

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Biologie
Imunologie



Bc. Tereza Turková

Vývoj myšího modelu pro studium chromatin remodelačního genu Smarca5 (Snf2h)

Generation of the Mouse Model to Delineate Function of Chromatin Remodeling Gene
Smarca5 (Snf2h)

Diplomová práce

Vedoucí závěrečné práce/Školitel:
prof. MUDr. Tomáš Stopka, Ph.D.

Praha, 2016

Chtěla bych poděkovat zejména svému konzultantovi Mgr. Tomáši Zikmundovi a svému školiteli prof. MUDr. Tomáši Stopkovi, Ph.D. za cenné rady a podporu při psaní této práce a vypracování výsledků. Dále bych chtěla poděkovat kolegům z laboratoře za veškerou pomoc a přátelskou atmosféru.

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, 15. 8. 2016

Podpis:

Abstrakt

Chromatinová struktura, tvořená DNA a histonovými proteiny, prochází během buněčného cyklu a při diferenciaci buněk dynamickými změnami. Pouze pokud se DNA nachází v rozvolněné podobě, může být přístupná transkripčnímu a replikačnímu aparátu, zatímco její kondenzace umožňuje účinně nevyužitou DNA skladovat. Remodelace chromatinové struktury je proto jedním z nástrojů regulace genové exprese. Faktory remodelující chromatin dokáží různě specificky rozpoznávat chromatin a ovlivnit tak interakce mezi DNA a histony. Jedním z nich je i námi studovaný protein Smarca5. Cílem této práce je studovat funkci proteinu Smarca5 a pro tento účel vytvořit myší model, u kterého bude možné tkáňově specificky indukovat nadprodukcí proteinu Smarca5. Model bude sloužit ke studiu alterace fyziologických funkcí proteinu vysokou neregulovanou dávkou Smarca5. V předešlých studiích bylo pozorováno, že nefyziologická exprese chromatin remodelačního faktoru může vést k nádorové transformaci buněk, k pochopení tohoto procesu může také přispět vyvíjený model pro protein Smarca5. Dalším cílem této práce je prozkoumat některé aspekty fenotypu myšího modelu s kondicionální delecí proteinu Smarca5 v T a B-lymfocytech, konkrétně vliv delecce tohoto proteinu na diferenciaci progenitorových buněk. Výsledky práce dokazují, že protein Smarca5 hraje významnou roli během vývoje lymfocytů a bylo pozorováno, že delecce tohoto proteinu vede k poruše diferenciaci a vývojovému bloku lymfocytů.

Klíčová slova

Remodelace chromatinu, komplexy remodelující chromatin závislé na ATP, Smarca5, Snf2h, myší model, vývoj T-lymfocytů a B-lymfocytů

Abstract

The chromatin structure, consisting of DNA and histones, changes dynamically during the cell cycle and cell differentiation. DNA can only be transcribed and replicated when it is packaged loosely, whereas tight packaging allows for more efficient storage. Chromatin remodelling is therefore one of the tools of gene expression control. The chromatin remodelling factors recognise chromatin with varying specificity and have an effect on the interaction between DNA and the histones. One of these factors is the Smarca5 protein. This study investigates the role of Smarca5; its goal is to create a mouse model with the ability to trigger Smarca5 overproduction in specific tissues. This model will be used to study the effect of a high, unregulated dose of Smarca5 on the physiological function of the protein. Previous studies have shown that non-physiological expression of a chromatin-remodelling factor can lead to malignant transformation. Our model can help to understand this process. Another goal of this study is to investigate some phenotype aspects of the mouse model with conditional deletion of Smarca5 in T and B cells, in particular the effects of this deletion on progenitor cell differentiation. Our results show that Smarca5 has an important role in lymphocyte development, and we have observed that Smarca5 deletion causes errors in differentiation and blocks lymphocyte development.

Keywords

Chromatin remodeling, ATP-dependent chromatin-remodeling complexes, Smarca5, Snh2h, mouse model, T-cell and B-cell development

Obsah

1	Seznam zkratk	6
2	Úvod	8
3	Cíle diplomové práce	9
4	Literární přehled	10
4.1	Chromatin a jeho remodelace	10
4.2	Protein Smarca5 a jeho komplexy	14
4.3	Myší modely pro protein Smarca5	18
4.4	Remodelace chromatinu ve vývoji T a B-lymfocytů	19
5	Materiály	23
5.1	Technické vybavení	23
5.2	Chemikálie	24
5.3	Protilátky	26
5.4	Enzymy	27
5.5	Roztoky a média	27
5.6	Komerční soupravy	31
5.7	Použitý software	32
5.8	DNA vektory	32
5.9	Organismy	33
6	Metody	35
6.1	Příprava transgenního DNA vektoru	35
6.2	Kultivace embryonálních kmenových buněk	39
6.3	Nukleofekce transgenního vektoru do myších ESC a genotypování	41
6.4	Průtoková cytometrie	45
7	Výsledky	47
7.1	Vývoj myšího modelu s indukovatelnou expresí proteinu Smarca5	47
7.1.1	Vytvoření DNA vektoru pro homologní rekombinaci	47
7.1.2	Nukleofekce transgenního vektoru do myších ESC	52
7.1.3	Injekce ESC do myších blastocyst	54
7.2	Význam proteinu Smarca5 ve vývoji T a B-lymfocytů	56
8	Diskuse	65
9	Závěr	69
10	Seznam použité literatury	70

1 Seznam zkratek

ACF	Komplex remodelující chromatin, který se skládá z proteinů Smarca5 a Acf1 (anglicky <u>A</u> TP-utilizing <u>c</u> hromatin assembly and remodeling factor)
AML	<u>A</u> kutní <u>m</u> yeloidní <u>l</u> eukémie
ATP	Adenosin trifosfát (anglicky <u>A</u> denosine <u>t</u> riphosphate)
BCR	B-buněčný receptor (anglicky <u>B</u> - <u>c</u> ell receptor)
bp	Páry bází DNA (anglicky <u>B</u> ase <u>p</u> airs)
BRG1	Chromatin remodelační faktor z podrodiny SWI/SNF, známý také jako Smarca4 (anglicky <u>B</u> rahma-related gene- <u>1</u>)
CD	Diferenční skupina povrchových molekul, které najdeme především na buňkách imunitního systému (anglicky <u>C</u> luster of <u>d</u> ifferentiation)
DN	Dvojitě negativní fáze vývoje thymocytů – neexprimují ani CD4 ani CD8 molekulu (anglicky <u>D</u> ouble <u>n</u> egative)
DNA	Deoxyribonukleová kyselina (anglicky <u>D</u> eoxyribo <u>n</u> ucleic <u>a</u> cid)
DP	Dvojitě pozitivní fáze vývoje thymocytů – exprimují CD4 i CD8 molekulu (anglicky <u>D</u> ouble <u>p</u> ositive)
ESC	Embryonální kmenové buňky (anglicky <u>E</u> mbryonic <u>s</u> tem <u>c</u> ells)
FBS	Fetální bovinní sérum (anglicky <u>F</u> etal <u>b</u> ovine <u>s</u> erum)
HRP	Křenová peroxidáza (anglicky <u>H</u> orseradish <u>P</u> eroxidase)
CHRAC	Komplex remodelující chromatin, který se skládá z proteinů Smarca5, Acf1, CHRAC-15 a CHRAC-17 (anglicky <u>C</u> hromatin <u>a</u> ccessibility <u>c</u> omplex)
ISWI	Název jedné z podrodin patřících do proteinové rodiny SWI2/SNF2 (anglicky <u>I</u> mitation mating type <u>s</u> witch)
KSR	<u>K</u> nock-out <u>s</u> érum <u>r</u> eplacement
MEF	Myší embryonální fibroblasty (anglicky <u>M</u> ouse <u>e</u> mbryonic <u>f</u> ibroblasts)
mLIF	Myší leukémii inhibující faktor (anglicky <u>m</u> ouse <u>L</u> eukemia <u>i</u> nhibitory <u>f</u> actor)
mRNA	Mediátorová ribonukleová kyselina (anglicky <u>M</u> essenger ribonucleic <u>a</u> cid)
NHEJ	Nehomologní spojování konců při opravě DNA, může zde docházet k mutacím (anglicky <u>N</u> on- <u>h</u> omologous <u>e</u> nd <u>j</u> oining)
NoRC	Komplex remodelující chromatin, který se skládá z proteinů Smarca5 a Tip5 (anglicky <u>N</u> ucleolar <u>r</u> emodeling <u>c</u> omplex)
PBS	Fosfátový pufr (anglicky <u>P</u> hosphate <u>b</u> uffered <u>s</u> aline)

PCR	Polymerázová řetězová reakce (anglicky <u>P</u> olymerase <u>c</u> hain <u>r</u> eaction)
RNA	Ribonukleová kyselina (anglicky <u>R</u> ibonucleic <u>a</u> cid)
rpm	Otáčky za minutu (anglicky <u>R</u> evolutions <u>p</u> er <u>m</u> inute)
rRNA	Ribozomální ribonukleová kyselina (anglicky <u>R</u> ibosomal ribonucleic <u>a</u> cid)
RSF	Komplex remodelující chromatin, který se skládá z proteinů Smarca5 a Rsf-1 (anglicky <u>R</u> emodeling and <u>s</u> pacing <u>f</u> actor)
Smarca5	Faktor remodelující chromatin závislý na ATP, který tvoří katalytickou podjednotku ISWI komplexů, jinak také nazývaný Snf2h (anglicky <u>S</u> WI/SNF related, <u>m</u> atrix associated, <u>a</u> ctin dependent <u>r</u> egulator of <u>c</u> hromatin, subfamily <u>a</u> , member 5)
Snf2h	viz. Smarca5 (anglicky <u>S</u> ucrose <u>n</u> on <u>f</u> ermenting <u>2</u> <u>h</u> omolog)
SP	Jednotně („single“) pozitivní fáze vývoje thymocytů – exprimují pouze CD4 nebo CD8 molekulu (anglicky <u>S</u> ingle <u>p</u> ositive)
SWI/SNF	Proteinová rodina na ATP závislých faktorů remodelujících chromatin (anglicky <u>M</u> ating type <u>s</u> witch/ <u>S</u> ucrose <u>n</u> on <u>f</u> ermenting)
TCR	T-buněčný receptor (anglicky <u>T</u> - <u>c</u> ell <u>r</u> eceptor)
Tip5	Protein vyskytující se spolu se Smarca5 v komplexu NoRC (anglicky <u>T</u> ranscription termination factor 1 (Ttf1) – <u>i</u> nteracting <u>p</u> rotein <u>5</u>)
WICH	Komplex remodelující chromatin, který se skládá z proteinů Smarca5 a WSTF (anglicky <u>W</u> STF- <u>I</u> SWI <u>c</u> hromatin remodeling complex)
WSTF	Protein vyskytující se spolu se Smarca5 v komplexu WICH, gen pro tento transkripční faktor je jedním z deletovaných genů u Williamsova syndromu (anglicky <u>W</u> illiams <u>s</u> yndrome <u>t</u> ranscription <u>f</u> actor)

2 Úvod

Chromatin se skládá z DNA a histonových proteinů vytvářejících dohromady opakující se jednotky, nukleozómy. Chromatinová struktura velmi dynamicky mění svoje vlastnosti během buněčného cyklu a při většině transakcí na DNA. Například rozvolnění chromatinu zvýší přístupnost DNA pro proteiny, jež zajišťují její transkripci a replikaci. Naopak, během vzniku specializovaných buněk, při diferenciaci, dochází také k různým chromatinovým změnám, například k zahuštění (heterochromatinizaci) určitých úseků DNA, čímž dojde k umlčení v nich obsažených genů. Remodelace chromatinové struktury může být jedním z nástrojů regulace genové exprese. Pro správné fungování buňky je zásadní, aby remodelace chromatinu byla přísně regulovaným procesem, kterého se účastní proteiny, jež podléhají dalším regulačním vazbám. Chromatin remodelační faktory váží DNA a histony a ovlivňují jejich interakce za spotřeby ATP, díky čemuž mohou měnit strukturu chromatinu. Mezi tyto ATP-dependentní remodelátory chromatinu patří i námi studovaný protein Smarca5. V předchozích studiích již byla popsána důležitá a často esenciální role faktorů remodelujících chromatin v ontogenezi (zvláště v embryonálním vývoji) a při diferenciaci buněk. Také byla popsána spojitost mezi změněnou (nefyziologickou) expresí těchto faktorů a nádorovou transformací. Jinak tomu není ani v případě proteinu Smarca5, který je esenciální pro brzký embryonální vývoj a defekty jeho exprese jsou spojovány s různými nádorovými onemocněními včetně hematologických malignit, které jsou v centru pozornosti laboratoře. Předmětem této diplomové práce je zapojit se do výzkumné práce týmu mého školitele a vytvořit jeden z unikátních myších modelů pro studium specifických funkcí proteinu Smarca5, který umožní lépe porozumět roli studovaného proteinu v nádorových onemocněních. Díky tomuto projektu lze získat i lepší vhled do fyziologické role chromatinové remodelace v buněčných procesech a pochopit i procesy, jež mohou vést ke vzniku tumoru.

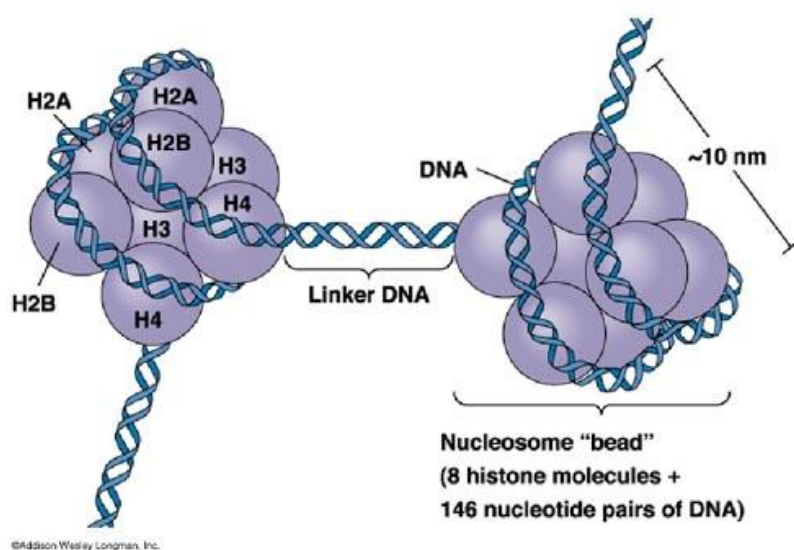
3 Cíle diplomové práce

- Vytvořit myší transgenní model s indukovatelnou nadprodukcí chromatin remodelačního faktoru Smarca5.
- Popsat některé aspekty fenotypu myšího modelu s kondičiální delecí genu Smarca5 ve vývoji lymfocytů v thymu, kostní dřeni a slezině.

4 Literární přehled

4.1 Chromatin a jeho remodelace

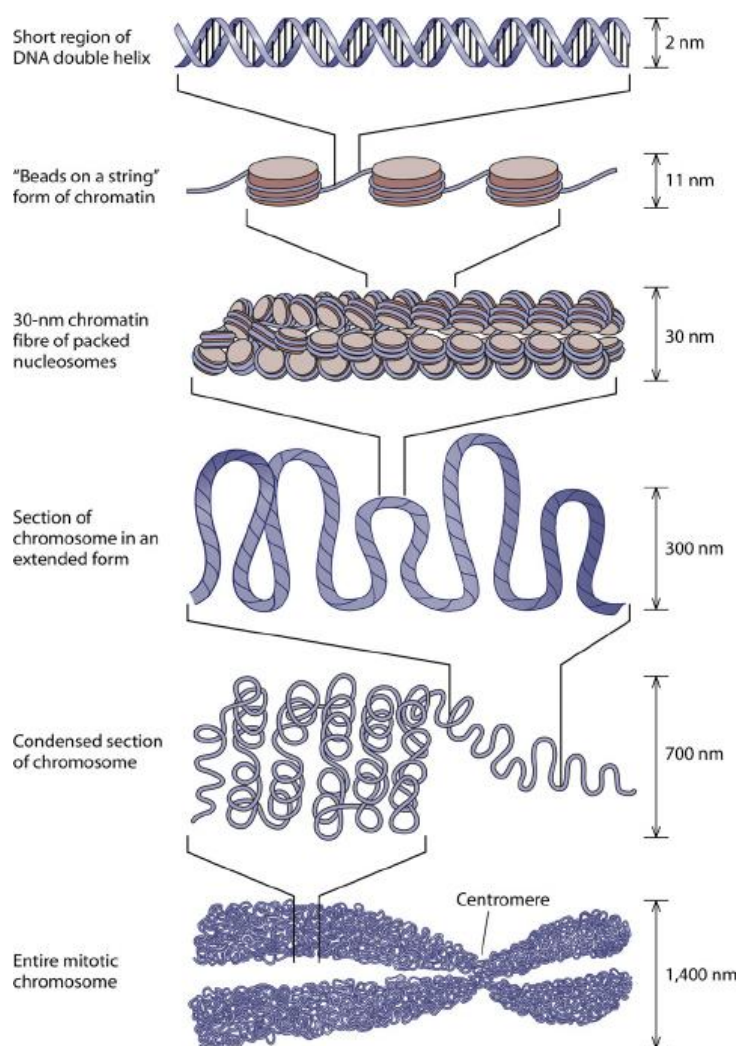
DNA je v jádrech eukaryot uložena ve struktuře označované jako chromatin. Tato struktura je tvořena dvoušroubovicí DNA a histonovými proteiny, které pomáhají kondenzovat DNA do velmi malého objemu buněčného jádra. V průběhu buněčného cyklu dochází k významným změnám ve struktuře chromatinu. Například během buněčného dělení se DNA nachází v maximálně kondenzované formě mitotických chromozomů. V ostatních fázích buněčného cyklu následně dochází k rozvolnění kondenzované struktury, kvůli požadavku zpřístupnit specifické sekvenční DNA transkripčnímu či replikačnímu aparátu. Základní jednotkou chromatinu je nukleozóm, ten se skládá z oktameru histonových proteinů (dvou dimerů histonů H2A a H2B a tetrameru 2xH3 a 2xH4), kolem kterého je ovinuto 145-147 bp dvoušroubovice DNA (Luger, Mader et al. 1997) (viz obrázek 4-1). Histonové proteiny obsahují vysoké procento kladně nabitých aminokyselin, které pomáhají stabilizovat záporně nabitou DNA. Mezi jednotlivými histonovými oktamerami se nachází tzv. linkerová DNA dlouhá 10-90 nukleotidů, na kterou může nasedat histon H1 (Richmond and Davey 2003). Histon H1 nasedá na linker DNA zejména ve více kondenzovaných strukturách, zatímco v rozvolněném chromatinu bývá linker DNA obnažená (Robinson and Rhodes 2006).



převzato z (Kim 2014)

Obrázek 4-1: Struktura nukleozómu. Dvoušroubovice DNA v oktameru histonových proteinů.

DNA vytváří přibližně 1,4 otáčky okolo histonových proteinů a připomíná svojí strukturou periodicky následovaných nukleozómů korálky navlečené na niti (anglicky beads on a string). Tato struktura bývá nazývána 11 nm vlákno a DNA je zde rozvolněná a přístupná vazebným proteinům. 11 nm vlákno může dále kondenzovat do 30 nm vlákna, kde na linkerovou DNA nasedá histon H1, shrnuto v (Luger and Hansen 2005). Chromatinová struktura se může ještě dále sbalovat do různých smyček za pomoci tzv. scaffold proteinů, které tvoří „lešení“ pro udržení rozsáhlých úseků chromatinu. Tato struktura chromatinu je velmi kondenzovaná a specifické sekvence DNA jsou prakticky nepřístupné vazebným proteinům. Nejvyšším stupněm kondenzace DNA je mitotický chromozom, v této podobě se DNA nachází pouze během buněčného dělení (viz obrázek 4-2).



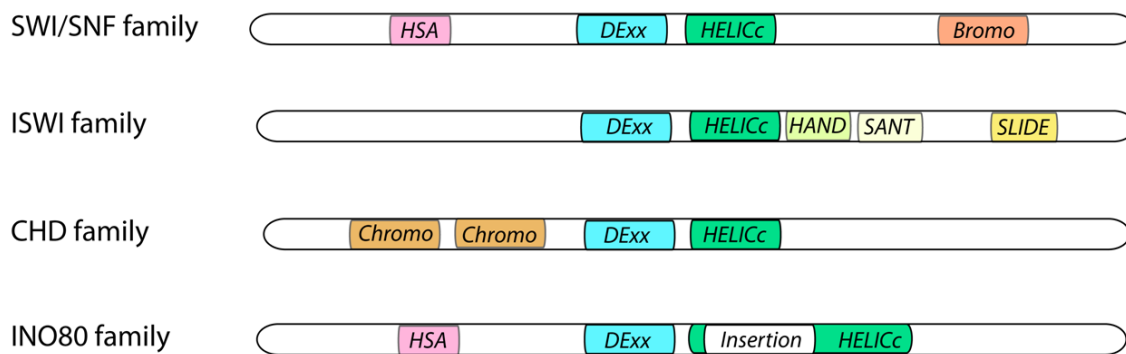
převzato z (Jansen and Verstrepen 2011)

Obrázek 4-2: Struktura chromatinu. Jednotlivé stupně kondenzace od dvoušroubovice DNA, přes 11 nm a 30 nm vlákno, až po mitotický chromozom.

V jádru buněk najdeme během buněčného cyklu (mimo dělení) chromatin ve dvou různých strukturách, nebo v přechodných fázích mezi nimi. Jedná se o rozvolněnou strukturu euchromatinu (11 nm či 30 nm vlákno), která je přístupná DNA vazebným proteinům a může zde probíhat transkripce a replikace, a strukturu heterochromatinu (vyšší stupně kondenzace chromatinu), která je proteinům nepřístupná. Chromatinová struktura je dynamická a její remodelace je jedním z nástrojů regulace genové exprese, kdy dochází k rozvolňování či kondenzaci chromatinové struktury a tím je buď umožněn či blokován přístup proteinů k DNA.

Strukturu chromatinu lze remodelovat dvojím způsobem. Buď pomocí kovalentních modifikací histonových N-konců, jakými jsou například acetylace, methylace, fosforylace, ubiquitinace, SUMOylace, nebo za spotřeby ATP pomocí tzv. chromatin remodelujících faktorů. Posttranslační modifikace histonů jsou vratné a zajišťují je specializované enzymy. Jednotlivé modifikace mají vliv na strukturu chromatinu buď přímo, tím že např. odstíní kladný náboj histonů, jako je tomu v případě acetylace nebo mohou vytvářet značku popř. sekvenci modifikací (např. methylace, fosforylace) jež jsou následně rozeznány např. chromatin remodelujícími faktory. Různé sekvence posttranslačních modifikací histonových konců jsou typické pro různé děje (replikace, transkripce, opravy DNA) a zároveň mohou souviset i s regulací těchto dějů. Například místa euchromatinu s aktivní transkripcí obsahují jiné posttranslační modifikace histonů než místa, kde je transkripce aktivně umlčena. Soubor sekvencí posttranslačních modifikací se proto někdy označuje jako histonový kód (Kouzarides 2007).

Druhou možnost remodelace chromatinu zajišťují tzv. chromatin remodelační komplexy závislé na ATP mezi které patří i v naší laboratoři studovaný protein Smarca5. Protein Smarca5 patří do rodiny SWI2/SNF2 (anglicky Switching defective and Sucrose non-fermenting) ATPáz, která se dělí na čtyři podrodiny – SWI/SNF, ISWI (sem patří protein Smarca5), CHD a INO80. Všechny podrodiny obsahují velmi konzervovanou helikázovou (anglicky helicase-like) ATPázovou doménu, která zajišťuje energii pro remodelaci chromatinu pomocí hydrolýzy ATP. Dále pak proteiny rodiny SWI2/SNF2 obsahují domény, které zajišťují specifickou vazbu na chromatin – bromodoménu a chromodoménu. Bromodoména umožňuje rozpoznávat acetylované N-koncové části histonů a chromodoména umožňuje těmto proteinům rozeznávat methylované N-konce histonů. Domény HAND, SANT a SLIDE pomáhají rozeznávat jednotlivé nukleozómy a také linkerovou DNA. Jednotlivé podrodiny SWI2/SNF2 se rozlišují podle obsahu těchto funkčních domén v molekule proteinu (viz obrázek 4-3), shrnuto v (Manelyte and Längst 2013).



Common domains	Function	Unique domains	Function
DExx	nucleic acid binding and ATP hydrolysis	Bromo	recognizes acetylated lysines in histone tails
HELICc		Chromo	binds methylated lysines in histone tails
		HAND	recognizes nucleosomes and internucleosomal DNA
		SANT	
		SLIDE	
		HSA	binds actin-related proteins

převzato z (Manelyte and Längst 2013)

Obrázek 4-3: Jednotlivé podrodiny SWI2/SNF2 ATPáz. Všechny obsahují doménu DExx a HELICc, které zajišťují vazbu na DNA a hydrolýzu ATP. Dále pak mohou obsahovat bromodoménu, která rozpoznává acetylované lysiny na N-koncových částech histonů (podrodina SWI/SNF). Chromodoména rozpoznává methylované N-koncové části histonů (podrodina CHD). Domény HAND, SANT a SLIDE, které rozpoznávají N-koncové části histonů (podrodina ISWI). Dále pak mohou obsahovat HSA doménu, která váže proteiny příbuzné aktinu.

Chromatin remodelační komplexy závislé na ATP mohou remodelovat chromatin několika způsoby. Především mohou posouvat, odstraňovat popř. vytvářet nukleozómy na vláknech DNA. ATPázy patřící do podrodiny ISWI (Imitation mating type switch), do které patří i protein Smarca5, zajišťují remodelaci chromatinu mimo jiné pomocí posunu nukleozómů po vláknech DNA. Takto mohou posunout nukleozóm až o 100 bp, shrnuto v (Becker 2002). Případně mohou z oktameru histonů vyjmout histony H2A a H2B a ponechat pouze histony H3 a H4, což vede k destabilizaci nukleozómu a zpřístupnění DNA vazebným faktorům, shrnuto v (Cairns 2007). ATPázy z podrodiny SWI/SNF mohou dále remodelovat chromatin například tím, že vymění určitý histon v nukleozómu za jiný typ. K tomuto ději dochází např. v oblastech centromer, kde je nutné do nukleozómů umístit centromerický

protein A (CENP-A), který je variantou histonu H3 a je nezbytný pro správný průběh mitózy (Black and Cleveland 2011).

4.2 Protein Smarca5 a jeho komplexy

Protein Smarca5 je 135 kDa velký chromatin remodelační faktor z podrodiny ISWI. ATPázová doména tohoto proteinu je tvořena dvěma RecA podobnými (anglicky "RecA-like") helikázovými doménami, mezi nimiž se nachází vazebné místo pro ATP (Fairman-Williams, Guenther et al. 2010). Proteinová molekula Smarca5 dále obsahuje domény HAND, SANT a SLIDE, které umožňují vazbu na strukturu chromatinu (Grune, Brzeski et al. 2003) (viz obrázek 4-4).



Obrázek 4-4: Protein Smarca5. Obsahuje konzervovanou helikázovou doménu a domény HAND, SANT a SLIDE, které umožňují specifickou vazbu na chromatin.

Chromatin remodelační faktory často vykonávají své funkce ve vazbě s dalšími proteiny, které mohou jejich funkce ovlivňovat popř. měnit jejich substrátovou specifitu (Tsukiyama, Palmer et al. 1999). Stejně tak je tomu u proteinu Smarca5, který se v jádrech buněk nachází v pěti komplexech: ACF, CHRAC, RSF, NoRC a WICH. V těchto komplexech může protein Smarca5 zastávat různé, často velmi odlišné role, které se odvíjí právě od toho, s jakým vazebným partnerem se momentálně v komplexu nachází. Protein Smarca5 v chromatin remodelačních komplexech zastává roli aktivní podjednotky, která zajišťuje hydrolyzu ATP. Vazební partneři proteinu Smarca5 pomáhají při specifické vazbě na chromatin (často obsahují bromodomény, PHD doménu a další domény, které rozeznávají strukturu chromatinu). Dále pak obsahují DDT doménu, která slouží k interakci s proteinem Smarca5 (Fyodorov and Kadonaga 2002). Tvzení, že vazební partneři mohou ovlivnit funkce proteinu Smarca5, dokládá například studie provedená *in vitro* s komplexem ACF (proteiny Smarca5 a Acf1). Bylo pozorováno, že v komplexu ACF má protein Smarca5 tendenci přesouvat nukleozómy směrem ke středu vlákna (Yang, Madrid et al. 2006), zatímco samotný protein Smarca5 přesouvá nukleozómy směrem ke koncům vlákna (Strohner, Wachsmuth et al. 2005). Protein Smarca5 také v komplexu ACF remodeluje chromatin až 6x účinněji (Yang, Madrid et al. 2006).

Komplexy remodelující chromatin, jejichž podjednotkou je protein Smarca5 vykonávají v buněčném jádře řadu různých funkcí. Jednou z nich je například role těchto komplexů při heterochromatinizaci, která bývá spojována s umlčováním genů během diferenciacce buněk. Komplex ACF má schopnost vytvářet rovnoměrné rozestupy mezi nukleozómy, což je znak spojovaný se strukturou heterochromatinu. Studie provedená na *Drosophila melanogaster* dokládá, že v nepřítomnosti komplexu ACF mají buňky problémy s tvorbou heterochromatinu (Fyodorov, Blower et al. 2004). Komplex ACF má také schopnost vázat histon macroH2A, který se nachází ve struktuře inaktivovaného a velmi kondenzovaného X-chromozomu v samičích buňkách savců, což napovídá, že by se komplex ACF mohl na umlčování tohoto chromozomu podílet (Chang, Ferreira et al. 2008). Dalším komplexem, který se může účastnit heterochromatinizace, je komplex RSF (proteiny Smarca5 a Rsf-1). Ten má schopnost vázat histon H2Av, který bývá spojován se strukturou heterochromatinu, a katalyzovat jeho záměnu za histon H2A ve struktuře nukleozómu (Hanai, Furuhashi et al. 2008). Komplex RSF má též schopnost vytvářet nukleozómy *de novo* a může plnit funkce histonového chaperonu (Loyola, LeRoy et al. 2001). Heterochromatinizaci může pravděpodobně zajišťovat také komplex CHRAC (proteiny Smarca5, Acf1, CHRAC-15, CHRAC-17). Tento komplex je exprimován jen během velmi časného stádia embryonálního vývoje a může se účastnit procesu diferenciacce buněk (Corona, Eberharter et al. 2000).

Chromatin remodelační komplexy s podjednotkou Smarca5 hrají roli při replikaci, kdy mohou pomáhat při průchodu replikační vidličky strukturou heterochromatinu. Ve studii provedené na HeLa buňkách bylo zjištěno, že v nepřítomnosti komplexu ACF nejsou buňky schopné dokončit S-fázi buněčného cyklu a mají problémy s replikací DNA, která se nachází ve struktuře heterochromatinu (Collins, Poot et al. 2002). Dále bylo pozorováno, že komplex WICH (proteiny Smarca5 a WSTF) může interagovat s clamp proteinem, který je součástí replikačního aparátu a zvyšuje procesivitu polymerázy. Tento komplex pravděpodobně hraje roli při replikaci, kdy pomáhá udržovat chromatin v rozvolněné podobě (Poot, Bozhenok et al. 2004). Komplex WICH také rekrutuje k replikační vidličce topoizomerázu I (Ribeyre, Zellweger et al. 2016).

Další z rolí chromatin remodelačních komplexů během buněčného dělení je jejich účast při formaci centromery. Komplex RSF má schopnost katalyzovat výměnu histonu H3 za protein CENP-A (anglicky Centromere protein A) (Perpelescu, Nozaki et al. 2009). S proteinem CENP-A také interaguje komplex NoRC (proteiny Smarca5 a Tip5) (Guertg, Lienemann et al. 2010).

Dalším procesem, kterého se účastní chromatin remodelační komplexy s podjednotkou Smarca5, je umlčování genů pro ribozomální RNA v jadérku. Komplex NoRC se váže do promotorových oblastí genů pro rRNA a účastní se jejich heterochromatinizace. Rekrutuje do těchto oblastí histonové deacetylázy (Zhou, Santoro et al. 2002) a histonové methyltransferázy (Santoro, Li et al. 2002), které se účastní formace heterochromatinu. Komplex NoRC dále může umlčovat promotorové oblasti díky posunu nukleozómů po vlákně DNA, vlivem toho může dojít k zneprístupnění promotoru pro transkripční faktory (Li, Langst et al. 2006). Komplex B-WICH se pravděpodobně účastní transkripce polymerázou I, která transkribuje právě geny pro rRNA. Tuto skutečnost naznačuje přítomnost rRNA (45S a 5S) jako podjednotek tohoto komplexu, další podjednotkou komplexu B-WITCH je protein NM1, který interaguje během transkripce s polymerázou I. Komplex B-WICH se skládá z proteinů Smarca5 a WSTF, RNA a některých jaderných proteinů (Percipalle, Fomproix et al. 2006). Komplex B-WICH může do oblasti genů pro 5S a 7S rRNA rekrutovat histonové acetylázy, které pomohou rozvolnit chromatin a umožní vazbu transkripčních faktorů (Sadeghifar, Bohm et al. 2015).

Chromatin remodelační komplexy s podjednotkou Smarca5 se také mohou účastnit opravy DNA. To dokazuje například fakt, že byla zjištěna přítomnost komplexu ACF v oblastech dvouvláknových zlomů (Lan, Ui et al. 2010). Další studie ukazuje, že komplex ACF se pravděpodobně podílí na opravě dvouvláknových zlomů ve struktuře heterochromatinu a to tak, že pomáhá rozvolnit tuto strukturu, aby byla přístupná reparačním proteinům (Klement, Luijsterburg et al. 2014). Dalším komplexem, který se nachází v oblastech dvouvláknových zlomů, je komplex RSF. Bylo zjištěno, že komplex RSF rekrutuje do oblastí dvouvláknových zlomů faktory RPA32 a Rad51, které hrají roli při opravě DNA mechanismem homologní rekombinace (Min, Jo et al. 2014). Studie provedená na buněčné linii ukázala, že komplex RSF se pravděpodobně podílí na opravě dvouvláknových zlomů na DNA jak mechanismem homologní rekombinace, tak NHEJ (anglicky non-homologous end joining), tedy nehomologního způsobu opravy zlomů. V nepřítomnosti komplexu RSF byly pozorovány defekty v obou způsobech opravy dvouvláknových zlomů (Pessina and Lowndes 2014). Dále bylo pozorováno, že protein Rsf-1 (podjednotka komplexu RSF) se účastní opravy zlomů na DNA pomocí mechanismu NHEJ. Protein Rsf-1 rekrutuje do místa zlomu centromerické proteiny CENP-S a CENP-X, které hrají roli při opravě DNA právě pomocí mechanismu NHEJ (Helfricht, Wiegant et al. 2013). Další studie ukazuje, že i komplex B-WICH může hrát roli při opravě dvouvláknových zlomů.

Tento komplex je schopen fosforylovat histon H2A.X, konkrétně fosforyluje tyrozin na pozici 142, což je histonová značka spojovaná se signálem pro opravu DNA (Xiao, Li et al. 2009).

Na závěr této kapitoly bych se chtěla zmínit o roli proteinu Smarca5 a jeho vazebných partnerů v nádorových onemocněních. Zvýšená exprese proteinu Smarca5 popř. jeho vazebných partnerů bývá s některými těmito onemocněními často spojována. Například protein Rsf-1 (podjednotka komplexu RSF) může být potenciálním onkogenem. Vysoké hladiny tohoto proteinu byly nalezeny u karcinomu ovárií (Shih Ie, Sheu et al. 2005), také u kolorektálního karcinomu (Liu, Dong et al. 2012), karcinomu plic (Li, Dong et al. 2012), karcinomu prostaty (Li, Zhang et al. 2014) a karcinomu prsu (Ren, Chen et al. 2014), u karcinomu prsu byla pozorována i zvýšená hladina proteinu Smarca5 (Jin, Mao et al. 2015). Dále byla zjištěna zvýšená koncentrace komplexu RSF (jak proteinu Smarca5, tak Rsf-1) u gliomu. Omezení exprese proteinu Smarca5 v buněčné linii odvozené od gliomu vedlo ke snížení rychlosti proliferace buněk a zástavy buněčného cyklu při přechodu z G1 do S fáze (Zhao, An et al. 2016). U hepatocelulárního karcinomu byla pozorována zvýšená hladina proteinu Rsf-1 (Xie, Fu et al. 2014) a také proteinu Smarca5, který je pravděpodobně zásadní pro růst tumoru (Wang, Qin et al. 2016). Další studie provedená na nádorové buněčné linii ukazuje, že protein Rsf-1 pravděpodobně hraje roli při proliferaci tumoru. Bylo pozorováno, že zvýšená produkce proteinu Rsf-1 vede k rychlejší proliferaci nádorové masy oproti kontrolním buňkám (Sheu, Choi et al. 2008). Nadprodukce proteinu Rsf-1 v buněčné linii může vést k až ke vzniku zlomů na DNA a apoptóze buněk. Kontinuálním zvyšování koncentrace proteinu v buňkách vedlo taktéž ke vzniku poškození DNA, které ale u některých buněk vyústilo v nádorovou transformaci (Sheu, Guan et al. 2010). Dalším z faktorů spojovaných s nádorovým onemocněním je Tip5 (podjednotka komplexu NoRC). Bylo zjištěno, že buňky deficientní na protein Tip5 rychleji proliferují a mohou vykazovat známky nádorové transformace (Guertl, Lienemann et al. 2010). Nově publikovaná studie dokazuje roli proteinu Tip5 v karcinomu prostaty, zde je překvapivě naopak zvýšená hladina proteinu Tip5 spojována s horší prognózou onemocnění (Gu, Frommel et al. 2015).

Protein Smarca5 hraje pravděpodobně roli i v hematologických malignitách. Výsledky získané v naší laboratoři ukazují, že pacienti s akutní myeloidní leukémií (AML) vykazují zvýšené hladiny proteinu Smarca5 v CD35 pozitivních hematopoetických progenitorech. Dále bylo zjištěno, že u pacientů s AML je exprese proteinu Smarca5 zvýšená během celého průběhu hematopoézy. U zdravých jedinců je protein Smarca5 exprimován pouze ve velmi časném stádiu vývoje a pak jeho exprese klesá, v CD34 pozitivních buňkách zdravých jedinců je hladina proteinu Smarca5 neznatelná. U pacientů, kteří dosáhli kompletní hematologické

remise, došlo ke snížení exprese proteinu Smarca5 během hematopoézy (Stopka, Zakova et al. 2000). Z popsaných výsledků vyplývá, že chromatin remodelační faktory, spolu s proteinem Smarca5 mohou hrát významnou roli v různých nádorových onemocněních. Tyto role zatím nebyly příliš detailně prozkoumány. K jejich lepšímu pochopení by mohl přispět i vyvíjený myší model s indukovatelnou nadprodukcí proteinu Smarca5.

4.3 Myší modely pro protein Smarca5

Pro protein Smarca5 bylo už v minulosti vyvinuto několik myších modelů, které bych v této kapitole ráda popsala. Jako první bych zmínila klasický deleční model (anglicky knock-out), který byl vytvořen mým školitelem. Pomocí tohoto modelu bylo zjištěno, že protein Smarca5 je esenciální pro brzký embryonální vývoj. Mláďata s genotypem *Smarca5*^{-/-} se nerodí. Heterozygotní myši *Smarca5*^{+/-} se rodily v normálním mendelovském poměru, byly životaschopné a nevykazovaly žádné fenotypové změny. Pro další studium byly izolovány blastocysty z heterozygotních myší. Kultivací těchto blastocyst bylo zjištěno, že blastocysty s genotypem *Smarca5*^{-/-} podléhaly po 48 hodinách kultivace apoptóze a hynuly. Časově tento údaj odpovídá 5-7 dnu embryonálního vývoje, kdy docházelo k úhynu *Smarca5*^{-/-} embryí (Stopka and Skoultchi 2003). Pro protein Smarca5 byly dále vytvořeny celkem tři modely, které oba vznikly pouhou bodovou záměnou v DNA sekvenci pro tento protein, tyto mutace vedly k nekonzervativní záměně aminokyseliny ve velmi konzervované sekvenci helikázové domény proteinu. U všech tří modelu se nerodila mláďata s mutací na obou alelách a byl tedy pozorován podobný jev jako u klasického delečního modelu popsaného výše. Nekonzervativní záměna aminokyseliny pravděpodobně způsobila špatné sbalení proteinu, který pak nemohl vykonávat své funkce (Chong, Vickaryous et al. 2007) a (Daxinger, Harten et al. 2013).

Pro protein Smarca5 byly v naší laboratoři také vytvořeny kondicionální deleční myší modely. Jedním z nich je model, u kterého dochází k delecí v buňkách, které exprimují molekulu CD2, tedy v myších B a T-lymfocytech. Model je zmiňován a blíže popisován v této práci, viz kapitoly 5.9 a 7.2. Dalším kondicionálním delečním modelem je myší model, u kterého dochází k delecí proteinu Smarca5 ve všech hematopoetických buňkách. Vlivem působení Cre rekombinázy pod promotorem Vav1 (anglicky Vav guanine nucleotide exchange factor 1) dojde k delecí exonu 5 *Smarca5* genu a posunu čtecího rámce, tím pádem nedochází ke vzniku žádného funkčního proteinu. U tohoto myšího modelu bylo pozorováno, že embrya s delecí proteinu Smarca5 umírají 18,5 dni embryonálního vývoje. Už v 13,5 dni

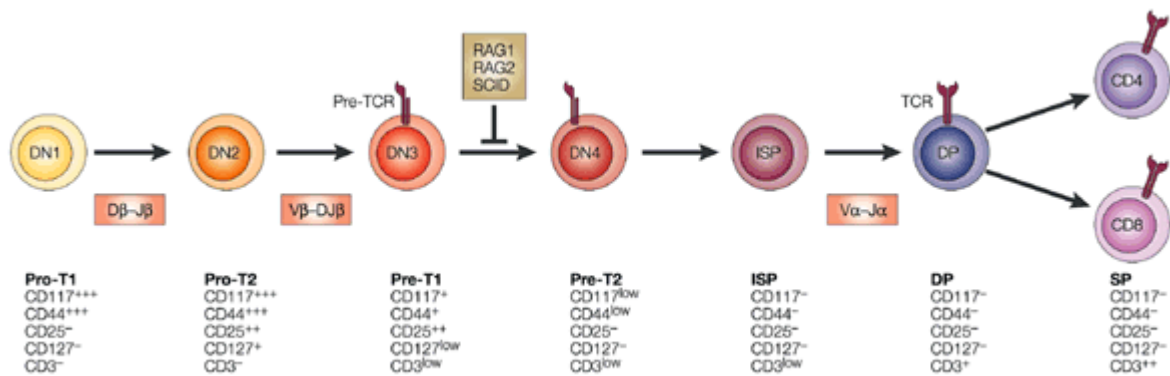
embryonálního vývoje mají anemický fenotyp, menší vzrůst a také je patrné selhání vývoje jater. Publikace popisující tento myší model je aktuálně v recenzním řízení.

4.4 Remodelace chromatinu ve vývoji T a B-lymfocytů

Imunitní systém obsahuje adaptivní složku, která má schopnost účinně rozeznávat velké množství pro organismus známých i neznámých epitopů, např. epitopy patogenů, ale i poškozených buněk vlastního těla. Tato schopnost je zajišťována produkcí obrovského množství velmi specifických receptorů, které jsou vytvářeny zejména T a B-lymfocyty. Je potřeba zmínit, že všechny tyto receptory lymfocytů jsou nejprve testovány na schopnost rozeznat antigen jako takový a zároveň na schopnost neaktivovat autoreaktivní odpověď. Lymfocyty z tohoto důvodu musí projít složitým procesem maturace, kdy např. v případě T-lymfocytů je odstraněno až 98% buněk s „nevhodnými“ receptory během pozitivní a negativní selekce v thymu. Během vývoje B-lymfocytů v kostní dřeni a prekurzorů T-lymfocytů v thymu dochází k V(D)J rekombinaci, tedy přeskupování genů pro podjednotky T a B buněčných receptorů. Právě proces V(D)J rekombinace dá vzniknout širokému repertoáru odlišných TCR a BCR, které pak lymfocytům umožní rozeznávat rozličné epitopy. Samotnou V(D)J rekombinaci zajišťují v lymfocytech rekombinázy RAG1 a RAG2 (anglicky Rekombination activating gene 1/2). Proces maturace receptorů pro T a B lymfocyty je ale složitější a v jeho průběhu probíhají i různé chromatinové přestavby, kterých se účastní další proteiny včetně chromatin remodelačních komplexů, shrnuto v (Dege and Hagman 2014).

T-lymfocyty se vyvíjí ze společného lymfoidního progenitoru, který putuje krevním řečištěm z kostní dřene do thymu. Prvotní vývojová stádia progenitorů T-lymfocytů (thymocytů) rozlišujeme na tzv. dvojitě negativní (DN), která neexprimují CD4 ani CD8 kostimulační molekulu. Podle exprese povrchových molekul CD25 a CD44 lze DN stádium vývoje thymocytů rozdělit na čtyři další podstádia (DN1, DN2, DN3 a DN4), shrnuto v (Ceredig and Rolink 2002). V DN3 stádiu dochází k aktivaci RAG1 a RAG2 rekombináz a přeskupení genů pro těžký řetězec TCR β (Hoffman, Passoni et al. 1996). Po přeskupení genu TCR β ve fázi DN3 započne exprese tzv. pre-TCR receptoru, tedy prvotního antigenního receptoru složeného z podjednotek TCR β a náhrady za TCR α podjednotku - pre-TCR α . Receptor pre-TCR (především jeho podjednotka TCR β) je v tzv. β -selekcí testován na schopnost přenosu signálu do nitra buňky. Pouze úspěšně selektované DN3 thymocyty mohou dále expandovat a vstoupit do stádia DN4 (viz obrázek 4-5). Thymocyty DN4 stádia získávají dalším vývojem obě kostimulační molekuly (CD4 a CD8) a přechází do tzv. dvojitě pozitivního (DP) stadia. DP thymocyty začínají přeskupovat gen TCR α , který kóduje lehký

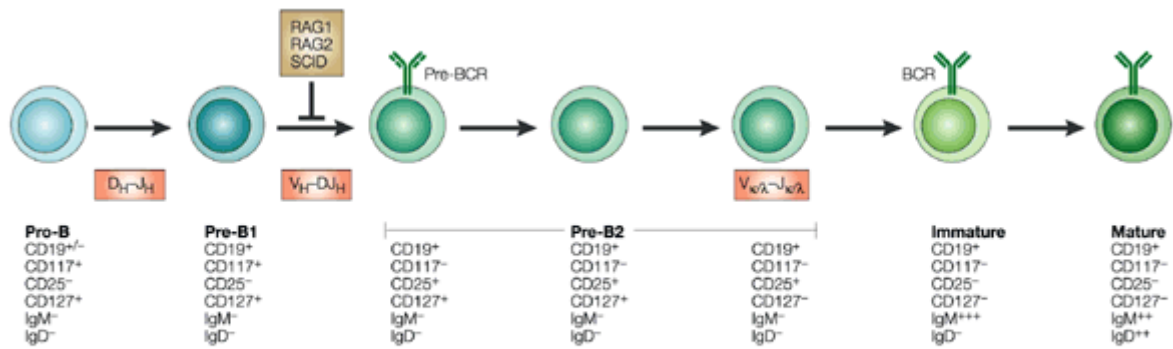
řetězec antigenního receptoru a následně podléhají negativní a pozitivní selekci v kortexu thymu. V závislosti na afinitě jejich antigenního receptoru k MHC glykoproteinům I. nebo II. třídy, thymocyty ztrácí expresi jedné z kostimulačních molekul a přechází do tzv. single pozitivního (SP) stádia, kdy exprimují pouze CD4 (pomocné Th) nebo CD8 (cytotoxické T-lymfocyty) molekulu (viz obrázek 4-5).



převzato z (Ceredig and Rolink 2002)

Obrázek 4-5: Vývojová stádia thymocytů. V DN stádiu thymocyty neexprimují CD4 ani CD8 molekulu, toto stádium můžeme podle exprese povrchových molekul CD25 a CD44 rozdělit na stádia DN1-4. Thymocyty následně přechází do DP stádia, kdy exprimují CD4 i CD8 a poté do SP stádia, ve kterém exprimují pouze CD4 nebo CD8. V obrázku jsou pod jednotlivými stádii vypsané povrchové molekuly, které tato stádia exprimují (+) nebo neexprimují (-) a podle kterých je lze rozlišit. Pod šipkami je vyznačeno, kdy probíhají jednotlivá stádia V(D)J rekombinace.

Vývoj B-lymfocytů probíhá v kostní dřeni ze společného lymfoidního progenitoru. Během vývoje B-lymfocytů rozlišujeme několik stádií – pro-B stádium, kde začíná VDJ rekombinace těžkého řetězce imunoglobulinu; pre-B1 stádium, u kterého proběhla VDJ rekombinace těžkého řetězce a ve kterém se testuje schopnost těžkého řetězce přenášet signál do buňky; pre-B2 stádium, pro které charakteristické DJ rekombinace genu pro lehký řetězec, shrnuto v (Melchers, ten Boekel et al. 2000) (viz obrázek 4-6). Dalším vývojovým stádiem je nezralý B-lymfocyt, který již exprimuje funkční BCR a podléhá pozitivní a negativní selekci. Nezralý B-lymfocyt následně vycestovává z kostní dřene do sekundárních lymfoidních orgánů, kde po interakci s antigenem na antigen prezentujících buňkách může být stimulován k další maturaci (viz obrázek 4-6).



Nature Reviews | Immunology

převzato z (Ceredig and Rolink 2002)

Obrázek 4-6: Vývojová stádia B-lymfocytů. Vývoj od pro-B až k zralému B-lymfocytu, pod obrázkem jsou popsána jednotlivá stádia a vypsány povrchové molekuly, které tato stádia exprimují (+) či neexprimují (-) a podle kterých je lze rozlišit. Pod šipkami je vyznačeno, kdy probíhají jednotlivá stádia V(D)J rekombinace. Vývoj od pro-B, přes pre-B1 a pre-B2 až k nezralému B-lymfocytu probíhá v kostní dřeni. Maturace B-lymfocytů pak probíhá v sekundárních lymfoidních orgánech.

Chromatin remodelační faktory hrají pro maturaci lymfocytů zásadní roli. Nejpodrobněji jsou v tomto ohledu u savců popsány pouze dva chromatin remodelační faktory a to Brg1 a Mi-2 β . Jako první bych zmínila transkripční aktivátor Brg1, který je členem SWI/SNF podrodiny SWI2/SNF2 ATPáz. Ve studii provedené na myším modelu s homozygotní delecí faktoru Brg1 bylo pozorováno, že dochází k vývojovému bloku thymocytů při přechodu z tzv. dvojitě negativní fáze (DN) do CD4 a CD8 dvojitě pozitivní (DP) fáze (Gebuhr, Kovalev et al. 2003). K podobnému závěru došli i autoři další studie provedené na Brg1 deficientních myších. Zde byl pozorován nejen vývojový blok v přechodu mezi z DN do DP fáze, ale i další vývojové anomálie přítomné už v dřívějších stádiích - DN1 až DN3 (Chi, Wan et al. 2003). Druhým prozkoumaným chromatin remodelačním faktorem je Mi-2 β , jinak také známý jako CHD4 (anglicky Chromodomain helicase DNA binding protein 4). Tento faktor se nachází v komplexu NuRD (anglicky Nucleosome remodeling deacetylase) a je členem CHD podrodiny SWI2/SNF2 ATPáz. Ve studii provedené na myším modelu s delecí proteinu Mi-2 β byl pozorován výrazný pokles počtu DP thymocytů a nárůst počtu CD8⁺ thymocytů (Williams, Naito et al. 2004). Autoři studie se domnívají, že remodelační faktor Mi-2 β je pravděpodobně nezbytný pro vývoj CD4⁺ T-lymfocytů. Dále bylo zjištěno, že se protein Mi-2 β váže na transkripční enhancer genu pro CD4 molekulu, kde se pravděpodobně účastní

aktivace exprese této kostimulační molekuly (Williams, Naito et al. 2004). Faktor Mi-2 β také zvyšuje expresi genu pro CD4 molekulu tím, že se může účastnit deacetylace histonových proteinů v oblasti jeho transkripčního silenceru (Naito, Gomez-Del Arco et al. 2007). Další studie dokládá vliv proteinu Srg3 (jedna z podjednotek SWI/SNF chromatin remodelačního komplexu) na vývoj B-lymfocytů. U myši s delecí proteinu Srg3 v hematopoetickém progenitoru byl pozorován vývojový blok při přechodu z pro-B do pre-B fáze vývoje B-lymfocytů (Choi, Ko et al. 2012).

Je tedy zřejmé, že chromatin remodelační komplexy hrají významnou roli ve vývoji T a B-lymfocytů. Vzhledem k výše popsaným funkcím proteinu Smarca5 jsme předpokládali, že i tento protein může hrát roli při chromatinových remodelacích spojených s vývojem T a B-lymfocytů. Díky popsané roli proteinu Smarca5 během oprav dvouřetězcových zlomů DNA mechanismem NHEJ (anglicky Non-homologous end joining), jsme předpokládali jeho přímou účast na V(D)J rekombinaci. Opravy DNA pomocí NHEJ jsou jedním z mechanismů zvyšování variability během V(D)J rekombinace. O roli proteinu Smarca5 během vývoje lymfocytů víme v současnosti jen velmi málo. Například pomocí *in vitro* studie bylo zjištěno, že protein Smarca5 může zajistit snazší přístup rekombinázám RAG1 a RAG2 k DNA a tím umožnit V(D)J rekombinaci (Patenge, Elkin et al. 2004). Naše laboratoř se zabývá studiem chromatin remodelačního faktoru Smarca5. Pro účely studia tohoto remodelačního faktoru *in vivo*, byl v naší laboratoři vytvořen myší model s podmíněnou (kondiciální) delecí genu Smarca5. Projekt, jehož jsem se v průběhu svého magisterského studia účastnila, využívá právě tento myší model ke studiu funkce proteinu Smarca5 ve vývoji thymocytů a snaží se zodpovědět některé výše zmíněné otázky (viz kapitola 7.2).

5 Materiály

5.1 Technické vybavení

Amaxa Nucleofector II (Lonza)
Analytické váhy ALJ 220-4 (KERN)
Automatické pipety BioPette autoclavable (Labnet)
Blotovací sestava (Bio-Rad)
Centrifuga 5415D (Eppendorf)
Centrifuga 5417R (Eppendorf)
Centrifuga 5804R (Eppendorf)
Cryo Tube 20 (TPP)
Cytometr BD FACS CantoII (BD Biosciences)
Fotoaparát Canon G12 (Canon)
Hematologický analyzátor BC-5300Vet (Mindray)
Horizontální elektroforéza HE33 (Hoefler)
Inkubátor Orbital Shaker (Gallenkamp)
Inkubátor TCH 100 (Laboratorní přístroje Praha)
Inzulínové stříkačky na jedno použití (Chirana)
Kultivační 6/12/24/96-well (Orange Scientific)
Kultivační lahve, povrch 75 cm² (Orange Scientific)
Kultivační misky, průměr 10 cm (Orange Scientific)
Laminární box Telstar BioIIA (TELSTAR)
Magnetický míchač Heating Magnetic Stirrer (Velp Scientifica)
Mastercycler Gradient (Eppendorf)
Měřič pH/mV/Temp PL-600 (EZDO)
Mikroskop Eclipse TS100 (Nikon)
Mikroskop IX71 (Olympus) s piezo-zaostřovací platformou NanoScanZ (Prior Scientific) a
CCD kamerou Clara DR328G (Andor)
Mini Rocker-Shaker PMR-30 (Grant-bio)
Molekulární sítko 40 μm (BD Biosciences)
Mr. Frosty Freezing Container (Thermo Scientific)
Parní sterilizátor Sterimat Plus (BMT Medical Technology)
Pipetboy Fastpette Plus (Labnet)
PVDF membrána (Bio-Rad)

Sérologické pipety 5/10/25 ml (TPP)
Sonikátor Bioruptor Standard UCD-200 (Diagenode)
Spektrofotometr NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific)
Stolní centrifuga Spectrafuge mini (Labnet)
Termoblok AccuBlock digital dry bath (Labnet)
Termoblok Thermomixer comfort (Eppendorf)
Termostat s atmosférou CO₂ Forma Direct Heat (Thermo Scientific)
Termostat TCH 100 (Laboratorní přístroje Praha)
UV-transluminátor T2202 (Sigma-Aldrich)
Vertikální elektroforéza (Bio-Rad)
Vodní lázeň NB9 (NÜVE)
Vortex MS1 Minishaker (IKA)
Zkumavky (15 a 50 ml) Centrifugal OrTubes (Orange Scientific)
Zkumavky 1,75 ml Snap Cap Micro Tube (BioCentrix)
Zkumavky na bakteriální kultury 10 ml Deltalab (Biogen)
Zkumavky na PCR 0,2 ml Thin Wall PCR 8-Strip Tubes (BioCentrix)

5.2 Chemikálie

4x Laemmli sample buffer (Bio-Rad)
6x DNA Loading Dye (Thermo Scientific)
10x Long PCR Buffer + MgCl₂ (Thermo Scientific)
10x PCR Buffer (Sigma-Aldrich)
30% Acrylamide/Bis roztok (Bio-Rad)
Agarose I (Amresco)
Albumin, from bovine serum (BSA) (Sigma-Aldrich)
APS (Amonium persulfate) (Sigma-Aldrich)
Betain (Sigma-Aldrich)
β-merkapt ethanol (Sigma-Aldrich)
Carbenicillin (Sigma-Aldrich)
Deoxycholát sodný (Sigma-Aldrich)
Diethylether (Penta)
Dimetylsulfoxid (DMSO) (Carl Roth GmbH)
DMEM - Dulbecco's Modified Eagle's Medium - high glucose 1x (Sigma-Aldrich)
dNTPs mix 10 mM (Biogen)

EDTA disodium salt dihydrate (Riedel-deHaën)
ESGRO mLIF (EMD Millipore)
Ethanol absolutní (Penta)
Ethidium bromid (EtBr) (Amresco)
Fenol (Sigma-Aldrich)
Fetal Bovine Serum (Hyclone)
Fetal Bovine Serum (Sigma-Aldrich)
Gelatin from porcine skin, Type A (Sigma-Aldrich)
GeneRuler 100bp Plus DNA Ladder (Fermentas)
GeneRuler 1kb DNA Ladder (Fermentas)
Geneticin G418 (Sigma-Aldrich)
Glycerol (Sigma-Aldrich)
Chlorid sodný (Amresco)
Chloroform (Penta)
Isopropanol (Penta)
KnockOut DMEM 1x (Sigma-Aldrich)
KnockOut Serum Replacement (Sigma-Aldrich)
L-glutamine 200 mM (Sigma-Aldrich)
LB Broth, Miller (Luria-Bertani) (Amresco)
LB Broth with agar (Lennox) (Sigma-Aldrich)
MEM Non-essential amino acid solution 100x (Sigma-Aldrich)
Methanol (Penta)
Nonidet P40 (NP-40) (Affymetrix)
PBS - Dulbecco's Phosphate Buffered Saline 10x (Sigma-Aldrich)
Penicilin-Streptomycin 100x (Gibco)
Pierce ECL Plus Western Blotting substrate (Thermo Scientific)
Precision Plus Protein Standards Dual Color (Bio-Rad)
SDS (Sodium dodecyl sulfate) (Amresco)
S.O.C. Medium (Invitrogen)
TEMED (Sigma-Aldrich)
Transfer pufr 10x (Bio-Rad)
Tris Hydrochloride (Amresco)
Trizma base (Sigma-Aldrich)
Trypsin (0,25%) EDTA 1x (Sigma-Aldrich)

Tween 20 (Amresco)

5.3 Protilátky

Protilátky na průtokovou cytometrii

Primární protilátky

anti-B220(klon: RA3-6B2)-biotin (Biolegend)
anti-B220 (klon: RA3-6B2)-FITC (Biolegend)
anti-CD4(klon: GK1.5)-biotin (eBioscience)
anti-CD4 (klon: RM4-5)-FITC (Biolegend)
anti-CD4 (klon: GK1.5)-PerCP (Biolegend)
anti-CD3ε (klon: 145-2C11)-biotin (Biolegend)
anti-CD8(klon: 53-6.7)-APC (Biolegend)
anti-CD8(klon: 53-6.7)-biotin (eBioscience)
anti-CD16/CD32 (klon: 93) (Biolegend)
anti-CD24 (klon: 30-F1)-PE (Biolegend)
anti-CD25 (klon: PC61)-PE (Biolegend)
anti-CD43 (klon: S7)-FITC (BD Biosciences)
anti-CD44(klon: IM7)-FITC (Biolegend)
anti-CD45 (klon: 30-F11)-Pe/Cy7 (Biolegend)
anti-CD117(c-Kit, klon: 2B8)-BV421 (BD Biosciences)
anti-Gr-1 (klon: RB6-8C5)-biotin (Biolegend)
anti-Ly-51(klon: 6C3)-AF647 (Biolegend)
anti-Mac-1 (klon: M1/70)-biotin (BD Biosciences)
anti-Nk1.1(klon: PK136)-PE/Cy7 (Biolegend)
anti-Ter119 (klon: Ter-119)-biotin (Biolegend)

Sekundární protilátky

Streptavidin-PE/Cy7 (Biolegend)
Streptavidin-PerCP (Biolegend)

Protilátky na western blot

Primární protilátky

anti-Smarca5 (králičí polyklonální) (Bethyl)
anti-FLAG (králičí polyklonální) (Cell Signaling Technology)
anti-Actin (myší, klon: AC-15) (Abcam)

Sekundární protilátky

anti-mouse-HRP conjugate (Jackson ImmunoResearch)

anti-rabbit-HRP conjugate (Jackson ImmunoResearch)

5.4 Enzymy

Long PCR enzyme mix (Thermo Scientific)

JumpStart Taq DNA polymerase (Sigma-Aldrich)

T4 DNA Ligase (Thermo Scientific)

BamHI (Thermo Scientific)

SacI (Thermo Scientific)

NheI (Thermo Scientific)

Sall (Thermo Scientific)

FseI (New England BioLabs)

5.5 Roztoky a média

1000x EtBr

0,5 mg EtBr (ethidium bromid) bylo rozpuštěno v 1 ml ddH₂O.

70% ethanol

36,46 ml 96% EtOH byl za stálého míchání ředěn sterilizovanou ddH₂O do výsledného objemu 50 ml.

2,5 M Betain

2,93 g betainu bylo rozpuštěno v 10 ml ddH₂O.

5 M NaCl

5,84 g NaCl bylo rozpuštěno ve 100 ml ddH₂O.

Neutralizovaný fenol

20 ml fenolu bylo smícháno s 20 ml 100 mM Tris-HCl (pH=7,5) v 50 ml zkumavce a důkladně zvortexováno. Zkumavka byla obalena hliníkovou fólií a vložena na 24 hodin do lednice. Po rozdělení tekutin je spodní, organická fáze, neutralizovaný fenol. Je možno odsát většinu horní vodné fáze.

1 M Tris-HCl (pH=6,8/7,5/8/8,8)

12,11 g Trizma base bylo rozpuštěno v 50 ml ddH₂O a upraveno pH přidáním HCl na požadovanou hodnotu. Poté byl roztok doplněn ddH₂O do 100 ml. Sterilizováno v parním sterilizátoru Sterimat Plus (121°C, 20 min).

10% SDS

50 g SDS (dodecylsulfát sodný) bylo rozpuštěno v 500 ml ddH₂O. Sterilizováno v parním sterilizátoru Sterimat Plus (121°C, 20 min).

0,5 M EDTA (pH=8)

73,06 g EDTA (ethylendiamintetraoctová kyselina) byla rozpouštěna ve 400 ml ddH₂O, za stálého míchání byl přidáván NaOH do doby, než roztok dosáhl pH=8. EDTA při pH nižším než 8 nerozpouští. Poté co došlo k úplnému rozpuštění, byl roztok doplněn ddH₂O do 500 ml. Sterilizováno v parním sterilizátoru Sterimat Plus (121°C, 20 min).

10% APS

50 g APS (persulfát amonný) byl rozpuštěn v 500 ml ddH₂O. Sterilizováno v parním sterilizátoru Sterimat Plus (121°C, 20 min).

Inhibitory proteáz : Complete proteinase inhibitor cocktail (Roche, 11697498001)

Dvě tablety byly rozpuštěny v 1 ml ddH₂O (PBS) a přidány do pufrů v ředění 1:100 těsně před jejich použitím.

Živné médium pro bakterie

12,5 g LB Broth bylo rozpuštěno v 500 ml dH₂O a sterilizováno v parním sterilizátoru Sterimat Plus (121°C, 20 min). Před použitím bylo do média přidáno antibiotikum carbenicillin tak, aby výsledná koncentrace antibiotika v médiu činila 50 µg/ml. Skladováno při 4°C.

Živný agar pro bakterie

7 g LB Broth with agar bylo rozpuštěno v 200 ml dH₂O a sterilizováno v parním sterilizátoru Sterimat Plus (121°C, 20 min). Před použitím bylo do média přidáno antibiotikum carbenicillin tak, aby výsledná koncentrace antibiotika v médiu činila 100 µg/ml. Skladováno při 4°C.

Tkáňová voda

Tkáňová voda byla připravena sterilizací ddH₂O v parním sterilizátoru Sterimat Plus (121°C, 20 min). Skladována při 4°C.

1x PBS

K 500 ml tkáňové vody bylo ve sterilních podmínkách přidáno 55,5 ml 10x PBS. Skladováno při 4°C.

Inaktivované FBS

FBS bylo inaktivováno 30 minut při 56°C ve vodní lázni. Zamraženo a skladováno při -20°C.

ESC médium s mLIF

Do 50 ml ESC média bylo ve sterilních podmínkách pipetováno 5 µl mLIF (10⁷ U/ml), výsledná koncentrace mLIF v médiu činila 1000 U/ml. Skladováno při 4°C.

0,1% gelatin

0,5 g gelatinu bylo rozpuštěno v 500 ml ddH₂O a sterilizováno v parním sterilizátoru Sterimat Plus (121°C, 20 min). Skladováno při 4°C.

<u>ESC médium</u>	<u>výsledná koncentrace</u>	
KnockOut DMEM 1x	500 ml	
KnockOut Serum Replacement	90 ml	15%
L-glutamin (200 mM)	6 ml	1%
Penicilin-Streptomycin (100x)	6 ml	1%
Neesenciální aminokyseliny (100x)	6 ml	1%
β-merkaptoethanol	4,2 µl	10 ⁻⁴ M

<u>ESC médium s FBS</u>	<u>výsledná koncentrace</u>	
KnockOut DMEM 1x	500 ml	
Inaktivované FBS (Hyclone)	90 ml	15%
L-glutamin (200 mM)	6 ml	1%
Penicilin-Streptomycin (100x)	6 ml	1%
Neesenciální aminokyseliny (100x)	6 ml	1%
β-merkaptoethanol	4,2 µl	10 ⁻⁴ M

MEF médium		výsledná koncentrace
DMEM 1x	500 ml	
Inaktivované FBS (Sigma-Aldrich)	60 ml	10%
Penicilin-Streptomycin (100x)	6 ml	1%
Neesenciální aminokyseliny (100x)	6 ml	1%
β-merkapt ethanol	4,2 μl	10 ⁻⁴ M

Zamražovací ESC médium 2x		výsledná koncentrace
Inaktivované FBS (Hyclone)	12 ml	80%
DMSO	3 ml	20%

Zamražovací MEF médium 2x		výsledná koncentrace
DMEM 1x	6 ml	
Inaktivované FBS (Sigma-Aldrich)	6 ml	40%
DMSO	3 ml	20%

RIPA Buffer (+EDTA)		výsledná koncentrace
10% SDS (s inhibitory proteáz)	1 ml	0,1%
NP-40	1 ml	1%
10% deoxycholát sodný	5 ml	0,5%
0,5 M EDTA (pH=8)	0,4 ml	2 mM
1 M Tris-HCl (pH=8)	5 ml	50 mM
5 M NaCl	3 ml	150 mM
ddH ₂ O	84,6 ml	celkem: 100 ml

Pufr TE		výsledná koncentrace
1 M Tris-HCl (pH=7,5)	1 ml	10 mM
0,5 M EDTA (pH=8)	0,2 ml	1 mM
ddH ₂ O	doplnění do 100 ml	celkem: 100 ml

Sterilizováno v parním sterilizátoru Sterimat Plus (121°C, 20 min).

1x Pufr TBS (pH=7,5)		<u>výsledná koncentrace</u>
Tris	6,05 g	50 mM
NaCl	8,76 g	150 mM
ddH ₂ O	doplnění do 1000 ml	celkem: 1000 ml

Sterilizováno v parním sterilizátoru Sterimat Plus (121°C, 20 min).

Transfer pufr		<u>výsledná koncentrace</u>
Transfer pufr 10x	100 ml	1x
Methanol	200 ml	20%
10% SDS	10 ml	0,1%
ddH ₂ O	doplnění do 1000 ml	celkem: 1000 ml

10% polyakrylamidový running gel

dH ₂ O	2,58 ml
1,5M Tris/HCl (pH=8,8)	1,7 ml
10% SDS	67 µl
Polyakrylamidový gel 30%	2,22 ml
10% APS	67 µl
TEMED	7 µl

5% polyakrylamidový stacking gel

dH ₂ O	2,5 ml
0,5M Tris/HCl (pH=6,8)	450 µl
10% SDS	36 µl
Polyakrylamidový gel 30%	600 µl
10% APS	36 µl
TEMED	3,6 µl

5.6 Komerční soupravy

DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen)

High-Speed Plasmid Mini Kit (Geneaid)

GenElute HP Plasmid Midiprep Kit (Sigma-Aldrich)

Mouse ES Cell Nucleofector Kit (Lonza)

Presto Max Gel/PCR Kit (Geneaid)

5.7 Použitý software

CorelDRAW Graphics Suite X7 (CorelDRAW)

FACSDiva software v.6.1 (BD Biosciences)

FlowJo software (LLC)

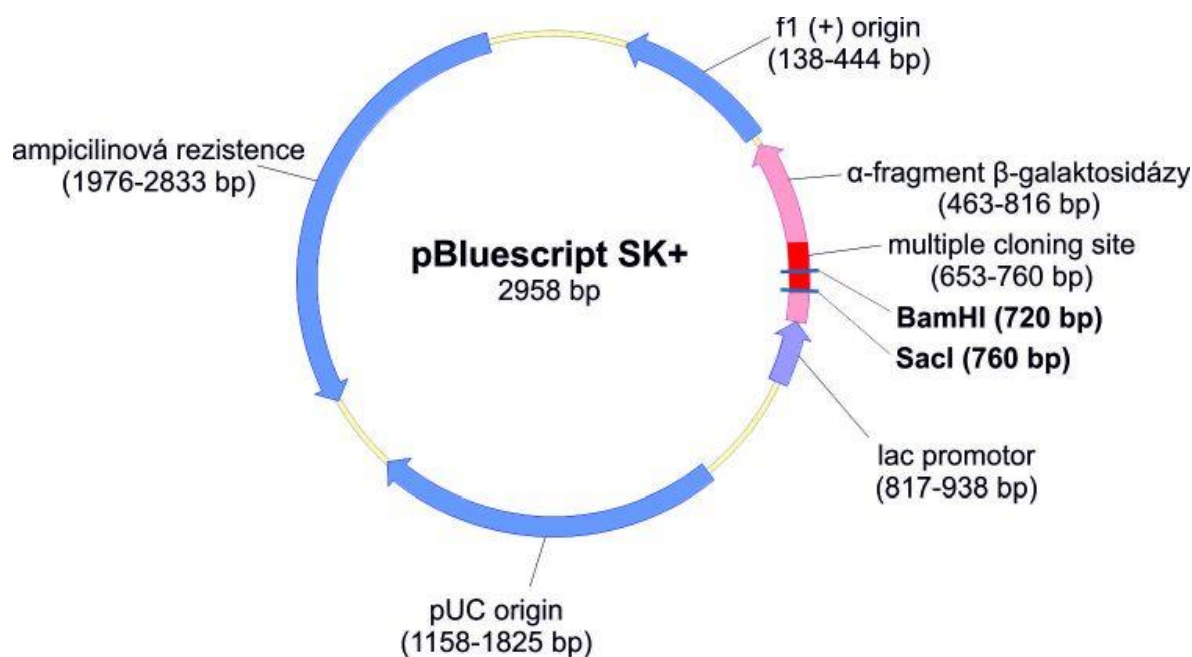
ImageJ (open source project)

Prism v.5 (GraphPad)

Vector NTI v.10 (Life Technologies)

5.8 DNA vektory

pBluescript SK+ (Stratagene)

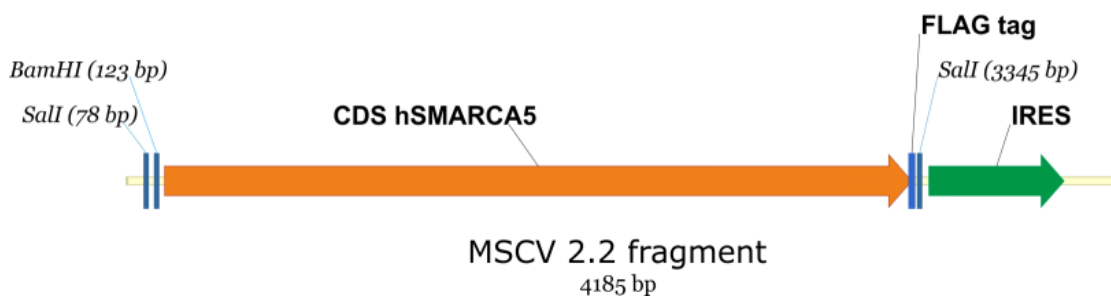


Plasmid p15-6-20

Plasmid p15-6-20 obsahuje homologní ramena k Rosa26 lokusu a byl navržen tak, aby do něj bylo možné ligovat DNA vektor sloužící k homologní rekombinaci do Rosa26 lokusu. Dále tento plasmid obsahuje rezistenci vůči antibiotikům neomycin/kanamycin a ampicilin. Plasmid p15-6-20 také obsahuje sekvenci pro fluorescenční protein tdTomato ohraničenou LoxP místy, sekvenci pro tento protein je tedy možné vyštěpit působením Cre rekombinázy. Plasmid p15-6-20 byl získán darem z laboratoře Vladimíra Kořínka, Ph.D., Ústav molekulární genetiky, AV ČR.

MSCV2.2 fragment

Fragment MSCV2.2 obsahuje kódující sekvenci proteinu hSMARCA5 s proteinovou značkou FLAG na C-konci proteinu a IRES sekvenci. Fragment byl získán z laboratoře prof. A. I. Skoultchiho, Albert Einstein College of Medicine, NY.



5.9 Organismy

Subcloning Efficiency DH5 α Competent Cells (Invitrogen)

Chemicky kompetentní bakterie kmene *E. coli*. Genotyp: F⁻ Φ 80lacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF) U169 *recA1 endA1 hsdR17*(r_k⁻, m_k⁺) *phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1* λ ⁻

ElectroMAX DH10B Cells (Invitrogen)

Elektrokompetentní bakterie kmene *E. coli*. Genotyp: F⁻ *mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) ϕ 80lacZ Δ M15 Δ lacX74 *recA1 endA1 araD139* Δ (*ara, leu*)7697 *galIU galK* λ ⁻ *rpsL nupG*

Myší embryonální kmenové buňky

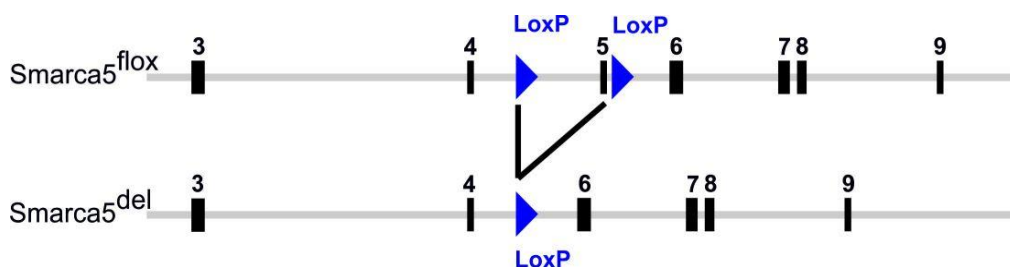
Pluripotentní myší embryonální kmenové buňky, linie R1. Tato linie byla vytvořena v roce 1993 v laboratoři Adrása Nagyho. Embryonální buňky byly derivovány z blastocyst z chinchilla 129/Sv samic, které byly kříženy s agouti 129/Sv-CP samci. Vytvořená linie R1 má samčí genotyp XY. Myší chiméry vytvořené s využitím ESC linie R1 mají barvu srsti agouti (Nagy, Rossant et al. 1993).

Myší model podmíněně deletovatelné alely genu *Smarca5* v CD2 exprimujících buňkách

Tento myší model byl vytvořen křížením dvou myších modelů a to myšího modelu s podmíněně deletovatelnou alelou genu *Smarca5*^{flox} a myšího modelu exprimujícího Cre rekombinázu (exprese je řízená promotorem genu hCD2). Expresor Cre rekombinázy řízený hCD2 promotorem nese transgenní sekvenci hCD2-iCre (promotor a LCR (anglicky Locus Control Region) lidského genu pro CD2 molekulu) náhodně inkorporovanou do oblasti genů kódujících barvu srsti. Vlivem toho mají myši s genotypem *hCD2-iCre*^{+/-} barvu srsti agouti.

Myši kmene hCD2-iCre jsou fertilní a kromě změny barvy srsti nevykazují žádné fenotypové změny. Myší transgenní model hCD2-iCre byl zakoupen z Jacksonovy laboratoře (The Jackson Laboratory - Stock No. 008520, Bar Harbor, Maine, USA). Myší model s podmíněně aktivovatelnou delecí alely genu *Smarca5^{flox}* byl vytvořen v naší laboratoři a umožňuje tkáňově specifickou delecí genu *Smarca5*. Sekvence genu *Smarca5^{flox}* obsahuje dvě LoxP místa v intronu 4 a 5. Vlivem působení Cre rekombinázy dojde k vyštěpení exonu 5, který kóduje helikázovou doménu proteinu *Smarca5*, a zároveň dojde k posunu čtecího rámce, (viz obrázek 5-1). Po vyštěpení exonu 5 tedy nedochází ke vzniku funkčního proteinu *Smarca5*. Myši s genotypem *Smarca5^{flox/flox}* jsou fertilní a nevykazují žádné fenotypové změny a mají černou barvu srsti.

Křížení dvou výše popsaných modelů dalo vzniknout modelu s podmíněně deletovanou alelou genu *Smarca5^{flox}* v CD2 exprimujících buňkách. Myši mají genotyp *Smarca5^{flox/flox}hCD2-iCre^{+/-}* a dochází u nich vlivem působení Cre rekombinázy k řízené delecí části genu *Smarca5^{flox}* (viz výše) ve všech CD2 exprimujících buňkách. Vlivem toho v těchto buňkách nevzniká funkční protein *Smarca5*. U myší molekulu CD2 exprimují již prekurzory B a T-lymfocytů a také NK buňky. Popsaný model je tedy vhodný ke studiu funkcí proteinu *Smarca5* při vývoji těchto buněk. Samice s genotypem *Smarca5^{flox/flox}hCD2-iCre^{+/-}* vykazují sníženou fertilitu, samci jsou plně fertilní.



Obrázek 5-1: Delece exonu 5 genu *Smarca5* vlivem působení Cre rekombinázy. V intronech kolem exonu 5 se nachází LoxP místa, která jsou rozeznávána Cre rekombináзой. To umožňuje vyštěpit celý exon 5, čímž uskuteční zkrácení kódující sekvence genu *Smarca5* a zároveň posune jeho čtecí rámec. Rekombinovaná alela neprodukuje žádný funkční protein *Smarca5*.

6 Metody

6.1 Příprava transgenního DNA vektoru

Transformace kompetentních buněk DH5 α

Zkumavka s 25 μ l zamražené (-80°C) bakteriální suspenze byla umístěna do ledové lázně a pozvolna rozmrazena. K rozmražené kultuře bylo pipetováno 10 ng plasmidové DNA a směs byla špičkou šetrně zamíchána. Takto připravená bakteriální suspenze byla inkubována na ledu po dobu 30 minut. Poté byl proveden tepelný šok ve vodní lázni bez třepání a to při 42°C po dobu 20 sekund. Suspenze byla umístěna na 2 minuty zpět na led a poté bylo přidáno 250 μ l S.O.C. media předehřátého na pokojovou teplotu. Bakterie byly následně inkubovány v třepačce 1 až 2 hodiny při 37°C a 225 rpm. Pak byla bakteriální suspenze rozetřena na předehřáté (37°C) misky s živným agarem a antibiotikem (carbenicillin 100 μ g/ml) a to ve dvou různých objemech 50 μ l a 200 μ l. Petriho misky s vysetými bakteriemi byly inkubovány přes noc ve 37°C. Druhý den byly z misek vypíchnuty bakteriální kolonie pro následné využití. Misky se zbylými koloniemi byly skladovány ve 4°C.

Elektroporace kompetentních buněk DH10B

Zkumavka s 25 μ l zamražené (-80°C) bakteriální suspenze byla umístěna do ledové lázně a pozvolna rozmrazena. K rozmražené kultuře bylo pipetováno 50 ng plasmidové DNA a směs byla špičkou šetrně zamíchána. Suspenze byla následně opatrně přepipetována do elektroporační kyvety, tak aby nevznikly bubliny, a elektroporována (2 kV, 200 Ω , 25 μ F). Poté byla suspenze přepipetována do zkumavky s 250 μ l S.O.C. media předehřátého na pokojovou teplotu. Bakterie byly následně inkubovány v třepačce 1 až 2 hodiny při 37°C a 225 rpm. Pak byla bakteriální suspenze rozetřena na předehřáté (37°C) misky se živným agarem s antibiotikem (carbenicillin 100 μ g/ml) a to ve dvou různých objemech 50 μ l a 200 μ l. Petriho misky s vysetými bakteriemi byly inkubovány přes noc ve 37°C. Druhý den byly z misek vypíchnuty bakteriální kolonie pro následné využití. Misky se zbylými koloniemi byly skladovány při 4°C.

Minipreparace plasmidové DNA z bakteriální suspenze

Pro získání bakteriální suspenze byly transformované bakteriální kolonie pomocí sterilní špičky vypíchnuty z misek se živným agarem nebo z bakteriální konzervy a přeneseny do předem připravených zkumavek se 6 ml živného média s přidaným antibiotikem (carbenicillin 50 μ g/ml). V tomto médiu byly bakterie inkubovány v termostatu přes noc při

37°C a 225 rpm. Druhý den byla z bakteriální suspenze izolována plasmidová DNA a to pomocí komerčního kitu „High-Speed Plasmid Mini Kit“ (Geneaid) a při izolaci DNA bylo postupováno podle pokynů výrobce. Koncentrace DNA pak byla měřena pomocí přístroje NanoDrop Spectrophotometer ND-100 (Thermo Scientific).

Midipreparace plasmidové DNA z bakteriální suspenze

Z předem připravené bakteriální suspenze o objemu 6 ml (viz výše) byly 2 ml přepipetovány do Erlenmeyerovy baňky se 100 ml živného média s antibiotikem (carbenicillin 100 µg/ml). Takto připravená bakteriální suspenze byla následně inkubována přes noc při 37°C a 225 rpm. Druhý den byla z bakteriální suspenze izolována plasmidová DNA a to pomocí komerčního kitu „GenElute™ HP Plasmid Midiprep Kit“ (Sigma-Aldrich). Při izolaci DNA bylo postupováno podle pokynů výrobce. Koncentrace DNA pak byla měřena pomocí přístroje NanoDrop Spectrophotometer ND-100 (Thermo Scientific).

Zamražování bakteriálních konzerv

K přípravě bakteriálních konzerv byla použita bakteriální suspenze s kulturou ve fázi exponenciálního růstu. Do kryozkumavky se šroubovacím víčkem bylo přeneseno 0,8 ml bakteriální suspenze a 0,2 ml glycerolu (výsledná koncentrace glycerolu tedy činila 20%). Suspenze byla zvortexována a následně uložena do -80°C.

Restrikční štěpení

Použité plasmidy byly štěpeny pomocí restrikčních endonukleáz a to buď enzymů BamHI a SacI nebo NheI a SalI. Štěpení těmito dvojicemi restrikčních enzymů bylo provedeno podle návodu získanému na webových stránkách výrobce: <https://www.thermofisher.com/us/en/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/thermo-scientific-restriction-modifying-enzymes/restriction-enzymes-thermo-scientific/double-digest-calculator-thermo-scientific.html>

Výsledný transgenní vektor hSMARCA5-FLAG byl linearizován enzymem FseI podle pokynů výrobce. Po ukončení štěpení byla provedena teplotní inaktivace restrikčních enzymů (65°C, 10 min).

Ligace

Ligace fragmentů byla provedena přes noc při 16°C za použití enzymu T4 DNA Ligase. Reakce byly pipetovány podle pokynů výrobce v molekulárních poměrech vektor:inzert = 1:1/1:3/1:5. Před transformací ligace do bakterií byla provedena teplotní inaktivace (65°C, 10 min).

Elektroforéza na agarózovém gelu

K rozdělení malých fragmentů DNA o velikosti pod 1000 párů bází byl používán agarózový gel o výsledné koncentraci agarózy 1,5%. Pro rozdělení fragmentů o velikosti nad 1000 párů bází byl použit gel s koncentrací agarózy 0,8%. Do agarózového gelu byl v průběhu jeho tuhnutí přidán ethidium bromid (EtBr), tak aby výsledná koncentrace EtBr činila 0,5 µg/ml. Podle velikosti očekávaných fragmentů byl na gel pipetován standard molekulových hmotností – Gene Ruler 1kbp/100bp (Thermoscientific). Ke každému vzorku DNA byl přidán roztok 6x DNA Loading Dye (Thermo Scientific) v poměru 1:5 vzhledem k objemu vzorku a vzorky byly napipetovány do jamek v gelu. Elektroforéza probíhala v pufru TBE při napětí 40 V po dobu 2 a 2,5 hodiny. DNA na gelu byla následně zviditelněna pomocí transluminátoru o vlnové délce 300 nm a gel vyfocen fotoaparátem Canon G12.

Izolace fragmentů DNA z agarózového gelu

Restričně štěpená DNA byla pipetována na agarózový gel s ethidium bromidem a rozdělena v elektrickém poli (viz výše). Poté byla DNA zviditelněna pomocí transluminátoru o vlnové délce 300 nm. Požadované fragmenty byly vyříznuty v co nejkratším čase spolu s co nejmenším možným množstvím gelu. DNA byla následně izolována s využitím komerčního kitu „Presto Max Gel/PCR Kit“ (Geneaid). Při izolaci DNA bylo postupováno dle pokynů výrobce. Koncentrace DNA pak byla měřena pomocí přístroje NanoDrop Spectrophotometer ND-100 (Thermo Scientific).

Fenol/chloroformová purifikace DNA

K vodnému roztoku DNA (500 µl) byl připipetován stejný objem (500 µl) roztoku chloroformu s neutralizovaným fenolem (pH=8) v poměru 1:1 (fenol:chloroform). Zkumavka se vzorkem byla následně vortexována 30s na maximální otáčky a poté stočena při pokojové teplotě (5 minut, 16 000 g), pro oddělení vodné a organické fáze. Poté byla odebrána horní vodná fáze a přepipetována do předem připravené zkumavky s chloroformem (500 µl). Vzorek byl znovu vortexován 30s na maximální otáčky a stočen při pokojové teplotě (5

minut, 16 000 g), pro oddělení vodné a organické fáze. Poté byla opět odebrána horní vodná fáze (500 µl) do předem připravené zkumavky a k ní bylo přidáno 400 µl isopropanolu. DNA byla precipitována 15 minut při pokojové teplotě za občasného převrácení zkumavky pro promíchání roztoku. Následovala centrifugace 15 minut, 16 000 g, 4°C. Pak byl odebrán všechen supernatant. K peletě DNA bylo přidáno 500 µl 70% ethanolu a zkumavka byla vortexována 30 s na maximální otáčky tak, aby došlo k utržení pelety. Dále byl roztok DNA centrifugován 10 minut, 16 000 g, 4°C. Supernatant byl odebrán a peleta DNA byla na vzduchu sušena 15-30 minut tak, aby se veškerý ethanol odpařil. Následně byla peleta rozpuštěna v požadovaném množství (např. 50 µl) TE pufru. Koncentrace DNA byla změřena pomocí přístroje NanoDrop Spectrophotometer ND-100 (Thermo Scientific). Roztok DNA byl následně skladován při -20°C.

Genotypování bakteriálních kolonií pomocí PCR

Genotypování bakteriálních kolonií nesoucích plasmid p15-6-20 hSMARCA5-FLAG pomocí metody PCR. Forward primer rozeznává sekvenci plasmidu p15-6-20 a reverse primer rozeznává sekvenci genu *hSMARCA5*.

Forward: 5' ACGAGGACCAAAGCCTTCAACACAG 3' velikost produktu: 852 bp

Reverse: 5' TGACAGTCGACAACCTTCCTGACTAGGGGAGGAGTAGAAGT 3'

Rozpis PCR reakce:	1x	Program cycleru:
10x PCR Buffer	2 µl	1) 94°C 3 min
dNTPs 2,5 mM	2 µl	2) 94°C 20 s
DMSO	0,4 µl	3) 58°C 30 s
2x10 µM Primer (1 µl každého)	1,2 µl	4) 72°C 1 min
JumpStart Taq DNA Pol	0,2 µl	5) zpět na krok 2)
ddH ₂ O	12,2 µl	zopakovat 35x
<u>DNA</u>	<u>2 µl</u>	6) 72°C 10 minut
Celkem	20 µl	

Sekvenace plasmidů

Pro sekvenaci bylo použito množství 100 ng plasmidu a 2 pmol primeru na reakci. Celkový objem jedné reakce činil 8 µl. Samotná sekvenace probíhala v Laboratoři sekvenace DNA na Přírodovědecké fakultě UK.

Primery použité pro sekvenaci (v závorce je napsáno jakou sekvencí primer rozeznává, u genu pro protein Smarca5 i od kterého páru bází tohoto genu):

Forward:

5' ATTACCGACACCGTAGAACAGAGC 3' (hSmarca5 430 bp)

5' TCCCACATCTCCCCCTGAACC 3' (pBSK_adaptor)

5' CCAGTCATAGCTGTCCCTCTTC 3' (RgPA terminator)

5' AGATGTGTTTAATTCAGCAGATGAC 3' (hSmarca5 1092 bp)

5' GTCGAATTAAGGCTGATGTTGA 3' (hSmarca5 1202 bp)

Reverse:

5' CTCATCAATGTATCTTATCATGTCTG 3' (PA terminator)

5' CATCTCTTGAATTCATCCAG 3' (mSmarca5 764 bp)

5' TCATCATTAAGGGATTCAGCTTC 3' (hSmarca5 2486 bp)

5' TGGTAAATCCCTGTGTTAGAAGC 3' (hSmarca5 2530 bp)

6.2 Kultivace embryonálních kmenových buněk

Příprava misek pro kultivaci ESC

Myší ESC byly kultivovány na gelatinizovaných kultivačních miskách s myšími embryonálními fibroblasty (MEF). Tyto misky byly připravovány vždy den dopředu a to následovně: v laminárním boxu byl na misky pomocí pipety nanesen 0,1% sterilní roztok gelatiny v deionizované vodě v množství přiměřeném kultivačnímu povrchu – 7 ml na misku o průměru 10 cm. Miskami bylo lehce zamícháno, aby se roztok rovnoměrně rozprostřel po celém dně. Takto byly misky ponechány 30-60 minut. Poté byl všechn roztok gelatiny z misek odsát a misky promyty čistým roztokem PBS. Na takto upravené misky byly vysety mitoticky inaktivované myší embryonální fibroblasty tak, aby pokryly přibližně 90% dna misek. Misky byly následně opatrně přeneseny do inkubátoru (37°C, 5% CO₂), kde byly ponechány přes noc. Druhý den bylo kultivační médium nahrazeno 10 ml předeřátého (37°C) ESC média s mLIF (1000 U/ml). Na takto připravené misky byly následně vysévány myší ESC.

Kultivace embryonálních kmenových buněk

Myší ESC byly kultivovány na gelatinizovaných miskách s mitoticky inaktivovanými myšími fibroblasty (MEF) při teplotě 37°C a 5% CO₂ a to v 10 ml ESC média s přidaným mLIF (1000 U/ml). Médium bylo měněno každý den a každý druhý (maximálně třetí den) byly ESC pasážovány (viz níže). Buňky byly pasážovány vždy na takovou plochu, aby po 48

hodinách kultivace pokrývaly asi 80-90% kultivačního povrchu. Veškerá média a PBS byly skladovány při 4°C a před použitím temperována ve vodní lázni na 37°C.

Pasážování myších ESC

Misky s myšimi ESC a MEF byly přeneseny do laminárního boxu, kde z nich bylo odsáto veškeré médium. Poté bylo na misky napipetováno předeřháté (37°C) PBS (6 ml na misku o průměru 10 cm), miskami bylo velmi lehce zamícháno a PBS odsáto. Takto jsme se zbavili zbytků kultivačního média, které by následně mohlo blokovat účinek trypsinu. Na misky byl napipetován roztok trypsinu o pokojové teplotě (1 ml roztoku trypsinu na misku o průměru 10 cm). Poté byly misky vloženy zpět do inkubátoru na přibližně 3 minuty, každou minutu byly misky lehce zamíchány a sledovány pod mikroskopem. Ve chvíli, kdy došlo k uvolnění většiny buněk z kultivačního povrchu, bylo na misky v laminárním boxu pipetováno ESC médium s FBS (10 ml na misku o průměru 10 cm). Buňky byly pomocí sérologické pipety resuspendovány a následně přeneseny do 15 ml zkumavky a stočeny 5 minut, 120 g, 4°C. Médium bylo slito a buňky resuspendovány v 3 ml (množství bylo případně upraveno podle množství buněk) ESC média. Následně byly buňky pipetovány na předem připravené misky s MEF a 10 ml kultivačního ESC média s mLIF.

Zamražování myších ESC

Misky s ESC byly opláchnuty PBS a buňky trypsinizovány a stočeny viz výše (pasážování). Poté byly buňky resuspendovány v odpovídajícím množství ESC média, ke kterému bylo následně přidáno 2x zamrazovací ESC médium v poměru 1:1 (ESC médium : 2x zamrazovací ESC médium). Následně bylo médium s buňkami pipetováno po 1 ml do kryozkumavek. Z jedné misky o průměru 10 cm byly připraveny obvykle 2-3 konzervy tak, aby bylo možné buňky po rozmražení nasít na misku o průměru 10 cm. Konzervy byly následně přeneseny do Mr. Frosty předchlazeného na -20°C a následně vloženy do -80°C. Pro dlouhodobé skladování byly konzervy přeneseny následující den do tekutého dusíku.

Rozmrazování myších ESC a MEF

Konzervy myších ESC nebo MEF byly umístěny do vodní lázně předeřháté na 37°C. Každých 30 vteřin byly kryozkumavky kontrolovány a jakmile v nich došlo k rozmražení většiny média, byly přeneseny do laminárního boxu. Zde bylo médium s buňkami ze zkumavek přepipetováno do předem připravené zkumavky s 10 ml nového ESC média. Kryozkumavky byly následně ještě propláchnuty 1 ml ESC média. Rozmražené buňky byly

stočeny 5 minut, 120 g, 4°C a médium bylo následně slito. Peleta buněk byla resuspendována v 1 ml ESC média s mLIF a buňky přeneseny na předem připravenou kultivační misku s MEF a 10 ml ESC média s mLIF (buňky byly rozmražovány na 1 misku o průměru 10 cm). Misky s buňkami pak byly opatrně přemístěny do inkubátoru (37°C, 5% CO₂).

Pro rozmražování MEF byl použit stejný postup, pouze bylo použito MEF médium a buňky byly vysety na gelatinizované misky (viz výše).

Příprava ozářených MEF

Myší embryonální fibroblasty byly napěstovány v kultivačních lahvích s povrchem 175 cm² do 3 až 4 pasáže (viz pasážování). V těchto lahvích byly následně ozařovány kobaltovým zářičem tak, aby byly vystaveny záření odpovídajícímu 35 Gy, čímž došlo k jejich mitotické inaktivaci. Následně bylo z lahví s ozářenými buňkami odsáto veškeré kultivační médium a buňky byly trypsinizovány 3 ml roztoku Trypsin/EDTA. Ve chvíli, kdy došlo k uvolnění naprosté většiny buněk, bylo do lahví pipetováno 25 ml MEF média. Následně byly buňky přeneseny do 50 ml zkumavky a stáčeny 5 minut, 120 g, 4°C. Poté byly buňky resuspendovány v odpovídajícím množství MEF média, ke kterému bylo následně přidáno 2x zamrazovací MEF médium v poměru 1:1 (MEF médium : 2x zamrazovací MEF médium). Suspenze buněk byla následně pipetována po 1 ml do připravených zamrazovacích zkumavek. Buňky byly zamražovány v takovém množství, aby bylo následně možné z 1 konzervy pokrýt přibližně 90% povrchu dvou misek o průměru 10 cm (z jedné lahve o povrchu 175 cm² plně porostlé buňkami byly obvykle vytvořeny 2 konzervy). Konzervy byly následně přeneseny do Mr. Frosty předchlazeného na -20°C a vloženy do -80°C. Druhý den byly konzervy přeneseny do tekutého dusíku.

6.3 Nukleofekce transgenního vektoru do myších ESC a genotypování

Nukleofekce transgenního vektoru do myších ESC

Před samotnou nukleofekcí bylo nutné oddělit ESC od mrtvých buněk a MEF, což bylo provedeno následovně: nejprve byly buňky promyty roztokem čistého PBS a poté trypsinizovány 2-3 minuty při 37°C (viz pasážování). Po stočení byla buněčná peleta resuspendována v 10 ml ESC média a přenesena na misku o průměru 10 cm, která nebyla gelatinizovaná. Misky s buňkami byly přeneseny do inkubátoru, kde byly ponechány 30 minut. Během této doby dojde k přisednutí MEF, zatímco ESC budou stále plavat v médiu. Po 30 minutách inkubace byl z misek sérologickou pipetou odsát veškerý zbytek buněčné suspenze a ta přepipetována do nové 15 ml zkumavky. Buněčná suspenze byla stáčena 5

minut, 120 g, 4°C a výsledná peleta resuspendována v 2 ml PBS (37°C). 10 µl buněčné suspenze bylo přeneseno na Bürkerovu komůrku a určena celularita suspenze. Dva miliony buněk bylo z této suspenze přeneseno do nové zkumavky, buňky byly stočeny (5 min, 120 g, 4°C) a následně použity na nukleofekci. Pro nukleofekci byl využit přístroj Amaxa Nucleofector II (Lonza) společně s komerčně dodávaným kitem „Mouse ES Cell Nucleofector Kit“ (Lonza). Na jednu reakci bylo k připravené peletě dvou milionů buněk ESC pipetováno 5 µg linearizovaného DNA vektoru a výsledná buněčná suspenze dále doplněna do celkového objemu 100 µl roztokem "Mouse ES Cell Nucleofection Solution". Buňky byly přeneseny do skleněné nukleofekční kyvety a elektroporovány podle standardního programu A-023. Okamžitě po nukleofekci byla buněčná suspenze přenesena pomocí Pasteurovy pipety do předem připravené zkumavky s předehřátými 500 µl ESC kultivačního média (37°C). Na závěr byly buňky ze zkumavky přepipetovány na předem připravenou Petriho misku s podpůrnou vrstvou buněk MEF s 10 ml ESC média s mLIF a přeneseny do inkubátoru.

Genotypování myších ESC

Pro izolaci DNA z myších ESC bylo využito komerčního kitu „DNeasy Blood and Tissue Kit“ (Quiagen) a bylo postupováno podle pokynů výrobce. Primery použité pro genotypování ESC (forward primer rozeznává sekvenci Rosa26 lokusu v genomické DNA a reverse primer rozeznává začátek transgenní sekvence, tedy sekvenci *tdTomato*):

Forward 2: 5' GTGTCTCTTTTCTGTTGGACCCTTACCT 3'

Reverse 2: 5' AAAAAGAAGAAGGCATGAACATGGTTAG 3' velikost produktu: 3400 bp

Primery použité pro genotypování ESC po delecii *tdTomato* (multiplexní reakce):

Forward: 5' AGCACTGGAAATGTTACCAAGG 3' (rozeznává sekvenci na konci krátkého homologního ramene k Rosa26 lokusu)

Reverse: 5' GCCGCCTTTGTTGCTGCTGTTG 3' velikost produktu: 567 bp

(tento primer rozeznává sekvenci, která následuje po sekvenci genu *tdTomato*, k tvorbě produktu PCR dochází tedy pouze při vyštěpení sekvence genu *tdTomato* – pozitivní kolonie)

Reverse: 5' CTCCTCGCCCTTGCTCACCA 3' velikost produktu: 401 bp

(tento primer rozeznává sekvenci na začátku genu *tdTomato*, pokud dochází k tvorbě produktu PCR, nedošlo k vyštěpení sekvence pro protein *tdTomato* – negativní kolonie)

Rozpis PCR reakce:	1x	Program cycleru:
10x Long PCR Buffer + MgCl ₂	2 µl	1) 94°C 3 min
dNTPs 2,5 mM	2 µl	2) 94°C 20 s
DMSO	1 µl	3) 61°C 30 s
2,5 M Betain	8 µl	4) 68°C 3 min + 1 s/cyklus
2x10 µM Primer (1 µl každého)	2 µl	5) zpět na krok 2)
Long PCR enzyme mix	0,2 µl	zopakovat 40x
ddH ₂ O	2,8 µl	6) 68°C 10 min
<u>DNA ESC</u>	<u>2 µl</u>	
Celkem	20 µl	

Genotypování myších chimér

Primery použité pro genotypování chimér (forward primer nasedá na konec sekvence genu *hSmarca5* a reverse primer rozeznává sekvenci *pGK promoter*):

Forward: 5' ACGAGGACCAAAGCCTTCAACACAG 3' velikost produktu: 852 bp

Reverse: 5' TGACAGTCGACAACTTCCTGACTAGGGGAGGAGTAGAAGT 3'

Interní pozitivní kontrola:

Forward: 5' AAAGTCGCTCTGAGTTGTTAT 3'

Reverse: 5' GGAGCGGGAGAAATGGATATG 3' velikost produktu: 603 bp

Rozpis PCR reakce:	1x	Program cycleru:
10x PCR Buffer	2 µl	1) 94°C 3 min
dNTPs 2,5 mM	2 µl	2) 94°C 20 s
DMSO	0,4 µl	3) 58°C 30 s
2x10 µM Primer (1 µl každého)	1,2 µl	4) 72°C 1 min
JumpStart Taq DNA Pol	0,2 µl	5) zpět na krok 2)
ddH ₂ O	12,2 µl	zopakovat 35x
<u>DNA</u>	<u>2 µl</u>	6) 72°C 10 minut
Celkem	20 µl	

Western blot

Myši ESC (2-3 miliony buněk) byly trypsinizovány (viz výše), přeneseny do 15 ml zkumavky a stáčeny 5 minut, 120 g, 4°C. Poté bylo slito veškeré médium a peleta buněk byla resuspendována v 5 ml PBS a opět stáčena 5 minut, 120 g, 4°C. PBS bylo slito a buňky byly resuspendovány ve 100 µl RIPA pufru s přidanými inhibitory proteáz. Poté byly buňky lyzovány 10 minut na ledu a následně sonikovány 1 s, amplituda 50%, při teplotě pulzu 20 °C (maximální teplota = 37°C). Při sonikaci byla 1,5 ml mikrocentrifugační zkumavka s buňkami umístěna v lázni s ledem. Sonikované buněčné lyzáty byly stáčeny 30 minut, 10 000 g, 4°C. Supernatant byl přenesen do nových zkumavek, které byly umístěny na ledu. Koncentrace proteinu v roztoku byla měřena pomocí Bradfordovy eseje. Ze vzorků bylo odebráno takové množství roztoku, které odpovídalo 50 a 100 µg proteinu. K tomuto objemu bylo poté přidáno 2,5 µl 4x Laemmli sample buffer (v poměru 1:10 s β-merkapt ethanol) a vzorky byly doplněny do objemu 10 µl RIPA pufrem. Proteiny v lyzátech byly denaturovány 5 minut, 95°C, vytemperovány na pokojovou teplotu a stáčeny 1 minutu, 14 000 g, při pokojové teplotě. Vzorky byly nanášeny na 10% polyakrylamidový (PAA) gel, spolu se standardem molekulových hmotností proteinů (6 µl). Elektroforéza probíhala 90 minut při napětí 120V. Po ukončení elektroforézy byl PAA gel promyt v Transfer pufru. PVDF membrána byla aktivována ponořením na 15 s do 100% methanolu a poté promyta v Transfer pufru. Následně byl sestaven „sandwich“ na blotování (katoda, filtrační papír, PAA gel, PVDF membrána, filtrační papír, anoda). Blotování probíhalo 50 minut při 100 V, za stálého míchání pufru na chlazení bločkem (-80°C). Po ukončení blotování byla PVDF membrána promyta v Transfer pufru a následně blokována 1 hodinu v 10% mléce v TBS + 0,1% Tween. Membrána byla po blokování 3x promyta roztokem TBS + 0,1% Tween. Poté byla membrána inkubována v roztoku primární protilátky rozpuštěné ve 2% mléce v TBS + 0,1% Tween při 4°C přes noc. Veškeré inkubace probíhaly na „kývačce“ (anglicky shaking platform). Druhý den byla membrána 3x promyta v TBS + 0,1% Tween a následně inkubována 10 minut při pokojové teplotě v TBS + 0,1% Tween. Poté byla membrána inkubována se sekundární protilátkou v roztoku 2% mléka v TBS + 0,1% Tween při 4°C po dobu 1 hodiny. Membrána byla 3x promyta v TBS + 0,1% Tween. Pro detekci signálu byla využita ECL (elektrochemiluminiscenční) reakce. Membrána byla inkubována 1 minutu při pokojové teplotě v Pierce ECL Plus Western Blotting substrate (Thermo Scientific). Všechny přebytečný pufr byl následně opatrně odsát pomocí buničité vaty a membrána byla umístěna do kazety na vyvolávání filmu a na ní byl umístěn film. Následně byl film exponován a vyvolán ve fotokomoře.

6.4 Průtoková cytometrie

Izolace myších orgánů a příprava buněčné suspenze

Myši byly nejdříve pomocí inhalační anestezie (ether) uvedeny do umělého spánku a následně usmrceny cervikální dislokací. Orgány (thymus a slezina) byly co nejrychleji po usmrcení vypreparovány a přemístěny ve zkumavkách na led. V těchto zkumavkách byly zváženy na analytických vahách. Následně byly homogenizovány za použití skleněného pístového homogenizátoru v 1 ml přechlazeného roztoku PBS s BSA (0,2%). Homogenizátor byl před a po každém použití promyt 70% ethanolem a destilovanou vodou. Získaná jednobuněčná suspenze byla ještě třikrát protažena inzulinovou injekční stříkačkou pro odstranění shluků buněk a poté umístěna na led. Pro izolaci kostní dřeně byly z myši vypreparovány femur a tibia z obou zadních končetin. Kostní dřeň byla následně vypláchnuta 1 ml předchlazeného PBS s BSA (0,2%) za pomoci inzulinové injekční stříkačky. Celularita buněčných suspenzí (thymus, slezina, kostní dřeň) byla měřena pomocí hematologického analyzátoru BC-5300Vet (Mindray).

Barvení buněčné suspenze

Buněčná suspenze byla po celou dobu práce umístěna na ledu a na promývání bylo používáno ledově vychlazené PBS s BSA (0,2%). Z buněčné suspenze byl odebrán takový objem, který odpovídal množství 2 milionů buněk a byl přepipetován do předem připravených zkumavek na průtokovou cytometrii s 3 ml PBS s BSA (0,2%). Zkumavky byly krátce zvortexovány a stočeny 5 minut, 350 g, 4°C. Poté byl slit supernatant a peleta buněk byla vortexováním resuspendována ve zbylém objemu (přibližně 100 µl). K buněčné suspenzi bylo pipetováno 0,5 µl protilátky Fc-block pro zablokování Fc receptorů. Po 10 min inkubaci na ledu byl k buněčné suspenzi pipetován připravený mastermix primárních protilátek, se kterými byla suspenze inkubována 20 minut na ledu. Následně byly do zkumavek připipetovány 3 ml PBS s BSA (0,2%) a zkumavky lehce zvortexovány a stočeny 5 minut, 350 g, 4°C. Supernatant byl slit a buňky resuspendovány ve zbylém objemu (100 µl). K buněčné suspenzi byla následně pipetována sekundární protilátka, se kterou byla inkubována 20 minut na ledu. Následovalo opět připipetování 3 ml PBS s BSA (0,2%), lehké zvortexování a stáčení 5 minut, 350 g, 4°C. Supernatant byl slit a buňky resuspendovány v 500 µl PBS s BSA (0,2%). Buněčná suspenze byla přefiltrována přes 40 µm molekulární sítko (BD Biosciences). Samotné měření probíhalo na přístroji BD FACSCanto II (BD

Biosciences). Kompenzace signálů a analýza dat pak byla provedena v softwaru BD FACSDiva (BD Biosciences) a FlowJo software (FlowJo, LLC).

7 Výsledky

7.1 Vývoj myšního modelu s indukovatelnou expresí proteinu Smarca5

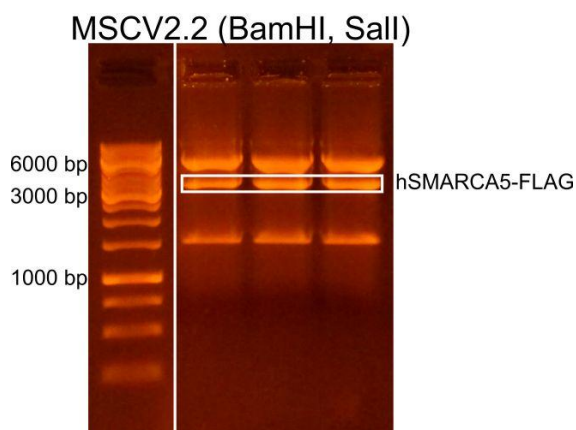
7.1.1 Vytvoření DNA vektoru pro homologní rekombinaci

Jedním z cílů této diplomové práce bylo vytvořit myší model s řízenou aktivací nadprodukce proteinu Smarca5 v buňkách. Vytvoření myšního modelu je několikastupňový proces, který v tomto případě vyžadoval nejprve klonování DNA konstrukt (anglicky targeting construct) pro genetické modifikování embryonálních kmenových buněk (ESC) pomocí homologní rekombinace. V této práci byl zvolen pro klonování DNA konstrukt bezpromotorový vektor p15-6-20, do kterého byla v několika krocích ligována cDNA proteinu hSMARCA5 (viz obrázek 7-1). Vektor p15-6-20 obsahuje 5' krátké a 3' dlouhé homologní rameno umožňující integraci transgenní kazety do lokusu Rosa26. Lokus Rosa26 je specifický tím, že je konstitutivně exprimován prakticky všemi buňkami těla, ale jeho přerušení (např. integrací DNA konstrukt) nemá vliv na fenotyp myši (Zambrowicz, Imamoto et al. 1997). Této skutečnosti bylo využito i při navrhování vektoru p15-6-20. Vektor p15-6-20 obsahuje mezi zmíněnými homologii mimo jiné kódující sekvenci pro fluorescenční protein tdTomato a vzhledem k absenci eukaryotního promotoru ve vektoru je tento fluorescenční protein exprimován pouze po jeho správné integraci do genomu. Expresi fluorescenčního proteinu tdTomato je tedy spouštěna teoreticky pouze z endogenního promotoru Rosa26 lokusu a slouží pro pozitivní selekci klonů myších ESC. Sekvence pro fluorescenční protein tdTomato má v DNA vektoru ještě další význam a to zabránit expresi genu, který se nachází za ním. V našem případě to byl právě gen *hSMARCA5*. Aby bylo vůbec možné spustit expresi genu nacházejícího se za tdTomato, byla do sekvence vektoru vložena ještě dvě LoxP místa kolem kódující sekvence pro tento fluorescenční protein. Sekvenci pro protein tdTomato je díky tomu možné tkáňově specificky odstranit vlivem působení Cre rekombinázy. Další kódující částí tohoto vektoru, která slouží pro pozitivní selekci, je kazeta umožňující buňkám rezistenci k antibiotiku neomycinu. Vektor p15-6-20 byl tedy vybrán z hlediska popsaných charakteristik pro klonování DNA konstrukt s indukovatelnou expresí proteinu hSMARCA5.



Obrázek 7-1: Schéma transgenního DNA vektoru. Vektor obsahuje homologní ramena k Rosa26 lokusu na 5' konci (R26 Short Arm) a na 3' konci (R26 Long Arm). Dále pak obsahuje sekvenci fluorescenčního proteinu tdTomato ohraničenou LoxP místy, kterou je možné vyštěpit pomocí Cre rekombinázy. Za touto sekvencí se nachází cDNA pro lidský protein hSMARCA5 a neomycinová rezistence.

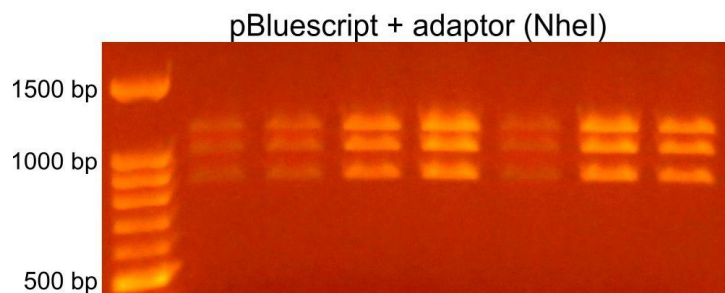
DNA konstrukt pro homologní rekombinaci do myších ESC, byl sestaven v zásadě ze dvou částí a to z vektoru p15-6-20 a sekvence cDNA (kódující DNA, anglicky coding DNA) pro lidský protein hSMARCA5, tato lidská kódující sekvence proteinu je z 97,4% homologní k myší sekvenci pro protein Smarca5. Sekvence cDNA pro protein hSMARCA5 s proteinovou značkou pro odlišení od endogenního proteinu (FLAG) byla vyštěpena z vektoru MCSV2.2 za pomoci restričních endonukleáz SalI a BamHI (viz obrázek 7-2).



Obrázek 7-2: Foto 0,8% agarózového gelu po proběhlé elektroforéze: Fragment MCSV2.2 štěpený restričními endonukleázami BamHI a SalI. Očekávané fragmenty: 5125 bp, 3228 bp (hSMARCA5-FLAG), 1376 bp, 51 bp. Bílým obdélníkem je vyznačen fragment hSMARCA5-FLAG, který byl vyřezáván.

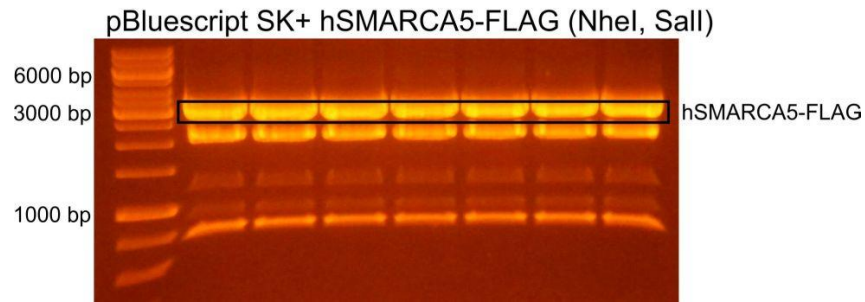
Vyštěpená sekvence cDNA hSMARCA5-FLAG byla následně klonována do upraveného plasmidu pBluescript SK+ (Stratagene). Tento krok navíc musel být zvolen z důvodu zachování správné orientace cDNA hSMARCA5 ve výsledném DNA vektoru a zároveň pro získání restričního místa NheI na 3' konci jeho sekvence DNA. Plasmid pBluescript SK+ byl nejprve otevřen restričními enzymy SacI a BamHI a přes tyto dvě

restrikční místa byl do plasmidu zaligován adaptor s následující sekvencí: 5' CGCTAGCTGAAGTTCCTATACTTTCTAGAGAATAGGAACTTCGGAATAGGAACTT CG 3' (3'-SacI-NheI-FRT-BamHI-5'). Tím došlo k přidání zmíněného restrikčního místa pro enzym NheI do plasmidu pBluescript SK+. Pro ověření integrace adaptoru bylo provedeno štěpení výsledného plasmidu restrikčním enzymem NheI (viz obrázek 7-3). Výsledný plasmid byl transfekován do bakterií pomocí teplotního šoku.



Obrázek 7-3: Foto 1,5% agarózového gelu po proběhlé elektroforéze: Ověřovací štěpení plasmidu pBluescript SK+ po ligaci s adaptorem pomocí restrikční endonukleázy NheI. Očekávané fragmenty: 1142 bp, 1008 bp, 808 bp. Všechny ověřované kolonie nesou správný plasmid.

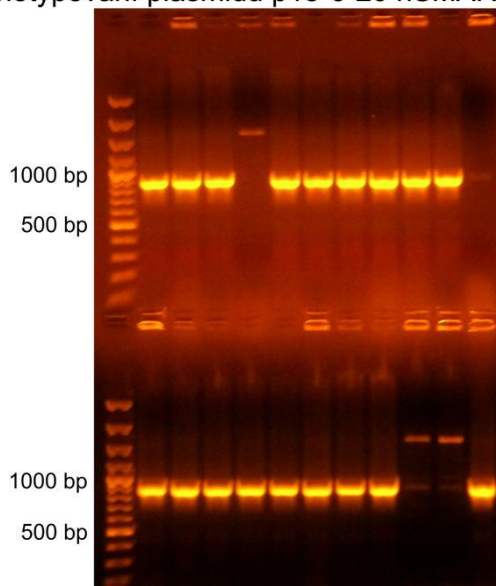
Plasmid pBluescript SK+ s adaptorem byl následně štěpen restriktázami Sall a BamHI a přes tato restrikční místa do něj byla zaligována sekvence pro protein hSMARCA5-FLAG. Produkt ligace byl transfekován do bakterií pomocí tepelného šoku. Popsaný mezi produkt klonování pBluescript SK+ hSMARCA5-FLAG byl následně štěpen restrikčními enzymy NheI a Sall a přes tato restrikční místa byl ligován do vektoru p15-6-20 (fragment DNA využitý k ligaci viz obrázek 7-4). Vzhledem k problémům s transformací ligace DNA vektoru do chemokompetentních buněk DH5 α musela být ligační reakce do bakterií elektroporována (konkrétně zvolen kmen elektrokompetentních bakterií DH10B).



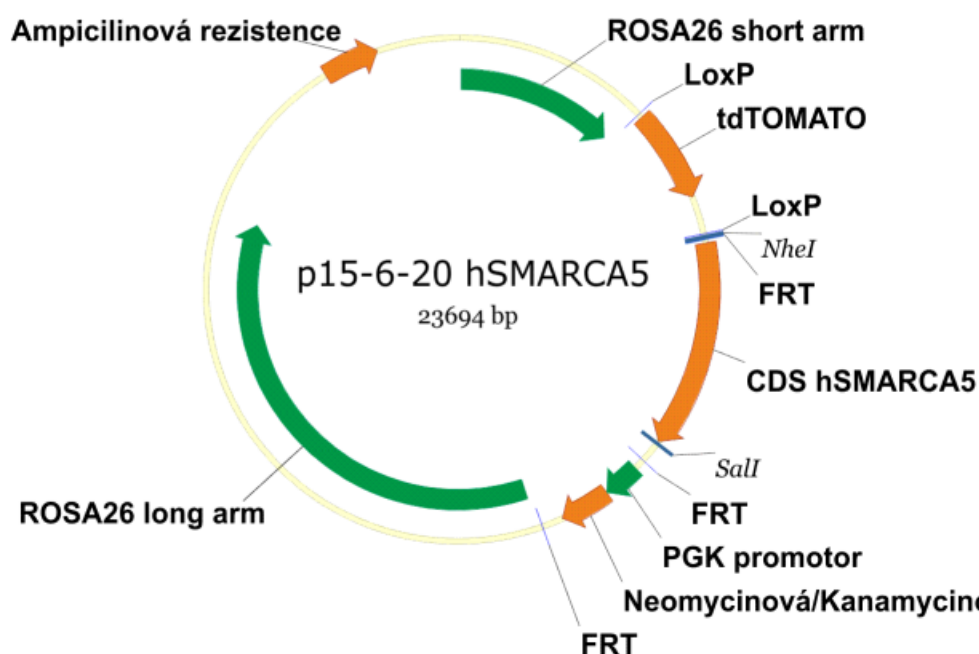
Obrázek 7-4: Foto 0,8% agarózového gelu po proběhlé elektroforéze: Plasmid pBluescript SK+ hSMARCA5-FLAG byl štěpen pomocí restričních endonukleáz NheI a Sall. Očekávané fragmenty: 3277 bp (hSMARCA5-FLAG), 2165 bp, 1246 bp, 919 bp, 718 bp. Černým obdélníkem je vyznačen fragment hSMARCA5-FLAG, který byl vyříznut a použit pro ligaci do plasmidu p15-6-20.

Za pomoci PCR bylo ověřeno 22 kolonií a z nich 18 vyšlo pozitivních (viz obrázek 7-5). Správnost sekvence výsledného DNA vektoru byla ověřena restričně a sekvenací plasmidu. Mapa výsledného plasmidu (viz obrázek 7-6). Kompletní postup pro pěstování bakterií, izolaci DNA, restriční štěpení, ligace a sekvenace je popsán v kapitole 6.1. Výchozí vektor byl následně pro zvýšení efektivity homologní rekombinace linearizován pomocí restriktázy FseI poté přečištěn a zakoncentrován pomocí fenol-chloroformové extrakce a nukleofekován do myších ESC.

Genotypování plasmidu p15-6-20 hSMARCA5-FLAG



Obrázek 7-5: Foto 1,5% agarózového gelu po proběhlé elektroforéze: Výsledek PCR reakce provedené pro ověření ligace fragmentu hSMARCA5-FLAG do plasmidu p15-6-20. Velikost produktu PCR reakce je 852 bp. Z celkem 22 kolonií je 18 pozitivních.

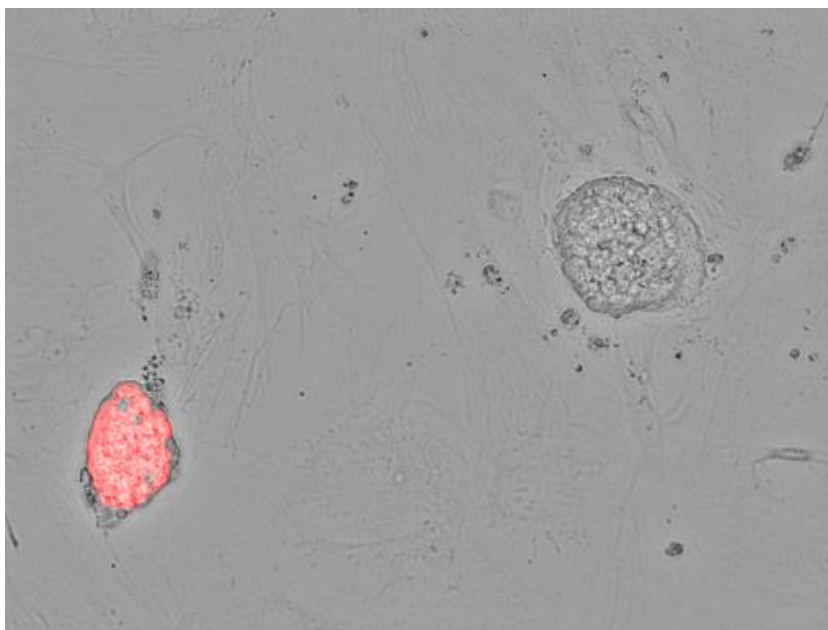


Obrázek 7-6: Plasmid p15-6-20 hSMARCA5-FLAG. Plasmid obsahuje homologní ramena k Rosa26 lokusu (ROSA26 short/long arm), sekvenci pro fluorescenční protein tdTomato ohraničenou LoxP místy, kódující sekvenci (CDS) pro protein hSMARCA5, ampicilinovou a neomycinovou/kanamycinovou rezistenci.

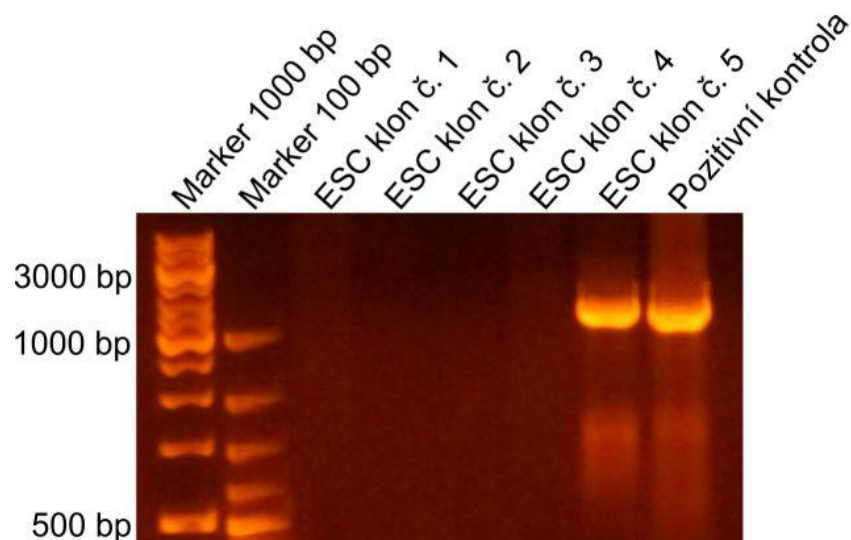
7.1.2 Nukleofekce transgenního vektoru do myších ESC

Integrace vektoru do specifického místa genomu myších ESC (v našem případě do Rosa26 lokusu) vyžaduje vnesení DNA konstruktů do buněčného jádra. Pro tento účel byl vybrán systém od firmy Lonza - Amaxa Nucleofector II jako poměrně efektivní a pro naši laboratoř nejdostupnější systém pro vnášení DNA do buněk. Postup kultivace myších ESC *in vitro* a popis samotné nukleofekce DNA vektoru pomocí systému Amaxa je v detailu popsán v kapitole 6.3. Následující den po nukleofekci byla započata pozitivní selekce nukleofekovaných buněk pomocí antibiotika geneticinu ve výsledné koncentraci 200 µg/ml v médiu.

Přibližně po týdenní kultivaci buněk v médiu s geneticinem byly zcela patrné kolonie myších ESC, které vznikly z jednoho klonu úspěšně elektroporované kmenové buňky. Tyto kolonie byly dále analyzovány pod fluorescenčním mikroskopem na expresi červeného fluorescenčního proteinu tdTomato (obrázek 7-7). Pouze pozitivní kolonie na tento fluorescenční protein byly vypíchnuty a jednotlivě přeneseny na 96-jamkovou destičku. Zde byly tyto kolonie trypsinizovány 100 µl roztoku Trypsin/EDTA a přeneseny na další předem připravenou 96-jamkovou destičku s podpurnou vrstvou buněk MEF. Po několika dnech expandování jednotlivých klonů buněk ESC, byla testována správná integrace vektoru do genomu myších ECS za pomoci PCR (viz kapitola 6.3 a obrázek 7-8).

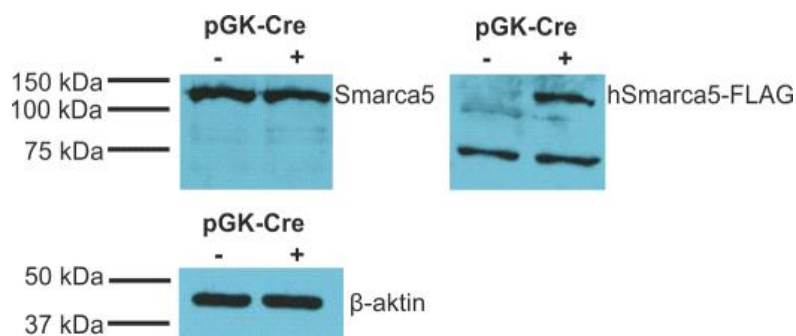


Obrázek 7-7: Kolonie myších embryonálních kmenových buněk. Vlevo dole vidíme pozitivní kolonii produkující červený fluorescenční protein tdTomato a vpravo nahoře vidíme negativní kolonii, která žádný fluorescenční protein neprodukuje. Zvětšení 100x.



Obrázek 7-8: Foto 1,5% agarózového gelu po proběhlé elektroforéze: Výsledek PCR reakce provedené pro ověření integrace vektoru do genomu myších ECS. Velikost produktu PCR reakce je 2400 bp. Pozitivní vyšel jeden klon (buňky narostlé z jedné kolonie) ESC.

U kolonií ESC, kde byla potvrzena správná integrace transgenního DNA vektoru pomocí PCR, byla dále ověřována jejich schopnost spustit expresi transgenního proteinu hSMARCA5-FLAG. Z popsaného důvodu byl do myších ESC za pomoci systému Amaxa Nucleofector vnesen plasmid pGK-Cre. Tento plasmid je schopen v myších ESC exprimovat enzym Cre rekombinázu, tedy enzym, který rozeznává LoxP místa a deletuje DNA sekvenci, jež se mezi těmito místy nachází. Z výše popsaného jsem předpokládala, že by mělo docházet k rozeznání LoxP míst umístěných kolem kódující sekvence pro červený fluorescenční protein tdTomato, k vyštěpení této sekvence a spuštění exprese proteinu hSMARCA5-FLAG. Odstranění kódující sekvence pro tdTomato se projevuje ztrátou fluorescenčního signálu. Proto několik dní po nukleofekci byly ESC kolonie kontrolovány pod fluorescenčním mikroskopem. Z kolonií, u kterých došlo ke ztrátě exprese proteinu tdTomato, byly vytvořeny proteinové lyzáty a z nich následně měřena míra exprese proteinu hSMARCA5-FLAG pomocí metody western blot (viz obrázek 7-9). Klony ESC, u kterých byla potvrzena schopnost spustit expresi proteinu hSMARCA5-FLAG, byly použity pro injekci do blastocyst, viz dále.



Obrázek 7-9: Western blot – membrány s vizualizací proteinů z myších ESC protilátkami proti proteinu Smarca5 a proteinové značce FLAG. Protilátka proti β -aktinu byla využita jako pozitivní kontrola a zároveň jako kontrola nanášky vzorku na gel. U kolonií, kterým byl injikován plasmid pGK-Cre (+), exprimující Cre rekombinázu, můžeme sledovat přítomnost proteinu hSmarca5-FLAG.

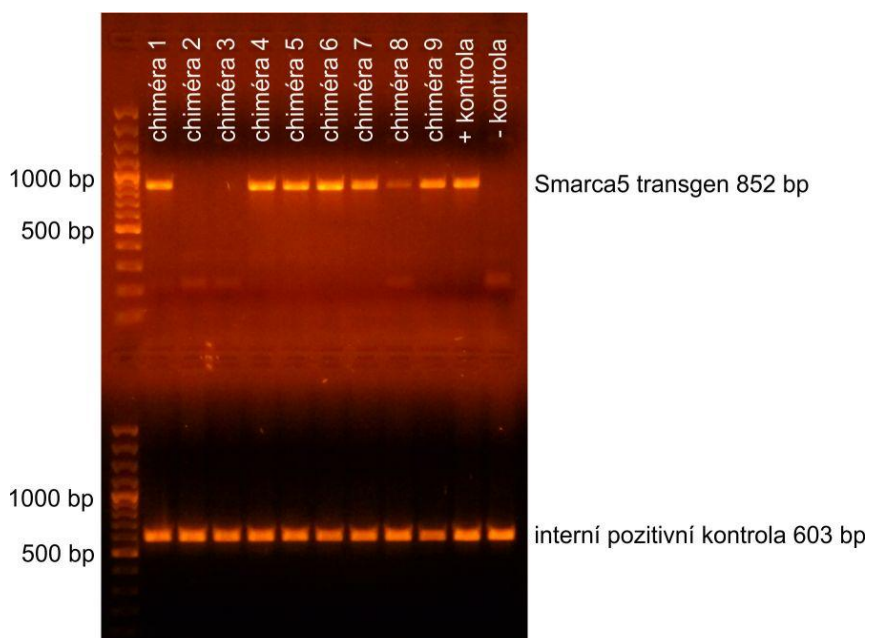
7.1.3 Injekce ESC do myších blastocyst

Injekce *in vitro* upravených ESC do blastocyst patří mezi základní přístupy pro vytvoření geneticky upraveného myšího jedince. ESC buňky jsou odvozené z vnitřní buněčné hmoty (anglicky „inner cell mass“) myších blastocyst. Díky tomu může dojít k začlenění geneticky pozměněných ESC do vnitřní buněčné hmoty. Injekce modifikovaných ESC do myších blastocyst probíhala v tomto projektu v servisní laboratoři vedené doc. Sedláčkem na Ústavu molekulární genetiky, AV ČR. Pokud došlo k úspěšnému začlenění implantovaných ESC do vyvíjející se blastocysty, vznikla chimérická myš, tedy myš, která ve svém těle nesla buňky odlišných jedinců. Modifikované myší ESC kmene R1 byly injikovány do blastocyst odlišného myšího kmene - C57BL/6. Je potřeba zmínit, že výběr odlišných myších kmenů nebyl náhodný. Jedním z důvodů výběru obou kmenů byla mimo jiné jejich odlišnost v barvě srsti tak, aby bylo možné rozpoznat stupeň chimérismu na základě barvy srsti. Srst chiméry, která se vytvořila z buněk původem z linie ESC R1 měla barvu agouti (Nagy, Rossant et al. 1993) a srst původem z linie C57BL/6 byla černé barvy. Míra zastoupení agouti či černé barvy srsti pak nepřímou naznačila i míru chimérismu narozeného jedince. První série injekcí do blastocyst vedla ke vzniku pouze jedné myši s mírou chimérismu přibližně 80% (viz obrázek 7-10). U vzorku tkáně odebrané z této myši byla za pomoci PCR ověřena přítomnost transgenního vektoru (viz kapitola 6.3). U této chimérické myši byla následně testována schopnost přenosu požadovaného genetického znaku (v našem případě hSMARCA5 transgenu) na potomstvo. Tento přenos je závislý na schopnosti injikovaných ESC vytvořit gonády schopné produkce funkčních terminálních buněk. Ze všech narozených potomků této myši však nebyl žádný, který by nesl transgen. Z popsaného důvodu byla provedena druhá

série injekcí, ze které vzniklo 9 chimér, z nichž 6 mělo potvrzený požadovaný genotyp v odebrané tkáni (viz obrázek 7-11). Momentálně jsou tyto myši chiméry kříženy a v současnosti nebyl potvrzen přenos genotypu na potomstvo.



Obrázek 7-10: Myší chiméra (samec) s ověřeným požadovaným genotypem, tedy přítomným transgenním vektorem hSMARCA5 a přibližně 80% chimérismem.



Obrázek 7-11: Foto 1,5% agarózového gelu po proběhlé elektroforéze: Genotypování myších chimér pomocí PCR. Velikost PCR produktů je 852 bp pro Smarca5 transgen a 603 bp pro interní pozitivní kontrolu. Bylo genotypováno 9 chimér a pozitivní a negativní kontrola.

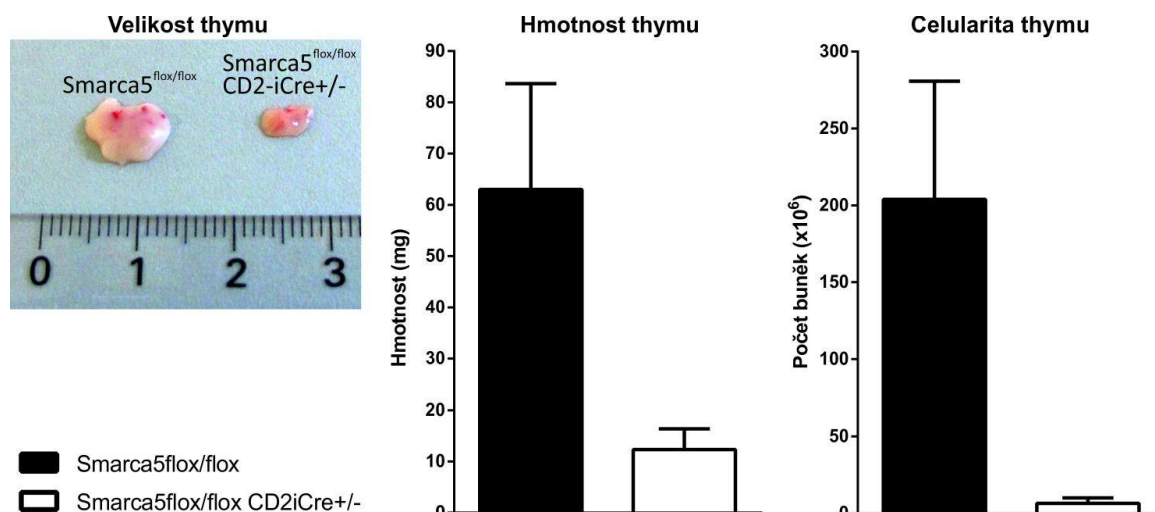
7.2 Význam proteinu Smarca5 ve vývoji T a B-lymfocytů

Tato část diplomové práce je věnována části projektu, na kterém jsem se osobně podílela v průběhu svého magisterského studia. Projekt se zabývá studiem významu proteinu Smarca5 pro vývoj lymfocytů a využívá myší model delece tohoto genu v buněčných liniích s aktivním promotorem CD2 (u myši jsou to nejdříve thymocyty a prekurzory B lymfocytů). Výsledky studia jsou momentálně zpracovávány do podoby manuskriptu a budou sloužit jako základ pro další studium kombinovaného genotypu tohoto myšího modelu kondiční delece genu Smarca5 s transgenním modelem, jež připravuji a který byl popsán v předešlé kapitole. Tato kapitola má především za cíl základním způsobem popsat fenotyp myši s kondiční delecí Smarca5 v lymfocytech a za použití metod průtokové cytometrie nalézt ta vývojová stádia, jejichž vývoj byl mutací narušen.

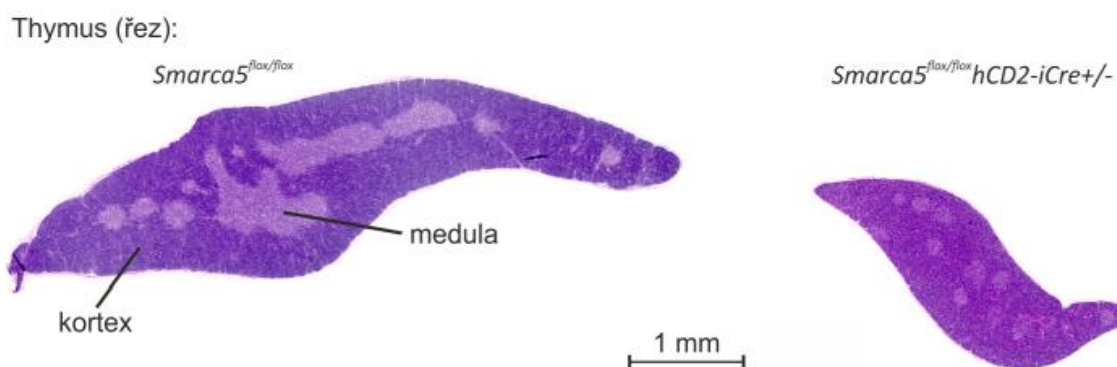
Myší model kondiční delece genu *Smarca5* v lymfocytech využívá modifikovanou alelu genu s dvěma LoxP místy integrovanými do intronů 4 a 5. Tuto alelu je možné částečně deletovat pomocí Cre rekombinázy a vyštěpit tak exon 5, který kóduje evolučně konzervovanou helikázovou doménu proteinu Smarca5. Po vyštěpení exonu dojde nejen ke zkrácení kódující sekvence o sekvenci helikázové domény ale zároveň k posunu čtecího rámce, čímž je zabráněno vzniku funkčního proteinu Smarca5. Vzhledem k tomu, že klasický knock-out genu je letální (Stopka and Skoultchi 2003), bylo nutné zvolit tkáňově specifický expresor v našem případě hCD2-iCre (de Boer, Williams et al. 2003), který umožnil inaktivovat gen Smarca5 v prekurzorech T a B lymfocytů. Více podrobností o tomto myším modelu je k nalezení v kapitole 5.9. Cílem křížení obou myších kmenů bylo získat experimentální jedince s genotypem *Smarca5^{flox/flox}hCD2-iCre^{+/-}* a kontrolní jedince s genotypem *Smarca5^{flox/flox}*. Do všech experimentů byli vzati pouze mladí jedinci ve věku 6-7 týdnů, protože s vyšším věkem dochází k involuci (zanikání) thymu a tím i ke snížení jeho buněčnosti. Z orgánů, které jsem analyzovala, se jednalo především o primární a sekundární lymfoidní orgány (thymus, slezina a kostní dřev) ve kterých fyziologicky dochází k expanzi a maturaci jednotlivých lymfocytárních stádií.

V experimentální části jsme se nejprve zaměřili na to, zdali není delecí genu Smarca5 narušen vývoj thymu. Prvotní analýza myši s genotypem *Smarca5^{flox/flox}hCD2-iCre^{+/-}* ukázala výrazné zmenšení velikosti thymu a s ní spojené snížení hmotnosti (z 60 mg na přibližně 12 mg) a celularity (z přibližně 200 milionů na 10 milionů buněk) tohoto orgánu oproti kontrole (viz obrázek 7-12). Data z histopatologického vyšetření následně ukázala výrazné změny v morfologii thymu, především narušení kortikomedulární architektury, které

naznačovalo, že protein Smarca5 zřejmě hraje důležitou roli ve vývoji thymocytů (viz obrázek 7-13).

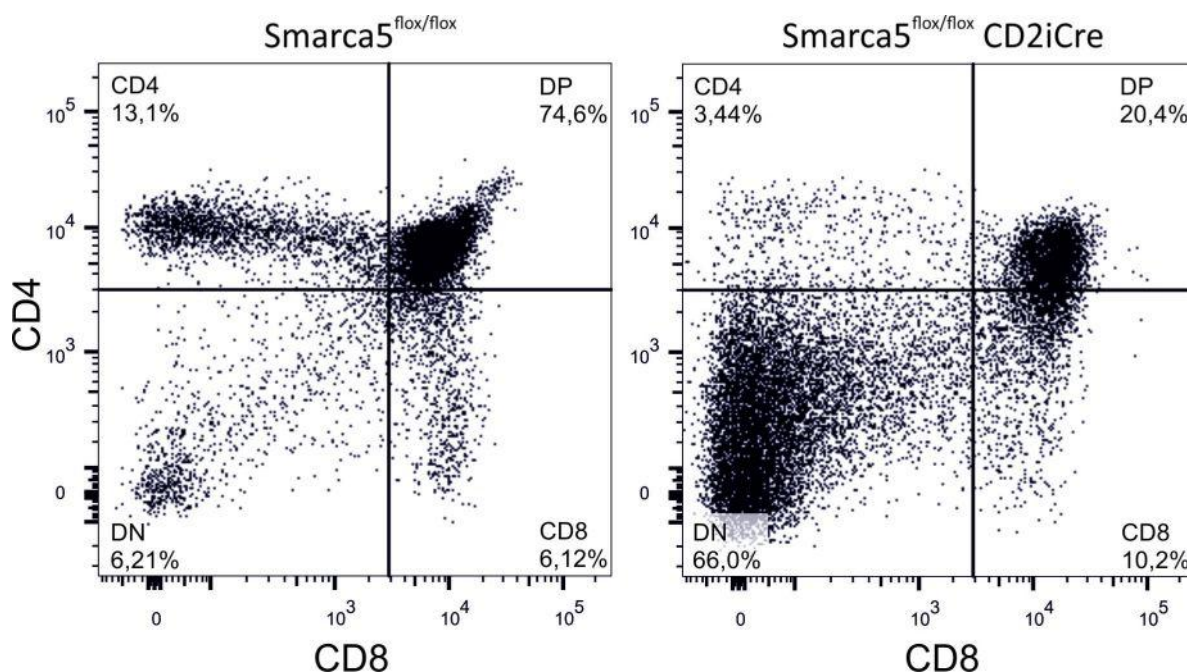


Obrázek 7-12: Rozdíl ve velikosti, hmotnosti a celularitě thymu u kontrolních myší *Smarca5^{flox/flox}* (černě) a myší s genotypem *Smarca5^{flox/flox}hCD2-iCre+/-* (bíle).



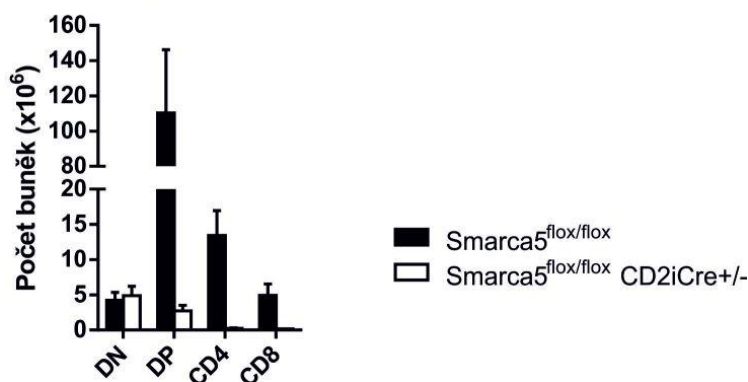
Obrázek 7-13: Řez lalokem thymu kontrolní myši (vlevo), můžeme pozorovat strukturu kortexu a meduly. Vpravo je řez thymem myši s genotypem *Smarca5^{flox/flox}hCD2-iCre+/-*, který je charakterizován hypoplazií a narušenou kortikomedulární architekturou. Histologie thymu byla provedena v laboratoři histopatologie v Centru fenogenomiky, BIOCEV, Vestec u Prahy.

Vývoj thymocytů je mimo jiné charakterizován buněčnou expanzí a diferenciací buněk, kterou doprovází změny v expresi specifických povrchových antigenů. Pro podrobnější analýzu vývoje thymocytů v brzlíku jsme zvolili metodu průtokové cytometrie (viz kapitola 6.4), pomocí které je možné rozlišit na základě diferenciální exprese povrchových antigenů jednotlivá vývojová stádia. Thymocyty byly barveny fluoroforem značenými protilátkami proti kostimulačním molekulám CD4 a CD8. Tyto protilátky umožnily rozlišit nezralá dvojitě negativní (DN), více maturovaná dvojitě pozitivní stádia (DP) a vývojově nejpokročilejší tzv. „single“ pozitivní stádia exprimující pouze jednu z analyzovaných povrchových molekul (viz obrázek 7-14). Pomocí protilátek proti molekulám B220 (B lymfocyty), Mac1 (makrofágy), Gr-1 (granulocyty) a Nk1.1 (NK buňky) byly z analýzy vyloučeny všechny ostatní populace buněk jiné než T-lymfocytární prekurzory. U myši s genotypem *Smarca5^{fllox/fllox}hCD2-iCre+/-* byl patrný poměrný nárůst DN populace thymocytů (z přibližně 6% na 66%) a zároveň pokles DP thymocytů (z přibližně 75% na 20%) oproti kontrolním myším. Dále byl patrný i pokles CD4 pozitivních thymocytů (z přibližně 13% na 3,5%). Výše popsané výsledky z průtokové cytometrie byly přepočítány na absolutní počet thymocytů, pro získání jasnější představy o velikosti pozorovaného vývojového defektu. Myši s genotypem *Smarca5^{fllox/fllox}hCD2-iCre+/-* měly výrazně nižší celkový počet DP thymocytů oproti kontrolám, z přibližně $110,3 \times 10^6$ buněk na $2,7 \times 10^6$. Výrazný byl také pokles v počtu CD4+ thymocytů z $13,5 \times 10^6$ na $0,2 \times 10^6$ a CD8+ thymocytů z $4,9 \times 10^6$ na $0,2 \times 10^6$. Počet DN thymocytů byl naopak u myši s genotypem *Smarca5^{fllox/fllox}hCD2-iCre+/-* mírně vyšší ($4,9 \times 10^6$ buněk) oproti kontrolní myši ($4,2 \times 10^6$ buněk) (viz obrázek 7-15). Tato data nám naznačila, že delece genu *Smarca5* zřejmě ovlivňuje diferenciaci DN buněk do DP vývojového stádia.



Obrázek 7-14: Analýza vývoje thymocytů pomocí průtokové cytometrie. Vlevo je zobrazen normální vývoj thymocytů u kontrolní myši – thymocyty přechází z DN do DP fáze a následně do jednotlivých SP fází tedy CD4+ nebo CD8+. Vpravo je zobrazen defektní vývoj u myši s genotypem *Smarca5^{flox/flox}hCD2-iCre+/-*.

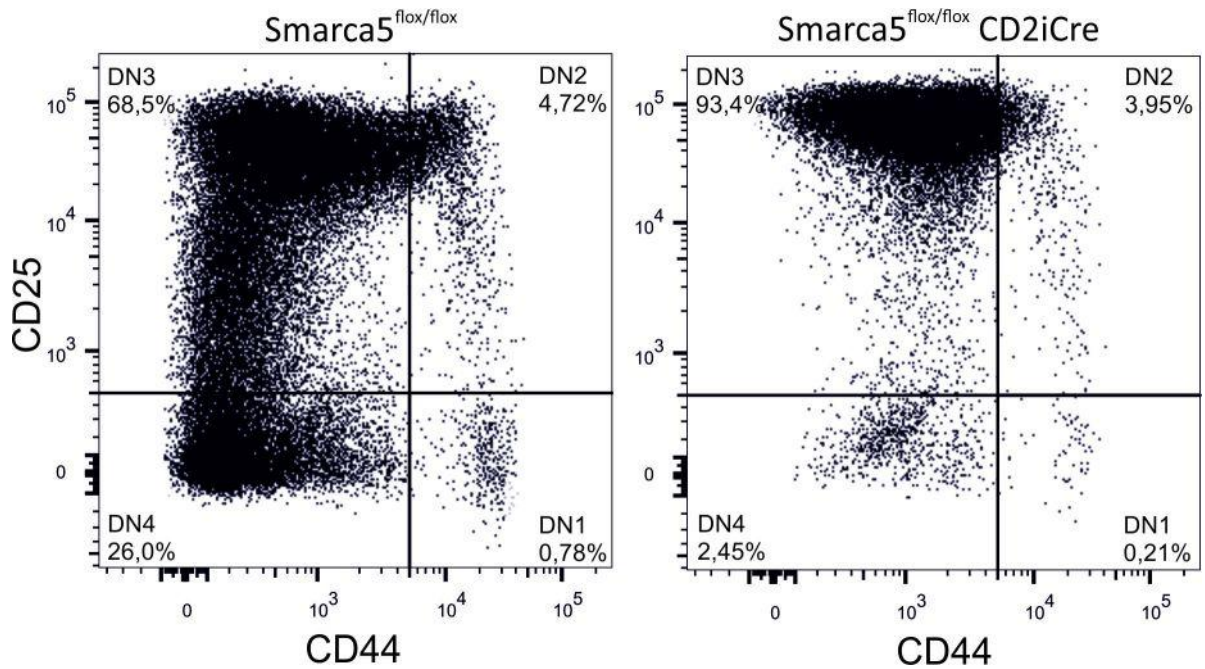
Absolutní počet thymocytů



Obrázek 7-15: Absolutní počet thymocytů. Z výsledků získaných pomocí průtokové cytometrie byl vypočítán absolutní počet thymocytů. Počty buněk jednotlivých populací u kontrolních myši s genotypem *Smarca5^{flox/flox}* jsou vyznačeny černými sloupci. Počty buněk jednotlivých populací s genotypem *Smarca5^{flox/flox}hCD2-iCre+/-* jsou vyznačeny bílými sloupci.

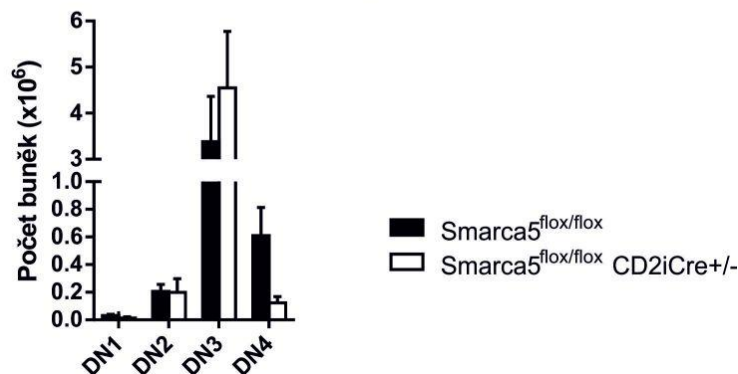
V další části projektu jsme si položili otázku, zda k pozorovanému defektu vývoje thymocytů nedochází již v průběhu DN stádia. K tomuto přesvědčení nás vedla informace, že Cre rekombináza je u *hCD2-iCre* myši exprimována prakticky už ve stádiu DN3 (de Boer, Williams et al. 2003). Podobně jako v případě více maturovaných thymocytů, kde se střídavě aktivuje a následně umlčuje exprese kostimulačních molekul CD4 a CD8, je možné i u dvojité negativních thymocytů pozorovat změny exprese některých povrchových antigenů, především CD44 a CD25. CD44 je adhezivní molekula (konkrétně jeden z receptorů pro kyselinu hyaluronovou) a pravděpodobně hraje roli při migraci prekurzorů T-lymfocytů do thymu (Wu, Kincade et al. 1993). Molekula CD25 je jednou z podjednotek (α -řetězec) receptoru pro interleukin-2, což je cytokin nezbytný pro vývoj T-lymfocytů (Sakaguchi, Sakaguchi et al. 1995). Podle diferenciální exprese antigenů CD44 a CD25 můžeme DN buňky rozdělit na čtyři různá stádia tzv. DN1 až DN4. V DN1 fázi thymocyty povrchově exprimují molekulu CD44, ale jsou negativní pro molekulu CD25. V DN2 stádiu začínají thymocyty exprimovat obě molekuly CD44 a CD25. Dalším postupným vývojem však thymocyty pozitivitu pro oba antigeny ztrácí a to nejprve pozitivitu pro molekulu CD44 antigen (DN3 stádium) a následně i pozitivitu pro molekulu CD25 (DN4 stádium).

Abychom byli schopni dále analyzovat případný vývojový defekt vývoje DN thymocytů, zvolili metodu průtokové cytometrie s použitím fluoroforem značených protilátek mimo jiné proti antigenům CD44 a CD25 (Laurent, Bosco et al. 2004) (viz obrázek 7-16) Pomocí protilátek proti molekulám CD4, CD8, B220, Mac-1 (makrofágy), Gr-1 (granulocyty), Nk1.1 (NK buňky), CD3 (maturované T-lymfocyty) a Ter119 (erytrocyty) byly z analýzy výsledků vyloučeny ostatní populace mimo sledovaných DN thymocytů. Metoda průtokové cytometrie ukázala, že u myši s genotypem *Smarca5^{flox/flox}hCD2-iCre+/-* je vidět výrazný nárůst poměrného zastoupení DN3 populace (z přibližně 69% na 93%) a zároveň pokles DN4 populace (z přibližně 26% na 2,5%) oproti kontrolním myším. Po přepočtení procent na absolutní počty měla populace DN3 u myši s genotypem *Smarca5^{flox/flox}hCD2-iCre+/-* v průměru více buněk oproti kontrole ($4,5 \times 10^6$ oproti $3,4 \times 10^6$), ale populace DN4 zaznamenala až šesti násobný pokles buněčnosti (z přibližně $0,6 \times 10^6$ na $0,1 \times 10^6$ buněk, viz obrázek 7-17). Stádia DN1 a DN2 také zaznamenala úbytek počtu buněk, ten však nebyl tak výrazný jako v případě populace DN4 (pokles u DN1 z přibližně $0,03 \times 10^6$ na $0,01 \times 10^6$ a u DN2 z $0,21 \times 10^6$ na $0,19 \times 10^6$ buněk). Popsaná data nám naznačovala, že pravděpodobně delece genu *Smarca5* stojí za výrazným poklesem buněk ve stádiu DN4.



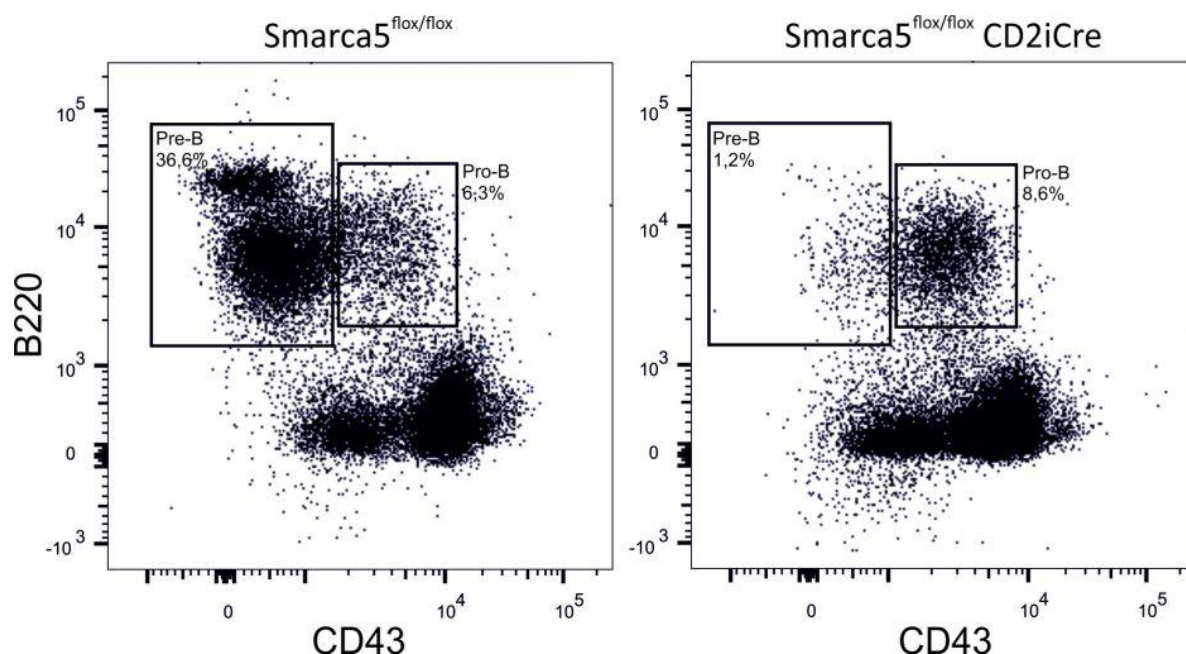
Obrázek 7-16: Analýza vývoje DN thymocytů pomocí průtokové cytometrie. Vlevo je zobrazen fyziologický vývoj u kontrolní myši, pomocí povrchových molekul CD25 a CD44 jsou rozlišena stádia DN1-4 (viz obrázek 7-9). Vpravo je zobrazen defektní vývoj u myši s genotypem *Smarca5*^{flox/flox}*hCD2-iCre*^{+/-}.

Absolutní počet DN thymocytů



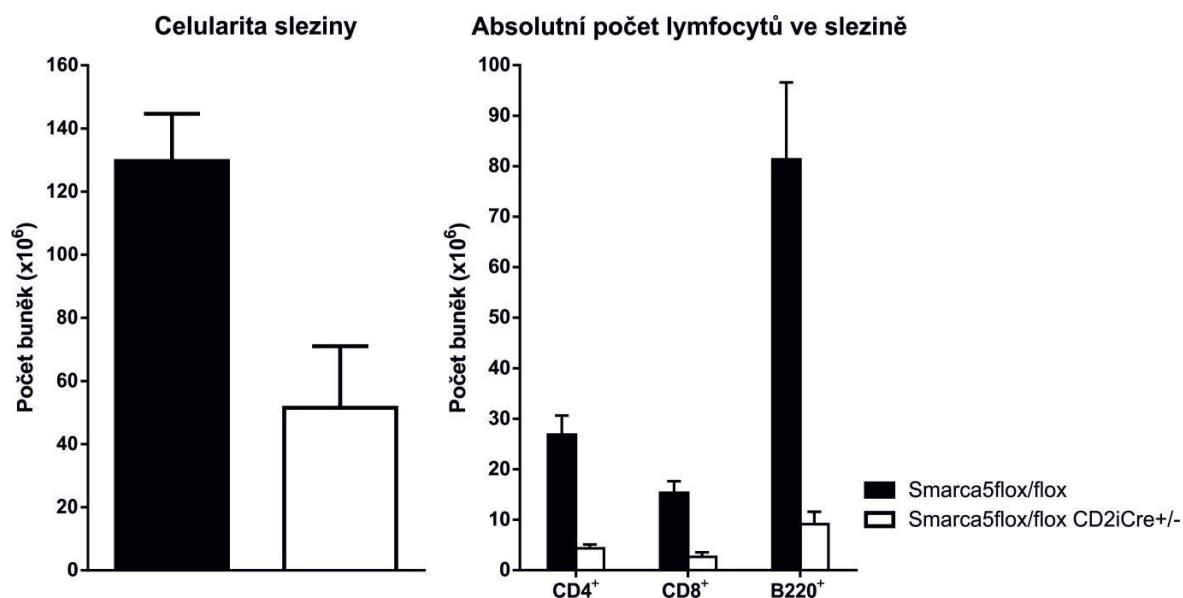
Obrázek 7-17: Absolutní počet DN thymocytů. Z výsledků získaných pomocí průtokové cytometrie byly vypočítány absolutní počty thymocytů ve fázích DN1-4. Počty buněk jednotlivých populací u kontrolních myši s genotypem *Smarca5*^{flox/flox} jsou vyznačeny černými sloupci. Počty buněk jednotlivých populací s genotypem *Smarca5*^{flox/flox}*hCD2-iCre*^{+/-} jsou vyznačeny bílými sloupci.

Jak již bylo zmíněno, k aktivaci promotoru hCD2 dochází u myši také v prekurzorech B-lymfocytů (de Boer, Williams et al. 2003). Dále nás proto zajímalo, zdali delece *Smarca5* bude mít podobně negativní vliv na vývoj této buněčné populace jako na vývoj thymocytů. Prekurzory B-lymfocytů se na rozdíl od thymocytů vyvíjí v kostní dřeni ze společného lymfoidního progenitoru. Od ostatních buněk kostní dřene mohou být odlišeny přítomností molekuly B220 na jejich povrchu, která se objevuje již v raných fázích jejich diferenciaci. Další důležitou molekulou pro základní odlišení jednotlivých vývojových stádií B lymfocytů je molekula CD43, která je exprimována ve stadiu pro-B a její exprese se snižuje s maturací do stádia pre-B (Hardy, Carmack et al. 1991). Molekula CD43 (leukosialin) je typická povrchová molekula hematopoetických progenitorů (Vodyanik, Thomson et al. 2006). V další fázi projektu jsme se proto zaměřili na analýzu exprese povrchových antigenů CD43 a B220 na buňkách kostní dřene pomocí průtokové cytometrie. Do panelu protilátek byla zařazena i protilátka rozeznávající molekulu CD45, která je exprimována všemi leukocyty a sloužila pro odstranění erytrocytů, jejich prekurzorů a krevních destiček z analýzy. Získaná data ukazují, že myši s genotypem *Smarca5^{fllox/fllox}hCD2-iCre+/-* vykazují výrazný pokles v zastoupení pre-B lymfocytů (z přibližně 37% na 1,2%) a zároveň mírný nárůst v počtu pro-B lymfocytů (z přibližně 6,3% na 8,6%) oproti kontrolním myším (viz obrázek 7-18). Tato data naznačují, že chromatin nemodelační faktor *Smarca5* je důležitý pro diferenciaci a vývoj progenitorů B-lymfocytů, především pre-B stádia.



Obrázek 7-18: Analýza vývoje B-lymfocytů pomocí průtokové cytometrie. Vlevo je znázorněno normální rozložení populací pro-B a pre-B lymfocytů u kontrolní myši a vpravo u myši s genotypem *Smarca5^{flox/flox}hCD2-iCre+/-*. Jednotlivé populace jsou rozlišeny na základě exprese molekul B220 a CD43. Uvedená procenta znázorňují poměr buněk v dané oblasti vůči všem CD45 pozitivním buňkám (leukocytům).

V poslední části projektu jsme se zaměřili na vliv delece genu *Smarca5* na počty periferních T a B lymfocytů. Jedním z orgánů, kde jsou obě populace lymfocytů výrazně zastoupeny, jsou sekundární lymfoidní orgány mimo jiné slezina. V těchto orgánech dochází za fyziologických podmínek k setkání lymfocytů s antigenem a k jejich další maturaci popřípadě aktivaci. Zajímalo nás tedy, zda budeme pozorovat u myši s genotypem *Smarca5^{flox/flox}hCD2-iCre+/-* rozdíly v počtu těchto buněčných linií ve slezině. Nejprve jsme určili celularitu orgánu a zjistili, že došlo v porovnání s kontrolou k úbytku počtu splenocytů v průměru z přibližně 130 mil na 50 mil (viz obrázek 7-19). Za pomoci průtokové cytometrie jsme analyzovali zastoupení lymfocytů ve slezině a zjistili výrazný pokles CD4 (přibližně z 27x10⁶ na 4x10⁶ buněk), CD8 (přibližně z 15x10⁶ na 3x10⁶ buněk) single pozitivních populací T-lymfocytů stejně tak i počtu pokles B-lymfocytů (přibližně z 81x10⁶ na 9x10⁶ buněk) (viz obrázek 7-19). Výsledná data naznačují, že delece *Smarca5* má vliv na kumulaci popřípadě maturaci periferních lymfocytů v sekundárních lymfoidních orgánech.



Obrázek 7-19: Celularita sleziny (graf vlevo) a zastoupení lymfocytů ve slezině (graf vpravo) u kontrolních myší s genotypem *Smarca5^{flox/flox}* (černé) oproti myším s genotypem *Smarca5^{flox/flox}hCD2-iCre+/-* (bílé). Povrchové molekuly CD4 a CD8 jsou typické pro single pozitivní periferní T-lymfocyty a molekula B220 pro B-lymfocyty.

8 Diskuse

Hlavním cílem této diplomové práce bylo zapojit se do týmu vědeckých pracovníků v oblasti vývojové biologie chromatin remodelačních mechanismů a přispět k pochopení funkcí jednoho z klíčových enzymů Smarca5. Proto jsme se rozhodli vyvinout myší model s indukovatelnou expresí proteinu Smarca5, který by umožnil studium funkcí tohoto chromatin remodelačního faktoru ve stavu indukované nadprodukce. Vlivem působení Cre rekombinázy bude možné u vyvíjeného myšího modelu indukovat (tkáňově specificky) expresi proteinu Smarca5 a tím zvýšit chromatin remodelační aktivitu v jádře a pozorovat její důsledky. Tento projekt jako vedlejší cíl nabízí možnost tvorby transgenního proteinu s proteinovou značkou FLAG. Pomocí této proteinové značky lze odlišit transgenní protein od endogenního a dále jej využít i pro separační účely ke studiu proteinu Smarca5 a jeho komplexů v tkáňově specifickém kontextu. Díky proteinové značce FLAG je možné zjistit lokalizaci transgenního proteinu Smarca5 v jádře buněk a případně i porovnání s lokalizací či množstvím endogenního proteinu Smarca5. Nabízí se možnost zkřížení vyvíjeného transgenního modelu s popsáním kondicionálně delečním modelem pro protein Smarca5 (genotyp *Smarca5^{flox/flox}hCD2-iCre+/-*, viz kapitola 5.9 a 7.2). Tento model exprimuje Cre rekombinázu pod CD2 promotorem (u myší tedy v T a B-buňkách a jejich prekurzorech), vlivem čehož u něj dochází k částečné deleci sekvence pro protein Smarca5 a zamezení vzniku funkčního proteinu. Pokud by byl tento model křížen s vyvíjeným modelem, došlo by zároveň v CD2 exprimujících buňkách ke spuštění exprese transgenního proteinu hSMARCA5-FLAG. Takový model by tedy v buňkách, které exprimují molekulu CD2, expimoval pouze protein hSMARCA5-FLAG, zatímco endogenní protein by byl deletovaný. Takový model by následně umožnil studium záchrany fenotypu původního modelu s genotypem *Smarca5^{flox/flox}hCD2-iCre+/-*. Dále by bylo možné studiem tohoto modelu zjistit, zda lidský protein hSMARCA5 bude plnit stejné funkce jako myší protein Smarca5. Lidská a myší DNA sekvence proteinu je z 97,4% identická a struktura proteinu Smarca5 je velmi konzervovaná, předpoklad tedy je, že tyto dva homologní proteiny plní totožnou funkci. Tuto hypotézu bude možné díky navrženému kombinovanému modelu otestovat.

Vyvíjený myší model s indukovatelnou nadprodukcí hSMARCA5 umožní také modelovat situaci popsanou u pacientů s akutní myeloidní leukémií (AML) v kapitole 4.2. U pacientů s AML v akutní fázi byla pozorována exprese proteinu Smarca5 během celého průběhu hematopoézy, na rozdíl od zdravých jedinců, u kterých je protein Smarca5 exprimován pouze v časném stádiu vývoje buněk a pak jeho exprese klesá (Stopka, Zakova et

al. 2000). Pokud bude vyvíjený myší model (s transgenním proteinem hSMARCA5-FLAG) křížen s expresorem Cre rekombinázy v hematopoetických buňkách (např. pod promotorem Vav1) bude možné modelovat situaci nalezenou u pacientů s AML, tedy nadměrnou expresi proteinu Smarca5 během celého průběhu hematopoézy. Takový model pak umožní lépe porozumět této problematice a bude možné sledovat, zda pouhá nadměrná exprese proteinu Smarca5 povede k nádorové transformaci hematopoetických buněk.

Konkrétní postup při vývoji myšího modelu s transgenním proteinem hSMARCA5-FLAG je uveden v první části kapitoly Výsledky. Vytvořený DNA vektor pro homologní rekombinaci byl vložen do Rosa26 lokusu myších ESC. Takto upravené ESC byly injikovány do myších blastocyst, což vedlo ke vzniku celkem 10 chimér, zatím ale nebyl potvrzen přenos požadovaného genotypu na potomstvo.

Druhá část výsledků byla věnována studiu vlivu proteinu Smarca5 na vývoj T a B-lymfocytů. K tomuto účelu byl využit myší model s genotypem *Smarca5^{flox/flox}hCD2-iCre+/-*, u kterého dojde k částečné delecii genu *Smarca5* v buňkách exprimujících CD2 molekulu. K částečné delecii genu dojde vlivem působení Cre rekombinázy exprimované právě pod promotorem pro molekulu CD2. Vlivem delecce dojde nejen ke zkrácení sekvence, ale také posunu čtecího rámce, v buňkách pak není exprimován žádný funkční protein Smarca5. Molekula CD2 je u myší exprimována již v prekurzorech T a B-lymfocytů. Bylo pozorováno, že myši s genotypem *Smarca5^{flox/flox}hCD2-iCre+/-* mají výrazně menší thymus – přibližně 5x menší hmotnost a 20x menší celularitu oproti kontrolním myším, což naznačuje určitý vývojový defekt tohoto orgánu. Z výsledků histologického vyšetření thymu vyplývá, že i architektura tohoto orgánu je alterovaná, struktura meduly a kortexu, kterou můžeme pozorovat u kontrolních myší, není znatelná u myší s genotypem *Smarca5^{flox/flox}hCD2-iCre+/-*. Vývojový defekt thymu naznačuje možnost problému vývoje thymocytů. U myší s genotypem *Smarca5^{flox/flox}hCD2-iCre+/-* byl pozorován přibližně sedmnáctinásobný pokles v absolutním počtu thymocytů oproti kontrolním myším. Také bylo pozorováno, že se většina těchto thymocytů nachází v DN fázi, konkrétně DN3, naproti tomu kontrolní myši mají většinu thymocytů v DP fázi. Z naměřených dat byl patrný vývojový blok při přechodu z DN3 do DN4 fáze vývoje thymocytů u myší s genotypem *Smarca5^{flox/flox}hCD2-iCre+/-*. Z dat naměřených v naší laboratoři vyplývá, že k úplné delecii proteinu Smarca5 dochází právě v DN3 fázi a tato událost tedy koreluje s pozorovaným vývojovým blokem.

K podobnému výsledku vedly studie provedené na myším modelu, u kterého dochází k delecii proteinu Brg1 v thymocytech. Chromatin remodelační faktor Brg1 patří do podrodiny

SWI/SNF ATPáz. U myšího modelu pro protein Brg1 došlo k částečné deleci a posunu čtecího rámce proteinu vlivem působení Cre rekombinázy exprimované pod promotorem Lck kinázy, který je specifický pro T-lymfocyty. Vlivem toho není protein Brg1 v thymocytech exprimován. Částečná delece sekvence genu *Brg1* probíhá už v DN1 vývojové fázi thymocytů, k úplné deleci však dojde až ve fázi DN4. Myši s delecí proteinu Brg1 v thymocytech (*tBrg1*^{-/-}) mají výrazně menší thymus, který má až 20x nižší celularitu oproti kontrolním myším. Také postrádají kortiko-medulární architekturu thymu a v tomto orgánu se u nich nachází zvýšené množství apoptotických buněk. U *tBrg1*^{-/-} myši byl pozorován vývojový blok při přechodu z DN4 do DP fáze, tedy ve fázi kdy dojde ke kompletní deleci proteinu Brg1 (Gebuhr, Kovalev et al. 2003) a (Chi, Wan et al. 2003). Výsledky uvedené v těchto studiích ukazují, že delece proteinu Brg1 v thymocytech vede k velmi podobnému fenotypu jako u delece proteinu Smarca5.

Dalším chromatin remodelačním faktorem, u něhož byla studována jeho funkce ve vývoji thymocytů je protein Mi-2 β , který je členem podrodiny CHD SWI2/SNF2 ATPáz. Studie byla provedena na kondicionálně delecčním myším modelu, u kterého dojde vlivem působení Cre rekombinázy (exprimovaná pod promotorem Lck kinázy) k deleci proteinu Mi-2 β v thymocytech. Částečnou deleci je možné sledovat už v DN stádiu, ale k úplné deleci dojde až v SP stádiu. U tohoto myšího modelu byl pozorován vývojový defekt thymu, orgán byl menší a měl menší celularitu oproti kontrolním. Dále byl pozorován výrazný pokles počtu DP thymocytů a tomu úměrný nárůst počtu CD8⁺ thymocytů. Studie dokládá, že protein Mi-2 β je nezbytný pro vývoj CD4⁺ thymocytů a také hraje pravděpodobně roli při vývoji thymocytů obecně – byly pozorovány dílčí vývojové bloky v DN stádiích thymocytů. Dále bylo zjištěno, že se protein Mi-2 β váže na CD4 enhancer a rekrutuje sem histonovou acetylázu, což podporuje tvrzení, že je tento protein důležitý pro vývoj CD4⁺ thymocytů (Williams, Naito et al. 2004). V navazující studii bylo ukázáno, že se protein Mi-2 β váže na CD4 silencer a pravděpodobně ho umlčuje (Naito, Gomez-Del Arco et al. 2007). Uvedené studie dokládají, že i chromatin remodelační faktor Mi-2 β hraje roli při vývoji thymocytů.

V této diplomové práci jsem se dále zaměřila na vývoj B-lymfocytů. U popisovaného modelu s genotypem *Smarca5*^{flox/flox}*hCD2-iCre*^{+/-} dochází k deleci proteinu Smarca5 nejen v prekurzorech T-lymfocytů, ale také v prekurzorech B-buněk. Z uvedených výsledků vyplývá, že i u B-lymfocytů dochází vlivem delece proteinu Smarca5 k vývojovému bloku a to na úrovni přechodu z pro-B do pre-B fáze. U myši s genotypem *Smarca5*^{flox/flox}*hCD2-iCre*^{+/-} můžeme sledovat pokles poměrného počtu pre-B lymfocytů z přibližně 37% (kontrolní myš) na 1%. Dále byl sledován pokles počtu lymfocytů ve slezině, tedy

sekundárním lymfoidním orgánu. Zde můžeme pozorovat přibližně sedminásobný pokles v počtu CD4⁺ a pětinásobný pokles v počtu CD8⁺ T-lymfocytů, dále můžeme vidět přibližně devítinásobný pokles v počtu B-lymfocytů ve srovnání s kontrolními myši. Z těchto dat vyplývá, že i počty lymfocytů v perifériích jsou pozmeněné. Protein Smarca5 hraje významnou roli nejen ve vývoji T-lymfocytů, ale také B-lymfocytů a pozorované vývojové bloky mají vliv i na počet lymfocytů v sekundárním lymfoidním orgánu (slezině).

Podobný fenotyp byl popsán u myšího kondicionálně delečního modelu pro protein Srg3 (anglicky Swi3-related gene). Protein Srg3 spolu s dalšími tvoří chromatin remodelační komplex SWI/SNF, další z podjednotek tohoto komplexu je také zmiňovaný protein Brg1. Myší model s kondicionální delecí proteinu Srg3 byl navržen tak, aby došlo k vyštěpení exonu 4 genu *Srg3* v hematopoetickém progenitoru vlivem působení Cre rekombinázy a zamezení vzniku funkčního proteinu. U myší s genotypem *Srg3*^{-/-} byl pozorován pokles počtu B-lymfocytů v kostní dřeni a slezině a to přibližně na polovinu oproti kontrolním myším. Dále byl pozorován vývojový blok při přechodu z pro-B do pre-B fáze vývoje B-lymfocytů. Bylo zjištěno, že pro-B buňky s deletovaným proteinem Srg3 exprimovaly snížené množství Rag1 a Rag2 rekombináz a nebyly schopné dokončit VDJ rekombinaci těžkého řetězce BCR (Choi, Ko et al. 2012). Z popsáných výsledků vyplývá, že i protein Srg3 hraje významnou roli ve vývoji B-lymfocytů.

9 Závěr

- Byl vytvořen DNA vektor pro homologní rekombinaci do Rosa26 lokusu. Vektor obsahuje sekvenci pro fluorescenční protein tdTomato, kódující sekvenci proteinu hSMARCA5, neomycinovou rezistenci a homologní ramena k Rosa26 lokusu na 5' i 3' konci. Vlivem působení Cre rekombinázy dojde k vyštěpení sekvence pro protein tdTomato a spuštění exprese proteinu hSMARCA5.
- Vytvořený transgenní vektor byl úspěšně nukleofekován do myších ESC. U buněk byla potvrzena schopnost deletovat sekvenci genu *tdTomato* a spustit expresi proteinu hSMARCA5.
- Modifikované ESC byly injikovány do myších blastocyst a bylo vytvořeno zatím celkem 10 myších chimér s potvrzeným požadovaným genotypem (tzn. přítomností transgenního vektoru). Zatím nedošlo k přenosu genotypu na potomstvo.
- Pravděpodobně bude nutné zopakovat injekce do blastocyst, případně i nukleofekce vektoru do ESC.
- U myšího modelu s genotypem *Smarca5^{fllox/fllox}hCD2-iCre+/-* byl pozorován defektní vývoj thymu a vývojový blok ve vývoji thymocytů, konkrétně při přechodu z DN3 do DN4 fáze. V DN3 fázi dochází k delecí genu pro protein Smarca5. Dále byl pozorován vývojový blok ve vývoji B-lymfocytů při přechodu z pro-B do pre-B stádia.
- Z výsledků uvedených v této práci vyplývá, že protein Smarca5 hraje zásadní roli ve vývoji T a B-lymfocytů.

10 Seznam použité literatury

- Becker, P. B. (2002). "Nucleosome sliding: facts and fiction." *EMBO J* **21**(18): 4749-4753.
- Black, B. E. and D. W. Cleveland (2011). "Epigenetic centromere propagation and the nature of CENP-a nucleosomes." *Cell* **144**(4): 471-479.
- Cairns, B. R. (2007). "Chromatin remodeling: insights and intrigue from single-molecule studies." *Nat Struct Mol Biol* **14**(11): 989-996.
- Ceredig, R. and T. Rolink (2002). "A positive look at double-negative thymocytes." *Nat Rev Immunol* **2**(11): 888-897.
- Collins, N., R. A. Poot, I. Kukimoto, C. Garcia-Jimenez, G. Dellaire and P. D. Varga-Weisz (2002). "An ACF1-ISWI chromatin-remodeling complex is required for DNA replication through heterochromatin." *Nat Genet* **32**(4): 627-632.
- Corona, D. F., A. Eberharter, A. Budde, R. Deuring, S. Ferrari, P. Varga-Weisz, M. Wilm, J. Tamkun and P. B. Becker (2000). "Two histone fold proteins, CHRAC-14 and CHRAC-16, are developmentally regulated subunits of chromatin accessibility complex (CHRAC)." *EMBO J* **19**(12): 3049-3059.
- Daxinger, L., S. K. Harten, H. Oey, T. Epp, L. Isbel, E. Huang, N. Whitelaw, A. Apedaile, A. Sorolla, J. Yong, V. Bharti, J. Sutton, A. Ashe, Z. Pang, N. Wallace, D. J. Gerhardt, M. E. Blewitt, J. A. Jeddloh and E. Whitelaw (2013). "An ENU mutagenesis screen identifies novel and known genes involved in epigenetic processes in the mouse." *Genome Biol* **14**(9): R96.
- de Boer, J., A. Williams, G. Skavdis, N. Harker, M. Coles, M. Tolaini, T. Norton, K. Williams, K. Roderick, A. J. Potocnik and D. Kioussis (2003). "Transgenic mice with hematopoietic and lymphoid specific expression of Cre." *Eur J Immunol* **33**(2): 314-325.
- Dege, C. and J. Hagman (2014). "Mi-2/NuRD chromatin remodeling complexes regulate B and T-lymphocyte development and function." *Immunol Rev* **261**(1): 126-140.
- Fairman-Williams, M. E., U. P. Guenther and E. Jankowsky (2010). "SF1 and SF2 helicases: family matters." *Curr Opin Struct Biol* **20**(3): 313-324.
- Fyodorov, D. V., M. D. Blower, G. H. Karpen and J. T. Kadonaga (2004). "Acf1 confers unique activities to ACF/CHRAC and promotes the formation rather than disruption of chromatin in vivo." *Genes Dev* **18**(2): 170-183.
- Fyodorov, D. V. and J. T. Kadonaga (2002). "Binding of Acf1 to DNA involves a WAC motif and is important for ACF-mediated chromatin assembly." *Mol Cell Biol* **22**(18): 6344-6353.
- Gebuhr, T. C., G. I. Kovalev, S. Bultman, V. Godfrey, L. Su and T. Magnuson (2003). "The role of Brg1, a catalytic subunit of mammalian chromatin-remodeling complexes, in T cell development." *J Exp Med* **198**(12): 1937-1949.
- Grune, T., J. Brzeski, A. Eberharter, C. R. Clapier, D. F. Corona, P. B. Becker and C. W. Muller (2003). "Crystal structure and functional analysis of a nucleosome recognition module of the remodeling factor ISWI." *Mol Cell* **12**(2): 449-460.
- Gu, L., S. C. Frommel, C. C. Oakes, R. Simon, K. Grupp, C. Y. Gerig, D. Bar, M. D. Robinson, C. Baer, M. Weiss, Z. Gu, M. Schapira, R. Kuner, H. Sultmann, M. Provenzano, M. L. Yaspo, B. Brors, J. Korbel, T. Schlomm, G. Sauter, R. Eils, C. Plass and R. Santoro (2015). "BAZ2A (TIP5) is involved in epigenetic alterations in prostate cancer and its overexpression predicts disease recurrence." *Nat Genet* **47**(1): 22-30.
- Guetg, C., P. Lienemann, V. Sirri, I. Grummt, D. Hernandez-Verdun, M. O. Hottiger, M. Fussenegger and R. Santoro (2010). "The NoRC complex mediates the

- heterochromatin formation and stability of silent rRNA genes and centromeric repeats." *EMBO J* **29**(13): 2135-2146.
- Hanai, K., H. Furuhashi, T. Yamamoto, K. Akasaka and S. Hirose (2008). "RSF governs silent chromatin formation via histone H2Av replacement." *PLoS Genet* **4**(2): e1000011.
- Hardy, R. R., C. E. Carmack, S. A. Shinton, J. D. Kemp and K. Hayakawa (1991). "Resolution and characterization of pro-B and pre-pro-B cell stages in normal mouse bone marrow." *J Exp Med* **173**(5): 1213-1225.
- Helfricht, A., W. W. Wiegant, P. E. Thijssen, A. C. Vertegaal, M. S. Luijsterburg and H. van Attikum (2013). "Remodeling and spacing factor 1 (RSF1) deposits centromere proteins at DNA double-strand breaks to promote non-homologous end-joining." *Cell Cycle* **12**(18): 3070-3082.
- Hoffman, E. S., L. Passoni, T. Crompton, T. M. Leu, D. G. Schatz, A. Koff, M. J. Owen and A. C. Hayday (1996). "Productive T-cell receptor beta-chain gene rearrangement: coincident regulation of cell cycle and clonality during development in vivo." *Genes Dev* **10**(8): 948-962.
- Chang, E. Y., H. Ferreira, J. Somers, D. A. Nusinow, T. Owen-Hughes and G. J. Narlikar (2008). "MacroH2A allows ATP-dependent chromatin remodeling by SWI/SNF and ACF complexes but specifically reduces recruitment of SWI/SNF." *Biochemistry* **47**(51): 13726-13732.
- Chi, T. H., M. Wan, P. P. Lee, K. Akashi, D. Metzger, P. Chambon, C. B. Wilson and G. R. Crabtree (2003). "Sequential roles of Brg, the ATPase subunit of BAF chromatin remodeling complexes, in thymocyte development." *Immunity* **19**(2): 169-182.
- Choi, J., M. Ko, S. Jeon, Y. Jeon, K. Park, C. Lee, H. Lee and R. H. Seong (2012). "The SWI/SNF-like BAF complex is essential for early B cell development." *J Immunol* **188**(8): 3791-3803.
- Chong, S., N. Vickaryous, A. Ashe, N. Zamudio, N. Youngson, S. Hemley, T. Stopka, A. Skoultchi, J. Matthews, H. S. Scott, D. de Kretser, M. O'Bryan, M. Blewitt and E. Whitelaw (2007). "Modifiers of epigenetic reprogramming show paternal effects in the mouse." *Nat Genet* **39**(5): 614-622.
- Jansen, A. and K. J. Verstrepen (2011). "Nucleosome positioning in *Saccharomyces cerevisiae*." *Microbiol Mol Biol Rev* **75**(2): 301-320.
- Jin, Q., X. Mao, B. Li, S. Guan, F. Yao and F. Jin (2015). "Overexpression of SMARCA5 correlates with cell proliferation and migration in breast cancer." *Tumour Biol* **36**(3): 1895-1902.
- Kim, Y. Z. (2014). "Altered histone modifications in gliomas." *Brain Tumor Res Treat* **2**(1): 7-21.
- Klement, K., M. S. Luijsterburg, J. B. Pinder, C. S. Cena, V. Del Nero, C. M. Wintersinger, G. Dellaire, H. van Attikum and A. A. Goodarzi (2014). "Opposing ISWI- and CHD-class chromatin remodeling activities orchestrate heterochromatic DNA repair." *J Cell Biol* **207**(6): 717-733.
- Kouzarides, T. (2007). "Chromatin modifications and their function." *Cell* **128**(4): 693-705.
- Lan, L., A. Ui, S. Nakajima, K. Hatakeyama, M. Hoshi, R. Watanabe, S. M. Janicki, H. Ogiwara, T. Kohno, S. Kanno and A. Yasui (2010). "The ACF1 complex is required for DNA double-strand break repair in human cells." *Mol Cell* **40**(6): 976-987.
- Laurent, J., N. Bosco, P. N. Marche and R. Ceredig (2004). "New insights into the proliferation and differentiation of early mouse thymocytes." *Int Immunol* **16**(8): 1069-1080.
- Li, H., Y. Zhang, X. Bai, Y. Peng and P. He (2014). "Rsf-1 overexpression in human prostate cancer, implication as a prognostic marker." *Tumour Biol* **35**(6): 5771-5776.

- Li, J., G. Langst and I. Grummt (2006). "NoRC-dependent nucleosome positioning silences rRNA genes." *EMBO J* **25**(24): 5735-5741.
- Li, Q., Q. Dong and E. Wang (2012). "Rsf-1 is overexpressed in non-small cell lung cancers and regulates cyclinD1 expression and ERK activity." *Biochem Biophys Res Commun* **420**(1): 6-10.
- Liu, S., Q. Dong and E. Wang (2012). "Rsf-1 overexpression correlates with poor prognosis and cell proliferation in colon cancer." *Tumour Biol* **33**(5): 1485-1491.
- Loyola, A., G. LeRoy, Y. H. Wang and D. Reinberg (2001). "Reconstitution of recombinant chromatin establishes a requirement for histone-tail modifications during chromatin assembly and transcription." *Genes Dev* **15**(21): 2837-2851.
- Luger, K. and J. C. Hansen (2005). "Nucleosome and chromatin fiber dynamics." *Curr Opin Struct Biol* **15**(2): 188-196.
- Luger, K., A. W. Mader, R. K. Richmond, D. F. Sargent and T. J. Richmond (1997). "Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution." *Nature* **389**(6648): 251-260.
- Manelyte, L. and G. Längst (2013). *Chromatin Remodelers and Their Way of Action*.
- Melchers, F., E. ten Boekel, T. Seidl, X. C. Kong, T. Yamagami, K. Onishi, T. Shimizu, A. G. Rolink and J. Andersson (2000). "Repertoire selection by pre-B-cell receptors and B-cell receptors, and genetic control of B-cell development from immature to mature B cells." *Immunol Rev* **175**: 33-46.
- Min, S., S. Jo, H. S. Lee, S. Chae, J. S. Lee, J. H. Ji and H. Cho (2014). "ATM-dependent chromatin remodeler Rsf-1 facilitates DNA damage checkpoints and homologous recombination repair." *Cell Cycle* **13**(4): 666-677.
- Nagy, A., J. Rossant, R. Nagy, W. Abramow-Newerly and J. C. Roder (1993). "Derivation of completely cell culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(18): 8424-8428.
- Naito, T., P. Gomez-Del Arco, C. J. Williams and K. Georgopoulos (2007). "Antagonistic interactions between Ikaros and the chromatin remodeler Mi-2beta determine silencer activity and Cd4 gene expression." *Immunity* **27**(5): 723-734.
- Patenge, N., S. K. Elkin and M. A. Oettinger (2004). "ATP-dependent remodeling by SWI/SNF and ISWI proteins stimulates V(D)J cleavage of 5 S arrays." *J Biol Chem* **279**(34): 35360-35367.
- Percipalle, P., N. Fomproix, E. Cavellan, R. Voit, G. Reimer, T. Kruger, J. Thyberg, U. Scheer, I. Grummt and A. K. Farrants (2006). "The chromatin remodelling complex WSTF-SNF2h interacts with nuclear myosin 1 and has a role in RNA polymerase I transcription." *EMBO Rep* **7**(5): 525-530.
- Perpelescu, M., N. Nozaki, C. Obuse, H. Yang and K. Yoda (2009). "Active establishment of centromeric CENP-A chromatin by RSF complex." *J Cell Biol* **185**(3): 397-407.
- Pessina, F. and N. F. Lowndes (2014). "The RSF1 histone-remodelling factor facilitates DNA double-strand break repair by recruiting centromeric and Fanconi Anaemia proteins." *PLoS Biol* **12**(5): e1001856.
- Poot, R. A., L. Bozhenok, D. L. van den Berg, S. Steffensen, F. Ferreira, M. Grimaldi, N. Gilbert, J. Ferreira and P. D. Varga-Weisz (2004). "The Williams syndrome transcription factor interacts with PCNA to target chromatin remodelling by ISWI to replication foci." *Nat Cell Biol* **6**(12): 1236-1244.
- Ren, J., Q. C. Chen, F. Jin, H. Z. Wu, M. He, L. Zhao, Z. J. Yu, W. F. Yao, X. Y. Mi, E. H. Wang and M. J. Wei (2014). "Overexpression of Rsf-1 correlates with pathological type, p53 status and survival in primary breast cancer." *Int J Clin Exp Pathol* **7**(9): 5595-5608.

- Ribeyre, C., R. Zellweger, M. Chauvin, N. Bec, C. Larroque, M. Lopes and A. Constantinou (2016). "Nascent DNA Proteomics Reveals a Chromatin Remodeler Required for Topoisomerase I Loading at Replication Forks." *Cell Rep* **15**(2): 300-309.
- Richmond, T. J. and C. A. Davey (2003). "The structure of DNA in the nucleosome core." *Nature* **423**(6936): 145-150.
- Robinson, P. J. and D. Rhodes (2006). "Structure of the '30 nm' chromatin fibre: a key role for the linker histone." *Curr Opin Struct Biol* **16**(3): 336-343.
- Sadeghifar, F., S. Bohm, A. Vintermist and A. K. Ostlund Farrants (2015). "The B-WICH chromatin-remodelling complex regulates RNA polymerase III transcription by promoting Max-dependent c-Myc binding." *Nucleic Acids Res* **43**(9): 4477-4490.
- Sakaguchi, S., N. Sakaguchi, M. Asano, M. Itoh and M. Toda (1995). "Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases." *J Immunol* **155**(3): 1151-1164.
- Santoro, R., J. Li and I. Grummt (2002). "The nucleolar remodeling complex NoRC mediates heterochromatin formation and silencing of ribosomal gene transcription." *Nat Genet* **32**(3): 393-396.
- Sheu, J. J., B. Guan, J. H. Choi, A. Lin, C. H. Lee, Y. T. Hsiao, T. L. Wang, F. J. Tsai and M. Shih Ie (2010). "Rsf-1, a chromatin remodeling protein, induces DNA damage and promotes genomic instability." *J Biol Chem* **285**(49): 38260-38269.
- Sheu, J. J., J. H. Choi, I. Yildiz, F. J. Tsai, Y. Shaul, T. L. Wang and M. Shih Ie (2008). "The roles of human sucrose nonfermenting protein 2 homologue in the tumor-promoting functions of Rsf-1." *Cancer Res* **68**(11): 4050-4057.
- Shih Ie, M., J. J. Sheu, A. Santillan, K. Nakayama, M. J. Yen, R. E. Bristow, R. Vang, G. Parmigiani, R. J. Kurman, C. G. Trope, B. Davidson and T. L. Wang (2005). "Amplification of a chromatin remodeling gene, Rsf-1/HBXAP, in ovarian carcinoma." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(39): 14004-14009.
- Stopka, T. and A. I. Skoultchi (2003). "The ISWI ATPase Snf2h is required for early mouse development." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(24): 14097-14102.
- Stopka, T., D. Zakova, O. Fuchs, O. Kubrova, J. Blafkova, J. Jelinek, E. Necas and J. Zivny (2000). "Chromatin remodeling gene SMARCA5 is dysregulated in primitive hematopoietic cells of acute leukemia." *Leukemia* **14**(7): 1247-1252.
- Strohner, R., M. Wachsmuth, K. Dachauer, J. Mazurkiewicz, J. Hochstatter, K. Rippe and G. Langst (2005). "A 'loop recapture' mechanism for ACF-dependent nucleosome remodeling." *Nat Struct Mol Biol* **12**(8): 683-690.
- Tsukiyama, T., J. Palmer, C. C. Landel, J. Shiloach and C. Wu (1999). "Characterization of the imitation switch subfamily of ATP-dependent chromatin-remodeling factors in *Saccharomyces cerevisiae*." *Genes Dev* **13**(6): 686-697.
- Vodyanik, M. A., J. A. Thomson and Slukvin, II (2006). "Leukosialin (CD43) defines hematopoietic progenitors in human embryonic stem cell differentiation cultures." *Blood* **108**(6): 2095-2105.
- Wang, Y., J. Qin, Q. Liu, X. Hong, T. Li, Y. Zhu, L. He, B. Zheng and M. Li (2016). "SNF2H promotes hepatocellular carcinoma proliferation by activating the Wnt/beta-catenin signaling pathway." *Oncol Lett* **12**(2): 1329-1336.
- Williams, C. J., T. Naito, P. G. Arco, J. R. Seavitt, S. M. Cashman, B. De Souza, X. Qi, P. Keables, U. H. Von Andrian and K. Georgopoulos (2004). "The chromatin remodeler Mi-2beta is required for CD4 expression and T cell development." *Immunity* **20**(6): 719-733.

- Wu, L., P. W. Kincade and K. Shortman (1993). "The CD44 expressed on the earliest intrathymic precursor population functions as a thymus homing molecule but does not bind to hyaluronate." *Immunol Lett* **38**(1): 69-75.
- Xiao, A., H. Li, D. Shechter, S. H. Ahn, L. A. Fabrizio, H. Erdjument-Bromage, S. Ishibe-Murakami, B. Wang, P. Tempst, K. Hofmann, D. J. Patel, S. J. Elledge and C. D. Allis (2009). "WSTF regulates the H2A.X DNA damage response via a novel tyrosine kinase activity." *Nature* **457**(7225): 57-62.
- Xie, C., L. Fu, L. Xie, N. Liu and Q. Li (2014). "Rsf-1 overexpression serves as a prognostic marker in human hepatocellular carcinoma." *Tumour Biol* **35**(8): 7595-7601.
- Yang, J. G., T. S. Madrid, E. Sevastopoulos and G. J. Narlikar (2006). "The chromatin-remodeling enzyme ACF is an ATP-dependent DNA length sensor that regulates nucleosome spacing." *Nat Struct Mol Biol* **13**(12): 1078-1083.
- Zambrowicz, B. P., A. Imamoto, S. Fiering, L. A. Herzenberg, W. G. Kerr and P. Soriano (1997). "Disruption of overlapping transcripts in the ROSA beta geo 26 gene trap strain leads to widespread expression of beta-galactosidase in mouse embryos and hematopoietic cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(8): 3789-3794.
- Zhao, X. C., P. An, X. Y. Wu, L. M. Zhang, B. Long, Y. Tian, X. Y. Chi and D. Y. Tong (2016). "Overexpression of hSNF2H in glioma promotes cell proliferation, invasion, and chemoresistance through its interaction with Rsf-1." *Tumour Biol* **37**(6): 7203-7212.
- Zhou, Y., R. Santoro and I. Grummt (2002). "The chromatin remodeling complex NoRC targets HDAC1 to the ribosomal gene promoter and represses RNA polymerase I transcription." *EMBO J* **21**(17): 4632-4640.