

Univerzita Karlova v Praze

1. lékařská fakulta

Autoreferát disertační práce



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

Mgr. Martina Dluhošová

Praha 2017

Doktorské studijní programy v biomedicině

Univerzita Karlova v Praze a Akademie věd České republiky

Obor: Fyziologie a patofyziologie člověka

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

Školící pracoviště: Ústav patologické fyziologie, 1. lékařská fakulta
Univerzity Karlovy

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

Disertační práce bude nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněna k nahlížení veřejnosti v tištěné podobě na Oddělení pro vědeckou činnost a zahraniční styky Děkanátu 1. lékařské fakulty.

Obsah

Abstrakt.....	4
Abstract.....	5
Úvod.....	6
Hypotézy a cíle práce	8
Materiál a metodika.....	9
Výsledky a diskuze.....	13
Shrnutí závěrů dizertační práce.....	21
Použitá literatura	23
Publikace autora	28

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 Ctfc 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.

Úvod

Myelodysplastický syndrom (MDS) je klonální onemocnění pluripotentní kmenové buňky vedoucí k poruše krvetvorby a následně ke vzniku akutní myeloidní leukémie (AML). Nízká hladina tumor supresorových genů v buňkách MDS a sekundární AML je spojována se zvýšenou metylací DNA v regulačních oblastech těchto genů a rozsah abnormální metylace pozitivně koreluje s pravděpodobností transformace do AML (Jiang et al., 2009).

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 5-azacytidin (AZA) (Fenaux et al., 2010). AZA se začleňuje do DNA a brání DNA metyltransferázám v jejich funkci. AZA mění expresi až 1424 genů v souvislosti se snížením hladiny metylace DNA. Demetylace DNA může být spojena jak s aktivací (10,6% genů), tak s inhibicí přepisu DNA (8,3% genů). Klinické studie ukazují, že léčba AZA snižuje nutnost transfúzí krve a krevních destiček (Silverman et al., 2002) a prodlužuje dobu celkového přežití pacientů a dobu progresse onemocnění do AML (Fenaux et al., 2009)(Fenaux et al., 2009). Navzdory zmíněným pozitivním účinkům AZA zůstává tato hypometylační terapie u pacientů s MDS z lékařského hlediska neuspokojivá. Výše popsané pro-diferenční účinky AZA na leukemické buňky dobře fungují v iniciální fázi terapie pacientů, avšak v průběhu času AZA postupně selhává a dochází k nekontrolované propagaci leukemického klonu a smrti pacienta.

Transkripční faktor SPI1 zahajuje a řídí myeloidní diferenciaci pluripotentní krvetvorné buňky. Směr diferenciacie je závislý na jeho přesné buněčné koncentraci. Expresi SPI1 řídí několik regulačních oblastí: proximální promotor, regulační oblast URE a dalších méně známé enhancery (Hoogenkamp et al., 2007; Leddin et al., 2011), které spolu komunikují a vytváří chromatinové smyčky (Ebraldizze et al., 2008; Leddin et al., 2011; Staber et al., 2013).

SPI1 je gen, který potlačuje vznik nádorů. Nízká hladina SPI1 je pozorována v buňkách AML (Rosenbauer et al., 2004) a MDS s vysokým rizikem přechodu do AML (podle IPSS) a u modelové buněčné linie MDS/AML OCI-M2 (Curik et al., 2012). U AML je nízká

hladina SPI1 spojována s delecí nebo mutací oblasti 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). 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 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).

Hypotézy a cíle 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 hypometylační 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*. Cílem dizertační práce je:

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 demetylaci 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.

Materiál a metodika

Materiál:

DNA plasmidy

Modelové DNA plasmidy pro studování regulačních vlastností -

Plasmidy obsahující vazebné domény a gen pro luciferázu: pHLLE, pHLIE a pHLME byly použity v experimentech testujících funkci insulátoru (Ishihara et al., 2006; Wendt and Peters, 2009). V naší práci byly tyto tzv. „reporterové“ plasmidy použity pro testování funkčního vztahu CTCF a SMARCA5 v oblasti insulátoru genu *H19*. Plasmidy byly vytvořeny a nám poskytnuty z laboratoře prof. Mitsuyoshi Nakao.

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) (DSMZ, Braunschweig, Německo; ACC 501).

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)(q21q26.2) nebo t(3;3)(q21;q26.2); RPN1-EVI1) (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.

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.

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. Expresse 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 μ M 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 μ M. 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 IIu s použitím protilátky PE-anti-human-CD34 (klon 581).

Směs myeloidních buněk byla od dárce v kompletní remisi po vyléčení předchozího lymfomu (s normálně vyzrávajícími 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 buněk MEL-shSmarca5, HeLa, OCI-M2

Izolace RNA a přepis do cDNA

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

Přenos proteinu a inkubace s protilátkou (Western Blott)

Ko-imunoprecipitace

Chromatinová imunoprecipitace (ChIP)

Stanovení luciferázové aktivity (exprese reportérového genu)

Analýza metylace DNA

Imunofluorescenční mikroskopie

Výsledky a diskuze

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 vyžívání 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). Dále 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 vyžívání 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*. Tato data ukazují, že exprese *H19* a *Igf2* v použitých leukemických buňkách je rozdílná.

Následně jsme v buňkách MEL určili vazbu Ctcf v regulační oblasti ICR lokusu *H19/Igf2* na čtyřech místech DNA (-3,7; -3,1; -2,6; -2,2 kb vzdálených od transkripčního počátku genu *H19*), podobně jak bylo určeno v dřívější 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 oblasti ICR vyskytuje ATPáza sestavující a posunující nukleozómy - Smarca5 z rodiny ISWI (Li et al., 2006; Strohner et al., 2001; Zhou et al., 2002).

Použili jsme stabilně transfekované buňky MEL-shSmarca5, u nichž jsme byli schopni účinně snížit hladinu Smarca5 (pod 20 % původní hladiny). V těchto buňkách jsme zjistili přítomnost Smarca5

v oblasti ICR v pozici -3,7; -3,1; -2,6; -2,2 kb vzdálených od transkripčního počátku *H19*. Získaná data ukazují, že Ctfc a Smarca5 se vážou na společná vazebná místa v ICR lokusu *H19/Igf2*.

Zajímalo nás dále, zda Smarca5 může ovlivňovat vazbu Ctfc na DNA nebo naopak, zda Ctfc může ovlivňovat vazbu Smarca5 na DNA v oblasti ICR *H19/Igf2*. K zodpovězení zmíněných otázek jsme použili metodu CHIP v oblasti ICR po blokování exprese Smarca5 a po blokování Ctfc. Pokles Smarca5 vedl ke snížení vazby Ctfc na DNA v oblasti ICR. Po blokování Ctfc byla vazba Smarca5 na DNA stabilní nebo dokonce zvýšená. Naše výsledky tedy nasvědčují tomu, že specifická vazba Ctfc v oblasti ICR *H19/Igf2* je závislá na přítomnosti Smarca5, a že Smarca5 se na DNA váže nezávisle na expresi Ctfc.

Následně jsme pomocí metody koimunoprecipitace ukázali proteinovou interakci mezi Ctfc a Smarca5 a to jak v buňkách myši tak lidské erytroleukémie.

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

2. SMARCA5 funkčně spolupracuje se CTCF

Dále jsme studovali vliv Smarca5 na regulaci transkripce cílových genů Ctfc. Na modelovém vektoru, který obsahuje klíčové regulační oblasti genového lokusu *H19/IGF2* jsme nejprve ukázali, že transkripční aktivita luciferázového genu na vektoru pHLIE je v přítomnosti CTCF trojnásobně inhibována oproti vektoru pHLME, jehož transkripční aktivita není ovlivněna přítomností CTCF, což je v souladu s dřívější prací (Ishihara et al., 2006; Wendt and Peters, 2009).

Zajímalo nás, zda blokování modelového enhanceru, které je řízeno proteinem CTCF, vyžaduje přítomnost SMARCA5. Nejdříve jsme ukázali změnu luciferázové aktivity po samotném blokování CTCF. V buňkách se sníženou hladinou CTCF jsme pozorovali významně zvýšenou luciferázovou aktivitu ukazující na negativní efekt CTCF na aktivitu enhanceru (tzv. enhancer-blocking effect). V buňkách se sníženou hladinou SMARCA5 jsme podobně jako

v buňkách s blokováním CTCF pozorovali významně zvýšenou aktivitu luciferázového genu.

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.

3. Smarca5 reguluje transkripci cílových genů Ctcf

Naším dalším cílem bylo ověřit data získaná testováním transkripční aktivity v reportérovém systému na primárních cílových genech proteinu Ctcf. Snížená hladina Ctcf vedla k pětinasobnému poklesu exprese *H19* a sedminásobnému zvýšení exprese *Igf2*. Podobné výsledky jsme pozorovali po snížení hladiny *Smarca5*. Exprese *H19* se v buňkách s nízkou hladinou *Smarca5* snížila trojnásobně, zatímco exprese *Igf2* se desetinásobně zvýšila.

Výsledky ukazují, 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*.

V návaznosti na data, jež popsala inhibující vliv DNA metylace na expresi genu pro hematopoetický transkripční faktor SPI1 (Curik et al., 2012), jsme testovali, zda snížení hladiny *Smarca5* bude mít vliv na expresi *Spi-1* a jeho cílového genu *Cebpa* v buňkách MEL. Po snížení hladiny *Smarca5* jsme pozorovali zvýšení exprese *Spi-1* a *Cebpa* na úrovni mRNA a proteinu. U buněk MEL je však fyziologická exprese *Spi-1* navíc narušena integrovaným retrovirem SFFV v jeho regulační oblasti, jež neumožňuje zahájení diferenciace do myeloidní řady. Z toho důvodu jsme ve studiu pokračovali na buněčném modelu lidské erytroleukémie.

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

Naše práce jako první ukazuje vazbu CTCF a SMARCA5 v genové oblasti *SPI1* v normálních myeloidních buňkách. V 5' oblasti genu *SPI1* jsme pozorovali významnou vazbu v řadě lokalizací jak CTCF tak i SMARCA5, přičemž společně nasedají na DNA v oblastech: -15,6, -13,7, -12,4 a -11.

V leukemických buňkách je vazba CTCF a SMARCA5 v oblasti genu *SPI1* narušena. Vazbu CTCF a SMARCA5 jsme testovali v lidské buněčné linii OCI-M2, jež 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 zjistili vazbu CTCF pouze v promotorové oblasti -0,15. Rozložení vazby SMARCA5 v buňkách OCI-M2 jsme pozorovali podobné jako v normálních buňkách. Vazbu SMARCA5 jsme určili v amplikonech -17,2 až -15,6 (v URE a v oblasti ve směru 3' od URE) a -11.

Následně jsme zjistili, že působení AZA umožňuje vazbu CTCF a SMARCA5. Nově vzniklou specifickou vazbu CTCF jsme lokalizovali pouze na enhanceru -14,4. Zvýšené „nabohacení“ CTCF, které jsme určili v amplikonech -15,6 a -11, se blíží specifické vazbě. Specifickou vazbu SMARCA5 jsme lokalizovali v amplikonech: -15,6, -13,4, -11 a také na enhanceru -14,4.

Z toho vyplývá, že společným vazebným místem pro CTCF a SMARCA5 v leukemických buňkách ovlivněných AZA je pouze enhancer -14,4.

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. V normálních lidských myeloidních buňkách jsme pozorovali „nabohacení“ obou členů kohezinového komplexu RAD21 a SMC1 v regulačních oblastech genu *SPI1* velmi podobné jako byla 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 a -9,7 .

V buňkách OCI-M2 bez AZA terapie jsme na genové oblasti *SPI1* pozorovali zanedbatelné „nabohacení“ RAD21 a SMC1. Po působení AZA byl RAD21 vázán do místa -15,9. 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. Vazba CTCF a SMARCA5 na enhanceru -14,4 se překvapivě nepřekrývala s vazbou RAD21 ani SMC1.

Výsledky ukazují, že působení hypometylační terapie obnovuje vazbu RAD21 a SMC1, kterou jsme pozorovali v normálně diferencujících myeloidních buňkách.

6. V buňkách AML je vazebné místo CTCF a SMARCA5 na genu *SPI1* metylováno a AZA způsobuje jeho demetylací

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.

Na vazebné sekvenci CTCF a v jejím okolí jsme určili metylační stav DNA v CD34+ buňkách MDS/AML, normálních CD34+ progenitorových buňkách a smíšených normálně vyzrávajících 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%.

Dále jsme pozorovali ve vzorku DNA od pacienta léčeného AZA vyšší procento nemetylovaných CG na enhanceru -14,4 než u pacienta bez AZA terapie.

Stejný vliv AZA jsme pozorovali v MDS/AML buněčné linii OCI-M2, kde AZA na vazebném místě CTCF (enhanceru -14,4) působil pokles metylace až o 22 %.

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. V normálních CD34+ buňkách jsme určili deset CG s nižší metylací DNA v enhanceru -14,4 oproti buňkám pacientů s MDS/AML. Ve zbývajících sledovaných oblastech -15,6 ani -11 jsme mezi vzorky nepozorovali shodné ani podobné rozdíly v metylaci DNA.

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. V buňkách OCI-M2 jsme pozorovali, že čím vyšší je úroveň metylace DNA, tím dochází k silnější demetylaci DNA působením AZA. Tato data jsou ve shodě s dřívější prací (Klco et al., 2013).

Ze získaných dat můžeme usuzovat, že metylace DNA v leukemických buňkách brání vazbě proteinů CTCF a SMARCA5.

7. Manipulování hladiny CTCF nebo SMARCA5 ovlivňuje transkripci genu *SPI1*

CTCF a SMARCA5 tlumí expresi *SPI1* v leukemických buňkách. 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*. Zatímco přechodně snížená exprese SMARCA5, v nepřítomnosti AZA nebo po předchozí inkubaci buněk s AZA, vedla ke zvýšení exprese *SPI1*.

Diskuze ke zjištěným vztahům mezi Cctf a Smarca5, jejich vazbou na DNA a vlivu na genovou expresi v leukemických buňkách

Zjistili jsme interakci proteinů Cctf a Smarca5 na známé cílové regulační sekvenci ICR genového lokusu *H19/Igf2*. Přítomnost Smarca5 je zde nezbytná pro vazbu Cctf na chromatin. Smarca5 se Cctf společně stimulují expresi genu *H19* a společně tlumí expresi *Igf2*. Prokázali jsme, že Smarca5 je kofaktorem Cctf ve funkci blokování enhanceru v oblasti ICR *H19/Igf2*. Jiná odborná studie prokázala interakci CTCF s dalším chromatin remodelačním faktorem CHD8 (Ishihara et al., 2006). Přítomnost CHD8 je, podobně

jako Smarca5, nutná pro enhancer-blokující aktivitu Ctf na ICR *H19/Igf2*, avšak na rozdíl od Smarca5 nemá CHD8 vliv na interakci CTCF s DNA v oblasti ICR *H19/Igf2* (Ishihara et al., 2006). 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.

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). Domníváme se, že zvýšená hladina Smarca5 v leukemických buňkách může abnormálně zesilovat vazbu CTCF na regulačních oblastech a nevhodně tak blokovat expresi tumor supresorových genů.

Zjistili jsme, že SMARCA5 a CTCF společně se zástupci kohezinového komplexu RAD21 a SMC1 interagují a společně ovlivňují expresi *SPI1*, jehož snížená hladina byla detekována u modelové buněčné linie OCI-M2 a u pacientů s MDS s vysokým rizikem přechodu do AML (Curik et al., 2012). RAD21 a SMC1 zde pravděpodobně přispívají k tvorbě regulačních chromatinových smyček, které zde byly již dříve identifikovány (Leddin et al., 2011).

Identifikovali jsme oblast enhanceru v pozici -14,4 kb od transkripčního počátku *SPI1*, která se vyznačuje zvýšenou metylací DNA v buňkách MDS a AML oproti normálně vyžívajícím buňkám, a kde hypometylační látka AZA snižuje metylační stav DNA, podobně jak ukázala dřívější práce v regulační oblasti *URE* (Curik et al., 2012). Zjistili jsme, že po působení AZA dochází v oblasti -11 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. To je v souladu s výsledky jiných prací, které ukázaly, že vazba SMARCA5 a CTCF na DNA je ovlivněna metylací DNA (Bell and Felsenfeld, 2000; Hakimi et al., 2002).

CTCF a SMARCA5 blokují expresi *SPI1* v leukemických buňkách. Z našich výsledků usuzujeme, že zvýšená hladina CTCF brání hypometylační terapii v obnovení exprese *SPI1* a naopak, snížení hladiny SMARCA5 podporuje hypometylační terapii

navozenou stimulaci exprese SPI1. Příčinou je pravděpodobně vazba CTCF/SMARCA5 na enhancer -14,4, kterou zprostředkuje působení AZA.

Domníváme se, že působení AZA mění v leukemických buňkách vazebný profil transkripčních a jiných epigenetických faktorů, které dále ovlivňují expresi SPI1 takovým způsobem, který není dostačující pro obnovení transkripce genu *SPI1* na takovou hladinu, jež je pozorována u buněk s normálně probíhající myeloidní diferenciací. Komplex CTCF/SMARCA5 je pravděpodobně zapojen v procesu blokování aktivovaných zesilujících regulačních oblastí tzv. smyčkováním chromatinu a brání tak znovuobnovení exprese SPI1 po působení hypometylační terapie.

Naše data představují 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. Domníváme se, že sledování vazby a aktivity komplexu CTCF-SMARCA5 by mohlo být diagnostickým či terapeutickým cílem na postižených cílových genech krvetvorby u pacientů s MDS a AML.

Shrnutí závěrů dizertační práce

Konkrétní cíle dizertační práce přinesly tyto závěry:

- 1. Ctcf a Smarca5 vzájemně interagují na DNA v krevních buňkách.** Interakce Ctcf a Smarca5 byla dokázána na ICR genového lokusu *H19/Igf2*. Vazba Ctcf na cílové sekvence probíhá pouze v přítomnosti Smarca5. Naopak vazba Smarca5 na DNA probíhá nezávisle na přítomnosti Ctcf.
- 2. Ctcf a Smarca5 spolupracují v regulaci genové exprese.** Ctcf a Smarca5 společně regulují genovou expresi cílových genů *H19/Igf2* v krevních buňkách. Ctcf 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 MSD/AML je podobně rozloženo 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 demetylace DNA v oblasti -14,4 pozitivně korelovala s počáteční úrovní metylace.
- 5. AZA demetyluje vazebné místo CTCF a SMARCA5.** V buněčné linii MSD/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 demetylací 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.

Použitá literatura

Bell, A.C., and Felsenfeld, G. (2000). Methylation of a CTCF-dependent boundary controls imprinted expression of the Igf2 gene. *Nature* 405, 482-485.

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.

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.

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.

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.

Filippova, G.N., Fagerlie, S., Klenova, E.M., Myers, C., Dehner, Y., Goodwin, G., Neiman, P.E., Collins, S.J., and Lobanenkov, 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., Thienes, C.P., Penn, B.H., Cho, D.H., Hu, Y.J., Moore, J.M., Klesert, T.R., Lobanenkov, 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.

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

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.

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 Lobanenkov, 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.

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*.

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.

Li, J., Langst, G., and Grummt, I. (2006). NoRC-dependent nucleosome positioning silences rRNA genes. *The EMBO journal* 25, 5735-5741.

Livingstone, C. (2013). IGF2 and cancer. *Endocrine-related cancer* 20, R321-339.

Ohlsson, R., Renkawitz, R., and Lobanekov, V. (2001). CTCF is a uniquely versatile transcription regulator linked to epigenetics and disease. *Trends in genetics : TIG* 17, 520-527.

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.

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.

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.

Staber, P.B., Zhang, P., Ye, M., Welner, R.S., Nombela-Arrieta, C., Bach, C., Kerenyi, 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.

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.

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.

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.

Wendt, K.S., and Peters, J.M. (2009). How cohesin and CTCF cooperate in regulating gene expression. *Chromosome Res* 17, 201-214.

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.

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.

Publikace autora

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 leukaemia in PU.1/p53 double mutant mice. *Oncogene*. 2013, sv. 1, s. 1–11. ISSN 0950-9232 **IF=7,35**

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

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

Nikola Čuřík, **Martina Dluhošová**, Anna Jonášová, Tomáš Stopka: Azacytidin v nádorových buňkách ovlivňuje geny s protinádorovým účinkem. *Medical Tribune*. X (2014) číslo 5, sešit C, strana 3

Souhrnný impakt faktor publikací autora: **11,08**