCCTGGAGGAGGCAAG
hPU.1 (-11.0kb)-R	GGACACCGCTCAGCATTCCTGG
hPU.1 (-9.7kb)-F	AGCCTCTCCAGTGTCTCAACCAT
hPU.1 (-9.7kb)-R	TAGCAACCTGTCCCATAGGGTGT
hPU.1 (-0,15kb)-F	TCCCTCTCAGTCCCAGCTTCCTC
hPU.1 (-0,15kb)-R	CCGTTTGCATAAATCTCTTGCGCTAC

Tabulka 7. Primery použité v metodě ChIP pro mapování přítomnosti CTCF a SMARCA5 ve vzdálených regulačních oblastech lidského genu *SPI1*. V každé dvojici primerů pokrývajících určitou oblast (její lokalizace uvedená v závorce je vztažena k místu počátku transkripce genu *SPI1*) je jeden označen jako F (forwad, vpřed) a

druhý jako R (reverse, zpět). Primery pro metodu ChIP byly navrženy s pomocí programu Primer3. Pro určení CTCF a SMARCA5 metodou ChIP jsme využili Fast SYBR Green master Mix. SYBR Green je fluorescenční kyaninové barvivo, které se nespecificky váže na menší žlábek dvojřetězcové DNA. Výhodou tohoto systému je, že nevyžaduje použití sondy (pro každou unikátní namnoženou sekvenci), ale zároveň vyznačuje vysokou senzitivitou.

Rovnice popisující standardní křivky dvojic primerů použitých v metodě ChIP.

Označení primeru	Rovnice popisující standardní křivky
hPU.1 (-17,5kb)	$y = -3,8146x + 46,954$
hPU.1 (-17,2kb)	$y = -3,1112x + 44,763$
hPU.1 (-16,6kb)	$y = -3,1672x + 43,418$
hPU.1 (-15,62kb)	$y = -3,0448x + 42,101$
hPU.1 (-15,28kb)	$y = -3,3268x + 43,899$
hPU.1 (-14,36kb)	$y = -3,4276x + 44,034$
hPU.1 (-13,7kb)	$y = -3,5392x + 30,999$
hPU.1 (-13,4kb)	$y = -3,6099x + 46,113$
hPU.1 (-13,3kb)	$y = -4,0701x + 45,487$
hPU.1 (-12,47kb)	$y = -3,3102x + 41,628$
hPU.1 (-11,0kb)	$y = -3,3017x + 43,927$
hPU.1 (-9,7kb)	$y = -2,7164x + 40,839$
hPU.1 (-0,15kb)	$y = -4,2788x + 46,984$
mH19(-2,2kb)	$y = -3,7261x + 41,716$
mH19(-2,6kb)	$y = -3,8635x + 41,888$
mH19(-3,1kb)	$y = -3,349x + 39,320$
mH19(-3,7kb)	$y = -3,5516x + 40,591$

Tabulka 8. Rovnice popisující standardní křivky dvojic primerů použitých v metodě ChIP. Dvojice primerů je označena číslem vyjadřujícím lokalizaci úseku namnožených PCR vztaženou k místu počátku transkripce genu *SPI1* anebo genu *H19* (v kb).

Primery na PCR ke studiu DNA metylace v genové oblasti *SPI1*.

Označení primeru	Sekvence primeru
hPU.1 (-11kb)-F conv.	GGTTAGTAGGGATAAGGGTGTG
hPU.1 (-11kb)-R conv.	TCAAACCCCTCAAACCTATAC
hPU.1 (-14,4kb)-F3 conv.	AAATTAGGAGAAGTGAAGTGGTTG
hPU.1 (-14,4kb)-R3 conv.	CCATCTATCCCAACTCAAATCTATA
hPU.1 (-15,6kb)-F conv.	GTGGGAGGAGTAGGTTTATGTT
hPU.1 (-15,6kb)-R3 conv.	CCTCCCCTTCTTACAATATCAAC

Tabulka 9. Primery použité v metodě bisulfitové sekvenování testující stav metylace DNA v predikovaných vazebných místech pro CTCF. Design primerů pro studium metylace DNA jsem prováděla ve volně dostupném programu Methyl Primer Express Software Version 1.0. Primery jsou navrhovány na bisulfitem konvertovanou DNA. Působení bisulfitu způsobuje, že všechny nemetylované cytosiny jsou přeměněny na uracily. Proto primery komplementární k těmto cytosinům obsahují thyminy. V každé dvojici primerů pokrývajících určitou oblast (její lokalizace je uvedena v závorce a je vztažena k místu počátku transkripce genu *SPI1*) je jeden označen jako F (forwad, vpřed) a druhý jako R (reverse, zpět).

Protilátky

Primární protilátky

Označení protilátky	Klon	Výrobce	Kat. číslo	Použití
Anti-Smarca5		Chemicon	MAB3644	IF
Anti-hSNF2H rabbit polyc.		EMD Millipore	07-624	Co-IP, WB
Anti-SNF2H rabbit polyc.		Abcam	ab3749	ChIP
Anti-CTCF rabbit polyc.		Abcam	ab 10571	Co-IP,ChIP
Anti-Ctcf rabbit polyc.	H-280	Santa Cruz Biotech.	sc-28189	IF
Anti-Ctcf rabbit polyc.		EMD Millipore	07-729	WB
Anti-PU.1 rabbit polyc.	T-21	Santa Cruz Biotech.	sc-352	WB
Anti-RAD21 rabbit polyc.		Abcam	ab992	ChIP
Anti-SMC1 rabbit polyc.		Abcam	ab9262	ChIP
Normal rabbit IgG		Calbiochem	NI01	Co-IP, ChIP
Anti-Actin –HRP conj.	I-19	Santa Cruz Biotech.	sc-1616HRP	WB
PE- anti- human-CD34	581	BD Biosciences	CAT343506	FACS

Tabulka 10. Seznam použitých primárních protilátek.

Sekundární protilátky

Označení protilátky	Klon	Výrobce	Kat. číslo	Použití
Anti-Rabbit IgG-HRP conj.		Jackson Immuno.Lab.	80919	WB
Normal Rabbit IgG		EMD Biosciences	NI01	ChIP
F(ab') ₂ -Goat anti-Mouse IgG (H+L) polyc. Alexa Fluor® 594 conj.		LifeTech	A-11020	IF
F(ab') ₂ -Goat anti-Rabbit IgG (H+L) polyc. Alexa Fluor® 488 conj.		LifeTech	A-11070	IF

Tabulka 11. Seznam použitých sekundárních protilátek.

Chemikálie, enzymy a standardy molekulových hmotností

Chemikálie	Výrobce	Kat.číslo
Agarose I	Amresco	071046
Albumin, from bovine serum (BSA)	Sigma-Aldrich	A2153
Azacitidin/Vidaza	Celgene Europe, Ltd.	(z lékárny)
Biocoll Separating Solution	Biochrom AG	L615
BLOCK-iT™ Fluorescent Oligo	Life Technologies	13750062
Bradford Reagent	Amresco	E530
Deoxycholic acid, sodium salt	Amresco	0613
Dimethylsulfoxid	Carl Roth GmbH	A994.2
DL-Dithiothreitol (DTT)	Amresco	0281
Doxycycline hyclate	Sigma Aldrich	D9891
dNTPs Mix (nukleotidy)	Takara Bio	4030
EDTA	Riedel-deHaën	27270
EGTA	Amresco	0732
Ethidium bromid	Amresco	1239-45-8
Ethanol 99% p.a.	Petr Švec – Penta	02862 1
Fast SYBR Green master Mix	Life Technologies	4385612
Fenol	Sigma	P4557
Formaldehyde 37% solution	Electron Micro. Scienc.	15680
G-CSF (Neupogen)	Amgen	(z lékárny)
Glycine	Amresco	0167
Glycerol	Amresco	0854
HEPES	Amresco	0485
Chlorid amonný	Petr Lukeš	ES 235-186-4
Chloroform p.a.	Petr Švec – Penta	25692 1
Igepal CA-630	Sigma-Aldrich	I8896
Isopropylalkohol p.a.	Petr Švec – Penta	59300 1
Kyselina octová 99% p.a.	Petr Švec – Penta	45731 1
LA PCR Buffer II (Mg ₂₊ plus) (10x)	Takara Bio	(samostatně neprodáván)
Linear acrylamide	Life Technologies	AM9520
Lipofectamine 2000 Transfection reagent	Life Technologies	11668-027
MassRuler™ DNA Ladder, Low range	Fermentas	SM0383
6x MassRuler™ Loading Dye solution	Fermentas	R0621

Chemikálie	Výrobce	Kat.číslo
Methanol HPLC	Carl Roth GmbH	P717.1
Nuclease eliminator	Amresco	E891
Formaldehyd		
Ponceau S	Sigma-Aldrich	P3504
Precision Protein Dual Color Standards	BIO-RAD	161-0374
Propidium jodid	Sigma-Aldrich	P4170
Protease Inhibitor Cocktail (P8340)	Sigma-Aldrich	P8340
Protein-A-agarose	Sigma-Aldrich	P7786
Protein-G-Agarose	Sigma-Aldrich	P4691
Proteinase K	Sigma-Aldrich	P4850
Ribonuclease A	Sigma-Aldrich	R4642
RiboZol	Amresco	N580
siRNA ON-TARGETplus Non-targeting Pool	Dharmacon	D-001810-10
siRNA Mouse Ctcf (13018)ON-TARGETplus	Dharmacon	L-044693-01
siRNA hSMARCA5	Ambion	s16082
siRNA negative control #1	Life Technologies	AM4611
Sodium dodecyl sulfate	Amresco	M107
Sodium chloride	Amresco	O241
TaKaRa LA Taq™ Hot Start Version	Takara Bio	RR042A
JumpStart™ Taq DNA Polymerase	Sigma Aldrich	D9307
TaqMan Universal master Mix II	Life Technologies	4427788
Tris-Hcl Ultrapure grade	Amresco	O234
Triton X-100	Amresco	O694
Tween 20	Amresco	O77
Vectashield Mounting Medium	Vector Lab.	H-1200

Roztoky, pufry

Komerčně dodávané pufry	Výrobce	Kat.číslo
NuPAGE LDS Sample Buffer (4x)	Life Technologies	NP0007
NuPAGE MOPS SDS Running Buffer (20x)	Life Technologies	NP0001
PBS – Dulbecco (10x)	Biochrom AG	L1835

Pufry a roztoky vlastní výroby **Složení (konečná koncentrace)**
RIPA lyzační pufr (WB, Co-IP) 50 mM Tris-Hcl; pH 8,0; 137 mM NaCl; 1% Igepal CA-630; 0,5% Deoxycholic acid sodiumsalt; 0,1% SDS; Protease Inhibitor Cocktail(ředění 1:1000)

11% formaldehydový roztok (ChIP) 11% formaldehyd; 0,1M NaCl; EDTA(pH 8,0); 1mM EDTA; 0,5mM EGTA; 50mM HEPES(pH 8,0)

Lyzační pufr erytrocytů 8,34 g NH₄Cl, 0,037 g EDTA, 1,0 g NaCl rozpuštěno v 1 L destilované vody

Pufry a roztoky vlastní výroby **Složení (konečná koncentrace)**

Lyzační pufr I (ChIP)	50 mM HEPES-KOH (pH 7,5); 140 mM NaCl; 1mM EDTA; 10% glycerol; 0,5% Igepal CA-630; 0,25% Triton X-100
Lyzační pufr II (ChIP)	1 mM EDTA (pH 8,0); 0,5 mM EGTA (pH 8,0); 10 mM Tris-Hcl (pH 8,0); 200 mM NaCl
Lyzační pufr III (ChIP)	1 mM EDTA (pH 8,0); 0,5 mM EGTA (pH 8,0); 10 mM Tris-Hcl (pH 8,0)
Paró's IP pufr (ChIP)	0,02% SDS; 2% Triton X-100; 4 mM EDTA (pH 8,0); 40 mM Tris-Hcl (pH 8,0); 300 mM NaCl
Paró's promývací pufr I (ChIP)	0,1% SDS; 1% Triton X-100; 2 mM EDTA (pH 8,0); 20 mM Tris-Hcl (pH 8,0); 50 mM NaCl
Paró's promývací pufr II (ChIP)	0,1% SDS; 1% Triton X-100; 1% EDTA (pH 8,0); 20 mM Tris-Hcl (pH 8,0); 500 mM NaCl
Pufr pro Proteinasu K (ChIP)	0,5% SDS; 25 mM EDTA (pH 8,0); 10 mM Tris-HCl (pH 8,0); 100 mM NaCl
MACS pufr	0,5% albumin z bovinního séra; 2 mM EDTA v PBS (pH 7,2)

Média, buněčná a bakteriální kultivace

Médium, kultivační substrát	Výrobce	Kat. číslo
DMEM- low glucose	Sigma-Aldrich	D5546
FBS	Biochrom AG	S0115
IMDM	Sigma-Aldrich	I3390
LB Agar	Sigma-Aldrich	L2897
LB Broth, Miller (Luria-Bertani)	Amresco	J106
NEAA (100x)	Sigma-Aldrich	M7145
Opti-MEM®I	Invitrogen	31985
Penicillin-Streptomycin solution	Amresco	K952
RPMI -1640	Sigma-Aldrich	R7388
S.O.C. Medium	Life Technologies	15544-034

Komerčně dodávané sady

Komerčně dodávaná sada	Výrobce	Kat. číslo
DNeasy Blood and Tissue Kit	Qiagen	69504
ECL Plus Western Blotting Detection System	GE Healthcare	RPN2132
Komerčně dodávaná sada	Výrobce	Kat. číslo

GenElute Plasmid Miniprep Kit	Sigma Aldrich	PLN350
Genelute Plasmid Midiprep Kit	Sigma Aldrich	PLD140
Human B Cell Nucleofector Kit	Lonza	VPA-1001
iBlot Gel Transfer Stacks, PVDF, Mini	Life Technologies	IB4010-02
iScript cDNA Synthesis Kit	BIO-RAD	170-8891
MethylCode Bisulfite Conversion kit	Invitrogen	MECOV-50
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen	28704
The Dual-Luciferase Reporter Assay System	Promega	E1910

Speciální přístroje a jiné vybavení

Přístroj

7900HT Fast Real-time PCR System
 Amaxa nukleofektor
 AutoMACS
 BD FACS Aria IIu
 Bioanalyzer 2100
 Biophotometr
 CL-XPosure Film (Clear Blue X-ray Film)
 Digital sonifier M500
 Genetic Analyzer 3500
 iBlot Gel Transfer System
 Luminometr Glomax 20/20®
 Mastercycler Gradient
 NuPAGE 10% Bis-Tris Gel 1.5mm X 10 well
 Spectrophotometer ND-1000

Výrobce

Life Technologies
 Lonza
 Milteny Biotec
 BD Biosciences
 Agilent Technol.
 Eppendorf
 Thermo Scientific
 Branson
 Life Technologies
 Life Technologies
 Promega
 Eppendorf
 Life Technologies
 NanoDrop Technol.

Speciální počítačové programy

Program

BiQ Analyzer

 FACSDiva software v.6.1
 Chromas 2.33
 Image J
 Luminometr Glomax
 Methyl Primer Express Software Version 1.0
 ProbeFinder Version 2.45
 Primer 3 Version 0.4.0.
 TIGR MultiExperimentViewer 4.0.01
 Vector NTI

Výrobce

Freeware (Max Planck Institut Informatik)
 BD Biosciences
 Technelysium Pty Ltd
 Freeware
 Promega
 Applied Biosystems
 Roche
 Freeware
 TM4 Microarray Software
 Life Technologies

Metody

Pracovní postup při nakládání s modelovými buněčnými liniemi a se vzorky pacientů s MDS, AML a zdravých jedinců.

Buňky buněčných linií MEL-shSmarca5, K562, HeLa a OCI-M2 byly kultivovány při 37°C a 5% atmosféře CO₂ v médiu podle doporučení dodavatele. Počet buněk v kultuře byl stanovován jejich spočítáním v Bürkerově komůrce.

Buňky MEL-shSmarca5 s integrovanou Smarca5 shRNA byly selektovány a kultivovány v médiu obsahujícím 0,5% puromycin a 2% G418. 24 hodin před zahájením aktivace exprese shSmarca5 byly buňky MEL-shSmarca5 promyty 1xPBS a dále kultivovány v médiu bez puromycinu. Exprese Smarca5 shRNA a s tím spjatý pokles proteinové hladiny Smarca5 v buněčné kultuře MEL-shSmarca5 byl navozen inkubací buněk v médiu obsahujícím doxycyklin o konečné koncentraci 1 µg/mL po dobu 96 hodin. Buňkám bylo kultivační médium s doxycyklinem vyměňováno v 24 hodinových intervalech a buněčná koncentrace byla udržována na 5x10⁵ buněk/mL. Ve stejných intervalech byly buňky odebírány pro analýzu RNA a proteinové úrovně Smarca5.

Buněčná kultura OCI-M2 byla ovlivňována růstovým faktorem G-CSF o konečné koncentraci 50 ng/ml a AZA o konečné koncentraci 5 µM jak bylo popsáno v odborném článku Čuřík et al. 2012. Čerstvý roztok AZA byl připraven rozpuštěním 25 mg prášku v 10 ml sterilního 1xPBS a následně přidán v příslušném objemu do 10 ml buněčné kultury tak, aby jeho výsledná koncentrace v kultuře dosáhla hodnoty 5 µM. Růstový faktor G-CSF byl ke kultuře přidán vždy 6 hodin před přidáním každé dávky AZA.

CD34+ buňky pacientů s MDS, AML a zdravého dárce byly získány z kostní dřeně gradientovou centrifugací přes vrstvu Biocoll a magnetickou separací na přístroji AutoMACS pomocí protilátky proti CD34 (klon 581/CD34) a proti CD11b (klon M1/70). Kvalita separovaných vzorků byla ověřena pomocí průtokové

cytometrie na přístroji BD FACS Aria II s použitím protilátky PE-anti-human-CD34 (klon 581).

Směs myeloidních buněk byla od dárce v kompletní remisi po vyléčení předchozího lymfomu (s normálně vyžívajícími myeloidními buňkami) získána z periferní krve. Zastoupení myeloidních buněk v periferní krvi bylo stanoveno metodou diferenciálního krevního rozpočtu. Periferní krev byla zbavena od erytrocytů osmotickou lýzou v lyzačním roztoku obsahujícím amonium chlorid.

Transientní transfekce

Transfekce buněk MEL-shSmarca5 pomocí lipofilního činidla DMRIE-c

24 hodin před transfekcí bylo na 24 jamkové destičky naseto 5×10^4 MEL-shSmarca5 buněk. Buňky byly před transfekcí promyty 1xPBS a přeneseny do 250 μ L čerstvého média bez antibiotik (90% DMEM, 10% FBS). V prvním kroku bylo inkubováno transfekční činidlo 4 μ L DMRIE-c se 125 μ L Opti-MEM (na 1 jamku) po dobu 30 minut při pokojové teplotě. V druhém kroku byly připraveny tyto transfekční směsi oligonukleotidů: (pro 1 jamku)

1) 25 nM siRNA CTCF + 25 nM Block IT + 125 μ L Opti-MEM

2) 25 nM neg. kontrola siRNA + 25 nM Block IT + 125 μ L Opti-MEM

Ke každé směsi bylo přidáno 125 μ L roztoku Opti-MEM/DMRIE-c, připraveného v prvním kroku a celá směs byla inkubována 20 minut při pokojové teplotě. Připravené směsi byly smíchány se suspenzí MEL-shSmarca5 buněk a po 5 hodinách bylo přidáno 250 μ L DMEM média (40% FBS, 1% Penicillin/Streptomycin). Po 24 hodinách se metodou průtokové cytometrie změnila GFP pozitivita transfekovaných buněk (účinnost transfekce byla 80-95%). Po 72 hodinách kultivace při 37°C a 5% atmosféře CO₂, byly buňky dále využity pro izolaci mRNA a následnou RT-qPCR analýzu (H19 a Igf2), pro analýzu proteinové úrovně (Ctcf) nebo pro určení Ctcf na DNA v oblasti ICR genového lokusu *H19/Igf2*.

Transfekce buněk HeLa pomocí lipofilního činidla Lipofektamin

24 hodin před transfekcí bylo na 24 jamkové destičky naseto $16-18 \times 10^4$ buněk HeLa. Buněčná konfluence v den transfekce dosahovala 80%. Buňky byly před zahájením transfekce promyty 1xPBS a přeneseny do 500 μL čerstvého média RPMI-1640 bez antibiotik. V prvním kroku bylo inkubováno 0,83 μL transfekčního činidla Lipofektaminu s 50 μL Opti-MEM (na 1 jamku) po dobu 5 minut při pokojové teplotě. V druhém kroku byly připraveny tyto transfekční směsi: (pro 1 jamku)

- 1) 0,178 μg pIHLE + 0,25 μg pmaxGFP + 0,2 μg Renila + 50 μL Opti-MEM
- 2) 0,25 μg pIHLE + 0,25 μg pmaxGFP + 0,2 μg Renila + 50 μL Opti-MEM
- 3) 0,25 μg pIHLME + 0,25 μg pmaxGFP + 0,2 μg Renila + 50 μL Opti-MEM
- 4) 0,178 μg pIHLE + 25nM siRNA CTCF + 0,25 μg pmaxGFP + 0,2 μg Renila + 50 μL Opti-MEM
- 5) 0,25 μg pIHLE + 25nM siRNA CTCF + 0,25 μg pmaxGFP + 0,2 μg Renila + 50 μL Opti-MEM
- 6) 0,25 μg pIHLME + 25nM siRNA CTCF + 0,25 μg pmaxGFP + 0,2 μg Renila + 50 μL Opti-MEM
- 7) 0,178 μg pIHLE + 20 pmol siRNA SMARCA5 + 0,25 μg pmaxGFP + 0,2 μg Renila + 50 μL Opti-MEM
- 8) 0,25 μg pIHLE + 20 pmol siRNA SMARCA5 + 0,25 μg pmaxGFP + 0,2 μg Renila + 50 μL Opti-MEM
- 9) 0,25 μg pIHLME + 20 pmol siRNA SMARCA5 + 0,25 μg pmaxGFP + 0,2 μg Renila + 50 μL Opti-MEM
- 10) 0,178 μg pIHLE + 25nM negativní kontrola siRNA + 0,25 μg pmaxGFP + 0,2 μg Renila + 50 μL Opti-MEM

11) 0,25 µg pHLIE + 25nM negativní kontrola siRNA + 0,25 µg pmaxGFP + 0,2 µg Renila +50 µL Opti-MEM

12) 0,25 µg pHLME + 25nM negativní kontrola siRNA + 0,25 µg pmaxGFP + 0,2 µg Renila +50 µL Opti-MEM

Ke každé směsi bylo přidáno 50 µL roztoku Opti-MEM/Lipofektaminu, připraveného v prvním kroku a celková směs byla inkubována 20 minut při pokojové teplotě. Připravené směsi byly přidány k HeLa buňkám (v duplikátech) a po 6 hodinách bylo přidáno 500 µL RPMI-1640 média (20% FBS, 1% Penicillin/Streptomycin). Po 24 hodinách byla metodou průtokové cytometrie změřena GFP pozitivita transfekovaných buněk (účinnost transfekce byla 75-95%). Po 72 hodinách kultivace při 37°C a 5% atmosféře CO₂, byly buňky dále využity pro stanovení luciferázové aktivity.

Transfekce buněk OCI-M2 pomocí nukleofektoru AMAXA

Lidká buněčná linie OCI-M2 byla elektroporována lidským B-buněčným nukleofekčním kitem (Human B-cells nucleofection kit) za použití nukleofektoru AMAXA. 24 hodin před transfekcí byly buňky kultivovány v médiu bez antibiotik (80% IMDM, 20% FBS). Před zahájením transfekce byly buňky promyty 1xPBS. 2 x10⁶ OCI-M2 buněk bylo smícháno s nukleofekčním roztokem a transfekováno oligonukleotidem 20 pmol siRNA SMARCA5 nebo 0,5 µg plasmidem pCTCF nebo 20 pmol negativní kontrolou siRNA nebo 0,5 µg kontrolního plasmidu pBSK+. Plasmid pmaxGFP byl kotransfekován pro určení a následnou separaci transfekovaných buněk. Pro transfekci byl použit program Y001. Ihned po nukleofekci byly buňky přeneseny do předeřhátého kultivačního media (37°C) a inkubovány při 37°C a 5% atmosféře CO₂. Po 72 hodinách byly buňky s pozitivním signálem GFP byly odseparovány na průtokovém cytometru BD FACS Aria IIu a využity pro izolaci proteinového lyzátu a následnou analýzu proteinové úrovně v buňkách OCI-M2.

Izolace RNA a přepis do cDNA

Z buněčné kultury bylo odebráno 2×10^5 - 1×10^6 buněk do 1,5 ml centrifugační zkumavky a buňky byly centrifugovány při pokojové teplotě 5 minut na 2200 otáč./min. Peleta buněk byla resuspendována v 700 μ l PBS a opět centrifugována při pokojové teplotě 5 minut na 2200 otáč./min. Peleta buněk byla lyzována v 400 μ l RiboZolu a ponechána 10 minut na pokojové teplotě. K buněčnému lyzátu byl přidán 1 μ l lineární akrylamid a 100 μ l předchlazeného chloroformu, směs byla promíchána na míchačce vortex po dobu 15 sekund a centrifugována při pokojové teplotě 7 minut na 11000 otáč./min. Po centrifugaci byla horní vodná fáze přenesena do nové 1,5 ml centrifugační zkumavky, spojená s chloroformem v objemu 1:1 a promíchána a centrifugována stejně jako v předchozím kroku. Svrchní vodná fáze byla přenesena do nové 1,5 ml zkumavky a byl k ní přidán isopropylalkohol v objemu 1:1. RNA byla uchována v isopropylalkoholu přes noc při teplotě -20°C . Druhý den byla vyprecipitovaná RNA centrifugována při 4°C 40 minut na 14 000 otáč./min. RNA peleta byla promyta 500 μ l 75% ethanolu, centrifugována při 4°C 10 minut při maximálních otáčkách a následně zbavena zbytků ethanolu (jeho odpařením) a rozpuštěna ve 30 μ l destilované vody. Kvalita (integrita) RNA byla ověřena na přístroji Bioanalyzer 2100 podle návodu udávaného výrobcem. Koncentrace a čistota RNA byla stanovena na přístroji Spectrophotometer ND-1000, tak aby poměr absorbancí A260/A280 byl v rozmezí 1,8-2,0. Z RNA izolované z buněčných linií MEL-shSmarca5 a OCI-M2 byl odebrán 1 μ g do 20 μ L celkového objemu jedné reakce na přepis do cDNA pomocí iScript cDNA Synthesis Kit. Reverzní transkripce proběhla na přístroji Mastercycler Gradient v těchto krocích: 1) $T=25^\circ\text{C}$, 5 minut; 2) $T=42^\circ\text{C}$, 30 minut; 3) $T=85^\circ\text{C}$, 5 minut; 4) $T=4^\circ\text{C}$, 5 minut. Přepsaná cDNA byla naředěna vodou do konečného objemu 50 μ l a uchována na -20°C k dalšímu použití.

Kvantitativní PCR v reálném čase (RT-qPCR) a vyhodnocení mRNA exprese

Pro RT-qPCR reakci byly odděleně připraveny dvě reakční směsi: cDNA-směs pro každý jednotlivý vzorek a primer-směs pro každý jednotlivý gen, jehož exprese byla studována. Následně byly tyto reakční směsi postupně napipetovány na destičku o 384 jamkách tak, aby do každé jamky byla napipetována kombinace z jedné cDNA směsi (4 μ l) a z jedné primer směsi (4 μ l). Celkový objem PCR reakce na jednu jamku byl 8 μ l. Každá PCR reakce (unikátní kombinace cDNA-směsi a primer-směsi) byla v dané experimentu napipetována jako duplikát.

Složení PCR reakce s hydrolyzačními sondami (pro jednu jamku):

1) cDNA směs: TaqMan Universal master Mix II 2 μ l; voda 1,5 μ l; cDNA 0,5 μ l

2) primer směs: TaqMan Universal master Mix II 2 μ l; voda 1,7 μ l; primer 0,2 μ l; hydrolyzační sonda Roche 0,1 μ l

RT-qPCR proběhla na přístroji 7900HT Fast Real-time PCR System. Přístroj četl fluorescenční signál ve fázi polymerizace i při nasedání primerů na templát.

Pro RT-qPCR reakci (TaqMan) jsme použili následující program: Počáteční denaturace; 40 cyklů ($T=95^{\circ}\text{C}$, 15 sekund; $T=60^{\circ}\text{C}$; 1 minuta).

Hodnocení RT-qPCR bylo provedeno následujícím způsobem: C_T hodnoty (hodnota PCR cyklu, kdy amplifikační křivka překročí prahovou hodnotu fluorescenčního signálu umístěnou do fáze exponenciálního růstu kopií PCR produktu) pro specifický PCR produkt/gen ($C_{T\text{spec}}$) byly odečteny od C_T hodnot pro příslušný normalizační gen ($C_{T\text{norm}}$). Relativní hodnota exprese mRNA byla vypočtena jako průměr hodnot ($C_{T\text{norm}} - C_{T\text{spec}}$) v duplikátu pro každý vzorek s určením standardní chyby měření. Hodnoty byly vyneseny do grafů a statisticky analyzovány. Pro analýzu byl použit také Studentův t-test. Tepelná mapa znázorňující změny genové exprese byly vytvořeny v programu TIGR MultiExperimentViewer 4.0.01.

Přenos proteinu a inkubace s protilátkou (Western Blott)

Z buněčné kultury byly odebrány 3×10^6 buněk do 1,5 ml centrifugační zkumavky acentrifugovány při pokojové teplotě 5 minut na 2200 otáč./min. Peleta buněk byla promyta v 500 μ l PBS a opět centrifugována při pokojové teplotě 5 minut na 2200 otáč./min. Peleta buněk byla lyzována ve 200 μ l RIPA lyzačním pufru na ledu po dobu 10 minut. V čase 5 a 10 minut lyzace byl lyzát promíchán 10 vteřin na míchačce vortex. Lyzát byl dále sonikován na přístroji Digital sonifier M500 umístěném v místnosti s teplotou 4-6°C. Celá sonikační procedura zahrnovala 3 cykly po 1 sekundě sonikace se dvěma pětisekundovými přestávkami. Amplituda sonikačního ostnu byla 50%. Ihned po skončení sonikace byl lyzát umístěn na 10 minut na led. Pomocí Bradford Reagent byla stanovena proteinová absorbance v buněčném lyzátu. Jako normalizační kontrola byla použita směs 1 μ l RIPA lyzačního pufru + 99 μ l Bradfordu, vzorek byl měřen ve složení 1 μ l lyzátu + 99 μ l Bradfordu. Absorbance byla měřena v 8,5 mm kyvetách na přístroji Biophotometr. Pomocí kalibrační křivky sestavené na základě ředící řady BSA byla vypočítána koncentrace proteinů ve vzorcích. RIPA lyzát v objemu odpovídajícímu 20 ng proteinu byl přidán k 6 μ l NuPAGE LDS Sample Buffer (4x), 2 μ l denaturačního činidla DTT a doplněn do 24 μ l pomocí NuPAGE MOPS SDS Running Buffer (1x). Protein byl denaturován při 70°C po dobu 10 minut a následně nanesen na NuPAGE 10% Bis-Tris Gel uložený v elektroforetické aparatuře naplněné vychlazeným NuPAGE MOPS SDS Running Bufferem. Nanesené vzorky byly analyzovány elektroforeticky (150 V, 125 mA, 90 minut). Gel byl vyndán z pouzdra a umístěn do aparatury předem připravených elektrod iBlot Gel Transfer Stacks a překryt membránou z materiálu PVDF. Aparatura byla umístěna v přenosovém přístroji iBlot Gel TransferSystem. Přenos proběhl podle programu P2 suchým způsobem 7 minut. Membrána s přenesenými proteiny byla před inkubací s primární protilátkou blokována 60 minut v 7,5% odtučněném mléku v PBS s přísadkou 0,1% Tween 20. Protilátky pro inkubaci s membránou byly naředěny v roztoku 7,5% odtučněného mléka v 1xPBS s přísadkou 0,1% Tween 20 v následujícím ředění: Anti-CTCF rabbit polyk. (1:5000), Anti-SNF2H rabbit polyk. (1:500), Anti-PU.1 rabbit polyk. [T-21] (1:600), Anti-Actin –HRP konj. [I-19] (ředěná 1:2000; kontrola nanesení stejného

množství proteinu). Inkubace membrány s primární protilátkou proběhla přes noc při 4°C na výkyvné plošině a pokračovala 45 minut na téže plošině při pokojové teplotě. Po inkubaci byla membrána promyta 3x20 minut v nadbytku 1xPBS + 0,1% Tween 20. Inkubace se sekundární protilátkou Anti-Rabbit IgG konjugovanou s HRP (ředěná 1:4000) proběhla 60 minut na výkyvné plošině při pokojové teplotě. Po inkubaci byla membrána promyta 3x20 minut v nadbytku PBS + 0,1% Tween 20. Po promytí byla membrána inkubována s roztokem luminolu podle návodu výrobce ECL Plus Western Blotting Detection System. Specifické proteinové proužky CTCF, SMARCA5 a SPI1 byly v různých expozičních dobách zobrazeny na filmy CL-XPosure Film.

Ko-imunoprecipitace

Z buněčné kultury MEL a K562 byly odebrány 3×10^6 buněk do 1,5 ml centrifugační zkumavky a centrifugovány při pokojové teplotě 5 minut na 2200 otáč./min. Proteinový lyzát buněčných kultur byl připraven standardním postupem, který je popsán v metodě „Přenos proteinu a inkubace s protilátkou“. Dalším krokem byla příprava A agarózových kuliček s navazující přípravou proteinového lyzátu.

Příprava A agarózových kuliček: 10 μ l A agarózových kuliček bylo promyto v 50 μ l Paro's IP pufru, centrifugováno při 10°C 2500 otáč./min po dobu 5 minut, promývací roztok byl odstraněn a kuličky byly rozpuštěny v 10 μ l Paro's IP pufru.

Příprava proteinového lyzátu: 600 μ g proteinovému lyzátu a tomu adekvátní objem negativního kontrolního lyzátu (samotný RIPA pufr) bylo inkubováno s 5 μ l nespecifické kontrolní protilátky IgG na ledové lázni po dobu 1 hodiny. K buněčnému lyzátu a kontrolnímu lyzátu bylo přidáno 10 μ l připravených A agarózových kuliček a vzorky byly inkubovány 25 minut při 4°C za stálého kývání. Následně byly vzorky centrifugovány při 4°C 14 000 otáč./min po dobu 10 minut. Roztok lyzátu nad A agarózovými kuličkami byl odebrán do čisté zkumavky a byl použit pro imunoprecipitaci se specifickou protilátkou.

Imunoprecipitace se specifickou protilátkou: Proteinové a kontrolní lyzáty byly inkubovány s 3,3 μ l protilátky Anti-CTCF, 5 μ l Anti-Smarca5 a nebo s 5 μ l nescifické kontrolní protilátky IgG při 4°C po dobu 3 hodin za stálého kývání. Následně bylo ke každému vzorku přidáno 10 μ l připravených A agarózových kuliček a vzorky byly inkubovány při 4°C přes noc za stálého kývání. A agarózové kuličky byly separovány centrifugací při 4°C 6000 otáč./min po dobu 6 minut a následně byly třikrát promyty 200 μ l Paro's promývacím pufrem I. Po posledním promytí bylo k A agarózovým kuličkám přidáno 20 μ l RIPA pufu, 6 μ l NuPAGE LDS Sample Buffer (4x), 2 μ l denaturačního činidla DTT a vzorky byly denaturovány při 95°C po dobu 5 minut. Po denuraci byly vzorky centrifugovány při 4°C 14 000 otáč./min po dobu 10 minut. Ihned po centrifugaci byly vzorky naneseny na NuPAGE 10% Bis-Tris Gel a bylo pokračováno metodou Přenos proteinu a inkubace s protilátkou“.

Membrána se vzorky, u nichž byla při imunoprecipitaci použita protilátka Anti-Ctcf a kontrolní protilátka IgG, byla inkubována s protilátkou Anti-Smarca5. Membrána se vzorky, u nichž byla při imunoprecipitaci použita protilátka Anti-Smarca5 a kontrolní protilátka IgG, byla inkubována s protilátkou Anti-Ctcf.

Chromatinová imunoprecipitace (ChIP)

Z buněčné kultury bylo odebráno 5×10^6 buněk a zpracováno způsobem popsaným v odborné literatuře (Burda et al., 2009). Při imunoprecipitaci (IP) byly použity protilátky Anti-SMARCA5 (3 μ g na jeden vzorek IP), Anti-CTCF (2 μ g na jeden vzorek IP), Anti-RAD21 (2 μ g na jeden vzorek IP), Anti-SMC1 (2 μ g na jeden vzorek IP) a kontrolní protilátka Normal Rabbit IgG (5 μ l na jeden vzorek IP). DNA z imunoprecipitátů byla změřena pomocí RT-qPCR v úsecích: 1) -2,2 až -3,7 kb před transkripčním počátkem genu *H19* (sledovaný úsek odpovídá oblasti ICR genového lokusu *H19/Igf2*) 2) -17,5 až -0,15 kb před transkripčním počátkem genu *SPI1*. Sledovaný úsek odpovídá popsaným regulačním oblastem URE (-17,5 ; -16,6; -15,9 kb), enhanceru -14 kb a promotoru -0,15 kb; další sledované evolučně konzervované oblasti jsou potenciálními vazebnými místy pro CTCF (-15,6; -15,3 a -

13,7 až -9,7 kb). Evolučně konzervované úseky a amplikony pro PCR jsou graficky shrnuty v programu VISTA (Obrázek 9A). Primery použité v PCR a standardní křivky pro PCR reakce s těmito primery jsou uvedeny výše (Tabulka 6,7 a Tabulka 8). Pro PCR jsme použili chemii s kyaninovým barvivem SYBR Green.

Složení PCR reakce s barvivem SYBR Green (pro jednu jamku):

1) cDNA směs: Fast SYBR Green master Mix 2 μ l; voda 1,5 μ l; cDNA 0,5 μ l

2) primer směs: Fast SYBR Green master Mix 2 μ l; voda 1,7 μ l; primer 0,3 μ l

PCR proběhla na přístroji 7900HT Fast Real-time PCR System. Přístroj měřil fluorescenční signál na konci fáze prodloužení (elongace).

Pro PCR reakci s chemií SYBR Green jsme použili následující program:

Počáteční denaturace; 40 cyklů (T=95°C, 10 sekund; T=60°C, 20 sekund; T=72°C; 30 sekund).

Přítomnost epigenetických faktorů CTCF, SMARCA5, RAD21, SMC1 v chromatinu („percento inputu“) je definována jako počet kopií specifického úseku DNA v každém imunoprecipitátu vztažená k počtu kopií téhož úseku v inputu použitém pro imunoprecipitaci v definovaném ředění. V experimentech sledující ICR genového lokusu *H19/Igf2* bylo pro input použito ředění 1:100 (1% input DNA) a v genové oblasti SPI1 bylo pro input použito ředění 2:100 (2% input DNA). Od hodnot „nabohacení“ (percenta inputu) získaných imunoprecipitací se specifickou protilátkou byla odečtena hodnota „nabohacení“ (percenta inputu) pro kontrolní, nescifickou protilátku.

Stanovení luciferázové aktivity (exprese reportérového genu)

Z transfekovaných buněk HeLa byl pomocí aktivní lýzy připraven proteinový lyzát podle pokynů komerčního kitu The Dual-Luciferase Reporter Assay System. Před zahájením lyzování buněk byly do lyzačního pufru přidány inhibitory

proteáz (ředění 1:1000). Aktivní lýza buněk byla provedena rychlým manuálním seškrábáním buněk ze dna kulturační destičky, opakovaným pipetováním buněčné suspenze a dvěma cykly zmrazení buněčné suspenze. V příslušném vzorku bylo provedeno měření světluškové a renilové luciferázové aktivity podle pokynů použitého kitu na luminometru Glomax 20/20®. Měření světluškové a renilové luciferázové aktivity bylo prováděno v oddělených 1,5 mL zkumavkách a pro každé měření bylo použito 10 μ l vzorku.

Použitý program pro měření světluškové luciferázy: Objem injektoru: 50 μ l; pauza mezi injekcí a měřením: 2 sekundy; měření: 10 sekund

Použitý program pro měření renilové luciferázy: Objem injektoru: 50 μ l; pauza mezi injekcí a měřením: 1 sekunda; měření: 2 sekundy

Luminometr určuje intenzitu emitovaného světla, která je přímo úměrná koncentraci luciferázy. Pro odečtení světelného pozadí byl použit vzorek s netransfekovanými buňkami HeLa. Hodnocení relativní luciferázové aktivity bylo provedeno následujícím způsobem: intenzita emitovaného světla produkovaná světluškovou luciferázou byla vztažena na hodnotu intenzity emitovaného světla produkovaného renilovou luciferázou v příslušném vzorku. Hodnota luciferázové aktivity byla vypočtena jako průměr hodnot duplikátu příslušné transfekční směsi s určením standardní chyby měření. Následně byla průměrná hodnota luciferázové aktivity normalizována na kontrolní vektor pIHLE nebo příslušný „reportérový“ vektor kotransfekovaný s negativní kontrolou pro siRNA, jejichž hodnoty byly nastaveny rovno jedné.

Analýza metylace DNA

Z buněčné linie OCI-M2, CD34+ progenitorových buněk získaných od pacientů s MDS a AMLa zdravých dárců byla pomocí komerčního kitu DNEasy Blood and Tissue Kit izolována genomická DNA. Podle návodu komerčního kitu MethylCode Bisulfite Conversion Kit byla genomická DNA (250 ng DNA rozpuštěných

ve 20 μ l vody v jedné reakci) upravena bisulfitickou konverzí, při níž dochází k deaminaci nemetylovaných cytosinů a jejich přeměně na uracily bisulfitem sodným. Specifické sekvence DNA pokrývající tři CpG ostrůvky v predikovaných vazebných místech pro protein CTCF o velikosti 493 bp, 617 bp a 354 bp byly namnoženy pomocí PCR.

Složení PCR reakce: DNA 4 μ l; 10x PCR Buffer 2 μ l; dNTPs 2 μ l; 1 μ l 5,0% DMSO; 8 μ l betainu 2,5 M; 1,2 μ l 20 mM směs primerů: 1)hPU.1(-11kb)-F conv. ahPU.1(-11kb)-R conv. 2)hPU.1(-14,4kb)-F3 conv. a hPU.1(-14,4kb)-R3 conv. 3)hPU.1(-15,6kb)-F conv. a hPU.1(-15,6kb)-R3 conv.; 0,4 μ l polymerázy JumpStart Taq DNA Pol; 1,4 μ l H₂O.

Pro PCR reakci jsme vytvořili následující program: 1) T=95°C, 3 minuty; 2) 6 cyklů - (T=94°C, 30 sekund; T=60°C, 50 sekund (touchdown o 1°C); T=72°C, 1:30 minuty) 3) 34 cyklů - (T=94°C, 30 sekund; T=54°C, 50 sekund; T=72°C, 1:30 minuty); 4) T=72°C, 10 minut.

Namnožené PCR produkty byly velikostně ověřeny pomocí DNA elektroforózy na 1,5% agarosovém gelu. DNA byla izolována z gelu pomocí QIAquick Gel Extraction Kit dle návodu výrobce. Koncentrace a čistota DNA byla stanovena na přístroji Spectrophotometer ND-1000. 200 ng DNA bylo ligováno do 1 μ l vektoru pCR[®]2.1-TOPO[®] podle návodu výrobce. Ligace proběhla při 25°C 1 hodinu. Následně došlo k transformaci do bakterií One Shot TOP 10 (použita byla celá ligační směs v objemu 6 μ l). Bakterie zůstaly stát 30 minut na ledu, proběhl tepelný šok 42°C 30 sekund, bakterie byly opět umístěny na 5 minut na led a následně byly inkubovány ve 250 μ l SOC média 2 hodiny při 37 °C ve třepačce při 180 otáčkách/minutu. Bakterie byly vysety na agarové plotny napuštěné ampicilinem (1:1000) aX-Gal (40 μ l na plotnu). Plotny byly inkubovány přes noc při 37°C. V průměru 15 bíle zbarvených kolonií bylo přepíchnuto špičkami o objemu 10 μ l na novou plotnu a zbytek bakterie ze špičky byl ponořen do PCR reakce na ověření správnosti klonovaného úseku DNA (373bp, 861bp, 598bp). Z pozitivních PCR-ověřených kolonií byla izolována DNA pomocí kitu GenElute Plasmid Miniprep Kit dle návodu výrobce. 450 ng DNA rozpuštěné v 6,4 μ l vody byla následně pomocí 1,6 μ l

komerčního primeru M13 (-20) forward (nachází se ve vektorové části plasmidu) osekvenována na přístroji Genetic Analyzer3500. Ověření sekvence a vypočítání procenta metylovaných CpG ostrůvků na DNA proběhlo pomocí programu BiQ Analyzer.

Imunofluoresceční mikroskopie

Buněčná linie MEL-shSmarca5 byla fixována na podložním skle v 3,5% formaldehydu (ředěno roztokem 1xPBS) při pokojové teplotě 15-20 minut a dále zpracována způsobem popsaným v odborné literatuře (Vargova et al., 2009). Pro imunologické značení byly použity primární protilátky Anti-Ctcf králičí polyklonální (ředěno 1:500 v 1% BSA-PBS) a Anti-Smarca5 králičí polyklonální (ředěno 1:200 v 1% BSA-PBS). Primární protilátky byly sledovány pomocí sekundárních protilátek Alexa Fluor 488 (ředěno 1:300 v 2% BSA-PBS) nebo Alexa Fluor 594 (ředěno 1:300 v 2% BSA-PBS). Montovací médium (Vectashield Mounting Medium) obsahující 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) bylo použito pro barvení heterochromatinu. Obrázky byly pořízeny pomocí konfokální laserové skenovací mikroskopie na přístroji Leica TCS SP2 se systémem AOBS při olejové imerzi 63x objektivu N.A. 1.4. Hodnocení profilových intenzit fluorescence a stanovení obsahu heterochromatinu byly provedeny pomocí softwaru ImageJ 1,38x.

4. VÝSLEDKY

4.1 Vazba Ctcf do oblasti ICR je v leukemických buňkách řízena chromatin remodelačním faktorem Smarca5.

Transkripční faktor Ctcf je zapojen v řízení exprese mnoha genů důležitých pro vyzrání krevních buněk, avšak jeho potenciálně patologický vliv na expresi těchto genů při vzniku leukémie není prozatím znám a přitom u 50% případů AML a také u CML byla pozorována aberantní exprese cílových genů CTCF: *H19* a *IGF2* (Randhawa et al., 1998; Wu et al., 1997). V normálních somatických buňkách jsou geny *H19* a *Igf2* imprintované, tedy exprimované vždy jen z jedné alely zatímco exprese druhé alely je epigeneticky blokována. U AML a CML byl detekován defektně probíhající imprinting, exprese *Igf2* probíhá na obou alelách (= bialelická genová exprese) a buněčná koncentrace *Igf2* je zvýšena. U leukemických buněk pacientů s CML je ztráta imprintingu spojována s progresí onemocnění (akcelerovanou fází a blastickou krizí) (Randhawa et al., 1998). Přičemž několik prací ukazuje, že ztráta imprintingu není závislá na metylaci DNA v oblasti ICR (Randhawa et al., 1998; Wu et al., 1997). Na buněčném modelu lidské erytroleukémie (buněčná linie K562) bylo ukázáno, že zvýšení hladiny CTCF řídí diferenciaci leukemických buněk do erytroidní krevní řady (Torrano et al., 2005). Při zahájení výzkumu na téma vlivu CTCF u lidských leukémií jsme si položili otázku, zda se Ctcf váže do oblasti ICR a zda Ctcf řídí expresi cílových genů *H19/Igf2* v leukemických buňkách. Pro studium jsme si vybrali buňky myši erytroleukémie (MEL), jejichž vyzrání do erytroidní krevní řady je zablokováno. Zjistili jsme, že buňky MEL produkují mRNA genů *H19* a *Igf2*, přičemž množství mRNA *Igf2* je 1000 krát menší než mRNA *H19* (Obrázek 15). Tato data ukazují, že exprese *H19* a *Igf2* v použitých leukemických buňkách je rozdílná a to v takovém poměru, který je v souladu s dříve publikovanou prací (Venkatraman et al., 2013).

Uvedené výsledky nás vedly k další analýze, kterou jsme chtěli potvrdit vazbu Ctcf na ICR *H19/Igf2* v leukemických buňkách. Vazbu Ctcf jsme testovali pomocí metody chromatinové imunoprecipitace (ChIP). Tato technika je používána pro

studium interakce proteinů a DNA v živých buňkách. Jejím cílem je určit vazbu specifického transkripčního faktoru nebo jiného proteinu na specifické genomické DNA. Momentální stav chromatinu, DNA a sní spojené proteiny, jsme v živých buňkách konzervovali působením roztoku 1% formaldehydu. Následně jsme konzervovaný chromatin štěpili na krátké fragmenty DNA pomocí sonikačních pulzů. DNA spojenou se specifickým transkripčním faktorem jsme z celkového buněčného lyzátu izolovali pomocí imunoprecipitace se specifickou protilátkou proti studovanému proteinu. DNA s navázaným specifickým proteinem jsme purifikovali a analyzovali pomocí PCR s primery sledujícími určitou sekvenci DNA. Nabohacení specifické sekvence DNA při PCR představuje oblasti genomu, kde se vyskytuje specifický transkripční faktor vůči oblastem DNA, kde se nenachází. V buňkách MEL jsme určili vazbu Ctcf v oblasti ICR na čtyřech místech DNA (-3,7; -3,1; -2,6; -2,2 kb vzdálených od transkripčního počátku genu *H19*). Abychom prokázali specifitu vazby Ctcf na DNA v daných místech DNA, inhibovali jsme expresi Ctcf pomocí transfekce siRNA proti Ctcf a opakovali jsme detekci proteinu Ctcf na příslušných sekvencích DNA. Specifickou vazbu Ctcf jsme prokázali poklesem nabohacení Ctcf na dříve určených vazebných místech Ctcf (Obrázek 6A). Účinnost poklesu proteinové hladiny Ctcf pomocí siRNA jsme prokázali metodou Western blot (Obrázek 6E, pravá část). Zjištění vazby Ctcf do oblasti ICR je v souladu s předchozími daty publikovanými v experimentální práci (Bell and Felsenfeld, 2000).

Dále několik experimentálních prací ukazuje, že vazba Ctcf na DNA vyžaduje vhodnou epigenetickou remodelaci chromatinu. Bylo ukázáno, že vazba Ctcf na ICR lokusu *H19/Igf2* je řízena metylací DNA a pozicí nukleozómů na vlákně DNA (Davey et al., 2003; Kanduri et al., 2000). Z těchto důvodů jsme testovali, zda se v pozorované oblasti ICR vyskytuje ATPáza sestavující a posunující nukleozómy - Smarca5 z rodiny ISWI, jež kooperuje s DNA metylačním mechanismem v rámci NoRC komplexu při represi ribosomálních RNA (Li et al., 2006; Strohner et al., 2001; Zhou et al., 2002). Zvolená leukemická buněčná linie MEL je známá zvýšenou hladinou Smarca5 (Stopka et al., 2000) a předpokládá se, že Smarca5 přispívá k epigenetické dysregulaci leukemických buněk. Použili jsme buňky MEL-shSmarca5, což jsou buňky MEL obohacené o konstrukt cDNA kódující krátkou inhibiční vlásenkovou RNA komplementární k mRNA Smarca5 (Smarca5-shRNA), jejíž expresi

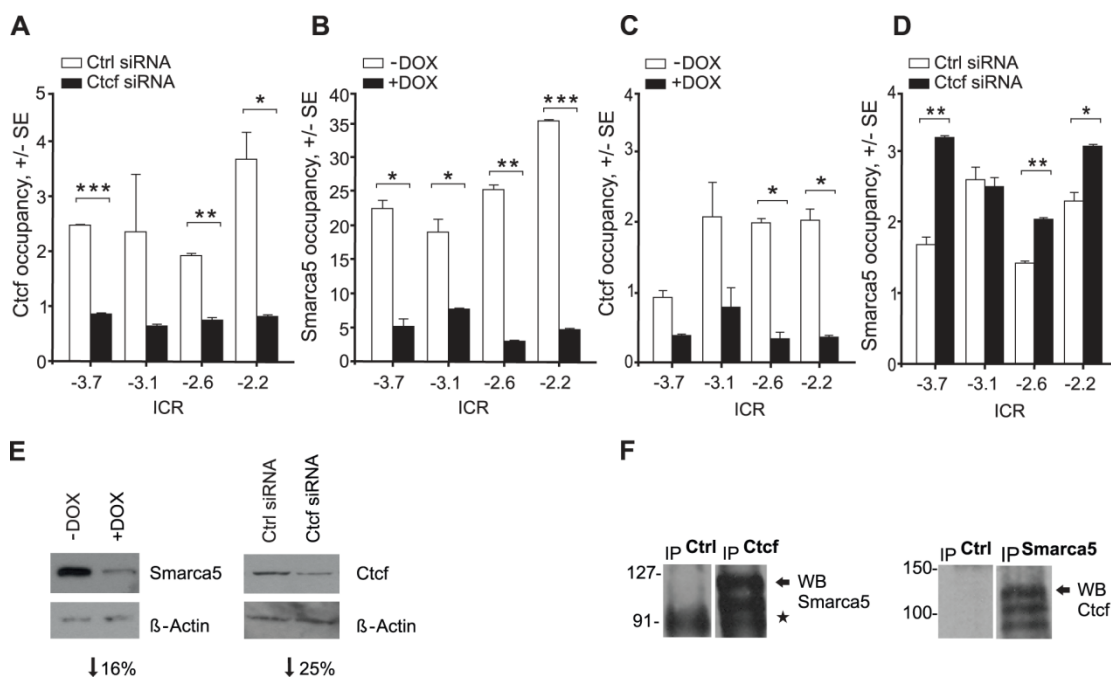
aktivuje přítomnost doxycyklinu (DOX). Smarca5-shRNA se váže na mRNA Smarca5 a snižuje buněčnou koncentraci Smarca5 jak na úrovni mRNA tak následně i proteinu. U MEL-shSmarca5 jsme tak účinně snížili hladinu Smarca5 (pod 20 % původní hladiny). Účinnost blokování přepisu Smarca5 pomocí Smarca5-shRNA jsme prokázali na úrovni mRNA v časovém rozpětí 0 – 96 hod (Obrázek 16), na proteinové úrovni po 96 hodinách působení doxycyklinu (Obrázek 8E, levá část). Pomocí metody ChIP jsme v buňkách MEL-shSmarca5, které nebyly ovlivňovány doxycyklinem, zjistili přítomnost Smarca5 v oblasti ICR v pozici -3,7; -3,1; -2,6; -2,2 kb vzdálených od transkripčního počátku *H19*, tedy na totožných místech DNA, na kterých byla pozorována vazba proteinu Ctcf (Obrázek 6B, bílé sloupce). Na buňkách MEL-shSmarca5 inkubovaných v médiu s doxycyklinem jsme prokázali specifitu vazby Smarca5 na DNA. Po snížení hladiny Smarca5 jsme již po 48 hodinách působení doxycyklinu pozorovali pokles vazby proteinu Smarca5 na příslušných místech DNA (Obrázek 8B, černé sloupce). Na získaných výsledcích můžeme pozorovat, že Ctcf a Smarca5 se vážou na společná vazebná místa v ICR lokusu *H19/Igf2*.

Tato data nás vedla k následné otázce, zda Smarca5 může ovlivňovat vazbu Ctcf na DNA nebo naopak, zda Ctcf může ovlivňovat vazbu Smarca5 na DNA v oblasti ICR *H19/Igf2*. Také jsme uvažovali o alternativní možnosti, tedy, že Ctcf a Smarca5 se vážou na DNA v ICR mechanismem na sobě nezávislým, ale následně spolu interagují v řízení transkripce cílových genů. K zodpovězení zmíněných otázek jsme použili metodu ChIP v oblasti ICR po blokování exprese Smarca5 a po blokování Ctcf. V buňkách MEL-shSmarca5 jsme vlivem doxycyklinu snížili hladinu Smarca5 a následně jsme metodou ChIP měřili vazbu Ctcf na ICR *H19/Igf2*. Obrázek 8C ukazuje, že pokles Smarca5 vedl ke snížení vazby Ctcf na DNA v oblasti ICR. Následně jsme testovali, zda je vazba Smarca5 na vlákno DNA závislá na přítomnosti Ctcf. V buňkách MEL-shSmarca5 jsme snížili hladinu Ctcf pomocí transfekované siRNA a měřili jsme vazbu Smarca5 na DNA v ICR *H19/Igf2*. Zjistili jsme, že vazba Smarca5 na DNA je stabilní nebo dokonce zvýšená (Obrázek 6D). Naše výsledky tedy nasvědčují tomu, že specifická vazba Ctcf v oblasti ICR *H19/Igf2* je závislá na přítomnosti Smarca5, a že Smarca5 se na DNA váže nezávisle na expresi Ctcf.

Dále jsme se zaměřili na otázku, zda existuje proteinová interakce mezi Ctcf a Smarca5. Využili jsme metodu koimunoprecipitace. Ukázali jsme, že protilátka proti Smarca5 byla schopna precipitovat protein Ctcf z celkového proteinového lyzátu. Lyzát precipitovaný protilátkou proti Smarca5 jsme testovali metodou Western blot, kde jsme pomocí protilátky proti Ctcf detekovali protein Ctcf (Obrázek 8F, pravá část). Opačným postupem jsme ukázali, že protilátka proti Ctcf byla schopna z celkového proteinového lyzátu precipitovat protein Smarca5. Protein Smarca5 jsme v precipitovaném lyzátu následně detekovali protilátkou proti Smarca5 metodou Western blot (Obrázek 8F, levá část). Ve shodě s propozicemi obou protilátek jsme pozorovali vždy jeden dominantní signál proteinů Ctcf a Smarca5 a několik dalších minoritních signálů po delší expozici filmu. Interakci Ctcf a Smarca5 zjištěnou v MEL buňkách pomocí ko-imunoprecipitace jsme též prokázali v buněčné linii lidské erytroleukemie K562 (Obrázek 17).

K nezávislému ověření nově zjištěné interakce Ctcf a Smarca5 na buněčné úrovni jsme použili metodu konfokální mikroskopie. V jaderném chromatinu MEL buněk jsme pozorovali částečný překryv imunofluorescenčních signálů Ctcf a Smarca5 (Obrázek 18).

Výsledky ukazují, že interakce Ctcf a Smarca5 na proteinové úrovni probíhá v nádorových buňkách jak v myši tak v lidské erytroleukémii. Lokalizační profil Ctcf a Smarca5 se částečně překrývá v myších erytroleukemických jádrech. Detailní analýza lokalizace Ctcf a Smarca5 na DNA ukázala, že epigenetické faktory Ctcf a Smarca5 se v použité myši leukemické buněčné linii vážou na společná vazebná místa v oblasti ICR genového lokusu *H19/Igf2*. Získaná data dále ukazují, že pro specifickou vazbu Ctcf je nezbytná přítomnost proteinu Smarca5.



Výsledkový obrázek 8. Ctfc a Smarca5 interagují v buňkách myši AML. (A) Přítomnost Ctfc na ICR. Buňky MEL-shSmarca5 po působení siRNA proti Ctfc (Ctfc siRNA, černé sloupce) nebo po působení nespecifické siRNA (Ctrl siRNA, bílé sloupce) byly analyzovány metodou chromatinové imunoprecipitace na čtyřech predikovaných místech v oblasti ICR *H19* po 72 hodinách inkubace. Na ose Y je znázorněna relativní přítomnost specifického „nabohacení“ proteinu na DNA, která je vztažena k měření s kontrolní protilátkou. Standardní chyba (SE) je vypočítána pro dva nezávislé experimenty. Osa X ukazuje sledované amplikony v oblasti ICR, číslo vyjadřuje vzdálenost v kb od transkripčního počátku genu *H19*. Hvězdy vyjadřují hladinu významnosti, která byla určena pomocí t-testu (0,05-0,005). (B) Přítomnost Smarca5 na ICR. Buňky MEL-shSmarca5 před inkubací s doxycyklinem (DOX-, bílé sloupce) nebo po 48 hodinové inkubaci s doxycyklinem (DOX+, černé sloupce). (C) Pokles přítomnosti Ctfc na ICR po blokování Smarca5. Přítomnost Ctfc byla sledována v buňkách použitých v obrázku 6B metodou ChIP. (D) Přítomnost Smarca5 po inhibici Ctfc. Přítomnost Smarca5 byla sledována na buněčném lyzátu použitým v obrázku 6A metodou ChIP. (E) Inhibice Smarca5 a Ctfc. Proteinové lyzáty ze vzorků 6A a 6B byly analyzovány metodou Western blotu. Na obrázku jsou ukázány specifické proužky Smarca5, Ctfc a β-aktinu. Hladina poklesu byla určena denzitometricky a je vyjádřena pod obrázkem blotu. (F) Ko-immunoprecipitace

Smarca5 a Ctfc v buňkách MEL. Šipky ukazují specifický signál sledovaného proteinu. Použité protilátky pro imunoprecipitaci (IP) a stanovení metodou Western blotu (WB) jsou naznačeny. Hvězda ukazuje na nespecifický signál protilátky.

4.2 SMARCA5 funkčně spolupracuje se CTCF

Na základě zjištěné interakce Ctfc a Smarca5 v erytroleukemických buňkách jsme se dále rozhodli studovat vliv Smarca5 na regulaci transkripce cílových genů Ctfc. Předpokládali jsme, že tak jako přítomnost Smarca5 řídí vazbu Ctfc na specifická vazebná místa DNA, tak bude přítomnost Smarca5 řídit také transkripční profil cílových genů Ctfc.

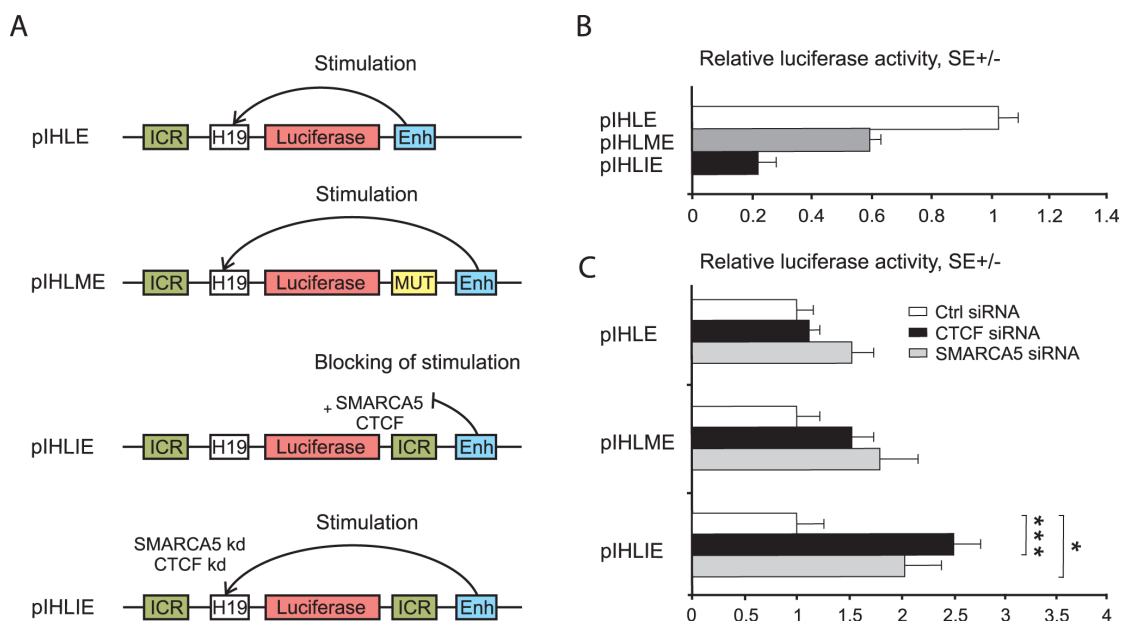
Použili jsme pro toto studium stanovení luciferázové aktivity na modelovém vektoru, který obsahuje klíčové regulační oblasti genového lokusu *H19/IGF2*, kde CTCF svou vazbou na ICR (jež je též insulátorem) blokuje komunikaci mezi enhancerem a promotorem modelového genu (=gen luciferázy). V buňkách jsme měnili koncentrace CTCF a SMARCA5 a sledovali změnu luciferázové aktivity. Stanovení luciferázové aktivity vypovídá o množství luciferázy exprimované za definovaných biologických podmínek v dané buněčné linii. Aktivita luciferázy se měří luminometrem, který zachycuje intenzitu emitovaného světla. Emitované světlo produkuje právě luciferáza při bioluminiscenční reakci.

Pro stanovení luciferázové aktivity jsme použili modelové vektory pIHLE, pIHLME a pIHLIE, které byly již dříve úspěšně použity v podobných experimentálních podmínkách (Ishihara et al., 2006; Wendt and Peters, 2009). Tyto studie ukázaly mj. vliv kohezinového komplexu a chromatin remodelačního komplexu CHD8 na regulační aktivitu CTCF jako insulátoru, který blokuje aktivitu enhanceru v oblasti ICR *H19/IGF2*. Vektor pIHLE obsahuje promotor genu *H19* a enhancer. Aktivita genu luciferázy na tomto vektoru není ovlivněna proteinem CTCF. Vektor pIHLIE oproti vektoru pIHLE obsahuje navíc ICR, který je umístěný mezi promotorem a enhancerem. Vazba CTCF na insulátor zde účinně blokuje aktivaci promotoru

přilehlým enhancerem a tím brání transkripci luciferázového genu. Vektor pIHLME je podobný vektoru pIHLIE, liší se však tím, že obsahuje mutovaná vazebná místa proteinu CTCF v oblasti ICR, z čehož vyplývá, že CTCF se na tuto oblast není schopen vázat (Obrázek 7A). Nejprve jsme v buňkách HeLa ukázali, podobně jako původní experimentální studie, že transkripční aktivita luciferázového genu na vektoru pIHLIE je v přítomnosti CTCF trojnásobně inhibována oproti vektoru pIHLME, jehož transkripční aktivita není ovlivněna přítomností CTCF (Obrázek 9B).

Mezi významné otázky, podobně jako při zjištění nabohacení Ctcf patřilo též, zda blokování modelového enhanceru, které je řízeno proteinem CTCF, vyžaduje přítomnost SMARCA5. Tuto otázku jsme testovali v buňkách HeLa s experimentálně sníženou hladinou SMARCA5 s využitím transkripčně-reportérového systému. Nejdříve jsme ukázali změnu luciferázové aktivity po samotném blokování CTCF. Buňky jsme transfekovali siRNA proti CTCF a jednotlivými výše zmíněnými modelovými plasmidy, po 72 hodinách inkubace jsme u jednotlivých buněčných lyzátů měřili luciferázovou aktivitu. V buňkách se sníženou hladinou CTCF jsme pozorovali významně zvýšenou luciferázovou aktivitu ukazující na negativní efekt CTCF na aktivitu enhanceru (tzv. enhancer-blocking effect). Totožný experiment jsme provedli s buňkami, ve kterých jsme snížili protein SMARCA5 pomocí transfekované siRNA. V buňkách se sníženou hladinou SMARCA5 jsme podobně jako v buňkách s blokováním CTCF pozorovali významně zvýšenou aktivitu luciferázového genu (Obrázek 9C).

Získaná data ukazují, že pro fyziologicky fungující ICR/insulátorovou oblast, jež řídí expresi genů *H19/IGF2*, je nezbytná přítomnost proteinu CTCF a rovněž přítomnost SMARCA5. Je pravděpodobné, že SMARCA5 provádí remodelaci chromatinu nutnou jak pro vazbu CTCF na DNA tak pro správné sestavení chromatinu při blokování enhanceru ICR/insulátorovou oblastí (Obrázek 9A dole).



Výsledkový obrázek 9. SMARCA5 se podílí na enhancer blokující aktivitě CTCF. **(A)** Schématické znázornění modelových konstruktů pIHLE (bez ICR), pIHLME (s mutovaným CTCF vazebným místem na ICR) a pIHLIE (s ICR, na které se váže CTCF). Značky uvedené ve schématu vyjadřují: ICR = insulátor genu *H19*; H19 = promotor genu *H19*; luciferase = gen luciferázy; Enh = enhancer SV40; MUT = insulátor s mutovaným vazebným místem pro CTCF; kd = inhibice proteinu. **(B)** Luciferázová aktivita modelových konstruktů v buňkách HeLa. Luciferázová aktivita reportéru byla normalizována na signál luminiscence Renily, hodnota luminiscenčního signálu vektoru pIHLE byla nastavena, aby byla rovna 1. **(C)** V buňkách HeLa chudých na protein CTCF nebo SMARCA5 (vlivem siRNA) byla analyzována luciferázová aktivita reportérů. Luciferázová aktivita byla normalizována na nespecifickou siRNA (Ctrl siRNA), která byla nastavena rovno 1. Chybové úsečky znázorňují standardní chybu (SE), pro výpočet hladiny významnosti byl použit t-test ($p < 0,05$ je naznačena hvězdou; tři hvězdy znamenají $p < 0,0005$).

4.3 Smarca5 reguluje transkripci cílových genů Cctf

Naším dalším cílem bylo ověřit data získaná testováním transkripční aktivity v reportérovém systému také na primárních cílových genech proteinu Cctf. Položili

jsme si proto otázku, zda ovlivněné hladiny Ctcf a Smarca5 budou způsobovat stejné změny v expresi genů *H19/Igf2* v erytroleukemických buňkách. Očekávali jsme, že snížení hladiny Ctcf povede ke zvýšení exprese Igf2 a naopak snížení exprese H19, podobně jak bylo ukázáno v experimentální práci, která sledovala expresi cílových genů Ctcf po delecii maternální DMR v ICR lokusu *H19/Igf2* (Venkatraman et al., 2013). V buňkách MEL se sníženou hladinou Ctcf nebo Smarca5 jsme proto analyzovali expresi mRNA zmíněných genů metodou RT-qPCR. Získaná data potvrdila náš předpoklad. Snížená hladina Ctcf, kterou jsme navodili působením siRNA, vedla k pětinasobnému poklesu exprese H19 a sedminásobnému zvýšení exprese Igf2 (Obrázek 8A). Podobné výsledky jsme pozorovali po snížení hladiny Smarca5, jež jsme navodili aktivací shSmarca5 působením DOX. Exprese H19 se v buňkách s nízkou hladinou Smarca5 snížila trojnásobně, zatímco exprese Igf2 se desetinasobně zvýšila (Obrázek 8B).

Výsledky expresní analýzy ukazují společně s daty získanými pomocí ChIP a stanovením luciferázové aktivity modelových plasmidů, že Smarca5 umožňuje vazbu Ctcf na ICR a přispívá ke stimulaci transkripce *H19* a blokování transkripce *Igf2*. Výsledky také naznačují, že nízká hladina Ctcf a Smarca5 může v leukemických buňkách aktivovat expresi Igf2, jehož vyšší hladina stimuluje buněčný růst, který je u dospělého jedince charakteristický pro rozvoj nádorového onemocnění anebo bývá spojený s progresí onemocnění (Livingstone, 2013).

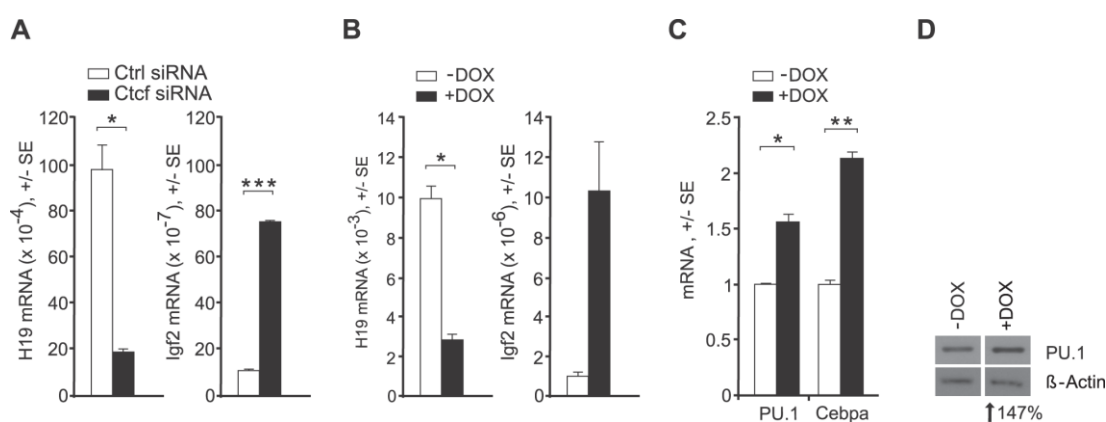
Protože abnormální exprese Igf2 v leukemických buňkách není závislá na metylaci DNA jeho regulačních oblastí (Randhawa et al., 1998), zajímalo nás, zda najdeme nový cílový gen proteinu Ctcf, který je 1) přímo zapojený v krvetvorbě a má vliv na vznik leukémie, 2) jeho exprese v leukemických buňkách je řízena změnou metylace DNA, 3) a který je současně ovlivňován aktivitou Smarca5.

Navázali jsme na data, jež popsala vliv inhibice DNA metylace na expresi genu pro hematopoetický transkripční faktor SPI1 (Curik et al., 2012), který je klíčový pro vyžívání většiny krevních buněk (makrofágů, granulocytů a B-lymfocytů, T lymfocytů a erytrocytů). Jeho vliv na krvetvorbu je přísně kontrolován jeho buněčnou koncentrací. Erytroleukemický fenotyp buněk MEL je způsoben

právě nedostatečně řízenou hladinou Spi-1. V buňkách MEL nedochází k dynamickému snižování exprese Spi-1, čímž dochází k bloku vyžívání buněk do erytroidní řady. Současně ale hladina Spi-1 není dostatečně vysoká na to, aby došlo k zahájení a dokončení vyžívání buněk myeloidní řady (Burda et al., 2009). Zároveň byla v buňkách MEL detekována zvýšená hladina Smarca5 (Stopka et al., 2000). Tyto poznatky nás vedly k otázce, zda Smarca5 reguluje transkripci genu *Spi-1* v buňkách MEL.

Testovali jsme, zda snížení hladiny Smarca5 bude mít vliv na expresi Spi-1 a jeho cílového genu *Cebpa*, kódující transkripční faktor myeloidní krevní řady. V buňkách MEL-shSmarca5 jsme pomocí DOX snížili hladinu Smarca5 a pozorovali jsme zvýšení exprese *Spi-1* a *Cebpa* na úrovni mRNA (Obrázek 10C) a proteinu (Obrázek 10D).

Tyto výsledky ukazují, že pokles hladiny Smarca5 stimuluje expresi Spi-1 v myších erytroleukemických buňkách, což vypovídá o represivním vlivu Smarca5 pro Spi-1. Snížení hladiny Smarca5 a následně zvýšená hladina Spi-1 v leukemických buňkách umožňuje obnovení vyžívání do myeloidní řady, podobně jak ukázaly práce (Burda et al., 2009; Stopka et al., 2000). U buněk MEL je však fyziologická exprese Spi-1 navíc narušena přítomností integrovaného retrovirusu SFFV v regulační oblasti tohoto genu. Z toho důvodu jsme ve studiu pokračovali na buněčném modelu lidské erytroleukémie.



Výsledkový obrázek 10. Smarca5 reguluje cílové geny Ctf v buňkách MEL.

(A) Expres RNA genů *H19* a *Igf2* po inhibici Ctf (Ctf siRNA) nebo nescifické

siRNA (Ctrl siRNA). **(B)** Expres RNA genů *H19* a *Igf2* po snížení hladiny Smarca5 (DOX+) v porovnání s normální hladinou Smarca5 (DOX-). Pro výsledky A a B byla použita analýza RT-qPCR, vzorky byly analyzovány po 72 hodinách působení siRNA nebo DOX. Osa Y: specifická mRNA byla vztažena na průměrnou hodnotu exprese genů *Hprt1* a *Gapdh* a dále normalizována na negativní kontrolu (nespecifickou siRNA nebo DOX-). Chybové úsečky znázorňují standardní chybu (SE). Hvězdy vyjadřují hladinu významnosti, pro jejíž výpočet byl použit t-test (0,05-0,005). **(D)** Expres Spi-1 (PU.1) a β -aktinu. Množství proteinu Spi-1 a β -aktinu bylo stanoveno metodou Western blotu po 144 hodinách (6 dnech) působení DOX. Zvýšení proteinové hladiny bylo určeno pomocí denzitometrie a je naznačeno pod obrázkem blotu.

4.4 CTCF a SMARCA5 se vážou na další cíl CTCF: gen *SPI1*

Nejdříve jsme mapovali lidskou genovou oblast *SPI1 in silico* a zjišťovali predikovaná vazebná místa pro CTCF. Na obrázku 11A je zobrazen lidský gen *SPI1*, který obsahuje několik evolučně vysoce konzervovaných oblastí situovaných od transkripčního počátku v pozici 5'. Tyto konzervované oblasti obsahují dříve popsané enhancery URE a -14,4 (Leddin et al., 2011). Položili jsme si otázku, zda se CTCF a SMARCA5 nachází na těchto konzervovaných oblastech DNA v lidských normálních myeloidních buňkách (izolovaných z dárců kmenových buněk mobilizovaných s G-CSF). Pro určení vazby CTCF a SMARCA5 jsme použili metodu CHIP. Soustředili jsme se na oblasti s více jak dvojnásobným (signifikantním) „nabohacením“ vazby při použití specifické protilátky oproti „nabohacení“ vazby při použití kontrolní nespecifické protilátky. V 5' oblasti genu *SPI1* jsme pozorovali významnou vazbu v řadě lokací jak CTCF tak i SMARCA5. Data ukazují „nabohacení“ vazby CTCF v amplikonech charakteristických svou již dříve popsanou funkcí: -16,6 (oblast 3' URE), -14,4 (enhancer) a -11 (element); jejich sousedících amplikonech: -15,6, -13,7, -13,4, -13,3, -12,4; a také v promotorové oblasti -0,15 (Obrázek 9B, šedivé sloupce). Vazbu SMARCA5 s výrazným „nabohacením“ jsme pozorovali v amplikonech od -17,5 až -15,3 (v URE a v oblasti

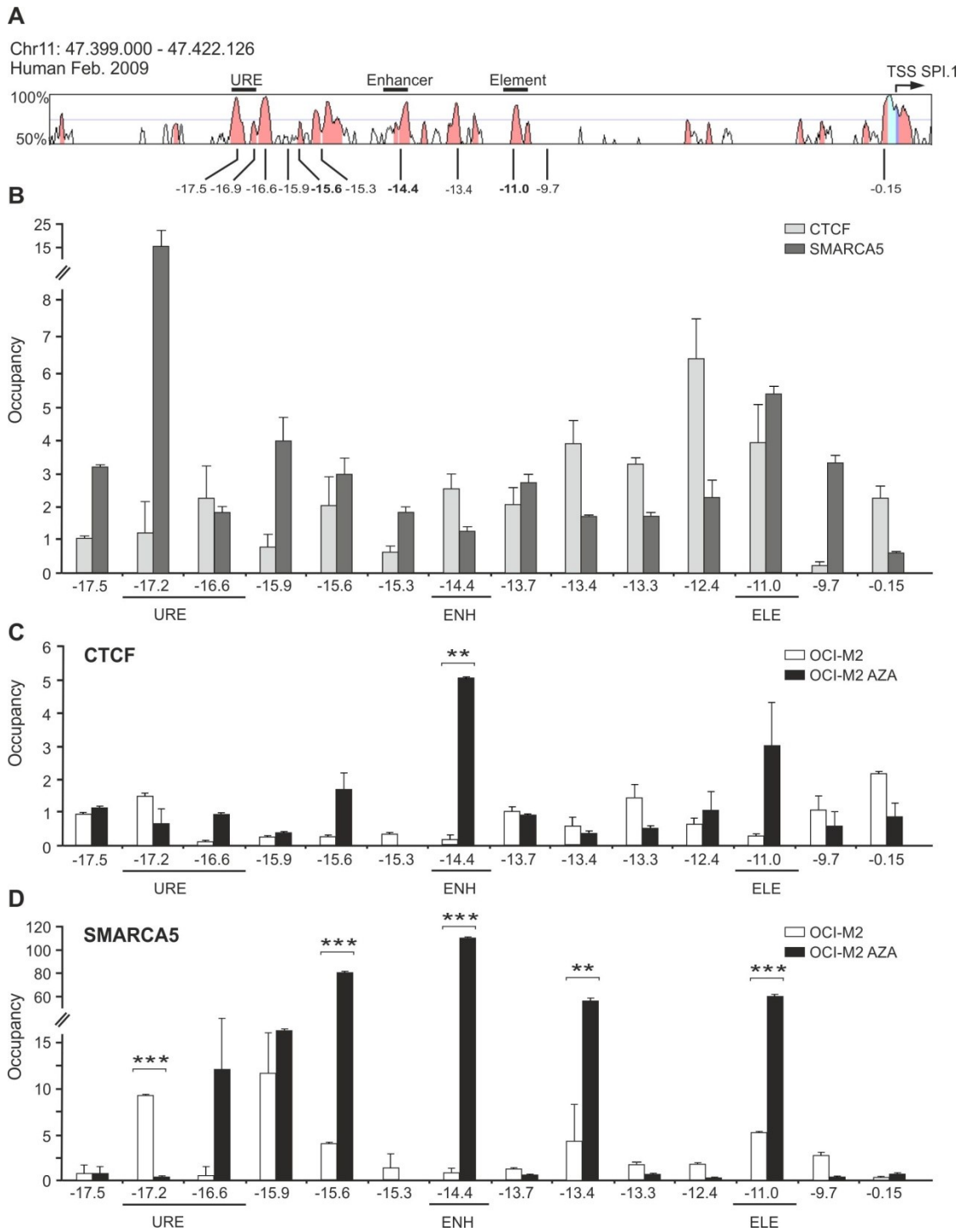
ve směru 3' od URE) a -11 (element) a v menší míře také v okolních amplikonech (Obrázek 9B, černé sloupce). Z toho vyplývá, že CTCF a SMARCA5 společně nasedají na DNA v oblastech: -15,6, -13,7, -12,4 a -11.

Dále nás zajímalo, zda bude vazba CTCF a SMARCA5 v genové oblasti *SPI1* v leukemických buňkách rozdílná ve srovnání s normálními myeloidními buňkami. Vazbu CTCF a SMARCA5 jsme testovali v lidské buněčné linii OCI-M2, jež je specifikována jako buňky AML (AML-M6) transformované v procesu myelodysplázie (MDS) s vysokým rizikem transformace do AML. V těchto buňkách bylo již dříve ukázáno, že DNA v regulační oblasti URE je vysoce metylována a že s touto epigenetickou modifikací DNA souvisí velmi nízká exprese *SPI1* (Curik et al., 2012). Buněčná linie OCI-M2 může být srovnávána se skupinou pacientů s MDS s nízkou hladinou *SPI1* v CD34+ buňkách, u nichž je medián přežití při léčbě AZA významně kratší než u pacientů s MDS se střední nebo vyšší hladinou *SPI1* (Curik et al., 2012). V buňkách OCI-M2 s metylovanou DNA jsme z celkových 14 pozorovaných amplikonů zjistili vazbu CTCF pouze v promotorové oblasti -0,15 (Obrázek 11C, bílé sloupce). Rozložení vazby SMARCA5 v buňkách OCI-M2 jsme pozorovali podobné jako v normálních buňkách. Vazbu SMARCA5 v buňkách OCI-M2 jsme určili v amplikonech -17,2 až -15,6 (v URE a v oblasti ve směru 3' od URE) a -11 (element) (Obrázek 11D, bílé sloupce). Tyto výsledky jsou v souladu s daty získanými v experimentu sledujícím vazbu *Smarca5* v buňkách MEL se sníženou hladinou *Ctcf* (Obrázek 8D) a zároveň podporují naše tvrzení, že vazba SMARCA5 na DNA je nezávislá na přítomnosti proteinu CTCF.

Následně jsme si položili otázku, za jakých podmínek probíhá vazba CTCF a SMARCA5 v nádorových blastech AML. Buňky MDS/AML jsou charakteristické mj. abnormálně zvýšenou metylací DNA, zajímalo nás proto, zda demethylace DNA v oblasti genu *SPI1*, jež je navozena pomocí azacitidinu (AZA) (Curik et al., 2012), umožní vazbu CTCF na DNA. Buňky OCI-M2 jsme inkubovali s AZA a následně pomocí metody CHIP jsme detekovali vazbu CTCF. Zjistili jsme, že skutečně působení AZA umožnilo vazbu CTCF. V amplikonech -15,6 a -11 (element) jsme určili zvýšené „nabohacení“ CTCF, které se blíží specifické vazbě, již můžeme pozorovat

v normálních myeloidních buňkách. Nově vzniklou specifickou vazbu CTCF jsme lokalizovali na enhanceru -14,4 (Obrázek 11C, černé sloupce). Působení AZA umožnilo také vazbu SMARCA5. Specifickou vazbu SMARCA5 jsme lokalizovali v amplikonech: -15,6, -13,4, -11 (element) a také na enhanceru -14,4. To znamená, že jsme určili společná vazebná místa pro SMARCA5 a CTCF (Obrázek 11D, černé sloupce).

Naše práce jako první ukazuje vazbu CTCF a SMARCA5 v genové oblasti *SPI1* v normálních i leukemických buňkách. Získané výsledky ukazují, že gen *SPI1* je cílovou vazebnou oblastí pro CTCF a SMARCA5 v normálních myeloidních buňkách. V blastech AML je vazba CTCF a SMARCA5 v oblasti genu *SPI1* narušena. Tato data jsou v souladu s dříve publikovanými pracemi, které ukazují, že zvýšená metylace DNA u nádorových buněk brání fyziologické vazbě CTCF a SMARCA5 (Hakimi et al., 2002; Wang et al., 2012). Ukázali jsme, že v leukemických buňkách působení AZA na některých místech genu *SPI1* obnovuje vazebný profil CTCF a SMARCA5, jaký byl pozorován u normálně diferencujících buněk. V blastech AML se SMARCA5 váže na několik míst lokusu *SPI1* zatímco CTCF se váže pouze na enhancer -14,4. Z toho vyplývá, že společným vazebným místem pro CTCF a SMARCA5 je pouze enhancer -14,4.



Výsledkový obrázek 11. CTCF a SMARCA5 se vážou na lokus genu *SPI1* v normálních myeloidních buňkách a po působení AZA také v buňkách AML. **(A)** Schéma konzervované sekvence genového lokusu *SPI1* (VISTA). Lidská sekvence DNA byla srovnána se sekvencí myši DNA. Pozice regulačních oblastí a dalších konzervovaných míst, které jsme analyzovali metodou ChIP, jsou očíslovány podle vzdálenosti od transkripčního počátku lidského genu *SPI1*. **(B)** ChIP proteinů CTCF a

SMARCA5 ve smíšených myeloidních buňkách. **(C)** CHIP CTCF a **(D)** CHIP SMARCA5 v buňkách OCI-M2 bez působení AZA (OCI-M2) nebo po působení AZA (OCI-M2 AZA). Osa Y ukazuje relativní „nabohacení“ specifického proteinu vztažené na výsledek měření s nespecifickou protilátkou. Chybové úsečky znázorňují standardní chybu (SE) vypočítanou pro dva nezávislé experimenty, hvězdy vyjadřují hladinu významnosti vypočítanou t-testem (0,05-0,005). Na ose X jsou amplikony charakterizované vzdáleností (kb) od transkripčního počátku genu *SPI1*. Použité zkratky: URE = Upstream Regulatory Element genu *SPI1*, ENH = enhancer, ELE = element.

4.5 Členové kohezinového komplexu se vážou na gen *SPI1* společně se CTCF a SMARCA5

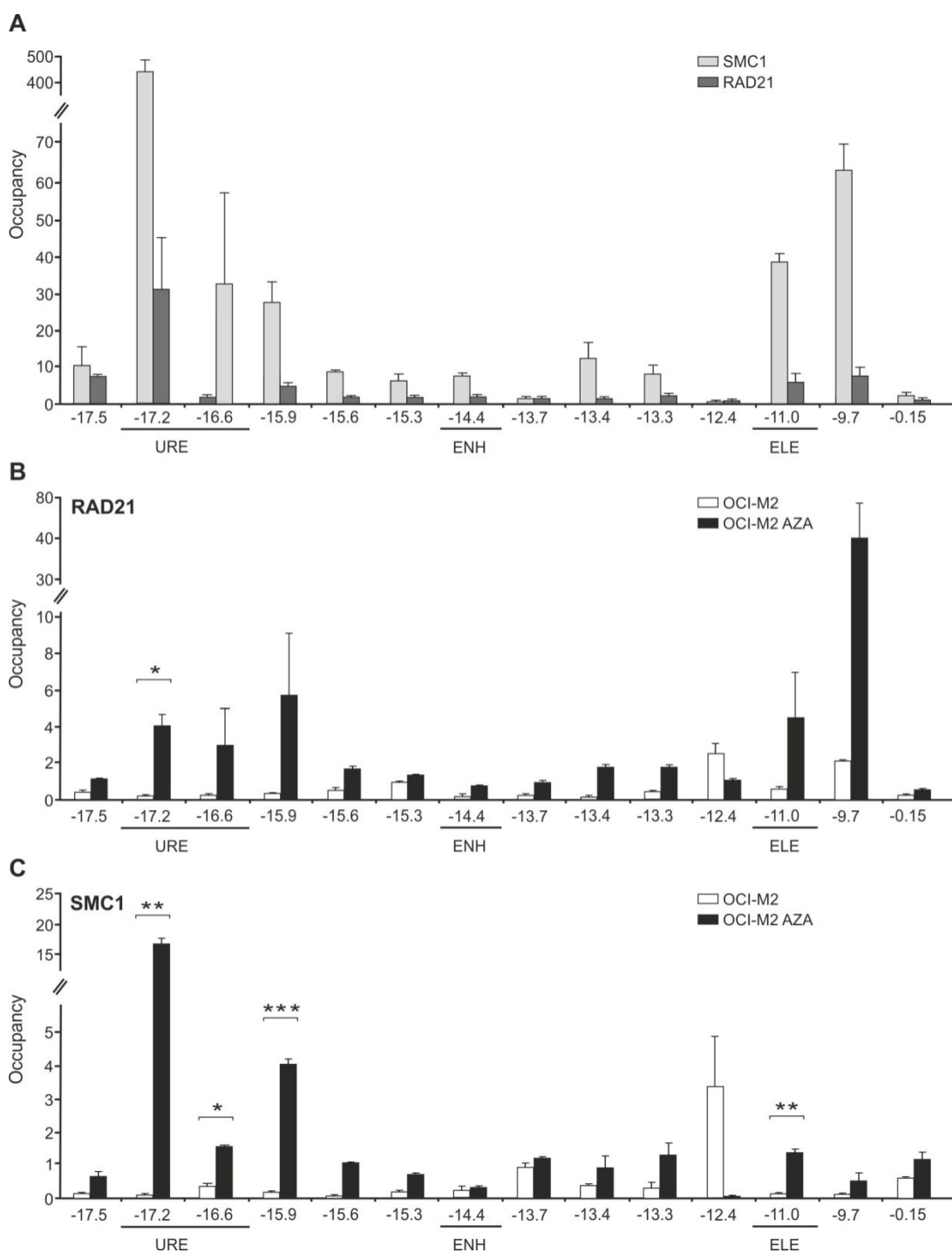
Vazba a působení CTCF na DNA je úzce spjata s přítomností kohezinového komplexu. CTCF pro funkci insulátoru vyžaduje přítomnost kohezinu, zatímco interakce kohezinu s DNA vyžaduje přítomnost CTCF (Wendt et al., 2008). To nás vedlo k další otázce, zda budou rozdíly ve vazbě CTCF v oblasti genu *SPI1* mezi normálními a leukemickými buňkami doprovázeny též rozdílnou vazbou kohezinového komplexu. Pomocí metody CHIP a stejných experimentálních podmínek jako v části 4.4, jsme se rozhodli testovat vazbu RAD21 a SMC1, což jsou členové kohezinového komplexu, jejichž vazba byla pozorována na vazebných místech Ctf v ICR *H19/Igf2* (Stedman et al., 2008). V normálních lidských myeloidních buňkách bylo „nabohacení“ obou členů RAD21 a SMC1 v regulačních oblastech genu *SPI1* velmi podobné jako vazba CTCF a SMARCA5. Nejvyšší „nabohacení“ RAD21 a SMC1 jsme pozorovali v oblasti URE, konkrétně na amplikonech -17,5 až -15,6. Druhé nejvyšší „nabohacení“ RAD21 a SMC1 jsme zaznamenali v amplikonech -11 (element) a -9,7 (Obrázek 12A).

Vazbu RAD21 a SMC1 jsme dále testovali v buňkách OCI-M2 před a po působení AZA. V neovlivněných buňkách OCI-M2 jsme na regulačních oblastech genu *SPI1* pozorovali zanedbatelné „nabohacení“ RAD21 a SMC1, což může

pravděpodobně souviset s nepřítomností CTCF na sledovaných místech (Nativio et al., 2009; Wendt et al., 2008). Pozorovali jsme, že po působení AZA byl RAD21 vázán do místa -15,9 (v blízkosti CTCF a SMARCA5, které se nacházely v pozici -15,6) (Obrázek 12B). Dále se RAD21 (společně se SMARCA5) šířil z pozice -15,9 směrem k URE. RAD21 se také vázal na -11 element (kam se vázaly též CTCF a SMARCA5) a amplikon -9,7. Vazbu SMC1 v buňkách OCI-M2 jsme pozorovali pouze v oblasti URE. V amplikonu -17,2 se SMC1 nacházel společně s RAD21 (Obrázek 12C). Vazba CTCF a SMARCA5 na enhanceru -14,4 se překvapivě nepřekrývala s vazbou RAD21 ani SMC1.

Z vysokého „nabohacení“ RAD21 a SMC1 v normálních buňkách v oblastech URE, -11 elementu a oblasti -9,7 usuzujeme, že na těchto místech hraje kohezin důležitou úlohu v regulaci chromatinové struktury a následně transkripce genu *SPI1*. V leukemických buňkách je vazba RAD21 a SMC1 na těchto místech DNA narušena. Výsledky ukazují, že působení hypometylační terapie obnovuje vazbu RAD21 a SMC1, kterou jsme pozorovali v normálně diferencujících myeloidních buňkách. Pro vazbu kohezinu do oblastí URE a -11 elementu po působení AZA je pravděpodobně nezbytný faktor SMARCA5 nikoliv však CTCF.

Nevýrazná vazba kohezinu na enhancer -14,4 v normálně diferencujících buňkách nasvědčuje tomu, že kohezin na tomto místě nepůsobí významným vlivem. Třebaže na enhanceru -14,4 dochází po působení AZA v buňkách OCI-M2 k silné vazbě jak CTCF tak SMARCA5, kohezinový komplex se zde neváže. Uvažujeme, že CTCF a SMARCA5 zde mohou spolupracovat s jiným proteinem umožňujícím tvorbu chromatinových smyček, takovým partnerem by mohl být např. protein SATB1.



Výsledkový obrázek 12. Přítomnost kohezivního komplexu na genomovém lokusu *SPI1*. **(A)** ChIP RAD21 a SMC1 ve smíšených myeloidních buňkách. **(B)** ChIP RAD21 a **(C)** ChIP SMC1 v buňkách OCI-M2 bez působení AZA (OCI-M2) nebo po působení AZA (OCI-M2 AZA). Osa Y ukazuje relativní „nabohacení“ specifického proteinu vztážené na výsledek měření s nespecifickou protilátkou. Chybové úsečky znázorňují standardní chybu (SE) vypočítanou pro dva nezávislé experimenty,

hvězdy vyjadřují hladinu významnosti vypočítanou t-testem (0,05-0,005). Na ose X jsou amplikony charakterizované vzdáleností (kb) od transkripčního počátku genu *SPI1*. Použité zkratky: URE = Upstream Regulatory Element genu *SPI1*, ENH = enhancer, ELE = element.

4.6 V buňkách AML je vazebné místo CTCF a SMARCA5 na genu *SPI1* metylováno a AZA způsobuje jeho demetylaci

Vazba SMARCA5 a CTCF na DNA je ovlivněna metylací DNA (Bell and Felsenfeld, 2000; Hakimi et al., 2002). Proto nás dále zajímal vztah mezi vazbou CTCF a SMARCA5 na oblast genu *SPI1* a metylací DNA. Rozhodli jsme se sledovat metylační stav DNA v oblastech s nejvýraznější vazbou CTCF, tzn. oblast -15,6; -14,4 a -11. Použili jsme detailní sekvenční analýzu na bisulfitem-modifikované DNA, která odhaluje metylační stav konkrétní sekvence DNA. Přičemž specifické změny v sekvenci DNA jsou určovány na úrovni jednonukleotidového rozlišení.

K modifikaci DNA jsme použili bisulfit sodný, který přeměňuje nemetylovaný cytosin na uracil zatímco metylovaný cytosin zůstává nezměněný. Pro PCR, která zmnožila vybrané oblasti DNA, jsme navrhli primery s thyminem, které rozeznávají bisulfitem modifikovanou DNA. Produkty PCR byly zaklonovány do vektoru a následně podrobeny sekvenovací reakci. Výsledky sekvenovací reakce byly analyzovány programem BiQ Analyzer. To znamená, že jsme detekovali metylační profil jedné jediné molekuly DNA. Pro procentuální vyjádření metylace konkrétního CpG jsme takto analyzovali v průměru 15 molekul DNA. Tato metoda je oproti jiným technikám studujícím metylaci DNA kvantitativně přesná, citlivá a vysoce efektivní.

V prvním kroku jsme pomocí *in silico* databází určili vazebnou sekvenci CTCF v amplikonu -14,4 (Obrázek 13A). Následně jsme na tomto vazebném místě a jeho okolí určili metylační stav DNA v CD34+ buňkách MDS/AML, normálních CD34+ progenitorových buňkách smíšených normálně vyžívajících myeloidních buňkách získaných z periferní krve po stimulaci G-CSF. Na rozdíl od normálních jedinců, u

kterých se procento nemetylované DNA pohybovalo v rozmezí 70 – 100%, jsme u progenitorových buněk MDS/AML pozorovali nízkou hladinu nemetylované DNA, u nichž se procento nemetylované DNA pohybovalo mezi 10 – 40% (Obrázek 13B).

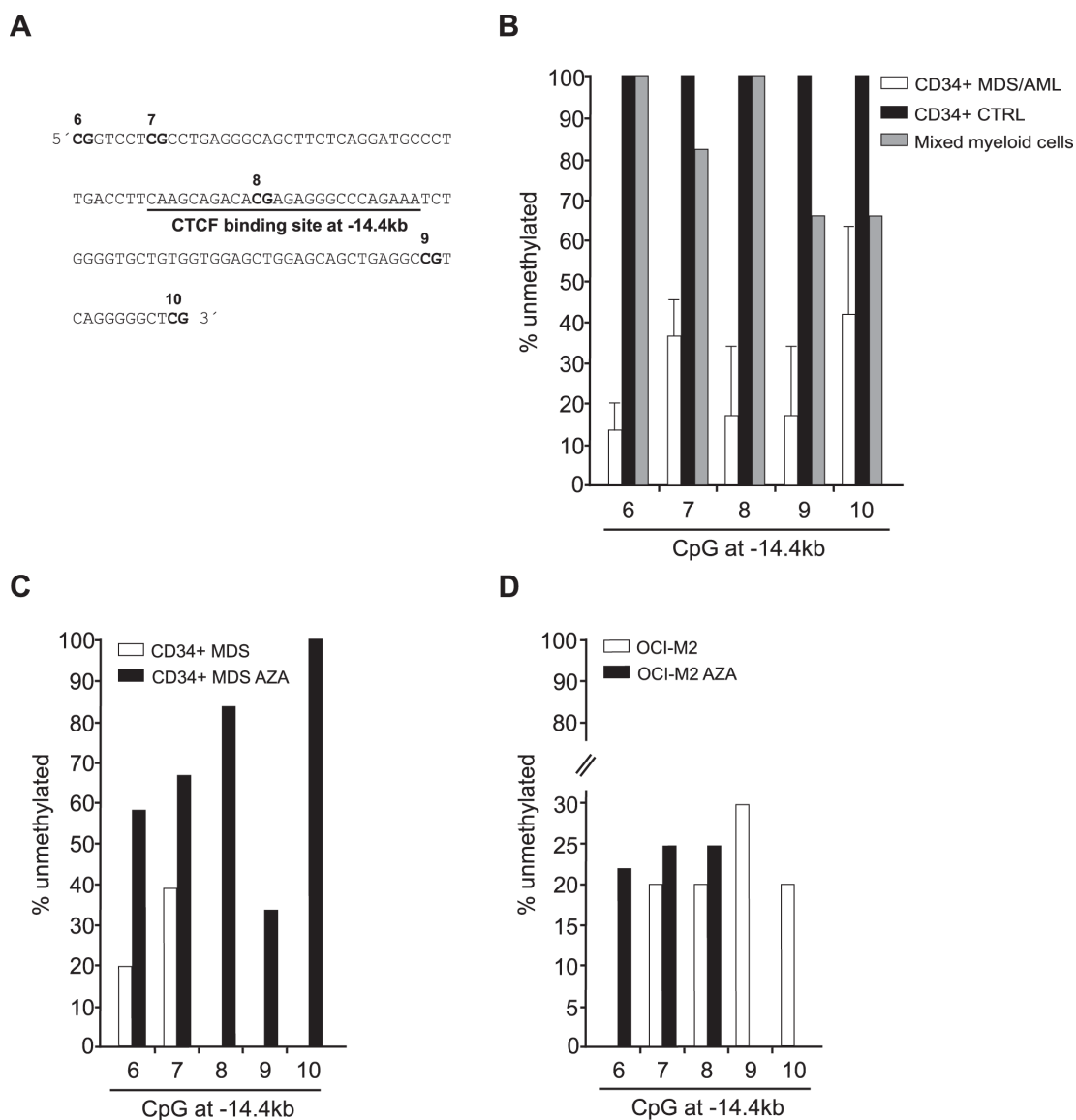
Dřívější práce ukázala, že AZA působí demetylaci URE v buňkách OCI-M2, známé regulační oblasti genu *SPI1* (Curik et al., 2012). Proto jsme dále zjišťovali, jaký vliv bude mít působení AZA na metylační stav enhanceru -14,4. Rozhodli jsme se pro tento experiment použít a porovnávat mezi sebou vzorky DNA izolované z CD34+ buněk od pacientů s MDS před a po terapii AZA. U pacienta léčeného AZA jsme pozorovali vyšší procento nemetylovaných CG než u pacienta bez demetylační terapie AZA (Obrázek 13C).

Dále jsme si položili otázku, zda v MDS/AML buněčné linii OCI-M2 můžeme pozorovat stejný vliv AZA na metylační stav enhanceru -14,4. Zjistili jsme, že na vazebném místě CTCF došlo po působení AZA k poklesu metylace na CG označeným číslem 7 a 8 o 5 % a na CG označeným číslem 6 o 22 % (Obrázek 13D). Ve srovnání s výsledky získanými na URE (Curik et al., 2012), kde byla demetylační terapie AZA vysoce efektivní, byla demetylace DNA na enhanceru -14,4 výrazná méně. Na dalších dvou CG s označením 9 a 10 v pozici 5' od vazebného místa CTCF se demetylační účinek AZA již neprojevil.

Kompletní data sekvenční analýzy metylace DNA v buňkách OCI-M2 na enhanceru -14,4, kde je významná vazba CTCF, a v oblastech -15,6 a -11, kde se vazba CTCF blíží významnému „nabohacení“, ukazuje doplňující obrázek 19C. V CD34+ buňkách pacientů s MDS léčených AZA jsme určili demetylaci enhanceru -14,4 na šesti CG, mezi které patří i CG demetylované v OCI-M2 (Obrázek 19B). Zajímavé výsledky jsme získali při porovnání normálních CD34+ buněk a CD34+ buněk od pacientů s MDS/AML. V normálních CD34+ buňkách jsme určili deset CG s nižší metylací DNA v enhanceru -14,4 oproti buňkám pacientů s MDS/AML (Obrázek 19A). Ve zbývajících sledovaných oblastech -15,6 ani -11 jsme mezi vzorky nepozorovali shodné ani podobné rozdíly v metylaci DNA (Obrázek 19A-C).

Dále sekvenační analýza odhalila, že v buňkách OCI-M2 po působení AZA dochází k demetylace DNA také v oblastech -15,6 a -11, jež pravděpodobně přispívá k významnému zvýšení „nabohacení“ vazby SMARCA5, nicméně tato úroveň demetylace DNA má menší vliv na zvýšení „nabohacení“ vazby CTCF. Ze získaných dat vyplývá, že metylační vzorec DNA v buňkách OCI-M2 před a po působení AZA je v souladu s našimi předpoklady o vlivu metylace DNA na vazbu CTCF a SMARCA5. To znamená, že metylace DNA v leukemických buňkách brání vazbě proteinů CTCF a SMARCA5.

V každé sledované oblasti -15,6; -14,4 a -11 působil AZA demetylaci DNA, nicméně úroveň demetylace neprobíhala stejnou silou na všech dinukleotidech CG a taktéž působení AZA neprobíhalo na všech dostupných místech s dinukleotidy CG. Ze získaných dat usuzujeme, že k demetylaci dochází spíše na vybraných CG nikoli na obsáhlejších ucelených sekvencích. V buňkách OCI-M2 můžeme porovnat sílu demetylace po působení AZA. Na CG se 100% metylací dochází ke snížení metylace o 22-30 %, na CG s 90 - 85% metylací ke snížení metylace o 15 %, na CG s 80% metylací ke snížení metylace o 5 %. Tato získaná data jsou ve shodě s dřívější prací, která uvádí, že čím vyšší je úroveň metylace DNA, tím dochází k silnější demetylaci DNA působením AZA (Klco et al., 2013).



Výsledkový obrázek 13. Metylace DNA vazebného místa CTCF v genovém lokusu *SPI1*. **(A)** Sekvence DNA vazebného místa CTCF v oblasti enhanceru -14,4 v lokusu *SPI1*. Dinukleotidy CG jsou v daném ampliconu (-14,4) očíslovány nad příslušnou sekvencí DNA. **(B)** Procento nemetylované DNA v oblasti enhanceru -14,4 bylo stanoveno sekvenováním bisulfitem modifikované DNA, která byla izolována z CD34+ buněk pacientů s MDS/AML (N=3, informace o pacientech jsou uvedeny v tabulce S1), kontrolních CD34+ buněk od zdravých dárců (N=1) a smíšených myeloidních buněk (N=1). Sekvence použitých primerů jsou uvedeny v tabulce S2. **(C)** Procento nemetylované DNA v oblasti enhanceru -14,4 bylo sledováno v CD34+ buňkách pacienta s MDS bez AZA terapie (N=1) a u pacienta s MDS léčeného AZA (N=1). **(D)** Procento nemetylované DNA v oblasti enhanceru -14,4 v buňkách OCI-M2

před a po inkubaci s AZA. Osa Y ukazuje procento nemetylovaných CpG. Osa X ukazuje očíslované CG, které jsou vyznačeny na obrázku 6A. Chybové úsečky vyjadřují standardní chybu.

4.7 Manipulování hladiny CTCF nebo SMARCA5 ovlivňuje transkripci genu *SPI1*

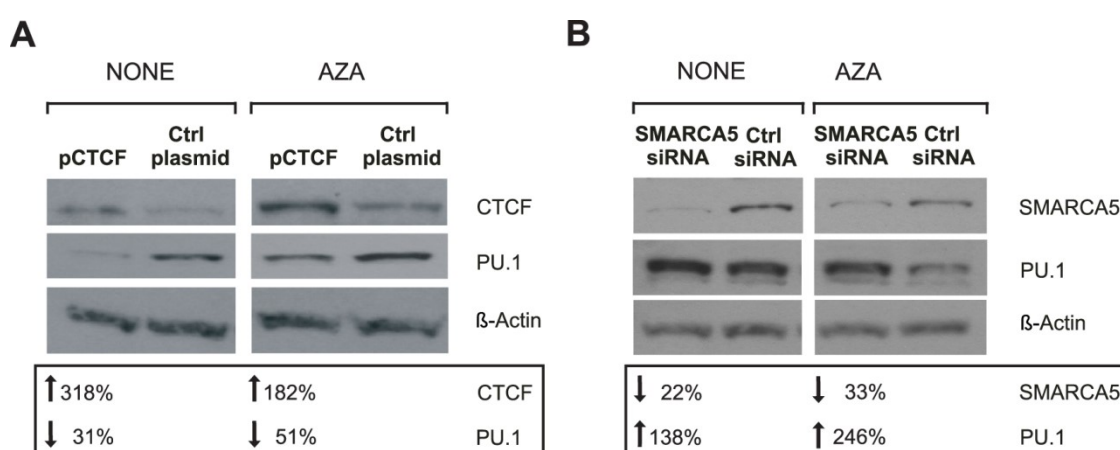
Na základě našich výsledků, které ukazují vazbu CTCF a SMARCA5 na genu *SPI1* ve smíšených myeloidních buňkách a v blastových buňkách OCI-M2 ovlivněných AZA, jsme předpokládali, že CTCF a SMARCA5 mohou řídit transkripci genu *SPI1*. Rozhodli jsme se tuto možnost ověřit na lidské buněčné linii OCI-M2, ve které jsme manipulovali hladinou CTCF a SMARCA5. Buněčnou hladinu CTCF jsme zvýšili transfekováním plasmidu kódující cDNA CTCF (pCTCF). Hladinu SMARCA5 jsme snížili transfekováním siRNA komplementární k mRNA pro SMARCA5. Společně s pCTCF a siRNA SMARCA5 jsme do buněk transfekovali zelený fluorescenční protein (GFP), který nám sloužil jako indikátor účinně proběhlé transfekční reakce. V buňkách exprimujících GFP jsme metodou Western blotu analyzovali hladinu CTCF, SMARCA5 a *SPI1*. Vzhledem k tomu, že předešlá data ukazují, že působení AZA ovlivňuje vazbu CTCF a SMARCA5 na genové oblasti *SPI1*, manipulovali jsme hladinami proteinů v nepřítomnosti a přítomnosti AZA. AZA je známý svou stimulací exprese *SPI1* a jeho cílových genů (Curik et al., 2012) (Obrázek 19). Očekávali jsme dvě možnosti: 1) CTCF a SMARCA5 svou vazbou na nově demetylovanou DNA stimuluje expresi *SPI1* nebo 2) CTCF a SMARCA5 po navázání na enhancer -14,4 blokuje komunikaci mezi enhancerem a promotorem *SPI1* a tím tlumí transkripci *SPI1*.

Přechodně zvýšená exprese CTCF v OCI-M2, ať už v nepřítomnosti AZA nebo po předchozí inkubaci buněk v médiu s AZA, vedla k poklesu exprese *SPI1* (Obrázek 12A). Zatímco přechodně snížená exprese SMARCA5, kterou jsme navodili transfekovanou siRNA, v nepřítomnosti AZA nebo po předchozí inkubaci buněk s AZA, vedla ke zvýšení exprese *SPI1* (Obrázek 14B). Z výsledků CHIP, kde jsme

pozorovali vazbu CTCF na amplikon -0,15 (promotorovu oblast), usuzujeme, že zvýšená hladina CTCF bez působení AZA blokuje expresi SPI1 pravděpodobně svou aktivitou na promotoru. Uvažujeme o možnosti, že přítomnost CTCF na promotoru *SPI1* může snižovat vazbu jiných transkripčních faktorů, které se účastní pozitivní regulace SPI1. Prozatím jsme však takový regulační vztah neprokázali.

Ukázali jsme, že CTCF a SMARCA5 jsou negativní regulační molekuly řídící transkripci *SPI1* v leukemických buňkách. Navíc zvýšená hladina CTCF brání hypometylační terapii v obnovení exprese SPI1 a naopak snížení hladiny SMARCA5 podporuje hypometylační terapií navozenou stimulaci exprese SPI1. Příčinou je pravděpodobně vazba CTCF/SMARCA5 na enhancer -14,4, kterou zprostředkuje působení AZA.

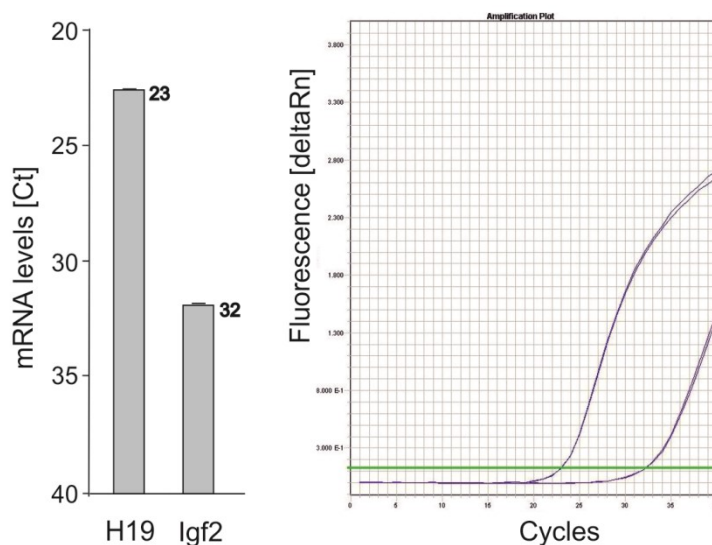
Uvedené výsledky nám dohromady poskytují důkaz o přímém spojení mezi vazbou CTCF a SMARCA5 na nově demetylovanou DNA v regulačních oblastech genu *SPI1* a transkripční aktivitou genu *SPI1* v blastových buňkách AML. Z výsledků usuzujeme, že CTCF a SMARCA5 brání terapeutickému působení AZA, a že snížení hladiny SMARCA5 a CTCF může zlepšovat terapeutické výsledky AZA u pacientů s MDS a AML.



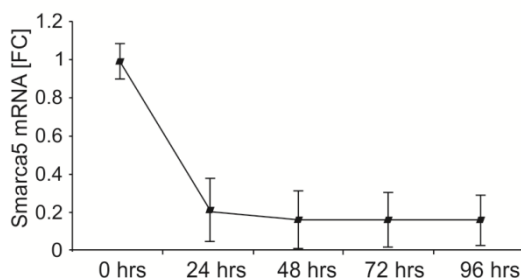
Výsledkový obrázek 14. Změna exprese CTCF a SMARCA5 ovlivňuje expresi SPI1 (A) Množství proteinu SPI1 (PU.1) bylo sledováno metodou Western blot

v buňkách OCI-M2 se zvýšenou expresí CTCF. Buňky OCI-M2 byly transfekovány plasmidem kódujícím CTCF (pCTCF) nebo negativním kontrolním plasmidem pBSK+ (Ctrl plasmid) a proteinový lyzát byl zpracován po 72 hodinách inkubace. Jedna část buněk byla inkubována v přítomnosti 5 μ M AZA (AZA) a druhá v nepřítomnosti AZA (NONE). **(B)** Množství proteinu SPI1 (PU.1) v buňkách OCI-M2 se sníženou expresí SMARCA5. Buňky OCI-M2 byly transfekovány siRNA proti SMARCA5 (SMARCA5 siRNA) nebo nespecifickou siRNA (Ctrl siRNA) a proteinový lyzát byl zpracován po 72 hodinové inkubaci. Jedna část buněk byla inkubována v přítomnosti 5 μ M AZA (AZA) a druhá v nepřítomnosti AZA (NONE). Pro kontrolu nanášky jsme použili určení β -aktinu. Změna množství specifických proteinů byla určena denzitometricky a je znázorněna v malé tabulce pod obrázkem.

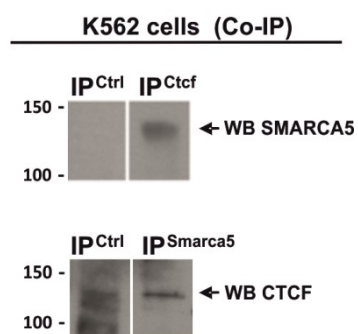
4.8 Doplnující výsledkové obrázky



Doplnující výsledkový obrázek 15. Expresi mRNA genů *H19* a *Igf2* v buňkách MEL. Expresi mRNA jsme zjišťovali metodou RT-qPCR a je zobrazena v hodnotách Ct (levá část). Amplifikační křivky jednotlivých vzorků mRNA jsou definovány osou X, kde je vyznačen počet cyklů PCR, a osou Y, kde je zaznamenán fluorescenční signál produktu PCR (lineární zobrazení delta Rn = změna hodnoty fluorescence) (pravá část).

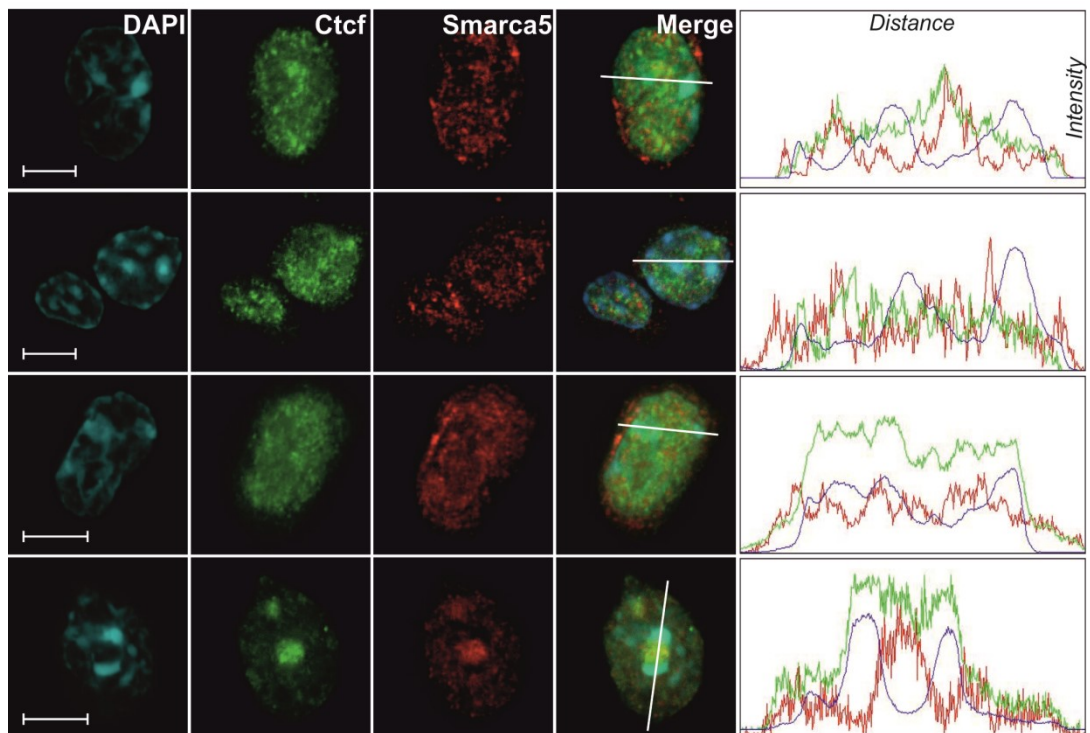


Doplňující výsledkový obrázek 16. Snížená exprese Smarca5 v indukovaných buňkách MEL-shSmarca5. Buňky MEL-shSmarca5 byly inkubovány v přítomnosti DOX (1 μ M/ml) po dobu 96 hodin. Celková mRNA byla analyzována ve 24 hodinových intervalech (osa X). Množství mRNA bylo stanoveno metodou RT-qPCR. Množství mRNA bylo normalizováno na množství Hprt1 a je zobrazeno jako násobná změna vztažená k buňkám, které nebyly inkubovány s DOX (osa Y). Chybové úsečky znázorňují standardní chybu (SE) vypočítanou pro dva nezávislé experimenty.

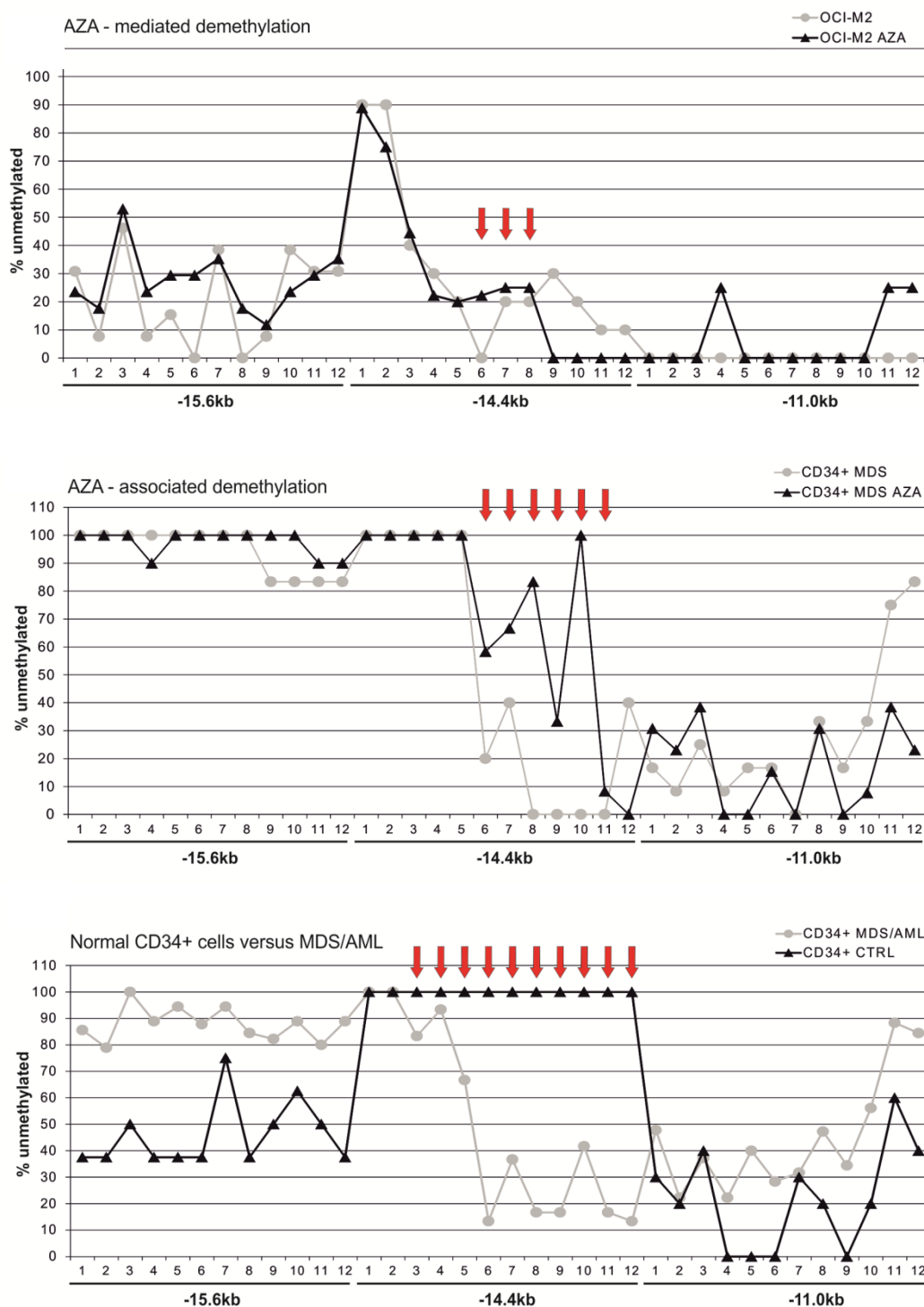


Doplňující výsledkový obrázek 17. Ko-immunoprecipitace SMARCA5 a CTCF v buňkách K562. Protilátky použité pro imunoprecipitaci: CTCF (horní panel) nebo SMARCA5 (dolní panel). Protilátky použité pro Western blot: SMARCA5 (horní panel) nebo CTCF (dolní panel). Šipky ukazují specifický signál příslušného proteinu.

MEL IF

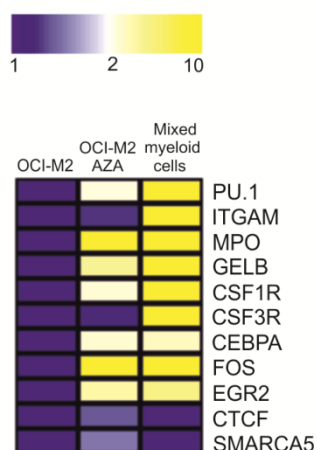


Doplňující výsledkový obrázek 18. Rozložení Ctf a Smarca5 v buňkách MEL testované imunologickým barvením ve spojení s konfokální laserovou skenovací mikroskopií. Buňky MEL byly fixovány 3,5% formaldehydem a značeny protilátkami proti Ctf (zelená barva), Smarca5 (červená barva) a DAPI (modrá barva). Obrázek, který ukazuje spojené zobrazení fluorescenčních signálů všech protilátek (Merge), byl použit pro určení profilů intenzit jednotlivých proteinů v řezu naznačeném přímkou. Profily intenzity fluorescence a stanovení obsahu heterochromatinu byly provedeny pomocí softwaru ImageJ 1,38x. Osa Y znázorňuje profil intenzity fluorescence příslušného fluoroforu, osa X představuje vzdálenost.



Doplňující výsledkový obrázek 19. (A) Demethylace DNA indukovaná AZA v buněčné linii OCI-M2. Sekvenování bisulfitem modifikované DNA byla provedena na genovém lokusu *SPI1* v oblastech -15,6kb, -14,4kb a -11,0kb v buňkách OCI-M2 před a po působení AZA. Sekvence použitých primerů jsou uvedeny v Tabulce 9. Každá analyzovaná oblast obsahuje dvanáct CpG, které jsou naznačeny pod

jednotlivými grafy. **(B)** Demethylace DNA indukovaná AZA v CD34+ buňkách izolovaných z pacienta s MDS bez AZA terapie (N=1, informace o pacientech jsou uvedeny v Tabulce S1) a z pacienta s MDS po AZA terapii (N=1). **(C)** Methylace DNA v CD34+ normálně vyžívajících buňkách (N=1) a CD34+ buňkách pacientů s MDS/AML (N=3). Osa Y ukazuje procento nemetylovaných CpG. Osa X ukazuje číselné označení CpG. Červené šipky upozorňují na demethylaci CpG.



Doplňující výsledkový obrázek 20. Expres mRNA SPI1 a mRNA transkriptů cílových genů *SPI1* v buněčné linii OCI-M2 a normálně diferencujících buňkách (zobrazeno tzv. tepelnou mapou). Celková mRNA získaná z primárních smíšených myeloidních buněk, z buněčné linie OCI-M2 před a po působení AZA (72 hodinová inkubace s AZA v koncentraci 5 μ M) byla analyzována RT-qPCR. Expres je normalizována na průměr hodnot HPRT1 a GAPDH a následně na hodnotu 1, která je rovna expresi buněčné linie OCI-M2 před působením AZA.

AML

Summary of Patients (N=2)/Summary of Samples (N=2)

Clinical Parameters		Number of patients (N=)	
1. Age			
	(years)	V 282 (62), V361 (69)	
2. Gender			
	Male	V361	
	Female	V282	
3. Diagnosis (WHO Classification 2008)			
AML with recurrent genetic abnormalities			
AML with t(8;21)(q22;q22); RUNX1-RUNX1T1			
AML with inv(16)(p13.1q22) or t(16;16)(p13.1;q22); CBFB-MYH11			
Acute promyelocytic leukemia with t(15;17)(q22;q12); PML-RARA			
AML with t(9 ;11)(p22;q23); MLLT3-MLL			
AML with t(6;9)(p23;q34); DEK-NUP214			
AML with inv(3)(q21q26.2) or t(3;3)(q21;q26.2); RPN1-EVI1		V 282	
AML with mutated NPM1*			
AML with mutated CEBPA*			
AML with myelodysplasia-related changes		V361	
Therapy-related myeloid neoplasms			
Myeloid sarcoma			
Myeloid proliferations related to Down syndrome			
Blasticplasmacytoid dendritic cell neoplasm			
4. Cytogenetic (Risk Category)			
	Favorable (t(8;21), t(15;17), inv(16))		
	Intermediate (Normal, +8, +21, +22, del(7q), del(9q), Abnormal 11q23, all other)	V282, V361	
	Unfavorable (-5, -7, del(5q), Abnormal 3q, Complex cytogenetics)		
5. Overall Survival (From Diagnosis to last follow up)			
	<6 months		
	6 - 24 months	V282	
	>24 months		
6. Therapy			
	Sample before treatment	V282, V361	
	BSC (best supportive care)		
	Standard induction chemotherapy (7+3)		
	Demethylation drug Azacitidine (Vidaza)		
	Other		
7. Response (IWG Criteria)			
	Non-response		
	HI (Hematologic Improvement)		
	PR (Partial remission)	V361 (after 4. AZA)	
	CR (Complete remission)		
	CRi (incomplete blood count recovery)		
	PD (disease progression)	V282	
	Relapse		
8. Time of the study (during)			
	date of start	date of end	
		19. 4. 2010	30. 5. 2013
	Time of study (observation) in months		
9. Outcome			
	Died (during the study)	V282(31. 3. 2011), V361 (19. 3. 2012)	
	Alive (after study)		

MDS

Summary of Patients (N=2)/ Summary of Samples (N=2)

<i>Clinical Parameters</i>	<i>Number of patients (N=)</i>		
1. Age			
(years)	V285 (67), V367(69)		
2. Gender			
Male	V367, V285		
Female			
3. Diagnosis (WHO 2008)			
RA (Refractory cytopenia)			
RARS (Refractory anemia with ring sideroblasts)			
RARS-t (Refractory anemia with ring sideroblasts – thrombocytosis)			
RCMD (Refractory cytopenia with multilineage dysplasia)			
RAEB-I (Refractory anemia with excess blasts 5-9% blasts)	V285		
RAEB-II (Refractory anemia with excess blasts 10-19% blasts)	V367		
CMML (Myelodysplastic-myeloproliferative overlap syndromes)			
5q- syndrome			
Myelodysplasia unclassifiable			
4. Cytogenetic (IPSS)			
Favorable (Normal, 5q-, -Y, 20q-)	V367 (del 20), V285 (del20)		
Intermediate (All others)			
Unfavorable (Complex, -7/7q-)			
5. IPSS			
Low risk			
Int I			
Int II	V367, V285		
High risk			
6. Overall Survival (From Dg to LF)			
<12 months			
12-36 months			
>36 months	V367, V285		
7. Therapy			
Sample before treatment	V367		
Azacitidine (Vidaza)	V285		
Other (chemotherapy)			
BSC (best supportive care)			
8. Therapy response (IWG criteria 2006)			
Non-response			
HI (Hematologic Improvement)			
PR (Partial remission)	V285		
CR (Complete remission)			
Relapse			
Transformation to AML			
9. Time of the study (during)			
date of start	date of end	19. 4. 2010	30. 5. 2013
Time of study (observation) in months			
10. Outcome			
Died (during the study)	V367 (5. 12. 2010)		
Alive (after study)	V285		

Doplňující tabulka 12. Souhrnné informace o pacientech.

5. DISKUZE

MDS je klonální onemocnění pluripotentní kmenové buňky vedoucí k poruše krvetvorby. Krvetvorná buňka ztrácí schopnost diferencovat, vznikají krevní elementy s morfologickými defekty (buněčná dysplázie), neefektivní hematopoéza způsobuje cytopénii v periferní krvi a poškozené a nezralé buňky se hromadí v kostní dřeni. U MDS mohou být postiženy všechny tři krevní řady, jedná se o heterogenní skupinu chorob, která se vyznačuje vysoce variabilním klinickým projevem. Příčina vzniku MDS proto probíhá zcela jistě již na molekulární úrovni a je heterogenního charakteru. Onemocnění MDS navíc často přechází do AML. Příčiny vzniku tohoto onemocnění a selhávání používané terapie podávané k léčbě MDS jsou dosud navzdory intenzivnímu studiu nejasné.

CTCF řídí expresi mnoha genů důležitých pro diferenciaci krevních buněk, avšak jeho patologický vliv na expresi těchto genů při vzniku leukémie není prozatím znám. SMARCA5 je známý svou úlohou v časně fázi diferenciaci myeloidních buněk a jeho zvýšená hladina v progenitorových krvetvorných buňkách blokuje další vyžívání (Kokavec et al., 2017; Stopka et al., 2000). Zajímalo nás proto, zda SMARCA5 a CTCF interagují a společně ovlivňují expresi krvetvorných prodiferenciačních genů, jejichž narušená exprese vede ke vzniku leukemických buněk.

Naše práce ukazuje důležitou úlohu interakce transkripčního faktoru CTCF a chromatin remodelačního faktoru SMARCA5 v regulaci transkripce prodiferenciačního genu *SPI1*. Nejprve jsme popsali roli ATP-dependentního chromatin remodelačního faktoru Smarca5 během procesu interakce Ctf se známou cílovou sekvencí v oblasti regulační sekvence ICR *H19/Igf2*. Genový lokus *H19/Igf2* jsme pro naše studium vybrali na základě předchozích nezávislých studií, které ukázaly, že CTCF i SMARCA5 interagují s kohezinem. První práce ukazuje, že SMARCA5 společně s proteinem obsahujícím bromodoménu WCRF180 přímo interaguje s členem kohezinového komplexu RAD21. V přítomnosti SMARCA5 se může kohezinový komplex vázat na DNA (Hakimi et al., 2002). Druhá práce ukazuje, že přítomnost CTCF je nezbytná pro vazbu kohezinu na specifická místa genomu,

mezi něž patří lokus *H19/Igf2*. Navíc interakce CTCF s kohezinem, konkrétně s podjednotkami RAD21 a SMC1, je nezbytná pro enhancer blokuující aktivitu CTCF na ICR *H19/Igf2* (Wendt and Peters, 2009). Další publikace prokázala, že kohezinový komplex upevňuje chromatinové smyčky vytvořené faktorem CTCF a přispívá tak k regulaci transkripce genů *H19* a *Igf2* (Nativio et al., 2009). Výše zmíněná pozorování společně s našimi daty naznačují, že SMARCA5 a CTCF mohou interagovat na DNA pravděpodobně v kohezinovém komplexu, a společně řídit transkripci genů důležitých pro diferenciaci krevních buněk a nádorových supresorových genů.

Naše práce předkládá důkaz, že Smarca5 je nezbytný pro vazbu Ctf na chromatin v oblasti ICR *H19/Igf2* v leukemických buňkách (Obrázek 8). Tento vztah není vzájemný, Smarca5 interaguje s chromatinem nezávisle na Ctf. Jiná odborná studie prokázala interakci CTCF s dalším chromatin remodelačním faktorem CHD8 (Chromodoména, helikáza, DNA vazebný protein 8) (Ishihara et al., 2006). Přítomnost CHD8 je, podobně jako Smarca5, nutná pro enhancer blokuující aktivitu Ctf na ICR *H19/Igf2*, avšak na rozdíl od Smarca5 nemá CHD8 vliv na interakci CTCF s DNA v oblasti ICR *H19/Igf2*. Zdá se proto, že Smarca5 je prvním v řadě remodelačních faktorů, který je nezbytný pro zahájení komplexní remodelace chromatinu a svou přítomností poskytuje signál pro další proteiny, jež mají za úkol podporovat CTCF v jeho aktivitách. Zajímavým zjištěním je, že ztráta CHD8 se projevuje zvýšením metylace DNA a snížením acetylace histonových konců v oblasti vazebných míst CTCF na insulátorech v genových oblastech *c-myc* a *BRCA1*, avšak ne v imprintované oblasti *H19/IGF2* (Ishihara et al., 2006). Otázkou, na kterou bychom rádi v budoucnosti odpověděli, zůstává, zda Smarca5 ovlivňuje metylaci DNA na vazebných místech CTCF.

Jaká je funkce komplexu Ctf/Smarca5 na DNA? Role obou faktorů Ctf i Smarca5 jsou komplexní, jelikož každý interaguje s řadou dalších proteinů. SMARCA5 interaguje s proteinovými komplexy, které jsou zapojeny do procesu sestavování nukleozómů a jejich pohybování po vlákně DNA: ACF (s Acf1, homologem WCRF180) (Fedorov and Kadonaga, 2002b), RSF (LeRoy et al., 2000;

Loyola et al., 2003; Loyola et al., 2001), WICH (s Wstf) (Bozhenok et al., 2002), NoRC (Santoro et al., 2002). Tyto práce také naznačují, že vazební partneři Smarca5 v jednotlivých chromatin remodelačních komplexech určují výslednou funkci Smarca5. Například v komplexu NoRC má Smarca5 transkripčně represivní funkci na promotorech genů kódujících ribozomální DNA. NoRC zde zprostředkovává vazbu histonových deacetyláz, histonových metyltransferáz a DNA metyltransferáz, jež působí změnu konformace chromatinu vedoucí k inhibici transkripce (Santoro et al., 2002). Zatímco v komplexu WICH působí Smarca5 transkripční aktivaci. Komplex WICH interaguje s RNA polymerázami I a III a umožňuje zahájení transkripce ribozomální DNA nebo 5S rRNA a 7SL RNA. (Cavellan et al., 2006; Percipalle et al., 2006).

Naše data ukazují, že Ctcf je dalším partnerským proteinem, který určuje vliv Smarca5 na proces transkripce. Zjistili jsme, že Ctcf a Smarca5 spolupracují v regulaci transkripce v oblasti ICR *H19/Igf2* a jejich působení vede k podobnému transkripčnímu výsledku. Po navozené inhibici proteinů Ctcf nebo Smarca5 můžeme pozorovat jak Smarca5 se Ctcf společně stimulují expresi genu *H19* a společně tlumí expresi *Igf2* (Obrázek 10). Experimenty s narušenou hladinou Ctcf nebo Smarca5 doplněné o testování modelových plasmidů připravených pro určení enhancer blokující aktivity Ctcf a Smarca5 jsou důkazem toho, že Smarca5 je kofaktorem Ctcf ve funkci blokování enhanceru v oblasti ICR *H19/Igf2* (Obrázek 9). Domníváme se, že zvýšená hladina Smarca5 v leukemických buňkách může abnormálně zesilovat vazbu CTCF na insulátorových regulačních oblastech a nevhodně tak blokovat expresi tumor supresorových genů. Domníváme se proto, že vazba a aktivita komplexu Ctcf-Smarca5 by mohla být terapeutickým cílem na postižených cílových genech krvetvorby.

Naše práce dále předkládá důkaz o důležité roli CTCF/SMARCA5 v regulaci transkripce genu *SPI1* v blastech AML. Transkripční faktor SPI1 řídí expresi až 3000 genů v krvetvorných buňkách a určuje tak směr diferenciaci krvetvorných buněk. Pro buněčné rozhodování ve vývoji krvetvorných buněk je zásadní buněčná koncentrace SPI1 (Burda et al., 2010). Expresní změny prodiferenciačního faktoru

SPI1 byli pozorovány u myší, buněčných linií a pacientů s MDS a AML. Zatímco 50% pokles normální hladiny SPI1 nezpůsobuje žádné abnormality ve fyziologickém vývoji krevních buněk, 80% pokles normální hladiny SPI1 způsobený homozygotní delecí regulační oblasti URE působí hromadění abnormálních prekurzorových krevních buněk a rozvoj AML (Rosenbauer et al., 2004). Hromadění mutací genů nebo jejich regulačních oblastí způsobuje vznik nádorových onemocnění nebo urychluje průběh nádorového onemocnění. Druhou jmenovanou možností dokládají výsledky naší předchozí práce, které ukazují, že v myším modelu s kombinovanou homozygotní delecí oblasti URE a nádorového supresoru *Tp53* (genotyp URE^{-/-} p53^{-/-}) se pokles hladiny SPI1 dále prohlubuje a vyvíjí se agresivně probíhající AML (Basova et al., 2013). Dále jsme u myší s tímto genotypem identifikovali regulační dráhu p53/Myb/miR-155/Spi-1. Ztráta p53 aktivuje expresi onkogenních molekul Myb a miR-155, které snižují expresi Spi-1. Takto snížená hladina Spi-1 zkracuje dobu vzniku AML a zhoršuje průběh AML u myší s kombinovanou mutací genů *Spi-1* a *Tp53*. U myší s tímto genotypem jsme pozorovali rychle se rozvíjející a množící se blasty, těžkou anémií, trombocytopenií související s megakaryocytární dysplázií v kostní dřeni a slezině, rychlý metabolický rozvrat spojený s hubnutím a výrazně kratší přežívání. Zjistili jsme, že agresivní rysy AML souvisí s extrémně zvýšenou expresí onkogenů Myb a mir-155. Nově identifikovanou regulační dráhu p53/Myb/miR-155/SPI1 jsme pozorovali rovněž u pacientů s AML s mutacemi lokusu 17p13, jenž nese gen *TP53* (Basova et al., 2013).

U pacientů s MDS a sekundární AML dosud nebyly pozorovány mutace genu *SPI1*, avšak na rozdíl od normálních hematopoetických progenitorů a *de novo* AML je jejich genom asociován s rozsáhlými změnami v metylaci DNA (Figueroa et al., 2009). Metylace DNA hraje důležitou roli v regulaci rozličných fyziologických a patologických procesů v lidských buňkách. Patologicky zvýšená metylace DNA může vést k tišení tumor supresorových genů, ztrátě homeostázy DNA a celkové genomické nestabilitě vedoucí k rozvoji nádorů. Z tohoto důvodu důležitost metylace DNA v biologických procesech představuje zajímavý diagnostický a terapeutický cíl u pacientů s MDS a sekundární AML.

Vysoce metylované oblasti DNA vedou u MDS a AML k utlumení klíčových genů pro buněčnou diferenciaci a tumor supresorových genů (Bejar et al., 2011a), mezi které patří *SPI1*. Nízká hladina *SPI1* byla detekována u modelové buněčné linie OCI-M2 a u pacientů s MDS s vysokým rizikem přechodu do AML (Curik et al., 2012). U těchto pacientů se při terapii používají hypometylační látky 5-azacytidin (AZA, komerční název Vidáza) a decitabin (komerční název Dacogen). Působení AZA a decitabinu však není zcela identické (Hollenbach et al., 2010). Pro naše studium je zajímavé, že hypometylační látka AZA působí proti abnormálně vysoké metylaci DNA v oblasti genu *SPI1*, kde demetyluje regulační oblast URE a zvyšuje expresi *SPI1*. Jelikož exprese *SPI1* se zvyšuje po působení AZA i v buňkách s homozygotní delecí URE, je pravděpodobné, že AZA působí v dalších nespecifikovaných regulačních oblastech genu *SPI1* (Curik et al., 2012).

Výsledky naší práce potvrdily tento předpoklad. Ukázali jsme, že se oblast enhanceru v pozici -14,4 kb od transkripčního počátku *SPI1* v buňkách MDS a AML oproti normálně vyžívajícím buňkám vyznačuje zvýšenou metylací DNA. A právě v této oblasti enhanceru -14,4 hypometylační látka AZA snižuje metylační stav DNA (Obrázek 13, Obrázek 19). Oblast enhanceru -14,4 je jediné konzistentně (ikdyž v různém rozsahu) demetylované místo napříč použitými buňkami. Současně v této oblasti efektivita demetylace DNA pozitivně korelovala s počáteční úrovní metylace, podobně jak bylo ukázáno v práci (Klco et al., 2013). Avšak v dalších oblastech -15,6 a -11 jsme pozorovali, že východisková hypermetylace DNA nemusí nutně vést k efektivní demetylaci, v některých případech dinukleotidů CG jsme dokonce pozorovali zvýšení metylace. Taktéž práce (Grovdal et al., 2013) pozorovala, že AZA může významně hypermetylovat DNA (ve 4 % všech sledovaných případů CG) a že působení AZA způsobuje změnu exprese i bez prokázané demetylace DNA, což nasvědčuje o dalších pochodech (např. změnách histonových variant), které mohou řídit expresi genů po působení AZA.

Naše data dále ukazují, že CTCF, SMARCA5 a zástupci kohezinového komplexu se vážou na gen *SPI1* během působení AZA (Obrázek 11, 12). Z lokalizace kohezinového komplexu na DNA, který se v určitých amplikonech překrývá s vazbou

CTCF a SMARCA5, usuzujeme, že kohezin zde přispívá k funkci CTCF podobným způsobem (tj. upevňováním chromatinové smyčky) jako v oblasti ICR *H19/Igf2* (Nativio et al., 2009).

V blastových buňkách AML se na metylovaný gen *SPI1* váže pouze SMARCA5 a to výhradně do oblasti URE. Po demetylaci DNA se CTCF a SMARCA5 nově vážou na enhancer -14,4 bez přítomnosti kohezinu, na element -11 se CTCF a SMARCA5 vážou společně s kohezinem (Obrázek 11,12). Na URE se po působení AZA váže SMARCA5 a kohezin v takové úrovni, kterou jsme pozorovali u normálně diferencujících myeloidních buněk, zatímco CTCF jsme po působení AZA na URE nepozorovali. Zajímavé je, že kohezin, jehož vazba na DNA vyžaduje demetylaci DNA a vazbu SMARCA5 (Hakimi et al., 2002), se váže do oblasti -11, na které nedošlo k tak efektivní demetylaci jako v oblasti -14,4, kde se naopak kohezin po působení AZA neváže. Domníváme se, že kohezin pro svou vazbu na DNA vyžaduje komplexnější skladbu chromatinu. Pravděpodobně jde kromě přítomnosti SMARCA5, CTCF také o specifickou sekvenci DNA, na níž proběhne i jen částečná demetylace DNA.

Získaná data naznačují, že 1) v oblasti -11 dochází k obnově vazby CTCF, SMARCA5 a kohezinu, kterou pozorujeme v normálně diferencujících buňkách; 2) v oblasti -14,4 dochází k nové vazbě CTCF a SMARCA5 (bez kohezinu), kterou v normálně diferencujících buňkách nepozorujeme. Je pravděpodobné, že komplex CTCF/SMARCA5/kohezin spolu interagují v oblasti -11, jež byla dříve definována jako slabší enhancer komunikující s URE a promotorem *SPI1* (Leddin et al., 2011), aby přispívali k aktivaci exprese *SPI1*. Podobný vliv CTCF/SMARCA5 jsme očekávali i v druhém případě, proteinová analýza však ukázala, že CTCF a SMARCA5 expresi *SPI1* inhibují. Jakým mechanismem interakce CTCF/SMARCA5 s enhancerem -14,4, k níž došlo po působení AZA, ovlivňuje transkripci genu *SPI1* není doposud objasněno. Můžeme uvažovat o možnosti, že vazba CTCF není dostatečně silná pro zajištění normální stimulace transkripce *SPI1*, která probíhá pomocí interakce URE a dalších pozitivních regulačních oblastí s promotorem *SPI1* (Leddin et al., 2011). Avšak vzhledem k slabé vazbě CTCF na enhanceru -14,4 kb v normálně vyvíjejících

buňkách, je pro nás pravděpodobnější vysvětlení, že CTCF a SMARCA5 interagují na enhanceru -14,4, aby zde mechanismem blokování enhanceru blokovali transkripci genu *SPI1*. Také můžeme uvažovat o možnosti, že SMARCA5 v oblasti -14,4 umožňuje vazbu nejen CTCF ale také jiným faktorům, inhibitorům *SPI1*, jejichž vliv je dominantnější než CTCF.

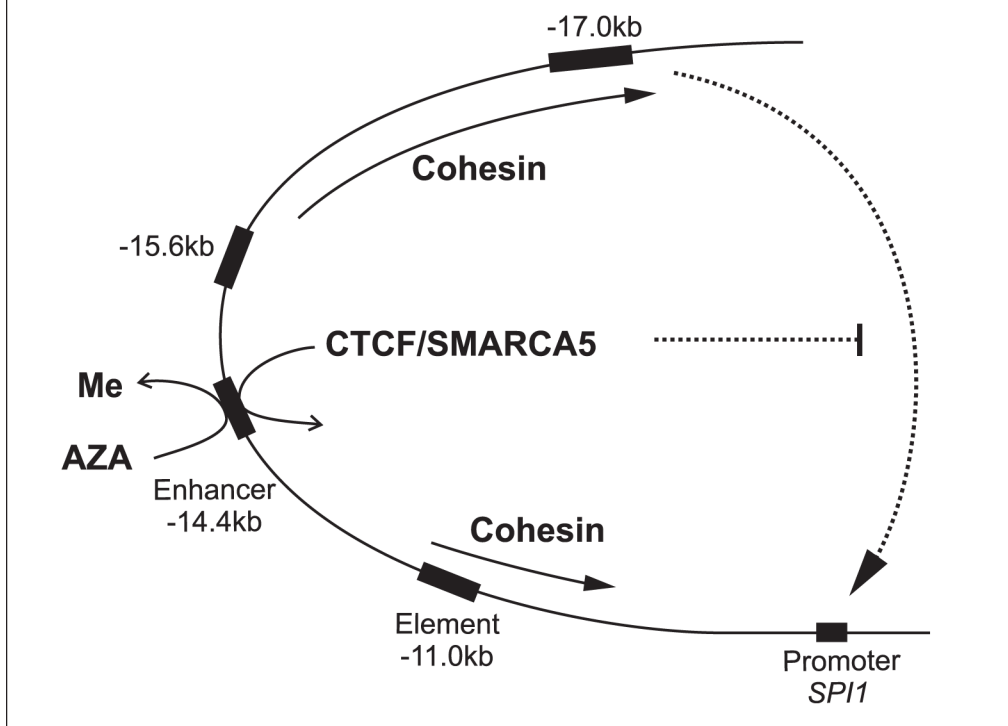
Na otázku, k čemu může sloužit mechanismus blokování enhanceru na genu *SPI1* během hypometylační terapie u MDS/AML, nemůžeme v tento okamžik přesně odpovědět. Domníváme se, že inhibice *SPI1* je stejně tak důležitá jako jeho aktivace a že může být využívána během časně fáze diferenciačního rozhodování krevních buněk, ke které dochází po předchozí demetylacii DNA (Hu et al., 2010). Známým příkladem, kdy dochází k tlumení exprese *SPI1*, je vyžívání erytroidní krevní řady. Odborné práce ukázaly, že k terminální diferenciaci erytroleukemických buněk dochází po dramatickém poklesu exprese *SPI1* (až na 5% původní hladiny) a že právě pokles hladiny *SPI1* je počátečním regulačním bodem v procesu diferenciaci (Rao et al., 1997; Rosenbauer et al., 2004). Naši domněnku podporuje zjištění, že k diferenciaci erytroleukemických buněk přispívá zvýšení hladiny CTCF (Torrano et al., 2005). Dalším možným vysvětlením může být, že vazba CTCF/SMARCA5 na enhancer -14,4 je aberantní a specifická pro buňky AML podstupující DNA demetylační terapii AZA a v normální fyziologii vyžívajících buněk neexistuje.

Mechanismus, jakým probíhá aktivace transkripce genu *SPI1*, byl již dříve popsán. Silná aktivace transkripce *SPI1* v myeloidních buňkách probíhá po vzniku dvou regulačních chromatinových smyček spojující oblast URE, enhancer -14,4 kb (-12 kb v myším genomu) a promotor *SPI1* za současné vazby specifických transkripčních faktorů C/EBP α , EGR2 a *SPI1* v těchto regulačních oblastech (Leddin et al., 2011). Naopak mechanismus, jakým probíhá inhibice genu *SPI1*, nebyl tímto způsobem doposud popsán.

Naše práce popisuje inhibici transkripce *SPI1*, jež probíhá pod vlivem metylace DNA. Na základě našich pozorování zde představujeme model, který zahrnuje metylaci DNA rozeznávající faktor CTCF, který spolupracuje na DNA s chromatin remodelačním faktorem SMARCA5. Vysoká metylace DNA v buňkách

MDS a AML brání vazbě transkripčních faktorů a vede ke strukturním změnám chromatinu, které jsou charakteristické pro represi genu *SPI1*. Podle našich dat získaných metodou CHIP se CTCF váže na DNA především v místě enhanceru -14,4 po působení demetylační terapie AZA (Obrázek 11). Vazba CTCF na enhancer -14,4 koreluje se sníženou metylací DNA po působení AZA (Obrázek 19) a přítomností SMARCA5. Podle dat získaných na genovém lokusu *H19/Igf2* usuzujeme, že SMARCA5 zde zastává důležitou úlohu jako chromatin remodelační faktor, který umožňuje vazbu CTCF na DNA (Obrázek 8C). Členové kohezinového komplexu se vážou podobně jako SMARCA5 na URE a element -11 kb a pravděpodobně také ovlivňují strukturu genu *SPI1* v diferencujících myeloidních buňkách. Dále z našich výsledků usuzujeme, že použitím demetylační terapie u MDS/AML vzniká aberantní vazba CTCF/SMARCA5 v regulační oblasti genu *SPI1*, kde přítomnost CTCF/SMARCA5 brání úplnému obnovení exprese *SPI1*. Z toho vyplývá, že působení AZA mění v leukemických buňkách vazebný profil transkripčních a jiných epigenetických faktorů, které dále ovlivňují expresi hematopoetického faktoru *SPI1* takovým způsobem, který není dostačující pro obnovení transkripce genu *SPI1* na takovou hladinu, jež je pozorována u buněk s normálně probíhající myeloidní diferenciací (Obrázek 21).

Model of CTCF/SMARCA5 in *SPI1* gene regulation
Model regulace genu *SPI1* faktory CTCF a SMARCA5



Obrázek 21. Model epigenetické regulace genu *SPI1* prostřednictvím proteinů CTCF a SMARCA5. Vazebné místo CTCF (-14,4kb) v buňkách AML je obsazeno proteinem CTCF a SMARCA5 po navození demetylace DNA způsobené AZA. Vazba členů kohezinového komplexu se částečně shoduje s vazbou CTCF/SMARCA5 a navíc se šíří přes element -11,0 kb a URE v genovém lokusu *SPI1*. Rozptýlená vazba jak CTCF tak SMARCA5 na genu *SPI1* pozorovaná ve vzorku smíšených myeloidních buněk nebyla určena v blastových buňkách AML. Přestože působení AZA v blastových buňkách AML navodilo částečnou obnovu vazby CTCF/SMARCA5 na genu *SPI1*, přítomnost CTCF/SMARCA5 nedokázala umocnit derepresi genu *SPI1* a na místo toho inhibovala transkripci *SPI1* pravděpodobně skrze jejich enhancer blokující aktivitu na enhanceru -14,4 kb.

6. SHRNU TÍ ZÁVĚRŮ DIZERTAČNÍ PRÁCE

Na počátku práce jsme si stanovili pracovní hypotézu předpokládající, že abnormální metylace DNA regulační oblasti *SPI1* je příčinou nízké hladiny *SPI1*, jež se projevuje zablokováním diferenciaci progenitorových krevních buněk a vznikem MDS a AML, a že CTCF je v přítomnosti SMARCA5 zapojen v regulaci transkripce genu *SPI1* v nádorových buňkách MDS/AML během hypometylační terapie AZA.

Naše práce ukázala, že CTCF a SMARCA5 spolu interagují na DNA v regulačních oblastech genu *SPI1* a spolupracují na regulaci exprese *SPI1* během hypometylační terapie MDS a AML a potvrdili jsme tím naši hypotézu. Identifikovali jsme druhou zesilující regulační oblast genu *SPI1*, která je hypermetylovaná u buněk MDS/AML a na které dochází k hypometylaci DNA během působení AZA. Ukázali jsme, že působení AZA mění vazebný profil transkripčního faktoru CTCF a chromatin remodelačního faktoru SMARCA5 v oblasti *SPI1* v leukemických buňkách. Zvýšená aktivita CTCF a SMARCA5 na regulačních oblastech genu *SPI1* blokuje obnovení jeho exprese.

Na konkrétní cíle navazující na hypotézu jsme odpověděli takto:

- 1. Ctfc a Smarca5 vzájemně interagují na DNA v krevních buňkách.** Interakce Ctfc a Smarca5 byla dokázána na ICR genového lokusu *H19/Igf2*. Vazba Ctfc na cílové sekvence probíhá pouze v přítomnosti Smarca5. Naopak vazba Smarca5 na DNA probíhá nezávisle na přítomnosti Ctfc.
- 2. Ctfc a Smarca5 spolupracují v regulaci genové exprese.** Ctfc a Smarca5 společně regulují genovou expresi cílových genů *H19/Igf2* v krevních buňkách. Ctfc a Smarca5 společně zvyšují expresi genu *H19* a snižují expresi genu *Igf2*. Vazba Smarca5 na ICR *H19/Igf2* je nezbytná pro enhancer blokující aktivitu CTCF.
- 3. CTCF a SMARCA5 interagují na DNA v regulačních oblastech genu *SPI1*.** V oblasti genu *SPI1* byla v buňkách normálního jedince byla pozorována jak vazba CTCF tak SMARCA5. Vazba CTCF a SMARCA5 se překrývala v určitých studovaných lokusech, což nasvědčuje o vzájemné interakci těchto proteinů na genu *SPI1*. Rozložení vazby

SMARCA5 v buňkách MDS/AML je podobně rozložené jako v buňkách normálního jedince. Vazba CTCF v buňkách MDS/AML byla pozorována na rozdíl od buněk normálního jedince pouze v oblasti promotoru.

4. AZA hypometyluje zesilující regulační oblast (enhancer) -14,4 genu *SPI1*.

Všechna sledovaná predikovaná vazebná místa CTCF -15,6, -14,4, -11 se vyznačují hypermetylovanou DNA v modelové buněčné linii MDS/AML. V ostatních vzorcích pacientů s MDS/AML byly hypermetylované oblasti -14,4 a -11. Jediná oblast enhanceru -14,4 se vyznačuje zvýšenou metylací DNA v buňkách MDS/AML oproti normálním jedincům. Působení AZA demetyluje DNA v místě enhanceru -14,4 jak v buněčné linii MDS/AML, tak v primárních vzorcích pacientů s MDS. Efektivita demethylace DNA v oblasti -14,4 pozitivně korelovala s počáteční úrovní metylace.

5. AZA demetyluje vazebné místo CTCF a SMARCA5. V buněčné linii MDS/AML se do oblasti enhanceru -14,4 neváže ani CTCF ani SMARCA5, v oblasti -11 se váže (slaběji než v normálně diferencujících buňkách) pouze SMARCA5. Po demethylaci dochází v oblasti -11 k obnově vazby CTCF, SMARCA5 a kohezinu, kterou pozorujeme v normálně diferencujících buňkách. V oblasti -14,4 dochází k nové vazbě CTCF a SMARCA5 bez kohezinu, kterou v normálně diferencujících buňkách nepozorujeme.

6. CTCF a SMARCA5 blokují expresi *SPI1*. CTCF a SMARCA5 spolupracují v regulaci exprese genu *SPI1* v buněčné linii MDS/AML. Manipulace proteinové hladiny CTCF a SMARCA5 odhalila, že oba proteiny snižují expresi *SPI1*.

Z uvedených závěrů vyplývá, že regulační oblasti tumor supresorového genu *SPI1* jsou u MDS/AML hypermetylovány. Působení hypometylační látky azacytidinu způsobuje pokles metylační úrovně DNA na určitých dinukleotidech CG a umožňuje vazbu nově identifikovaných regulátorů exprese *SPI1*, transkripčního faktoru CTCF a chromatin remodelačního faktoru SMARCA5. Zvýšená aktivita CTCF a SMARCA5 tlumí expresi *SPI1*. Domníváme se, že CTCF/SMARCA5 jsou zapojeny v procesu blokování aktivovaných zesilujících regulačních oblastí tv. smyčkováním chromatinu a brání tak znovuobnovení exprese *SPI1* a myeloidní diferenciaci po působení hypometylační terapie. Tímto představujeme důkaz, který by mohl vést k objasnění

otázky proč je hypometylační terapie pacientů s MDS a AML účinná jen krátkodobě nebo u některých pacientů zcela neúčinná.

7. ODKAZY

- Abramowitz, L.K., and Bartolomei, M.S. (2012). Genomic imprinting: recognition and marking of imprinted loci. *Current opinion in genetics & development* 22, 72-78.
- Aihara, T., Miyoshi, Y., Koyama, K., Suzuki, M., Takahashi, E., Monden, M., and Nakamura, Y. (1998). Cloning and mapping of SMARCA5 encoding hSNF2H, a novel human homologue of Drosophila ISWI. *Cytogenetics and cell genetics* 81, 191-193.
- Aimiwu, J., Wang, H., Chen, P., Xie, Z., Wang, J., Liu, S., Klisovic, R., Mims, A., Blum, W., Marcucci, G., *et al.* (2012). RNA-dependent inhibition of ribonucleotide reductase is a major pathway for 5-azacytidine activity in acute myeloid leukemia. *Blood* 119, 5229-5238.
- Akashi, K., Traver, D., Miyamoto, T., and Weissman, I.L. (2000). A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature* 404, 193-197.
- Amaravadi, L., and Klemsz, M.J. (1999). DNA methylation and chromatin structure regulate PU.1 expression. *DNA and cell biology* 18, 875-884.
- Anderson, M.K., Weiss, A.H., Hernandez-Hoyos, G., Dionne, C.J., and Rothenberg, E.V. (2002). Constitutive expression of PU.1 in fetal hematopoietic progenitors blocks T cell development at the pro-T cell stage. *Immunity* 16, 285-296.
- Arber, D.A., Orazi, A., Hasserjian, R., Thiele, J., Borowitz, M.J., Le Beau, M.M., Bloomfield, C.D., Cazzola, M., and Vardiman, J.W. (2016). The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood* 127, 2391-2405.
- Arney, K.L., Bae, E., Olsen, C., and Drewell, R.A. (2006). The human and mouse H19 imprinting control regions harbor an evolutionarily conserved silencer element that functions on transgenes in Drosophila. *Development genes and evolution* 216, 811-819.
- Arzenani, M.K., Zade, A.E., Ming, Y., Vijverberg, S.J., Zhang, Z., Khan, Z., Sadique, S., Kallenbach, L., Hu, L., Vukojevic, V., *et al.* (2011). Genomic DNA hypomethylation by histone deacetylase inhibition implicates DNMT1 nuclear dynamics. *Molecular and cellular biology* 31, 4119-4128.
- Back, J., Allman, D., Chan, S., and Kastner, P. (2005). Visualizing PU.1 activity during hematopoiesis. *Experimental hematology* 33, 395-402.
- Barski, A., Cuddapah, S., Cui, K., Roh, T.Y., Schones, D.E., Wang, Z., Wei, G., Chepelev, I., and Zhao, K. (2007). High-resolution profiling of histone methylations in the human genome. *Cell* 129, 823-837.
- Bartolomei, M.S., Zemel, S., and Tilghman, S.M. (1991). Parental imprinting of the mouse H19 gene. *Nature* 351, 153-155.
- Basova, P., Pospisil, V., Savvulidi, F., Burda, P., Vargova, K., Stanek, L., Dluhosova, M., Kuzmova, E., Jonasova, A., Steidl, U., *et al.* (2013). Aggressive acute myeloid leukemia in PU.1/p53 double-mutant mice. *Oncogene*.

- Battle-Lopez, A., Cortiguera, M.G., Rosa-Garrido, M., Blanco, R., del Cerro, E., Torrano, V., Wagner, S.D., and Delgado, M.D. (2015). Novel CTCF binding at a site in exon1A of BCL6 is associated with active histone marks and a transcriptionally active locus. *Oncogene* 34, 246-256.
- Bejar, R., Levine, R., and Ebert, B.L. (2011a). Unraveling the molecular pathophysiology of myelodysplastic syndromes. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 29, 504-515.
- Bejar, R., Stevenson, K., Abdel-Wahab, O., Galili, N., Nilsson, B., Garcia-Manero, G., Kantarjian, H., Raza, A., Levine, R.L., Neuberg, D., *et al.* (2011b). Clinical effect of point mutations in myelodysplastic syndromes. *The New England journal of medicine* 364, 2496-2506.
- Bell, A.C., and Felsenfeld, G. (2000). Methylation of a CTCF-dependent boundary controls imprinted expression of the *Igf2* gene. *Nature* 405, 482-485.
- Bell, A.C., West, A.G., and Felsenfeld, G. (1999). The protein CTCF is required for the enhancer blocking activity of vertebrate insulators. *Cell* 98, 387-396.
- Bestor, T.H. (2000). The DNA methyltransferases of mammals. *Human molecular genetics* 9, 2395-2402.
- Bird, A. (2002). DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes & development* 16, 6-21.
- Bird, A. (2011). The dinucleotide CG as a genomic signalling module. *Journal of molecular biology* 409, 47-53.
- Bonadies, N., Pabst, T., and Mueller, B.U. (2010). Heterozygous deletion of the PU.1 locus in human AML. *Blood* 115, 331-334.
- Boyer, L.A., Latek, R.R., and Peterson, C.L. (2004). The SANT domain: a unique histone-tail-binding module? *Nature reviews Molecular cell biology* 5, 158-163.
- Bozhenok, L., Wade, P.A., and Varga-Weisz, P. (2002). WSTF-ISWI chromatin remodeling complex targets heterochromatic replication foci. *The EMBO journal* 21, 2231-2241.
- Burcin, M., Arnold, R., Lutz, M., Kaiser, B., Runge, D., Lottspeich, F., Filippova, G.N., Lobanenkova, V.V., and Renkawitz, R. (1997). Negative protein 1, which is required for function of the chicken lysozyme gene silencer in conjunction with hormone receptors, is identical to the multivalent zinc finger repressor CTCF. *Molecular and cellular biology* 17, 1281-1288.
- Burda, P., Curik, N., Kokavec, J., Basova, P., Mikulenková, D., Skoultchi, A.I., Zavadil, J., and Stopka, T. (2009). PU.1 Activation Relieves GATA-1-Mediated Repression of *Cebpa* and *Cbfb* during Leukemia Differentiation. *Mol Cancer Res* 7, 1693-1703.
- Burda, P., Laslo, P., and Stopka, T. (2010). The role of PU.1 and GATA-1 transcription factors during normal and leukemogenic hematopoiesis. *Leukemia* 24, 1249-1257.

- Cadet, J., and Wagner, J.R. (2013). TET enzymatic oxidation of 5-methylcytosine, 5-hydroxymethylcytosine and 5-formylcytosine. *Mutation research*.
- Cavellan, E., Asp, P., Percipalle, P., and Farrants, A.K. (2006). The WSTF-SNF2h chromatin remodeling complex interacts with several nuclear proteins in transcription. *The Journal of biological chemistry* *281*, 16264-16271.
- Cazzola, M., Della Porta, M.G., and Malcovati, L. (2013). The genetic basis of myelodysplasia and its clinical relevance. *Blood* *122*, 4021-4034.
- Cook, W.D., McCaw, B.J., Herring, C., John, D.L., Foote, S.J., Nutt, S.L., and Adams, J.M. (2004). PU.1 is a suppressor of myeloid leukemia, inactivated in mice by gene deletion and mutation of its DNA binding domain. *Blood* *104*, 3437-3444.
- Corona, D.F., and Tamkun, J.W. (2004). Multiple roles for ISWI in transcription, chromosome organization and DNA replication. *Biochimica et biophysica acta* *1677*, 113-119.
- Cuddapah, S., Jothi, R., Schones, D.E., Roh, T.Y., Cui, K., and Zhao, K. (2009). Global analysis of the insulator binding protein CTCF in chromatin barrier regions reveals demarcation of active and repressive domains. *Genome research* *19*, 24-32.
- Curik, N., Burda, P., Vargova, K., Pospisil, V., Belickova, M., Vlckova, P., Savvulidi, F., Necas, E., Hajkova, H., Haskovec, C., *et al.* (2012). 5-azacitidine in aggressive myelodysplastic syndromes regulates chromatin structure at PU.1 gene and cell differentiation capacity. *Leukemia* *26*, 1804-1811.
- Dahl, R., Iyer, S.R., Owens, K.S., Cuylear, D.D., and Simon, M.C. (2007). The transcriptional repressor GFI-1 antagonizes PU.1 activity through protein-protein interaction. *The Journal of biological chemistry* *282*, 6473-6483.
- Dahl, R., and Simon, M.C. (2003). The importance of PU.1 concentration in hematopoietic lineage commitment and maturation. *Blood cells, molecules & diseases* *31*, 229-233.
- Davey, C., Fraser, R., Smolle, M., Simmen, M.W., and Allan, J. (2003). Nucleosome positioning signals in the DNA sequence of the human and mouse H19 imprinting control regions. *Journal of molecular biology* *325*, 873-887.
- Defossez, P.A., Kelly, K.F., Filion, G.J., Perez-Torrado, R., Magdinier, F., Menoni, H., Nordgaard, C.L., Daniel, J.M., and Gilson, E. (2005). The human enhancer blocker CTC-binding factor interacts with the transcription factor Kaiso. *The Journal of biological chemistry* *280*, 43017-43023.
- Degner, S.C., Verma-Gaur, J., Wong, T.P., Bossen, C., Iverson, G.M., Torkamani, A., Vettermann, C., Lin, Y.C., Ju, Z., Schulz, D., *et al.* (2011). CCCTC-binding factor (CTCF) and cohesin influence the genomic architecture of the *Igh* locus and antisense transcription in pro-B cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *108*, 9566-9571.

- DeChiara, T.M., Robertson, E.J., and Efstratiadis, A. (1991). Parental imprinting of the mouse insulin-like growth factor II gene. *Cell* *64*, 849-859.
- DeKoter, R.P., Kamath, M.B., and Houston, I.B. (2007). Analysis of concentration-dependent functions of PU.1 in hematopoiesis using mouse models. *Blood cells, molecules & diseases* *39*, 316-320.
- Delgado, M.D., Chernukhin, I.V., Bigas, A., Klenova, E.M., and Leon, J. (1999). Differential expression and phosphorylation of CTCF, a c-myc transcriptional regulator, during differentiation of human myeloid cells. *FEBS letters* *444*, 5-10.
- DeMare, L.E., Leng, J., Cotney, J., Reilly, S.K., Yin, J., Sarro, R., and Noonan, J.P. (2013). The genomic landscape of cohesin-associated chromatin interactions. *Genome research* *23*, 1224-1234.
- Dolnik, A., Engelmann, J.C., Scharfenberger-Schmeer, M., Mauch, J., Kelkenberg-Schade, S., Haldemann, B., Fries, T., Kronke, J., Kuhn, M.W., Paschka, P., *et al.* (2012). Commonly altered genomic regions in acute myeloid leukemia are enriched for somatic mutations involved in chromatin remodeling and splicing. *Blood* *120*, e83-92.
- Donohoe, M.E., Zhang, L.F., Xu, N., Shi, Y., and Lee, J.T. (2007). Identification of a Ctf cofactor, Yy1, for the X chromosome binary switch. *Molecular cell* *25*, 43-56.
- Ebralidze, A.K., Guibal, F.C., Steidl, U., Zhang, P., Lee, S., Bartholdy, B., Jorda, M.A., Petkova, V., Rosenbauer, F., Huang, G., *et al.* (2008). PU.1 expression is modulated by the balance of functional sense and antisense RNAs regulated by a shared cis-regulatory element. *Genes & development* *22*, 2085-2092.
- Erdel, F., and Rippe, K. (2011a). Binding kinetics of human ISWI chromatin-remodelers to DNA repair sites elucidate their target location mechanism. *Nucleus* *2*, 105-112.
- Erdel, F., and Rippe, K. (2011b). Chromatin remodelling in mammalian cells by ISWI-type complexes--where, when and why? *The FEBS journal* *278*, 3608-3618.
- Felsenfeld, G., Burgess-Beusse, B., Farrell, C., Gaszner, M., Ghirlando, R., Huang, S., Jin, C., Litt, M., Magdinier, F., Mutskov, V., *et al.* (2004). Chromatin boundaries and chromatin domains. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* *69*, 245-250.
- Fenaux, P., Mufti, G.J., Hellstrom-Lindberg, E., Santini, V., Finelli, C., Giagounidis, A., Schoch, R., Gattermann, N., Sanz, G., List, A., *et al.* (2009). 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. *The lancet oncology* *10*, 223-232.
- Fenaux, P., Mufti, G.J., Hellstrom-Lindberg, E., Santini, V., Gattermann, N., Germing, U., Sanz, G., List, A.F., Gore, S., Seymour, J.F., *et al.* (2010). Azacitidine prolongs overall survival compared with conventional care regimens in elderly patients with low bone marrow blast count acute myeloid leukemia. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* *28*, 562-569.

Figuroa, M.E., Skrabanek, L., Li, Y., Jiemjit, A., Fandy, T.E., Paietta, E., Fernandez, H., Tallman, M.S., Grealley, J.M., Carraway, H., *et al.* (2009). MDS and secondary AML display unique patterns and abundance of aberrant DNA methylation. *Blood* *114*, 3448-3458.

Filippova, G.N., Fagerlie, S., Klenova, E.M., Myers, C., Dehner, Y., Goodwin, G., Neiman, P.E., Collins, S.J., and Lobanekov, V.V. (1996). An exceptionally conserved transcriptional repressor, CTCF, employs different combinations of zinc fingers to bind diverged promoter sequences of avian and mammalian c-myc oncogenes. *Molecular and cellular biology* *16*, 2802-2813.

Filippova, G.N., Lindblom, A., Meincke, L.J., Klenova, E.M., Neiman, P.E., Collins, S.J., Doggett, N.A., and Lobanekov, V.V. (1998). A widely expressed transcription factor with multiple DNA sequence specificity, CTCF, is localized at chromosome segment 16q22.1 within one of the smallest regions of overlap for common deletions in breast and prostate cancers. *Genes, chromosomes & cancer* *22*, 26-36.

Filippova, G.N., Qi, C.F., Ulmer, J.E., Moore, J.M., Ward, M.D., Hu, Y.J., Loukinov, D.I., Pugacheva, E.M., Klenova, E.M., Grundy, P.E., *et al.* (2002). Tumor-associated zinc finger mutations in the CTCF transcription factor selectively alter its DNA-binding specificity. *Cancer research* *62*, 48-52.

Filippova, G.N., Thienes, C.P., Penn, B.H., Cho, D.H., Hu, Y.J., Moore, J.M., Klesert, T.R., Lobanekov, V.V., and Tapscott, S.J. (2001). CTCF-binding sites flank CTG/CAG repeats and form a methylation-sensitive insulator at the DM1 locus. *Nature genetics* *28*, 335-343.

Fu, Y., Sinha, M., Peterson, C.L., and Weng, Z. (2008). The insulator binding protein CTCF positions 20 nucleosomes around its binding sites across the human genome. *PLoS genetics* *4*, e1000138.

Fyodorov, D.V., and Kadonaga, J.T. (2002a). Binding of Acf1 to DNA involves a WAC motif and is important for ACF-mediated chromatin assembly. *Molecular and cellular biology* *22*, 6344-6353.

Fyodorov, D.V., and Kadonaga, J.T. (2002b). Dynamics of ATP-dependent chromatin assembly by ACF. *Nature* *418*, 897-900.

Garcia-Manero, G. (2014). Myelodysplastic syndromes: 2014 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *American journal of hematology* *89*, 97-108.

Gerlach, K., Hwang, Y., Nikolaev, A., Atreya, R., Dornhoff, H., Steiner, S., Lehr, H.A., Wirtz, S., Vieth, M., Waisman, A., *et al.* (2014). TH9 cells that express the transcription factor PU.1 drive T cell-mediated colitis via IL-9 receptor signaling in intestinal epithelial cells. *Nature immunology* *15*, 676-686.

Ghoshal, K., Datta, J., Majumder, S., Bai, S., Dong, X., Parthun, M., and Jacob, S.T. (2002). Inhibitors of histone deacetylase and DNA methyltransferase synergistically activate the methylated metallothionein I promoter by activating the transcription factor MTF-1 and forming an open chromatin structure. *Mol Cell Biol* *22*, 8302-8319.

Gicquel, C., Rossignol, S., Cabrol, S., Houang, M., Steunou, V., Barbu, V., Danton, F., Thibaud, N., Le Merrer, M., Burglen, L., *et al.* (2005). Epimutation of the telomeric imprinting center region on chromosome 11p15 in Silver-Russell syndrome. *Nature genetics* 37, 1003-1007.

Goldman, J.A., Garlick, J.D., and Kingston, R.E. (2010). Chromatin remodeling by imitation switch (ISWI) class ATP-dependent remodelers is stimulated by histone variant H2A.Z. *The Journal of biological chemistry* 285, 4645-4651.

Gore, S.D., Fenaux, P., Santini, V., Bennett, J.M., Silverman, L.R., Seymour, J.F., Hellstrom-Lindberg, E., Swern, A.S., Beach, C.L., and List, A.F. (2013). A multivariate analysis of the relationship between response and survival among patients with higher-risk myelodysplastic syndromes treated within azacitidine or conventional care regimens in the randomized AZA-001 trial. *Haematologica* 98, 1067-1072.

Graves, B.J., and Petersen, J.M. (1998). Specificity within the ets family of transcription factors. *Advances in cancer research* 75, 1-55.

Greenberg, P.L., Tuechler, H., Schanz, J., Sanz, G., Garcia-Manero, G., Sole, F., Bennett, J.M., Bowen, D., Fenaux, P., Dreyfus, F., *et al.* (2012). Revised international prognostic scoring system for myelodysplastic syndromes. *Blood* 120, 2454-2465.

Grovdal, M., Karimi, M., Tobiasson, M., Reinius, L., Jansson, M., Ekwall, K., Ungerstedt, J., Kere, J., Greco, D., and Hellstrom-Lindberg, E. (2013). Azacitidine induces profound genome-wide hypomethylation in primary myelodysplastic bone marrow cultures but may also reduce histone acetylation. *Leukemia*.

Grune, T., Brzeski, J., Eberharter, A., Clapier, C.R., Corona, D.F., Becker, P.B., and Muller, C.W. (2003). Crystal structure and functional analysis of a nucleosome recognition module of the remodeling factor ISWI. *Molecular cell* 12, 449-460.

Guastafierro, T., Cecchinelli, B., Zampieri, M., Reale, A., Riggio, G., Sthandier, O., Zupi, G., Calabrese, L., and Caiafa, P. (2008). CCCTC-binding factor activates PARP-1 affecting DNA methylation machinery. *The Journal of biological chemistry* 283, 21873-21880.

Guo, C., Gerasimova, T., Hao, H., Ivanova, I., Chakraborty, T., Selimyan, R., Oltz, E.M., and Sen, R. (2011a). Two forms of loops generate the chromatin conformation of the immunoglobulin heavy-chain gene locus. *Cell* 147, 332-343.

Guo, C., Yoon, H.S., Franklin, A., Jain, S., Ebert, A., Cheng, H.L., Hansen, E., Despo, O., Bossen, C., Vettermann, C., *et al.* (2011b). CTCF-binding elements mediate control of V(D)J recombination. *Nature* 477, 424-430.

Gupta, P., Gurudutta, G.U., Saluja, D., and Tripathi, R.P. (2009). PU.1 and partners: regulation of haematopoietic stem cell fate in normal and malignant haematopoiesis. *Journal of cellular and molecular medicine* 13, 4349-4363.

Hadjur, S., Williams, L.M., Ryan, N.K., Cobb, B.S., Sexton, T., Fraser, P., Fisher, A.G., and Merkenschlager, M. (2009). Cohesins form chromosomal cis-interactions at the developmentally regulated IFNG locus. *Nature* 460, 410-413.

Haferlach, T., Nagata, Y., Grossmann, V., Okuno, Y., Bacher, U., Nagae, G., Schnittger, S., Sanada, M., Kon, A., Alpermann, T., *et al.* (2014). Landscape of genetic lesions in 944 patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia* 28, 241-247.

Hakimi, M.A., Bochar, D.A., Schmiesing, J.A., Dong, Y., Barak, O.G., Speicher, D.W., Yokomori, K., and Shiekhattar, R. (2002). A chromatin remodelling complex that loads cohesin onto human chromosomes. *Nature* 418, 994-998.

Hark, A.T., Schoenherr, C.J., Katz, D.J., Ingram, R.S., Levorse, J.M., and Tilghman, S.M. (2000). CTCF mediates methylation-sensitive enhancer-blocking activity at the H19/Igf2 locus. *Nature* 405, 486-489.

Harris, N.L., Jaffe, E.S., Diebold, J., Flandrin, G., Muller-Hermelink, H.K., Vardiman, J., Lister, T.A., and Bloomfield, C.D. (1999). The World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues. Report of the Clinical Advisory Committee meeting, Airlie House, Virginia, November, 1997. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 10, 1419-1432.

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

Hoogenkamp, M., Krysinska, H., Ingram, R., Huang, G., Barlow, R., Clarke, D., Ebralidze, A., Zhang, P., Tagoh, H., Cockerill, P.N., *et al.* (2007). The Pu.1 locus is differentially regulated at the level of chromatin structure and noncoding transcription by alternate mechanisms at distinct developmental stages of hematopoiesis. *Molecular and cellular biology* 27, 7425-7438.

Hota, S.K., and Bartholomew, B. (2011). Diversity of operation in ATP-dependent chromatin remodelers. *Biochimica et biophysica acta* 1809, 476-487.

Hromas, R., Orazi, A., Neiman, R.S., Maki, R., Van Beveran, C., Moore, J., and Klemsz, M. (1993). Hematopoietic lineage- and stage-restricted expression of the ETS oncogene family member PU.1. *Blood* 82, 2998-3004.

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

Huang, G., Zhang, P., Hirai, H., Elf, S., Yan, X., Chen, Z., Koschmieder, S., Okuno, Y., Dayaram, T., Growney, J.D., *et al.* (2008). PU.1 is a major downstream target of AML1 (RUNX1) in adult mouse hematopoiesis. *Nature genetics* 40, 51-60.

Huff, J.T., and Zilberman, D. (2014). Dnmt1-independent CG methylation contributes to nucleosome positioning in diverse eukaryotes. *Cell* 156, 1286-1297.

Chao, W., Huynh, K.D., Spencer, R.J., Davidow, L.S., and Lee, J.T. (2002). CTCF, a candidate trans-acting factor for X-inactivation choice. *Science* 295, 345-347.

- Chen, H., Ray-Gallet, D., Zhang, P., Hetherington, C.J., Gonzalez, D.A., Zhang, D.E., Moreau-Gachelin, F., and Tenen, D.G. (1995). PU.1 (Spi-1) autoregulates its expression in myeloid cells. *Oncogene* *11*, 1549-1560.
- Chen, H., Tian, Y., Shu, W., Bo, X., and Wang, S. (2012). Comprehensive identification and annotation of cell type-specific and ubiquitous CTCF-binding sites in the human genome. *PLoS one* *7*, e41374.
- Chen, H., Zhang, P., Radomska, H.S., Hetherington, C.J., Zhang, D.E., and Tenen, D.G. (1996). Octamer binding factors and their coactivator can activate the murine PU.1 (spi-1) promoter. *The Journal of biological chemistry* *271*, 15743-15752.
- Chen, X., Xu, H., Yuan, P., Fang, F., Huss, M., Vega, V.B., Wong, E., Orlov, Y.L., Zhang, W., Jiang, J., *et al.* (2008). Integration of external signaling pathways with the core transcriptional network in embryonic stem cells. *Cell* *133*, 1106-1117.
- Choi, J.H., Sheu, J.J., Guan, B., Jinawath, N., Markowski, P., Wang, T.L., and Shih Ie, M. (2009). Functional analysis of 11q13.5 amplicon identifies Rsf-1 (HBXAP) as a gene involved in paclitaxel resistance in ovarian cancer. *Cancer research* *69*, 1407-1415.
- Chung, J.H., Whiteley, M., and Felsenfeld, G. (1993). A 5' element of the chicken beta-globin domain serves as an insulator in human erythroid cells and protects against position effect in *Drosophila*. *Cell* *74*, 505-514.
- Ishihara, K., Oshimura, M., and Nakao, M. (2006). CTCF-dependent chromatin insulator is linked to epigenetic remodeling. *Molecular cell* *23*, 733-742.
- Jiang, Y., Dunbar, A., Gondek, L.P., Mohan, S., Rataul, M., O'Keefe, C., Sekeres, M., Sauntharajah, Y., and Maciejewski, J.P. (2009). Aberrant DNA methylation is a dominant mechanism in MDS progression to AML. *Blood* *113*, 1315-1325.
- Kanduri, C., Pant, V., Loukinov, D., Pugacheva, E., Qi, C.F., Wolffe, A., Ohlsson, R., and Lobanekov, V.V. (2000). Functional association of CTCF with the insulator upstream of the H19 gene is parent of origin-specific and methylation-sensitive. *Curr Biol* *10*, 853-856.
- Kanduri, M., Kanduri, C., Mariano, P., Vostrov, A.A., Quitschke, W., Lobanekov, V., and Ohlsson, R. (2002). Multiple nucleosome positioning sites regulate the CTCF-mediated insulator function of the H19 imprinting control region. *Molecular and cellular biology* *22*, 3339-3344.
- Kim, H.G., de Guzman, C.G., Swindle, C.S., Cotta, C.V., Gartland, L., Scott, E.W., and Klug, C.A. (2004). The ETS family transcription factor PU.1 is necessary for the maintenance of fetal liver hematopoietic stem cells. *Blood* *104*, 3894-3900.
- Kim, T.H., Abdullaev, Z.K., Smith, A.D., Ching, K.A., Loukinov, D.I., Green, R.D., Zhang, M.Q., Lobanekov, V.V., and Ren, B. (2007). Analysis of the vertebrate insulator protein CTCF-binding sites in the human genome. *Cell* *128*, 1231-1245.

- Klco, J.M., Spencer, D.H., Lamprecht, T.L., Sarkaria, S.M., Wylie, T., Magrini, V., Hundal, J., Walker, J., Varghese, N., Erdmann-Gilmore, P., *et al.* (2013). Genomic impact of transient low-dose decitabine treatment on primary AML cells. *Blood* *121*, 1633-1643.
- Klemsz, M.J., and Maki, R.A. (1996). Activation of transcription by PU.1 requires both acidic and glutamine domains. *Molecular and cellular biology* *16*, 390-397.
- Klenova, E.M., Nicolas, R.H., Paterson, H.F., Carne, A.F., Heath, C.M., Goodwin, G.H., Neiman, P.E., and Lobanenko, V.V. (1993). CTCF, a conserved nuclear factor required for optimal transcriptional activity of the chicken c-myc gene, is an 11-Zn-finger protein differentially expressed in multiple forms. *Molecular and cellular biology* *13*, 7612-7624.
- Kokavec, J., Zikmund, T., Savvulidi, F., Kulvait, V., Edelmann, W., Skoultchi, A.I., and Stopka, T. (2017). Smarca5 (Snf2h) is required for Proliferation of Hematopoietic Stem Cells Differentiating into Erythroid and Myeloid lineages. *Stem Cells*.
- Kouzarides, T. (2002). Histone methylation in transcriptional control. *Curr Opin Genet Dev* *12*, 198-209.
- Kummalu, T., and Friedman, A.D. (2003). Cross-talk between regulators of myeloid development: C/EBPalpha binds and activates the promoter of the PU.1 gene. *Journal of leukocyte biology* *74*, 464-470.
- Lai, A.Y., Fatemi, M., Dhasarathy, A., Malone, C., Sobol, S.E., Geigerman, C., Jaye, D.L., Mav, D., Shah, R., Li, L., *et al.* (2010). DNA methylation prevents CTCF-mediated silencing of the oncogene BCL6 in B cell lymphomas. *The Journal of experimental medicine* *207*, 1939-1950.
- Lan, L., Ui, A., Nakajima, S., Hatakeyama, K., Hoshi, M., Watanabe, R., Janicki, S.M., Ogiwara, H., Kohno, T., Kanno, S., *et al.* (2010). The ACF1 complex is required for DNA double-strand break repair in human cells. *Molecular cell* *40*, 976-987.
- Langst, G., and Becker, P.B. (2001). ISWI induces nucleosome sliding on nicked DNA. *Molecular cell* *8*, 1085-1092.
- Laslo, P., Pongubala, J.M., Lancki, D.W., and Singh, H. (2008). Gene regulatory networks directing myeloid and lymphoid cell fates within the immune system. *Seminars in immunology* *20*, 228-235.
- Laslo, P., Spooner, C.J., Warmflash, A., Lancki, D.W., Lee, H.J., Sciammas, R., Gantner, B.N., Dinner, A.R., and Singh, H. (2006). Multilineage transcriptional priming and determination of alternate hematopoietic cell fates. *Cell* *126*, 755-766.
- Lazzaro, M.A., and Picketts, D.J. (2001). Cloning and characterization of the murine Imitation Switch (ISWI) genes: differential expression patterns suggest distinct developmental roles for Snf2h and Snf2l. *Journal of neurochemistry* *77*, 1145-1156.
- Leddin, M., Perrod, C., Hoogenkamp, M., Ghani, S., Assi, S., Heinz, S., Wilson, N.K., Follows, G., Schonheit, J., Vockentanz, L., *et al.* (2011). Two distinct auto-regulatory loops operate at the PU.1 locus in B cells and myeloid cells. *Blood* *117*, 2827-2838.

- LeRoy, G., Loyola, A., Lane, W.S., and Reinberg, D. (2000). Purification and characterization of a human factor that assembles and remodels chromatin. *The Journal of biological chemistry* 275, 14787-14790.
- Li, E., Bestor, T.H., and Jaenisch, R. (1992). Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell* 69, 915-926.
- Li, J., Langst, G., and Grummt, I. (2006). NoRC-dependent nucleosome positioning silences rRNA genes. *The EMBO journal* 25, 5735-5741.
- Li, Y., Okuno, Y., Zhang, P., Radomska, H.S., Chen, H., Iwasaki, H., Akashi, K., Klemsz, M.J., McKercher, S.R., Maki, R.A., *et al.* (2001). Regulation of the PU.1 gene by distal elements. *Blood* 98, 2958-2965.
- Lindsley, R.C., and Ebert, B.L. (2013). Molecular pathophysiology of myelodysplastic syndromes. *Annual review of pathology* 8, 21-47.
- Livingstone, C. (2013). IGF2 and cancer. *Endocrine-related cancer* 20, R321-339.
- Lobanenkov, V.V., and Gudvin, G.G. (1989). [CCCTC-binding protein: a new nuclear protein factor which interaction with 5'-flanking sequence of chicken c-myc oncogene correlates with repression of the gene]. *Doklady Akademii nauk SSSR* 309, 741-745.
- Lobanenkov, V.V., Nicolas, R.H., Adler, V.V., Paterson, H., Klenova, E.M., Polotskaja, A.V., and Goodwin, G.H. (1990). A novel sequence-specific DNA binding protein which interacts with three regularly spaced direct repeats of the CCCTC-motif in the 5'-flanking sequence of the chicken c-myc gene. *Oncogene* 5, 1743-1753.
- Loyola, A., Huang, J.Y., LeRoy, G., Hu, S., Wang, Y.H., Donnelly, R.J., Lane, W.S., Lee, S.C., and Reinberg, D. (2003). Functional analysis of the subunits of the chromatin assembly factor RSF. *Molecular and cellular biology* 23, 6759-6768.
- Loyola, A., LeRoy, G., Wang, Y.H., and Reinberg, D. (2001). Reconstitution of recombinant chromatin establishes a requirement for histone-tail modifications during chromatin assembly and transcription. *Genes & development* 15, 2837-2851.
- Majumder, P., Gomez, J.A., and Boss, J.M. (2006). The human major histocompatibility complex class II HLA-DRB1 and HLA-DQA1 genes are separated by a CTCF-binding enhancer-blocking element. *The Journal of biological chemistry* 281, 18435-18443.
- Majumder, P., Gomez, J.A., Chadwick, B.P., and Boss, J.M. (2008). The insulator factor CTCF controls MHC class II gene expression and is required for the formation of long-distance chromatin interactions. *The Journal of experimental medicine* 205, 785-798.
- Menafra, R., and Stunnenberg, H.G. (2014). MBD2 and MBD3: elusive functions and mechanisms. *Frontiers in genetics* 5, 428.
- Metcalf, D., Dakic, A., Mifsud, S., Di Rago, L., Wu, L., and Nutt, S. (2006). Inactivation of PU.1 in adult mice leads to the development of myeloid leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 1486-1491.

- Michaelis, C., Ciosk, R., and Nasmyth, K. (1997). Cohesins: chromosomal proteins that prevent premature separation of sister chromatids. *Cell* *91*, 35-45.
- Moreau-Gachelin, F. (2006). Lessons from models of murine erythroleukemia to acute myeloid leukemia (AML): proof-of-principle of co-operativity in AML. *Haematologica* *91*, 1644-1652.
- Moreau-Gachelin, F., Tavitian, A., and Tambourin, P. (1988). Spi-1 is a putative oncogene in virally induced murine erythroleukaemias. *Nature* *331*, 277-280.
- Moreau-Gachelin, F., Wendling, F., Molina, T., Denis, N., Titeux, M., Grimber, G., Briand, P., Vainchenker, W., and Tavitian, A. (1996). Spi-1/PU.1 transgenic mice develop multistep erythroleukemias. *Molecular and cellular biology* *16*, 2453-2463.
- Mueller, B.U., Pabst, T., Osato, M., Asou, N., Johansen, L.M., Minden, M.D., Behre, G., Hiddemann, W., Ito, Y., and Tenen, D.G. (2002). Heterozygous PU.1 mutations are associated with acute myeloid leukemia. *Blood* *100*, 998-1007.
- Mullighan, C.G., Zhang, J., Kasper, L.H., Lerach, S., Payne-Turner, D., Phillips, L.A., Heatley, S.L., Holmfeldt, L., Collins-Underwood, J.R., Ma, J., *et al.* (2011). CREBBP mutations in relapsed acute lymphoblastic leukaemia. *Nature* *471*, 235-239.
- Nakamura, K., Kato, A., Kobayashi, J., Yanagihara, H., Sakamoto, S., Oliveira, D.V., Shimada, M., Tauchi, H., Suzuki, H., Tashiro, S., *et al.* (2011). Regulation of homologous recombination by RNF20-dependent H2B ubiquitination. *Molecular cell* *41*, 515-528.
- Nativio, R., Wendt, K.S., Ito, Y., Huddleston, J.E., Uribe-Lewis, S., Woodfine, K., Krueger, C., Reik, W., Peters, J.M., and Murrell, A. (2009). Cohesin is required for higher-order chromatin conformation at the imprinted IGF2-H19 locus. *PLoS genetics* *5*, e1000739.
- Nikolic, T., Movita, D., Lambers, M.E., Ribeiro de Almeida, C., Biesta, P., Kreefft, K., de Bruijn, M.J., Bergen, I., Galjart, N., Boonstra, A., *et al.* (2014). The DNA-binding factor Ctfc critically controls gene expression in macrophages. *Cellular & molecular immunology* *11*, 58-70.
- Nutt, S.L., Metcalf, D., D'Amico, A., Polli, M., and Wu, L. (2005). Dynamic regulation of PU.1 expression in multipotent hematopoietic progenitors. *The Journal of experimental medicine* *201*, 221-231.
- Ohlsson, R., Renkawitz, R., and Lobanenkov, V. (2001). CTCF is a uniquely versatile transcription regulator linked to epigenetics and disease. *Trends in genetics : TIG* *17*, 520-527.
- Okano, M., Bell, D.W., Haber, D.A., and Li, E. (1999). DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell* *99*, 247-257.
- Okano, M., Xie, S., and Li, E. (1998). Cloning and characterization of a family of novel mammalian DNA (cytosine-5) methyltransferases. *Nature genetics* *19*, 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., *et al.* (2005). Potential autoregulation of transcription factor PU.1 by an upstream regulatory element. *Mol Cell Biol* 25, 2832-2845.

Ouboussad, L., Kreuz, S., and Lefevre, P.F. (2013). CTCF depletion alters chromatin structure and transcription of myeloid-specific factors. *Journal of molecular cell biology* 5, 308-322.

Papaemmanuil, E., Gerstung, M., Malcovati, L., Tauro, S., Gundem, G., Van Loo, P., Yoon, C.J., Ellis, P., Wedge, D.C., Pellagatti, A., *et al.* (2013). Clinical and biological implications of driver mutations in myelodysplastic syndromes. *Blood* 122, 3616-3627; quiz 3699.

Parelho, V., Hadjur, S., Spivakov, M., Leleu, M., Sauer, S., Gregson, H.C., Jarmuz, A., Canzonetta, C., Webster, Z., Nesterova, T., *et al.* (2008). Cohesins functionally associate with CTCF on mammalian chromosome arms. *Cell* 132, 422-433.

Partensky, P.D., and Narlikar, G.J. (2009). Chromatin remodelers act globally, sequence positions nucleosomes locally. *Journal of molecular biology* 391, 12-25.

Percipalle, P., Fomproix, N., Cavellan, E., Voit, R., Reimer, G., Kruger, T., Thyberg, J., Scheer, U., Grummt, I., and Farrants, A.K. (2006). The chromatin remodelling complex WSTF-SNF2h interacts with nuclear myosin 1 and has a role in RNA polymerase I transcription. *EMBO reports* 7, 525-530.

Perpelescu, M., Nozaki, N., Obuse, C., Yang, H., and Yoda, K. (2009). Active establishment of centromeric CENP-A chromatin by RSF complex. *The Journal of cell biology* 185, 397-407.

Petty, E., and Pillus, L. (2013). Balancing chromatin remodeling and histone modifications in transcription. *Trends in genetics : TIG* 29, 621-629.

Poot, R.A., Bozhenok, L., van den Berg, D.L., Steffensen, S., Ferreira, F., Grimaldi, M., Gilbert, N., Ferreira, J., and Varga-Weisz, P.D. (2004). The Williams syndrome transcription factor interacts with PCNA to target chromatin remodelling by ISWI to replication foci. *Nature cell biology* 6, 1236-1244.

Poot, R.A., Dellaire, G., Hulsmann, B.B., Grimaldi, M.A., Corona, D.F., Becker, P.B., Bickmore, W.A., and Varga-Weisz, P.D. (2000). HuCHRAC, a human ISWI chromatin remodelling complex contains hACF1 and two novel histone-fold proteins. *The EMBO journal* 19, 3377-3387.

Prebet, T., Gore, S.D., Esterni, B., Gardin, C., Itzykson, R., Thepot, S., Dreyfus, F., Rauzy, O.B., Recher, C., Ades, L., *et al.* (2011). Outcome of high-risk myelodysplastic syndrome after azacitidine treatment failure. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 29, 3322-3327.

Precht, P., Wurster, A.L., and Pazin, M.J. (2010). The SNF2H chromatin remodeling enzyme has opposing effects on cytokine gene expression. *Molecular immunology* 47, 2038-2046.

Qi, C.F., Martensson, A., Mattioli, M., Dalla-Favera, R., Lobanenkov, V.V., and Morse, H.C., 3rd (2003). CTCF functions as a critical regulator of cell-cycle arrest and death after ligation of the B cell receptor on immature B cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *100*, 633-638.

Randhawa, G.S., Cui, H., Barletta, J.A., Strichman-Almashanu, L.Z., Talpaz, M., Kantarjian, H., Deisseroth, A.B., Champlin, R.C., and Feinberg, A.P. (1998). Loss of imprinting in disease progression in chronic myelogenous leukemia. *Blood* *91*, 3144-3147.

Rao, G., Rekhtman, N., Cheng, G., Krasikov, T., and Skoultchi, A.I. (1997). Deregulated expression of the PU.1 transcription factor blocks murine erythroleukemia cell terminal differentiation. *Oncogene* *14*, 123-131.

Rasko, J.E., Klenova, E.M., Leon, J., Filippova, G.N., Loukinov, D.I., Vatolin, S., Robinson, A.F., Hu, Y.J., Ulmer, J., Ward, M.D., *et al.* (2001). Cell growth inhibition by the multifunctional multivalent zinc-finger factor CTCF. *Cancer research* *61*, 6002-6007.

Recillas-Targa, F., De La Rosa-Velazquez, I.A., Soto-Reyes, E., and Benitez-Bribiesca, L. (2006). Epigenetic boundaries of tumour suppressor gene promoters: the CTCF connection and its role in carcinogenesis. *Journal of cellular and molecular medicine* *10*, 554-568.

Ribeiro de Almeida, C., Stadhouders, R., Thongjuea, S., Soler, E., and Hendriks, R.W. (2012). DNA-binding factor CTCF and long-range gene interactions in V(D)J recombination and oncogene activation. *Blood* *119*, 6209-6218.

Rice, K.L., Hormaeche, I., and Licht, J.D. (2007). Epigenetic regulation of normal and malignant hematopoiesis. *Oncogene* *26*, 6697-6714.

Rippe, K., Schrader, A., Riede, P., Strohner, R., Lehmann, E., and Langst, G. (2007). DNA sequence- and conformation-directed positioning of nucleosomes by chromatin-remodeling complexes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *104*, 15635-15640.

Rodriguez, C., Borgel, J., Court, F., Cathala, G., Forne, T., and Piette, J. (2010). CTCF is a DNA methylation-sensitive positive regulator of the INK/ARF locus. *Biochemical and biophysical research communications* *392*, 129-134.

Rosenbauer, F., Owens, B.M., Yu, L., Tumang, J.R., Steidl, U., Kutok, J.L., Clayton, L.K., Wagner, K., Scheller, M., Iwasaki, H., *et al.* (2006). Lymphoid cell growth and transformation are suppressed by a key regulatory element of the gene encoding PU.1. *Nature genetics* *38*, 27-37.

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

Rubio, E.D., Reiss, D.J., Welch, P.L., Distche, C.M., Filippova, G.N., Baliga, N.S., Aebersold, R., Ranish, J.A., and Krumm, A. (2008). CTCF physically links cohesin to chromatin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *105*, 8309-8314.

- Santoro, R., Li, J., and Grummt, I. (2002). The nucleolar remodeling complex NoRC mediates heterochromatin formation and silencing of ribosomal gene transcription. *Nature genetics* 32, 393-396.
- Santos-Rosa, H., Schneider, R., Bernstein, B.E., Karabetsou, N., Morillon, A., Weise, C., Schreiber, S.L., Mellor, J., and Kouzarides, T. (2003). Methylation of histone H3 K4 mediates association of the Isw1p ATPase with chromatin. *Molecular cell* 12, 1325-1332.
- Scott, E.W., Simon, M.C., Anastasi, J., and Singh, H. (1994). Requirement of transcription factor PU.1 in the development of multiple hematopoietic lineages. *Science* 265, 1573-1577.
- Shukla, S., Kavak, E., Gregory, M., Imashimizu, M., Shutinoski, B., Kashlev, M., Oberdoerffer, P., Sandberg, R., and Oberdoerffer, S. (2011). CTCF-promoted RNA polymerase II pausing links DNA methylation to splicing. *Nature* 479, 74-79.
- Silverman, L.R. (2001). Targeting hypomethylation of DNA to achieve cellular differentiation in myelodysplastic syndromes (MDS). *The oncologist* 6 Suppl 5, 8-14.
- Silverman, L.R., Fenaux, P., Mufti, G.J., Santini, V., Hellstrom-Lindberg, E., Gattermann, N., Sanz, G., List, A.F., Gore, S.D., and Seymour, J.F. (2011). Continued azacitidine therapy beyond time of first response improves quality of response in patients with higher-risk myelodysplastic syndromes. *Cancer* 117, 2697-2702.
- Sorm, F., Piskala, A., Cihak, A., and Vesely, J. (1964). 5-Azacytidine, a new, highly effective cancerostatic. *Experientia* 20, 202-203.
- Sparago, A., Cerrato, F., Vernucci, M., Ferrero, G.B., Silengo, M.C., and Riccio, A. (2004). Microdeletions in the human H19 DMR result in loss of IGF2 imprinting and Beckwith-Wiedemann syndrome. *Nature genetics* 36, 958-960.
- Splinter, E., Heath, H., Kooren, J., Palstra, R.J., Klous, P., Grosveld, F., Galjart, N., and de Laat, W. (2006). CTCF mediates long-range chromatin looping and local histone modification in the beta-globin locus. *Genes & development* 20, 2349-2354.
- Spruijt, C.G., Gnerlich, F., Smits, A.H., Pfaffeneder, T., Jansen, P.W., Bauer, C., Munzel, M., Wagner, M., Muller, M., Khan, F., *et al.* (2013). Dynamic readers for 5-(hydroxy)methylcytosine and its oxidized derivatives. *Cell* 152, 1146-1159.
- Staber, P.B., Zhang, P., Ye, M., Welner, R.S., Nombela-Arrieta, C., Bach, C., Kerényi, M., Bartholdy, B.A., Zhang, H., Alberich-Jorda, M., *et al.* (2013). Sustained PU.1 levels balance cell-cycle regulators to prevent exhaustion of adult hematopoietic stem cells. *Molecular cell* 49, 934-946.
- Stedman, W., Kang, H., Lin, S., Kissil, J.L., Bartolomei, M.S., and Lieberman, P.M. (2008). Cohesins localize with CTCF at the KSHV latency control region and at cellular c-myc and H19/Igf2 insulators. *The EMBO journal* 27, 654-666.
- Steidl, U., Steidl, C., Ebralidze, A., Chapuy, B., Han, H.J., Will, B., Rosenbauer, F., Becker, A., Wagner, K., Koschmieder, S., *et al.* (2007). A distal single nucleotide polymorphism

alters long-range regulation of the PU.1 gene in acute myeloid leukemia. *The Journal of clinical investigation* *117*, 2611-2620.

Stopka, T., Amanatullah, D.F., Papetti, M., and Skoultschi, A.I. (2005). PU.1 inhibits the erythroid program by binding to GATA-1 on DNA and creating a repressive chromatin structure. *The EMBO journal* *24*, 3712-3723.

Stopka, T., and Skoultschi, A.I. (2003). The ISWI ATPase Snf2h is required for early mouse development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *100*, 14097-14102.

Stopka, T., Zakova, D., Fuchs, O., Kubrova, O., Blafkova, J., Jelinek, J., Necas, E., and Zivny, J. (2000). Chromatin remodeling gene SMARCA5 is dysregulated in primitive hematopoietic cells of acute leukemia. *Leukemia* *14*, 1247-1252.

Stresemann, C., Bokelmann, I., Mahlknecht, U., and Lyko, F. (2008). Azacytidine causes complex DNA methylation responses in myeloid leukemia. *Molecular cancer therapeutics* *7*, 2998-3005.

Strohner, R., Nemeth, A., Jansa, P., Hofmann-Rohrer, U., Santoro, R., Langst, G., and Grummt, I. (2001). NoRC--a novel member of mammalian ISWI-containing chromatin remodeling machines. *The EMBO journal* *20*, 4892-4900.

Taskesen, E., Havermans, M., van Lom, K., Sanders, M.A., van Norden, Y., Bindels, E., Hoogenboezem, R., Reinders, M.J., Figueroa, M.E., Valk, P.J., *et al.* (2014). Two splice-factor mutant leukemia subgroups uncovered at the boundaries of MDS and AML using combined gene expression and DNA-methylation profiling. *Blood* *123*, 3327-3335.

Tenen, D.G., Hromas, R., Licht, J.D., and Zhang, D.E. (1997). Transcription factors, normal myeloid development, and leukemia. *Blood* *90*, 489-519.

Torrano, V., Chernukhin, I., Docquier, F., D'Arcy, V., Leon, J., Klenova, E., and Delgado, M.D. (2005). CTCF regulates growth and erythroid differentiation of human myeloid leukemia cells. *The Journal of biological chemistry* *280*, 28152-28161.

Tremblay, K.D., Duran, K.L., and Bartolomei, M.S. (1997). A 5' 2-kilobase-pair region of the imprinted mouse H19 gene exhibits exclusive paternal methylation throughout development. *Molecular and cellular biology* *17*, 4322-4329.

Tremblay, K.D., Saam, J.R., Ingram, R.S., Tilghman, S.M., and Bartolomei, M.S. (1995). A paternal-specific methylation imprint marks the alleles of the mouse H19 gene. *Nature genetics* *9*, 407-413.

Vangala, R.K., Heiss-Neumann, M.S., Rangatia, J.S., Singh, S.M., Schoch, C., Tenen, D.G., Hiddemann, W., and Behre, G. (2003). The myeloid master regulator transcription factor PU.1 is inactivated by AML1-ETO in t(8;21) myeloid leukemia. *Blood* *101*, 270-277.

Vargova, J., Vargova, K., Skoultschi, A.I., and Stopka, T. (2009). Nuclear localization of ISWI ATPase Smarca5 (Snf2h) in mouse. *Frontiers in bioscience* *1*, 553-559.

- Vargova, K., Curik, N., Burda, P., Basova, P., Kulvait, V., Pospisil, V., Savvulidi, F., Kokavec, J., Necas, E., Berkova, A., *et al.* (2011). MYB transcriptionally regulates the miR-155 host gene in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* *117*, 3816-3825.
- Venkatraman, A., He, X.C., Thorvaldsen, J.L., Sugimura, R., Perry, J.M., Tao, F., Zhao, M., Christenson, M.K., Sanchez, R., Yu, J.Y., *et al.* (2013). Maternal imprinting at the H19-Igf2 locus maintains adult haematopoietic stem cell quiescence. *Nature* *500*, 345-349.
- Vigorito, E., Perks, K.L., Abreu-Goodger, C., Bunting, S., Xiang, Z., Kohlhaas, S., Das, P.P., Miska, E.A., Rodriguez, A., Bradley, A., *et al.* (2007). microRNA-155 regulates the generation of immunoglobulin class-switched plasma cells. *Immunity* *27*, 847-859.
- Vogler, C., Huber, C., Waldmann, T., Ettig, R., Braun, L., Izzo, A., Daujat, S., Chassignet, I., Lopez-Contreras, A.J., Fernandez-Capetillo, O., *et al.* (2010). Histone H2A C-terminus regulates chromatin dynamics, remodeling, and histone H1 binding. *PLoS genetics* *6*, e1001234.
- Wang, H., Maurano, M.T., Qu, H., Varley, K.E., Gertz, J., Pauli, F., Lee, K., Canfield, T., Weaver, M., Sandstrom, R., *et al.* (2012). Widespread plasticity in CTCF occupancy linked to DNA methylation. *Genome research* *22*, 1680-1688.
- Webber, A.L., Ingram, R.S., Levors, J.M., and Tilghman, S.M. (1998). Location of enhancers is essential for the imprinting of H19 and Igf2 genes. *Nature* *391*, 711-715.
- Welch, J.S., Ley, T.J., Link, D.C., Miller, C.A., Larson, D.E., Koboldt, D.C., Wartman, L.D., Lamprecht, T.L., Liu, F., Xia, J., *et al.* (2012). The origin and evolution of mutations in acute myeloid leukemia. *Cell* *150*, 264-278.
- Wendt, K.S., and Peters, J.M. (2009). How cohesin and CTCF cooperate in regulating gene expression. *Chromosome Res* *17*, 201-214.
- Wendt, K.S., Yoshida, K., Itoh, T., Bando, M., Koch, B., Schirghuber, E., Tsutsumi, S., Nagae, G., Ishihara, K., Mishihiro, T., *et al.* (2008). Cohesin mediates transcriptional insulation by CCCTC-binding factor. *Nature* *451*, 796-801.
- West, A.G., Gaszner, M., and Felsenfeld, G. (2002). Insulators: many functions, many mechanisms. *Genes & development* *16*, 271-288.
- Wu, H.K., Weksberg, R., Minden, M.D., and Squire, J.A. (1997). Loss of imprinting of human insulin-like growth factor II gene, IGF2, in acute myeloid leukemia. *Biochemical and biophysical research communications* *231*, 466-472.
- Xiao, A., Li, H., Shechter, D., Ahn, S.H., Fabrizio, L.A., Erdjument-Bromage, H., Ishibe-Murakami, S., Wang, B., Tempst, P., Hofmann, K., *et al.* (2009). WSTF regulates the H2A.X DNA damage response via a novel tyrosine kinase activity. *Nature* *457*, 57-62.
- Xie, X., Mikkelsen, T.S., Gnirke, A., Lindblad-Toh, K., Kellis, M., and Lander, E.S. (2007). Systematic discovery of regulatory motifs in conserved regions of the human genome, including thousands of CTCF insulator sites. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *104*, 7145-7150.

- Yamamoto, H., Kihara-Negishi, F., Yamada, T., Hashimoto, Y., and Oikawa, T. (1999). Physical and functional interactions between the transcription factor PU.1 and the coactivator CBP. *Oncogene* *18*, 1495-1501.
- Yeaman, C., Wang, D., Paz-Priel, I., Torbett, B.E., Tenen, D.G., and Friedman, A.D. (2007). C/EBP α binds and activates the PU.1 distal enhancer to induce monocyte lineage commitment. *Blood* *110*, 3136-3142.
- Yoder, J.A., Soman, N.S., Verdine, G.L., and Bestor, T.H. (1997). DNA (cytosine-5)-methyltransferases in mouse cells and tissues. Studies with a mechanism-based probe. *Journal of molecular biology* *270*, 385-395.
- Yusufzai, T.M., Tagami, H., Nakatani, Y., and Felsenfeld, G. (2004). CTCF tethers an insulator to subnuclear sites, suggesting shared insulator mechanisms across species. *Molecular cell* *13*, 291-298.
- Zampieri, M., Guastafierro, T., Calabrese, R., Ciccarone, F., Bacalini, M.G., Reale, A., Perilli, M., Passananti, C., and Caiafa, P. (2012). ADP-ribose polymers localized on Ctfp-Parp1-Dnmt1 complex prevent methylation of Ctf target sites. *The Biochemical journal* *441*, 645-652.
- Zarnegar, M.A., Chen, J., and Rothenberg, E.V. (2010). Cell-type-specific activation and repression of PU.1 by a complex of discrete, functionally specialized cis-regulatory elements. *Molecular and cellular biology* *30*, 4922-4939.
- Zhang, L., Padron, E., and Lancet, J. (2015). The molecular basis and clinical significance of genetic mutations identified in myelodysplastic syndromes. *Leukemia research* *39*, 6-17.
- Zhang, P., Behre, G., Pan, J., Iwama, A., Wara-Aswapati, N., Radomska, H.S., Auron, P.E., Tenen, D.G., and Sun, Z. (1999). Negative cross-talk between hematopoietic regulators: GATA proteins repress PU.1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *96*, 8705-8710.
- Zhang, P., Zhang, X., Iwama, A., Yu, C., Smith, K.A., Mueller, B.U., Narravula, S., Torbett, B.E., Orkin, S.H., and Tenen, D.G. (2000). PU.1 inhibits GATA-1 function and erythroid differentiation by blocking GATA-1 DNA binding. *Blood* *96*, 2641-2648.
- Zhou, Y., Santoro, R., and Grummt, I. (2002). The chromatin remodeling complex NoRC targets HDAC1 to the ribosomal gene promoter and represses RNA polymerase I transcription. *The EMBO journal* *21*, 4632-4640.

SEZNAM PUBLIKACÍ AUTORA

Dluhosova M, Curik N, Vargova J, Jonasova A, Zikmund T, Stopka T. Epigenetic Control of SPI1 Gene by CTCF and ISWI ATPase SMARCA5. *PLoS One*. 2014 Feb 3;9(2):e87448. doi: 10.1371/journal.pone.0087448 **IF=3,73**

Basova P, Pospisil V, Savvulidi F, Burda P, Vargova K, Stanek L, **Dluhosova M**, Kuzmova E, Jonasova A, Steidl U, Laslo P, Stopka T. Aggressive acute myeloid leukemia in PU.1/p53 double-mutant mice. *Oncogene*. 2013 Oct 14. doi: 10.1038/onc.2013.414 **IF=7,35**

Martina Dluhošová, Nikola Čuřík, Anna Jonášová, Tomáš Stopka: Patofyziologické poznámky k diferenciační terapii 5-azacytidinem u MDS. *Myelodysplastic Syndrome News*, červen 2014, číslo 1, strana 10-18

PŘÍLOHY

Příloha 1

Dluhosova M, Curik N, Vargova J, Jonasova A, Zikmund T, Stopka T. Epigenetic Control of SPI1 Gene by CTCF and ISWI ATPase SMARCA5. *PLoS One*. 2014 Feb 3;9(2):e87448. doi: 10.1371/journal.pone.0087448 **IF=3,73**

Příloha 2

Basova P, Pospisil V, Savvulidi F, Burda P, Vargova K, Stanek L, **Dluhosova M**, Kuzmova E, Jonasova A, Steidl U, Laslo P, Stopka T. Aggressive acute myeloid leukemia in PU.1/p53 double-mutant mice. *Oncogene*. 2013 Oct 14. doi: 10.1038/onc.2013.414 **IF=7,35**

Příloha 3

Martina Dluhošová, Nikola Čuřík, Anna Jonášová, Tomáš Stopka: Patofyziologické poznámky k diferenciační terapii 5-azacytidinem u MDS. Myelodysplastic Syndrome News, červen 2014, číslo 1, strana 10-18