

Abstrakt

Enhancery jsou distální cis – regulační sekvence DNA, které regulují (zesilují) transkripci genu řízenou z promotoru. Enhancery se nacházejí v nekódující DNA před, či za genem nebo v intronech či kódujících oblastech vzdálených až mnoho kilobází od genu.

Superenhancery jsou nově objevená seskupení mnohočetných enhancerů, které hrají zásadní úlohu při aktivaci tkáňově specifických genů, určení buněčné identity a indukci diferenciaci.

PU.1 je transkripční faktor (TF) nezbytný pro normální krvetvorbu, konkrétně pro vývoj myeloidní a lymfoidní krevní řady. Přesná koncentrace PU.1 je zodpovědná za diferenciaci krvetvorných buněk do odlišných buněčných linií a jejich narušení vede k leukemogenezi. Vysoké koncentrace PU.1 stimulují makrofágový vývoj, zatímco střední koncentrace stimulují vývoj granulocytů. Jakými regulačními mechanismy je zajištěno, že granulocytární geny jsou aktivovány výhradně ve střední koncentraci PU.1, zatímco makrofágové ve vysoké, je zajímavá biologická otázka, k jejímuž zodpovězení se snaží přispět i tato diplomová práce.

Cílem této diplomové práce bylo vytvořit sérii reportérových vektorů nesoucí regulační oblasti granulocytárních genů MPO a MMP9, které by umožnily studium mechanismů, jak jsou různé koncentrace TF PU.1 vnímány regulačními sekvencemi cílových genů. Na základě analýzy regulačních oblastí genů MPO a MMP9 jsme identifikovali 4 MPO a 14 MMP9 putativních enhancerů. Následně jsme vytvořili 48 luciferázových konstruktů nesoucích regulační oblasti genu MPO a MMP9 a jejich varianty či kombinace. Vytvořené luciferázové konstrukty byly funkčně testovány během diferenciaci PU.1 transgenních myeloidních progenitorů, iniciované různými hladinami PU.1. Data ukazují, že 7 ze 13 ti MMP9 a 2 z 3 MPO testovaných enhancerů měly aktivační schopnosti ve střední (granulocytární) koncentraci PU.1. To naznačuje, že exprese těchto genů je koregulována vícečetnými oblastmi, tvořícími pravděpodobně superenhancer. Postupné sestavování jednotlivých MPO enhancerů vedlo k aditivnímu aktivačnímu efektu. Zatímco aktivační potenciál jednotlivých enhancerů byl relativně nízký, tak výrazně graduálně stoupal v přítomnosti ostatních enhancerů, což poukazuje na nutnost spolupráce jednotlivých enhancerů, nezbytnou pro optimální tkáňově specifickou expresi MPO a MMP9 genů.

Vytvořené konstrukty byly následně použity k mutagenезi vazebných míst PU.1 a dále budou použity k testování úlohy kooperujících transkripčních faktorů.

Klíčová slova: regulace transkripce, enhancer, superenhancer, diferenciacce, PU.1