

Svoluji k zapůjčení své diplomové práce ke studijním účelům a prosím, aby byla vedena přesná evidence vypůjčovateli. Převzaté údaje je vypůjčovatel povinen řádně ocitovat.

**Univerzita Karlova v Praze**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie  
Studijní obor: Genetika, molekulární biologie a virologie



**Bc. Kateřina Rejlová**

Regulace exprese genu DLX1 přes AP-1 vazebné místo  
Regulation of DLX1 gene expression through AP-1 binding site

Diplomová práce

Školitel: Mgr. Júlia Starková, Ph.D.

Praha, 2013

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 30. 7. 2013

Podpis

## **Poděkování**

Na tomto místě bych ráda poděkovala své školitelce Mgr. Júlii Starkové, Ph.D. za odborné vedení celého projektu a všechny konzultace, které byly nedílnou součástí vypracování této diplomové práce. Dále bych ráda poděkovala prof. MUDr. Janu Trkovi, Ph.D. za možnost účasti na výzkumu v oblasti dětských leukémií. Děkuji celé laboratoři CLIP při Klinice dětské hematologie a onkologie (UK 2. LF a FN Motol) za velmi přátelské pracovní prostředí a motivaci, bez které by tato práce nevznikla. Velké díky patří konkrétně Mgr. Martině Slámové a MUDr. Olze Zimmermannové za psychickou podporu a pomoc při časově náročných experimentech. Velké poděkování věnuji také Mgr. Karolíně Kramarzové za její trpělivost a ochotu. V neposlední řadě bych ráda poděkovala Mgr. Kateřině Borčin Mocové, která mi i přes své mateřské povinnosti poskytla řadu cenných rad k sepsání diplomové práce. Největší dík patří celé mé rodině za nepostradatelnou podporu během celého mého studia.

Tato diplomová práce vznikla za finanční podpory grantu GAČR – č. P304/12/2214 (Grantová agentura České republiky).

## Abstrakt

Regulace genu *DLX1*, jehož signifikantně zvýšená hladina byla detekována právě u pacientů s akutní myeloidní leukémií s mutací *FLT3-ITD*, je dosud zcela neprozkoumaným tématem. Prvním cílem této práce bylo zjistit, které signální dráhy regulují expresi genu *DLX1*. Z těchto drah byly pomocí metod qRT-PCR a western blot vybrány dráhy ERK a JNK. Uvedené dráhy způsobují aktivaci podjednotek transkripčního faktoru AP-1, jehož předpokládané vazebné místo bylo identifikováno také na promotoru genu *DLX1*. Druhým cílem této práce bylo proto ověření hypotézy o předpokládané regulaci exprese genu *DLX1* (přes ERK/JNK dráhu) probíhající přes AP-1 vazebné místo na promotoru. K ověření hypotézy byla použita metoda duální luciferázové eseje, která využívá luminiscenční aktivity luciferázy, jejíž gen je obsažen v použitém luciferázovém vektoru. Před tento gen byla při tvorbě konstruktů využívaných ve výše zmíněné eseji vložena nejprve krátká část promotoru genu *DLX1* a poté i jeho dlouhá část (v okolí AP-1 místa). Z výsledků studie vyplývá, že regulace exprese genu *DLX1* přes AP-1 vazebné promotorové místo je důležitou, nikoli však postačující součástí regulační kaskády probíhající přes ERK a JNK dráhu. Na regulaci exprese genu *DLX1* se pravděpodobně podílejí rovněž jiné transkripční faktory, které jsou aktivovány ERK1/2 kinázou.

Klíčová slova:

leukémie, homeoboxové geny, signální dráhy, genová exprese, duální luciferázová esej

## Abstract

Regulation of expression *DLX1* gene, whose elevated levels are detected in patients with acute myeloid leukemia with FLT3-ITD mutations, is not still completely explored topic. The first aim of this study was to determine which selected signaling pathways regulate gene expression of *DLX1*. ERK a JNK pathways were selected by using qRT-PCR and western blot. These pathways cause activation of the transcription factor AP-1 subunits, the AP-1 putative promoter binding site was identified also in the promoter of the *DLX1* gene. The second aim of this study was to test the hypothesis on the regulation of gene expression of *DLX1* (via ERK/JNK pathway) through AP-1 binding site on the promoter. Dual luciferase assay using luminescent luciferase activity was performed to test this hypothesis. Gene of the luciferase is contained in the used luciferase vector. The short and the long part of the *DLX1* promoter (around AP-1 site) were inserted before the gene of the luciferase in the constructs used in this method. The results of this study indicate that the regulation of gene expression through AP-1 promoter binding site is important but not sufficient part of the regulatory cascade running through ERK and JNK pathway. There must be another transcription factors activated by ERK1/2 kinase which are probably also involved in the regulation of *DLX1* gene.

Keywords:

leukemia, homeobox genes, signal pathways, gene expression, dual luciferase assay

# Obsah

|   |    |
|---|----|
| Abstrakt .....  | 3  |
| Abstract .....  | 4  |
| Seznam zkratek .....  | 8  |
| 1 Úvod .....  | 11 |
| 2 Cíle práce .....  | 13 |
| 3 Přehled literatury .....  | 14 |
| 3.1 Leukémie .....  | 14 |
| 3.1.1 Vznik leukémie na molekulární úrovni .....                              | 14 |
| 3.2 Rozdělení leukemií .....  | 14 |
| 3.2.1. Akutní leukémie.....   | 15 |
| 3.3 Homeoboxové geny .....  | 18 |
| 3.3.1 HOX geny v hematopoéze .....  | 21 |
| 3.3.2 HOX geny v patogenezi .....   | 22 |
| 3.3.3 DLX1 .....  | 23 |
| 4 Metody .....  | 29 |
| 4.1 Kultivace a uchovávání buněk .....  | 29 |
| 4.1.1 Buněčné linie použité v experimentech .....                             | 29 |
| 4.1.2 Kultivace buněk .....   | 29 |
| 4.2 Western blot .....  | 31 |
| 4.2.1 Příprava buněčných linií a přidání aktivátoru/inhibitoru.....           | 31 |
| 4.2.2 Příprava proteinových vzorků .....                                      | 34 |
| 4.2.3 Detekce proteinů na nitrocelulóзовé membráně .....                      | 36 |
| 4.3 Kvantitativní RT-PCR v reálném čase (qRT-PCR) .....                       | 40 |
| 4.3.1 Příprava buněk .....  | 40 |
| 4.3.2 Použité inhibitory .....  | 41 |
| 4.3.3 Izolace RNA .....   | 41 |
| 4.3.4. Reverzní transkripce .....   | 41 |
| 4.3.5 qRT-PCR .....   | 42 |
| 4.3.6 Výpočet relativní normalizované hladiny mRNA .....                      | 43 |
| 4.4 Příprava základních konstruktů pro metodu duální luciferázové eseje ..... | 43 |
| 4.4.1 Amplifikace genové oblasti našeho zájmu .....                           | 45 |
| 4.4.2 TOPO klonování .....  | 46 |

|  |    |
|--|----|
| 4.4.3 Měření koncentrace plazmidů .....  | 48 |
| 4.4.4 Kontrola délky plazmidů .....  | 48 |
| 4.4.5 Sekvenování – ověření sekvence plazmidů .....                            | 49 |
| 4.4.6 Amplifikace genové oblasti našeho zájmu z TOPO vektoru .....             | 49 |
| 4.4.7 Restrikce insertů a vektorů pomocí EcoRI .....                           | 50 |
| 4.4.8 Přečišťování vyštěpených insertů z gelu .....                            | 51 |
| 4.4.9 Ligace insertu s vektorem .....  | 51 |
| 4.4.10 Klonování ligovaných produktů .....                                     | 52 |
| 4.4.11 Kontrola klonování pomocí restrikce EcoRI .....                         | 52 |
| 4.4.12 Sekvenování – ověření sekvence plazmidů .....                           | 53 |
| 4.5 Příprava mutovaných konstruktů pro metodu duální luciferázové eseje .....  | 53 |
| 4.6 Duální luciferázová esej .....   | 54 |
| 4.6.1 Příprava buněk .....   | 55 |
| 4.6.2 Transfekce buněk pomocí lipofectaminu .....                              | 55 |
| 4.6.3 Použité aktivátory/inhibitory .....                                      | 56 |
| 4.6.4 Odběr vzorků pro měření luciferázové eseje .....                         | 57 |
| 4.6.5 Měření duální luciferázové eseje .....                                   | 58 |
| 4.6.6 Výpočet relativní normalizované luminiscence luciferázy .....            | 59 |
| 4.7 Seznam chemikálií .....  | 60 |
| 5 Výsledky .....   | 61 |
| 5.1 Stanovení exprese genu DLX1 po inhibici vybraných signálních drah .....    | 61 |
| 5.1.1 Kontrola funkce příslušných inhibitorů .....                             | 61 |
| 5.1.2 Stanovení hladiny exprese genu DLX1 na mRNA úrovni .....                 | 64 |
| 5.1.3 Stanovení hladiny exprese genu DLX1 na proteinové úrovni .....           | 67 |
| 5.2 Stanovení aktivity luciferázy pod vlivem určité části DLX1 promotoru ..... | 68 |
| 5.2.1 Kontrola funkce příslušného inhibitoru/aktivátoru dráhy ERK .....        | 68 |
| 5.2.2 Luciferázová aktivita pod vlivem kontrolního promotoru .....             | 69 |
| 5.2.3 Luciferázová aktivita pod vlivem krátkého promotoru .....                | 71 |
| 5.2.4 Luciferázová aktivita pod vlivem dlouhého promotoru .....                | 74 |
| 6 Diskuze .....  | 77 |
| 6.1 Stanovení exprese genu DLX1 po inhibici vybraných signálních drah .....    | 77 |
| 6.1.1 Kontrola funkce příslušných inhibitorů .....                             | 77 |
| 6.1.2 Stanovení hladiny exprese DLX1 na mRNA a proteinové úrovni .....         | 77 |
| 6.2 Stanovení aktivity luciferázy pod vlivem určité části DLX1 promotoru ..... | 78 |

|       |   |    |
|-------|---|----|
| 6.2.1 | Kontrola funkce příslušného inhibitoru a aktivátoru ERK dráhy ..... | 78 |
| 6.2.2 | Luciferázová aktivita pod vlivem kontrolního promotoru .....        | 78 |
| 6.2.3 | Luciferázová aktivita pod vlivem krátkého promotoru .....           | 79 |
| 6.2.4 | Luciferázová aktivita pod vlivem dlouhého promotoru .....           | 80 |
| 7     | Souhrn .....  | 82 |
| 8     | Seznam použité literatury .....                                     | 83 |

## Seznam zkratek

|               |   |
|---------------|---|
| ALL           | akutní lymfoblastická leukémie  |
| ALM           | activation loop domain  |
| AML           | akutní myeloidní leukémie   |
| AML1 (RUNX1)  | runt-related transcription factor 1                                   |
| AMP           | ampicilin   |
| APL           | akutní promyelocytární leukémie                                       |
| APS           | ammonium persulfate (persulfát amonný)                                |
| ATB           | antibiotika   |
| BSA           | bovine serum albumin (bovinní sérum albumin)                          |
| CBF $\beta$   | core-binding factor $\beta$   |
| CD            | cluster of differentiation  |
| CDX2          | caudal type homeobox 2  |
| CLL           | chronická lymfoblastická leukémie                                     |
| CML           | chronická myeloidní leukémie  |
| c-Myc         | v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)                 |
| CREB          | cAMP response element-binding protein                                 |
| Cut11         | Cut-like homeobox 1   |
| DLL           | Distal-less gene  |
| DLX geny      | Distal-less homeobox geny   |
| DMEM          | Dulbecco's Modified Eagle Medium                                      |
| DMSO          | dimethylsulfoxid  |
| ECR           | Evolutionary Conservation Regions                                     |
| EDTA          | ethylenediaminetetraacetic acid                                       |
| ELK1          | ETS domain-containing protein ELK1                                    |
| ERK           | extracellular-signal-regulated kinases                                |
| ETO (RUNX1T1) | runt-related transcription factor; translocated to 1 (cyclin related) |
| ETS           | E-twenty six  |
| FAB           | French-American-British pracovní skupina                              |
| Fas           | TNF receptor superfamily, member 6, CD95                              |
| FBS           | fetal bovine serum (fetální bovinní sérum)                            |
| FLT3          | fms (Feline McDonough Sarcoma) - related tyrosine kinase 3            |
| Fos           | FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog                        |
| fwd           | forward (přímý)   |
| GAPDH         | glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase                              |
| GZMB          | granzym B   |
| H3K27me3      | trimethylace lysinu 27 na histonu 3                                   |
| H3K4          | histon 3 lysin 4  |
| HEX           | hematopoietically expressed homeobox                                  |
| HOM geny      | homeotické geny   |
| HOX geny      | homeoboxové geny  |
| HSC           | hematopoietic stem cell (hematopoetická kmenová buňka)                |

|                     |  |
|---------------------|--|
| Id2                 | Inhibitor of DNA binding 2                                     |
| ITD                 | internal tandem duplication (vnitřní tandemová duplikace)      |
| JMJD3 (KDM6B)       | lysine (K)-specific demethylase 6B                             |
| JNK                 | c-Jun N-terminal kinase  |
| Jun                 | jun proto-oncogene   |
| KIT                 | kit oncogene   |
| MDS                 | myelodisplastický syndrom                                      |
| MEIS1               | myeloid ecotropic viral integration site 1                     |
| MEK                 | MAPK/ERK kinase  |
| miRNA               | micro RNA  |
| MLL                 | mixed lineage leukemia   |
| MLLT2 (AF4)         | myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia; translocated to, 2 |
| MLLT3 (AF9)         | myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia; translocated to, 3 |
| MYH11               | myosin, heavy polypeptide 11, smooth muscle                    |
| NUP98               | Nucleoporin 98 kDa   |
| p14 (ARF)           | alternate reading frame  |
| p15 (CDKN2B)        | Cyclin-dependent kinase inhibitor 2B                           |
| p21 (CDKN1A)        | Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A                           |
| p38 MAPK            | p38 Mitogen-activated protein kinase                           |
| p53 (TP53)          | tumor protein p53  |
| Pai-1               | Plasminogen activator inhibitor-1                              |
| PBS                 | phosphate buffered saline (fosfátový pufr)                     |
| PBX                 | pre-B-cell leukemia homeobox                                   |
| PcG geny            | Polycomb group genes   |
| PI3K                | Phosphoinositide 3-kinase                                      |
| PMA                 | forbol-12-myristát-13-acetát                                   |
| PML                 | promyelocytic leukemia   |
| PMSF                | phenylmethanesulfonylfluoride                                  |
| PRC                 | Polycomb repressive complex                                    |
| PREP1/KNOX1(PKNOX1) | PBX/knotted 1 homeobox 1                                       |
| PTPN11              | protein tyrosine phosphatase, non-receptor 11                  |
| qRT-PCR             | kvantitativní PCR v reálném čase                               |
| RA                  | retinoic acid (kyselina retinová)                              |
| RAR                 | retinoic acid receptor   |
| RAS                 | RASA1 p21 protein activator                                    |
| rev                 | reverse (reverzní)   |
| RPMI                | Roswell Park Memorial Institute                                |
| SDS                 | sodium dodecyl sulfáte (dodecylsulfát sodný)                   |
| STAT5               | Signal transducer and activator of transcription 5             |
| TALE doména         | three-amino-acid-loop-extension                                |
| TEL (ETV6)          | ets variant 6  |
| TEMED               | N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine                           |

|             |   |
|-------------|---|
| TGFβ        | transforming growth factor, beta 1                          |
| TPP         | Techno Plastic Products                                     |
| TSS         | transcription start site (počáteční místo transkripce)      |
| UTX (KDM6A) | lysine (K)-specific demethylase 6A                          |
| WHO         | World health organization (Světová zdravotnická organizace) |

# 1 Úvod

Pojem leukémie, který pravděpodobně pochází z řeckého leukos haima a je překládán jako bílá krev, označuje maligní transformaci hematopoetických tkání. Poprvé byl pojem leukémie (v originále Leukämie) použit R. Virchovem již v roce 1849. Od té doby zaznamenal výzkum tohoto závažného onemocnění včetně léčebných postupů výrazně pozitivní vývoj, což se projevilo zejména v podobě vyššího přežívání a případně úplného vyléčení pacientů s leukémií.

U zdravého jedince při hematopoéze (vývoji krevních buněk) pluripotentní hematopoetické kmenové buňky (HSC) proliferují a diferenciují ve dvě buněčné linie: myeloidní a lymfoidní. Konečným stádiem diferenciací myeloidní linie jsou erythrocyty, granulocyty, monocyty a trombocyty. Naopak diferenciací lymfoidní linie vznikají B a T lymfocyty. U pacientů s diagnostikovanou leukémií je zmiňovaný vývoj krevních buněk v určitém stádiu blokován a blasty jsou pak šířeny do krve, lymfatických uzlin, jater a jiných orgánů (Mayer, Starý et al 2002).

Nádorová onemocnění u dětí oproti dospělým jsou velmi vzácná, přičemž leukémie patří mezi nejčastější malignity dětského věku (Stiller, 2004). Tato práce je zaměřena zejména na akutní myeloidní leukémii (AML), která je nejčastěji se vyskytujícím typem leukémie u dospělých pacientů, u nichž je medián věku při diagnóze 65 let. Incidence tohoto onemocnění roste s věkem. U dětských pacientů tvoří AML 15 - 20% diagnostikovaných akutních leukémií a je považována za vysoce morfologicky heterogenní skupinu onemocnění (Mayer, Starý et al 2002).

Při výzkumu leukémie jsou nejvíce zkoumány geny a jejich proteinové produkty, které se podílejí na jejím vzniku, a to jak přímo, tak i nepřímo regulací jiných iniciátorů. Mezi takové geny patří rovněž vysoce evolučně konzervovaná rodina homeoboxových (*HOX*) genů, jejichž proteinové produkty (transkripční faktory) regulují transkripci cílových genů. *HOX* geny jsou známé zejména díky regulaci předozadní osy těla obratlovců. Důležitou roli však mají také při vývoji krevních buněk neboli hematopoéze. Deregulovaná exprese homeoboxových genů byla detekována u řady leukémií, což naznačuje vliv těchto genů na leukemogenezi (Ayton & Cleary, 2003; Fischbach et al., 2005; Kroon et al., 2001; Sauvageau et al., 1997).

Mezi *HOX* geny patří mj. genová rodina *DLX* (Distal-less homeobox), u níž byla prokázána regulační funkce řady dějů při vývoji těla obratlovců jako jsou hematopoéza

(Chiba et al., 2003), neurogeneze (Anderson et al., 1997), vývoj chrupu (Thomas et al., 1997) nebo sítnice (de Melo et al., 2005). Aberantní exprese některých *DLX* genů zapojených do embryonálního vývoje byla detekována u řady solidních nádorů (Morini et al., 2010) a leukémií (Haga et al., 2000). Tato práce je zaměřena na gen *DLXI*, u kterého se předpokládá možný vliv na vznik a vývoj leukémie. Konkrétně je v této práci zkoumána regulace exprese genu *DLXI* transkripčním faktorem AP-1, jehož regulační vazebné místo se vyskytuje v promotoru genu *DLXI*. K analýze uvedené regulace byl využit experimentální systém na neleukemických buněčných liniích HeLa a HEK293, u kterých je detekována vysoká endogenní exprese genu *DLXI*. Experimentální část této práce navazuje na článek školitelky doktorky Starkové (Starkova et al., 2011) a je součástí rozsáhlejšího projektu Transkripční regulace *HOX* genů v normální a leukemické krvetvorbě, financovaného Grantovou agenturou České republiky (GAČR – č. P304/12/2214).

## 2 Cíle práce

- **Stanovení hladiny exprese genu *DLX1* po inhibici vybraných signálních drah ovlivňujících expresi *DLX1* na mRNA a proteinové úrovni**
  - Ověření funkčnosti použitých inhibitorů
  - Stanovení hladiny exprese genu *DLX1* po inhibici vybraných signálních drah na mRNA úrovni
  - Stanovení hladiny exprese genu *DLX1* po inhibici vybraných signálních drah na proteinové úrovni
- **Vytvoření konstruktů pro luciferázovou esej**
  - Konstrukt obsahující krátkou část promotoru (200 bp) pGL3\_AP1 v divoké a mutované formě AP-1 vazebného místa
  - Konstrukt obsahující dlouhou část promotoru (1605 bp) pGL3\_wpDLX1 v divoké a mutované formě AP-1 vazebného místa
- **Ověření hypotézy o předpokládané regulaci exprese genu *DLX1* (přes ERK/JNK dráhu) probíhající přes AP-1 vazebné místo na promotoru pomocí metody duální luciferázová esej**
  - Kontrola funkce příslušného inhibitoru a aktivátoru dráhy ERK pro luciferázovou esej
  - Stanovení hladiny luciferázy u kontrolního vektoru s repetitivním AP-1 vazebným místem
  - Stanovení hladiny luciferázové aktivity pod vlivem krátké části promotoru genu *DLX1*
  - Stanovení hladiny luciferázové aktivity pod vlivem dlouhé části promotoru genu *DLX1*

## 3 Přehled literatury

### 3.1 Leukémie

#### 3.1.1 Vznik leukémie na molekulární úrovni

Předpokládaná teorie vzniku leukémií i ostatních nádorů je označovaná jako vícestupňová. Tato teorie popisuje vznik maligní buňky jako proces o několika krocích, ve kterých jsou díky jednotlivým změnám genomu pozitivně selektovány preleukemické buňky, z nichž se postupně tvoří buňky leukemické. Takto změněné hematopoetické buňky se v určitém vývojovém stádiu zastaví, neplní svoji funkci a postupně vytěsňují zdravou populaci krevních buněk. Leukemické buňky se vyznačují, tak jako ostatní nádorové buňky, několika typickými znaky: ztrátou schopnosti diferenciaci při zachované proliferaci, defekty apoptózy vedoucími k prodloužení doby života, nezávislostí na vnějších růstových faktorech, defektním přenosem buněčných signálů (Mayer, Starý et al 2002).

Mutace v genomu důležité pro vývoj leukemických buněk se týkají z velké části jak protoonkogenů, tak i antionkogenů. Oba typy genů mají velký význam pro vývoj normální zdravé buňky. Protoonkogeny jsou nezbytné pro regulaci a stimulaci buněčné proliferace, zatímco antionkogeny proliferaci buněk tlumí a zároveň podporují diferenciaci a apoptózu. Mutované protoonkogeny neboli onkogeny se vymaní z buněčné regulace, nebo se exprimují v nadbytku, což způsobí nekontrolovatelně zvýšenou proliferaci buněk. Mutace v antionkogenech vedou k jejich inaktivaci, což výrazně podpoří proliferaci a současně utlumí buněčnou diferenciaci a apoptózu. Pro vyřazení antionkogenů je třeba mutace v obou alelách genu nazývaná jako mutace recesivní. Naopak k inaktivaci protoonkogenů dochází již mutací v jedné alele (tzv. dominantní mutace) (Mayer, Starý et al 2002).

### 3.2 Rozdělení leukémií

Leukémie se dělí podle průběhu onemocnění a podle buněčné linie hematopoetických buněk, ze kterých vycházejí. Primární členění dle průběhu rozděluje leukémie na akutní a chronické. Pro akutní leukémie je typický prudký nástup, často bez jakékoli hematologické anamnézy. Chronické leukémie se u dětí vyskytují pouze zřídka, mají pomalejší průběh, který je charakterizovaný třemi stádii: chronickou fází, akcelerací a blastickou krizí. Zatímco u akutních leukémií jsou ve své funkci blokovány zejména plně nezralé a nediferenciované

buňky, u chronických leukémií jsou postiženy spíše buňky ve vyšším stádiu diferenciaci (Mayer, Starý et al 2002).

### 3.2.1 Akutní leukémie

Akutní leukémie jsou heterogenní skupinou hematologických malignit. Akutní leukémie se dělí podle původu buněčné linie na lymfoidní (ALL) a myeloidní (AML). Hlavním úkolem pro diagnostiku je správné rozlišení ALL a AML, a to zejména s ohledem na následnou léčbu tohoto onemocnění. Základní kritéria pro rozlišení shrnuje tabulka (viz tab. 3.1). Diagnóza tohoto onemocnění je stanovena na základě vyšetření vzorku kostní dřeně a periferní krve. Pro přesné určení a zařazení do konkrétního subtypu akutní leukémie je prováděna cytogenetická, imunologická, molekulárně genetická a morfologická analýza maligně transformovaných buněk (Mayer, Starý et al 2002).

Ačkoli nebyla dosud zcela objasněna patogeneze vzniku akutních leukémií, všeobecně se nepředpokládá, že by bylo onemocnění dědičné. Častější výskyt akutních leukémií je však asociovan s hereditálními chromozomálními poruchami jako jsou Downův syndrom (Fong & Brodeur, 1987), Bloomův syndrom (Poppe et al., 2001), ataxia-telangiectasia (Yamada et al., 1998) nebo Fanconioho anémie (Rochowski et al., 2012).

Pacienti s diagnostikovanou akutní leukémií jsou zařazeni do jednotlivých rizikových skupin. Průběh onemocnění a riziko vzniku relapsu se u rizikových skupin velmi odlišuje. Stratifikace pacientů do rizikových skupin má tak zásadní význam pro zvolení správného typu a intenzity léčby tohoto onemocnění. Rozdělení pacientů do jednotlivých rizikových skupin probíhá na základě prognosticky významných znaků, a to jak u ALL (Pui et al., 2004), tak u AML (Kaspers & Zwaan, 2007).

|                     | ALL  | AML  |
|---------------------|--|--|
| <b>morfologie</b>   | žádná granula<br>žádné Auerovy tyče  | obvykle se mohou vyskytovat<br>Auerovy tyče  |
| <b>imunofenotyp</b> | B-řada: CD 19+, CD10+<br>T-řada: cyCD3+, CD7+  | panmyeloidní antigeny<br>CD13+, CD33+, CD65  |
| <b>karyotyp</b>     | t(8;14) (B-ALL)<br>t(9;22)<br>t(1;19) (pre- B-ALL)<br>t(11;14) (T-ALL)<br>t(4;11) (pro- B-ALL) | t(8;21) (FAB M2)<br>t(15;17) (FAB M3)<br>t(9;11) (FAB M5)<br>inv(16) (FAB M4eo)<br>monozomie 7<br>trizomie 8 |

Tab. 3.1: Rozdílné znaky AML a ALL (převzato z Mayer, Starý et al 2002)

### 3.2.1.1 Akutní myeloidní leukémie

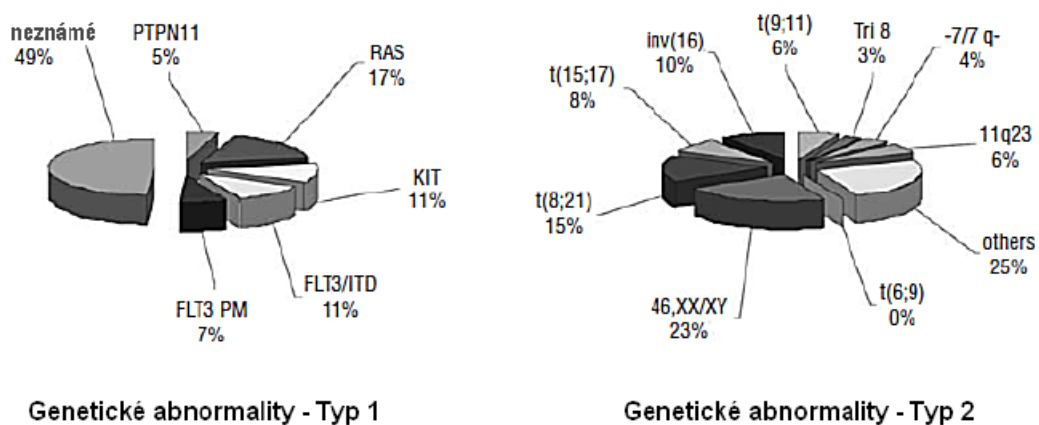
AML postihuje erythroidní, granulocytární, monocytární a megakaryocytární hematopoetickou řadu. Z tohoto důvodu byla AML v roce 1976 rozdělena do 8 subtypů, které navrhla French-American-British (FAB) pracovní skupina (Bennett et al., 1976). Ačkoli v roce 2002 navrhla Světová zdravotnická organizace (WHO) rozdělení subtypů AML hlavně na základě cytogenetických charakteristik (Vardiman et al., 2002), dodnes se v praxi používá starší rozdělení dle FAB (viz tab. 3.2)

| FAB Subtyp    | Charakteristika  | Zastoupení |
|---------------|--|------------|
| <b>AML M0</b> | akutní leukémie s minimálními známkami myeloidní diferenciaci (tzv. časná myeloidní leukémie)                                    | 3 %        |
| <b>AML M1</b> | akutní myeloidní leukémie bez vyzrávání  | 15 – 20 %  |
| <b>AML M2</b> | akutní myeloidní leukémie s vyzráváním   | 25 – 30 %  |
| <b>AML M3</b> | akutní promyelocytární leukémie (APL), do této skupiny patří také podskupina <b>AML M3v</b> – variantní mikrogranulární leukémie | 5 – 10 %   |
| <b>AML M4</b> | akutní myelomonocytární leukémie, subtypem této skupiny je varianta <b>AML M4eo</b> s eozinofilií                                | 25 – 30 %  |
| <b>AML M5</b> | akutní monocytární leukémie  | 6 %        |
| <b>AML M6</b> | Erytroleukémie   | 3 – 5 %    |
| <b>AML M7</b> | akutní megakaryoblastická leukémie   | 3 %        |

Tab. 3.2: Subtypy AML podle FAB rozdělení

Tak jako pro ALL jsou i pro AML (více než dvě třetiny případů) typické některé numerické a strukturální chromozomální aberace. Všechny tyto genetické abnormality lze obecně rozdělit do dvou skupin, tj. na typ 1 a 2 (viz obr. 3.1). Pro první skupinu abnormalit jsou typické mutace v genech, které dávají buňkám proliferační výhodu. Mezi takové geny patří receptorové kinázy (*FLT3* – fms (Feline McDonough Sarcoma) - related tyrosine kinase 3), fosfatázy (*PTPN11* – protein tyrosine phosphatase, non-receptor 11) nebo onkogeny (*KIT* – kit oncogene, *RAS* – RASA1 p21 protein activator (GTPase activating protein) 1). Translokace zahrnující geny pro transkripční faktory, které způsobují v translokované formě

aberrantní expresi cílových genů, jsou charakteristické pro druhý typ genetických abnormalit (Kaspers & Zwaan, 2007).



Obr. 3.1: Frekvence zastoupení typických abnormalit u AML

Nejčastější translokací detekovanou u AML je t(8;21)(q22;q22) s fúzním genem *AML1*(*RUNX1* - runt-related transcription factor 1) /*ETO* (*RUNX1T1* - runt-related transcription factor; translocated to 1(cyclin related)). Fúzní gen *AML1/ETO* odpovídající M2 subtypu AML bývá spojován s dobrou prognózou (Rulina et al., 2010). Produkt tohoto fúzního genu je aberantním transkripčním faktorem s korepresorovou částí, který reguluje diferenciaci prekurzorů myeloidní řady. Bylo prokázáno, že fúzní protein *AML1/ETO* se přímo váže na promotorovou oblast tumor supresorového genu *p14* (*ARF* – alternate reading frame), čímž inhibuje jeho transkripci. Předpokládá se, že *p14* mající důležitou roli v p53 dependentní odpovědi, by mohl být rozhodujícím tumorsupresorovým genem u řady leukémií (Linggi et al., 2002).

Subtypy M4 a M5 AML jsou asociovány s translokacemi genu *MLL* (11q23). Nejčastější translokací, která má zároveň nejprůzračnější prognózu, je t(9;11)(p22;q23) s fúzním genem *MLL/AF9*. Translokace genu *MLL* bývají často spojeny se vznikem sekundárních AML vznikajících jako odpověď na léčbu inhibitory topoisomérázy II (Super et al., 1993). Translokovaná oblast genu *MLL* je hypersenzitivní k Dnáze I, a tudíž náchylná ke zlomům DNA, což může spolu s inhibicí topoisomérázy II vést ke vzniku translokací. Pro vznik translokací je pravděpodobně důležitá také bezprostřední blízkost genu *MLL* s častými translokačními partnery jako *AF9* a *AF4*, které sdílejí transkripční jádro (Cowell et al., 2012).

Relativně dobrá prognóza AML je spojována s inverzí chromozomu 16 inv(16)(p13q22) s fúzním genem *CBFβ* (core-binding factor β)/*MYH11* (myosin, heavy

polypeptide 11, smooth muscle). Bylo prokázáno, že tato inv(16) a druhá varianta translokace t(16;16)(p13;q22) kódují skupinu heterogenních fúzních proteinů, které se částečně liší i ve své biologické aktivitě (Shurtleff et al., 1995). Fúzní gen *CBFβ/MYH11* je detekován u subtypů M0, M1, M2 a M5 AML, avšak nejčastěji je jeho přítomnost spojována se subtypem M4 AML s abnormální eozinofilií.

Akutní promyelocytární leukémie (APL) odpovídající subtypu M3 AML je charakteristická translokací t(15;17)(q22;q12-22) s fúzním genem *PML* (promyelocytic leukemia)/*RARα* (retinoic acid receptor α). Prekurzory krevních buněk jsou zastaveny v promyelocytárním stádiu, kdy působením *PML/RARα* dochází k blokaci diferenciaci a zároveň k podpoře přežívání buněk (Ferrucci et al., 1997). Bylo prokázáno, že promotor genu *RARα* je v translokované formě *PML/RARα* methylován. Na deregulaci exprese *RARα* se tedy podílí jak translokace, tak i methylace v promotorové oblasti (Chim et al., 2005).

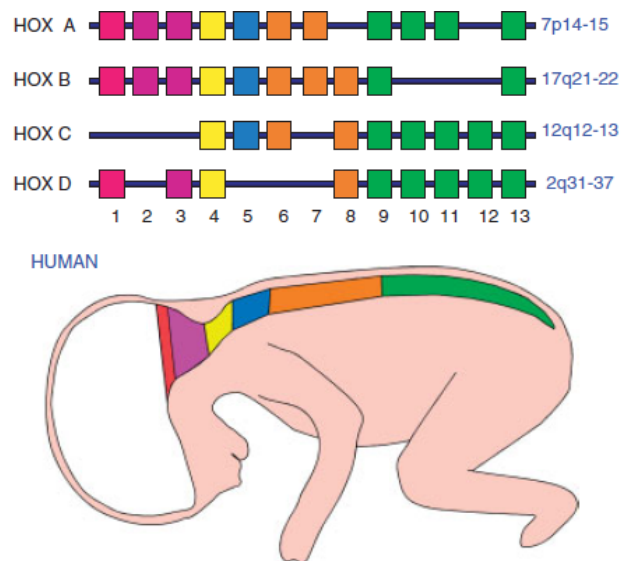
U pacientů s AML se vyskytují mutace genu *FLT3* kinázy, která je běžně exprimována zejména v časných progenitorech hematopoézy. Nejčastější mutací *FLT3* spojenou s nepříznivou prognózou AML je *FLT3/ITD* (internal tandem duplication), která blokuje myeloidní diferenciaci. U AML byly identifikovány také bodové mutace *FLT3* kinázy v oblasti ALM (activation loop domain). Příkladem takové mutace je mutace v kodonu 835 (D835), ke které dochází nezávisle na *FLT3/ITD*. Aktivační mutace D835 vykazující konstitutivní fosforylaci na tyrosinech jsou asociovány s nízkou hladinou přežití bez relapsu (Yamamoto et al., 2001).

### 3.3 Homeoboxové geny

Homeoboxové (*HOX*) geny jsou považovány za vysoce evolučně konzervovanou rodinu genů, která se účastní ontogeneze obratlovců. U savců byla identifikována řada *HOX* genů, rozdělených do dvou tříd. Třída I reprezentuje skupinu 39-ti klastrovaných *HOX* genů (clustered *HOX* genes) uskupených do čtyř klastrů. Klastry se nacházejí na 4 různých chromozomech: klastr A na chromozomu 7, klastr B na chromozomu 17, klastr C na chromozomu 12 a klastr D na chromozomu 2. Další třída *HOX* genů, třída II, je naopak tvořena *HOX* geny rozptýlenými po celém genomu. Tyto neklastrované *HOX* geny (non-clustered *HOX* genes), čítající stovky genů, vykazují vysokou variabilitu. Obě tyto třídy *HOX* genů kódují transkripční faktory regulující transkripci řady cílových genů. Tyto transkripční faktory obsahují specifickou 60-ti aminokyselinovou DNA vazebnou doménu, která tvoří motiv helix-turn-helix (Argiropoulos & Humphries, 2007; Grier et al., 2005).

*HOX* geny jsou považovány za velmi důležité v souvislosti s vývojem těla obratlovců. Jejich klíčová role byla popsána v regulaci vývoje anterior-posteriorní osy těla během embryogeneze. Rozšíření funkce *HOX* genů během evoluce způsobilo jejich vliv také na regulace pozdějších stádií vývoje jako je hematopoéza (Argiropoulos & Humphries, 2007) nebo vývoj genitálií (Dollé et al., 1991).

Klastrované *HOX* geny obratlovců vykazují vysokou homologii s klastrovanými homeotickými geny (*HOM-C*) *Drosophily melanogaster*. Sekvence těchto homologních genů je konzervována jak na nukleotidové, tak na chromozomální úrovni. Předpokládá se, že *HOX* geny u obratlovců vznikly duplikací a divergencí. Zůstalo však zachováno směřování exprese těchto genů. Umístění *HOX* genů v klastrech koreluje s pořadím jejich exprese. Anteriorní geny umístěné na 3' konci jsou exprimovány dříve než posteriorní geny, které jsou lokalizovány na 5' konci (viz obr. 3.2). Pro správný embryonální vývoj, a to zejména pro vývoj anterior-posteriorní osy těla, je toto načasování nezbytné. Exprese 3' genů se během embryogeneze postupně snižuje, zatímco exprese genů na 5' konci se zvyšuje (Grier et al., 2005; Mallo et al., 2010).



Obr. 3.2: Exprese *HOX* genů ve vývoji anterior-posteriorní osy těla (převzato z Grier, 2005)

Některé neklastrované *HOX* geny hrají důležitou roli v organogenezi, hematopoéze a postupné diferenciaci některých tkání. Mezi takové geny se řadí také genová rodina *DLX* (Distal-less homeobox), *HEX* (hematopoietically expressed homeobox), *CDX2* (caudal type homeobox 2) a další. Jejich deregulovaná exprese často vede k malignizaci příslušných tkání. Snížená exprese genu *CDX2* je asociována s výskytem kolorektálního karcinomu (Mallo et

al., 1997). Naopak zvýšená exprese genu *HEX* byla detekována u T buněčného lymfomu (George et al., 2003).

Řada neklastrovaných *HOX* genů, exprimujících se během embryonálního vývoje, působí jako regulátory proteinů kódovaných klastrovanými *HOX* geny. Mezi takové neklastrované *HOX* geny kódující proteiny s TALE doménou (three-amino-acid-loop-extension) patří *PBX* (pre-B-cell leukemia homeobox), *MEIS1* (myeloid ecotropic viral integration site 1) a *PREP1/KNOX1* (*PKNOX1*-*PBX*/knotted 1 homeobox 1). Protein-proteinové interakce mezi produkty těchto genů a transkripčními faktory kódovanými klastrovanými *HOX* geny zásadně ovlivňují vývoj organismu determinací vazby na DNA cílových genů (Penkov et al., 2013).

Exprese *HOX* genů je ovlivňována dalšími nehomeoboxovými regulátory jako je *MLL*, *RA* (retinoic acid), proteiny skupiny *PcG* (Polycomb group), *JMJD3* (*KDM6B* - lysine (K)-specific demethylase 6B) a *UTX* (*KDM6A* - lysine (K)-specific demethylase 6A). Produkt genu *MLL* je *H3K4* (histon 3 lysin 4) specifická methyltransferáza, stimulovaná acetylací na histonu H3. Methylace *H3K4* a acetylace na H3 v promotorových sekvencích pak působí jako aktivační značka pro expresi *HOX* genů (Milne et al., 2002). Bylo prokázáno, že pro aktivaci transkripce genů z klastru *HOXA* a *HOXB* je nezbytná signalizace *RA* přes receptor *RAR $\gamma$*  (retinoic acid receptor  $\gamma$ ) nebo přes 3' *RA*-response element na genu *HOXA1*. Pokud tato vazebná místa pro *RA* chybí, nedochází k odstranění inhibiční methylační značky *H3K27me3* (trimethylace lysinu 27 na histonu 3), a tudíž ani k aktivaci transkripce genů *HOXA* a *HOXB* (Kashyap et al., 2011). Důležitými regulátory exprese *HOX* genů jsou také komplexy *PRC1* a *PRC2* (Polycomb repressive complex) kódované geny skupiny *PcG*, které hrají roli v umlčení a represi chromatinu. Komplex *PRC2* má methyltransferázovou aktivitu vedoucí k trimethylaci lysinu 27 na histonu H3 (inhibiční methylační značka), což způsobí dlouhodobou represi exprese *HOX* genů. *H3K27me3* vytvoří vazebná místa pro chromo-domény komplexu *PRC1* katalyzující mono-ubiquitinaci na histonu H2A, která je nezbytná pro kondenzaci chromatinu a umlčení řady genů (Cao et al., 2002). Bylo však prokázáno, že tato epigenetická změna katalyzovaná *PRC1* je pro umlčení exprese *HOX* genů postradatelná (Endoh et al., 2012). Exprese *HOX* genů je ovlivněna také histon *H3K27* demethylázami *JMJD3* (*KDM6B* - lysine (K)-specific demethylase 6B) a *UTX* (*KDM6A* - lysine (K)-specific demethylase 6A). Byly podány důkazy, že *UTX* se váže přímo na lokus *HOXB1* a je nezbytný pro jeho aktivaci (Agger et al., 2007). Mezi další regulátory exprese *HOX* genů patří také nekódující RNA. Z lokusu *HOX C* je přepisována nekódující RNA, nazývaná *Hotair*, která způsobuje inhibici transkripce ve vzdálenosti až 40 kbp na lokusu

*HOX D*. Hotair se váže na PRC2, kde působí jako nezbytný faktor pro správnou funkci této methyltransferázy zajišťující umlčení transkripce na lokusu *HOX D* (Rinn et al., 2007). Posttranskripčně může být exprese *HOX* genů inhibována pomocí specifických miRNA. Jednou z nich je i miR-196, která způsobuje specifické štěpení mRNA *HOXB8*. Zmiňovaná miR-196, která je přepisována ze tří paralogních míst lokusů *A*, *B* a *C HOX* genů, obsahuje evolučně konzervovanou komplementární sekvenci k transkriptům *HOXB8*, *HOXC8* a *HOXD8* (Yekta et al., 2004).

### 3.3.1 *HOX* geny v hematopoéze

*HOX* geny hrají důležitou roli také ve vývoji krevních buněk, neboli hematopoéze. *HOX* geny jsou exprimovány zejména během vývoje HSC (hematopoietic stem cell, hematopoetická kmenová buňka), u nichž bývá detekována výrazně vyšší exprese těchto genů než u diferenciovaných krevních buněk. Během vývoje krevních buněk se tedy exprese *HOX* genů postupně snižuje. Stejně jako u vývoje anterior-posteriorní osy těla obratlovců, tak i při vývoji krevních buněk je důležité načasování exprese v souvislosti s umístěním zmiňovaných genů. Nejprve dochází k expresi genů na 3' konci, jejichž exprese se postupně snižuje. Zároveň dochází k postupnému zvyšování exprese genů na 5' konci (Argiropoulos & Humphries, 2007).

Pro objasnění role *HOX* genů v hematopoéze byla např. analyzována exprese několika lokusů lidských *HOX* genů u buněčných linií představujících 3 různé fáze diferenciace krevních buněk – erythroleukemické, promyelocytární a monocytární linie buněk. *HOX4* lokus byl umlčen u všech zkoumaných linií, zatímco lokus *HOX2* byl aktivován u erythroleukemické buněčné linie. Tato studie podporuje hypotézu o důležitosti přesné koordinace exprese *HOX* genů na počátku hematopoézy (Magli et al., 1991). Dále bylo prokázáno, že gen *HOXB6* je exprimován v erythroidních buňkách, ne však v hematopoetických ani nehematopoetických HSC. Proto se předpokládá, že *HOXB6* je typickým markerem pro erythroidní linii (Zimmermann & Rich, 1997). Vliv *HOX* genů na vývoj různých hematopoetických linií byl prokázán pro řadu těchto genů. Např. geny *B2*, *B4*, *B6-B9*, *C6*, *C8* a *A5* byly popsány jako regulátory erythropoézy, zatímco mezi geny kontrolující vývoj myelomonocytární řady patří spíše geny *A9*, *A10*, *B3*, *B7* a *B8* (Magli et al., 1997). Pro vývoj lymfoidních buněk je pravděpodobně důležitý gen *A5*, exprimovaný již v časných lymfoidních prekurzorech, a *C5*, který je exprimovaný spíše u zralých buněčných linií (Bijl et al., 1996). Ačkoli není role *HOX* genů doposud zcela objasněna, bylo prokázáno,

že celkově zvýšená exprese těchto genů měla vliv na blokování diferenciací lymfocytů, erythrocytů a tvorbu myeloproliferativních poruch (Argiropoulos & Humphries, 2007).

### 3.3.2 HOX geny v patogenezi

V řadě studií byl prokázán vliv deregulované exprese *HOX* genů na maligní transformaci některých buněk (Cantile et al., 2012; Kovichich et al., 2013; Zhang et al., 2013). Zatím se nepodařilo objasnit, zda mají *HOX* geny přímý vliv na vznik buněčných neoplastických změn, nebo jsou pouze jejich vedlejšími efekty. Vzhledem ke skutečnosti, že *HOX* geny jsou exprimovány zejména během embryogeneze a jejich aberantní exprese je zároveň detekována u řady solidních nádorů a hematologických malignit, lze tvrdit, že tyto geny jsou spojovacím můstkem mezi normálním vývojem a maligní transformací některých buněk.

U různých typů leukemií byla prokázána asociace s aberantní expresí určitých *HOX* genů. U *HOX* genů klastru A je nejvýznamnějším genem v souvislosti s leukemogenezí gen *HOXA9*. Zvýšená exprese tohoto genu je popsána u MLL asociovaných myeloidních leukemií, kde se předpokládá jeho působení zejména na počáteční fázi maligní transformace (Ayton & Cleary, 2003). U genu *HOXA9* byla také prokázána korelace se špatnou prognózou u AML (Golub et al., 1999). Vliv genu *HOXA10* na leukemogenezi byl zkoumán na myších s retrovirově zvýšenou expresí tohoto genu. U těchto myší byl prokázán vznik AML (Thorsteinsdottir et al., 1997). Zvýšená exprese genů *HOXA10* a *HOXA11* byla nalezena také v podskupině T prekurzorových ALL, která se vyznačuje inverzí inv(7)(p15q34) (Speleman et al., 2005).

Mezi zástupce *HOX* genů klastru B asociovaných se vznikem leukemií patří *B3*, *B4* a *B6*. Zatímco zvýšená exprese *HOXB3* v myší kostní dřeni vedla až k indukci myeloproliferativní poruchy (Sauvageau et al., 1997), zvýšení exprese *HOXB4* nevedlo ke vzniku leukémie ani po expanzi HSC (Beslu et al., 2004). Pokud byla v myší kostní dřeni zvýšena exprese genu *HOXB6*, docházelo k nárůstu proliferace hematopoetických prekurzorů, což vedlo až ke vzniku AML s poměrně dlouhou latentní fází (Fischbach et al., 2005).

*HOX* geny klastru C jsou exprimovány spíše u lymfoidní linie hematopoetických buněk. Exprese genu *HOXC5* bývá detekována v souvislosti s non-Hodgkinským lymfomem. Z výsledků studií na tomto genu se předpokládá, že *HOXC5* se přímo podílí na vzniku lymfomu (Bijl et al., 1996).

U řady leukemií jsou *HOX* geny detekovány jako součást translokací, jejichž produktem jsou fúzní proteiny. Nejznámějším fúzním proteinem je NUP98 (Nucleoporin 98

kDa)/HOXA9, produkt translokace t(7;11)(p15;p15), který je typický zejména pro AML a MDS (Slape & Aplan, 2004). U AML a MDS byl tento fúzní protein popsán jako odpovědný za němou preleukemickou fází myeloproliferativního onemocnění (Kroon et al., 2001). Fúzní protein NUP98/HOXA9 byl rovněž prokázán v souvislosti s výskytem CML, kde pravděpodobně způsobuje ztrátu diferenciace myeloidních prekurzorů, a tudíž i transformaci do fáze blastické krize (Yamamoto et al., 2000). Gen *NUP98* je translokačním partnerem celé řady dalších *HOX* genů jako je *A11*, *A13*, *C11*, *C13* a *D13*, s nimiž se ve formě fúzního proteinu pravděpodobně také podílí na leukemické transformaci hematopoetických buněk (Pineault et al., 2004).

Předpokládá se, že aberantní exprese *HOX* genů nebo jejich translokace s jinými geny jsou odpovědné za udržování proliferace a sebeobnovy buněk, což může být důležitý, ale zdaleka ne postačující krok k rozvoji leukémie. Protože jsou *HOX* geny detekovány u řady typů leukémií, lze předpokládat jejich budoucí využití jako potenciálního cíle leukemických terapií nebo jako možného prognostického faktoru především u leukémií s nejasnou prognózou. Tuto hypotézu potvrzují dvě studie zaměřené na sledování exprese *HOX* genů pomocí qRT-PCR (kvantitativní PCR v reálném čase) u pacientů s diagnostikovanou akutní leukémií. V první studii byla sledována exprese *HOX* genů klastru A a B u dospělých AML pacientů se známou cytogenetickou prognózou. V tomto případě byla pozorována korelace nízké exprese vybraných *HOX* genů s dobrou cytogenetickou prognózou (Drabkin et al., 2002). Při druhé studii byli naopak předmětem zkoumání dětské ALL pacienti, u nichž se analyzovala exprese genů *HOXA*, *HOXB* a *CDX1/2*. Ve druhém případě byla dobrá prognóza s úplným přežitím bez relapsu (relapse free survival) spojena s vysokou hladinou *HOXA* genů (Starkova et al., 2010).

### 3.3.3 DLX

*DLX* (Distal-less homeobox) je genovou rodinou, která patří do skupiny neklastrovaných *HOX* genů. Tato genová rodina, jejíž součástí je i gen *DLX1*, je homologní k rodině genů *DLL* (Distal-less gene), zodpovědných za komplexní kontrolu vývoje předozadní osy těla *Drosophily melanogaster* (Cohen & Jurgens, 1989). Gen *DLX1*, jehož délka je zhruba 14kbp, leží na dlouhém raménku chromosomu 2 blízko klastru *HOX D* (McGuinness et al., 1996). Tento gen se spolu s dalšími členy z rodiny *DLX* účastní kontroly vývoje těla savců. Rodina *DLX* genů, která pravděpodobně vznikla duplikací z původního genového páru *DLX*, je obvykle uspořádaná v párech, do tandemové konfigurace a uskupení: *DLX1* a *DLX2*, *DLX3*

a *DLX7*, *DLX5* a *DLX6*. Výjimkou je gen *DLX4*, který se sice nachází v chromosomové oblasti jako *DLX3* a *DLX7*, ale nemá svého tandemového partnera (Ghanem et al., 2003).

Genová rodina *DLX* byla popsána jako regulátor neurogeneze. Původně byly tyto geny identifikovány ve vývoji předního mozku myšího embrya, avšak později byla prokázána také jejich role ve vývoji neuronů. Nepřítomnost genů *DLX1* a *DLX2* u myšího modelu způsobila inhibici migrace interneuronů (Anderson et al., 1997). Migrace interneuronů pomocí těchto genů je způsobena represí růstu axonů a dendritů (Cobos et al., 2007). Myší mutanty v genech *DLX1* a *DLX2* také vykazovaly defekty ve vývoji chrupu myši (Thomas et al., 1997). Funkce genů *DLX1* a *DLX2* byly dále popsány rovněž jako nezbytné součásti diferenciaci myší sítnice. Dvojitý knockout těchto genů způsobil úmrtí myši v neonatálním období (de Melo et al., 2005).

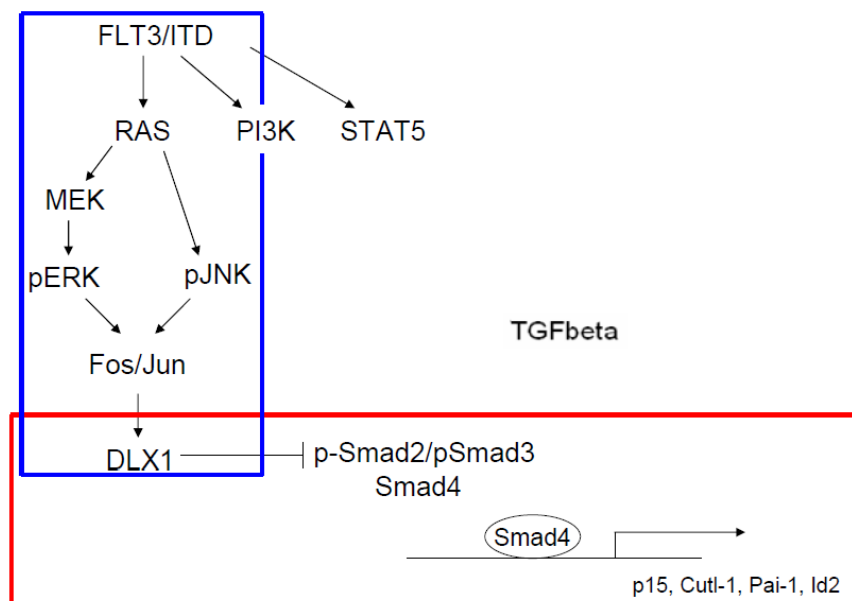
Aberantní exprese genové rodiny *DLX* byla identifikována ve spojení s řadou solidních nádorů. Gen *DLX4* je zesílen u některých epiteliálních ovarialních karcinomů, kde pravděpodobně navozuje růstovou stimulaci nádoru (Hara et al., 2007). Tento gen byl také spojen s příznivou prognózou u nádoru plic, kde je popisována jeho role v negativní regulaci tvorby metastáz (Tomida et al., 2007). Jako možné budoucí prognostické faktory rakoviny prsu by mohly sloužit další geny genové rodiny *DLX*, *DLX2* a *DLX5*, jejichž exprese se vzájemně vylučuje (Morini et al., 2010).

Genová rodina *DLX* se podílí rovněž na kontrole normální hematopoézy. Gen mého zájmu, *DLX1*, byl popsán jako negativní regulátor definitivní erythropoézy (Chiba et al., 2003). Podstatnou roli hraje genová rodina *DLX* pravděpodobně i ve vývoji leukémie. Nízká exprese genu *DLX4* byla detekována u buněk zdravé kostní dřeně, avšak u vzorků pacientů jak s AML, tak i ALL i byla hladina exprese tohoto genu výrazně zvýšena (Haga et al., 2000). U skupiny dětských B prekurzorových ALL, konkrétně u pacientů s fúzními geny *MLL/AF4* a *TEL/AML1*, byla zkoumána methylace v promotoru genu *DLX3*. Bylo prokázáno, že *DLX3* byl hypermethylován u pacientů s *MLL/AF4*, zatímco u pacientů s *TEL/AMI* nebyla methylace tohoto genu detekována. Methylace genu *DLX3* by tedy mohla sloužit jako epigenetický marker u vysoce rizikových podskupin ALL (Campo Dell'Orto et al., 2007).

### 3.3.3.1 *DLX1* spolu s *FLT3* a *TGFβ*

Gen *DLX1* byl v posledních letech charakterizován jako spojující článek mezi dráhou *FLT3* kinázy a dráhou *TGFβ* (viz obr. 3.3). Již dříve byla popsána inhibice *TGFβ* dráhy pomocí *DLX1* přímou vazbou na *Smad4* (Chiba et al., 2003). Později byla identifikována regulace exprese genu *DLX1* kinázou *FLT3* pomocí její aktivace a inhibice. Inhibice *FLT3*

vedla ke snížení hladiny DLX1, a naopak aktivace FLT3 způsobila zvýšení hladiny DLX1 u leukemických buněčných linií jak na proteinové, tak na mRNA úrovni. Tato korelace byla detekována také u pacientů s AML na proteinové úrovni (Starkova et al., 2011). Dále bylo prokázáno, že inhibiční drah ERK (extracellular-signal-regulated kinases) a JNK (c-Jun N-terminal kinase) (downstream od FLT3) došlo k výraznému snížení hladiny DLX1 na mRNA úrovni. Tyto dráhy aktivují, Fos a Jun, podjednotky transkripčního faktoru AP-1, který pravděpodobně nasedá na vazebné místo promotoru *DLX1* (Starkova et al., 2011). Právě regulace exprese genu *DLX1* přes AP-1 vazebné místo je předmětem studia méj diplomové práce.



Obr. 3.3: Předpokládané schéma propojení FLT3 a TGFβ přes DLX1

### 3.3.3.2 FLT3

Expres FLT3 (Fms-related tyrosin kinase 3) kinázy, neboli receptoru s intracelulární kinázovou doménou, je důležitá pro normální vývoj hematopoetických kmenových buněk. Během hematopoézy je FLT3 kináza exprimována zejména v časně hematopoéze u progenitorů s lymfoidním a myeloidním diferenciačním potenciálem (Adolfsson et al., 2005).

FLT3 kinázová dráha ovlivňuje proliferaci, diferenciaci i apoptózu hematopoetických buněk. Součástí této dráhy jsou geny aktivované FLT3 kinázou jako jsou ERK, JNK, PI3K (Phosphoinositide 3-kinase), p38 MAPK (p38 Mitogen-activated protein kinase), STAT5 (Signal transducer and activator of transcription 5) a další. STAT5 zahrnuje transkripční faktory s velmi podobným aminokyselinovým složením, tj. STAT5a a STAT5b, které jsou kódované různými geny. Tyto transkripční faktory se podílejí na buněčné proliferaci,

diferenciaci a apoptóze hematopoetických buněk (Grimley et al., 1999). MAPK kináza p38 negativně reguluje sebeobnovu HSC, zatímco bylo prokázáno, že inhibice p38 vede k expanzi HSC ex vivo (Wang et al., 2011). Významná role v hematopoéze je připisována PI3K kináze, která byla identifikována jako nezbytná součást vývoje B lymfocytů (Jou et al., 2002).

FLT3 dráha je trvale zapnutá u zhruba 30 % pacientů s AML, kteří mají mutaci FLT3/ITD (Internal tandem duplication). Tato mutace je u AML spojena se špatnou prognózou, vyšším rizikem relapsu a vyšší mortalitou (Thiede et al., 2002). Častý výskyt mutací FLT3 kinázy způsobující její konstitutivní aktivaci vedl k výzkumu řady FLT3 inhibitorů, u nichž se předpokládá potenciální terapeutické využití. Do dnešní doby bylo připraveno mnoho přímých inhibitorů FLT3 kinázy, které jsou nyní v různých stádiích testování. Mezi již klinicky testované inhibitory patří SU5416 (Sexamanib), SU11248 (Sunitinib), CEP701 (Lestaurtinib), PKC412 (Midosaurin), MLN-518 (Tandutinib), CHIR-258 (Dovitinib), ABT-869 (Linifanib) a KW-2449 (Knapper, 2007). Jedním z nejnovějších klinicky testovaných inhibitorů je AC220 (Quizartinib). AC220 byl studován na AML pacientech s normálním karyotypem, u jejichž blastů kostní dřeně způsobil dozrání do terminálního stádia myeloidní diferenciace (Sexauer et al., 2012). U řady pacientů léčených tímto inhibitorem však došlo k rezistenci. Jak u pacientů, tak i u buněčných linií byly identifikovány bodové mutace v kinázové doméně, které jsou za rezistenci k inhibitoru odpovědné. Lze proto předpokládat, že v budoucnu se výzkum zaměří na rozvoj dalších inhibitorů FLT3/ITD, jakožto ústřední mutace tohoto typu AML (Smith et al., 2012). Ukázalo se, že u řady pacientů jsou *FLT3* mutace vysoce nestabilní a mění se v průběhu onemocnění, což komplikuje vývoj účinného inhibitoru. Kontinuální sledování mutací *FLT3* v průběhu léčby AML se tedy jeví jako klinicky velmi významné (Warren et al., 2012).

### 3.3.3.3 ERK/JNK dráha

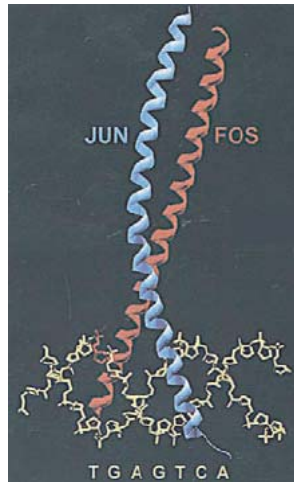
ERK 1/2 kinázy (Extracellular signal-regulated kinase) neboli p44/42 MAPK kinázy (Mitogen activated protein kinase) jsou nazývány také MEK (MAPK/ERK kinase). ERK 1/2 vykazují velmi vysokou sekvenční podobnost. Přítomnost těchto kináz na krysím modelu byla detekována pomocí protilátek ve všech tkáních (Boulton & Cobb, 1991). Bylo prokázáno, že ERK 1/2 hrají důležitou roli v regulaci buněčného cyklu a proliferaci buňky. Pokud jsou ERK 1/2 normálně aktivovány, způsobují progresi G1 fáze buněčného cyklu akumulací cyklinu D1. Pokud jsou však ERK 1/2 dlouhodobě nadměrně aktivovány, dochází k indukci inhibitoru cyklin dependentních kináz, což vede k zastavení buněčného cyklu. Aberantní aktivace ERK 1/2 indukující inhibitory CDK by mohla být v budoucnu využita jako ochrana proti

nekontrolovatelnému množení maligně transformovaných buněk (Meloche & Pouyssegur, 2007). Pro zjednodušení budou ERK 1/2 kinázy v textu dále označovány jako ERK dráha.

JNK kinázy (c-Jun N-terminal kinase) byly popsány jako důležité kinázy účastnící se normálních fyziologických procesů aktivací pomocí cytokinů, avšak předpokládá se také jejich role v odpovědi na buněčný stres (Ip & Davis, 1998). Tyto kinázy jsou nezbytné jak pro buněčnou proliferaci, tak i apoptózu, což závisí na způsobu jejich aktivace. Bylo prokázáno, že  $\gamma$ -záření způsobilo opožděnou, ale trvalou pro-apoptotickou aktivaci JNK1. Naopak aktivace JNK1 signalizací přes receptor CD28 (cluster of differentiation 28) a za spolupůsobení aktivátoru PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate) vedlo k anti-apoptotické aktivaci JNK1, která byla rychlá a přechodná (Chen et al., 1996).

Dráhy ERK a JNK aktivují podjednotky transkripčního faktoru AP-1. AP-1 je heterodimerní protein skládající se z podjednotky c-Fos (aktivovaná ERK) a podjednotky c-Jun (aktivovaná JNK). Heterodimer je uspořádaný do struktury leucinového zipu (viz obr. 3.4). ERK a JNK kinázy modulují aktivitu c-Fos a c-Jun fosforylací serinových a threoninových zbytků na specifických pozicích proteinu (Hess et al., 2004). AP-1 hraje důležitou roli v regulaci apoptózy, přičemž záleží na cílových genech a spolupracujících transkripčních faktorech, zda má AP-1 funkci pro-apoptotickou, nebo spíše zajišťuje přežívání buněk (Ameyar et al., 2003).

Bylo prokázáno, že AP-1 je zodpovědný za kontrolu buněčné proliferace regulací exprese cílových genů. Mezi tyto cílové geny patří regulátory buněčného cyklu, jako jsou např. cyklin D1, p21 a p53 (Shaulian & Karin, 2002). AP-1 je popisován také jako jeden z faktorů rozhodující mezi přežitím a buněčnou smrtí buňky v závislosti na extracelulárních signálech. Byla prokázána odlišná funkce podjednotek Fos a Jun v apoptóze. Ačkoli se obě podjednotky váží na promotor genu Fas (TNF receptor superfamily, member 6, CD95), Jun je popisován jako aktivátor transkripce tohoto genu, zatímco Fos tuto aktivaci ruší (Lasham et al., 2000). Fos pravděpodobně také negativně reguluje expresi FasL, na jehož represorové části promotoru je stabilně navázán (Crist et al., 2003).



Obr. 3.4.: Schéma vazby transkripčního faktoru AP-1 na DNA (převzato z Hess et al., 2004)

### 3.3.3.4 TGFβ dráha

TGFβ (Transforming growth factor β) dráha je aktivována pomocí jednoho z ligandů z rodiny TGFβ, který se váže na receptor typu II. Tento receptor rekrutuje receptor typu I způsobující fosforylaci receptorem regulovaných Smad (Smad2, Smad3, atd.). Takto fosforylovaný Smad je asociován se Smad4. Výsledný komplex Smad je translokován do jádra, kde reguluje transkripci cílových genů (Fortunel et al., 2000).

Protein TGFβ je důležitým regulátorem proliferace a diferenciaci řady savčích buněk. TGFβ může být jak aktivátorem, tak inhibítozem transkripce v závislosti na druhu buněk. Je známo, že TGFβ působí jako antiproliferativní faktor u normálních epiteliálních buněk a u buněk v raném stádiu onkogeneze (Ye et al., 2012). Naopak v pozdějších stádiích onkogenní transformace buněk působí TGFβ jako onkogenní faktor podílející se na indukci epiteliálně mesenchymální změny transformovaných buněk (Yu et al., 2013). Tato tkáňová změna dále přispívá k progresi tumoru a případnému metastázování. Již dříve bylo prokázáno, že TGFβ hraje důležitou roli rovněž v hematopoéze a vývoji leukémie. U AML byla pozorována inhibice proliferace periferních blastů pomocí TGFβ (Tessier & Hoang, 1988)

Mezi cílové geny TGFβ dráhy patří: *c-Myc* (v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)), *Cut11* (Cut-like homeobox 1), *Id2* (Inhibitor of DNA binding 2), *p15* (CDKN2B, Cyklin-dependent kinase inhibitor 2 B), *p21* (CDKN1A, Cyklin-dependent kinase inhibitor 1A), *Pai-1* (Plasminogen activator inhibitor-1) atd. Vzhledem k funkcím TGFβ, jejich cílových genů a důležitosti kináz regulujících TGFβ, které se podílejí se na mnohých mechanismech maligní transformace buněk (Datto et al., 1995; Humbert & Lebrun, 2013; Li et al., 1995; Michl et al., 2005; Pietenpol et al., 1990; Schlegel et al., 2009), je žádoucí studovat jejich předpokládané propojení přes gen *DLX1*.

## **4 Metody**

### **4.1 Kultivace a uchovávání buněk**

Práce s buňkami, kromě centrifugace a zahřívání ve vodní lázni, byla prováděna ve sterilním prostředí mikrobiologického sterilního boxu, aby se zabránilo kontaminaci mikroorganismy z vnějšího prostředí.

#### **4.1.1 Buněčné linie použité v experimentech**

Buněčné linie byly získány z Leibniz-Institut DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH) – German Collection of Microorganisms and Cell Cultures.

HeLa – adherentní, karcinom děložního čípku (transformace: HPV-18)

HEK293 - adherentní, primární embryonální ledvinné buňky (transformace: Adenovirus type 5)

MV4;11 – suspenzní, akutní monocytická leukémie, AML FAB M5 (translokace t(4;11) MLL/AF4, mutace FLT3-ITD)

#### **4.1.2 Kultivace buněk**

Buňky byly kultivovány v 15 ml média v kultivačních lahvích (TPP, Techno Plastic Products) v inkubátoru (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>).

##### **4.1.2.1 Příprava média pro buněčné kultury**

Kultivační médium bylo smícháno v poměrech vhodných pro kultivaci použitých linií:

a) HeLa, HEK293

- DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), High Glucose, GlutaMax<sup>TM</sup>, Life Technologies)

- 1% směs antibiotik a antimykotik (Antibiotic-Antimycotic, 100×, Life Technologies)

-10% inaktivované fetální bovinní sérum (FBS, Fetal Bovine Serum, Certified, US Origin, Life Technologies)

b) MV4;11

- RPMI (Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 medium, GlutaMax<sup>TM</sup>, Life Technologies)

- 1% směs antibiotik a antimykotik (Antibiotic-Antimycotic, 100×, Life Technologies)

- 10% inaktivované fetální bovinní sérum (FBS, Fetal Bovine Serum, Certified, US Origin, Life Technologies)

#### **4.1.2.1.1 Inaktivace fetálního bovinního séra (FBS)**

Zásobní zamražený FBS byl nejprve rozpuštěn ve vodní lázni (37 °C). Následně byl FBS inaktivován 30 minut ve vodní lázni zahřáté na 56 °C. Inaktivovaný FBS rozdělený po 50 ml do sterilních falkon lze skladovat při teplotě -20 °C.

#### **4.1.2.2 Rozmrazování buněčných linií**

Buněčné linie skladované v tekutém dusíku byly přeneseny na ledu a následně rozmrazeny ve vodní lázni (37 °C). K rozmraženým buňkám bylo postupně přidáno 10 ml předem připraveného vytemperovaného média a poté byla provedena centrifugace (5 min, 155g). Supernatant byl slit, vzniklý sediment resuspendován v 15 ml média a vše bylo přemístěno do kultivační láhve o objemu 75 cm<sup>2</sup> (polystyren, TPP).

#### **4.1.2.3 Pasážování buněk**

Pasážování buněk je potřeba provádět zhruba dvakrát týdně. Tento proces zahrnuje odstranění spotřebovaného média a mrtvých buněk (centrifugace: 5 min, 155g) a přidání čerstvého média.

##### **4.1.2.3.1 Adherentní buněčné linie**

Adherentní buněčné linie je nejprve potřeba oddělit od povrchu kultivační láhve trypsinizací. Nejprve bylo odsáto médium, přisedlé buňky byly promyty PBS (phosphate buffered saline) a poté bylo přidáno 5 ml trypsinu (0,5 % Trypsin-EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) ~ 10×, Life Technologies), který působil cca 3 min (37 °C). Následně byly oddělené buňky přeneseny do sterilní falkony. K buňkám bylo přidáno 5 ml nového média a vše bylo centrifugováno (5 min, 155g). Supernatant byl odlit a sediment resuspendován v 1 ml média. Část těchto buněk byla přenesena do kultivační láhve (75 ml, TPP) a doplněna médiem na výsledný objem 15 ml.

##### **4.1.2.3.2 Suspenzních buněčné linie**

Suspenzní buněčné linie byly vždy promyty pomocí PBS a následně centrifugovány (5 min, 155g). Supernatant byl odlit a vzniklý sediment resuspendován v 1 ml média. Část těchto

buněk byla přenesena do kultivační láhve (75 ml, TPP) a doplněna médiem na výsledný objem 15 ml.

#### **4.1.2.4 Počítání buněk**

Sediment buněk vzniklý po centrifugaci (5 min, 155g) byl resuspendován v 1 ml média. 10  $\mu$ l z resuspendovaných buněk bylo smícháno s trypanovou modří (Trypan Blue, Sigma-Aldrich<sup>®</sup>). Zhruba 10  $\mu$ l z tohoto roztoku bylo přemístěno do počítacího sklíčka (Countess<sup>™</sup> Cell Counting Chamber Slides, Life Technologies) a vloženo do počítačky buněk (Countess<sup>™</sup> Automated Cell Counter, Life Technologies). Výsledkem je vždy počet buněk v 1 ml (živých, mrtvých a celkově), viabilita a velikost buněk.

#### **4.1.2.5 Skladování buněčných linií**

Sediment buněk vzniklý centrifugací (5 min, 155g), který obsahuje 10 milionu buněk, byl resuspendován v 1 ml média s 10% dimethylsulfoxidem (DMSO, Sigma-Aldrich<sup>®</sup>) a 20% intaktivovaným FBS. Následně byly buňky přeneseny do zamrazovací zkumavky (1,8 ml, Nunc Cryo Tube<sup>™</sup> Vial, Thermo SCIENTIFIC) vloženy do nádoby Mr. Frosty (Wessington Cryogenics). Buňky v této nádobě byly uloženy na 24 hodin do teploty -80 °C. Poté byly zamrazovací zkumavky s buňkami umístěny do boxů s tekutým dusíkem pro dlouhodobé skladování.

## **4.2 Western blot**

Metoda Western blot byla využita

- ke kontrole funkce příslušných inhibitorů na proteinové úrovni
- ke stanovení hladiny *DLXI* na proteinové úrovni

### **4.2.1 Příprava buněčných linií a přidání inhibitoru/aktivátoru**

#### **4.2.1.1 Příprava buněk**

Pro tuto metodu byly použity linie HeLa, HEK293 a MV4;11, které byly nasazeny v koncentraci 1 milion buněk na 2 ml příslušného média (do 6-ti jamkové destičky s max. objemem 6 ml na jamku). Na přípravu jednoho vzorku bylo použito 4 – 6 milionů buněk, dle buněčné linie. Nasazené buňky byly ponechány v inkubátoru po dobu 24 – 48 hodin, dle příslušného experimentu.

#### 4.2.1.2 Použité aktivátory/inhibitory

##### 4.2.1.2.1 Aktivátory

- z lyofilizovaných substrátů byly připraveny roztoky (v DMSO/PBS) o koncentraci 10 mM, které byly dále skladovány při teplotě -20 °C

- výsledná koncentrace přidaná k buňkám - 0,25 μM

a) PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate, Sigma-Aldrich®) ~ aktivátor ERK, JNK, p38

b) orthovanadát sodný (Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, Sigma-Aldrich®) -aktivovaný pomocí H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ~ aktivátor ERK, JNK, PI3K, STAT5, p38

##### 4.2.1.2.2 Inhibitory

- z lyofilizovaných substrátů byly připraveny roztoky (v DMSO) o koncentraci 10 mM, které byly dále skladovány při teplotě -20 °C

- výsledná koncentrace přidaná k buňkám - 10 μM

a) U0126 (monoethanolate, Sigma-Aldrich®) ~ inhibitor ERK

b) SP600125 (1,9-Pyrazoloanthrone, Sigma-Aldrich®) ~ inhibitor JNK

c) LY294002 (2-(4-Morpholinyl)-8-phenyl-1(4H)-benzopyran-4-one hydrochloride, Sigma-Aldrich®) ~ inhibitor PI3K

d) N'-((4-Oxo-4H-chromen-3-yl) methylene) nicotinohydrazide, Calbiochem®) ~ inhibitor STAT5

e) SB203580 (4-(4-Fluorophenyl)-2-(4-methylsulfinylphenyl)-5-(4-pyridyl)1H-imidazole, Cell Signaling Technology®) ~ inhibitor p38

##### 4.2.1.3 Přidání aktivátoru/inhibitoru

K nasazeným narostlým buňkám byl přidán aktivátor/inhibitor konkrétní dráhy dle tabulky (viz tab. 4.1, 4.2 – 4.6, 4.7). Ke kontrolnímu vzorku (bez ovlivnění aktivátorem/inhibitorem dráhy) bylo přidáno v adekvátním množství DMSO, ve kterém byly příslušné inhibitory rozpuštěny. Po příslušné době působení aktivátoru/inhibitoru byly buňky odebrány a dále zpracovány.

| čas<br>přidání/působení | přidáno |     |           |
|-------------------------|---------|-----|-----------|
|                         | C       | PMA | PMA+I-ERK |
| 0/60 min                | DMSO    | PMA | PMA       |
| 30/30 min               | nic     | nic | I-ERK     |

Tab. 4.1: Kontrola funkčnosti aktivátoru/inhibitoru použitého pro metodu duální luciferázové eseje (buněčné linie HeLa a HEK 293)

| čas<br>přidání/působení | přidáno |     |                                     |           |         |
|-------------------------|---------|-----|-------------------------------------|-----------|---------|
|                         | C       | PMA | Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> (O) | PMA+I-ERK | O+I-ERK |
| 0/60 min                | DMSO    | PMA | O                                   | PMA       | O       |
| 30/30 min               | nic     | nic | nic                                 | I-ERK     | I-ERK   |

| čas<br>přidání/působení | přidáno |     |                                     |           |         |
|-------------------------|---------|-----|-------------------------------------|-----------|---------|
|                         | C       | PMA | Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> (O) | PMA+I-JNK | O+I-JNK |
| 0/60 min                | DMSO    | PMA | O                                   | PMA       | O       |
| 30/30 min               | nic     | nic | nic                                 | I-JNK     | I-JNK   |

| čas<br>přidání/působení | přidáno |     |                                     |            |          |
|-------------------------|---------|-----|-------------------------------------|------------|----------|
|                         | C       | PMA | Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> (O) | PMA+I-PI3K | O+I-PI3K |
| 0/60 min                | DMSO    | PMA | O                                   | PMA        | O        |
| 30/30 min               | nic     | nic | nic                                 | I-PI3K     | I-PI3K   |

| čas<br>přidání/působení | přidáno |     |                                     |             |           |
|-------------------------|---------|-----|-------------------------------------|-------------|-----------|
|                         | C       | PMA | Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> (O) | PMA+I-STAT5 | O+I-STAT5 |
| 0/60 min                | DMSO    | PMA | O                                   | PMA         | O         |
| 30/30 min               | nic     | nic | nic                                 | I-STAT5     | I-STAT5   |

| čas<br>přidání/působení | přidáno |       |
|-------------------------|---------|-------|
|                         | C       | I-p38 |
| 0/30 min                | DMSO    | I-p38 |

Tab. 4.2 – 4.6: Kontrola funkčnosti aktivátoru/inhibitoru pro metody western blot a qRT-PCR (buněčná linie MV4;11)

| čas<br>přidání/působení | přidáno |       |       |        |         |       |
|-------------------------|---------|-------|-------|--------|---------|-------|
|                         | C       | I-EKR | I-JNK | I-PI3K | I-STAT5 | I-p38 |
| 0/9 hod                 | DMSO    | I-EKR | I-JNK | I-PI3K | I-STAT5 | I-p38 |

Tab. 4.7: Inhibice drah a studování jejich vlivu na expresi *DLX1*

## 4.2.2 Příprava proteinových vzorků

### 4.2.2.1 Zpracování buněk

#### 4.2.2.1.1 Adherentní buňky (HeLa, HEK 293)

Nejprve bylo odsáto médium a následně byly přisedlé buňky promyty pomocí PBS. K promytým buňkám byl přidán 1 ml trypsinu, který působil 3 min (37 °C). Poté byly buňky centrifugovány (5 min, 243g). Supernatant byl odlit a vzniklý sediment resuspendován v 1 ml PBS. Následně byla provedena centrifugace (4 °C, 5 min, 243g). Tento krok byl ještě dvakrát zopakován. Od této chvíle byly buňky udržovány na ledu. Výsledný vysušený sediment byl rozpuštěn ve 250 µl RIPA pufru (viz tab. 4.8, 4.9).

#### 4.2.2.1.2 Suspenzní buňky (MV4;11)

Nejprve byly odsáty všechny buňky v médiu z konkrétní jamky, která byla následně propláchnuta malým množstvím PBS. Buňky byly dále centrifugovány (5 min, 243g). Supernatant byl odlit a vzniklý sediment resuspendován v 1 ml PBS. Poté byla provedena centrifugace (4 °C, 5 min, 243g). Tento krok byl ještě dvakrát zopakován. Od této chvíle byly buňky udržovány na ledu. Výsledný vysušený sediment byl rozpuštěn ve 250 µl RIPA pufru (viz tab. 4.8, 4.9).

| chemikálie                               | % (v/v) |
|--|---------|
| NaF (1 M)                                | 5%      |
| PMSF (0,02 M)                            | 5%      |
| Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> (0,02 M) | 5%      |
| inhibitory proteáz - Complete (7×)       | 14%     |
| MgCl <sub>2</sub> (25 mM)                | 8%      |
| lyzační pufr                             | 63%     |

Tab. 4.8: Složení RIPA pufru

| chemikálie          | % (v/v) |
|---------------------|---------|
| Triton-X-100        | 1%      |
| SDS (10%)           | 1%      |
| EDTA (0,5M)         | 0,4%    |
| NaCl (1M)           | 14%     |
| Tris-HCl (pH ~ 7,5) | 80%     |

Tab. 4.9: Složení lyzačního pufru

#### 4.2.2.2 Sonikace zlyzovaných buněk

Sonikace byla použita pro mechanické rozbití buněčných jader. Každý lyzát buněk ve 250  $\mu$ l lyzačního pufru byl sonikován na sonikátoru (Model 150VT Ultrasonic Homogenizer, BIOLOGICS, INC.) po dobu 10 sec. Výsledný roztok byl centrifugován (4 °C, 3 min, 9450g), přičemž jako vzorek do western blotu byl použit odsátý supernatant.

#### 4.2.2.3 Kolorimetrické/Spektrofotometrické stanovení koncentrace proteinů

Koncentrace proteinů byla stanovena pomocí sady *DC*<sup>TM</sup> Protein Assay (Bio-Rad) dle návodu, který využívá modifikovaného principu Lowryho metody. Tato metoda spočívá v reakci proteinů s mědí v alkalickém prostředí (Alkaline copper tartrate solution) a následné redukci přidaného činidla (Folin reagent) takto modifikovaným proteinem. Výsledné modré zbarvení roztoku, využitě při kolorimetrickém stanovení koncentrace proteinu, je způsobeno zejména redukcí pomocí aminokyselin, jako je tyrozin a tryptofan (Lowry et al., 1951). Ke kalibraci byla použita ředící řada BSA (bovinní sérum albumin) s postupně se snižující koncentrací (viz tab. 4.10). Po inkubaci 15 min při pokojové teplotě byla koncentrace proteinů stanovena spektrofotometricky na přístroji ELISA – READER (Molecular Device) při vlnové délce 750 nm.

| číslo standardu | 1.   | 2. | 3.  | 4. | 5.   | 6.  | 7.   | 8.    | 9. |
|-----------------|------|----|-----|----|------|-----|------|-------|----|
| c (BSA) ~ mg/ml | 2,49 | 2  | 1,5 | 1  | 0,75 | 0,5 | 0,25 | 0,125 | 0  |

Tab. 4.10: Koncentrace standardů

#### 4.2.2.4 Příprava vzorků s redukcí činidlem

Dle změřené koncentrace byly vzorky naředěny vodou a vzorkovým puftrem (viz tab. 4.11) na výslednou koncentraci 100 - 200 ng/ $\mu$ l, dle příslušného experimentu. Takto smíchané

vzorky s redukcujícím vzorkovým pufrům byly zahřáty v suchém bloku na 99 °C po dobu 3 min. Takto zpracovaný vzorek je připraven na western blot.

| chemikálie                         | % (v/v) (w/v) |
|------------------------------------|---------------|
| zaostřovací gelový pufr (viz dále) | 27,8% (v/v)   |
| glycerol                           | 55.6% (v/v)   |
| β-merkapt ethanol                  | 2,5% (v/v)    |
| bromfenolová modř                  | 0,3% (v/v)    |
| SDS                                | 16,7% (w/v)   |

Tab.4.11: Složení vzorkového pufru (5×)

### 4.2.3 Detekce proteinů na nitrocelulókové membráně

#### 4.2.3.1 Elektroforéza v polyakrylamidového gelu v přítomnosti SDS (SDS - PAGE)

Elektroforetické dělení proteinů jednotlivých vzorků bylo provedeno v plochých polyakrylamidových gelech v přítomnosti SDS (sodium dodecyl sulfát) v elektroforetické soustavě Bio – Rad. K elektroforéze byl použit gel o koncentraci 10% akrylamidu (separační gel) a rozměrech 83 × 50 × 1,5 mm.

##### 4.2.3.1.1 Příprava gelů

Nejprve byla skla pro přípravu gelu odmaštěna ethanolem a zasazena vertikálně do stojánku (Bio-Rad). Mezi tato skla byl okamžitě po smíchání nalit 10% separační gel (viz tab. 4.12, 4.13). Ihned poté byla hladina gelu převrstvena destilovanou vodou, aby došlo k polymeraci gelu zabráněním přístupu kyslíku. Polymerace separačního gelu probíhala 20 min. Následně byla odstraněna voda z povrchu gelu a zbytek volného prostoru byl vyplněn zaostřujícím gelem. Do tohoto gelu byl před polymerací vsunut hřebínek, který vytvořil po 40 min polymerace 10 jamek pro nanesení vzorku. K polymeraci akrylamidu dochází za katalýzy APS (ammonium persulfát), přičemž zesíťování gelu katalyzuje TEMED (N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine).

| chemikálie      | % (v/v)                  |                            |
|-----------------|--------------------------|----------------------------|
|                 | separační gel (10%)      | zaostřovací gel            |
| pufr            | (separační)<br>25% (v/v) | (zaostřovací)<br>25% (v/v) |
| akrylamid (30%) | 33,1% (v/v)              | 14,5% (v/v)                |
| TEMED           | 0,05% (v/v)              | 0,1% (v/v)                 |
| APS (10%)       | 0,5% (v/v)               | 0,5% (v/v)                 |

Tab. 4.12: Příprava gelů

| chemikálie | % (v/v) (w/v)         |                     |
|------------|-----------------------|---------------------|
|            | separační pufr        | zaostřovací pufr    |
| Tris-base  | 18% (w/v)             | 6% (w/v)            |
| SDS        | 0,4% (w/v)            | 0,4% (w/v)          |
| HCl        | 2,3% (v/v) (pH ~ 8,8) | 4% (v/v) (pH ~ 6,8) |

Tab. 4.13: Příprava gelových pufřů

#### 4.2.3.1.2. Elektroforéza vzorků

Gel byl nasazen do elektroforetické aparatury (Bio-Rad) a zalit 1× elektrodoým pufřem naředěným ze zásobního roztoku (viz tab. 4.14). Do první jamky bylo naneseo 7 µl standardu (Color Burst™ Electrophoresis Marker, Sigma-Aldrich®). Do ostatních jednotlivých jamek na připraveném zpolymerovaném akrylamidovém gelu bylo naneseo 45 µl z každého vzorku. Po zapojení aparatury ke stabilizovanému zdroji napětí (Power Pac 200, Bio-Rad) byla spuštěná samotná elektroforéza, která probíhala 70 min při konstantním napětí 130 V.

| chemikálie | % (w/v)     |
|------------|-------------|
| Tris-base  | 3% (w/v)    |
| glycin     | 14,4% (w/v) |
| SDS        | 1% (w/v)    |

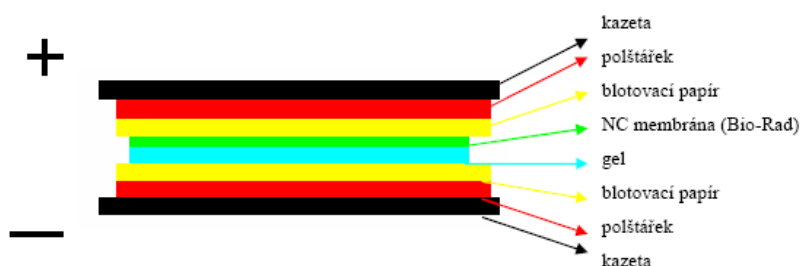
Tab. 4.14: 10× elektrodoý pufr (zásobní)

#### 4.2.3.2 Přenos proteinů z gelu na nitrocelulózoúou membránu (Western blot)

Po dokončení elektroforézy byl gel z aparatury vyjmut a skla odstráňeoa. Následně byl odříznut zaostřující gel a pro další práci byl dále využíván pouze gel separační s rozdělenými proteiny. Pro přenos proteinů z gelu na membránu byl sestaven blotovací sendvič (viz obr. 4.1), který byl po celou dobu navlhčen blotovacím pufřem (viz tab. 4.15). Blotovací sendvič spolu s ledem byl zasunut do aparatury pro elektropřenos (stejná jako pro elektroforézu) a vše bylo zalito blotovacím pufřem. K aparatuře byl nakonec připojen stabilizovaný zdroj napětí s nastavenými podmínkami pro přenos: 75 V, 90 min.

| chemikálie       | % (v/v) (w/v) |
|------------------|---------------|
| 1M Tris (8,8 pH) | 2,5% (v/v)    |
| methanol         | 20% (v/v)     |
| glycin           | 1,1% (w/v)    |

Tab. 4.15: Složení blotovacího pufru



Obr. 4.1: Blotovací sendvič

#### 4.2.3.3 Blokování membrány

Ihned po ukončení elektropřenosu byla membrána vyjmuta a vložena do 10 ml blokačního roztoku (5% mléko/BSA v roztoku Tween (1%) + PBS 1×). Takto byla membrána blokována na míchačce při pokojové teplotě po dobu 1 hod.

#### 4.2.3.4 Imunodetekce a vyvolání signálu (zesílená chemiluminiscence)

Po dostatečném zablokování byla membrána přenesena do roztoku primární protilátky ředěné dle doporučení výrobce v blokačním roztoku (5% mléka/BSA v roztoku Tween (1%) + PBS 1×). Membrána byla v roztoku primární protilátky inkubována na míchačce ve 4 °C přes noc (cca 16 hod.).

##### 4.2.3.4.1 Primární protilátky (výsledné ředění)

ERK (42/44 kDa) ~ p44/42 MAPK (Erk1/2) (137F5) mAb, králičí, Cell Signaling Technology® (1:1000)

p-ERK (42/44 kDa) ~ Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) Ab, králičí, Cell Signaling Technology® (1:1000)

JNK (46/54 kDa) ~ SAPK/JNK(56G8) mAb, králičí, Cell Signaling Technology® (1:1000)

p-JNK (46/54 kDa) ~ Phospho-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185) Ab, králičí, Cell Signaling Technology® (1:1000)

AKT/PI3K (60 kDa) ~ Akt (pan) (40D4), myší, Cell Signaling Technology® (1:2000)

p-AKT/PI3K (60 kDa) ~ Phospho-Akt (Ser473) (587F11) mAb, myši, Cell Signaling Technology<sup>®</sup> (1:1000)

STAT5 (92 kDa) ~ Monoclonal Anti-STAT5A antibody produced in mouse, myši, Sigma-Aldrich<sup>®</sup> (1:1000)

p-STAT5 (92 kDa) ~ p-Stat5a (Ser 780): sc-101805, králíčí, Santa Cruz Biotechnology, Inc. (1:200)

p38 (40 kDa) ~ p38 $\alpha$  MAP Kinase Ab, králíčí, Cell Signaling Technology<sup>®</sup> (1:1000)

p-p38 (43 kDa) ~ Phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182) (D3F9) XP<sup>®</sup> Ab, králíčí, Cell Signaling Technology<sup>®</sup> (1:1000)

DLX1 (28 kDa) ~ Rabbit Polyclonal antibody to Dlx, GTX108804, králíčí, GeneTex (1:1000)

$\beta$ -actin ~ Monoclonal Anti- $\beta$ -Actin antibody produced in mouse, myši, Sigma-Aldrich<sup>®</sup> (1:4000)

Po inkubaci s primární protilátkou byla membrána třikrát promyta na míchačce při pokojové teplotě po dobu 10 min v promývacím roztoku (Tween (1%) + PBS 1 $\times$ ). Následně byla membrána inkubována s příslušnou sekundární protilátkou konjugovanou s křenovou peroxidázou (Goat Anti-Mouse/Anti-Rabbit IgG (H+L)-HRP Conjugate, Bio-Rad) ředěnou dle doporučení výrobce v 10 ml roztoku (1% mléka v roztoku Tween (1%) + PBS 1 $\times$ ). Inkubace membrány v sekundární protilátce byla prováděna na míchačce při pokojové teplotě po dobu 1 hod. Po inkubaci se sekundární protilátkou byla membrána opět třikrát promyta na míchačce při pokojové teplotě po dobu 10 min v promývacím roztoku (Tween (1%) + PBS 1 $\times$ ).

Na promytou membránu s konjugovanými protilátkami byl rovnoměrně nanesen roztok luminolu smíchaného s peroxidovým pufrem (Immun-Star<sup>™</sup> HRP Substrate, Bio-Rad). Po 1 min působení roztoku luminolu byla membrána lehce osušena, zabalena do fólie a umístěna do vyvolávací kazety. V temné komoře byl na membránu položen film (Medical X-ray Film, Kodak), který byl v uzavřené kazetě ponechán zhruba 1 min. Poté byl film vložen do vyvolávacího přístroje (Optimax). Vyvolané fotografie byly náležitě popsány a podle standardu byly vyznačeny jednotlivé molekulové hmotnosti. Pro správnou vizualizaci proteinu byla detekce zopakována v různých časech expozice a případně silnějšími roztoky luminolu (Super Signal<sup>®</sup> West Pico Chemiluminiscent Substrate, Super Signal<sup>®</sup> West Femto Trial Kit, ThermoSCIENTIFIC).

#### 4.2.3.5 Western blot – $\beta$ -aktin

Stanovení  $\beta$ -aktinu pomocí metody Western blot bylo využito ke kontrole množství ( $\mu\text{g}$ ) naneseného vzorku. Tato kontrola vylučuje zkreslení výsledků nesprávným nanesením vzorků na elektroforézu. Původní membrána, na které byl vizualizován protein našeho zájmu, byla promyta v promývacím roztoku (Tween (1%) + PBS 1 $\times$ ) a následně byly původní protilátky odstraněny pomocí strippingového pufru (viz tab. 4.16) při pokojové teplotě po dobu 10 min. Membrána očištěná od původních protilátek byla opět třikrát promyta na míchače při pokojové teplotě po dobu 10 min v promývacím roztoku (Tween (1%) + PBS 1 $\times$ ). Promytá membrána byla blokována v blokovacím roztoku (5% mléko/BSA v roztoku Tween (1%) + PBS 1 $\times$ ). Nejprve byla použita primární protilátka proti  $\beta$ -aktinu naředěná (1:4000) v 10 ml roztoku (1% mléko v roztoku Tween (1%) + PBS (1 $\times$ )). Následně byla membrána třikrát promyta promývacím roztokem a inkubována s příslušnou sekundární protilátkou konjugovanou s křenovou peroxidázou (Goat Anti-Mouse IgG (H+L)-HRP Conjugate, Bio-Rad) ředěnou dle doporučení výrobce (1:3000) v 10 ml roztoku (1% mléko v roztoku Tween (1%) + PBS (1 $\times$ )). Membrána byla po hodině inkubace se sekundární protilátkou opět třikrát promyta v promývacím roztoku. Na membránu byl rovnoměrně nanesen roztok luminolu smíchaného s peroxidovým pufrem (Immun-Star<sup>TM</sup> HRP Substrate, Bio-Rad). V temné komoře byl na membránu krátce přiložen film (Medical X-ray Film, Kodak), který byl následně vložen do vyvolávacího přístroje (Optimax). Vyvolané fotografie byly náležitě popsány a podle standardu byly vyznačeny jednotlivé molekulové hmotnosti.

| chemikálie | % (v/v) (w/v) |
|------------|---------------|
| k.octová   | 3% (v/v)      |
| NaCl       | 2,9% (w/v)    |

Tab. 4.16: Stripping buffer

### 4.3 Kvantitativní RT-PCR v reálném čase (qRT-PCR)

Kvantitativní RT-PCR byla použita ke stanovení exprese genu *DLX1* na mRNA úrovni.

#### 4.3.1 Příprava buněk

Pro tuto metodu byla použita buněčná linie MV4;11, která byla nasazena v koncentraci 1 milion buněk na 2 ml příslušného média (do 24 jamkové destičky s max. objemem 2 ml na jamku). Nasazené buňky byly ponechány v inkubátoru po dobu 24 hodin.

### 4.3.2 Použité inhibitory

viz kapitola: 4.2.1.2.2 Inhibitory

#### 4.3.2.1 Přidání inhibitoru

K nasazeným narostlým buňkám (24 hod. po nasazení) byly přidány jednotlivé inhibitory konkrétních drah (viz tab. 4.17). Ke kontrolnímu vzorku (bez ovlivnění inhibitorem dráhy) bylo přidáno DMSO, ve kterém byly příslušné inhibitory rozpuštěny. Po příslušné době působení (2, 8, 9, 24 hod.) inhibitoru byly buňky odebrány a dále zpracovány.

| čas<br>přidání/působení | přidáno |       |       |        |         |       |
|-------------------------|---------|-------|-------|--------|---------|-------|
|                         | C       | I-EKR | I-JNK | I-PI3K | I-STAT5 | I-p38 |
| 0/2 hod                 | DMSO    | I-EKR | I-JNK | I-PI3K | I-STAT5 | I-p38 |
| 0/8 hod                 | DMSO    | I-EKR | I-JNK | I-PI3K | I-STAT5 | I-p38 |
| 0/9 hod                 | DMSO    | I-EKR | I-JNK | I-PI3K | I-STAT5 | I-p38 |
| 0/24 hod                | DMSO    | I-EKR | I-JNK | I-PI3K | I-STAT5 | I-p38 |

Tab. 4.17: Inhibice drah a studování jejich vlivu na expresi *DLX1*

#### 4.3.3 Izolace RNA

Nejprve byly odsáty všechny buňky v médiu z konkrétní jamky, která byla následně propláchnuta malým množstvím PBS. Buňky byly centrifugovány (5 min, 243g). Supernatant byl odlit a vzniklý sediment resuspendován v 1 ml PBS. Následně byla provedena centrifugace (4°C, 5 min, 243g).

Samotná izolace byla provedena pomocí kitu RNeasy<sup>®</sup> Plus Mini Kit (Quiagen) dle návodu. Koncentrace a čistota vyzolované RNA byla změřena na NanoDropu (ND-1000 Spectrophotometer, Thermo SCIENTIFIC) pomocí programu ND-1000 V3.7.1. K určení koncentrace a čistoty RNA na Nanodropu byla změřena absorbance roztoku DNA při světle o vlnové délce 230, 260 a 280 nm.

#### 4.3.4 Reverzní transkripce

Přepis mRNA (messenger RNA) do cDNA (kódující DNA) byl proveden pomocí kitu (iScript<sup>™</sup> cDNA Synthesis Kit, Bio Rad). Templátová RNA byla použita ve výsledném množství 1 µg. Složení a průběh reakce dle tab. 4.18 a tab 4.19.

| složení reakce                | Objem/hmotnost |
|-------------------------------|----------------|
| 5x iScript reaction mix       | 2 µl           |
| iScript reverse transcriptase | 0,5 µl         |
| RNA                           | 1 µg           |
| dH <sub>2</sub> O             | 5 µl           |
|                               | 10 µl          |

Tab. 4.18: Složení reakční směsi pro reverzní transkripci

| čas    | teplota |
|--------|---------|
| 5 min  | 25 °C   |
| 30 min | 42 °C   |
| 5 min  | 85 °C   |

Tab. 4.19: Reverzní transkripce – časy a teploty

#### 4.3.5 qRT-PCR

Na připravené cDNA byla provedena kvantitativní PCR dle protokolu (viz tab. 4.21 a tab. 4.22). K amplifikaci DNA byly použity dva typy specifických primerů (viz tab. 4.20): primery pro gen *DLX1* (gen našeho zájmu) a primery pro gen *GAPDH* - glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (kontrolní gen). Hladina exprese genu našeho zájmu byla vztažena k hladině exprese kontrolního genu. Kvantifikace exprese byla provedena pomocí nescifické sondy Sybr Green (Power SYBR<sup>®</sup> Green PCR Master Mix, Applied Biosystems). Směs na qRT-PCR byla namíchána (viz tab.) v duplikátech pro každý vzorek a každý pár primerů. Výsledná qRT-PCR reakce byla provedena v cycleru (LightCycler480 II, Roche) dle tab. 4.21, 4.22.

| produkty | primery 5'- 3'        |                      |
|----------|-----------------------|----------------------|
|          | fwd                   | rev                  |
| DLX1     | CGGCCTCTTTGGGACTCAC   | CACTACCCTCCAGAGCCGC  |
| GAPDH    | AGGTGAAGGTCGGAGTCAACG | CGTTCTCAGCCTTGACGGTG |

Tab. 4.20: qRT-PCR – primery (forward/reverse)

| složení qRT-PCR    | V (µl) |
|--------------------|--------|
| Sybr green mix     | 5      |
| primer fwd (10 µM) | 0,1    |
| primer rev (10 µM) | 0,1    |
| RNA                | 1      |
| dH <sub>2</sub> O  | 3,8    |
|                    | 10     |

Tab. 4.21: Složení qRT-PCR reakce

| produkt    | polymeráza     | qRT-PCR |        |        |
|------------|----------------|---------|--------|--------|
| DLX1/GAPDH | Sybr green mix | 1×      | 50×    |        |
|            |                | 95 °C   | 95 °C  | 60 °C  |
|            |                | 10 min  | 15 sec | 60 sec |

Tab. 4.22: qRT-PCR – teploty a časy

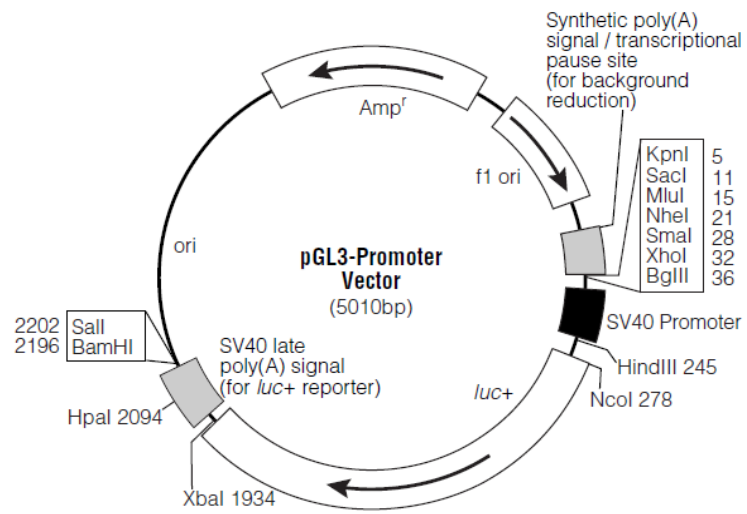
#### 4.3.6 Výpočet relativní normalizované hladiny mRNA

Ve výpočtech byla vztažena hodnota exprese genu *DLX1* k hodnotě exprese kontrolního genu *GAPDH*, aby bylo normalizováno rozdílné množství RNA vložené do reakce ( $Ct_{DLX1} - Ct_{GAPDH} \sim \Delta Ct$ ). Z průměru hodnot byla vypočtena relativní exprese genu *DLX1* jako  $(1/2^{\Delta Ct}) \times 100$ . Výpočty byly upraveny dle metodiky Drabkin et al., 2002. K hodnotě průměru C (kontrola bez ovlivnění jakékoli dráhy), která zde odpovídá 1 (100 %), byly vztaženy hodnoty průměrů ovlivněných vzorků (I-ERK, I-JNK, I-PI3K, I-p38, I-STAT5) jako hodnoty FCA (Fold change absolut).

Výsledky byly vyhodnoceny pomocí neparametrického statistického testu Mann-Whitney (program Statview). Pro statisticky významný rozdíl mezi nepárovými skupinami stejných vzorků byla stanovena hladina významnosti  $P \leq 0,05$ .

#### 4.4 Příprava základních konstruktů pro metodu duální luciferázové eseje

Promotorem našeho zájmu pro metodu duální luciferázové eseje byla nejprve část promotoru *DLX1* v okolí AP-1 vazebného místa (wtAP1). AP-1 místo bylo identifikováno pomocí databáze ECR (Evolutionary Conservation Regions) browser, multiTF tool. Část promotoru *DLX1* v okolí AP-1 místa (200 bp, -40 bp +160 bp od TSS (transcription start site ~ ATG)), která bude pro zjednodušení dále nazývána jako krátký promotor, byla připravena pomocí PCR reakce, kde byla celková délka produktu 200 bp (viz sekvence 4.1). Poté byla připravena delší část promotoru *DLX1* (1605 bp, -873 bp +732 bp od TSS), která bude pro zjednodušení dále nazývána jako dlouhý promotor, kde délka produktu odpovídala 1605 bp (wpDLX1) (viz sekvence 4.2). Obě části promotoru *DLX1* wtAP1 a wpDLX1 byly použity jako inserty do luciferázového vektoru pGL3 (Promega) (viz obr. 4.2). Inserty (části promotorové oblasti genu *DLX1*) ve formě divoké i mutované byly vloženy před gen Luc+ (exprimovaný jako luminiscenční enzym luciferáza), zaklonovaný v pGL3 luciferázovém plazmidu.



Obr. 4.2: Vektor pGL3, získaný z laboratoře Mella Greaves (The Institute of Cancer Research, London, UK), byl upraven z vektoru pGL3 promoter (na obrázku) vložení promotorové oblasti GZMB (granzym B). Díky tomuto vložení vznikla po vyštěpení GZMB ve vektoru EcoRI štěpná místa, přes které byl do vektoru vložen náš insert. (převzato z Promega, 2008)

AP1\_DLX1 (200 bp)

GCAAGACAGCGGACCAATCAGCTCCGCCAGCTCATGAATATTTATGACCTTCGCT  
GAGTCA AAGCTTTGAACCGAGTTTGGGGAGCTCAGCAGCATC ATGCTTAGACTTT  
TCAAAGAGACAACTCCATTTTCTTATGAATGGAAAGTGAAAACCCCTGTTCCGC  
TTAAATTGGGTTCCCTTCTGTCCTGAGAAACATAG

WP\_DLX1 (1605 bp)

CGCATGGGGAGTGGAGAAGGGAGGGGGAGGAGGAGGAAGGCTGGGAGGGAAAG  
AGGATGTGTGTGTTGGGGGAGGGGGCGGTGCAGCCGCCTTTCCTGGGAGGAGAA  
GCGCGGGTTCCCTGGCTCTCCACGCGCACTGCTTTAATCAGACCCGTGCAGCCTCG  
AGCTGGAGTGGCCAGCTGGGCCTGGAGCAATGCGAGCGGGCCCCAGGGAGCGAC  
AGCGGCGTTGGCGCAGCGGCCGAGTGAGTGAGTTCGCAGGGAGGGCCCCCTAAGC  
CCCGACTCCAGGGATGCGGCAGAGCGTACCGGGGAGGCGCGGCCGGATAGGGCGC  
TGCCTAGGCACAAGGCTCTTAGGAGAACCTCTGTCTGTTGGCCGCCTCGGGCGC  
CCCCAGTGCGCGACTCCGCGCTCCAGAGGCAGAGGTCAGTCTCCTCCTGAGCCGC  
CCTAGCTCTGCGCCGAAGTGGAGTGGCAGCGACGAGAAGCGGTCCCGGGTGTCCG  
GTGTTAGGGACCGCTGAAGGGTGGGGACAGTGGTAGGGGGGGCGGCGGCGCGGAG  
CCGCTGGTTGGTTCCTGGGGAGGAAAGCGCGCGAGGGAGGCGGGAGGCCGATGA  
GCCGCGGGCCGACGGGGCCCCGGCGCAGACGCCGCAGCCCATTGTGCTTCCCTGCC  
CGGCGCGCTCTGTTGCAGAGGAGCCCCGGCCGGGAAGTGTGGATGCGTCTTACCC  
GAGGCCGGGCCGCTCGCCCGCTCTAGTCCAGCGGAGCCCAGCGCCTCGGACC  
AATCCCCAGTGATTATGCAAGACAGCGGACCAATCAGCTCCGCCAGCTCATGAAT  
ATTTATGACCTTCGCTGAGTCA AAGCTTTGAACCGAGTTTGGGGAGCTCAGCAGC  
ATC ATGCTTAGACTTTTCAAAGAGACAACTCCATTTTCTTATGAATGGAAAGTG  
AAAACCCCTGTTCCGCTTAAATTGGGTTCCCTTCTGTCCTGAGAAACATAGAGAC  
CCCCAAAAGGGAAGCAGAGGAGAGAAAGTCCCACACCCAGACCCCGCGAGAAG  
AGATGACCATGACCACCATGCCAGAAAGTCTCAACAGCCCCGTGTGCGGGCAAGG  
CGGTGTTTATGGAGTTTGGGCCGCCCAACCAGCAAATGTCTCCTTCTCCCATGTCC  
CACGGGCACTACTCCATGCACTGTTTACACTCGGCGGGCCATTTCGCAGCCCGACG  
GCGCCTACAGCTCAGCCTCGTCCTTCTCCCGACCGCTGGGCTACCCCTACGTCAAC  
TCGGTCAGCAGCCACGCATCCAGCCCCTACATCAGTTCGGTGCAGTCTTACCCGG  
GCAGCGCCAGCCTCGCCAGAGCCGCCTGGAGGACCCAGGTACGTGCGCTTGCC  
AGGGAGAGGGAGAGGAGGAGGTACAAGGGAGAGAGGGAAAGAAGGAGCGGGG  
GAGAAGAGGAGAGGGAGAGAGAGAGAAAGAGAAGAGAGGAGAGCGAGGTGGG  
GTGGGGGTGGGGAGGGCGCGGGAGCAGTGGAGGTTTCGAATATCAATCTATAGA  
TCCTTGTCACAGCAAATAAATTTTTTTTAAAAATTCCTCAATTTGCAACTATCCAG  
CCAAGGATAAATCCCAGAGCGTCTCCTG

Sekvence 4.1 a. 4.2: AP1\_DLX1 a wp\_DLX1

AP1 ~ TGAGTCA, TSS ~ ATG

#### 4.4.1 Amplifikace genové oblasti (insertu) našeho zájmu

Nejprve byla na cycleru (Gene Amp<sup>®</sup> PCR System 2700, Applied Biosystems) provedena PCR reakce (dle tab. 4.23, 4.24, 4.25) z templátové DNA (buffy coat) se specifickými primery pomocí polymerázy jako je HotMaster Taq DNA Polymerase (5 Prime), Herculase II Fusion DNA Polymerase (Agilent Technologies) - polymeráza pro tvorbu

dlouhých GC bohatých produktů. Tyto polymerázy zachovávají kohezní konce s přesahem adeninu, které jsou důležité pro inserci do TOPO vektoru s kohezními konci s přesahem thyminu.

| produkty | primery 5'- 3'          |                         |
|----------|-------------------------|-------------------------|
|          | fw                      | rev                     |
| wtAP1    | GCAAGACAGCGGACCAAT      | CTATGTTTCTCAGGACAGGAAGG |
| wpDLX1   | CAGGAGACGCTCTGGGATTTATC | CGCATGGGGAGTGGAGAAG     |

Tab. 4.23: PCR - primery (forward/reverse)

| produkt | polymeráza                         | PCR  |       |       |      |      |      |      |      |    |
|---------|------------------------------------|------|-------|-------|------|------|------|------|------|----|
| wtAP1   | HotMaster Taq Polymerase           | 1×   | 13×   |       |      |      | 25×  |      |      | 1× |
|         |                                    | 94°C | 94°C* | 68°C* | 72°C | 94°C | 55°C | 72°C | 72°C |    |
|         |                                    | 5:00 | 0:20  | 0:20  | 0:20 | 0:20 | 0:20 | 0:20 | 5:00 |    |
| wpDLX1  | Herculase II Fusion DNA Polymerase | 1×   | 13×   |       |      |      | 25×  |      |      | 1× |
|         |                                    | 98°C | 98°C  | 65°C* | 72°C | 98°C | 55°C | 72°C | 72°C |    |
|         |                                    | 3:00 | 0:20  | 0:20  | 1:45 | 0:20 | 0:20 | 1:45 | 3:00 |    |

Tab. 4.24: PCR – teploty a časy

| wtAP1                     |       | wpDLX1                     |       |
|---------------------------|-------|----------------------------|-------|
| složení PCR               | V(μl) | složení PCR                | V(μl) |
| templát DNA (BC)          | 1,5   | templát DNA (BC)           | 1     |
| primer (10 μM) fwd        | 1     | primer (10 μM) fwd         | 1     |
| primer (10 μM) rev        | 1     | primer (10 μM) rev         | 1     |
| HotMaster Taq Pol.        | 0,2   | Herc. II Fusion DNA Pol.   | 0,5   |
| 10x HotMaster Buffer      | 2,5   | 5x Herc.II Reaction Buffer | 5     |
| MgCl <sub>2</sub> (25 mM) | /     | MgCl <sub>2</sub> (25 mM)  | /     |
| dNTP                      | 2     | dNTP                       | 2,5   |
| BSA                       | 0,5   | DMSO (20%)                 | 1     |
| dH <sub>2</sub> O         | 16,3  | dH <sub>2</sub> O          | 13    |
|                           | 25    |                            | 25    |

Tab. 4.25: Složení PCR reakce

#### 4.4.2 TOPO klonování

Kohezní konce z PCR reakce byly využity v TOPO klonovací reakci (TOPO TA Cloning<sup>®</sup> Kit, LifeTechnologies), kde bylo smícháno 4 μl PCR reakce, 1 μl Salt solution, 1 μl TOPO vektoru (gen pro ampicilinovou rezistenci). Tato směs byla inkubována při pokojové teplotě po dobu 5 min.

#### **4.4.2.1 Příprava ampicilinového agaru**

Ampicilinový (AMP) agar byl připraven z prášku (ImMedia™ Amp Agar, Life Technologies), který byl zahříváním rozpuštěn ve 200 ml dH<sub>2</sub>O. Rozpuštěný agar byl rozlit do petriho misek, kde tuhl zhruba 1 hod.

#### **4.4.2.2 Příprava tekutého LB média (AMP)**

Tekuté médium LB (Luria Broth, Life Technologies) bylo připraveno z 12,5 g práškového LB rozpuštěného v 500 ml dH<sub>2</sub>O. Roztok LB média byl autoklávován za podmínek: 121 °C, 15 min. K vychlazenému LB médiu bylo přidáno odpovídající antibiotikum (AMP) pro selekci transformovaných bakterií. Antibiotikum (Lékárna Motol) bylo přidáno v konečné koncentraci 0,1 µg/µl.

#### **4.4.2.3 Chemická transformace (1.den)**

Do rozmrzlých bakterií E.coli (One Shot® TOP10 Chemically Competent E. coli, Life Technologies) byly přidány 2 µl TOPO klonovací reakce. Pomocí pipety byla směs jemně promíchána a inkubována 5 min na ledu. Poté byl na suchém bloku proveden tepelný šok bakterií po dobu 30 sekund při teplotě 42 °C. K bakteriím bylo následně přidáno 250 µl SOC média (Life Technologies). V tomto médiu byly bakterie kultivovány za podmínek: 37 °C, 1 hod., 200 kvů/min (na horizontální třepačce). Bakterie byly po zhruba 70 µl naneseny na misky s ampicilinovým agarem (AMP rezistence transformovaných bakterií), které byly umístěny dnem vzhůru. Takto připravené misky s bakteriemi byly inkubovány přes noc při 37 °C.

#### **4.4.2.4 Přenos kolonií (2.den)**

Z narostlých kolonií na agarových plotnách bylo pomocí pipetové špičky odebráno vždy po 10 jednotlivých koloniích do předem připravených 14 ml falkon s 3 ml AMP LB média (AMP rezistence transformovaných bakterií). Bakterie v LB médiu byly kultivovány přes noc (max 16 hod.) za podmínek: 37 °C, 200 kvů/min.

#### **4.4.2.5 Izolace plazmidů (3.den)**

Narostlé transformované bakterie v AMP LB médiu byly centrifugovány při 4 °C, 2000g po dobu 10 min. Výsledný supernatant byl slit a vzniklý sediment (transformované bakterie) byl použit k izolaci plazmidů dle návodu pomocí QIAprep® Spin Miniprep Kit (Quiagen) nebo zamražen v -20 °C pro pozdější využití.

#### 4.4.3 Měření koncentrace plazmidů

Koncentrace a čistota vyizolovaných plazmidů byla změřena na NanoDropu (ND-1000 Spectrophotometer, Thermo SCIENTIFIC) pomocí programu ND-1000 V3.7.1. K určení koncentrace a čistoty DNA na Nanodropu byla změřena absorbance roztoku DNA při světle o vlnové délce 230, 260 a 280 nm.

#### 4.4.4 Kontrola délky plazmidů

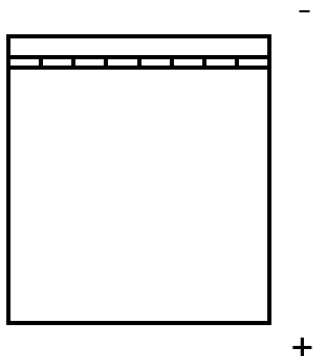
Agarózová elektroforéza byla prováděna v aparatuře (SCIE-PLAS) v horizontálním agarózovém gelu. 1% agarózový gel byl připraven smícháním a rozpuštěním 0,5 g agarózy (0,25 g NuSieve® GTG® Agarose (Lonza) + 0,25 g UltraPure™ Agarose (Life Technologies), 50 ml naředěného 1× pufru TAE (viz tab. 4.26). Do vychlazené směsi bylo přidáno 6 µl GelRed (Nucleid Acid Stain, 10 000× in water, Biotinum), který byl využit pro obarvení DNA. Výsledná směs byla nalita do vany k tvorbě gelu (6 cm × 10 cm), do níž byl zasazen hřeben pro vytvoření jamek. Zhruba po 30 min tuhnutí byl gel připraven k použití. Z gelu zasunutého do aparatury na elektroforézu byl vyjmut hřeben a gel s prázdnými jamkami byl zalit naředěným 1× pufrem TAE až po risku v aparatuře.

Do první jamky bylo nanaseno 7 µl standardu (Gene Ruler™ 1 kb Ladder, ready-to-use, Thermo SCIENTIFIC). Jednotlivé vzorky plazmidů smíchané s dH<sub>2</sub>O a vzorkovým pufrem (6× DNA Loading Dye, Thermo SCIENTIFIC) v poměru: 2 µl vzorku, 5 µl dH<sub>2</sub>O a 2 µl vzorkového pufru byly nanесeny do dalších prázdných jamek gelu. Aparatura byla připojena ke stabilnímu zdroji napětí (Bio-Rad) (viz obr. 4.3). Elektroforéza probíhala při konstantním napětí 96 V po dobu 60 min.

Po doběhnutí elektroforézy byl agarózový gel vizualizován na transluminátoru (Gel Doc 2000 With UV Trans Illuminator, Bio Rad) pod ultrafialovým světlem. Vizualizace byla zpracována a upravena zaostřením a časem expozice v programu Quantity One (Bio-Rad).

| chemikálie                          | % (v/v)     |
|-------------------------------------|-------------|
| Tris-base                           | 24,2% (w/v) |
| kyselina octová                     | 5,7% (v/v)  |
| Na <sub>2</sub> EDTA 0,5 M (pH ~ 8) | 10% (v/v)   |

Tab. 4.26: 50× TAE pufr (zásobní)



Obr. 4.3: Schéma zapojení elektroforézy

#### 4.4.5 Sekvenování – ověření sekvence plazmidů

Vyizolované plazmidy byly sekvenovány pomocí vybraných sekvenačních primerů v Laboratoři molekulární genetiky Dětské pediatrické kliniky v Motole Sangerovou metodou s fluorescenčně označenými dideoxynukleotidy na sekvenátoru ABi 3130xl HITACHI Prism Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

Analýza výsledků byla provedena v programu BioEdit 7.0.5.3, kde byla porovnávána získaná sekvence s původní teoretickou sekvencí. Při vybírání klonu v TOPO vektoru k další práci byla důležitá maximální shoda nukleotidové sekvence bez mutací.

#### 4.4.6 Amplifikace genové oblasti našeho zájmu (insertu) z TOPO vektoru

Z vybraných ověřených klonů v TOPO vektoru byla provedena PCR reakce (dle tab. 4.27, 4.28, 4.29) s primery obsahující štěpné místo pro EcoRI v cycleru (Gene Amp<sup>®</sup> PCR System 2700, Applied Biosystems) pomocí polymerázy jako je HotMaster Taq DNA Polymerase (5 Prime), Herculase II Fusion DNA Polymerase (Agilent Technologies) - polymeráza pro tvorbu dlouhých GC bohatých produktů.

| produkty | primery 5'- 3'                 |                                 |
|----------|--------------------------------|---------------------------------|
|          | fw                             | rev                             |
| wtAP1    | AAGAATTCGCAAGACAGCGGACCAAT     | ATGAATTCCTATGTTTCTCAGGACAGGAAGG |
| wpDLX1   | ATGAATTCAGGAGACGCTCTGGGATTTATC | ATGAATTCGCATGGGGAGTGGAGAAG      |

Tab. 4.27: PCR – primery s EcoRI štěpným místem (forward/reverse)

| produkt | polymeráza                         | PCR  |       |       |      |      |      |      |      |
|---------|------------------------------------|------|-------|-------|------|------|------|------|------|
|         |                                    | 1×   | 13×   |       |      | 25×  |      |      | 1×   |
| wtAP1   | HotMaster Taq Polymerase           | 94°C | 94°C* | 68°C* | 72°C | 94°C | 55°C | 72°C | 72°C |
|         |                                    | 5:00 | 0:20  | 0:20  | 0:20 | 0:20 | 0:20 | 0:20 | 5:00 |
|         |                                    |      |       |       |      |      |      |      |      |
| wpDLX1  | Herculase II Fusion DNA Polymerase | 98°C | 98°C  | 65°C* | 72°C | 98°C | 55°C | 72°C | 72°C |
|         |                                    | 3:00 | 0:20  | 0:20  | 1:45 | 0:20 | 0:20 | 1:45 | 3:00 |
|         |                                    |      |       |       |      |      |      |      |      |

Tab. 4.28: PCR – amplifikace insertu

| wtAP1                     |       | wpDLX1                     |       |
|---------------------------|-------|----------------------------|-------|
| složení PCR               | V(ul) | složení PCR                | V(ul) |
| TOPO vektor (wtAP1)       | 1,5   | TOPO vektor (wpDLX1)       | 1     |
| primer (10 µM) fwd        | 1     | primer (10 µM) fwd         | 1     |
| primer (10 µM) rev        | 1     | primer (10 µM) rev         | 1     |
| HotMaster Taq Pol.        | 0,2   | Herc. II Fusion DNA Pol.   | 0,5   |
| 10x HotMaster Buffer      | 2,5   | 5x Herc.II Reaction Buffer | 5     |
| MgCl <sub>2</sub> (25 mM) |       | MgCl <sub>2</sub> (25 mM)  |       |
| dNTP                      | 2     | dNTP                       | 2,5   |
| BSA                       | 0,5   | DMSO (20%)                 | 1     |
| dH <sub>2</sub> O         | 16,3  | dH <sub>2</sub> O          | 13    |
|                           | 25    |                            | 25    |

Tab. 4.29: Složení PCR reakce

#### 4.4.7 Restrikce insertů a vektorů pomocí EcoRI

PCR produkty (inserty) z TOPO vektoru byly štepeny pomocí restriktázy EcoRI (Thermo SCIENTIFIC) (viz tab. 4.30). Restrikce probíhala v suchém bloku při teplotě 37 °C po dobu 2 hod. Po restrikci byl enzym inaktivován v suchém bloku při teplotě 65 °C po dobu 20 min.

| složky reakce        | objem v µl |
|----------------------|------------|
| PCR produkt (insert) | 10         |
| 10× EcoRI pufr       | 2          |
| EcoRI restriktáza    | 1,5        |
| dH <sub>2</sub> O    | 18         |
|                      | 31,5       |

Tab. 4.30: Restrikce EcoRI

Plazmid pGL3 (vektor) byl štěpen pomocí restriktázy EcoRI (Thermo SCIENTIFIC) (viz tab. 4.31). Restrikce probíhala v suchém bloku při teplotě 37 °C po dobu 1,5 hod. Poté byla k restrikční reakci přidána alkalická fosfatáza (FastAP, Thermo SCIENTIFIC), která

zabraňuje znovu spojení konců rozštěpeného vektoru pomocí defosforylace. Inkubace s FastAP probíhala při teplotě 37 °C po dobu 30 min. Po restrikci byly oba enzymy inaktivovány v suchém bloku při teplotě 65 °C po dobu 30 min.

| složky reakce          | objem v $\mu\text{l}$         |
|------------------------|-------------------------------|
| plazmid (vektor)       | 1 (0,1-0,5 $\mu\text{g}$ DNA) |
| 10 $\times$ EcoRI pufr | 2                             |
| EcoRI restriktáza      | 1,5                           |
| dH <sub>2</sub> O      | 15,5                          |
| FastAP                 | 5                             |
|                        | 25                            |

Tab. 4.31: Restrikce EcoRI (vektory)

#### 4.4.8 Přečišťování vyštěpených insertů z gelu

Po restrikci PCR produktů byly inserty přečištěny, tak aby bylo dosaženo pouze produktu našeho zájmu. Restrikční reakce byla smíchána se vzorkovým pufrům (6 $\times$  DNA Loading Dye, Thermo SCIENTIFIC) v poměru 5:1 a nanášena na předem připravený 1% agarózový gel (viz kapitola 4.4.4). Do první jamky gelu bylo nanášeno 7  $\mu\text{l}$  standardu (Gene Ruler<sup>TM</sup> 1 kb Ladder, ready-to-use, Thermo SCIENTIFIC). Aparatura byla připojena ke stabilnímu zdroji napětí v zapojení (viz obrázek). Elektroforéza probíhala při konstantním napětí 96 V po dobu 60 min. Po doběhnutí elektroforézy byl agarózový gel vizualizován na transluminátoru (Gel Doc 2000 With UV Trans Illuminator, Bio Rad) pod ultrafialovým světlem. Vizualizace byla zpracována a upravena zaostřením a časem expozice v programu Quantity One. Podle standardu byla určena délka našeho insertu, který byl vyříznut pomocí skalpelu pod UV světlem v transluminátoru. Vyříznutý gen s DNA našeho zájmu byl zpracován pomocí izolačního kitu (illustra<sup>TM</sup> GFX<sup>TM</sup> PCR DNA and Gel Band Purification Kit, GE Healthcare) dle návodu.

#### 4.4.9 Ligace insertu s vektorem

Ligace insertu s vektorem přes kohezní konce naštěpené EcoRI restriktázou byla provedena pomocí T4 DNA ligázy (Life Technologies). Ligace (viz tab. 4.32) probíhala po dobu 4 hodin při teplotě 23 °C. Ligační reakce byla namíchána v poměru hmotností - vektor : insert  $\sim 1 : 3$  dle vzorce:

$$\frac{\text{Množství vektoru (v ng)} \times \text{velikost insertu (v kb)}}{\text{velikost vektoru (v kb)}} = \text{množství insertu (v ng)}$$

| složky reakce | poměr/objem |
|---------------|-------------|
| vektor        | 1           |
| insert        | 3           |
| T4 DNA ligáza | 1 $\mu$ l   |
| T4 pufr       | 4 $\mu$ l   |
| voda          | 15 $\mu$ l  |
|               | 20 $\mu$ l  |

Tab. 4.32: Ligační reakce

#### 4.4.10 Klonování ligovaných produktů

Při klonování zligovaných produktů byla k selekci transformovaných bakterií využita ampicilinová rezistence v plazmidu (vektoru) pGL3.

##### 4.4.10.1 Chemická transformace (1.den)

Do rozmrzlých bakterií E.coli (One Shot<sup>®</sup> TOP10 Chemically Competent E. coli, Life Technologies) bylo přidáno 6  $\mu$ l ligační reakce klonovací reakce. Dále viz kapitoly 4.4.2.3 Chemická transformace (1.den), 4.4.2.4 Přenos kolonií (2.den), 4.4.2.5 Izolace plazmidů (3.den)

##### 4.4.11 Kontrola klonování pomocí EcoRI restrikce

Po izolaci plazmidů, u kterých byla změřena čistota a koncentrace a zhruba ověřena délka, byla provedena restrikce pomocí EcoRI jako kontrola ligační a klonovací reakce. Při správné ligační reakci (vlození insertu do vektoru) po restrikci EcoRI byl předpokládán vznik dvou produktů štěpení : insertu a vektoru.

Restrikce (viz 5.7 Restrikce insertů a vektorů pomocí EcoRI) probíhala v suchém bloku při teplotě 37 °C po dobu 2 hod. Po restrikci byl enzym inaktivován v suchém bloku při teplotě 65 °C po dobu 20 min. Následně byly štěpené vzorky kontrolovány pomocí agarózové elektroforézy na 1% agarózovém gelu v horizontálním uspořádání (viz kapitola 4.1.4). Podle výsledného gelu byly vybrány klony, které po restrikci EcoRI obsahovaly dvě délky DNA ve velikostech insertu a vektoru.

#### 4.4.12 Sekvenování – ověření sekvence plazmidů (viz 4.4.5 Sekvenování – ověření sekvence plazmidů)

Po této kontrole byly výsledné ověřené konstrukty využity pro další práci (pro luciferázovou esej): pGL3\_wtAP1 a pGL3\_wpDLX1.

#### 4.5 Příprava mutovaných konstruktů pro metodu duální luciferázové eseje

Pro metodu duální luciferázové eseje bylo potřeba vytvořit mutovanou formu konstruktů (pGL3\_mutAP1, pGL3\_mut-wpDLX1) z divokého typu pGL3\_wtAP1, pGL3\_wt-wpDLX1. Mutagenese základních konstruktů byla provedena pomocí mutačního kitu (The QuickChange<sup>®</sup> Lightning Site-Directed Mutagenesis Kit, Agilent Technologies).

Na konstruktech divokého typu (pGL3\_wtAP1, pGL3\_wt-wpDLX1) byla provedena PCR (viz tab. 4.34 a tab. 4.35) reakce s použitím mutovaných primerů (navržené pro vznik konkrétní mutace, viz tab. 4.33). V této PCR reakci byla použita polymeráza The QuickChange<sup>®</sup> Lightning Enzym (derivát vysoce přesné polymerázy PfuUltra<sup>®</sup> high-fidelity (HF) DNA polymerase). Pomocí PCR reakce byly vytvořeny nemethylované kopie obou řetězců plazmidu s konkrétní mutací, přičemž původní templátové řetězce divokého typu byly methylované. Díky rozdílu divokého a mutovaného typu řetězců v methylaci byly methylované templátové řetězce rozštěpeny pomocí endonukleázy Dpn I (2% (v/v)), specifické pro methylované a hemimethylované DNA. Mutované formy konstruktů (pGL3\_mutAP1, pGL3\_mut-wpDLX1) byly transformovány do bakterií (viz kapitola 5.10).

Po izolaci mutovaných plazmidů, u kterých byla změřena čistota a koncentrace a zhruba ověřena délka, byla provedena kontrola pomocí sekvenace (viz kapitola 4.12). Po této kontrole byly výsledné ověřené konstrukty v mutované formě využity pro další práci (pro luciferázovou esej): pGL3\_mutAP1, pGL3\_mut-wpDLX1.

| produkty       | primery 5'- 3'              |                             |
|----------------|-----------------------------|-----------------------------|
|                | fw                          | rev                         |
| mut AP1/wpDLX1 | ACCTTCGCTGTAGCAAAGCTTTGAACC | GGTTCAAAGCTTTGCTACAGCGAAGGT |

Tab. 4.33: mut-PCR – primery (forward/reverse)

| složení mut-PCR       | V (μl) |
|-----------------------|--------|
| 10×reaction buffer    | 5      |
| primer fwd (10 μM)    | 1,25   |
| primer rev (10 μM)    | 1,25   |
| dNTP mix              | 1      |
| QuickSolution reagent | 1,5    |
| plazmid ~ (5 ng/μl)   | 5      |
| dH <sub>2</sub> O     | 35     |
|                       | 50     |

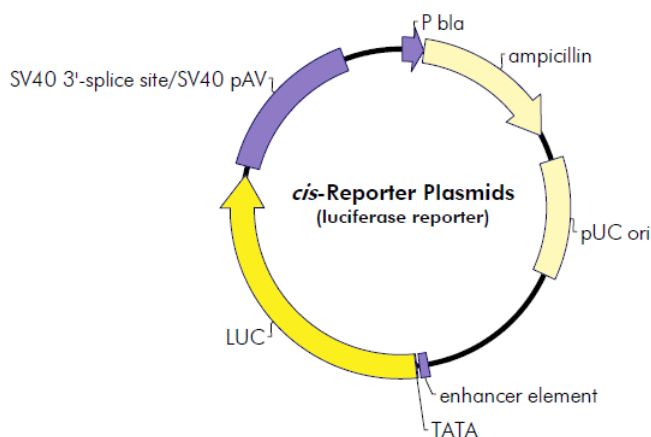
Tab. 4.34: Složení mutační PCR reakce

| produkt                | polymeráza                             | PCR  |       |       |      |      |
|------------------------|--|------|-------|-------|------|------|
|                        |  | 1×   | 18×   |       |      | 1×   |
| mut_AP1/<br>mut_wpDLX1 | The<br>QuickChange®<br>Lightning Enzym | 95°C | 95°C* | 60°C* | 68°C | 68°C |
|                        |  | 2:00 | 0:20  | 0:10  | 3:30 | 5:00 |

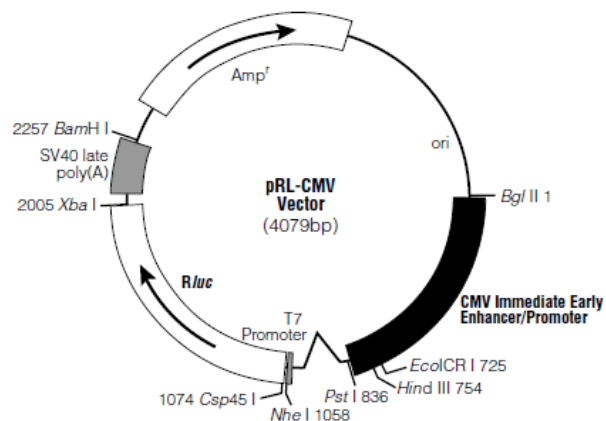
Tab. 4.35: Mutační PCR – teploty a časy

## 4.6 Duální luciferázová esej

Pro metodu duální luciferázové eseje byly využity vytvořené konstrukty divokého typu (pGL3\_wtAP1, pGL3\_wt-wpDLX1) a mutované formy (pGL3\_mutAP1, pGL3\_mut-wpDLX1). Pro kontrolu navrženého experimentálního systému byl využit také kontrolní konstrukt (pGL3\_polyAP1, viz obr. 4.4), který byl získán od spolupracující laboratoře. Pro kontrolu transfekce při této metodě byly buňky transfekovány také plazmidem pRI obsahujícím gen pro renillu (viz obr. 4.5), aby se zabránilo zkreslení výsledků nepřesným počtem nasazených buněk nebo různou úspěšností transfekce.



Obr. 4.4: Kontrolní konstrukt pGL3\_polyAP1~ AP-1 (7×), enhancer element ~ (TGACTAA)<sub>7</sub> (převzato z Agilent Technologies, 2012)



Obr. 4.5: pRL-CMV vektor (převzato z Promega, 2001)

#### 4.6.1 Příprava buněk

Pro tuto metodu byly využity linie HeLa a HEK293. Buňky byly nasazeny do 24 jamkové destičky do 1 ml média (DMEM + 10% FBS) na jamku: HeLa (160 000 buněk/jamka), HEK293 (250 000 buněk/jamka). Nasazené buňky byly ponechány v inkubátoru přes noc (cca 16 hod), aby pro další práci pokryly zhruba 90% povrchu jamky.

#### 4.6.2 Transfekce buněk pomocí lipofectaminu

##### 4.6.2.1 Příprava buněk pro transfekci lipofectaminem

Přes noc narostlým buňkám bylo odsáto médium a následně byly přisedlé buňky promyty pomocí PBS. K promytým buňkám bylo přidáno 500  $\mu$ l média DMEM (bez ATB, FBS). Takto promyté buňky byly připraveny na transfekci lipofectaminem (Lipofectamin 2000, Life Technologies).

##### 4.6.2.2 Příprava mixů pro transfekci lipofectaminem

Pro transfekci Lipofectaminem<sup>TM</sup> 2000 (Invitrogen) byly připraveny dva typy mixů (dle tab. 4.36 a tab. 4.37) pro všechny jamky transfekované daným typem konstruktu (viz schéma výše). Mix 1 byl po smíchání ponechán 5 min v pokojové teplotě. Poté byl k mixu 1 přidán mix 2 a důkladně promíchaná směs obou mixů byla ponechána 20 min v pokojové teplotě.

Při transfekci bylo použito médium umožňující pěstování buněk v nepřítomnosti FBS bez omezení růstu nebo změny morfologie buněk (Opti-MEM<sup>®</sup>, Life Technologies). Nepřítomnost FBS je nutná pro transfekci kationtovými lipidovými transfekčními činidly jako je lipofectamin (Dalby et al., 2004).

| chemikálie            | MIX 1 (wt/mut/polyAP1) |
|-----------------------|------------------------|
| Lipofectamin          | 2 $\mu$ l              |
| Opti-MEM <sup>®</sup> | 50 $\mu$ l             |

Tab. 4.36: Příprava mixu 1 (množství na jednu jamku)

| chemikálie            | MIX 2 wt       | MIX 2 mut       | MIX 2 polyAP1       |
|-----------------------|----------------|-----------------|---------------------|
| pRenilla              | 0,05 $\mu$ g   | 0,05 $\mu$ g    | 0,05 $\mu$ g        |
| konstrukt             | 1,6 $\mu$ g wt | 1,6 $\mu$ g mut | 1,6 $\mu$ g polyAP1 |
| Opti-MEM <sup>®</sup> | 50 $\mu$ l     | 50 $\mu$ l      | 50 $\mu$ l          |

Tab. 4.37: Příprava mixu 2 (množství na jednu jamku)

#### 4.6.2.3 Přidání směsi mixů 1 a 2 pro transfekci lipofectaminem

Do každé jamky s připravenými buňkami ve čtyřplikátech bylo přidáno patřičné množství z připravených směsí mixu 1 a 2. Směs byla jemně promíchána s buňkami v médiu a inkubována při teplotě 37 °C po dobu 4 hod. Po inkubaci buněk s transfekční směsí mixů bylo k buňkám přidáno 600  $\mu$ l média DMEM (20% FBS) na jamku.

#### 4.6.3 Použité aktivátory/inhibitory

K transfekovaným buňkám byly přidávány aktivátory a inhibitory drah ERK a JNK.

##### 4.6.3.1 Aktivátory

- z lyofilizovaných substrátů byly připraveny roztoky (v DMSO) o koncentraci 10 mM, které byly dále skladovány při teplotě -20 °C

- výsledná koncentrace přidaná k buňkám – 0,25  $\mu$ M

PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate (forbol-12-myristát-13-acetát), Sigma-Aldrich<sup>®</sup>) ~ aktivátor ERK, JNK

#### 4.6.3.2 Inhibitory

- z lyofilizovaných substrátů byly připraveny roztoky (v DMSO) o koncentraci 10 mM, které byly dále skladovány při teplotě -20 °C

- výsledná koncentrace přidaná k buňkám – 10 μM

a) U0126 (monoethanolate, Sigma-Aldrich®) ~ inhibitor ERK

b) SP600125 (1,9-Pyrazoloanthrone, Sigma-Aldrich®) ~ inhibitor JNK

#### 4.6.3.1 Přidání aktivátoru/inhibitoru

K transfekovaným buňkám konstrukty wt, mut a polyAP1 byl přidán aktivátor/inhibitor ERK dráhy (viz tab. 4.38). Ke kontrolnímu vzorku (bez ovlivnění ERK dráhy) bylo přidáno DMSO, pro kontrolu zda DMSO neovlivňuje ERK dráhu. K aktivaci ERK/JNK dráhy byl použit aktivátor PMA Jako inhibitor ERK dráhy byl použit U0126 (I-ERK). Jako inhibitor JNK dráhy byl použit SP600125 (I-JNK).

| čas<br>přidání/působení | přidáno |     |                      |
|-------------------------|---------|-----|----------------------|
|                         | C       | PMA | PMA + I-ERK (+I-JNK) |
| 0/60 min                | DMSO    | PMA | PMA                  |
| 30/30 min               | nic     | nic | I-ERK (I-JNK)        |

Tab. 4.38: Časy a množství přidání aktivátoru/inhibitoru

#### 4.6.4 Odběr vzorků pro měření luciferázové eseje

Transfekované buňky byly odebrány a zpracovány na vzorky pro měření luciferázové eseje v časovém intervalu (9, 24 a 48 hod) po ovlivnění aktivátorem/inhibitorem ERK dráhy. Po optimalizaci časových intervalů byl vybrán odběr po 24 hod.

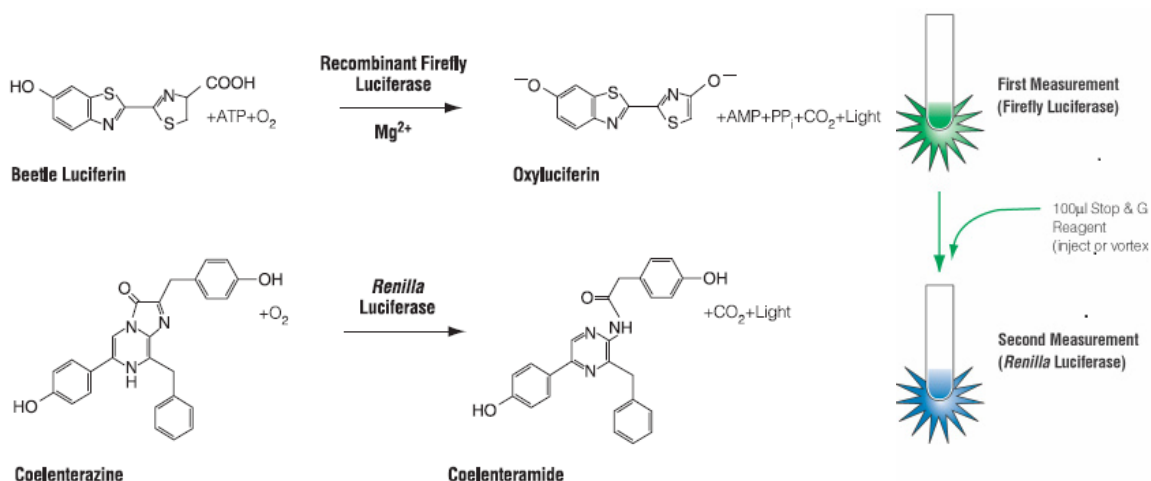
Ovlivněným transfekovaným buňkám bylo nejprve odsáto médium a následně byly buňky promyty pomocí PBS. Promyté buňky byly lyzovány 150 μl lyzačního pufru PLB (Passive Lysis Buffer, Dual -Luciferase® Reporter Assay System, Promega), který byl před lyzováním buněk naředěn ze zásobního roztoku (5× koncentrovaný) na používaný roztok (1×koncentrovaný). Buňky s lyzačním pufrem byly inkubovány na míchačce při pokojové teplotě po dobu 15 min. Poté byly zlyzované buňky resuspendovány v roztoku lyzačního pufru a přeneseny do předem připravených a označených eppendorfků (1,5 ml). Zlyzovaný roztok buněk v eppendorfkách byl centrifugován na stolní centrifuze (15 sec, 8000g).

#### 4.6.5 Měření duální luciferázové eseje

Duální luciferázová esej byla měřena na luminometru (Sirius Single Tube Luminometer, Titertek Berthold) v cytometrických zkumavkách (5ml, Sarstedt). Měření bylo provedeno pomocí kitu (Dual -Luciferase<sup>®</sup> Reporter Assay System, Promega). Výsledky měření byly zpracovány v softwaru FB 12 Sirius (Titertek Berthold).

##### 4.6.5.1 Teorie – duální luciferázové esej

Metoda duální luciferázové eseje využívá rozdílnosti dvou enzymů způsobujících luminiscenci: luciferázy izolované ze světlušky (de Wet et al., 1987), jejíž gen je zaklonovaný v luciferázovém plazmidu pGL3 a Renilly (Matthews et al., 1977), která se používá ke stanovení úspěšnosti transfekce. Tyto enzymy mají rozdílné jak substráty, tak i kofaktory a zároveň se liší také ve vlnové délce luminiscence (viz obr. 4.6.). Díky těmto faktům lze měřit luminiscenci obou enzymů současně, a to pouze přidáním různých reagensií.



Obr. 4.6.: Schéma enzymatických reakcí luciferázy a Renilly (převzato z Promega, 2006)

##### 4.6.5.2 Příprava kitu pro měření (Dual -Luciferase<sup>®</sup> Reporter Assay System, Promega)

Luminiscence luciferázy byla měřena pomocí roztoku LAR II (Luciferase Assay Reagent II). Tento roztok byl připraven rozpuštěním lyofilizovaného substrátu (Luciferase Assay Substrate) v 10 ml pufru (Luciferase Assay Buffer II) a následně rozdělen po 1 ml do eppendorfek (1,5 ml). Luminiscence Renilly byla měřena pomocí roztoku Stop & Glo<sup>®</sup> (Stop & Glo<sup>®</sup> Reagent). Tento roztok byl připraven smícháním 200 µl 50× koncentrovaného substrátu (Stop & Glo<sup>®</sup> Substrate) s 10 ml pufru (Stop & Glo<sup>®</sup> Buffer) a následně rozdělen po 1 ml do eppendorfek (1,5 ml). Takto zpracované roztoky LAR II a Stop & Glo<sup>®</sup> byly skladovány při teplotě -80 °C.

#### **4.6.5.3 Měření luminiscence**

Nejprve byl na luminometru změřen blank (pozadí), a to pouze jako prázdná cytometrická zkumavka. Poté byly měřeny jednotlivé vzorky v množství 20  $\mu$ l. Vzorek byl nejprve smíchán s 50  $\mu$ l roztoku LAR II, z čehož byla na luminometru změřena luminiscence luciferázy. Následně bylo k měřenému vzorku smíchanému s roztokem LAR II přidáno 50  $\mu$ l roztoku Stop & Glo<sup>®</sup>, z čehož byla na luminometru změřena luminiscence Renilly.

#### **4.6.6 Výpočet relativní normalizované luminiscence luciferázy**

Ve výpočtech byla vztažena hodnota luminiscence luciferázy (L) k hodnotě luminiscence Renilly (R), aby se zabránilo zkreslení výsledku nepřesným počtem nasazených buněk a různou úspěšností transfekce (L/R). Poté byl z těchto hodnot, v rámci čtyřplikátů jednoho vzorku, vypočten průměr. K hodnotě průměru C (kontrola bez ovlivnění ERK dráhy), která zde odpovídá 1 (100 %), byly vztaženy hodnoty průměrů ovlivněných vzorků (PMA, PMA+I-ERK) jako hodnoty FCA (Fold change absolut).

Výsledky byly vyhodnoceny pomocí neparametrického statistického testu Mann-Whitney (programem Statview). Pro statisticky významný rozdíl mezi nepárovými skupinami stejných vzorků (čtyřplikátů) byla stanovena hladina významnosti  $p \leq 0,05$

## 4.7 Seznam chemikálií

|   |                            |
|---|----------------------------|
| akrylamid   | Bio-Rad                    |
| APS   | Sigma-Aldrich <sup>®</sup> |
| bromfenolová modř (bromphenol blue)   | Sigma-Aldrich <sup>®</sup> |
| BSA   | Sigma-Aldrich <sup>®</sup> |
| Complete (7×)   | Roche                      |
| DMSO (dimethylsulfoxid)   | Sigma-Aldrich <sup>®</sup> |
| EDTA ([CH <sub>2</sub> N(CH <sub>2</sub> CO <sub>2</sub> H) <sub>2</sub> ] <sub>2</sub> ) | Sigma-Aldrich <sup>®</sup> |
| ethanol   | PENTA                      |
| glycerol  | Sigma-Aldrich <sup>®</sup> |
| glycin  | Sigma-Aldrich <sup>®</sup> |
| kyselina chlorovodíková (HCl)   | Lachema                    |
| kyselina octová (CH <sub>3</sub> COOH)  | PENTA                      |
| LB médium (Luria Broth)   | Invitrogen                 |
| methanol  | PENTA                      |
| MgCl <sub>2</sub>   | Applied Biosystems         |
| Na <sub>2</sub> EDTA 0,5 M (pH ~ 8)   | Invitrogen                 |
| Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>   | Sigma-Aldrich <sup>®</sup> |
| NaCl  | Sigma-Aldrich <sup>®</sup> |
| NaF   | Fluka                      |
| Non-Fat Dry Milk (mléko)  | Bio-Rad                    |
| PBS   | Lékárna FN Motol           |
| PMSF  | Roche                      |
| SDS   | Sigma-Aldrich <sup>®</sup> |
| TEMED   | Bio-Rad                    |
| Tris 1M   | Bio-Rad                    |
| Tris-base   | Calbiochem <sup>®</sup>    |
| Tris-HCl (pH ~ 7,5)   | Invitrogen                 |
| Triton-X-100  | Sigma-Aldrich <sup>®</sup> |
| trypanová modř (trypan blue)  | Sigma-Aldrich <sup>®</sup> |
| Tween 20 10% (polyoxyethylensorbitanmonolaurát)   | Bio-Rad                    |
| β-merkptoethanol  | Sigma-Aldrich <sup>®</sup> |

## 5 Výsledky

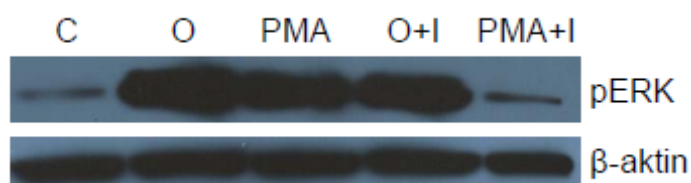
### 5.1 Stanovení hladiny exprese genu *DLX1* po inhibici vybraných signálních drah

Stanovení hladiny exprese genu *DLX1* (na mRNA a proteinové úrovni) po inhibici vybraných signálních drah, které ovlivňují expresi *DLX1*, bylo provedeno za účelem identifikace efektorových drah regulujících expresi tohoto genu. Mezi vybrané signální dráhy byly zařazeny dráhy ERK, JNK, PI3K, p38 a STAT5.

#### 5.1.1 Kontrola funkce příslušných inhibitorů

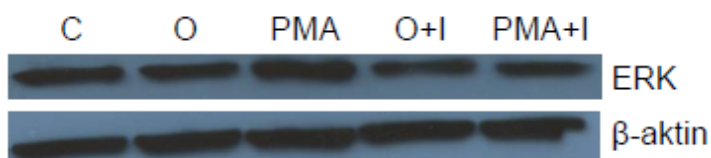
Kontrola byla provedena metodou Western blot (na proteinové úrovni) na buněčné linii MV4;11 s vysokou expresí *DLX1*. Snížení hladiny proteinu *DLX1* bylo porovnáváno oproti kontrolnímu vzorku (bez aktivátoru/inhibitoru). Pokud nebyla hladina inhibice daného proteinu vůči kontrole viditelná, byly následně použity také aktivátory konkrétních drah ( $\text{Na}_3\text{VO}_4$  (O) a PMA (forbol-12-myristát-13-acetát)). Kontrola množství naneseného proteinu byla provedena pomocí  $\beta$ -aktinu

Hladina proteinu pERK1/2 byla oproti kontrolnímu vzorku zvýšena pomocí aktivátorů (O, PMA). Snížení hladiny pERK1/2 bylo detekováno po inhibici dráhy (specifickým inhibitorem U0126) aktivované pomocí PMA (PMA+I), narozdíl od inhibice dráhy aktivované pomocí O (O+I), kde se snížení hladiny pERK1/2 neprojevovalo tak významně (viz obr. 5.1). Naopak hladina celkového ERK1/2 proteinu se nezměnila (viz obr. 5.2) po aktivaci ERK dráhy (O, PMA) ani po inhibici (specifickým inhibitorem U0126) aktivované ERK dráhy (O+I, PMA+I).



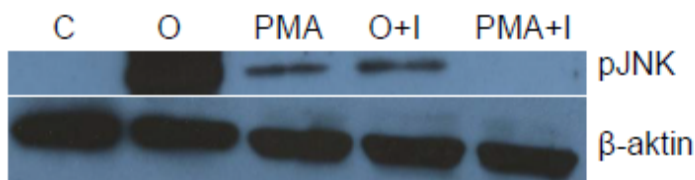
Obr. 5.1: Hladina proteinu pERK1/2 detekovaná po ovlivnění ERK dráhy.

C (kontrola), O (orthovanadát), PMA (forbol-12-myristát-13-acetát), O+I (orthovanadát + specifický inhibitor ERK dráhy), PMA+I (PMA + specifický inhibitor ERK dráhy).

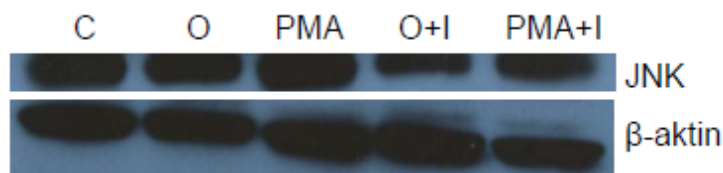


Obr. 5.2: Hladina celkového proteinu ERK1/2 po ovlivnění ERK dráhy.  
C (kontrola), O (orthovanadát), PMA (forbol-12-myristát-13-acetát), O+I (orthovanadát + specifický inhibitor ERK dráhy), PMA+I (PMA + specifický inhibitor ERK dráhy).

Zvýšení hladiny proteinu pJNK bylo detekováno po obou typech aktivace JNK dráhy (O, PMA). Inhibice JNK dráhy (specifickým inhibitorem SP600125) způsobila snížení hladiny pJNK patrné v případě obou typů aktivátorů (O+I, PMA+I) (viz obr. 5.3). Hladina celkového JNK proteinu (viz obr. 5.4) se nezměnila po aktivaci JNK dráhy (O, PMA) ani po inhibici aktivované JNK dráhy (O+I, PMA+I) specifickým inhibitorem (SP600125).

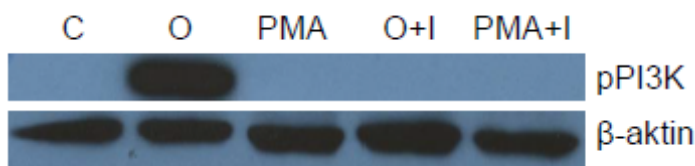


Obr. 5.3: Hladina proteinu pJNK detekovaná po ovlivnění JNK dráhy.  
C (kontrola), O (orthovanadát), PMA (forbol-12-myristát-13-acetát), O+I (orthovanadát + specifický inhibitor JNK dráhy), PMA+I (PMA + specifický inhibitor JNK dráhy).

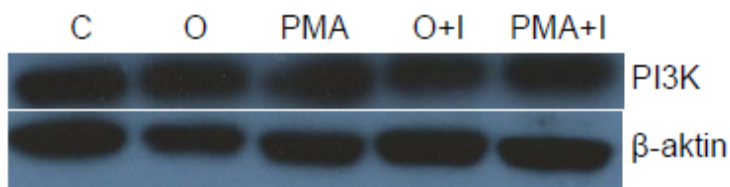


Obr. 5.4: Hladina celkového proteinu JNK po ovlivnění JNK dráhy.  
C (kontrola), O (orthovanadát), PMA (forbol-12-myristát-13-acetát), O+I (orthovanadát + specifický inhibitor JNK dráhy), PMA+I (PMA + specifický inhibitor JNK dráhy).

Protein pPI3K byl detekován (viz obr. 5.5) pouze po aktivaci dráhy PI3K pomocí O. Inhibice PI3K specifickým inhibitorem (LY294002) byla zřetelná pouze po aktivaci pomocí O (O+I). Hladina celkového PI3K proteinu (viz obr. 5.6) se nezměnila po aktivaci PI3K dráhy (O, PMA) ani po inhibici aktivované PI3K dráhy (O+I, PMA+I) specifickým inhibitorem (LY294002).

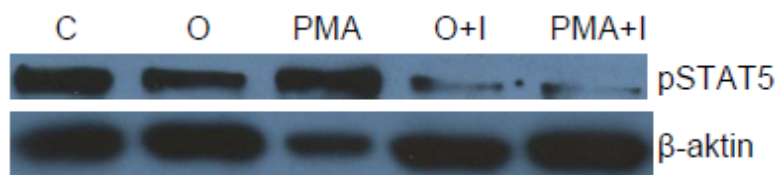


Obr. 5.5: Hladina proteinu pPI3K detekovaná po ovlivnění PI3K dráhy. C (kontrola), O (orthovanadát), PMA (forbol-12-myristát-13-acetát), O+I (orthovanadát + specifický inhibitor PI3K dráhy), PMA+I (PMA + specifický inhibitor PI3K dráhy).



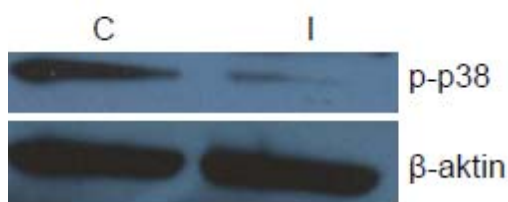
Obr. 5.6: Hladina celkového proteinu PI3K po ovlivnění PI3K dráhy. C (kontrola), O (orthovanadát), PMA (forbol-12-myristát-13-acetát), O+I (orthovanadát + specifický inhibitor PI3K dráhy), PMA+I (PMA + specifický inhibitor PI3K dráhy).

U proteinu pSTAT5 (viz obr. 5.7) bylo detekováno výrazné zvýšení zejména po aktivaci pomocí PMA. Inhibice specifickým inhibitorem (N'-((4-Oxo-4H-chromen-3-yl)methylene)nicotinohydrazide) však byla zřetelná po aktivaci oběma aktivátory. U vzorku po aktivaci PMA byla pravděpodobně na gel nanášena menší koncentrace proteinu, což je patrné na β-aktinu. V tomto případě bylo i přesto detekováno jasné zvýšení hladiny proteinu pSTAT5.

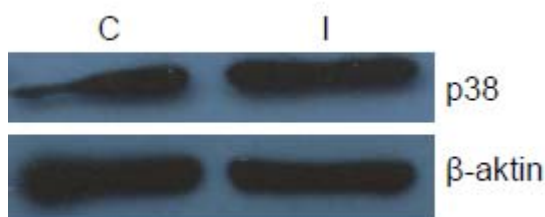


Obr. 5.7: Hladina proteinu pSTAT5 detekovaná po ovlivnění STAT5 dráhy. C (kontrola), O (orthovanadát), PMA (forbol-12-myristát-13-acetát), O+I (orthovanadát + specifický inhibitor STAT5 dráhy), PMA+I (PMA + specifický inhibitor STAT5 dráhy).

Hladina proteinu p-p38 byla po přidání inhibitoru dráhy p38 (SB203580) snížena ve srovnání se vzorkem kontrolním (viz obr. 5.8). Hladina celkového proteinu p38 se po inhibici dráhy p38 specifickým inhibitorem (SB203580) oproti kontrolnímu vzorku nezměnila (viz obr. 5.9).



Obr. 5.8: Hladina proteinu p-p38 detekovaná po ovlivnění p38 dráhy. C (kontrola), I (specifický inhibitor p38 dráhy)



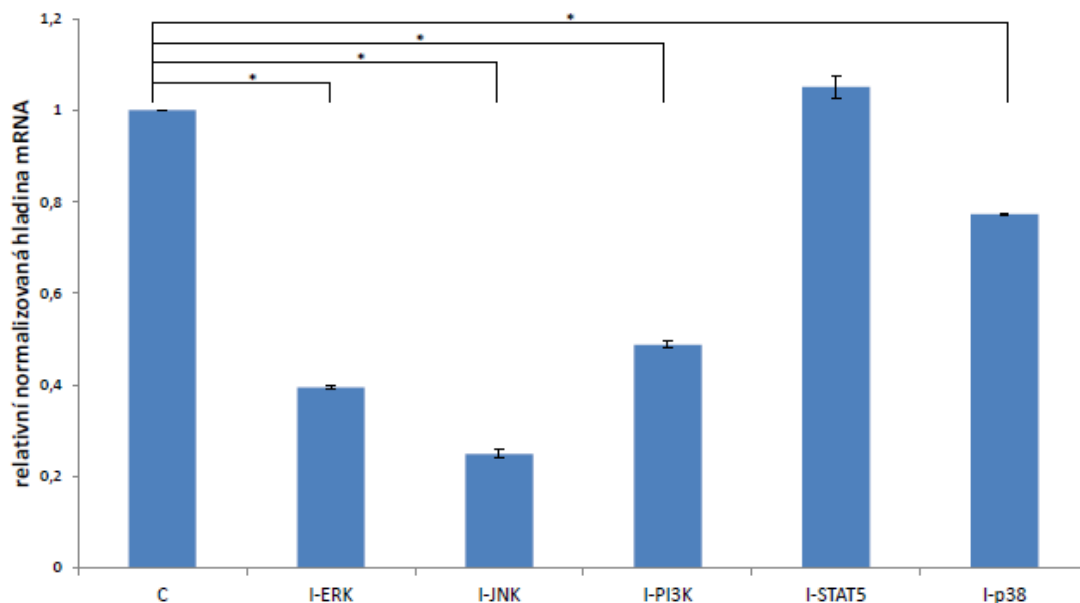
Obr. 5.9: Hladina celkového proteinu p38 po ovlivnění p38 dráhy. C (kontrola), I (specifický inhibitor p38 dráhy)

### 5.1.2 Stanovení hladiny exprese genu *DLX1* po na mRNA úrovni

Stanovení hladiny exprese *DLX1* po inhibici vybraných signálních drah na mRNA úrovni bylo provedeno na buněčné linii MV4;11 pomocí metody qRT-PCR.

Nejprve bylo provedeno stanovení hladiny mRNA v několika časových bodech (2, 8, 24 hod.) a dále bylo zvoleno 9 hod. jako vhodný časový bod pro detekci exprese *DLX1* na proteinové úrovni. Exprese genu *DLX1* na mRNA úrovni byla normalizována k expresi house-keeping genu (kontrolního genu *GAPDH*) a celkové výsledky byly hodnoceny pomocí statistického testu Mann-Whitney. Statistické úsečky v grafech odpovídají směrodatným odchylkám vypočítaným z duplikátů jednotlivých vzorků, které odpovídající expresi genu *DLX1* vztaženého k expresi kontrolního genu.

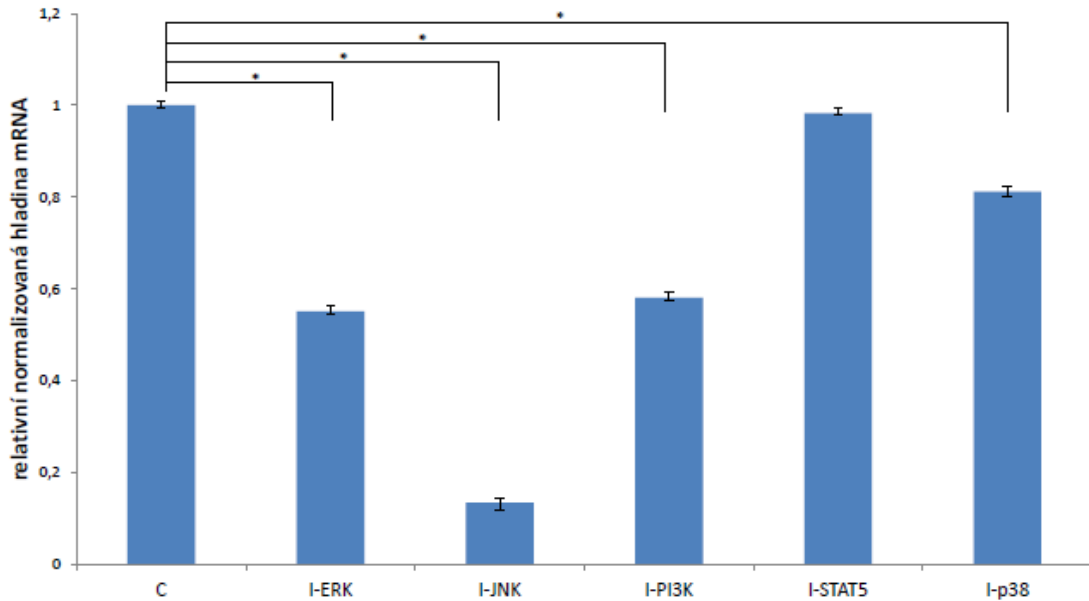
U vzorků odebraných po 2 hodinách od přidání inhibitorů byl identifikován signifikantní rozdíl ( $p$  hodnota  $< 0,05$ ) v hladině exprese genu *DLX1* mezi kontrolním vzorkem (bez přidání inhibitoru) a vzorky s inhibovanými drahami ERK, JNK, PI3K a p38 (I-ERK, I-JNK, I-PI3K, I-p38). Naopak u vzorku s inhibovanou dráhou STAT5 (I-STAT5) nebyl signifikantní rozdíl v hladině exprese genu *DLX1* oproti kontrolnímu vzorku (viz obr. 5.10).



Obr. 5.10: Relativní hladina mRNA genu *DLX1* v časovém bodě 2 hod.

C (kontrola), I-ERK (specifický inhibitor ERK dráhy), I-JNK (specifický inhibitor JNK dráhy), I-PI3K (specifický inhibitor PI3K dráhy), I-STAT5 (specifický inhibitor STAT5 dráhy), I-p38 (specifický inhibitor p38 dráhy); p hodnota < 0,05 ~ signifikantní rozdíl \*

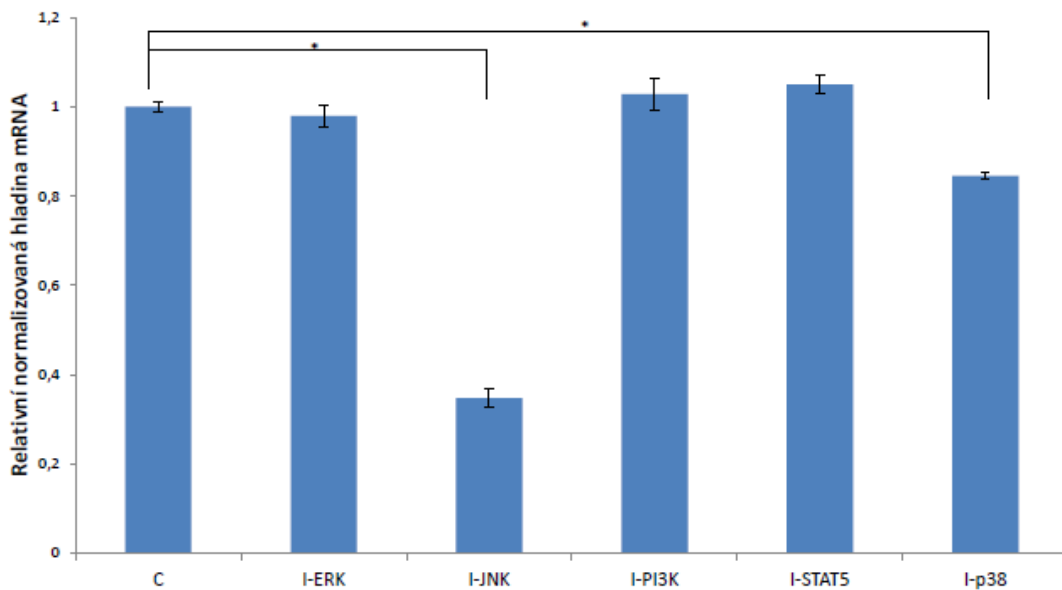
Po 8 hodinách byl rozdíl exprese genu *DLX1* u vzorků s inhibovanými drahami oproti kontrolnímu vzorku (bez inhibitoru) téměř identický jako v časovém bodě 2 hod. U vzorků s inhibovanými drahami ERK, JNK, PI3K a p38 (I-ERK, I-JNK, I-PI3K, I-p38) byl identifikován signifikantní rozdíl oproti kontrolnímu vzorku (p hodnota < 0,05). Naopak u vzorku s inhibovanou dráhou STAT5 (I-STAT5) nebyl prokazatelný rozdíl v hladině exprese genu *DLX1* oproti kontrolnímu vzorku (viz obr. 5.11).



Obr. 5.11: Relativní hladina mRNA genu *DLX1* v časovém bodě 8 hod.

C (kontrola), I-ERK (specifický inhibitor ERK dráhy), I-JNK (specifický inhibitor JNK dráhy), I-PI3K (specifický inhibitor PI3K dráhy), I-STAT5 (specifický inhibitor STAT5 dráhy), I-p38 (specifický inhibitor p38 dráhy); p hodnota < 0,05 ~ signifikantní rozdíl \*

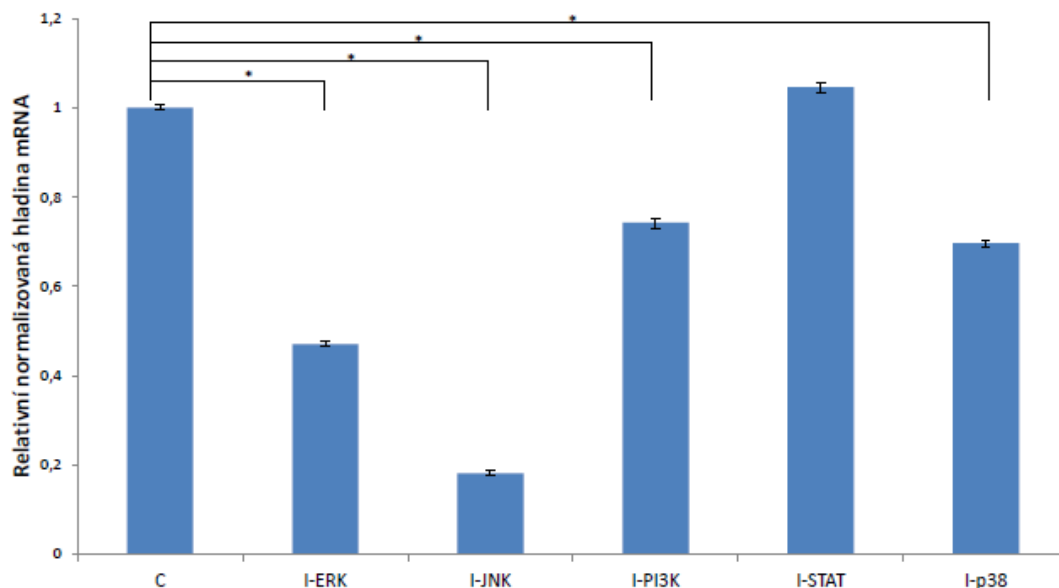
U vzorků odebraných po 24 hodinách od přidání inhibitorů byl signifikantní rozdíl mezi expresí genu *DLX1* kontrolního vzorku (bez inhibitoru) a vzorků s inhibicí konkrétních drah detekován pouze u vzorků I-JNK a I-p38 (p hodnota < 0,05). Naopak u vzorků I-ERK, I-PI3K a I-STAT5 nebyl signifikantní rozdíl oproti kontrolnímu vzorku prokázán (viz obr. 5.12).



Obr 5.12.: Relativní hladina mRNA genu *DLX1* ve vybraném časovém bodě 24 hod.

C (kontrola), I-ERK (specifický inhibitor ERK dráhy), I-JNK (specifický inhibitor JNK dráhy), I-PI3K (specifický inhibitor PI3K dráhy), I-STAT5 (specifický inhibitor STAT5 dráhy), I-p38 (specifický inhibitor p38 dráhy); p hodnota < 0,05 ~ signifikantní rozdíl \*

Po 9 hodinách byl rozdíl exprese genu *DLX1* u vzorků s inhibovanými drahami oproti kontrolnímu vzorku (bez inhibitoru) velmi podobný jako v časových bodech 2 a 8 hod. U vzorků s inhibovanými drahami ERK, JNK, PI3K a p38 (I-ERK, I-JNK, I-PI3K, I-p38) byl ve srovnání s kontrolním vzorkem identifikován signifikantní rozdíl ( $p$  hodnota  $< 0,05$ ). Naopak u vzorku s inhibovanou dráhou STAT5 (I-STAT5) nebyl detekován prokazatelný rozdíl v hladině exprese genu *DLX1* oproti kontrolnímu vzorku (viz obr. 5.13).



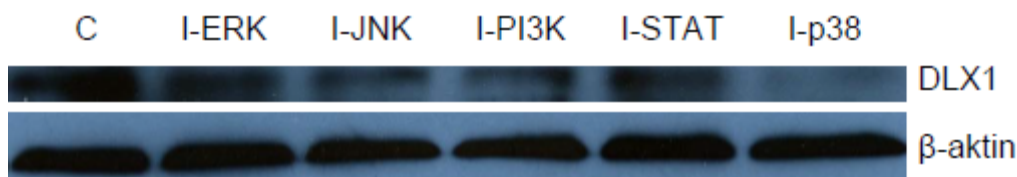
Obr. 5.13: Relativní hladina mRNA genu *DLX1* v časovém bodě 9 hod.

C (kontrola), I-ERK (specifický inhibitor ERK dráhy), I-JNK (specifický inhibitor JNK dráhy), I-PI3K (specifický inhibitor PI3K dráhy), I-STAT5 (specifický inhibitor STAT5 dráhy), I-p38 (specifický inhibitor p38 dráhy);  $p$  hodnota  $< 0,05$  ~ signifikantní rozdíl \*

### 5.1.3 Stanovení hladiny exprese genu *DLX1* na proteinové úrovni

Stanovení hladiny exprese *DLX1* po inhibici vybraných signálních drah na proteinové úrovni bylo provedeno na buněčné linii MV4;11 pomocí metody Western blot.

Na proteinové úrovni bylo detekováno snížení exprese *DLX1* oproti kontrolnímu vzorku (bez přidání inhibitoru) u vzorků I-ERK, I-JNK, I-PI3K a I-p38. Snížení hladiny exprese *DLX1* bylo detekováno nejvíce po inhibici dráhy p38 (I-p38). Naopak po inhibici dráhy STAT5 (I-STAT5) bylo detekováno minimální snížení exprese *DLX1* (viz obr. 5.15).



Obr. 5.15: Hladina proteinu *DLX1* v časovém bodě 9 hod.

C (kontrola), I-ERK (specifický inhibitor ERK dráhy), I-JNK (specifický inhibitor JNK dráhy), I-PI3K (specifický inhibitor PI3K dráhy), I-STAT5 (specifický inhibitor STAT5 dráhy), I-p38 (specifický inhibitor p38 dráhy).

## 5.2 Stanovení aktivity luciferázy pod vlivem určité části *DLX1* promotoru

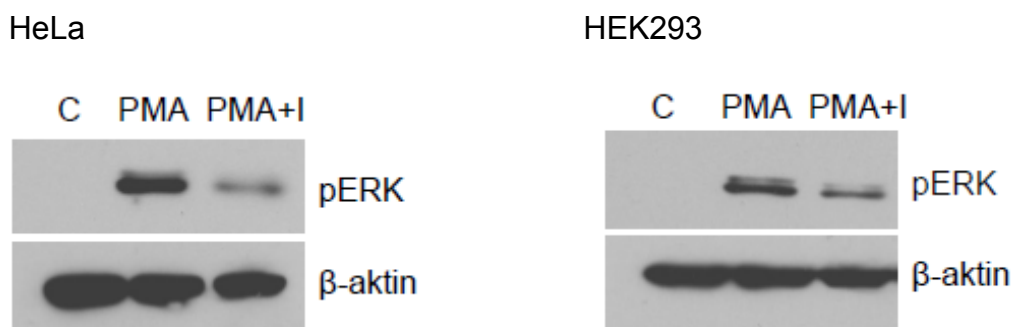
Tento typ experimentu využívající metodu duální luciferázové eseje, byl proveden za účelem ověření hypotézy, která předpokládá regulaci genu *DLX1* (přes ERK/JNK dráhu) probíhající přes AP-1 vazebné místo. V tomto systému se využívají luminiscenční vlastnosti luciferázy, před jejíž gen byl vložen studovaný promotor, nebo pouze část promotorové oblasti.

### 5.2.1 Kontrola funkce příslušného inhibitoru a aktivátoru dráhy ERK

Kontrola byla provedena metodou Western blot (na proteinové úrovni) na buněčných liniích HeLa a HEK 293 s vysokou expresí *DLX1*, jehož regulace je dále sledována metodou luciferázové eseje. Snížení a zvýšení hladiny ERK1/2 proteinu bylo porovnáváno vzhledem ke kontrolnímu vzorku (bez inhibitoru a aktivátoru). Kontrola množství naneseného proteinu byla provedena pomocí  $\beta$ -aktinu.

Funkce aktivátoru a inhibitoru ERK dráhy byla ověřována vždy pro každou jednotlivě připravenou luciferázovou esej. Buňky byly vždy nasazeny a ovlivněny působením aktivátorů a inhibitorů současně pro obě metody (western blot a luciferázová esej). Níže použité obrázky jsou pouze reprezentativní.

U obou buněčných linií (HeLa a HEK293) bylo detekováno zvýšení hladiny pERK po přidání aktivátoru PMA. Zároveň přidání inhibitoru ERK dráhy (U0126) po aktivaci vedlo ke snížení pERK1/2 (viz obr. 5.16 a obr. 5.17).



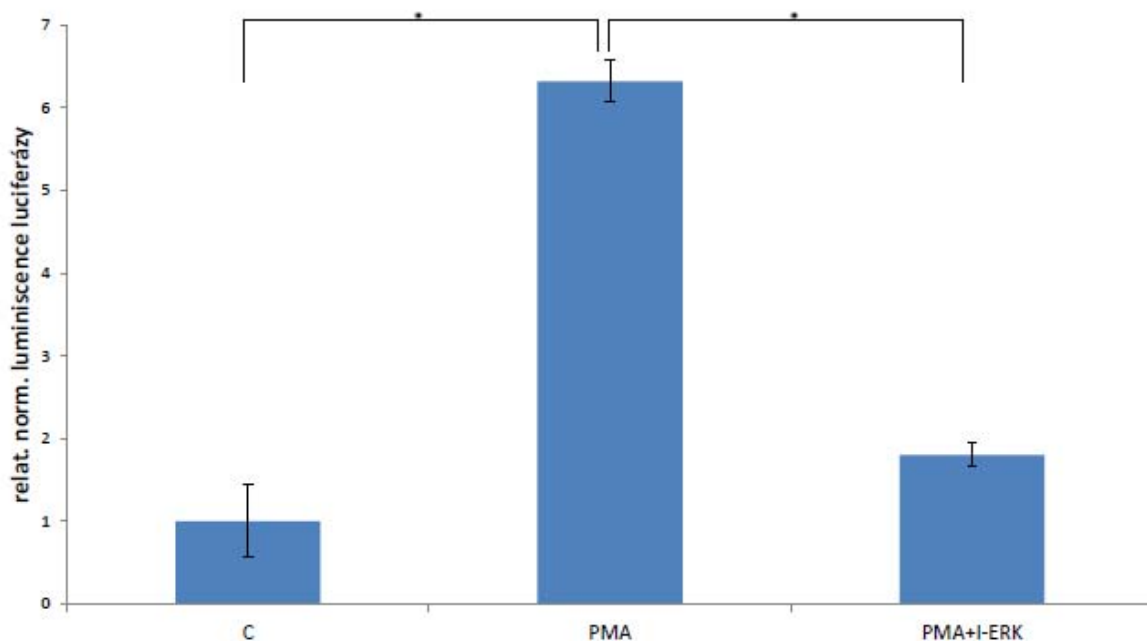
Obr. 5.16, 5.17: Hladina proteinu pERK1/2 detekovaná po ovlivnění ERK dráhy. C (kontrola), PMA (forbol-12-myristát-13-acetát), PMA+I-ERK (PMA + specifický inhibitor ERK dráhy)

### 5.2.2 Luciferázová aktivita pod vlivem kontrolního promotoru

Nejprve bylo provedeno stanovení hladiny luciferázy pod vlivem kontrolního promotoru. Tento experiment byl realizován za účelem kontroly funkčnosti celého navrženého experimentálního systému duální luciferázové eseje.

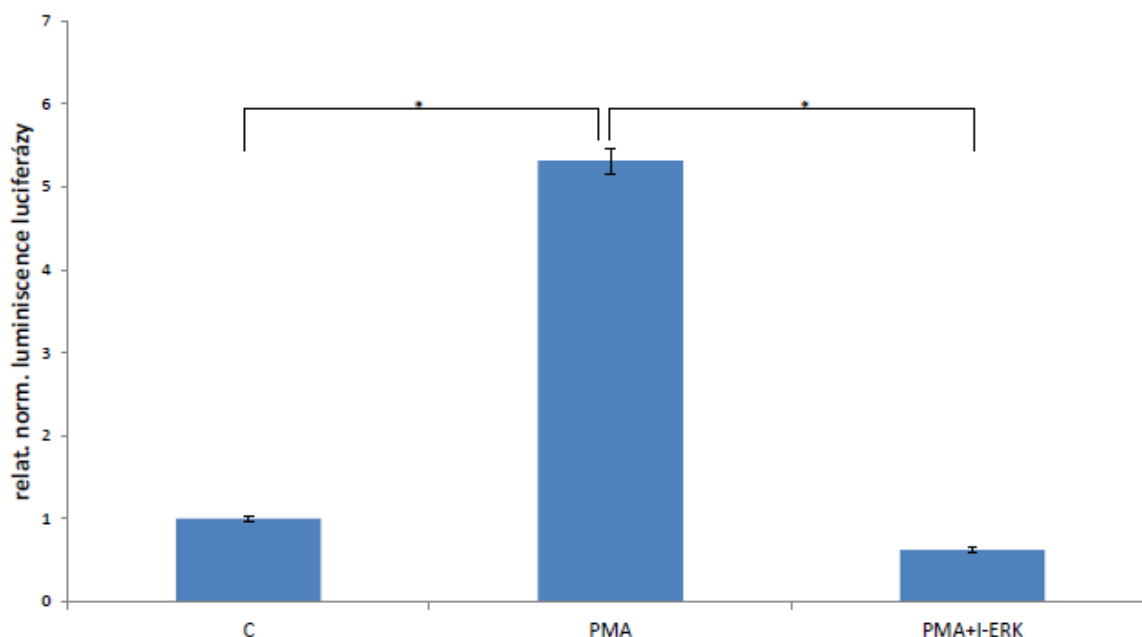
Stanovení hladiny exprese luciferázy bylo provedeno na buněčných liniích HeLa a HEK293 metodou duální luciferázové eseje. Do buněk byl transfekován kontrolní plazmid polyAP1 obsahující luciferázový reporter a před něho vloženou repetitivní (7×) AP-1 vazebnou sekvencí. Výsledná luminiscence luciferázy pod tímto promotorem byla v rámci normalizace dat vztažena k luminiscenci renilly z plazmidu pRl. Výsledky byly zpracovány pomocí statistického testu Mann-Whitney. Ilustrační grafy pro tento pokus jsou pouze reprezentativní. Statistické úsečky v grafech odpovídají směrodatným odchylkám vypočítaným z jednotlivých čtyřplikátů každého vzorku odpovídajících luminiscenci luciferázy normalizované k hladině luminiscence renilly. Statistika byla vytvořena pro minimálně tři opakování stejného pokusu.

U kontrolního typu konstrukt (pGL3\_polyAP1) vloženého do buněčné linie HeLa byl detekován signifikantní rozdíl ( $p$  hodnota  $< 0,0001$ ) jak mezi kontrolním vzorkem (bez aktivátoru/inhibitoru) a aktivovaným vzorkem (PMA), tak mezi aktivovaným vzorkem (PMA) a vzorkem inhibovaným po aktivaci (PMA+I-ERK). Po aktivaci ERK dráhy pomocí PMA bylo pozorováno výrazné zvýšení hladiny luminiscence luciferázy, zatímco po inhibici aktivované ERK (PMA+I-ERK) dráhy bylo detekováno výrazné snížení luminiscence (viz obr. 5.18).



Obr. 5.18: Relativní normalizovaná luminiscence luciferázy z kontrolního plazmidu polyAP1 u buněčné linie HeLa (inhibice ERK dráhy). C (kontrola), PMA (forbol-12-myristát-13-acetát), PMA+I-ERK (PMA + specifický inhibitor ERK dráhy); p hodnota < 0,05 ~ signifikantní rozdíl \*

U kontrolního typu konstruktů (pGL3\_polyAP1) vloženého do buněčné linie HEK293 byly pozorovány podobné změny luminiscence luciferázy jako v případě buněčné linie HeLa. Signifikantní rozdíl (p hodnota < 0,0001) byl detekován jak mezi kontrolním vzorkem (bez aktivátoru/inhibitoru) a aktivovaným vzorkem (PMA), tak mezi aktivovaným vzorkem (PMA) a vzorkem inhibovaným po aktivaci (PMA+I-ERK). Po aktivaci ERK dráhy pomocí PMA bylo pozorováno výrazné zvýšení hladiny luminiscence luciferázy, zatímco po inhibici aktivované ERK (PMA+I-ERK) dráhy bylo detekováno výrazné snížení luminiscence (viz obr. 5.19).



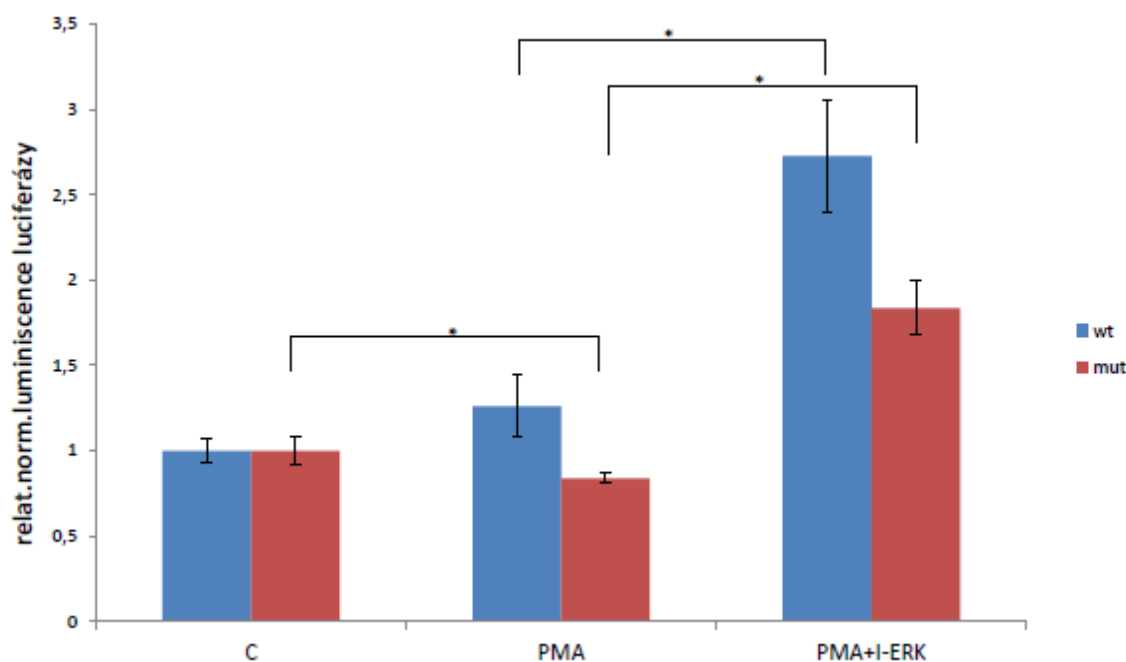
Obr. 5.19: Relativní normalizovaná luminiscence luciferázy u kontrolního plazmidu polyAP1 u buněčné linie HEK293 (inhibice ERK)  
 C (kontrola), PMA (forbol-12-myristát-13-acetát), PMA+I-ERK (PMA + specifický inhibitor ERK dráhy);  
 p hodnota < 0,05 ~ signifikantní rozdíl \*

### 5.2.3 Luciferázová aktivita pod vlivem krátkého promotoru

Následně bylo provedeno stanovení hladiny luciferázové aktivity pod vlivem krátké části promotoru genu *DLX1* (v okolí AP-1 vazebného místa) metodou duální luciferázové eseje. Ke stanovení hladiny luminiscence luciferázy byly využity buněčné linie HeLa a HEK293. Do buněk byl transfekován plazmid pGL3 obsahující gen pro luciferázu, před který byla vložena krátká část promotoru genu *DLX1* (200 bp, -40 bp +160 bp od TSS). Výsledná luminiscence luciferázy byla v rámci normalizace dat vztažena k luminiscenci renilly z plazmidu pRL. Pro každý výsledek byl vytvořen reprezentativní graf. Výsledky několika opakování pokusů byly zpracovány pomocí statistického testu Mann-Whitney. Ilustrační grafy pro tento pokus jsou pouze reprezentativní. Statistické úsečky v grafech odpovídají směrodatným odchylkám vypočítaným z jednotlivých čtyřplikátů každého vzorku, které odpovídají luminiscenci luciferázy normalizované k hladině luminiscence renilly. Statistika byla vytvořena pro minimálně tři opakování stejného pokusu.

U divokého typu konstruktů (pGL3\_wtAP1) transfekovaných do buněčné linie HeLa nebyl detekován signifikantní rozdíl v luciferázové aktivitě mezi kontrolním vzorkem (bez aktivátoru/inhibitoru) a vzorkem po aktivaci PMA. Naopak signifikantní rozdíl (p hodnota ~ 0,0027) byl identifikován mezi vzorkem aktivovaným (PMA) a vzorkem inhibovaným po

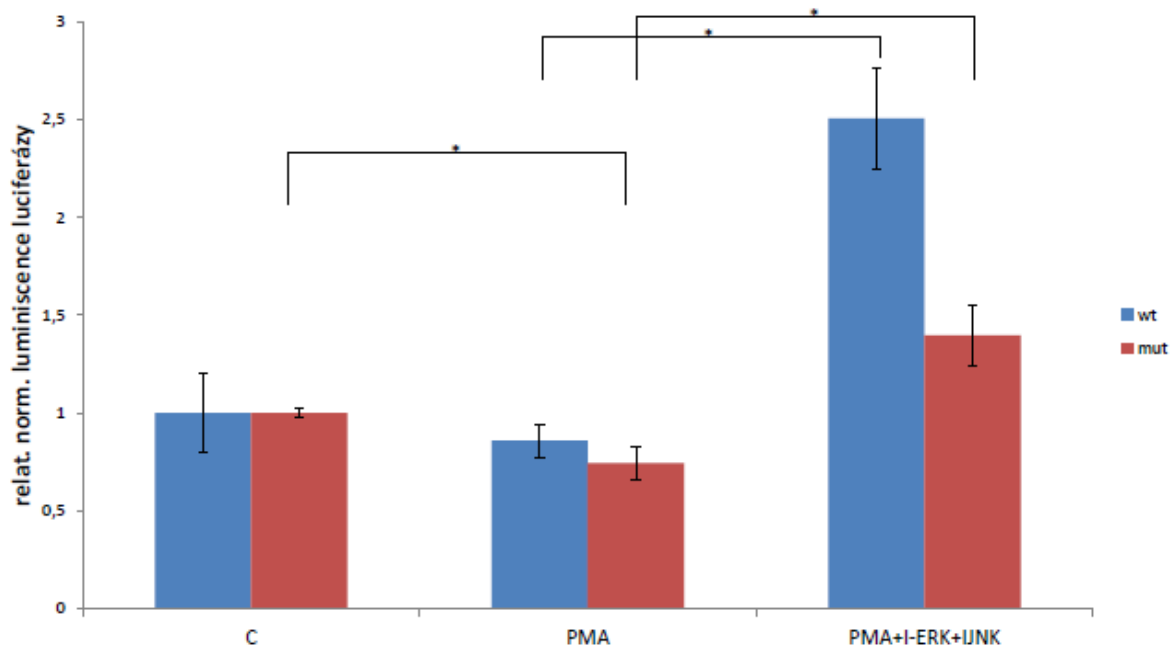
aktivaci (PMA+I-ERK), přičemž bylo patrné zvýšení luminiscence luciferázy pod krátkou částí promotoru po inhibici aktivované ERK dráhy. U mutovaného typu konstruktu (pGL3\_mutAP1) byl detekován hraničně signifikantní rozdíl mezi kontrolním vzorkem (bez aktivátoru/inhibitoru) a vzorkem aktivovaným PMA (p hodnota ~ 0,0433). Signifikantní rozdíl (zvýšení luminiscence luciferázy pod mutovaným typem krátké části promotoru) byl detekován mezi aktivovaným vzorkem (PMA) a inhibovaným vzorkem po aktivaci (PMA+I-ERK) (p hodnota ~ 0,0209) (viz obr. 5.20).



Obr. 5.20: Relativní normalizovaná luminiscence luciferázy u buněčné linie HeLa (inhibice ERK) C (kontrola), PMA (forbol-12-myristát-13-acetát), PMA+I-ERK (PMA + specifický inhibitor ERK dráhy); p hodnota < 0,05 ~ signifikantní rozdíl \*

U divokého typu konstruktů (pGL3\_wtAP1) vloženého do buněčné linie HeLa nebyl detekován signifikantní rozdíl v luciferázové aktivitě mezi vzorkem kontrolním (bez aktivátoru/inhibitoru) a vzorkem aktivovaným PMA. Naopak signifikantní rozdíl (p hodnota ~ 0,0339) byl identifikován mezi aktivovaným vzorkem (PMA) a vzorkem inhibovaným po aktivaci (PMA+I-ERK+I-JNK). Při společné inhibici aktivovaných drah ERK a JNK je patrná tendence zvýšení hladiny luminiscence luciferázy pod tímto typem promotoru. U mutovaného typu konstruktů (pGL3\_mutAP1) byl identifikován signifikantní rozdíl luminiscence luciferázy, jak mezi vzorkem kontrolním (bez aktivátoru/inhibitoru) a vzorkem aktivovaným PMA (p hodnota ~ 0,0339), tak mezi vzorkem aktivovaným (PMA) a vzorkem inhibovaným po aktivaci (PMA+I-ERK+I-JNK) (p hodnota ~ 0,0209). Tendence změny luminiscence

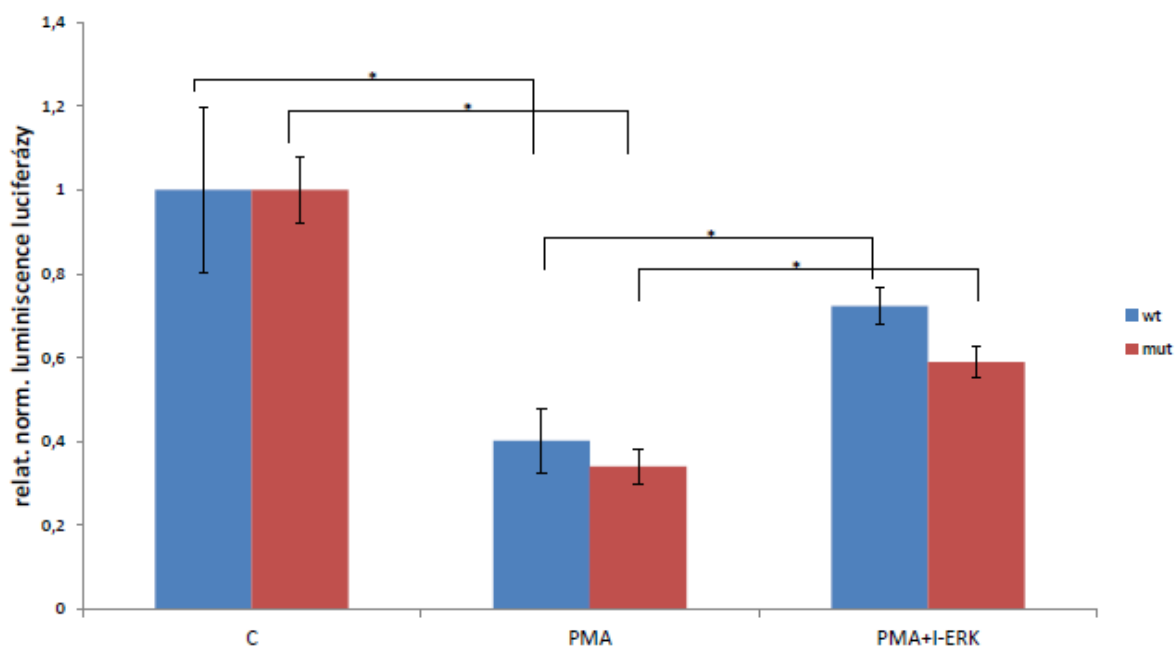
luciferázy odpovídá mírnému snížení po aktivaci ERK dráhy (PMA) a následné zvýšení po inhibici aktivovaných drah ERK a JNK (PMA+I-ERK+I-JNK) (viz obr. 5.21). Tento pokus byl proveden pouze jednou, proto hodnoty reprezentativního grafu odpovídají všem hodnotám použitým ve statistickém vyhodnocení.



Obr. 5.21: Relativní normalizovaná luminiscence luciferázy u buněčné linie HeLa (inhibice ERK a JNK současně)

C (kontrola), PMA ((forbol-12-myristát-13-acetát), PMA+I-ERK +I-JNK (PMA + specifický inhibitor ERK dráhy + specifický inhibitor JNK dráhy); p hodnota < 0,05 ~ signifikantní rozdíl \*

U divokého typu konstruktů (pGL3\_wtAP1) transferovaného do buněčné linie HEK293 byl detekován vysoce signifikantní rozdíl (p hodnota ~ 0,0003) v luciferázové aktivitě mezi kontrolním vzorkem (bez aktivátoru/inhibitoru) a vzorkem aktivovaným PMA. Signifikantní rozdíl (p hodnota ~ 0,0067) luminiscence byl identifikován také mezi vzorkem aktivovaným (PMA) a vzorkem inhibovaným po aktivaci (PMA+I-ERK). Tendence změny luminiscence luciferázy odpovídá zřetelnému snížení po aktivaci ERK dráhy (PMA) a následnému zvýšení po inhibici aktivované ERK dráhy (PMA+I-ERK). U mutovaného typu konstruktů (pGL3\_mutAP1) byl pozorován signifikantní rozdíl (p hodnota < 0,0001) luminiscence luciferázy mezi kontrolním vzorkem (bez aktivátoru/inhibitoru) a vzorkem aktivovaným PMA. Mezi aktivovaným vzorkem (PMA) a vzorkem inhibovaným po aktivaci (PMA+I-ERK) byl také identifikován signifikantní rozdíl luminiscence (p hodnota ~ 0,0026). Změna luminiscence luciferázy pod mutovaným typem AP-1 části promotoru byla velmi podobná jako v případě luminiscence pod divokou formou tohoto promotoru (viz obr. 5.22).



Obr. 5.22: Relativní normalizovaná luminiscence luciferázy u buněčné linie HEK293 (inhibice ERK) C (kontrola), PMA (forbol-12-myristát-13-acetát), PMA+I-ERK (PMA + specifický inhibitor ERK dráhy); p hodnota < 0,05 ~ signifikantní rozdíl \*

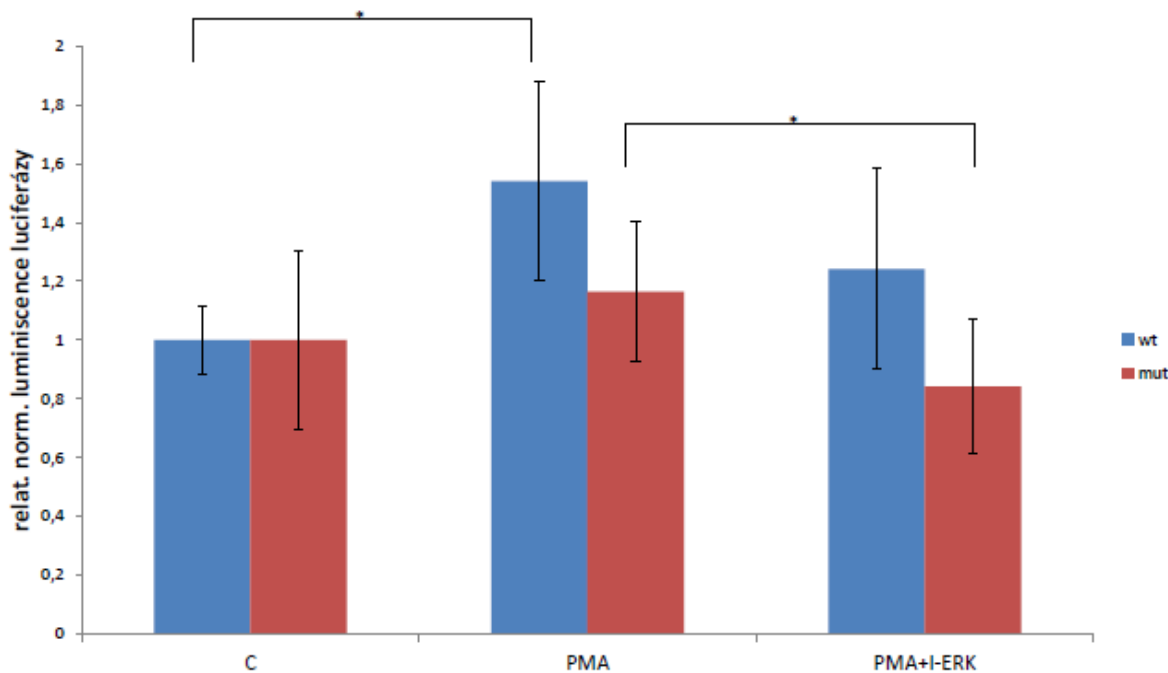
#### 5.2.4 Luciferázová aktivita pod vlivem dlouhého promotoru

Nakonec bylo realizováno stanovení luciferázové aktivity pod vlivem dlouhé části promotoru genu *DLX1* (v okolí AP-1 vazebného místa). Tento experiment byl proveden za účelem ověření nutné přítomnosti dalších vazebných míst pro jiné transkripční faktory na promotoru genu *DLX1*.

Stanovení hladiny exprese luciferázy bylo provedeno na buněčné linii HeLa metodou duální luciferázové eseje. Do buněk byl transfekován plazmid pGL3 obsahující gen pro luciferázu, před který byl vložena dlouhá část promotoru genu *DLX1* (1605 bp, -873 bp +732 bp od TSS). Výsledná luminiscence luciferázy pod tímto promotorem byla v rámci normalizace dat vztažena k luminiscenci renilly z plazmidu pRl. Výsledky byly zpracovány pomocí statistického testu Mann-Whitney.

U konstruktů divokého typu (pGL3\_wt-wpDLX1) vloženého do buněčné linie HeLa byl prokázán rozdíl mezi luminiscencí kontrolního vzorku (bez aktivátoru/inhibitoru) a vzorku po aktivaci PMA (p hodnota ~ 0,0063). Rozdílná luminiscence u tohoto konstruktů mezi vzorkem aktivovaným (PMA) a vzorkem inhibovaným po aktivaci (PMA+I-ERK) byla detekována, avšak na hladině statistické významnosti nebyla signifikantní (p hodnota ~

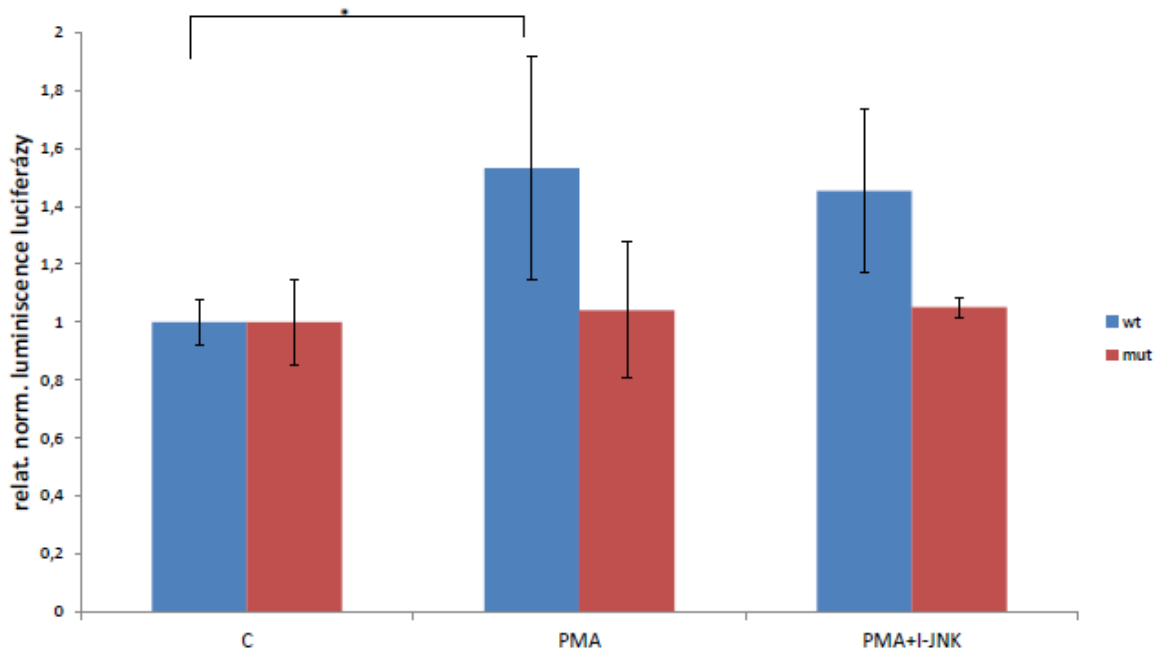
0,0929). Po aktivaci ERK dráhy pomocí PMA bylo pozorováno zvýšení hladiny luminiscence luciferázy pod dlouhou částí promotoru DLX1, zatímco po inhibici aktivované ERK dráhy (PMA+I-ERK) bylo detekováno snížení luminiscence. U konstruktů mutovaného typu (pGL3\_mut-wpDLX1) nebyl prokázán signifikantní rozdíl v luminiscenci kontrolního vzorku (bez aktivátoru/inhibitoru) a vzorku aktivovaného PMA. U tohoto konstruktu byl detekován hraničně signifikantní rozdíl mezi vzorkem aktivovaným PMA a vzorkem inhibovaným po aktivaci (p hodnota ~ 0,0460). U mutovaného typu konstruktu byla pozorována podobná tendence změny luminiscence luciferázy po aktivaci a inhibici ERK dráhy, ale rozdíly byly identifikovány nižší (viz obr. 5.23). Graf pro tento pokus je pouze reprezentativní. Statistické úsečky v grafu odpovídají směrodatným odchylkám vypočítaným z jednotlivých čtyřplikátů každého vzorku, které odpovídají luminiscenci luciferázy normalizované k hladině luminiscence renilly. Statistika byla vytvořena pro minimálně tři opakování stejného pokusu.



Obr. 5.23: Relativní normalizovaná luminiscence luciferázy u buněčné linie HeLa (inhibice ERK) C (kontrola), PMA (forbol-12-myristát-13-acetát), PMA+I-ERK (PMA + specifický inhibitor ERK dráhy); p hodnota < 0,05 ~ signifikantní rozdíl \*

U divokého typu konstruktů (pGL3\_wt-wpDLX1) transfekovaného do buněčné linie HeLa byl identifikován rozdíl (p hodnota ~ 0,0339) v luciferázové aktivitě kontrolního vzorku (bez aktivátoru/inhibitoru) a vzorku aktivovaného (PMA). Naopak mezi vzorkem aktivovaným (PMA) a vzorkem inhibovaným po aktivaci (PMA+I-JNK) nebyl identifikován významný rozdíl luminiscence. Tendence změny luminiscence při inhibici dráhy JNK odpovídala změnám při inhibici dráhy ERK. Po aktivaci JNK dráhy pomocí PMA bylo

pozorováno zvýšení hladiny luminiscence luciferázy pod tímto typem promotoru, zatímco po inhibici aktivované JNK dráhy (PMA+I-JNK) bylo detekováno snížení luminiscence. U mutovaného typu konstruktů (pGL3\_mut-wpDLX1) nebyl identifikován statisticky významný rozdíl luminiscence luciferázy pod mutovaným typem dlouhé části promotoru *DLX1* jak mezi kontrolním vzorkem (bez aktivátoru/inhibitoru) a vzorkem aktivovaným (PMA), tak mezi aktivovaným vzorkem (PMA) a vzorkem inhibovaným po aktivaci (PMA+I-JNK) (viz obr. 5.24). Tento pokus byl proveden pouze jednou, proto hodnoty reprezentativního grafu odpovídají všem hodnotám použitým ve statistickém vyhodnocení. Statistické úsečky v grafu odpovídají směrodatným odchýlkám vypočítaným z jednotlivých čtyřplikátů každého vzorku odpovídajících luminiscenci luciferázy normalizované k hladině luminiscence renilly.



Obr. 5.24: Relativní normalizovaná luminiscence luciferázy u buněčné linie HeLa (inhibice JNK) C (kontrola), PMA (forbol-12-myristát-13-acetát), PMA+I-JNK (PMA + specifický inhibitor JNK dráhy); p hodnota < 0,05 ~ signifikantní rozdíl \*

## 6 Diskuze

### 6.1 Stanovení hladiny exprese genu *DLX1* po inhibici vybraných signálních drah

První část diplomové práce byla zaměřena na identifikaci drah ovlivňujících expresi genu *DLX1*. Použitím specifických inhibitorů vybraných signálních drah byla detekována změna exprese genu *DLX1* na mRNA a proteinové úrovni.

Stanovení hladiny exprese genu *DLX1* bylo provedeno z důvodu identifikace vybraných efektorových drah, které by mohly regulovat jeho expresi. Změny hladiny exprese genu *DLX1* byly pozorovány po inhibici ERK, JNK, PI3K, p38 a STAT5 signálních drah. Tyto dráhy jsou součástí FLT3 kinázové regulační kaskády, jejíž vliv na expresi genu *DLX1* se už podařilo prokázat (Starkova et al., 2011). Působení drah ERK, JNK, PI3K a p38 na expresi *DLX1* na mRNA úrovni popsala ve svém článku školitelka doktorka Starková (Starkova et al., 2011). Tato diplomová práce však rozšiřuje výzkum i o proteinovou úroveň. Nově bylo zařazeno sledování efektu dráhy STAT5 jako možného dalšího efektoru.

#### 6.1.1 Kontrola funkce příslušných inhibitorů

Nejprve byla na proteinové úrovni úspěšně provedena kontrola funkce všech použitých inhibitorů (I-ERK, I-JNK, I-PI3K, I-p38, I-STAT5) pro sledování změny exprese genu *DLX1*.

#### 6.1.2 Stanovení hladiny exprese *DLX1* na mRNA a proteinové úrovni

Výsledné stanovení exprese genu *DLX1* po inhibici vybraných signálních drah bylo provedeno v časovém bodě 9 hod (po přidání inhibitorů) na mRNA i proteinové úrovni. Na mRNA úrovni byl identifikován signifikantní rozdíl (oproti kontrolnímu vzorku) v případě inhibice drah ERK, JNK, PI3K a p38. Nejvýznamnější snížení hladiny exprese genu *DLX1* bylo pozorováno po inhibici drah ERK a JNK. Snížení hladiny exprese *DLX1* po inhibici těchto drah bylo pozorováno také na proteinové úrovni, kde bylo detekováno nejvýznamnější snížení hladiny *DLX1* (oproti kontrolnímu vzorku) po inhibici dráhy p38. Z uvedeného lze tedy předpokládat, že dráha p38 má mj. významný vliv na expresi genu *DLX1*, což se potvrdilo také na mRNA úrovni. Další možnou dráhou ovlivňující expresi genu *DLX1* je PI3K. Po inhibici této dráhy bylo patrné snížení hladiny *DLX1* na mRNA i proteinové úrovni. Naopak inhibice dráhy STAT5 nezpůsobila změnu hladiny *DLX1* na mRNA ani proteinové úrovni.

Velmi podobné výsledky byly publikovány v článku školitelky doktorky Starkové, kde bylo prokázáno významné snížení hladiny exprese genu *DLX1* po inhibici ERK a JNK dráhy na mRNA úrovni (Starkova et al., 2011). Tyto dráhy aktivují podjednotky transkripčního faktoru AP-1 (Fos a Jun) (Hess et al., 2004). Hypotéza vlivu ERK/JNK dráhy byla podpořena přítomností vazebného místa pro AP-1 transkripční faktor na promotoru genu *DLX1*. Lze tedy předpokládat, že aktivovaný transkripční faktor AP-1 nasedá na možné vazebné místo promotoru *DLX1*, čímž ovlivňuje expresi tohoto genu (Starkova et al., 2011).

## **6.2 Stanovení aktivity luciferázy pod vlivem určité části DLX1 promotoru**

Druhá část diplomové práce byla zaměřena na ověření hypotézy předpokládající regulaci exprese genu *DLX1* (přes ERK/JNK dráhu) přes AP-1 vazebné místo na promotoru. Tato hypotéza byla ověřena pomocí metody duální luciferázová esej, pro kterou byly připraveny konstrukty obsahující krátkou a dlouhou část promotoru genu *DLX1* vloženou před gen pro luciferázu.

### **6.2.1 Kontrola funkce příslušného inhibitoru a aktivátoru dráhy ERK pro luciferázovou esej**

Kontrola funkce aktivátoru (PMA) a inhibitoru (I-ERK) ERK dráhy byla ověřována pro každou luciferázovou esej zvlášť. V případě nefunkčního inhibitoru ERK dráhy byly výsledky luciferázové eseje zkráceny, a proto nebyly následně započítány do statistiky.

### **6.2.2 Luciferázová aktivita pod vlivem kontrolního promotoru**

K ověření funkčnosti celého experimentálního systému byl experiment proveden s komerčním konstruktem (pGL3\_polyAP1), který pro tento účel sloužil jako kontrolní. Část promotoru vkládaná před gen pro luciferázu v daném případě obsahovala pouze repetitivní (7×) AP-1 vazebnou sekvenci. Tímto konstruktem byla ověřena správnost našeho experimentálního systému v obou buněčných liniích HeLa a HEK293. Po aktivaci ERK dráhy bylo pozorováno signifikantní zvýšení luminiscence pod polyAP1 částí promotoru oproti kontrole. Naopak inhibice aktivované ERK dráhy vedla k výraznému snížení hladiny luminiscence ve srovnání s luminiscencí po aktivaci této dráhy. Nadpočetné množství AP-1 vazebných míst v promotoru pravděpodobně způsobuje výraznější změny exprese cílového

genu a zároveň je citlivější k působení efektorových drah. Používaný experimentální systém byl proto z výše uvedeného důvodu označen jako funkční.

### 6.2.3 Luciferázová aktivita pod vlivem krátkého promotoru

Pro důkaz vlivu ERK/JNK dráhy na transkripční regulaci genu byl vytvořen konstrukt pGL3\_wtAP1 obsahující krátkou část promotorové oblasti genu *DLXI* (200 bp, -40 bp +160 bp od TSS) vložené do luciferázového vektoru pGL3) a jeho mutovaný protějšek pGL3\_mutAP1 (mutace v AP-1 místě), které byly využity pro metodu duální luciferázové eseje. Po vložení krátké části promotoru genu *DLXI* do vektoru pGL3 se gen pro luciferázu dostal pod jeho vliv. Pomocí luminiscence luciferázy bylo tedy možné určit vliv AP-1 místa a jeho okolí na regulaci transkripce.

V případě buněčné linie HeLa bylo pozorováno mírné, ale nesignifikantní zvýšení luciferázové aktivity pod vlivem krátké části promotoru genu *DLXI* v případě aktivace ERK dráhy oproti kontrole (bez aktivace). Po inhibici aktivované ERK dráhy se však luminiscence luciferázy výrazně zvýšila. Tato skutečnost neodpovídala naší hypotéze, na základě které by měla aktivace ERK dráhy vést ke zvýšení luminiscence, zatímco inhibice této dráhy by způsobila její snížení. U mutovaného typu konstruktu pGL3\_mutAP1 vedla aktivace ERK dráhy ke snížení hladiny luminiscence pod tímto typem promotoru a naopak inhibice této dráhy způsobila její zvýšení. Ačkoli byly změny luminiscence luciferázy pod mutovaným typem AP-1 části promotoru méně výrazné než v případě divokého typu, výsledky naší hypotéze opět neodpovídaly. Předpokládali jsme, že mutace v oblasti AP-1 nepovede k žádným změnám v expresi pod zmiňovaným typem promotoru. Vzhledem k tomu, že funkci AP-1 transkripčního faktoru ovlivňuje také dráha JNK, byl proveden pokus s konstrukty pGL3\_wtAP1 a pGL3\_mutAP1 se současnou inhibicí drah ERK a JNK. Změny hladiny luminiscence luciferázy pod divokým a mutovaným typem promotoru byly téměř identické jako v případě inhibice samotné ERK dráhy. Z uvedeného důvodu byl nadále používán pouze inhibitor dráhy ERK.

Kvůli možnému zkreslení výsledků vlivem specifického prostředí v buňkách linie HeLa byl tento pokus proveden také v buněčné linii HEK293. V případě divokého typu konstruktu (pGL3\_wtAP1) bylo identifikováno signifikantní snížení hladiny luminiscence luciferázy pod tímto typem promotoru po aktivaci ERK dráhy oproti kontrole. Po inhibici aktivované ERK dráhy bylo naopak prokázáno signifikantní zvýšení oproti aktivovanému vzorku. Výsledky s použitým mutovaným konstruktem (pGL3\_mutAP1) vykazovaly stejnou tendenci změny hladiny luminiscence, ovšem s mírnějšími rozdíly. Hypotéza tedy nebyla

podpořena ani výsledky na buněčné linii HEK293. Zároveň byl vyloučen buněčně specifický vliv linie HeLa.

Vzhledem k tomu, že v případě mutovaného konstrukt (pGL3\_mutAP1) byly ve všech pokusech změny hladiny luminiscence luciferázy menší než u konstrukt divokého typu (pGL3\_wtAP1), lze předpokládat alespoň částečný vliv AP-1 vazebného místa na regulaci exprese cílového genu.

#### **6.2.4 Luciferázová aktivita pod vlivem dlouhého promotoru**

Vzhledem k výsledkům luciferázové eseje s konstrukty, které obsahují pouze krátkou část promotoru genu *DLX1* v okolí AP-1 místa, lze předpokládat, že kromě AP-1 vazebného místa jsou k regulaci exprese genu potřeba i další vazebná místa specifická pro jiné transkripční faktory vyskytující se na tomto promotoru. Z tohoto důvodu byl připraven konstrukt obsahující dlouhou část promotoru genu *DLX1* (1605 bp, -873 bp +732 bp od TSS) vloženou do vektoru pGL3 (pGL3\_wt-wpDLX1) a konstrukt identický, který se lišil pouze mutací v AP-1 vazebném místě (pGL3\_mut-wpDLX1). Pomocí luciferázové aktivity byl následně určován vliv celého promotoru genu *DLX1* na regulaci transkripce.

Připravený konstrukt pGL3\_wt-wpDLX1 byl transfekován do buněčné linie HeLa a ovlivněn aktivátorem a inhibítozem ERK dráhy. Po aktivaci ERK dráhy bylo detekováno signifikantní zvýšení luminiscence luciferázy pod divokým typem dlouhé části *DLX1* promotoru oproti kontrole. Naopak inhibice aktivované ERK dráhy způsobila nesignifikantní, avšak viditelné snížení luminiscence luciferázy ve srovnání s luminiscencí po aktivaci ERK dráhy. Tato skutečnost podporuje naši původní hypotézu, kdy se s aktivací ERK dráhy zvyšuje exprese genu *DLX1* pod promotorem obsahujícím AP-1 vazebné místo, zatímco po inhibici aktivované ERK dráhy se exprese snižuje. V případě mutovaného konstrukt pGL3\_mut-wpDLX1 byla pozorována stejná tendence změny jako u konstrukt divokého typu, ovšem s viditelně menšími rozdíly.

Tento pokus byl se stejnými konstrukty opakován pro aktivaci a inhibici JNK dráhy. Výsledky s konstruktem pGL3\_wt-wpDLX1 odpovídaly předchozím výsledkům po aktivaci a inhibici dráhy ERK, což taktéž plně podpořilo naši pracovní hypotézu. Po aktivaci a inhibici JNK dráhy u mutovaného typu konstrukt pGL3\_mut-wpDLX1 byly rozdíly v luminiscenci nesignifikantní a výrazně menší než v případě luminiscence pod divokým typem promotoru. Znatelně menší rozdíly luminiscence během ovlivnění drah ERK a JNK u mutovaného konstrukt oproti konstrukt divokého typu značně podporují naši hypotézu o významnosti AP-1 vazebného místa v promotoru genu *DLX1*.

S ohledem na získané výsledky lze tvrdit, že AP-1 vazebné místo v promotoru genu *DLX1* hraje důležitou, ne však plně postačující úlohu v regulaci exprese cílového genu. Na regulaci exprese genu *DLX1* mají pravděpodobně vliv také jiné transkripční faktory aktivované ERK dráhou jako jsou ELK1 (ETS (E-twenty six) domain-containing protein ELK1), CREB (cAMP response element-binding protein) (Davis et al., 2000; Vanhoutte et al., 1999), c-Myc (Pintus et al., 2002) a další, jejichž vazebná místa byla na promotoru zpětně identifikována.

## 7 Souhrn

Vzhledem k tomu, že vztah mezi expresí genu *DLXI* a aktivitou FLT3 kinázy byl prokázán již v publikaci školitelky doktorky Starkové (Starkova et al., 2011), bylo smyslem této diplomové práce rozšířit zmíněné poznatky, resp. zaměřit se na regulaci exprese genu *DLXI* přes dráhy regulované FLT3 kinázou. Po inhibici vybraných signálních drah na mRNA a proteinové úrovni byla významná změna exprese genu *DLXI* prokázána pro signální dráhy ERK, JNK, PI3K a p38. Z výsledků lze usuzovat, že tyto efektorové dráhy se podílejí na regulaci transkripce genu *DLXI*.

Vliv drah ERK a JNK na regulaci exprese genu *DLXI* prostřednictvím aktivace podjednotek transkripčního faktoru AP-1 byl zkoumán pomocí metody duální luciferázové eseje. Pro zmiňovanou metodu byly připraveny konstrukty obsahující krátkou a dlouhou část promotoru genu *DLXI* vloženou před gen pro luciferázu. Tato esej umožnila na ověřeném experimentálním systému studovat hypotézu o regulaci transkripce genu *DLXI* probíhající přes AP-1 vazebné místo na promotoru. Zmiňovaná hypotéza byla výsledky této práce částečně potvrzena. Ze získaných dat vyplývá, že ačkoli AP-1 vazebné místo ovlivňuje regulaci exprese genu *DLXI*, je nutné, aby se do regulace zapojily i další promotorové oblasti. Na řízení transkripční aktivity se proto pravděpodobně podílejí také jiné transkripční faktory, které jsou společně aktivované ERK a JNK dráhou.

I když jsou funkce a regulace genu *DLXI* u maligních onemocnění včetně leukémií prozatím jen málo probádány, zvýšená hladina tohoto genu detekována u AML pacientů s mutací FLT3-ITD však naznačuje jeho účast v procesu vývoje leukémie. Zároveň se také uvažuje o významu genu *DLXI* v prognóze. S ohledem na tyto poznatky lze předpokládat, že další výzkum v této oblasti může pozitivním způsobem ovlivnit léčbu pacientů s leukémií a ostatními maligními onemocněními.

## 8 Seznam použité literatury

- Adolfsson J, Mansson R, Buza-Vidas N, Hultquist A, Liuba K, Jensen CT *et al* (2005). Identification of Flt3(+) lympho-myeloid stem cells lacking erythro-megakaryocytic potential: A revised road map for adult blood lineage commitment. *Cell* **121**: 295-306.
- Agger K, Cloos PA, Christensen J, Pasini D, Rose S, Rappsilber J *et al* (2007). UTX and JMJD3 are histone H3K27 demethylases involved in HOX gene regulation and development. *Nature* **449**: 731-734.
- Ameyar M, Wisniewska M, Weitzman JB (2003). A role for AP-1 in apoptosis: the case for and against. *Biochimie* **85**: 747-752.
- Anderson SA, Eisenstat DD, Shi L, Rubenstein JLR (1997). Interneuron migration from basal forebrain to neocortex: Dependence on Dlx genes. *Science* **278**: 474-476.
- Argiropoulos B, Humphries RK (2007). Hox genes in hematopoiesis and leukemogenesis. *Oncogene* **26**: 6766-6776.
- Ayton PM, Cleary ML (2003). Transformation of myeloid progenitors by MLL oncoproteins is dependent on Hoxa7 and Hoxa9. *Genes & Development* **17**: 2298-2307.
- Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR *et al* (1976). Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *Br J Haematol* **33**: 451-458.
- Beslu N, Kros J, Laurin M, Mayotte N, Humphries KR, Sauvageau G (2004). Molecular interactions involved in HOXB4-induced activation of HSC self-renewal. *Blood* **104**: 2307-2314.
- Bijl J, vanOostveen JW, Kreike M, Rieger E, vanderRaaijHelmer LMH, Walboomers JMM *et al* (1996). Expression of HOXC4, HOXC5, and HOXC6 in human lymphoid cell lines, leukemias, and benign and malignant lymphoid tissue. *Blood* **87**: 1737-1745.
- Boulton TG, Cobb MH (1991). Identification of multiple extracellular signal-regulated kinases (ERKs) with antipeptide antibodies. *Cell Regulation* **2**: 357-371.
- Campo Dell'Orto M, Banelli B, Giarin E, Accordi B, Trentin L, Romani M *et al* (2007). Down-regulation of DLX3 expression in MLL-AF4 childhood lymphoblastic leukemias is mediated by promoter region hypermethylation. *Oncol Rep* **18**: 417-423.
- Cantile M, Scognamiglio G, Anniciello A, Farina M, Gentilcore G, Santonastaso C *et al* (2012). Increased HOX C13 expression in metastatic melanoma progression. *J Transl Med* **10**: 91.
- Cao R, Wang LJ, Wang HB, Xia L, Erdjument-Bromage H, Tempst P *et al* (2002). Role of histone H3 lysine 27 methylation in polycomb-group silencing. *Science* **298**: 1039-1043.
- Cobos I, Borello U, Rubenstein JLR (2007). Dlx transcription factors promote migration through repression of axon and dendrite growth. *Neuron* **54**: 873-888.
- Cohen SM, Jurgens G (1989). Proximal distal pattern-formation in Drosophila – cell autonomous requirement for distal-less gene activity in limb development. *Embo Journal* **8**: 2045-2055.
- Cowell IG, Sondka Z, Smith K, Lee KC, Manville CM, Sidorczuk-Lesthuruge M *et al* (2012). Model for MLL translocations in therapy-related leukemia involving topoisomerase II $\beta$ -mediated DNA strand breaks and gene proximity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**: 8989-8994.
- Crist SA, Griffith TS, Ratliff TL (2003). Structure/function analysis of the murine CD95L promoter reveals the identification of a novel transcriptional repressor and functional CD28 response element. *Journal of Biological Chemistry* **278**: 35950-35958.

- Dalby B, Cates S, Harris A, Ohki EC, Tilkins ML, Price PJ *et al* (2004). Advanced transfection with Lipofectamine 2000 reagent: primary neurons, siRNA, and high-throughput applications. *Methods* **33**: 95-103.
- Datto MB, Li Y, Panus JF, Howe DJ, Xiong Y, Wang XF (1995). Transforming growth factor beta induces the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 through a p53-independent mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**: 5545-5549.
- Davis S, Vanhoutte P, Pages C, Caboche J, Laroche S (2000). The MAPK/ERK cascade targets both Elk-1 and cAMP response element-binding protein to control long-term potentiation-dependent gene expression in the dentate gyrus in vivo. *J Neurosci* **20**: 4563-4572.
- de Melo J, Du GY, Fonseca M, Gillespie LA, Turk WJ, Rubenstein JLR *et al* (2005). Dlx1 and Dlx2 function is necessary for terminal differentiation and survival of late-born retinal ganglion cells in the developing mouse retina. *Development* **132**: 311-322.
- de Wet JR, Wood KV, Deluca M, Helinski DR, Subramani S (1987). Firefly luciferase gene: structure and expression in mammalian cells. *Molecular and Cellular Biology* **7**: 725-737.
- Dollé P, Izpisua-Belmonte JC, Brown JM, Tickle C, Duboule D (1991). HOX-4 genes and the morphogenesis of mammalian genitalia. *Genes Dev* **5**: 1767-1767.
- Drabkin H, Parsy C, Ferguson K, Guilhot F, Lacotte L, Roy L *et al* (2002). Quantitative HOX expression in chromosomally defined subsets of acute myelogenous leukemia. *Leukemia* **16**: 186-195.
- Endoh M, Endo TA, Endoh T, Isono K, Sharif J, Ohara O *et al* (2012). Histone H2A monoubiquitination is a crucial step to mediate PRC1-dependent repression of developmental genes to maintain ES cell identity. *PLoS Genet* **8**: e1002774.
- Ferrucci PF, Grignani F, Pearson M, Fagioli M, Nicoletti I, Pelicci PG (1997). Cell death induction by the acute promyelocytic leukemia-specific PML/RAR alpha fusion protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**: 10901-10906.
- Fischbach NA, Rozenfeld S, Shen W, Fong S, Chrobak D, Ginzinger D *et al* (2005). HOXB6 overexpression in murine bone marrow immortalizes a myelomonocytic precursor in vitro and causes hematopoietic stem cell expansion and acute myeloid leukemia in vivo. *Blood* **105**: 1456-1466.
- Fong CT, Brodeur GM (1987). Down's syndrome and leukemia: epidemiology, genetics, cytogenetics and mechanisms of leukemogenesis. *Cancer Genet Cytogenet* **28**: 55-76.
- Fortunel NO, Hatzfeld A, Hatzfeld JA (2000). Transforming growth factor-beta: pleiotropic role in the regulation of hematopoiesis. *Blood* **96**: 2022-2036.
- George A, Morse HC, Justice MJ (2003). The homeobox gene Hex induces T-cell-derived lymphomas when overexpressed in hematopoietic precursor cells. *Oncogene* **22**: 6764-6773.
- Ghanem N, Jarinova O, Amores A, Long QM, Hatch G, Park BK *et al* (2003). Regulatory roles of conserved intergenic domains in vertebrate Dlx bigene clusters. *Genome Research* **13**: 533-543.
- Golub TR, Slonim DK, Tamayo P, Huard C, Gaasenbeek M, Mesirov JP *et al* (1999). Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science* **286**: 531-537.
- Grier DG, Thompson A, Kwasniewska A, McGonigle GJ, Halliday HL, Lappin TR (2005). The pathophysiology of HOX genes and their role in cancer. *Journal of Pathology* **205**: 154-171.

- Grimley PM, Dong F, Rui H (1999). Stat5a and Stat5b: fraternal twins of signal transduction and transcriptional activation. *Cytokine & Growth Factor Reviews* **10**: 131-157.
- Haga SB, Fu S, Karp JE, Ross DD, Williams DM, Hankins WD *et al* (2000). BP1, a new homeobox gene, is frequently expressed in acute leukemias. *Leukemia* **14**: 1867-1875.
- Hara F, Samuel S, Liu JS, Rosen D, Langley RR, Naora H (2007). A homeobox gene related to Drosophila Distal-less promotes ovarian tumorigenicity by inducing expression of vascular endothelial growth factor and fibroblast growth factor-2. *American Journal of Pathology* **170**: 1594-1606.
- Hess J, Angel P, Schorpp-Kistner M (2004). AP-1 subunits: quarrel and harmony among siblings. *Journal of Cell Science* **117**: 5965-5973.
- Humbert L, Lebrun JJ (2013). TGF-beta inhibits human cutaneous melanoma cell migration and invasion through regulation of the plasminogen activator system. *Cell Signal* **25**: 490-500.
- Chen YR, Meyer CF, Tan TH (1996). Persistent activation of c-Jun N-terminal kinase 1 (JNK1) in gamma radiation-induced apoptosis. *Journal of Biological Chemistry* **271**: 631-634.
- Chiba S, Takeshita K, Imai Y, Kumano K, Kurokawa M, Masuda S *et al* (2003). Homeoprotein DLX-1 interacts with Smad4 and blocks a signaling pathway from activin A in hematopoietic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**: 15577-15582.
- Chim CS, Wong SY, Pang A, Chu P, Lau JS, Wong KF *et al* (2005). Aberrant promoter methylation of the retinoic acid receptor alpha gene in acute promyelocytic leukemia. *Leukemia* **19**: 2241-2246.
- Ip YT, Davis RJ (1998). Signal transduction by the c-Jun N-terminal kinase (JNK) - from inflammation to development. *Current Opinion in Cell Biology* **10**: 205-219.
- Jou ST, Carpino N, Takahashi Y, Piekorz R, Chao JR, Wang D *et al* (2002). Essential, nonredundant role for the phosphoinositide 3-kinase p110delta in signaling by the B-cell receptor complex. *Mol Cell Biol* **22**: 8580-8591.
- Kashyap V, Gudas LJ, Brenet F, Funk P, Viale A, Scandura JM (2011). Epigenomic reorganization of the clustered Hox genes in embryonic stem cells induced by retinoic acid. *J Biol Chem* **286**: 3250-3260.
- Kaspers GJL, Zwaan CN (2007). Pediatric acute myeloid leukemia: towards high-quality cure of all patients. *Haematologica-the Hematology Journal* **92**: 1519-1532.
- Knapper S (2007). FLT3 inhibition in acute myeloid leukaemia. *British Journal of Haematology* **138**: 687-699.
- Kovochich AN, Arensman M, Lay AR, Rao NP, Donahue T, Li XM *et al* (2013). HOXB7 promotes invasion and predicts survival in pancreatic adenocarcinoma. *Cancer* **119**: 529-539.
- Kroon E, Thorsteinsdottir U, Mayotte N, Nakamura T, Sauvageau G (2001). NUP98-HOXA9 expression in hemopoietic stem cells induces chronic and acute myeloid leukemias in mice. *Embo Journal* **20**: 350-361.
- Lasham A, Lindridge E, Rudert F, Onrust R, Watson J (2000). Regulation of the human fas promoter by YB-1, Puralpha and AP-1 transcription factors. *Gene* **252**: 1-13.
- Li JM, Nichols MA, Chandrasekharan S, Xiong Y, Wang XF (1995). Transforming growth factor beta activates the promoter of cyclin-dependent kinase inhibitor p15INK4B through an Sp1 consensus site. *J Biol Chem* **270**: 26750-26753.
- Linggi B, Muller-Tidow C, van de Locht L, Hu M, Nip J, Serve H *et al* (2002). The t(8;21) fusion protein, AML1-ETO, specifically represses the transcription of the p14(ARF) tumor suppressor in acute myeloid leukemia. *Nature Medicine* **8**: 743-750.

- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* **193**: 265-275.
- Magli MC, Barba P, Celetti A, Devita G, Cillo C, Boncinelli E (1991). Coordinate regulation of HOX genes in human hematopoietic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **88**: 6348-6352.
- Magli MC, Largman C, Lawrence HJ (1997). Effects of HOX homeobox genes in blood cell differentiation. *Journal of Cellular Physiology* **173**: 168-177.
- Mallo GV, Rechreche H, Frigerio JM, Rocha D, Zweibaum A, Lacasa M *et al* (1997). Molecular cloning, sequencing and expression of the mRNA encoding human Cdx1 and Cdx2 homeobox. Down-regulation of Cdx1 and Cdx2 mRNA expression during colorectal carcinogenesis. *Int J Cancer* **74**: 35-44.
- Mallo M, Wellik DM, Deschamps J (2010). Hox genes and regional patterning of the vertebrate body plan. *Developmental Biology* **344**: 7-15.
- Matthews JC, Hori K, Cormier MJ (1977). Purification and properties of Renilla reniformis luciferase. *Biochemistry* **16**: 85-91.
- Mayer J, Stary J *et al* (2002). Leukemie. Vyd. 1. Praha: Grada Publishing, spol. s r. o., 2002. 357 s
- McGuinness T, Porteus MH, Smiga S, Bulfone A, Kingsley C, Qiu MS *et al* (1996). Sequence, organization, and transcription of the Dlx-1 and Dlx-2 locus. *Genomics* **35**: 473-485.
- Meloche S, Pouyssegur J (2007). The ERK1/2 mitogen-activated protein kinase pathway as a master regulator of the G1- to S-phase transition. *Oncogene* **26**: 3227-3239.
- Michl P, Ramjaun AR, Pardo OE, Warne PH, Wagner M, Poulsom R *et al* (2005). CUTL1 is a target of TGF beta signaling that enhances cancer cell motility and invasiveness. *Cancer Cell* **7**: 521-532.
- Milne TA, Briggs SD, Brock HW, Martin ME, Gibbs D, Allis CD *et al* (2002). MLL targets SET domain methyltransferase activity to Hox gene promoters. *Molecular Cell* **10**: 1107-1117.
- Morini M, Astigiano S, Gitton Y, Emionite L, Mirisola V, Levi G *et al* (2010). Mutually exclusive expression of DLX2 and DLX5/6 is associated with the metastatic potential of the human breast cancer cell line MDA-MB-231. *Bmc Cancer* **10**.
- Penkov D, Mateos San Martín D, Fernandez-Díaz LC, Rosselló CA, Torroja C, Sánchez-Cabo F *et al* (2013). Analysis of the DNA-binding profile and function of TALE homeoproteins reveals their specialization and specific interactions with Hox genes/proteins. *Cell Rep* **3**: 1321-1333.
- Pietenpol JA, Holt JT, Stein RW, Moses HL (1990). Transforming growth factor beta 1 suppression of c-myc gene transcription: role in inhibition of keratinocyte proliferation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **87**: 3758-3762.
- Pineault N, Abramovich C, Ohta H, Humphries RK (2004). Differential and common leukemogenic potentials of multiple NUP98-Hox fusion proteins alone or with Meis1. *Molecular and Cellular Biology* **24**: 1907-1917.
- Pintus G, Tadolini B, Posadino AM, Sanna B, Debidda M, Bennardini F *et al* (2002). Inhibition of the MEK/ERK signaling pathway by the novel antimetastatic agent NAMI-A down regulates c-myc gene expression and endothelial cell proliferation. *Eur J Biochem* **269**: 5861-5870.
- Poppe B, Van Limbergen H, Van Roy N, Vandecruys E, De Paepe A, Benoit Y *et al* (2001). Chromosomal aberrations in Bloom syndrome patients with myeloid malignancies. *Cancer Genetics and Cytogenetics* **128**: 39-42.

- Pui CH, Relling MV, Downing JR (2004). Acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med*: United States. pp 1535-1548.
- Rinn JL, Kertesz M, Wang JK, Squazzo SL, Xu X, Bruggmann SA *et al* (2007). Functional demarcation of active and silent chromatin domains in human HOX loci by noncoding RNAs. *Cell* **129**: 1311-1323.
- Rochowski A, Olson SB, Alonzo TA, Gerbing RB, Lange BJ, Alter BP (2012). Patients with Fanconi anemia and AML have different cytogenetic clones than de novo cases of AML. *Pediatric Blood & Cancer* **59**: 922-924.
- Rulina AV, Spirin PV, Prassolov VS (2010). Activated leukemic oncogenes AML1-ETO and c-kit: Role in development of acute myeloid leukemia and current approaches for their inhibition. *Biochemistry-Moscow* **75**: 1650-1666.
- Sauvageau G, Thorsteinsdottir U, Hough MR, Hugo P, Lawrence HJ, Largman C *et al* (1997). Overexpression of HOXB3 in hematopoietic cells causes defective lymphoid development and progressive myeloproliferation. *Immunity* **6**: 13-22.
- Sexauer A, Perl A, Yang X, Borowitz M, Gocke C, Rajkhowa T *et al* (2012). Terminal myeloid differentiation in vivo is induced by FLT3 inhibition in FLT3/ITD AML. *Blood* **120**: 4205-4214.
- Shaulian E, Karin M (2002). AP-1 as a regulator of cell life and death. *Nature Cell Biology* **4**: E131-E136.
- Shurtleff SA, Meyers S, Hiebert SW, Raimondi SC, Head DR, Willman CL *et al* (1995). Heterogeneity in CBF beta/MYH11 fusion messages encoded by the inv(16)(p13q22) and the t(16;16)(p13;q22) in acute myelogenous leukemia. *Blood* **85**: 3695-3703.
- Schlegel NC, Eichhoff OM, Hemmi S, Werner S, Dummer R, Hoek KS (2009). Id2 suppression of p15 counters TGF-beta-mediated growth inhibition of melanoma cells. *Pigment Cell & Melanoma Research* **22**: 445-453.
- Slope C, Aplan PD (2004). The role of NUP98 gene fusions in hematologic malignancy. *Leukemia & Lymphoma* **45**: 1341-1350.
- Smith CC, Wang Q, Chin CS, Salerno S, Damon LE, Levis MJ *et al* (2012). Validation of ITD mutations in FLT3 as a therapeutic target in human acute myeloid leukaemia. *Nature* **485**: 260-U153.
- Speleman F, Cauwelier B, Dastugue N, Cools J, Verhasselt B, Poppe B *et al* (2005). A new recurrent inversion, inv(7)(p15q34), leads to transcriptional activation of HOXA10 and HOXA11 in a subset of T-cell acute lymphoblastic leukemias. *Leukemia* **19**: 358-366.
- Starkova J, Gadgil S, Qiu YH, Zhang N, Hermanova I, Kornblau SM *et al* (2011). Up-regulation of homeodomain genes, DLX1 and DLX2, by FLT3 signaling. *Haematologica* **96**: 820-828.
- Starkova J, Zamostna B, Mejstrikova E, Krejci R, Drabkin HA, Trka J (2010). HOX Gene Expression in Phenotypic and Genotypic Subgroups and Low HOXA Gene Expression as an Adverse Prognostic Factor in Pediatric ALL. *Pediatric Blood & Cancer* **55**: 1072-1082.
- Stiller CA (2004). Epidemiology and genetics of childhood cancer. *Oncogene* **23**: 6429-6444.
- Super HJ, McCabe NR, Thirman MJ, Larson RA, Le Beau MM, Pedersen-Bjergaard J *et al* (1993). Rearrangements of the MLL gene in therapy-related acute myeloid leukemia in patients previously treated with agents targeting DNA-topoisomerase II. *Blood* **82**: 3705-3711.
- Tessier N, Hoang T (1988). Transforming growth factor beta inhibits the proliferation of the blast cells of acute myeloblastic leukemia. *Blood* **72**: 159-164.
- Thiede C, Steudel C, Mohr B, Schaich M, Schakel U, Platzbecker U *et al* (2002). Analysis of FLT3-activating mutations in 979 patients with acute myelogenous leukemia:

- association with FAB subtypes and identification of subgroups with poor prognosis. *Blood* **99**: 4326-4335.
- Thomas BL, Tucker AS, Qiu MS, Ferguson CA, Hardcastle Z, Rubenstein JLR *et al* (1997). Role of Dlx-1 and Dlx-2 genes in patterning of the murine dentition. *Development* **124**: 4811-4818.
- Thorsteinsdottir U, Sauvageau G, Hough MR, Dragowska W, Lansdorp PM, Lawrence HJ *et al* (1997). Overexpression of HOXA10 in murine hematopoietic cells perturbs both myeloid and lymphoid differentiation and leads to acute myeloid leukemia. *Mol Cell Biol* **17**: 495-505.
- Tomida S, Yanagisawa K, Koshikawa K, Yatabe Y, Mitsudomi T, Osada H *et al* (2007). Identification of a metastasis signature and the DLX4 homeobox protein as a regulator of metastasis by combined transcriptome approach. *Oncogene* **26**: 4600-4608.
- Vanhoutte P, Barnier JV, Guibert B, Pagès C, Besson MJ, Hipkind RA *et al* (1999). Glutamate induces phosphorylation of Elk-1 and CREB, along with c-fos activation, via an extracellular signal-regulated kinase-dependent pathway in brain slices. *Mol Cell Biol* **19**: 136-146.
- Vardiman JW, Harris NL, Brunning RD (2002). The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood* **100**: 2292-2302.
- Wang Y, Kellner J, Liu LB, Zhou DH (2011). Inhibition of p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Promotes Ex Vivo Hematopoietic Stem Cell Expansion. *Stem Cells and Development* **20**: 1143-1152.
- Warren M, Luthra R, Yin CC, Ravandi F, Cortes JE, Kantarjian HM *et al* (2012). Clinical impact of change of FLT3 mutation status in acute myeloid leukemia patients. *Modern Pathology* **25**: 1405-1412.
- Yamada Y, Inoue R, Fukao T, Kaneko H, Isogai K, Fukuda S *et al* (1998). Ataxia telangiectasia associated with B-cell lymphoma: The effect of a half-dose of the drugs administered according to the acute lymphoblastic leukemia standard risk protocol. *Pediatric Hematology and Oncology* **15**: 425-429.
- Yamamoto K, Nakamura Y, Saito K, Furusawa S (2000). Expression of the NUP98/HOXA9 fusion transcript in the blast crisis of Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukaemia with t(7;11)(p15;p15). *British Journal of Haematology* **109**: 423-426.
- Yamamoto Y, Kiyoi H, Nakano Y, Suzuki R, Kodera Y, Miyawaki S *et al* (2001). Activating mutation of D835 within the activation loop of FLT3 in human hematologic malignancies. *Blood* **97**: 2434-2439.
- Ye XY, Niu XM, Tang NW, Xu YH, Li ZM, Yu YF *et al* (2012). Adenovirus mediated knockdown of bone morphogenetic protein 2 inhibits human lung cancer growth and invasion in vitro and in vivo. *Int J Immunopathol Pharmacol* **25**: 967-976.
- Yekta S, Shih IH, Bartel DP (2004). MicroRNA-directed cleavage of HOXB8 mRNA. *Science* **304**: 594-596.
- Yu M, Bardia A, Wittner BS, Stott SL, Smas ME, Ting DT *et al* (2013). Circulating breast tumor cells exhibit dynamic changes in epithelial and mesenchymal composition. *Science* **339**: 580-584.
- Zhang Q, Jin XS, Yang ZY, Wei M, Liu BY, Gu QL (2013). Upregulated Hoxc6 expression is associated with poor survival in gastric cancer patients. *Neoplasia* **60**: 439-445.
- Zimmermann F, Rich IN (1997). Mammalian homeobox B6 expression can be correlated with erythropoietin production sites and erythropoiesis during development, but not with hematopoietic or nonhematopoietic stem cell populations. *Blood* **89**: 2723-2735.