

Přírodovědecká fakulta UK

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Buněčná a vývojová biologie



Bc. Kamila Chramostová

**Model pro studium regulace transkripce granulocytárních genů
MPO a MMP9 rozdílnými koncentracemi
transkripčního faktoru PU.1**

**Model for study of transcription regulation of granulocytic genes
MPO and MMP9 by different levels of
PU.1 transcription factor**

Diplomová práce

Vedoucí práce: Mgr. Vít Pospíšil, PhD

Praha 2018

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, 11. 8. 2018

Kamila Chramostová

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému školiteli Mgr. Vítu Pospíšilovi, PhD za odborné vedení mé diplomové práce, připomínky, trpělivost, cenné rady a čas, který mi věnoval. Dále bych poděkovala svým spolupracovníkům z laboratoře MSc. Pavlemu Krsmanovici, Ph.D., Mgr. Konstantinovi Kutashevovi a Mgr. Janu Valečkovi. Mé poděkování patří také mé rodině, zejména mamince za morální i materiální podporu a důvěru, kterou ve mě vložili a mému příteli za podporu a trpělivost během celého studia.

Obsah

OBSAH	4
ABSTRAKT	7
ABSTRACT	9
1. LITERÁRNÍ PŘEHLED	12
1.1. Regulace genové exprese přehled regulace	12
1.1.1. Regulace transkripce	12
1.1.1.1. Transkripční faktory	13
1.1.1.2. Regulační oblasti genu	14
1.1.1.2.1. Promotor	14
1.1.1.2.2. Enhancer	16
1.1.1.2.3. Superenhancery	21
1.1.1.3. Prostorová (3D) organizace genomu	23
1.1.1.4. Chromosome conformation capture (3C) - metoda pro studium 3D interakce	24
1.2. Krvetvorba	28
1.2.1. Myeloidní diferenciace	30
1.2.2. Koncentrace PU.1 v hematopoéze	31
2. CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE	34
3. MATERIÁL A METODY	35
3.1. Materiál	35
3.1.1. Buněčné linie a bakteriální kmeny	35
3.1.1.1. Buněčné linie	35
3.1.1.2. Bakteriální kmeny	35
3.1.2. Kultivační média	35
3.1.2.1. Pevná média	35
3.1.2.2. Tekutá média	35
3.1.3. Použité vektory a expresní plasmidy	36
3.1.4. Použité enzymy, pufrý a DNA markery	36

3.1.5. Komerčně dodávané kity.....	37
3.1.6. Seznam použitých přístrojů	37
3.1.7. Seznam použitých chemikálií.....	38
3.2. Metody.....	39
3.2.1. Práce s buněčnými liniemi	39
3.2.2. Metody použité k přípravě luciferázových konstruktů nesoucích úseky regulační oblasti genů MPO a MMP9.....	39
3.2.2.1. DNA elektroforéza v agarózovém gelu	39
3.2.2.2. Příprava fragmentů regulačních oblastí genů MPO a MMP9	41
3.2.2.3. Příprava vektorů pGI3-Basic a pCluc-Basic 2	48
3.2.2.4. Purifikace vektoru pGI3-Basic a pCluc-Basic 2 z gelu	51
3.2.2.5. Ligace vektoru a fragmentů regulačních oblastí genů MPO a MMP9	51
3.2.2.6. Transformace luciferázových konstruktů do DH5 α kompetentních bakterií	53
3.2.2.7. Ověření pozitivních kolonií pomocí PCR z bakteriálních kolonií.....	53
3.2.2.8. Izolace plasmidové DNA	54
3.2.2.9. Restrikční ověření luciferázových konstruktů.....	55
3.2.2.10. Zamražení bakteriální kultury.....	55
3.2.3. Metody použité k mutagenезi (záměně) vazebných míst PU.1	56
3.2.4. Transfekce DNA	59
3.2.4.2. DNA transfekce do PUER myeloidních progenitorů	59
3.2.4.3. Sklizení buněk	60
3.2.4.4. Stanovení luciferázové aktivity	61
3.2.4. Statistické vyhodnocení.....	61
4. VÝSLEDKY.....	62
4.1. Buněčný systém – model myeloidní diferenciace	62
4.2. Tvorba luciferázových vektorů nesoucích regulační oblasti MPO a MMP9 umožňujících studium jejich regulace rozdílnými koncentracemi PU.1	65
4.2.1. In silico analýza regulačních oblastí genů MPO a MMP9	65
4.2.2. Strategie klonování kandidátních regulačních oblastí MPO a MMP9 do luciferázových vektorů	69
4.2.3. Tvorba reportérových konstruktů nesoucích potenciální MPO enhancery	73
4.2.3.1. Amplifikace fragmentů obsahujících regulační oblasti genu MPO	73
4.2.3.2. Restrikční štěpení, purifikace na gelu a ligace fragmentů regulačních oblastí genu MPO do pGL3 reportérových vektorů.	75
4.2.3.3. Restrikční ověření MPO reportérových konstruktů.....	75
4.2.4. Tvorba reportérových konstruktů nesoucích potenciální MMP9 enhancery.....	77

4.2.4.1. Příprava fragmentů obsahujících regulační oblasti genu MMP9	77
4.2.4.2. Restrikční štěpení, purifikace z gelu a ligace fragmentů regulační oblasti genu MMP9 do pCluc reportérového vektoru a transformace.....	78
4.2.4.3. Restrikční ověření MMP9 reportérových konstruktů	79
4.3. Funkční ověření MPO a MMP9 enhancerových reportérových konstruktů různými koncentracemi transkripčního faktoru PU.1	82
4.4. Mutageneze PU.1 vazebných míst v MPO a MMP9 reportérech	87
5. DISKUZE.....	94
6. SOUHRN	99
7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	101

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 mutagenezi vazebných míst PU.1 a dále budou použity k testování úlohy kooperujících transkripčních faktorů.

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

Abstract

Enhancers are distal cis – regulatory DNA sequences that regulate (enhance) transcription of the respective gene driven by its promoter. Enhancers are found in non-coding DNA upstream or downstream of the gene coding sequence, or in introns or coding regions that are located up to hundreds kb away from the gene.

Superenhancers are newly discovered clusters of multiple enhancers that play a vital role in activating tissue-specific genes, determining cell identity and regulating differentiation.

PU.1 is the transcription factor (TF) that is necessary for normal haematopoiesis, specifically for the development of myeloid and lymphoid blood lineages. Distinct levels of PU.1 induce differentiation of hematopoietic cells into different cell lineages whereby disruption of PU.1 levels leads to leukemogenesis. High PU.1 levels stimulate macrophage development, while intermediate levels stimulate the development of granulocytes. This diploma thesis seeks to contribute to addressing the interesting biological question of what are the regulatory mechanisms to ensure that granulocytic genes are activated only at the intermediate concentration of PU.1, whereas macrophage genes are activated only at its high levels.

The aim of this diploma thesis was to create a series of reporter vectors carrying regulatory regions of granulocyte genes MPO and MMP9, which would allow the study of mechanisms of how different levels of TF PU.1 are sensed by regulatory sequences of target genes. Based on the analysis of the regulatory regions of the MPO and MMP9 genes we identified 4 MPO and 14 MMP9 putative enhancers +/- 100 kb from the transcriptional start. Subsequently, we created 48 luciferase constructs carrying the regulatory regions of the MPO and MMP9 genes and their variants or combinations. The resulting luciferase constructs were functionally tested during the differentiation of PU.1 transgenic myeloid progenitors initiated by different levels of PU.1. Data show that 7 of 13 MMP9 and 2 out of 3 MPO of enhancer constructs that were tested had activation ability at the intermediate (granulocytic) level of PU.1. This suggests that the expression of these genes is co-regulated by multiple domains that likely constitute a superenhancer. The sequential assembly of individual MPO enhancers led to an additive activation effect. While the activation potentials of the individual enhancers were relatively low, their activity gradually increased in the presence of other enhancers and/or proximal promoter, indicating the need for the collaboration of the individual enhancers necessary for optimal tissue-specific expression of MPO and MMP9 genes.

The generated enhancer constructs were subsequently used for mutagenesis of PU.1 binding sequences with different affinities and will be utilized for the testing of PU.1 co-operative transcription factors.

Keywords: Transcription regulation, Enhancer, Superenhancer, Differentiation, PU.1

Seznam zkratek

3C	chromosome conformation capture
CAGE	cap analysis of gene expression
ChIP-seq	chromatinová imunoprecipitace spojená se sekvenováním
CLP	lymfoidní progenitor
CMP	myeloidní progenitor
DBD	DNA vazebná doména
DCE	downstream core element
DPE	downstream promotorový element
ER	estrogenový receptor
eRNA	enhancerová RNA
GMP	granulocyto/monocytový progenitor
Hi-C	celogenomová varianta 3C metody
HSC	hematopoetická kmenová buňka
Inr	iniciátor
kb	kilobáze
LT-HSC	dlouhodobé hematopoetické kmenové buňky
luc	luciferáza
MEP	megakaryocyto/erytroidní progenitor
MLLP	myelo/lymfoidní multipotentní progenitor
MMP9	matrix metaloproteináza 9
MPO	myeloperoxidáza
MPP	multipotentní progenitor
nt	nukleotid
PCR	polymerázová řetězová reakce
PIC	preiniciační komplex
PP	proximální promotor
RE	responzivní element
RNA pol II	DNA dependentní RNA polymeráza II
ST-HSC	krátkodobé hematopoetické kmenové buňky
TAD	topologicky asociovaná doména
Tax	tamoxifen
TF	transkripční faktor
TSS	transkripční startovací místo

1. Literární přehled

1.1. Regulace genové exprese přehled regulace

Lidský genom obsahuje přibližně 22 000 protein kódujících genů, až 5 000 mikroRNA a velké množství nekódující RNA, jejichž počet (zatím přesně nedefinovaný) mnohonásobně přesahuje počet protein kódujících genů. Dospělý lidský organismus obsahuje přibližně 10^{15} specializovaných buněk. Každá diferenciovaná buňka exprimuje pouze určitý set genetické informace v určitý čas a na určitém místě. To je zajištěno komplexním biologickým procesem, jenž se nazývá regulace genové exprese.

Genová exprese je komplexní proces transformace genetické informace zakódované v sekvenci DNA do genových produktů – proteinů. Genová exprese je regulována na mnoha úrovních, které zahrnují procesy jako buněčná signalizace, prostorová organizace genomu, struktura a modifikace chromatinu, iniciace transkripce, procesování mRNA (pre-mRNA sestřih, polyadenylace, jaderný export a degradace), cytoplazmatická translace proteinů a jejich následná modifikace a degradace (Alberts et al., 2014).

I přestože centrální dogma molekulární biologie DNA – RNA – protein definoval laureát Nobelovy ceny Francis Crick již v roce 1970 (Crick, 1970), přesto jsou popisovány stále nové a komplexnější mechanismy regulace genů. V posledních několika letech byla objevena např. postranskripční regulace mRNA pomocí mikroRNA. Celogenomové sekvenční metody umožnily identifikovat rozsáhlou regulační úlohu nekódujících úseků DNA zahrnující např. nový mechanismus regulace genové exprese mnohočetnými enhacery, tzv. superenhancery.

1.1.1. Regulace transkripce

Prvním a limitujícím procesem v regulaci genové exprese je iniciace transkripce genomové DNA do RNA pomocí DNA dependentní RNA polymerázy II (RNA pol II).

Regulace transkripce se účastní řada proteinových faktorů. Nejdříve dochází k vazbě tzv. „pionýrských“ transkripčních faktorů na DNA, poté k vazbě histonacetyltransferáz (p300, CBP) a dalších histony modifikujících faktorů na TF, které modifikují koncové aminokyseliny histonů (např. H3K9ac, H3K4me), čímž rozvolňují chromatin. Současně chromatin remodelační komplexy (např. SWI/SNF), které se buď vážou přímo na histony, nebo na TF, přesouvají nukleozomy, aby zpřístupnily DNA v oblasti počátku transkripce pro vazbu obecných transkripčních faktorů, které zprostředkují vazbu RNA pol II. K iniciaci transkripce je potřeba často další signál od specifických transkripčních faktorů, který je

zprostředkován prostřednictvím multikomponentního mediátorového komplexu (Alberts et al., 2014).

1.1.1.1. Transkripční faktory

Transkripční faktory jsou proteiny, které regulují transkripci DNA. Transkripční faktory se váží na regulační oblasti promotoru nebo enhancerů, čímž zprostředkují nasednutí komplexu RNA polymerázy II do proximálního promotoru a zahájení transkripce. Transkripční faktory rozeznávají krátkou sekvenci DNA (6-12 bp) a tyto sekvence rozeznávané transkripčními faktory se nazývají responzivní elementy (REs) popř. vazebná místa (sekvence). Jejich funkcí je buď aktivace transkripce, potom je nazýváme aktivátory, nebo inhibice transkripce a ty nazýváme represory (Alberts et al., 2014).

Transkripční faktory obsahují specifické funkční domény. Typicky obsahují DNA vazebnou doménu (DBD), která obsahuje sekvenční motiv, kterým se váže na DNA. Podle typu DBD existuje několik skupin transkripčních faktorů zahrnující základní helix-loop-helix, helix-turn-helix, motiv zinkového prstu, leucinový zip, křídlatý helix, křídlatý helix-turn-helix a další unikátní domény transkripčních faktorů (Pabo, 1992).

Další doménou je trans-aktivační doména, která slouží k interakci s dalšími transkripčními faktory a kofaktory jako např. chromatin modifikujícími proteiny. Některé transkripční faktory mohou obsahovat ligand vazebnou doménu, která reaguje na externí signály, například prostřednictvím interakce s hormony.

Transkripční faktory kooperují s mnoha dalšími proteiny, jako jsou např. koaktivátory, faktory remodelující chromatin a enzymy modifikující histony. Těmto proteinům chybí zpravidla DNA vazebná doména.

Transkripční faktory rozdělujeme na obecné transkripční faktory a specifické transkripční faktory. **Obecné transkripční faktory** jsou nezbytné pro iniciaci transkripce a zajišťují bazální transkripci genu. Obecné transkripční faktory společně s RNA pol II vytváří preiniciační komplex (PIC). Pomáhají RNA pol II nasednout na místo transkripčního startu (TSS), protože samotná RNA pol II není schopná rozeznat místo transkripčního startu. Obecné transkripční faktory jsou přítomné ve všech buňkách v organismu. Většina těchto transkripčních faktorů jsou multimerní proteiny. Největší z nich je TFIID, který se skládá z TBP a TAF. TBP je protein, který rozeznává a váže se na TATA box promotoru. TBP se váže do malého žlábků DNA a způsobí její ohyb. Poté dochází k vazbě TFIIB, který se váže na TBP i DNA, RNA pol II s TFIIF a poté TFIIE. Vazba transkripčního faktoru TFIIH je posledním krokem v tvorbě preiniciačního komplexu. Podjednotka TFIIH má helikázovou

aktivitu a za spotřeby ATP rozvine DNA v místě transkripčního startu. RNA pol II může vytvářet otevřený komplex v místě rozvinutí DNA. Templátová DNA se váže do aktivního místa RNA pol II a polymeráza může začít transkribovat templátovou DNA (Grünberg & Hahn, 2013; Sainsbury *et al*, 2015)

Specifické transkripční faktory jsou regulační proteiny, které zajišťují odpověď na vnější signály, rozpoznávají a váží specifické sekvence DNA a vytvářejí kontakt s transkripčním aparátem, a to buď přímo, nebo zprostředkovaně. Specifické transkripční faktory se váží jak na proximální promotor, tak na distální regulační genové oblasti jako enhancery a silencery, které mohou být vzdálené až stovky kb od promotoru nebo se dokonce mohou nacházet i na jiném chromozomu. Kontakt s RNA pol II je zprostředkován prostřednictvím mediátoru, což je proteinový komplex (26 podjednotek), který zajistí přenos regulačního signálu od TF, který je navázán na DNA, k RNA pol II. Transkripční faktory se na mediátor váží trans-aktivační doménou. Poté dochází k iniciaci transkripce (Allen & Taatjes, 2015).

1.1.1.2. Regulační oblasti genu

DNA regulační oblasti kontrolující transkripci genu rozdělujeme na proximální a distální části. Proximální částí je promotor a distální částí jsou enhancery a silencery. Promotor se nachází v bezprostřední blízkosti kódující oblasti genu, enhancery a silencery jsou více vzdálené od kódující oblasti genu. Na specifické sekvence těchto DNA regulačních oblastí se vážou transkripční faktory, které se podílejí na regulaci transkripce (Alberts *et al.*, 2014).

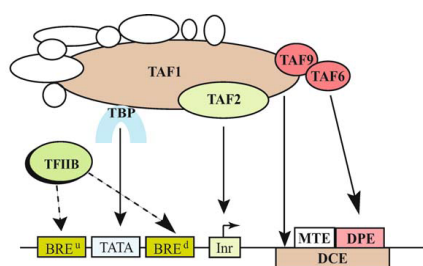
1.1.1.2.1. Promotor

Promotor je sekvence DNA, která iniciuje transkripci konkrétního genu, zahrnuje počátek transkripce (TSS), přidružené sekvence v obou směrech a je důležitá pro nasednutí RNA pol II do počátku transkripce. Promotor lze rozdělit na jádro promotoru a proximální část. Jádro promotoru je sekvence DNA, která je nezbytná pro iniciaci bazální transkripce a sestavení preiniciačního komplexu z RNA pol II a obecných transkripčních faktorů. Proximální část promotoru obsahuje vazebná místa pro řadu specifických transkripčních faktorů (Alberts *et al.*, 2014).

Mezi základní sekvence jádra promotoru patří TATA box, TFIIB rozeznávací element (BRE element), Iniciátor (Inr), downstream promotorový element (DPE) (viz Obr. 1). Prvním objeveným elementem jádra promotoru eukaryotických genů byl TATA box, který obsahuje

sekvenci TATA(A/T)A(A/T) a je vzdálen ~ 25-35 bp od TSS. Na TATA box se váže podjednotka TFIID TBP a ne všechny geny ho obsahují, pouze 24% lidských genů obsahuje TATA box (Mathis & Chambon, 1981; Yang *et al*, 2007). Další částí jádra promotoru je BRE element, který se skládá ze dvou motivů obklopující TATA box z obou stran. Každý motiv obsahuje 7 bp sekvenci, rozeznávanou obecným transkripčním faktorem TFIIB (Lagrange *et al*, 1998; Deng *et al*, 2005). Iniciátor (Inr) zahrnuje TSS a pravděpodobně je nejčastěji se vyskytujícím motivem jádra promotoru (Smale & Baltimore, 1989; FitzGerald *et al*, 2006). Sekvence Inr je rozpoznávána TAF1 a TAF2 podjednotkou TFIID (Kaufmann & Smale, 1994; Chalkley & Verrijzer, 1999). DPE je další motiv, který se nachází přibližně 30 bp za TSS a je rozeznáván stejně jako TATA box podjednotkou TAF6 a TAF9 TFIID a nachází se většinou v promotorech, které neobsahují TATA box (Smale & Kadonaga, 2003; Burke & Kadonaga, 1997; Kutach & Kadonaga, 2000). Dalšími motivy jádra promotoru jsou DCE (downstream core element) a MTE (motif ten element) (Mathis & Chambon, 1981). DCE se nachází v pozici +6 až +34 bp vůči TSS, je rozdělen na tři podjednotky SI-SIII a stejně jako DPE je rozeznáván podjednotkou TAF6 a TAF9 TFIID. MTE se nachází +18 až +22 bp vůči TSS a je rozeznáván podjednotkou TAF1 TFIID (Lee *et al*, 2005). Mezi další části jádra promotoru lze zařadit CAAT box, GC box a oktamer. CAAT box se nachází 60-100 bp od TSS a obsahuje sekvenci GGCCAATCT a vážou se na něj aktivátory NF-1 a NF-Y. GC box se nachází přibližně 110 bp od TSS a vážou se na něj specifické transkripční faktory jako např. Sp1. Oktamer je rozeznáván transkripčním faktorem OCT-1. Některé publikace řadí CAAT a GC box do proximálního promotoru (Dolores Delgado & León, 2006). Promotory se mohou lišit v zastoupení sekvencně specifických elementů.

Proximální promotor obsahuje DNA sekvence (cca 6-10 bp), které jsou rozeznávány specifickými transkripčními faktory.



	Pozice	Sekvence (od 5' k 3')	Vazba proteinu
BRE ^h	-38 to -32	(G/C)(G/C)(G/A)CGCC	TFIIB
TATA	-31 to -24	TATA(A/T)A(A/T)(A/G)	TBP
BRE ^d	-23 to -17	(G/A)T(T/G/A)(T/G)(G/T)(T/G)(T/G)	TFIIB
Inr	-2 to +5	PyPyAN(T/A)PyPy	TAF1/TAF2
MTE	+18 to +29	C(G/C)A(A/G)C(G/C)(G/C)AACG(G/C)	n.a.
DPE	+28 to +34	(A/G)G(A/T)CGTG	TAF6/TAF9
DCE	3 subelements +6 to +11 +16 to +21 +30 to +34	core sequence: S _I CTTC S _{II} CTGT S _{III} AGC	TAF1

Obr. 1: Části jádra eukaryotického promotoru. Jádro promotoru s TATA boxem, iniciátorem, BRE, DPE, DCE a MTE elementem. Znázorněna vazba TFIIB a podjednotek TFIID. Tabulka s pozicí jednotlivých elementů, jejich sekvencí a vazbou obecného transkripčního faktoru. Převzato a upraveno z (Thomas & Chiang, 2006).

1.1.1.2.2. Enhancer

Geny regulující základní buněčné funkce, které jsou exprimovány ve všech buněčných typech a tkáních (např. GAPDH) jsou převážně regulovány vazbou transkripčních faktorů do proximálního promotoru genu.

Geny exprimované ve specifických buněčných typech a tkáních jsou kromě promotoru navíc regulovány vzdálenými cis-regulačními prvky (CRE) nazývanými enhancery. První objevený enhancer byl v genu pro těžký řetězec imunoglobulinu (Banerji *et al*, 1983, 1981).

Enhancer je sekvence DNA, která zesiluje transkripci z promotoru daného genu, nezávisle na její pozici či orientaci. Enhancery jsou dlouhé až několik stovek bp a mohou se nacházet před, za genem nebo v intronech či kódující oblasti genu. I přestože většina enhancerů (~80%) se vyskytuje v blízkosti regulovaného genu, byly popsány enhancery vzdálené až mnoho megabází (Amano *et al*, 2009). Lidský genom obsahuje milióny potencionálních enhancerů, ale každý buněčný typ obsahuje pouze omezený počet aktivních enhancerů, jež jsou zodpovědné za expresi genů specifických pro daný buněčný typ. Ostatní enhancery jsou v daném buněčném typu neaktivní, zatím co mohou být aktivní v jiném buněčném typu. (Heinz *et al*, 2015). Enhancerové sekvence obsahují velké množství vazebných sekvencí pro specifické TF. Enhancer se dostává do kontaktu s promotorem prostřednictvím DNA smyčky, tzv. „DNA looping“.

Vlastnosti enhancerů

Typickými vlastnostmi enhancerů jsou:

1. otevřený chromatin (senzitivita k DNáze I, či ATAC sekvenování)
2. specifické histonové modifikace
3. vysoká koncentrace vazebných míst pro transkripční faktory a „master“ transkripční faktory
4. přítomnost transkripčních koaktivátorů a mediátorů
5. přítomnost RNA pol II transkribující enhancerovou sekvenci do tzv. enhancerových RNA

Citlivost k DNáze I

je znak pro otevřený chromatin. Enhancery jsou charakterizované deplecí nukleozomů, umožňující vazbu transkripčních faktorů a kofaktorů do DNA (Thurman *et al*, 2012; He *et al*, 2010). Novější metodou identifikující otevřený chromatin je ATAC sekvenování, využívající štěpení transpozázou Tn5.

Histonové modifikace enhancerů

Enhancery jsou charakterizované specifickými histonovými modifikacemi nukleozomů, mezi něž patří zejména vysoká úroveň monometylace lysinu 4 na histonu 3 (**H3K4me1**) a acetylace lysinu 27 na histonu 3 (**H3K27ac**) a naopak nízká úroveň trimetylace lysinu 4 histonu 3 (**H3K4me3**) (typická pro TSS) (Heintzman *et al*, 2007).

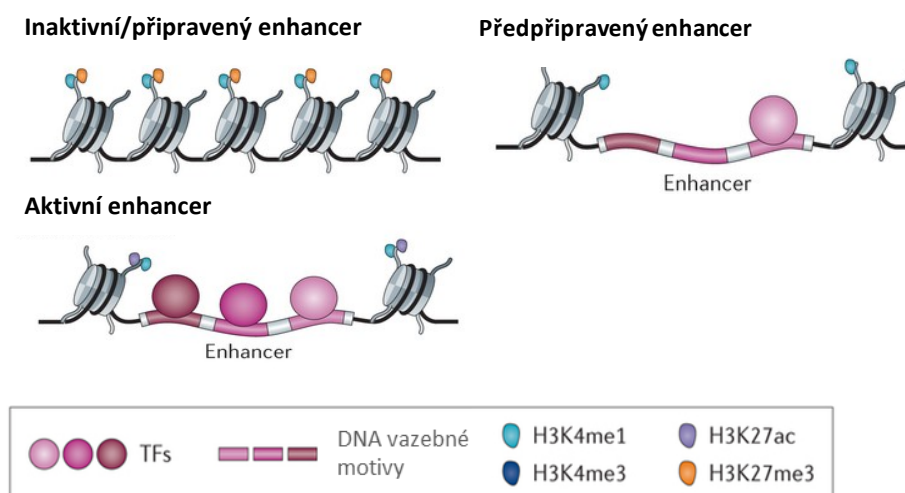
Enhancery můžeme na základě jejich histonových modifikací rozdělit na inaktivní, předpřipravené, připravené a aktivní enhancery (Obr. 2) (Ernst & Kellis, 2010).

Inaktivní enhancer se nachází v kompaktním uzavřeném (hetero)chromatinu a je nedostupný pro transkripční faktory a obsahuje histonové modifikace typické pro neaktivní chromatin jako trimetylace lysinu 27 na histonu 3 (H3K27me3).

Předpřipravený enhancer (angl. primed) je charakterizován otevřeným chromatinem, zprostředkovaným vazbou specifických transkripčních faktorů a H3K4 mono a dimetylací.

Připravený enhancer (angl. poised) je definován jako předpřipravený enhancer, který obsahuje navíc H3K27me3 a tvoří tzv. bivalentní chromatin, který obsahuje jak modifikace asociované s aktivací tak represí (Heinz *et al*, 2015).

Aktivní enhancer je charakterizován přítomností aktivačních histonových modifikací a to H3K4me1 a navíc **H3K27ac**, a přítomností RNA pol II, která aktivně přepisuje eRNA (Creyghton *et al*, 2010; de Santa *et al*, 2010; Kim *et al*, 2010)



Obr. 2: Rozdělení enhancerů na základě histonových modifikací. Histony nukleozomů inaktivních a připravených enhancerů nesou H3K4me1 a represivní H3K27me3. Předpřipravené enhancery, které ještě nejsou aktivní, ale jsou připraveny pro aktivaci, jsou označeny H3K4me1. Histony aktivních enhancerů jsou označeny H3K4me1 a H3K27ac. Převzato a upraveno z (Shlyueva *et al*, 2014).

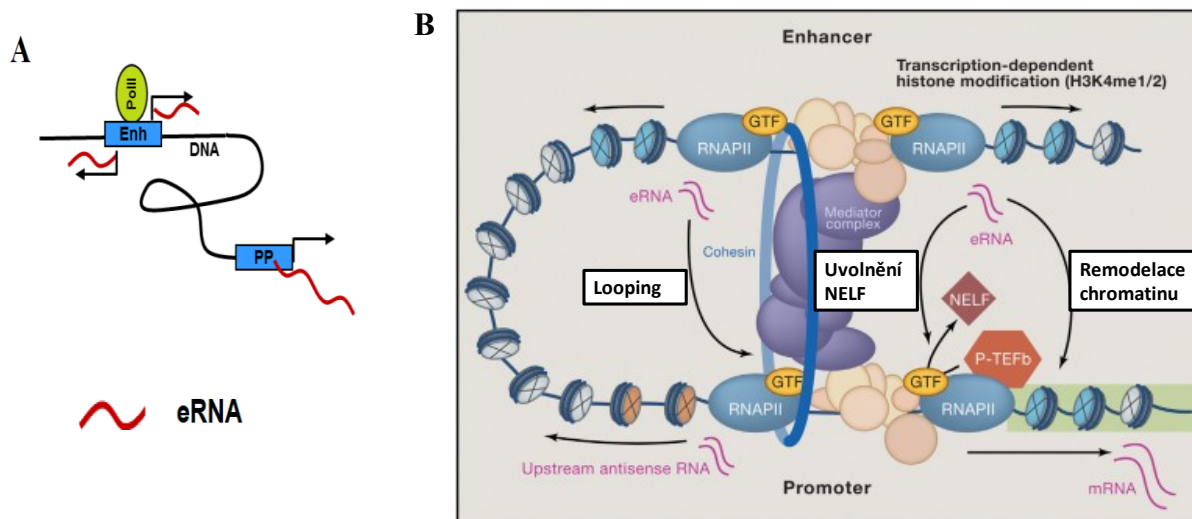
1.1.1.2.2.1. Enhancerové RNA

Celogenomové sekvenční metody jako CAGE (Cap analysis of gene expression) sekvenování či GRO sekvenování (Global run on sekvenování) přinesly v nedávné minulosti překvapivý objev: aktivní enhancery jsou asociované s RNA pol II a většina extragenní transkripce a extragenní vazby RNA pol II (~ 70%) je spojena s enhancery (Kim *et al*, 2010; de Santa *et al*, 2010). Aktivní enhancery jsou transkribovány RNA pol II do krátkých nekódujících transkriptů zvaných enhancerové RNA (eRNA). **eRNA** jsou krátké obousměrné transkripty o průměrné délce ~ 350 nt, oddělené 180 páry bází odpovídajícími hranicím nukleozomů (Andersson *et al*, 2014).

Funkce eRNA nebyla dosud přesně objasněna. Předpokládá se, že eRNA mohou zprostředkovat tvorbu DNA smyčky mezi enhancerem a promotorem a mohou tak přinášet transkripční aparát k promotoru a TSS, nebo mohou sekvenčně specificky rekrutovat kofaktory či vázat k DNA chromatin remodelační enzymy a zprostředkovat remodelaci chromatinu (Wang *et al*, 2011). Můžou se také podílet na uvolnění negativního elongačního faktoru (NELF), který způsobuje zastavení RNA pol II blízko TSS. (Schaukowitch *et al*, 2014) Je také možné, že eRNA představují transkripční šum (Li *et al*, 2013) (Obr. 3).

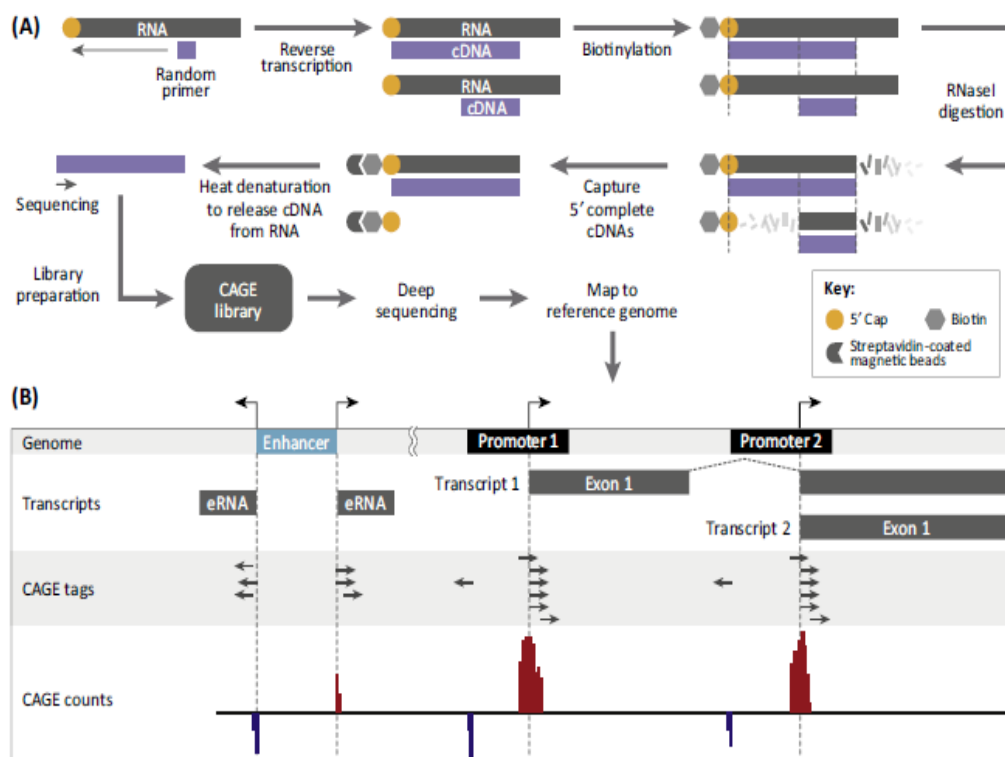
Konkrétně např. bylo popsáno, že eRNA se účastní tvorby smyčky mezi enhancerem a promotorem tím, že interagují s podjednotkou mediátorového komplexu MED1, který se

účastní společně s kohezinem tvorby smyčky mezi regulačními oblastmi (Hsieh *et al*, 2014). Dopusud publikované práce podporují všechny uvedené varianty, ale objev eRNA je čerstvý a je nezbytný další výzkum na objasnění přesné biologické funkce eRNA. Data z naší laboratoře a publikované práce ukazují, že detekce a kvantifikace eRNA pomocí qRT PCR může sloužit jako měřítko endogenní enhancerové aktivity (Lam *et al*, 2013).



Obr. 3: (A) Model eRNA transkripce. (B) Funkce eRNA. eRNA funkcí může být zprostředkování tvorby smyčky mezi enhancerem a promotorem, zprostředkování remodelace chromatinu, zprostředkování uvolnění negativního elongačního faktoru. Převzato a upraveno z (Kim & Shiekhattar, 2015).

Cap Analysis of Gene Expression (CAGE) je sekvenační metoda založená na analýze počátečních sekvencí RNA transkriptů, která umožňuje identifikovat v genomu počátky transkripce (TSS) a současně kvantifikovat úroveň jejich transkripce (Shiraki *et al*, 2003). Tato metoda umožňuje také identifikovat bidirekcionální enhancerové RNA. FANTOM databáze (<http://fantom.gsc.riken.jp/>) obsahuje celogenomová CAGE data téměř 800ti buněčných typů a tkání a umožňuje hledat TSS kódujících genů a identifikovat enhancerové sekvence (Andersson *et al*, 2014) (Obr. 4).



Obr. 4: Schéma přípravy CAGE knihovny a analýzy dat. Prvním krokem této metody je reverzní transkripce RNA do cDNA. Poté jsou 5' čepičky RNA biotinylovány, přidána RNáza I, která naštěpí jednovláknovou RNA, cDNA s RNA je precipitována magnetickými kuličkami potaženými streptavidinem. Následně je uvolněna cDNA z RNA a sekvenována (A). Pomocí mapování CAGE značek k referenčnímu genomu jsou detekována místa transkripčního stratu. Aktivita promotorů může být odvozena z počtu CAGE značek. Současně CAGE umožňuje determinovat enhancery a úroveň eRNA exprese na základě bidirekcionálních eRNA. Červené a modré signály označují CAGE signály v obou směrech (B). Převzato z (Murakawa *et al.*, 2016).

Další metodou identifikující nascentní RNA transkripci je **Gro-seq** (Global run-on sequencing). Tato robustní celogenomová metoda je založena na značení nově syntetizovaných transkriptů bromdeoxyuridinem (BrdU) v přítomnosti chemické látky sarkosylu, která zabraňuje nasednutí RNA polymerázy k DNA. Proto pouze RNA polymeráza, která je již na DNA před přidáním sarkosylu, bude produkovat nové transkripty, které budou značeny BrdU. BrdU značené nascentní transkripty jsou precipitovány magnetickými kuličkami povlečenými protilátkou proti BrdU, převedeny na cDNA a poté sekvenovány pomocí NGS (Core *et al.*, 2008).

1.1.1.2.3. Superenhancery

Současné celogenomové sekvenační analýzy (ChIP-seq, Gro-seq, ATAC-seq apod.) přinesly nový objev, že regulační oblasti tkáňově specifických genů, které určují typ a tkáňově specifickou identitu buněk, nesou velká seskupení aktivních enhancerových sekvencí, které tvoří takzvané **superenhancery**.

Superenhancery jsou hustá seskupení mnohočetných aktivních funkčně spolupracujících enhancerů, která regulují expresi genů důležitých např. pro diferenciaci a liniové určení buněk, nebo např. onkogenů. Superenhancery prostorově interagují s proximálním promotorem (viz Obr. 5 a 6) (Whyte *et al*, 2013; Hnisz *et al*, 2013). Regulační příspěvek jednotlivých složek superenhanceru, jejich nezbytnost či případná redundance zatím nejsou dobře popsány.

Aktivace složek superenhanceru vede k prostorovému kontaktu jednotlivých enhancerů a sestavení funkčního superenhanceru. Vlastní sestavení superenhanceru je zprostředkováno prostorovým kontaktem pomocí DNA smyček. Ty jsou zpravidla zprostředkovány dimerizací transkripčního faktoru CTCF a následným vytvořením prstence kohezinového komplexu na bázi každé smyčky (viz Obr. 6).

Stejně jako u enhancerů, typickými vlastnostmi aktivního superenhanceru jsou senzitivita k DNáze I, specifické histonové modifikace jako H3K27ac a H3K4me1, přítomnost RNA pol II a produkce eRNA. Aktivní superenhancery dále váží velké množství „master“ transkripčních faktorů, kofaktorů, chromatinových regulátorů, mediátorových komplexů, komplexu RNA pol II a jsou vysoce transkribovány. Nejnovější modely genové regulace naznačují, že superenhancery formují v jádře fázově separované bezmembránové kondenzáty (kompartmenty) významně obohacené o zmíněné faktory (Hnisz *et al*, 2017). Superenhancery se liší od typických enhancerů velikostí a hustotou vazby transkripčních faktorů. (Hnisz *et al*, 2013).

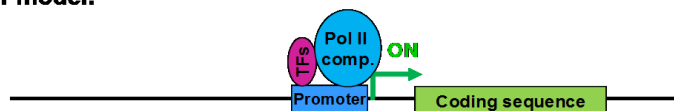
Superenhancery vykazují výjimečnou citlivost a reakci na signální dráhy, které kontrolují buněčnou identitu během vývoje a tumorigeneze. Bylo např. popsáno, že vazba terminálních transkripčních faktorů signálních drah jako např. SMAD3, WNT, TCF3 a LIF, které jsou esenciální pro transkripční kontrolu kmenových buněk, je nabohacena v superenhancerech. Tyto superenhancery poskytují svým cílovým genům mnohem vyšší pravděpodobnost odpovědi na signalizaci (Hnisz *et al*, 2015).

Analýzy superenhancerů v nádorových a zdravých buňkách odhalily, že nádorové buňky získávají superenhancery v onkogenech a dalších důležitých genech ve vývoji nádorů

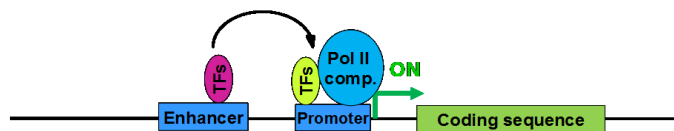
během procesu nádorové patogeneze, čímž zvyšují úroveň transkripce těchto genů oproti zdravým buňkám (van Groningen *et al*, 2017; Hnisz D, Schuijers J, Lin CY, Weintraub AS, Abraham BJ, Lee TI, Bradner JE, 2016). U více druhů malignit byly nalezeny superenhancery v nekódujících sekvencích obklopujících gen C-MYC, zatímco tyto superenhancery ale nebyly nalezeny (aktivní) ve zdravých tkáních. Mezi mechanismy, které mohou být odpovědné za schopnost maligních buněk získat superenhancery, patří např. DNA translokace, nadměrná exprese transkripčních faktorů, fokální amplifikace apod. (Hnisz *et al*, 2013).

Také bylo popsáno, že pět jednonukleotidových polymorfismů (SNP), které jsou asociované s Alzheimerovou chorobou, je obohaceno v superenhancerech genů mozkových tkáních. Další SNP v superenhancerech byly např. popsány u diabetu typu 1 nebo systémového lupus erythematos (Hnisz *et al*, 2013).

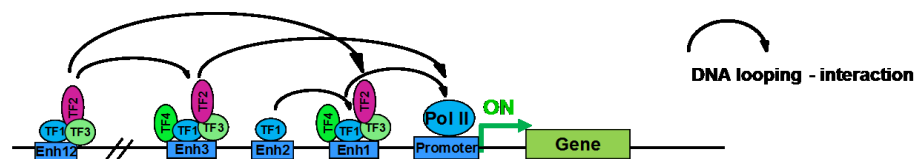
Původní model:



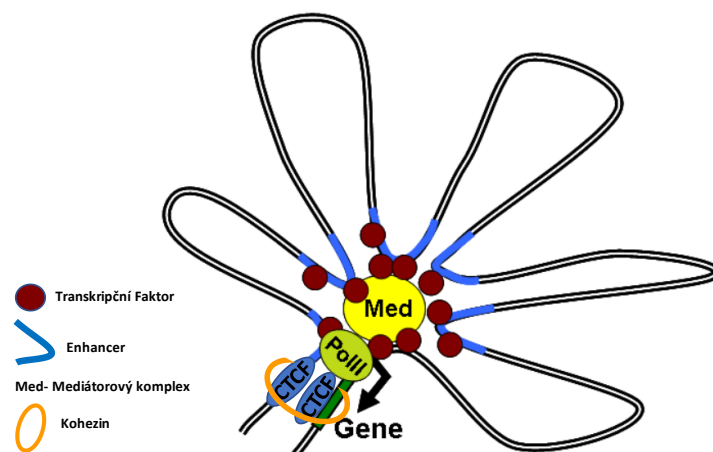
Novější model: Enhancery



Nejnovější model: Superhancery



Obr. 5: Modely transkripční regulace. Původní model, předpokládal, že geny jsou regulovány vazbou transkripčních faktorů do proximálního promotoru. Později se ukázalo, že geny exprimované ve specifických buněčných typech a tkáních jsou kromě promotoru navíc regulovány enhancery. Nejnovější model regulace transkripce jsou superenhancery, které určují buněčný typ a tkáňově specifickou identitu buněk (V. Pospíšil, nepublikovaná data).



Obr. 6: Model sestaveného superenhanceru. Modré čáry – enhancery, zelená čára – gen, vínová kolečka – transkripční faktory, žluté kolečko – mediátor, světle zelená elipsa – RNA pol II, modrá elipsa – CTCF, oranžový kroužek – kohezinový komplex. Zjednodušeně, předpokládá se, že kohezinový komplex je na bázi všech zázorných DNA smyček.

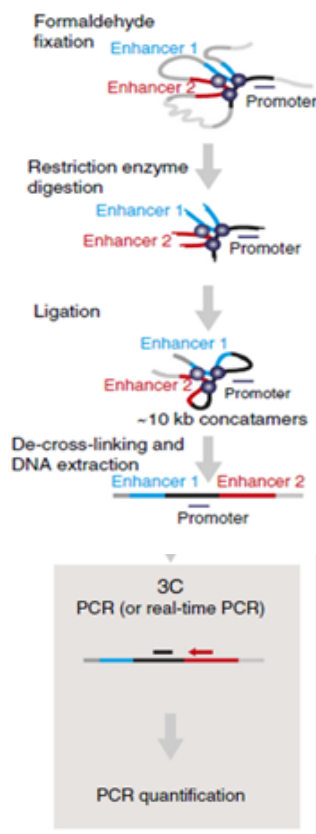
1.1.1.3. Prostorová (3D) organizace genomu

Genom v buněčném jádře je organizován a rozdělen do funkčních kompartmentů v 3D prostoru. Transkripčně aktivní euchromatin a transkripčně neaktivní heterochromatin mají tendenci segregovat, čímž se genom rozděluje na aktivní a neaktivní oddíly (Lieberman-Aiden *et al*, 2009). V mnoha buněčných typech je neaktivní heterochromatin asociován s jadernou membránou, zatímco aktivní euchromatin je lokalizován v centru jádra. Metody pro studium 3D interakce genomu jako Hi-C (Hi-chromosome conformation capture, viz níže) ukázaly, že genom je rozdělen do velkých, megabázových, lokálních chromatinových interakčních domén, které se nazývají topologicky asociované domény (topologically associated domains, **TADs**) (Dixon *et al*, 2012). TADs představují funkční, velké megabázové segmenty, v nichž mohou být geny společně regulovány. Lidský a myší genom obsahuje cca 2000 TADs, s průměrnou velikostí cca 800 kb. TADs jsou dále rozděleny na poddomény, a ty dále až na samostatné DNA (chromatinové) smyčky (Obr. 8). TADs jsou odděleny hraničním regionem, který typicky obsahuje vazebné místo pro transkripční faktor CTCF inzulátorový protein. CTCF má schopnost dimerizovat a zároveň váže kohezinový komplex (heterodimer proteinu SMC1 a SMC3, SCC1, SCC3-intraguje s CTCF). Dimerizace CTCF spolu s vytvořením kohezinového komplexu pak fyzicky vytváří vlastní DNA smyčky a tím zprostředkuje kontakt interagující DNA např. promotoru a enhanceru (Obr. 6 a 8). Vazba CTCF zároveň zabraňuje interakci mezi sousedními TAD a odděluje tak společně koregulované oblasti. (Pombo & Dillon, 2015).

1.1.1.4. Chromosome conformation capture (3C) - metoda pro studium 3D interakce

3D interakce DNA lze studovat jednak pomocí mikroskopických metod jako „super resolution microscopy“, jež mají ale omezenou rozlišitelnost. Biochemická metoda, jež je schopná 3D interakci studovat na molekulární úrovni se nazývá chromosome conformation capture (3C). 3C metoda umožňuje identifikovat interakce vzdálených regionů DNA jako jsou např. enhancery a promotory (Dekker, 2002).

Prvním krokem 3C je fixace chromatinu pomocí formaldehydu, jež způsobí „crosslink“ nukleoproteinových komplexů v místě interagujících DNA oblastí a tyto interagující DNA segmenty zůstanou spojeny. Poté je fixovaný chromatin štěpen restrikcními enzymy o vhodné frekvenci štěpení (adekvátní studované DNA oblasti). Tímto krokem dojde k oddělení interagující DNA od neinteragující. Naštěpené konce interagujících DNA sekvencí jsou následně ligovány za limitně nízké koncentrace vzorku, zajišťující, že jsou preferenčně ligovány interagující fixované úseky, jejichž volné konce jsou díky fixaci v blízkosti, a nikoliv náhodné úseky. Následně je purifikována ligovaná interagující DNA. Interakce DNA lokusů je následně identifikována pomocí q-PCR za použití specifických (head to tail) primerů, navržených přes ligované DNA spoje (viz Obr. 7). Tyto primery jsou tudíž schopné amplifikovat pouze neštěpenou a následně ligovanou interagující DNA a jelikož primery mají stejnou orientaci, nejsou schopny amplifikovat neinteragující DNA. Četnost DNA interakce je vyjádřena jako frekvence, s jakou segmenty interagují (tzv. „crosslink frequency“) a rovná se qPCR stanovenému relativnímu množství testovaného ligačního produktu. Frekvence testovaných interagujících lokusů se vztahuje k frekvenci vybraného neinteragujícího lokusu(ů) (Dekker, 2006; Simonis *et al*, 2007; Davies *et al*, 2017). 3C metoda má řadu celogenomových variant jako 4C, 5C, Hi-C, ChiA-Pet, viz níže.



Obr. 7: Kroky 3C metody. Prvním krokem 3C metody je fixace chromatinu pomocí formaldehydu. Poté je fixovaný chromatin štěpen restričními enzymy, poté jsou naštěpené konce ligovány. Následně je purifikována ligovaná DNA a interakce DNA je následně identifikována pomocí qPCR. Převzato a upraveno z (Davies *et al*, 2017)

1.1.1.5. Celogenomové varianty 3C metody

Klasická 3C metoda je schopná identifikovat s vysokou citlivostí pouze omezený počet lineárních interakcí, definovaný množstvím navržených primerů. Proto v současnosti probíhá stále vývoj sofistikovaných celogenomových variant 3C. Všechny tyto varianty využívají modifikovanou přípravu 3C knihovny založenou na fixaci, restričním štěpením a ligaci.

4C (Chromosome conformation capture-on-chip) metoda testuje interakci mezi jedním lokusem a všemi ostatními genomickými lokusy. Po restričním štěpení se interagující fragmenty cirkularizují a použijí k provedení inverzní PCR se specifickými primery k testované sekvenci (např. PP) a tím dochází k amplifikaci neznámé sekvence interagující k s testovanou sekvencí (Zhao *et al*, 2006).

Hi-C metoda vytváří kontaktní mapy mezi všemi částmi genomu. Oproti 3C obsahuje navíc inkorporaci biotinylovaných nukleotidů do konců restriktivně štěpených DNA fragmentů. Poté dochází k ligaci interagujících fragmentů, streptavidinové precipitaci interagujících biotinylovaných fragmentů a sekvenaci. Nevýhoda je malé rozlišení cca 2-5 kb. (van Berkum *et al*, 2010)

ChiA-Pet kombinuje 3C a chromatinovou imunoprecipitaci (ChIP). Po crosslinku chromatinu dochází k jeho fragmentaci. Poté je provedena chromatinová imunoprecipitace, která slouží k nabohacení DNA fragmentů, které jsou vázané proteinem našeho zájmu. Do 2 odlišných typů adaptorů jsou inkorporovány biotinylované nukleotidy. Tyto adaptory obsahují MmeI místo a jsou ligovány k DNA fragmentům. Opět dochází k ligaci, poté k restriktivnímu štěpení a k precipitaci magnetickými kuličkami potaženými streptavidinem. Následně dojde k purifikaci a sekvenování produktů (Li *et al*, 2014).

Capture – Hi-C je metoda, která obohacuje Hi-C knihovnu o fragmenty našeho zájmu pomocí biotinylovaných RNA průb navržených proti testovaným DNA regionům. Tyto fragmenty jsou poté precipitovány magnetickými kuličkami potaženými streptavidinem. (Hughes *et al*, 2014; Mifsud *et al*, 2015)

NG Capture- Hi-C je metoda, která oproti Capture Hi-C navíc vkládá krok sonikace 3C knihovny na 200 bp fragmenty, čímž se výrazně zvýší rozlišení této metody (Davies *et al*, 2015)

Promoter Capture-Hi-C slouží ke studiu interakce mezi promotorem a jinými regulačními oblastmi. Hi-C knihovna je obohacena precipitací s biotinylovanými průbami proti více jak 20 000 anotovaných myších promotorů (Schoenfelder *et al*, 2015).

Micro-C je adaptace Hi-C, která využívá mikrokokální nukleázu místo restriktivních enzymů k fragmentaci chromatinu. Tato metoda má vysoké rozlišení, je schopna rozlišit mezi jednotlivými nukleozomy, ale hodí se spíše pro analýzu menších genomů (Hsieh *et al*, 2015).

DNase Hi-C je stejná jako Hi-C metoda, ale pro fragmentaci chromatinu využívá DNázu I, což zvyšuje její rozlišení na 1 kb (Ramani *et al*, 2016).

Na konci všech zmíněných Hi-C modifikací je purifikace a následné sekvenování interagujících DNA fragmentů.

Obr. 8 a 9 zobrazuje grafickou analýzu a porovnání jednotlivých 3C metod.

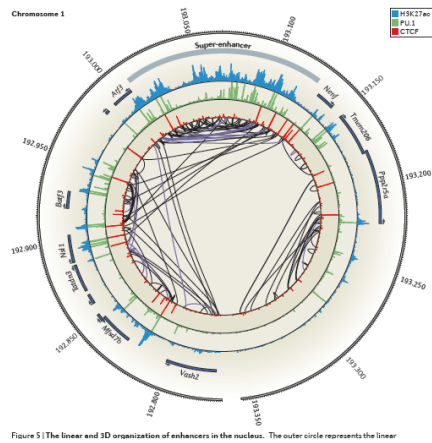
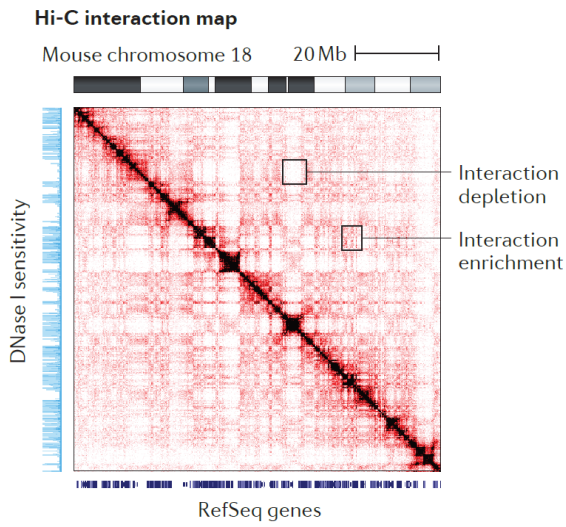
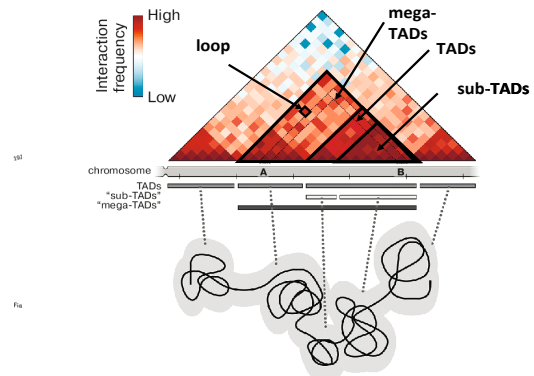
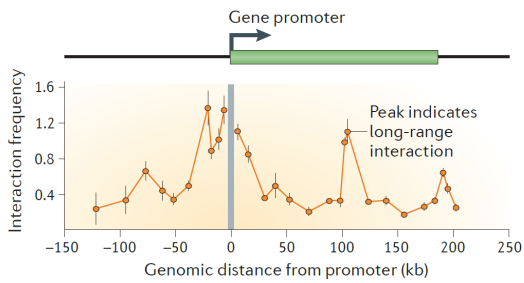
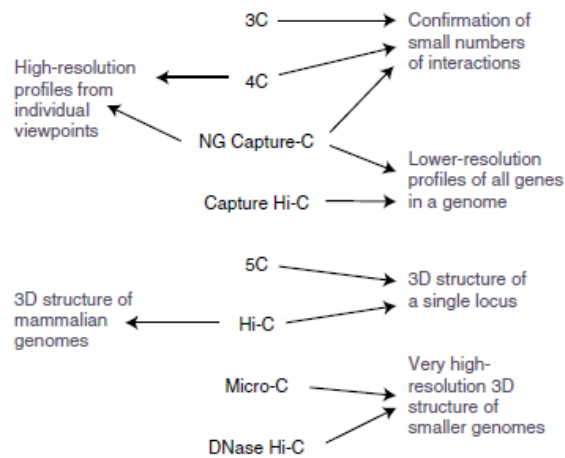


Figure 5 | The linear and 3D organization of enhancers in the nucleus. The outer circle represents the linear



Obr. 8 Horní dva panely: **Hi-C interakční mapa**, různá zobrazení, dolní panel vlevo: **4C graf**, dolní panel vpravo: fragment Hi-C mapy s vyznačením TAD a chromatinové smyčky. Převzato a upraveno z (Dekker *et al*, 2013; Razin & Gavrillov, 2018)



Obr. 9: Přehled chromosome conformation capture (3C) metod. Převzato z (Davies *et al*, 2017).

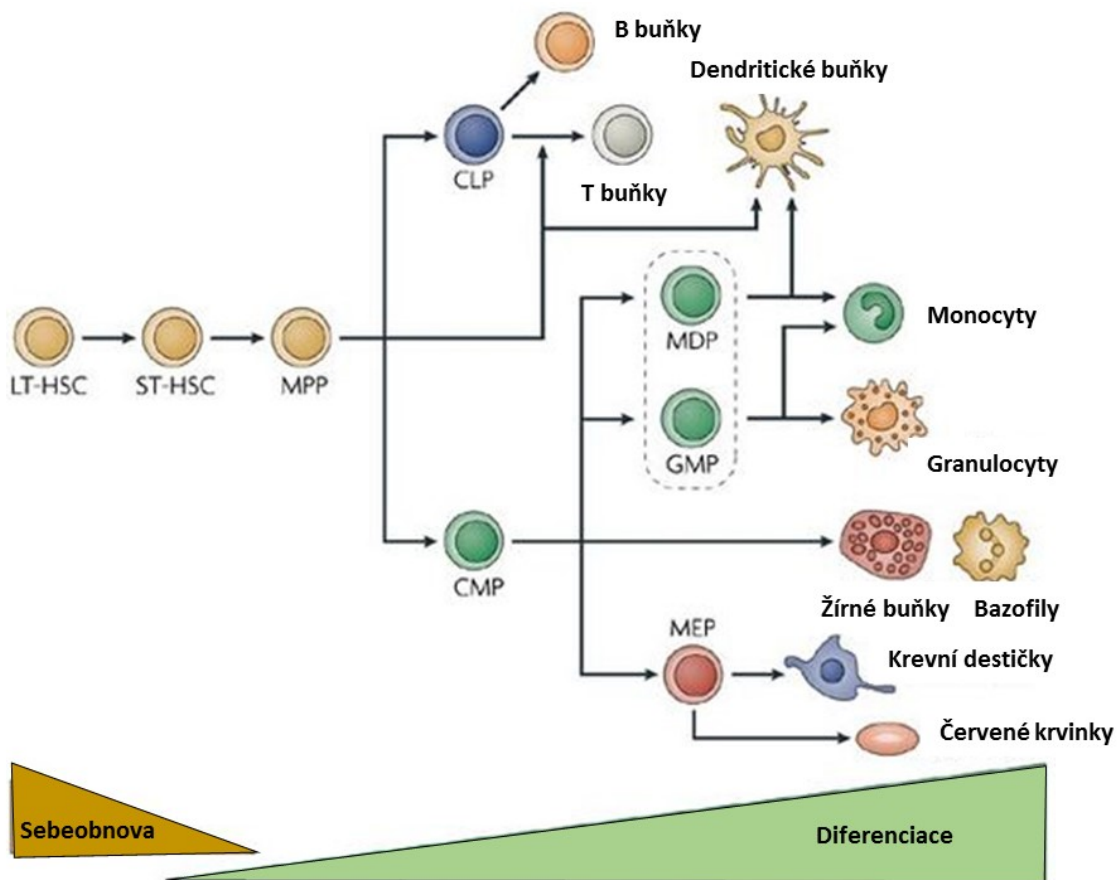
1.2. Krvetvorba

Krvetvorba je nepřetržitý, a přesně regulovaný proces, kdy hematopoetická kmenová buňka (HSC) prochází diferenciací za účelem vzniku liniově i funkčně odlišných krevních buněk. V embryu dochází ke krvetvorbě ve žlutkovém váčku, během vývoje dochází k přesunu krvetvorby do lymfatických uzlin, sleziny, jater a po dokončení vývoje kostní dřeně se většina krvetvorby přesouvá sem a později i do sekundárních lymfatických orgánů jako je brzlík (Hořejší *et al.*, 2009)

Hematopoetické kmenové buňky jsou schopny sebeobnovy a diferenciaci do všech krevních linií. Maturace hematopoetických kmenových buněk je spojena s dvěma základními procesy: ztrátou schopnosti sebeobnovy a postupnou specifickou diferenciací. Tyto procesy jsou řízeny kompetujícími genetickým programy. Pokud hematopoetické kmenová buňka začne diferenciovat, geny pro sebeobnovu jsou vypnuty (např. C-KIT, BMI-1), zatímco geny důležité pro diferenciaci jsou zapnuty (např. PU.1, IRF8) (Rosenbauer & Tenen, 2007). Vznik HSC z kmenových buněk mezodermy je zajištěn transkripčními faktory RUNX1 a SCL. U myši, které byli deficitní na tyto faktory, nedocházelo k hematopoéze (Okuda *et al.*, 1996; Shivdasani *et al.*, 1995).

Na základě exprese povrchových markerů a schopnosti sebeobnovy lze HSC rozdělit do odlišných subpopulací. Podle Weismanova modelu můžeme hematopoetické kmenové buňky rozdělit na dlouhodobé LT-HSC a z nich vznikající krátkodobé ST-HSC. LT-HSC (LIN⁻SCA1⁺KIT⁺FLT3⁻Thy1^{low}CD34⁻) jsou negativní pro liniově specifický antigen (LIN⁻), pozitivní SCA1 (SCA1⁺, stem cells asociated antigen) a KIT antigen (KIT⁺), negativní pro cytokinový receptor FLT3, na nízké úrovni exprimují Thy1 (Thy1^{low} – T-cell antigen) a neexprimují povrchový antigen CD34 (Kondo *et al.*, 2003; Weissman *et al.*, 2001; Adolfsson *et al.*, 2001; Osawa *et al.*, 1996). ST-HSC (LIN⁻SCA1⁺KIT⁺FLT3^{low}Thy1^{low}CD34⁺) mají nízkou úroveň exprese FLT3 a exprimují CD34. Jak LT-HSC tak ST-HSC jsou schopné diferenciaci do všech typů krevních buněk. Liší se v tom, že ST-HSC jsou schopny sebeobnovy po neomezenou dobu, ale u LT-HSC je tato doba zkrácena. Z ST-HSC vznikají multipotentní progenitory (MPP) (LIN⁻SCA1⁺KIT⁺FLT3⁺Thy1⁻CD34⁺), které ztrácí zcela schopnost sebeobnovy, ale jsou schopné diferenciovat do všech krevních buněčných linií (Morrison *et al.*, 1995). Za ztrátu schopnosti sebeobnovy je zodpovědný FLT3, který je exprimován v MPP (Adolfsson *et al.*, 2001). MPP diferencují buď na lymfoidní (CLP) nebo myeloidní (CMP) progenitor. Podle jiných autorů MPP nejdříve diferencují buď do erytroidní linie, z níž vznikají červené krvinky a krevní destičky nebo do myelo-lymfoidní

linie. Rozhodnutí, do jaké linie bude MPP diferenciovat je regulováno transkripčními faktory PU.1 a GATA-1, které se vzájemně inhibují. GATA-1 je důležitý pro vznik megakaryocyto/erytroidního progenitoru (MEP) naopak PU.1 pro vznik myelo/lymfoidního multipotentního progenitoru (MLPP) (Stopka *et al*, 2005). Z MLPP poté vzniká buď lymfoidní progenitor (CLP), z něhož vznikají T a B buňky, nebo myeloidní progenitor (CMP) z něhož vznikají všechny linie myeloidních buněk (Akashi *et al*, 2000; Kondo *et al*, 1997; Weissman *et al*, 2001) (Obr. 10).



Obr. 10: Schéma hematopoézy. Z LT-HSC postupně diferenciují ST-HSC a poté MPP. MPP diferenciují do CLP a CMP. Z CLP vznikají B a T buňky, z CMP vznikají monocyty, granulocyty žírné buňky, megakaryocyty a erytrocyty. Převzato a upraveno z (Rosenbauer & Tenen, 2007).

1.2.1. Myeloidní diferenceiace

Myeloidní progenitorové buňky diferencují do specifických progenitorů a to granulocyt/monocytových progenitorů (GMP), megakaryocyto/erytroidních progenitorů (MEP), progenitorů bazofilů a žírných buněk a progenitorů dendritických buněk (MDP) (Arinobu *et al*, 2005; Fogg D, Sibon C, Miled C, Jung S, Aucouturier, Dan R. Littman, Ana Cumano, 2006).

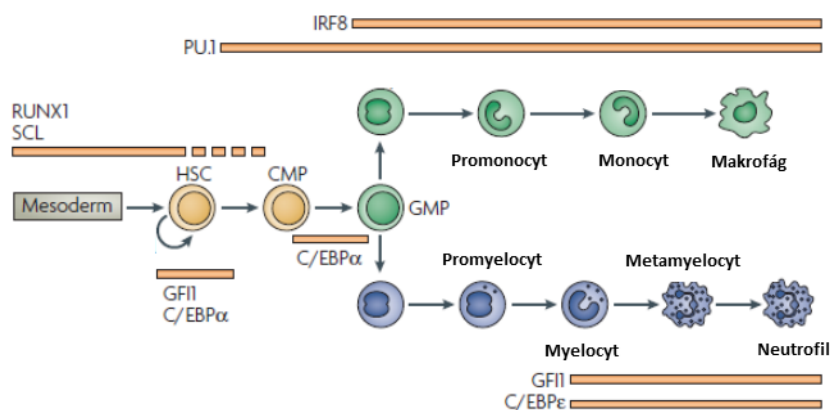
Makrofágy vznikají přeměnou z monocytů, které kolují v krvi a až po vstupu do tkání se přemění na makrofágy. Jejich základní funkcí je fagocytóza a společně s dendritickými buňkami patří mezi hlavní antigen prezentující buňky. Mezi další jejich funkce patří regulace zánětu, destrukce mikroorganismů, odstraňování mrtvých buněk. Makrofágy jsou charakterizovány expresí specifických genů zahrnující membránové receptory-např. CD14, CD11B, F4/80, CD68, CSF1R (Khazen *et al*, 2005).

Granulocyty se na základě výsledku Wrightova barvení dělí na tři druhy: neutrofilní, eozinofilní a bazofilní granulocyty. Neutrofilny jsou nejčastějším typem granulocytů v krvi (60-70%) a podílí se na opsonizaci a fagocytóze antigenu, neexprimují MHCII, tedy nejsou antigen prezentující buňky. Jejich granula obsahují antimikrobiální a cytotoxické proteiny, které se uvolňují při procesu degranulace a účastní se boje pro infekci. Tyto granula se rozdělují na primární, která obsahují např. myeloperoxidázu (MPO), neurofilní elastázu, katepsin G, sekundární, která obsahují např. lysozym, NADPH oxidázu a kolagenázu a terciální, která obsahují např. katepsin a matrix metaloproteinázu 9 (MMP9). Eozinofily se uplatňují v obraně proti mnohobuněčným parazitům, jejich cytoplazmatická granula obsahují peroxidázy, fosfatázy a bazické proteiny, které likvidují mnohobuněčné parazity. Jejich zastoupení v krvi je pouze 1-3 %. Bazofily se účastní alergických reakcí, jejich granula obsahují heparin a histamin a jejich výskyt v krvi je <2 % (Hořejší *et al.*, 2009). Diferenceiace HSC do dvou hlavních myeloidních linií, monocytární a neutrofilní, se účastní řada transkripčních faktorů a jejich deregulace hraje důležitou roli v leukemogenezi.

Mezi transkripční faktory, které řídí diferenceiaci myeloidních buněk patří-PU.1, CCAAT/enhancer (C/EBP α , C/EBP β a C/EBP ϵ), IRF8, RUNX1, SCL a GFI-1. Tyto transkripční faktory řídí expresi mnoha myeloidních genů, např. geny kódující receptory pro makrofágový faktor stimulující kolonie (M-CSF), faktor stimulující kolonie granulocytů (G-CSF) a faktor stimulující kolonie granulocytů / makrofágů (GM-CSF), dále geny kódující komponenty granul, jako například myeloperoxidáza (MPO), matrix metaloproteináza 9

(MMP9) nebo neutrofilní kolagenáza (NC). Tyto transkripční faktory navíc často aktivně potlačují geny, které jsou jinak normálně exprimovány v odlišných liniích (Tenen *et al*, 1997).

C/EBP α je důležitý pro vznik GMP z CMP, je exprimován v HSC, v myeloidních progenitorech a granulocytech a k jeho expresi nedochází v makrofázích (Zhang *et al*, 2004; Radomska *et al*, 1998). Další jeho rolí v hematopoéze je kontrola sebeobnovy HSC (Zhang *et al*, 2004). Zda budou z GMP vznikat granulocyty nebo makrofágy je zajištěno pomocí PU.1 a jeho vazebného partnera – interferon γ (IFN γ) responzivního transkripčního faktoru (IRF8). IRF8 je exprimován v GMP a makrofázích, ale k jeho expresi nedochází v granulocytech (Tamura *et al*, 2000). PU.1 je hlavní transkripční regulátor myeloidních a lymfoidních buněk, vazebné motivy pro PU.1 se nachází téměř ve všech regulačních oblastech myeloidně specifických a mnoha lymfoidně specifických genů (viz kapitola 1.2.1) (Tenen *et al*, 1997). GFI-1 a C/EBP ϵ transkripční faktory jsou důležité pro vývoj neutrofilů (Karsunky *et al*, 2002; Hock *et al*, 2003) (Obr. 11).

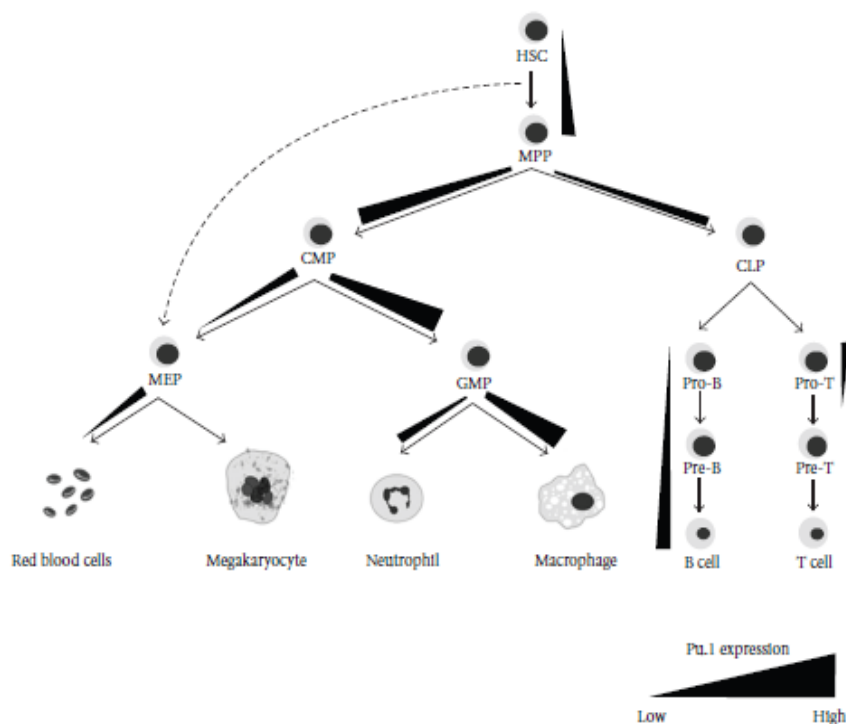


Obr. 11: Transkripční faktory během myeloidní diferenciace. RUNX1 a SCL transkripční faktory jsou důležité pro tvorbu HSC z mezodermu. Diferenciace HSC do dvou myeloidních linií a to monocytární a neutrofilní je zajištěna řadou transkripčních faktorů. C/EBP α je důležitý pro diferenciaci CMP do GMP a účastní se také sebeobnovy HSC. GFI-1 a C/EBP ϵ jsou důležité pro diferenciaci neutrofilů a GFI-1 se účastní také sebeobnovy HSC. Pro diferenciaci makrofágů je nezbytný PU.1 a IRF8. Převzato z (Rosenbauer & Tenen, 2007).

1.2.2. Koncentrace PU.1 v hematopoéze

Transkripční faktor PU.1 je členem Ets rodiny transkripčních faktorů a je nezbytným transkripčním faktorem kontrolující lymfoidní a myeloidní vývoj z hematopoetického progenitoru, ale je postradatelný pro vznik MEP. PU.1 deficientní myši umírají v pozdní

gestaci a jsou bez fetálních jaterních B lymfocytů, makrofágů a granulocytů (McKercher *et al*, 1996). Regulace prostřednictvím PU.1 nezávisí pouze na tom, zda je transkripční faktor exprimován, ale závisí také na tom, v jaké koncentraci je tento transkripční faktor exprimován. Exprese je nízká v HSC, jakmile vznikne MPP progenitor, který následně diferencuje na CLP nebo CMP, PU.1 exprese stoupá a jeho koncentrace jsou důležité pro rozhodnutí, jakým směrem bude diferenciace pokračovat (Iwasaki *et al*, 2005; Arinobu *et al*, 2007). Při diferenciaci a maturaci krevních buněk je PU.1 exprimován v různých koncentracích (Obr. 12), přičemž makrofágy exprimují vysoké koncentrace PU.1, granulocyty střední koncentrace PU.1 a B buňky nižší koncentrace PU.1. PU.1 není exprimován v T buňkách (s výjimkou některých pomocných T buněk typu Th2) a NK buňkách (Klemsz *et al*, 1990; Back *et al*, 2005; Chang *et al*, 2005; Nutt *et al*, 2005; Kamath *et al*, 2008). PU.1 reguluje celou řadu genů v myeloidní a lymfoidní linii zahrnující geny cytokinových receptorů např. geny pro M-CSFR, G-CSFR, GM-CSFRa a IL-7R (DeKoter *et al*, 2002).



Obr. 12: Schéma změny exprese PU.1 během hematopoézy. HSC-hematopoetická kmenová buňka, MPP-multipotentní progenitor, CMP-myeloidní progenitor, CLP-lymfoidní progenitor, MEP-megakaryocyto/erytroidní progenitor, GMP-granulocyto/makrofágový progenitor. Převzato z (Mak *et al*, 2011)

Makrofágy vykazují nejvyšší koncentrace PU.1, které řídí expresi genů podílejících se na diferenciaci a funkci makrofágů např. geny pro CD11B integrin, M-CSF a GM-CSF receptory. PU.1 zprostředkovaná diferenciaci makrofágů je závislá na indukcii exprese transkripčních regulátorů EGR1,2 (Early Growth Response1,2) a NAB-2 (NGFI-A Binding Protein 2), které pro svoji expresi vyžadují vysoké koncentrace PU.1. Transkripční faktor EGR2 a transkripční represor NAB-2 jsou důležité pro udržení makrofágového expresního programu, neboť tyto transkripční faktory reprimují GFI-1 (Growth Factor Independent-1), což je transkripční faktor nezbytný pro diferenciaci neutrofilů, a tudíž dochází k diferenciaci makrofágů (Laslo *et al*, 2006; Spooner *et al*, 2009).

Diferenciaci GMP progenitorů na granulocyty probíhá ve střední koncentraci PU.1, kdy nedochází k expresi EGR1,2. PU.1 koncentrace jsou zvýšeny u GFI-1 knockout myši (Spooner *et al*, 2009). Dalším specifickým transkripčním faktorem pro neutrofilů je C/EBP α . GFI-1 společně s C/EBP α negativně regulují PU.1 expresi, čímž reprimují makrofágový expresní program a indukují diferenciaci neutrofilů. GFI-1 je exprimován pouze ve střední koncentraci, protože nedochází k expresi EGR1,2 a NAB-2, které GFI-1 reprimují (Dahl *et al*, 2003).

Zda jsou ale rozdílné koncentrace exprese PU.1 příčinou (induktorem) diferenciaci hematopoetických progenitorů do různých krevních linií, nebo naopak pouze pasivním následkem liniové diferenciaci, není doposud známo.

2. Cíle diplomové práce

1. Hlavním cílem mé diplomové práce bylo vytvořit luciferázové reportérové konstrukty nesoucí regulační oblasti genu MPO a MMP9, které umožní studium regulace cílových genů PU.1 jeho rozdílnými koncentracemi.
2. Následným cílem je otestovat funkční aktivitu vytvořených MPO a MMP9 enhancerových reportérových konstruktů v průběhu diferenciaci PUER myeloidních progenitorů indukované různými koncentracemi transkripčního faktoru PU.1.

3. Materiál a metody

3.1. Materiál

3.1.1. Buněčné linie a bakteriální kmeny

3.1.1.1. Buněčné linie

- PUER progenitory – myeloidní progenitorové buňky izolované z PU.1^{-/-} myši stabilně transfekované PU.1-ER (PU.1 fúzované s ligand vazebnou doménou estrogenového receptoru) transgenem indukovatelným tamoxifenem.

3.1.1.2. Bakteriální kmeny

- *Escherichia coli* kmen DH5 α (Invitrogen, USA)
- MAX Efficiency™ DH5 α ™ Competent Cells (Thermo Scientific, USA)
- One Shot™ TOP10 Chemically Competent *E. coli* (Thermo Scientific, USA)

3.1.2. Kultivační média

3.1.2.1. Pevná média

- LB (Luria Bertani) agar (Sigma, USA)
kompletní médium: 35 g/l LB agar
100 μ g/ml ampicilin

3.1.2.2. Tekutá média

- LB (Luria Bertani) médium (Sigma, USA)
kompletní médium: 20 g/l LB médium
100 μ g/ml ampicilin
- S.O.C. médium (Invitrogen, USA)
- IMDM 1x (Iscove's Modified Dulbecco's medium) (Gibco, USA)
kompletní médium: 500 ml IMDM 1x
10 % FBS
100 μ g/ml penicilin/streptomycin

3.1.3. Použité vektory a expresní plasmidy

Luciferázové vektory použité pro klonování genově regulačních úseků (Tab. 1):

- pGL3-Basic (Promega, USA)
- pCluc- Basic2 (NEB, USA)

Luciferázové vektory použité pro normalizaci transfekce (Tab. 1):

- pRL (SV40) (Promega, USA)
- pCMV GLuc (NEB, USA)
- pNL 1.1.PGK (Promega, USA)

	luciferáza	promotor
pCluc Basic-2	Cypridinia	SV40
pGL3-Basic	Photinus pyralis	-
pRL	Renilla	SV40
pCMV GLuc	Gaussia	CMV
pNL 1.1.PGK	NanoLuc	PGK

Tab. 1: Použité vektory.

Expresní vektory:

- pCDNA3.1 (Invitrogen, USA)
- pGFP
- pMSCV-GFI1
- pCMV-PU.1
- pCB6-Egr2 (všechny poskytl P. Laslo, Institute of Molecular Medicine, St. James's University Hospital, Leeds UK)

3.1.4. Použité enzymy, pufrý a DNA markery

- Phusion Hot Start II DNA polymeráza (Thermo Scietnific, USA)
- 5x CG pufr (Thermo Scietnific, USA)
- T4 DNA ligáza (Thermo Scietnific, USA)
- T4 DNA ligační pufr (Thermo Scietnific, USA)
- MluI (Thermo Scietnific, USA)

- XhoI (Thermo Scientific, USA)
- PstI (Thermo Scientific, USA)
- KpnI (NEB, USA)
- SacI (NEB, USA)
- AgeI (NEB, USA)
- NgoMIV (NEB, USA)
- Trypsin (Gibco, USA)
- Purf R (Thermo Scientific, USA)
- 10x Cutsmart pufr (NEB, USA)
- GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder (Thermo Scientific, USA)
- GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific, USA)
- 6x nanášecí pufr pro elektroforézu DNA (Thermo Scientific, USA)
- 10x FastAP pufr (Thermo Scientific, USA)
- FastAP termosenzitivní alkalická fosfatáza (Thermo Scientific, USA)
- SapphireAmp FastPCR Mastermix (Takara Bio, USA)
- KLD enzyme mix (NEB, USA)

3.1.5. Komerčně dodávané kity

- Dual-Luciferase® Reporter Assay system (Promega, USA)
- BioLux® Gaussia Luciferase Assay Kit (NEB, USA)
- Nano-Glo® Luciferase Assay System (Promega, USA)
- BioLux® Cypridina Luciferase Assay Kit (NEB, USA)
- QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, BRD)
- JETQUICK Plasmid Miniprep Spin Kit (Genomed, BRD)
- QIAquick gel extraction kit (Qiagen, USA)

3.1.6. Seznam použitých přístrojů

- Nukleofektor (Amaxa, USA)
- Spektrofotometr NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologie, USA)
- Centrifugy: 5804 R (Eppendorf, BRD)
- 5810 R (Eppendorf, BRD)
- Stolní centrifuga Combi-spin PCV-2400 (Grant, Velká Británie)

- Magnetický míchač (VELP Scientifica, Itálie)
- Termoblok Thermomixer C (Eppendorf, BRD)
- PCR cyklér Master-cycler gradient (Eppendorf, BRD)
- Vortex Vortex – Genie 2 (Scientific Industries, USA)
- Analytické váhy: ALJ 220- 4NM (KERN, BRD)
- Aparatura pro DNA elektroforézu: mini HE 33 (Hofer, USA)
- Zdroj napětí PowerPac TM Basic (BIO-RAD, USA)
- Transiluminátor T2202 (Sigma, USA)
- CO₂ inkubátor IGO 150 CO₂ incubator (Jouan, Francie)
- Laminární box MSC 12 (Jouan, Francie)
- Optický mikroskop eclipse TS100 (Nikon, Japonsko)
- Fluorescenční mikroskop DP70 (OLYMPUS, Japonsko)
- Sterilizátor Sterilab (BMT Medical Technology, Česká republika)
- Inkubátor s integrovanou třepačkou (Gallenkamp, UK)
- Luminometr (GloMax, USA)

3.1.7. Seznam použitých chemikálií

- 6x nanášecí pufr pro elektroforézu DNA (Thermo Scientific, USA)
- Agaróza I (Amresco, USA)
- Ampicilin (Amresco, USA)
- Ethidium bromid (Amresco, USA)
- Ethylalkohol (Penta, Česká republika)
- Fetální bovinní sérum (FBS) (Gibco, USA)
- Pasivní lyzační pufr (Promega, USA)
- PBS pH 7.4 10x (Gibco, USA)
- Penicilin/streptomycin (Gibco, USA)
- TE pufr (10mM Tris, 1mM EDTA, pH 8)
- TBE – Tris-hydrochlorid (Amresco, USA)
 - EDTA (Amresco, USA)
 - kyselina boritá (Amresco, USA)
- 5M betain (Thermo Scientific, USA)

3.2. Metody

3.2.1. Práce s buněčnými liniemi

Buňky byly pěstovány v níže uvedených kompletních médiích obsahujících 10 % FBS a 100 µg/ml penicilin/streptomycin (Gibco):

PUER – IMDM, suplementované interleukinem IL-3 a čerstvým glutaminem (25 µl/ 10 ml).

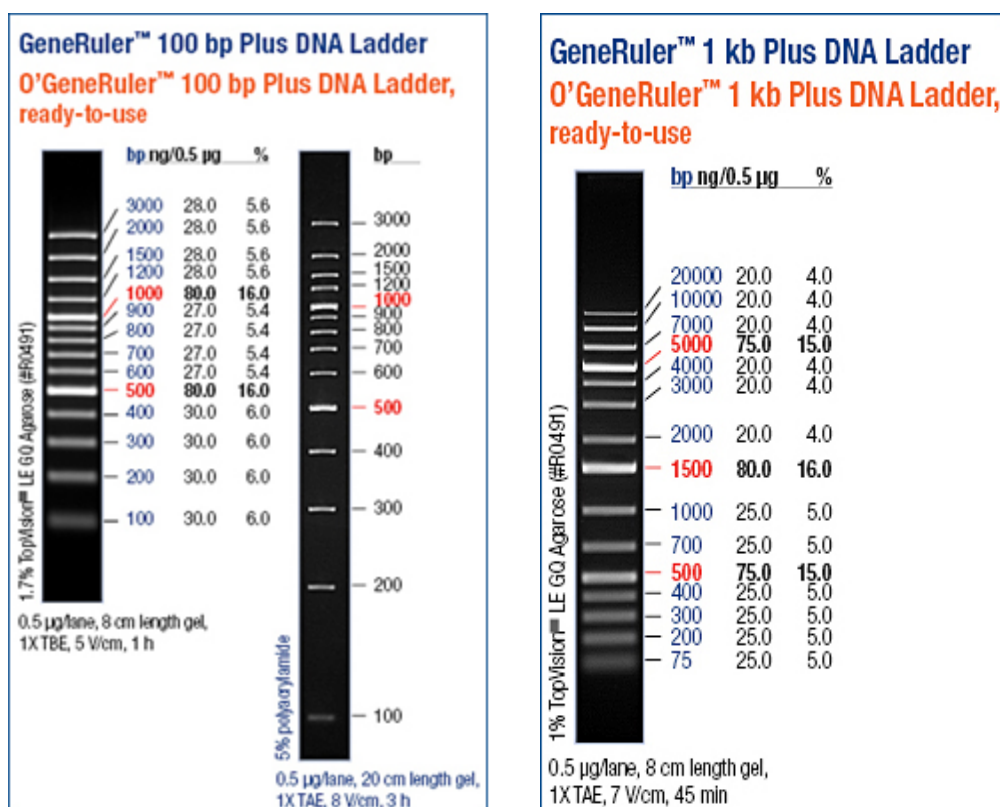
Buňky byly kultivovány v 37°C v 5 % CO₂ inkubátoru. Veškeré manipulace s nimi byly prováděny podle standardních protokolů.

3.2.2. Metody použité k přípravě luciferázových konstruktů nesoucích úseky regulační oblasti genů MPO a MMP9

3.2.2.1. DNA elektroforéza v agarózovém gelu

Materiál

- Agaróza (Amresco, USA)
- TBE pufr
- ethidium bromid (Thermo Scietnific, USA)
- 6x nanášecí pufr pro elektroforézu DNA (Thermo Scietnific, USA)
- marker GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder, GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Scietnific, USA) (Obr. 13)



Obr. 13: Markery používané pro DNA elektroforézu v agarózovém gelu.

Postup

- Podle velikosti analyzovaných fragmentů zvolíme koncentraci agarózového gelu.
- Do 50 ml TBE pufru přidáme navážené množství agarózy a zahříváme, dokud není agaróza úplně rozpuštěna.
- Do rozpuštěného gelu přimícháme 2-5 µl ethidium bromidu.
- Gel nalijeme do připravené vaničky s hřebínkem a necháme ztuhnout.
- Vyjmeme hřebínek a gel vložíme do elektroforetické aparatury s TBE pufrům.
- Vzorky na analýzu smícháme s nanášecím pufrům pro elektroforézu DNA a nanese na gel, nakonec přidáme marker.
- Elektroforetickou aparaturu zapneme a nastavíme napětí 70- 80 V.
- Po skončení elektroforézy vyjmeme gel z aparatury a zdokumentujeme přítomnost DNA pod UV lampou.

3.2.2.2. Příprava fragmentů regulačních oblastí genů MPO a MMP9

Amplifikace fragmentů regulačních oblastí genů MPO a MMP9

Materiál

- templátová DNA (genomická DNA izolovaná z myši)
- Phusion Hot Start II DNA polymeráza (Thermo Scientific, USA)
- 5x CG pufr (Thermo Scientific, USA)
- 2,5mM směs dNTPs
- 50mM MgCl₂ (Thermo Scientific, USA)
- 10mM primery (Tab. 2 a Tab. 3)
- 5M betain (Thermo Scientific, USA)
- DMSO

Postup

- Na ledu namícháme následující reakční směs.

5x CG pufr	10 µl
Phusion Hot Start DNA polymeráza	0,275µl
2,5mM dNTP	4 µl
10mM forward primer	2,5 µl
10mM reverse primer	2,5 µl
5M betain	10 µl
DMSO	1 µl
50mM MgCl ₂	0,2 µl
templátová DNA	150-300 ng
H ₂ O	doplnit do 50 µl

- Reakční směs v PCR zkumavkách vložíme do termocykléru (Master-cycler gradient, Eppendorf).

- Na termocykléru nastavíme následující program:

	teplota	čas	počet cyklů
počáteční denaturace	98 °C	3 min	1
denaturace	98 °C	10 s	35
annealing	64–69 °C*	30 s	
elongace	72 °C	30 s/ 1 kb	
finální elongace	72 °C	10 min	1

* MMP9 Enh 2; 7; 9; 11 a MPO enhancery 66 °C, 30 s

MMP9 Enh 4, 6, 8, 10, 11, 12 66 °C 20 s

MMP9 Enh 3 61 °C 20 s

MMP9 Enh 5 69 °C, 20 s

MMP9 Enh 1 64 °C, 20 s

- Přítomnost PCR produktů ověříme pomocí gelové elektroforézy.

Amplifikace Enh 0 genu MMP9 pomocí GC-RICH PCR systému

Materiál

- templátová DNA (genomická DNA izolovaná z myši)
- GC-RICH PCR Systém (Roche, Německo)
- 10mM směs dNTPs
- 10mM primery (Tab. 3)

Postup

- Na ledu namícháme následující reakční směs.

5x GC- RICH pufr	4 µl
GC- RICH polymeráza	0,8 µl
GC-RICH rozlišovací roztok	4 ul
10mM dNTP	0,2 µl
10mM mix forward a reverse primeru	0,8 µl
25mM MgCl ₂	0,2 µl
templátová DNA	2 ul
H ₂ O	doplnit do 20 µl

- Reakční směs v PCR zkumavkách vložíme do termocykléru (Master-cycler gradient, Eppendorf).

- Na termocykléru nastavíme následující program:

	teplota	čas	počet cyklů
počáteční denaturace	95 °C	3 min	1
denaturace	95 °C	30 s	10
annealing	61 °C	30 s	
elongace	72 °C	1 min	
denaturace	95 °C	30 s	24
annealing	61 °C	30 s	
elongace	72 °C	1 min	
finální elongace	67 °C	10 min	1

Primery:

Primery pro MPO klonování

Název	sekvence
MPO PP MluI -191 F	GAT <u>ACGCGT</u> CCAGGACCCTTCTTCCTGAGAAGCC
MPO PP MluI -353 F	GAT <u>ACGCGT</u> CCTTCCTAACAGACAAGCCCTGGGC
MPO PP MluI -615 F	GAT <u>ACGCGT</u> TCTCCTGAGTCTGGGATCTGTTCCC
MPO TSS XhoI +12 R	GAT <u>CTCGAG</u> GGCTACGCTACTCCCCATAACTTCTCAG
MPO Enh1 MLU1 -3668 F	GAT <u>ACGCGT</u> TCTGGCGCGAAGACTCAGTAACTATCC
MPO Enh1 MLU1 -3701 F	GAT <u>ACGCGT</u> GCAGTTAGCTCCTGAGGCCCTGAGTG
MPO Enh1 MLU1 -4663 F	GAT <u>ACGCGT</u> GTCTTCTAAGCACTGGCATCATAGGTGC
MPO Enh1 Pau Xho-3256R	GAT <u>CTCGAG</u> GCGCGCGGCCCTCTGAGAACTGGGACATCTGA
MPO Enh1.4 XHO-PauI-3572R	GAT <u>CTCGAG</u> GCGCGCCAGTTGGAATTAGAGGTGTTGGGGTCC
MPO Enh1 MLU1 - 4653 F	GAT <u>ACGCGT</u> GCAGTGGCATCATAGGTGCATCATTCTATG
MPO Enh1 MLU1-3421 F	GAT <u>ACGCGT</u> GGATGGTTGTAGTCTGGTGTAGGGTATTCC
MPO Enh1 MLU1-3350 F	GAT <u>ACGCGT</u> GTACCCTTCAGGGATGTTCCCTGG
MPO Enh2 MLU1 -14342 F	GAT <u>ACGCGT</u> CCAAGAAGCACCACTCATCAGGAC
MPO Enh2 XHO-PauI -14045 R	GAT <u>GCGCGC</u> CTCGAGCCCAGGCAGAAGCAGAAGCAGAAG
MPO Enh3 MLU1 -16799 F	GAT <u>ACGCGT</u> CCTCCTGCCATAGCCTTCTGAGTATTAGG
MPO Enh3 XHO-PauI-16428 R	GAT <u>GCGCGC</u> CTCGAGCACCACTTAGGATTGGACCCAGGC

Tab. 2: Primery použité pro amplifikaci úseků MPO genu. Název primeru obsahuje název genu, název enhanceru, přidaná restrikční místa, pozici od transkripčního startu a zda se jedná o reverse (R) nebo forward (F) primer. Restrikční místa jsou vyznačena podtržením.

Primery pro MMP9 klonování

název	sekvence
MMP9 PP -642 F Kpn AgeF	GATGGTACCACCGGIGTGCTAGCCTGAGAAGGATGAAGCTTCT
MMP9 PP +49 R Sac R	GATGAGCTCCAGGGACTCATGGTGAGGACCGCAG
MMP9 Enh0 KpnI AgeI +12173 F	GATGGTACCACCGGATGCTTTCTGGGACCCCTTCTCTCG
MMP9 Enh0 NgoMIV +12923 R	GATGCCGGCCAAGTCCTTGGGGCCGCACTACTG
MMP9 Enh1 KpnAgeXba +4319 F	GATGGTACCACCGGTTCTAGACCACGGTTGGCCCTACAGGCGCC
MMP9 Enh1 SacNgoXba+5084 R	GATGAGCTCGCCGGCTCTAGACCAGCACGGTCTTGCCTGTGTACACC
MMP9 Enh2 KpnI AgeI - 5552 F	GATGGTACCACCGGTTGGAGTATGTCTCCCTCACATCCTGCC
MMP9 Enh2 NgoMIV - 4693 R	GATGCCGGCAGTTCAGCAGAGGCCAGGACTTGG
MMP9 Enh2 NgoMIV - 4954 R2	GATGCCGGCTGCTGCTGGTTCTTTCTTACCAACTGCG
MMP9 Enh3 KpnI AgeI - 9726 F	GATGGTACCACCGGICTCAGCTTCGACTCGGTCTCAGCAG
MMP9 Enh3 NgoMIV - 8995 R	GATGCCGGCCGGTGGCGCACACCGTTAATCCCAGTG
MMP9 Enh3 NgoMIV - 8741 R2	GATGCCGGCCTGGGATTAACGGTGTGCGCCAC
MMP9 Enh4 KpnI AgeI - 12360 F	GATGGTACCACCGGIGCTGAAGCTCTAGGACCGTGGTTCT
MMP9 Enh4 NgoMIV - 11562 R	GATGCCGGCTCCTGGGTTTCTTCTGAGACCCTGT
MMP9 Enh5 KpnI AgeI - 15036 F	GATGGTACCACCGGICTGGCTGCAAAGCTTAACCTGAAGAGC
MMP9 Enh5 NgoMIV - 14190 R	GATGCCGGCTTGCCACTTTCACCAGAGCCTTAGC
MMP9 Enh6 KpnI AgeI - 20144 F	GATGGTACCACCGGTTGTCTATCTGGGGCTTGAGGATGGC
MMP9 Enh6 NgoMIV - 19477 R	GATGCCGGCAGTGAGCACAGCGCCTACTGAGAG
MMP9 Enh7 KpnI AgeI - 21461 F	GATGGTACCACCGGICTTGCCAGGATCTGAACCTCCAATGC
MMP9 Enh7 NgoMIV - 20781 R	GATGCCGGCGTTAGAGGCCAGCCTTGGCTACACAG
MMP9 Enh8 KpnI AgeI - 22410 F	GATGGTACCACCGGIGTCTGTCTGGGTTGCCTTGCATACAC
MMP9 Enh8 NgoMIV - 21716 R	GATGCCGGCCGAGGCAGAAGACAGAGATGAAGCCA
MMP9 Enh9 KpnI AgeI - 23866 F	GATGGTACCACCGGTAGCAGGCCTCTGAACCTGGGTGATAG
MMP9 Enh9 NgoMIV - 23230 R	GATGCCGGCAGGGGAGGCATTAGGTCCTCTGGAG
MMP9 Enh10 KpnI AgeI - 31473 F	GATGGTACCACCGGICAGTGCTAAGGCCCGAGATGAGCTA
MMP9 Enh10 NgoMIV -30887 R	GATGCCGGCCCAAATCCTACAGCCTCAGGAGCCA
MMP9 Enh11 KpnI AgeI - 34705 F	GATGGTACCACCGGTCCTAACCAGGGGACAGGATTCCAGA
MMP9 Enh11 NgoMIV - 34197 R	GATGCCGGCGGGAGGTAGAGGCAGGAGTATTCGG
MMP9 Enh11.2 KpnI AgeI - 36871 F	GATGGTACCACCGGTTTGTGGCGGCGCTGGGTTTC
MMP9 Enh11.2 NgoMIV - 36281 R	GATGCCGGCTCCCAGGTCGCGACGGTTCTCTAAG
MMP9 Enh12 KpnI AgeI - 38687 F	GATGGTACCACCGGICCCACCCACCCACATTTACAGCCTTAC
MMP9 Enh12 NgoMIV - 37993 R	GATGCCGGCTGAGCAGGTTACCCAGGTTCTAGCC

Tab. 3: Primery použité pro amplifikaci úseků MMP9 genu. Název primerů obsahuje název genu, název enhanceru, přidaná restriční místa, pozici primeru od transkripčního startu a zda se jedná o reverse (R) nebo forward (F) primer. Restriční místa jsou vyznačená podtržením.

Purifikace fragmentů regulačních oblastí genů MPO a MMP9

Materiál

- QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Německo)
- Amplifikované fragmenty regulačních oblastí genů MPO a MMP9

Postup

- K amplifikovaným fragmentům přidáme 5 V PB pufru, zamícháme a vzorek přepipetujeme do 2 ml sběrné zkumavky. Centrifugujeme 17 000 x g, akcelerace 3, 3 min.
- Vzorek promyjeme 0,75 ml PE pufru a centrifugujeme 17 000 x g 30 s, abychom se zbavili veškerého ethanolu. Vyměníme sběrnou zkumavku a centrifugujeme znova 2 min na maximální otáčky centrifugy.
- Kolonku přendáme do čisté 1,5 ml mikrozukavky a na střed filtru kolonky přidáme 40 µl EB pufru přehřátého na 65 °C. Centrifugujeme 17 000 x g, 1 min.
- Koncentraci a čistotu purifikované DNA stanovíme pomocí NanoDropu (Thermo Scientific, USA).

Štěpení fragmentů regulačních oblastí genu MPO

Materiál

- purifikované fragmenty regulační oblasti MPO genu
- restrikční enzymy MluI, XhoI, PvuII (Thermo Scientific, USA)
- 10x pufr R (Thermo Scientific, USA)

Štěpení fragmentů PP1, PP2, PP3

Postup:

- Napipetujeme restrikční reakci do 0,5 ml mikrozukavky dle návodu.

10x pufr R	6 µl
MluI	1,5 µl
XhoI	1,5 µl
DNA	50 µl

- Necháme štěpit v 37 °C, 2 hod.

Štěpení fragmentů E1.1, E1.2, E1.3, E1.4, E2, E3, E23

Postup

- Napipetujeme restriční reakci do 0,5 ml mikrozkušavky dle návodu.

10x pufr R	6 µl
MluI	0,4 µl
Paul	0,4 µl
DNA	50 µl

- Necháme štěpit v 37 °C, 2 hod.

Štěpení fragmentů regulačních oblastí genů MMP9

Materiál

- purifikované fragmenty regulační oblasti MMP9 genu
- restriční enzymy SacI, AgeI, KpnI, NgoMIV (Thermo Scientific, USA), (NEB, USA)
- 10x pufr R (Thermo Scientific, USA), 10x Cutsmart pufr (NEB, USA)

Štěpení fragmentu PP

Postup

- Napipetujeme restriční reakci do 0,5 ml mikrozkušavky dle návodu.

10x CutSmart buffer	10 µl
KpnI-HF	2 µl
SacI-HF	2 µl
DNA	50 µl

- Necháme štěpit v 37 °C, 2 hodiny.

Štěpení fragmentů E0, E1.1, E1.2, E2.2, E3.1, E3.2, E4, E6, E7, E8, E9, E10, E11, E12

Postup

- Napipetujeme restriční reakci do 0,5 ml mikrozkušavky dle návodu.

10x CutSmart buffer	10 µl
KpnI-HF	1,5 µl
NgoMIV	2 µl
DNA	50 µl

- Necháme štěpit v 37°C, 2 hodiny.

Štěpení fragmentu E2.1

- Napipetujeme restriční reakci do 0,5 ml mikrozkušavky dle návodu.

10x CutSmart buffer	10 μ l
AgeI-HF	0,3 μ l
NgoMIV	0,5 μ l
DNA	50 μ l

- Necháme štěpit v 37 °C, 2 hodiny.

Štěpení fragmentů E11.2

- Napipetujeme restriční reakci do 0,5 ml mikrozkušavky dle návodu.

10x CutSmart pufr	10 μ l
NgoMIV	2 μ l
DNA	50 μ l

- Necháme štěpit v 37 °C, 2 hodiny.

Purifikace štěpených fragmentů regulačních oblastí genů MPO a MMP9

Materiál

- QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Německo)
- štěpené fragmenty regulačních oblastí genů MPO a MMP9

Postup

- Fragmenty purifikujeme pomocí kitu QIAquick PCR Purification Kit. Postup popsán v kapitole Purifikace fragmentů regulačních oblastí genů MPO a MMP9.

3.2.2.3. Příprava vektorů pGl3-Basic a pCluc-Basic 2

Štěpení a defosforylace konců vektoru pGl3-basic

Materiál

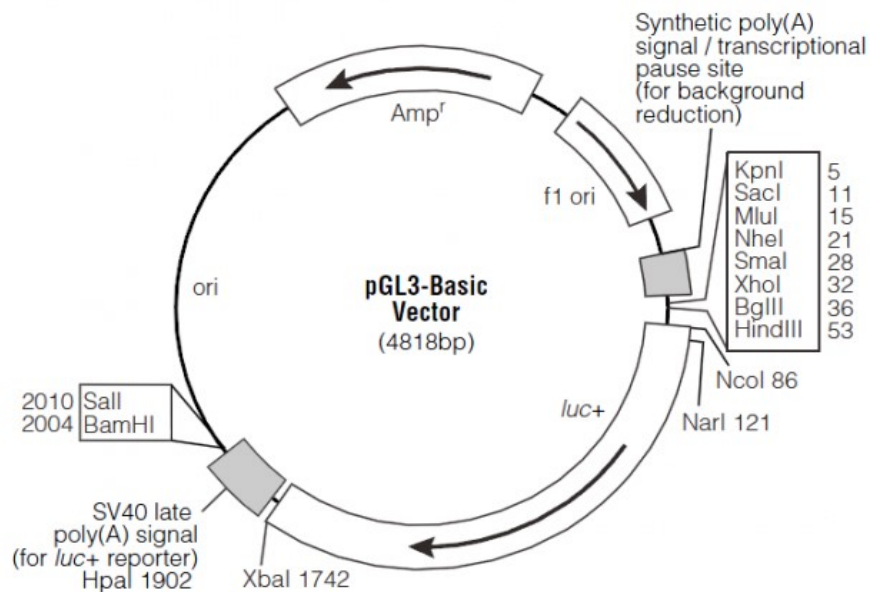
- vektor pGl3-Basic (Promega, USA) (Obr. 14)
- restrikční enzymy MluI, XhoI (Thermo Scientific, USA)
- 10x pufr R (Thermo Scientific, USA)
- FastAP termosenzitivní alkalická fosfatáza (Thermo Scientific, USA)
- 10x FastAP pufr (Thermo Scientific, USA)

Postup

- Napipetujeme restrikční reakci do 0,5 ml mikrozkušavky dle návodu.

10x pufr R	8 μ l
MluI	6 μ l
XhoI	6 μ l
pGl3 basic	100 μ g

- Necháme štěpit v 37 °C, 4 hod.



Obr. 14: Schéma pGL3-Basic vektoru: V MCS restrikční místa MluI a XhoI, která byla použita pro štěpení vektoru při klonování.

- Přidáme 10x FastAP pufr a FastAP alkalickou fosfatázou do restrikční směsi. Množství fosfatázy volíme podle množství DNA v restrikční směsi.
- Defosforylujeme v 37 °C, 60 min.

Štěpení a defosforylace konců vektoru pCluc-Basic 2

Materiál

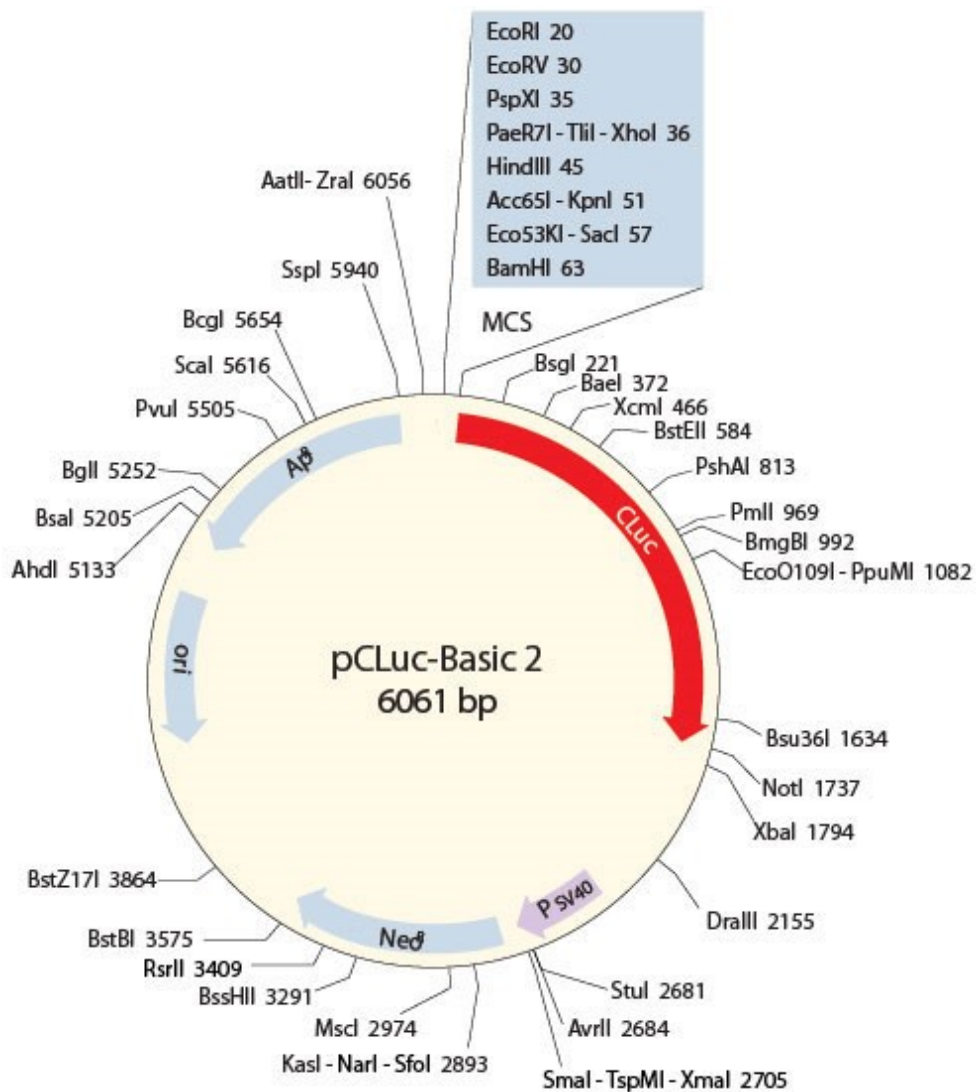
- vektor pCluc-Basic 2 (Neb, USA) (Obr. 15)
- restrikční enzymy KpnI, SacI (NEB, USA)
- 10x CutSmart pufr (NEB, USA)
- FastAP termosenzitivní alkalická fosfatáza (Thermo Scientific, USA)
- 10x FastAP pufr

Postup

- Napipetujeme restrikční reakci do 1,5 ml mikrozkušavky dle návodu.

10x CutSmart pufr	8 μ l
KpnI-HF	4 μ l
SacI-HF	4 μ l
pCluc Basic-2	50 μ g

- Necháme štěpit v 37 °C, 4 hodiny.



Obr. 15: Schéma pCluc-Basic 2 vektoru: V MCS restrikční místa KpnI a SacI, která byla použita pro štěpení vektoru při klonování.

- Fosforylaci vektoru provádíme stejně jako u vektoru pG13-Basic.

3.2.2.4. Purifikace vektoru pGI3-Basic a pCluc-Basic 2 z gelu

Materiál

- štěpený vektor pGI3-Basic a pCluc-Basic 2
- agarozový gel
- 6x nanášecí pufr pro elektroforézu DNA (Thermo Scientific, USA)
- QIAquick gel extraction kit (Qiagen, Německo)

Postup

- Před odlitím gelu vyčistíme vaničku a hřebínek ethanolem. Vyměníme TBE pufr v elektroforetické aparatuře.
- Vektory nanese na 0,7 % gel. Použijeme 25 µg vektoru smíchaného s nanášecím pufr pro elektroforézu DNA a vodou. Elektroforéza pustíme na nízké napětí (40 V), aby byly DNA proužky ostré. Elektroforéza běžela cca 6 hodin, aby došlo k oddělení štěpeného a neštěpeného vektoru. Proužek odpovídající štěpenému vektoru vyřízneme z gelu. Při vyřezávání dáme pod gel western blotová skla, abychom zabránili mutacím DNA způsobených UV zářením. Vektor z gelu izolujeme pomocí kitu QIAquick gel extraction kit. Nejprve vyříznutý gel zvážíme a přidáme 3 V QG pufru. Inkubujeme v 50 °C, dokud se gel úplně nerozpustí, vortexujeme každé 3 minuty.
- Směs přeneseme na kolonku a centrifugujeme 17 000 x g, 3 min. Přidáme 500 µl QG pufru a znova centrifugujeme 17 000 x g, 1 min.
- Poté kolonku promyjeme 750 µl PE pufru a centrifugujeme 17 000 x g, 1 min.
- Kolonku převedeme do 1,5 ml čisté mikrozkuhavky a na střed filtru kolonky napipetujeme 20 µl PE pufru. Necháme 1 min stát a centrifugujeme 17 000 x g, 1 min.
- Koncentraci a čistotu vektoru změříme na Nanodropu.

2.2.2.5. Ligace vektoru a fragmentů regulačních oblastí genů MPO a MMP9

Materiál

- štěpený vektor, purifikované fragmenty regulační oblasti MPO a MMP9 (Tab. 4)
- T4 DNA ligáza, T4 DNA ligační pufr (Thermo Scietnific, USA)
- cyklér (Master-cycler gradient; Eppendorf)

Postup

- Napipetujeme ligační reakci dle návodu.

T4 DNA ligační pufr	1,5 µl
T4 DNA ligáza	0,4 µl
vektor	100 ng
inzert	x ng

- Purifikovaný štěpený vektor a inzerty byly ligovány v poměru 1:1 -1:10. s ohledem na délku inzertu.
- Ligaci provádíme v termotermocykléru dle následujícího programu:

teplota	čas
22 °C	1 hod
16 °C	3 hod

vektor	inzert
pGl3	PP.1
	PP.2
	PP.3
	E2
	E3
	E23

vektor	inzert
pGl3PP3	E1.1
	E1.2
	E1.3
	E1.4
	E1.4 short
	E2
	E3
	E23

vektor	inzert
pGl3PP3E1.3	E2
	E3
	E23

vektor	inzert
pClucPP	E1.1
	E1.2
	E2.1
	E2.2
	E3.1
	E3.2
	E4
	E6
	E7
	E8
	E9
	E10
	E11
	E11.2
E12	

vektor	inzert
pClucPPE2.2	E1.1
	E1.2
	E2.1
	E2.2
	E3.1
	E3.2
	E4
	E6
	E7
	E8
	E9
	E10
	E11
	E11.2
E12	

Tab. 4: Přehled vektorů a inzertů při ligaci.

3.2.2.6. Transformace luciferázových konstruktů do DH5 α kompetentních bakterií

Materiál

- DH5 α bakterie (Invitrogen, USA) One Shot™ TOP10 Chemically Competent *E.coli* (Thermo Scientific, USA)
- luciferázové konstrukty získané ligací
- S.O.C. médium (Thermo Scientific, USA)
- LB pevné médium (Sigma, USA)
- agarové plotny s ampicilinovou rezistencí

Postup

- Bakterie necháme na ledu roztát, promícháme je špičkou a do 1,5 ml mikroskopické pipetovací kuličky napipetujeme 50 μ l bakterií.
- Poté k bakteriím přidáme 1-5 μ l (1-10 ng DNA) ligační směsi, promícháme opatrně špičkou a inkubujeme na ledu 30 min.
- Provedeme teplotní šok 42 °C, 35 s.
- Inkubujeme na ledu 2 min.
- Přidáme 250 μ l S.O.C. media předehřátého na 37 °C.
- Třepeme 1,5 hodiny v 37 °C, 225 rpm
- Různé koncentrace transformační směsi nanášíme na plotny s LB agarem a ampicilinem, přes noc inkubujeme v 37°C.
- Přítomnost luciferázových konstruktů v narostlých koloniích ověříme pomocí PCR z bakteriálních kolonií.

3.2.2.7. Ověření pozitivních kolonií pomocí PCR z bakteriálních kolonií

Materiál

- SapphireAmp FastPCR Mastermix (Takara Bio, USA)
- 10mM primery
- plotny s narostlými koloniemi

Postup

- Napipetujeme reakci na PCR dle návodu.

2x Sapphire Amp FastPCR Mastermix	7,5 µl
Forward primer	0,4 µl
Reverse primer	0,4 µl
DNA	-
H ₂ O	6,7 µl
Celkem	15 µl

- Bakteriální kolonie vypíchneme pomocí špičky a vypláchneme je v připraveném v mixu.
- Reakční směs v PCR zkumavkách vložíme do termocykléru a nastavíme následující program:

	Teplota	Čas	Počet cyklů
počáteční denaturace	94 °C	1 min	1
denaturace annealing elongace	98 °C	5 s	35 cyklů
	62 °C	5 s	
	72 °C	20 s	
finální elongace	72 °C	10 min	1

- Přítomnost fragmentů zdokumentujeme pomocí gelové elektroforézy.

3.2.2.8. Izolace plasmidové DNA

Materiál

- JETQUICK Plasmid Miniprep Spin Kit (Genomed, BRD)
- pozitivní kolonie bakterií
- LB médium (Sigma, USA)

Postup

- Bakterie pro izolaci plasmidové DNA kultivujeme v LB médiu v třepačce přes noc, 37 °C (cca 16 hod.), 220 rpm.
- Narostlé bakterie centrifugujeme 6 000 x g, 10 min.
- Peletu bakterií resuspendujeme v 250 µl G1 pufru, do kterého byla přidána RNáza A.
- K bakteriím přidáme 250 µl lyzačního G2 pufru. Promícháme, nevortexujeme. Necháme stát 5 min.

- Přidáme 350 μ l neutralizačního G3 pufru. Promícháme, nevortexujeme. Centrifugujeme 16 000 x g, 4 min.
- Kolonku s filtrem umístíme do sběrné zkumavky. Na kolonku přepipetujeme supernatant. Centrifugujeme 17 000 x g, akcelerace 3, 3 min,.
- Promyjeme 500 μ l G4 pufru. Centrifugujeme 16 000 x g, 1 min. Zopakujeme ještě jednou a centrifugujeme na maximální otáčky.
- Kolonku s filtrem přendáme do čisté 1,5 ml mikrozkušavky. Na střed filtru kolonky napipetujeme 30-50 μ l předem přehřátého (65 °C) elučního pufru. Centrifugujeme 17 000 x g, 3 min.
- Koncentraci a čistotu změříme na Nanodropu.

3.2.2.9. Restrikční ověření luciferázových konstruktů

Materiál

- restrikční enzymy MluI, XhoI, SacI (NEB, USA), (Thermo Scientific, USA)
- 10x CutSmart pufr (NEB, USA)
- 10x pufr R (Thermo Scientific, USA)
- luciferázové konstrukty

Postup

- Napipetujeme restrikční reakci dle návodu.

MPO luciferázové konstrukty	
H ₂ O	16 μ l
Pufr R	2 μ l
DNA, 300 ng/ μ l	1 μ l
MluI	0,5 μ l
XhoI	0,5 μ l
Celkem	20 μ l

MMP9 luciferázové konstrukty	
H ₂ O	16,65 μ l
CutSmart buffer	2 μ l
DNA	300 ng
XhoI	0,1 μ l
SacI	0,25 μ l
Celkem	20 μ l

- Luciferázové konstrukty necháme štěpit v 37 °C, 1 hod.
- Přítomnost fragmentu zdokumentujeme na gelu.

3.2.2.10. Zamražení bakteriální kultury

Materiál

- pozitivní bakteriální klony
- glycerol

Postup

- Použijeme 500 μ l bakteriální kultury ke které přidáme 500 μ l 50 % glycerolu.
- Bakteriální kultury skladujeme v -80 °C.

3.2.3. Metody použité k mutagenезi (záměně) vazebných míst PU.1

Inverzní PCR

Materiál

- templátová DNA (vektory: pG13PP3, pG13PP3E1.3, pG13PP3E1.3E2, pClucPPE2.2, pClucPPE2.2E6)
- Q5 DNA polymeráza (NEB, USA)
- 5x Q5 pufr (NEB, USA)
- 2,5mM směs dNTPs
- 50mM MgCl₂ (Thermo Scientific, USA)
- 10mM primery (Tab. 5)

Název primeru	Sekvence
1MPO PP3 /CD14 BSex F	aagaattcagTTTGTCCCGAGCCTGGAG
2MPO PP3 /CD14 BSex R	cctgttttcgTCAGGCAGAGAAGGACCC
3MPO PPE1/CD14 no Egr2 BSex F	gaagaattcaTGTGTGTACGGTGGATGG
4MPO PPE1 no Egr2 BSex R	ctgttttcgTACTGAGCTCTCCCAAACAC
5MPO PP E1 with Egr2 BS F	gaagaattcaGTGGATGGTTGTAGTCTGGT
6MPO PP E1 with Egr2 BS R	ctgttttcgCTACTGAGCTCTCCCAAACac
7MPO PP E3/CD14 BS ex F	gaagaattcaGAAGCAGGTTGCTGGCAA
8MPO PP E3/CD14 BS ex R	ctgttttcgTTCTTCCTGGATGTCTGATAAGtc
11MMP9 E2 ChIP peak BS ex F	gaagaattcaGGGATGTGGTAACCAGAAC
12MMP9 E2 ChIP peak BS ex R	ctgttttcgCTAACACCACAACAGAGTTTAGc
13MMP9 E6 /CD14 BS ex F	gaagaattcaCTATGCCTGCACGTCTGC
14MMP9 E6 /CD14 BS ex R	ctgttttcgTTTACATCCAGATCCGCAGtc
15MPO PP3 /CD14 Enh BSex F	tttccatttctctcctcctaacaTTTGTCCCGAGCCTGGAG
16MPO PP3 /CD14 Enh BSex R	gcaattagagttcacagagggaaggggTCAGGCAGAGAAGGACCC
5.1 MPOPPE1 wit Egr2BSlong F	gaagaattcaATGGTTGTAGTCTGGTGTAGGG
9MMP9 E2 composite BSex F	caacgaagtgttttaggaaggacgaaaacaggaattcaGTTGGTGAGCAGGGTGTATGTG
10MMP9 E2 composite BSex R	caatattactagaagtgagtagggctgttaggaggaagagaagtgCCCCTAACACCACAACAGAGTTTAG
11.1MMP9 E2 peak longBS ex F	gaagaattcaGCTGTGTTGAAAACCAAGCTTC
11.2MMP9 E2peak CD14e1 BSex F	tcctaacagcGCTGTGTTGAAAACCAAGCTTC
12.2MMP9 E2 peak CD14e1BSex R	ggaagagaaatCTAACACCACAACAGAGTTTAGct
13.2MMP9 E6 /CD14e1 BS ex F	tcctaacagcCTATGCCTGCACGTCTGC
14.2MMP9 E6 /CD14e1 BS ex R	ggaagagaaatTTTACATCCAGATCCGCAGtc
17MPO PP3/CD14EnhshortBSex F	tcctaacagcTTTGTCCCGAGCCTGGAG
18MPO PP3/CD14EnhshortBSex R	ggaagagaaatTCAGGCAGAGAAGGACCC

Tab. 5: Primery pro záměnu vazebných míst PU.1 v regulačních oblastech genu MPO a MMP9.

Název primeru obsahuje název vektoru, kde bude provedena záměna vazebného místa a název inzertu, jež se bude vkládat. Malá písmena označují nekomplementární část primeru, která obsahuje sekvenci vkládaného inzertu. Velká písmena v sekvenci primeru značí komplementární část primeru k vektoru, v němž dochází k záměně vazebného místa.

Postup

- Na ledu namícháme následující reakční směs.

5x Q5 pufr	10 µl
2,5mM dNTP	4 µl
10mM forward primer	2,5 µl
10mM reverse primer	2,5 µl
50mM MgCl ₂	0,2 µl
templátová DNA	10 ng
Q5 polymeráza	0,2 µl
H ₂ O	15,53 µl

- Reakční směs v PCR zkumavkách vložíme do termocykléru a nastavíme následující program:

	teplota	čas	počet cyklů
počáteční denaturace	98 °C	3 min	1
denaturace	98 °C	10 s	26
annealing	64 °C	30 s	
elongace	72 °C	360 s (40 s / 1 kb)	
finální elongace	72 °C	10 min	1

- Přítomnost PCR produktů ověříme pomocí gelové elektroforézy.

KLD reakce-Kináza, Ligáza, DpnI

Materiál

- PCR produkty se záměnou vazebných míst PU.1
- KLD enzymový mix (NEB, USA)
- One Shot™ TOP10 Chemically Competent *E.coli* (Thermo Scientific, USA)

Postup

- Namícháme následující reakční směs.

PCR produkt	0,5 µl
2X KLD reakční pufr	2,5 µl
10X KLD enzymový mix	0,5 µl
H ₂ O	1,5 µl

- Inkubujeme 5 min v 25 °C. Poté transformujeme do bakterií (viz kap. 2.2.2.6).

3.2.4. Transfekce DNA

3.2.4.2. DNA transfekce do PUER myeloidních progenitorů

Materiál

- plasmidová DNA, pRL vektor, pGFP vektor, pNL1.1.PGK vektor, PCMV GLuc vektor
- PUER buňky
- IMDM médium (Gibco, USA)
- 12 jamková destička
- Nukleofektor (Amaxa, USA)
- Transfekce probíhá ve sterilním laminárním boxu.

Postup

- Napěstujeme si s týdenním předstihem buňky.
- Připravíme transfekční směs DNA pro každou transfekci obsahující vždy jeden MPO a jeden MMP9 reportér (0,5 µg), pRL a pNL prázdné luc vektory (0,05 a 0,01 µg) a pGFP (0,05 µg) v celkovém objemu 10 µl. pRL, pNL a pGFP jsou pipetovány ze společného mastermixu, dobře vortexovaného.
- Připravíme si 12 jamkovou destičku. Na každou jamku napipetujeme 1,5 ml média a předehejeme v 37°C.
- Stočíme buňky 300 x g, 5 min, 4°C. Na jednu transfekci potřebujeme přibližně 2-4 x 10⁶ buněk. Odstraníme supernatant a peletu resuspendujeme v 90 µl nukleofektorového roztoku vynásobeného počtem transfekcí a necháme na ledu.
- Pipetujeme 90 µl suspenze buněk do 10 µl DNA směsi, promícháme a přeneseme do transfekční kyvety předchlazené na ledu.
- Kyvetu zazátkujeme a vložíme do nukleofektoru a aktivujeme program X-01.
- Po skončení programu obsah kyvety přidáme do 1,5 ml předehejtého média v připravené destičce.
- Po 4-8 hodinách, rozdělíme objem jamek na třetiny a přepipetujeme celkem do třech destiček.

- Buňky rozdělíme do třech sad destiček s 500 μ l kompletního média s 0; 0,5 a 5 μ M tamoxifenem.

3.2.4.3. Sklizení buněk

Materiál

- buňky PUER vyseté na 12 jamkovou destičku
- PBS (Gibco, USA)
- pasivní lyzační roztok (DLRA, Promega)

Postup

Kontrolní buňky a buňky stimulované 0,5 μ M tamoxifenem

- Kontrolní buňky sklízíme 48 h po transfekci a buňky diferencované 0,5 μ M tamoxifenem sklízíme 72–84 h po transfekci
- Odsajeme supernatant z buněk do zkumavek.
- Přidáme 0,5 ml PBS.
- Centrifugujeme 6 min, 400 x g. Odsajeme supernatant, znovu centrifugujeme a odsajeme zbylý supernatant.
- Přidáme 70 μ l pasivního lyzačního roztoku.
- Zamrazíme buňky v -80 °C.

Buňky stimulované 2,5 μ M tamoxifenem

- Buňky stimulované 2,5 μ M tamoxifenem sklízíme 72–84 h po transfekci.
- Suspenzní buňky sklízíme stejně jako kontrolní buňky.
- Přisedlé buňky promyjeme PBS, přidáme 90 μ l pasivního lyzačního roztoku a buňky seškrábeme pomocí stěrky. Převedeme do 1,5 ml mikrozkušavky a měříme luciferázovou aktivitu.

3.2.4.4. Stanovení luciferázové aktivity

Materiál

- lyzát transfekovaných buněk
- luminometr GloMax (Promega, USA)
- BioLux® Cypridina Luciferase Assay Kit (Promega, USA)
- Nano-Glo® Dual-Luciferase® Reporter Assay System (Promega, USA)
- Dual-Luciferase® Reporter Assay System (Promega, USA)

Postup

- Nejdříve jsme každý injektor luminometru promyli 70 % ethanolem a destilovanou vodou (2x).
- Do každého injektoru jsme poté dali substrát. Podle počtu vzorku jsme připravili potřebné množství substrátu. Na jeden vzorek jsme použili 50 μ l substrátu.
- Poté jsme odebrali 10 μ l lyzátu do 1,5 ml mikrozkuřavky, vložili do luminometru a změřili luciferázovou aktivitu. Substrát byl k lyzátu přidán automaticky. Měřili jsme v následujícím pořadí: Firefly, Cypridinia, NanoLuc, Gaussia.

3.2.4. Statistické vyhodnocení

Statistické vyhodnocení bylo provedeno v programu GraphPadPrism 5, pomocí Anova Tukey-HSD test (Obr. 30 a 31). Symbol hvězdiček představuje dosaženou hladinu významnosti (p-value). Pro označení dosažené hladiny významnosti bylo použito označení:

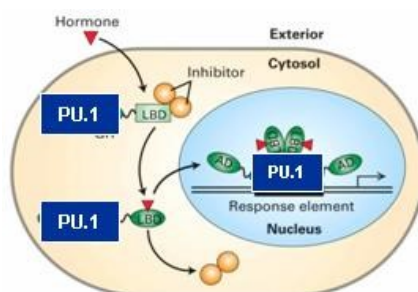
* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$.

Hodnoty dat v grafech jsou vyjádřeny jako průměr hodnot 2 - 5ti biologických replikátů + směrodatná odchylka.

4. Výsledky

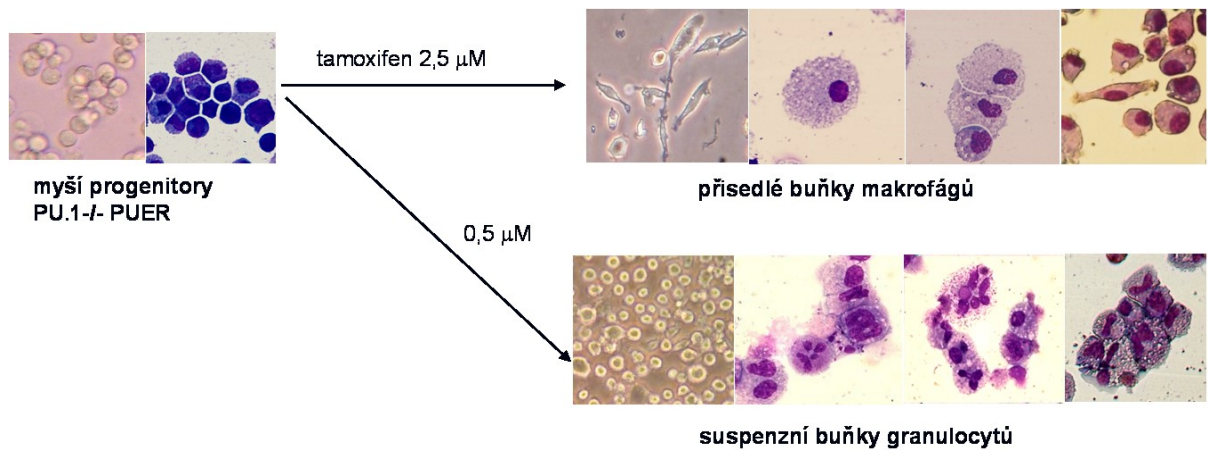
4.1. Buněčný systém – model myeloidní diference

Pro studium mechanismů, jak různé koncentrace transkripčního faktoru PU.1 regulují hematopoetickou diferenciaci, jsme použili transgenní myši myeloidní progenitory, které umožňují regulovatelnou expresi PU.1. Tyto myeloidní progenitory byly izolovány z fetálních jater PU.1^{-/-} myši (Walsh *et al*, 2002) a následně stabilně transfekovány transgenem kódujícím fúzní gen PU.1 s ligand vazebnou doménou estrogenového receptoru (ER), citlivou na analog estrogenu tamoxifen (PU.1^{-/-} PU.1 ER, PUER buňky) (Obr. 16). PUER transgen umožňuje přesnou kontrolu aktivity PU.1 v závislosti na koncentraci PU.1 induktoru tamoxifenu (tax). V nepřítomnosti tamoxifenu zůstává PUER transgen inaktivní v cytoplasmě a PUER buňky zůstávají blokovány ve stádiu prolifерujících myeloidních progenitorů. Po přidání tamoxifenu je PUER transgen aktivován translokací do jádra (tím že ligand tamoxifen vazbou na ligand vazebnou doménu vytěsňuje inhibitor blokující nukleární lokalizační signál (NLS)), kde PU.1 již může fungovat jako transkripční faktor a aktivovat cílové geny (Obr. 16). Aktivace PUER transgenu vede k zástavě buněčného cyklu a diferenciaci.



Obr. 16: Schéma aktivace PU.1-ER transgenu. Po navázání tamoxifenu na ligand vazebnou doménu PU.1–ER transgenu dojde k odmaskování NLS a transportu do jádra. Upraveno z (Lodish *et al.*, 2013).

Předešlá studia v naší laboratoři ukázala, že vysoká koncentrace PU.1 (2,5 μM tax) indukuje diferenciaci PUER progenitorů do přisedlých makrofágů, charakterizovaných velkou vakuolovou cytoplazmou (Pospisil *et al*, 2011). Je zajímavé, že střední koncentrace PU.1 (0,5 μM tax) indukovala diferenciaci PUER progenitorů do suspenzních buněk granulocytů, charakterizovaných segmentovanými jádry (Obr. 17).



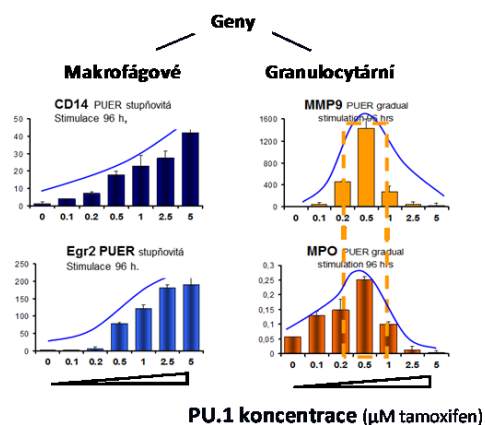
Obr. 17: PU.1 v závislosti na koncentraci indukuje diferenciaci makrofágů nebo granulocytů. PUER progenitorové buňky byly stimulovány zvyšující se koncentrací tamoxifenu po dobu 96 hodin. Fázový kontrast a cytospin obarvený Wright – Giemsa, Romanowski. Zvětšení 400x

Analýza mRNA genové exprese PUER progenitorů indukovaných vzrůstajícími koncentracemi PU.1 (0,1 - 5 µM tax) ukázala, že makrofágové geny (jako např. CD14, F4/80, CSF1R, EGR2) byly postupně indukovány při zvyšování koncentrace PU.1. Překvapivě specifické geny pro granulocyty, jako např. matrix metaloproteináza 9 (MMP9), myeloperoxidáza (MPO) nebo neutrofilní kolagenáza (NC), byly aktivovány výhradně při středních koncentracích PU.1 (Obr. 18).

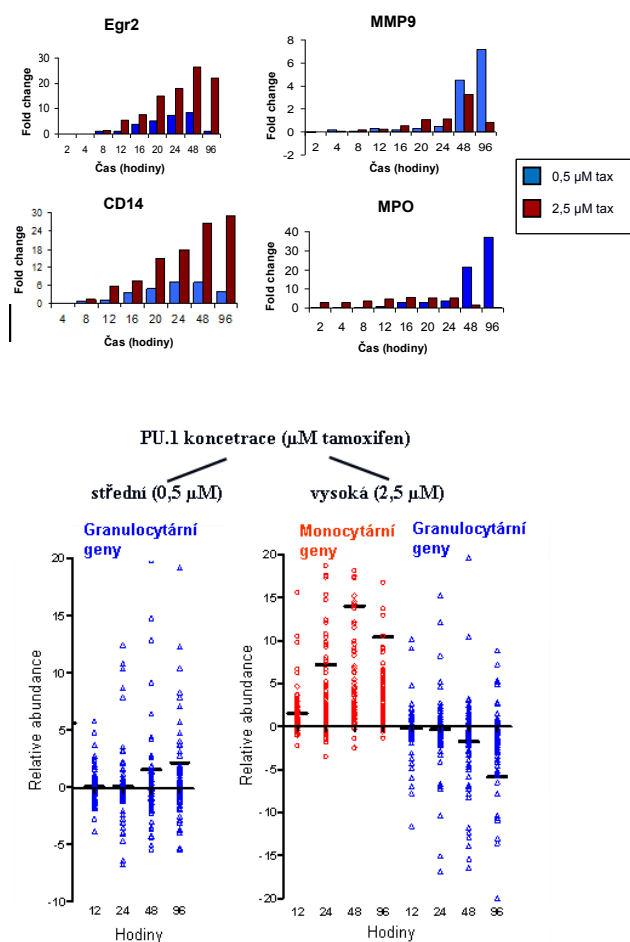
Časová analýza diferenciaci PUER progenitorů v 8 časových bodech (2-96 hodin) a třech PU.1 koncentracích (0; 0,5 a 2,5 µM tax) ukázala, že zatím co většina makrofágových genů (např. CD14, F4/80, CSF1R, EGR2) byla časnými cíli PU.1 (aktivace již po 8mi hod), tak granulocytární geny byly pozdními cíli PU.1 a jejich exprese byla indukována mezi 48 a 96 hodinami od začátku PU.1 aktivace (Obr. 19).

Jakými genově regulačními mechanismy je zajištěno, že granulocytární geny jsou aktivovány exkluzivně ve střední koncentraci PU.1, zatímco vysokou koncentrací PU.1 jsou reprimovány, je velmi zajímavá biologická otázka, k jejímuž zodpovězení se snaží přispět i tato diplomová práce.

Uvedená charakterizace diferenciaci PUER progenitorové myeloidní linie vznikla před mým příchodem do laboratoře a stala se základem, na který navazovala moje práce.



Obr. 18: Zvyšující se koncentrace PU.1 v PUER buňkách aktivují makrofágové nebo granulocytární geny. PUER buňky byly stimulovány vzrůstající koncentrací tamoxifenu (tax, 0-5 μM, X-osa) po dobu 2-96 hodin a mRNA exprese byla měřena pomocí qPCR.



Obr. 19: Analýza genové exprese granulocytárních a makrofágových genů. PUER progenitory byly diferenciovány 0,5 μM a 2,5 μM tax po dobu 2-96 hodin. mRNA exprese vybraných genů byla analyzována pomocí mRNA array (Affymetrix).

4.2. Tvorba luciferázových vektorů nesoucích regulační oblasti MPO a MMP9 umožňujících studium jejich regulace rozdílnými koncentracemi PU.1

4.2.1. In silico analýza regulačních oblastí genů MPO a MMP9

Pro studium mechanismů, jak regulační sekvence genů vnímají a odpovídají na odlišné koncentrace PU.1, které indukují diferenciaci do odlišných krevních linií, jsme nejdříve provedli komplexní srovnávací analýzu regulačních sekvencí (+ -100 kb) dvou vybraných genů (MMP9 a MPO), aktivovaných výhradně ve středních koncentracích PU.1 (vedoucí ke granulocytární diferenciaci), ale ne ve vysokých koncentracích PU.1 (indukujících makrofágovou diferenciaci).

K analýze regulačních sekvencí jsme použili UCSC prohlížeč genomu (<https://genome.ucsc.edu/s>) s využitím vlastních a veřejně dostupných dat z ChIP-seq analýz transkripčního faktoru PU.1 při diferenciaci PUER progenitorů v různých časových bodech (0, 1, 6, 12, 48 h) a dále vazby PU.1 v myších makrofázích, granulocytech a B buňkách. GFI-1 byl dalším transkripčním faktorem, u kterého jsme analyzovali ChIP-seq v granulocytech. Dále jsme analyzovali charakteristiky typické pro enhancery jako jsou: hypersenzitivní místa k DNázeI (DHS) v granulocytech, specifické histonové modifikace (např. H3K4me1 (v PUER buňkách), H3K4me3 v granulocytech), H3K27ac (v granulocytech)), vazbu hraničního faktoru CTCF (v granulocytech) a fylogenetickou konzervaci lokusu. Zároveň jsme využili dostupné analýzy transkripce enhancerových RNA, typických pro aktivní enhancery (FANTOM CAGE databáze). Analýza je zobrazena v Obr. 20.

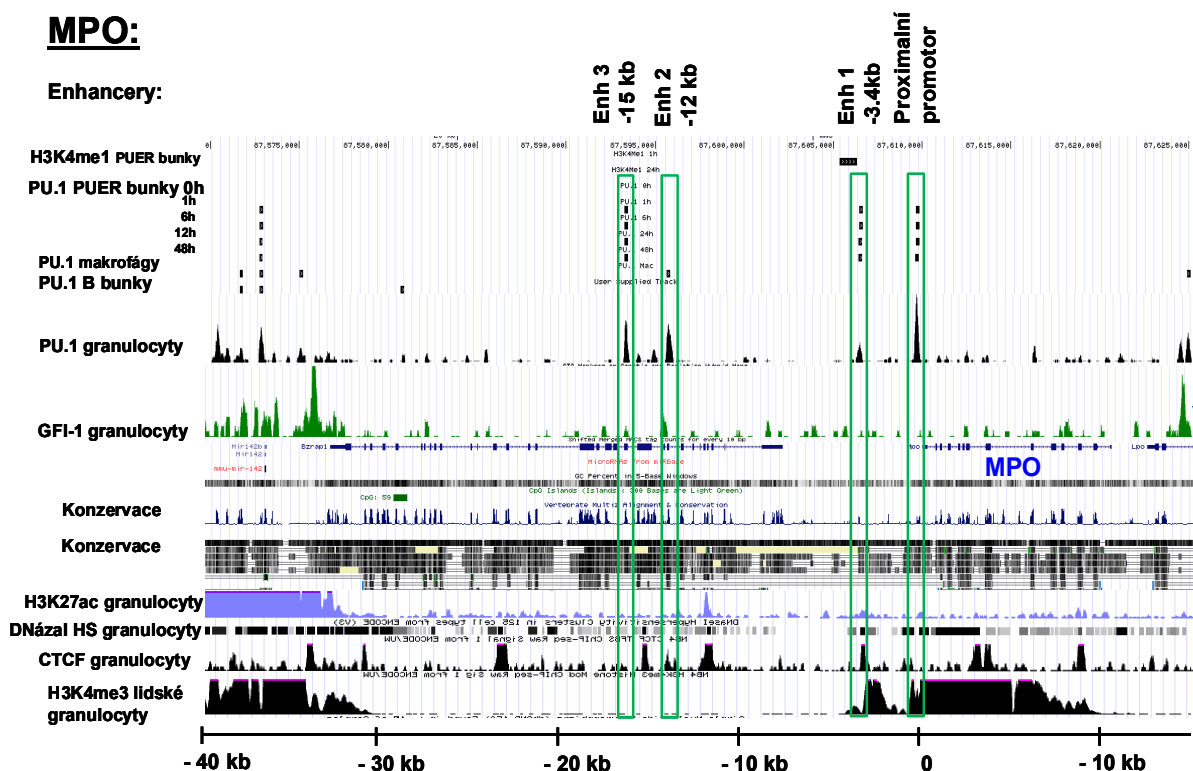
Dále jsme pomocí programů Jaspar (<http://jaspar.genereg.net/>) a MatInspector (<https://www.genomatix.de/>) analyzovali podrobné složení nalezených regulačních sekvencí a predikci vazeb potenciálních kooperujících transkripčních faktorů. Predikci vazeb TFs jsme zkombinovali s ChIP-seq identifikovanými vazbami TFs PU.1 a GFI-1 v testovaných enhancerech. Soustředili jsme se na identifikaci nabohacení vazeb kooperujících transkripčních faktorů v těsné blízkosti PU.1 vazeb (+/- 100 bp). Příklad takové analýzy vybraných enhancerů je v Obr. 21. Uvedené analýzy byly prováděny ve spolupráci s mým školitelem a postdoktorálním spolupracovníkem Pavlem Krsmanovicem PhD.

Syntéza uvedených analýz vedla k identifikaci 14 potenciálních enhancerů v lokusu genu MMP9, nacházejících se v oblasti mezi -40 až +10 kb a majících vlastnosti superenhanceru, a dále k identifikaci 4 enhancerů genu MPO, nacházejících se v oblasti -20

až 0 kb (ve vztahu k TSS). Informace z uvedených analýz byly dále využity pro individuální posouzení a přesný návrh sekvencí (návrh primerů) pro testování nalezených enhancerů a jejich delečních variant neobsahujících vybraná vazebná místa TFs. Aby byl dostatečně zachován kontext a chromatinová struktura testovaných sekvencí, mají navržené fragmenty genově regulačních oblastí délku 400- 1500 bp.

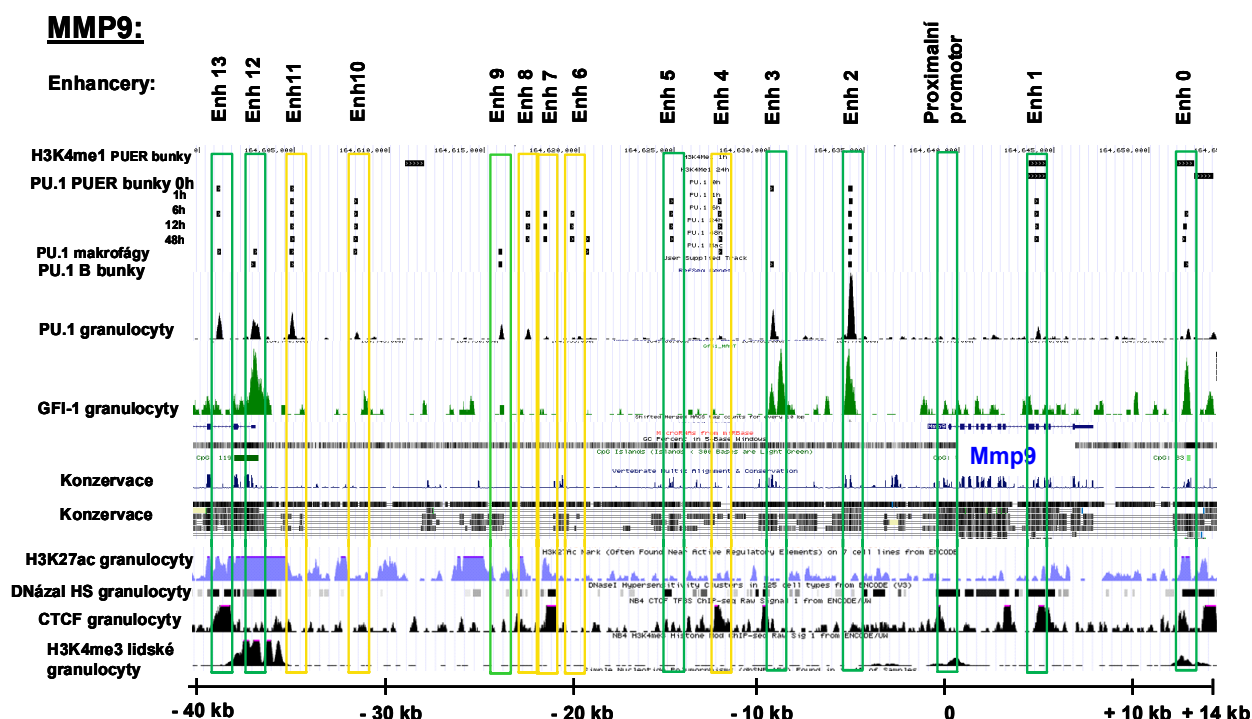
MPO:

Enhancery:



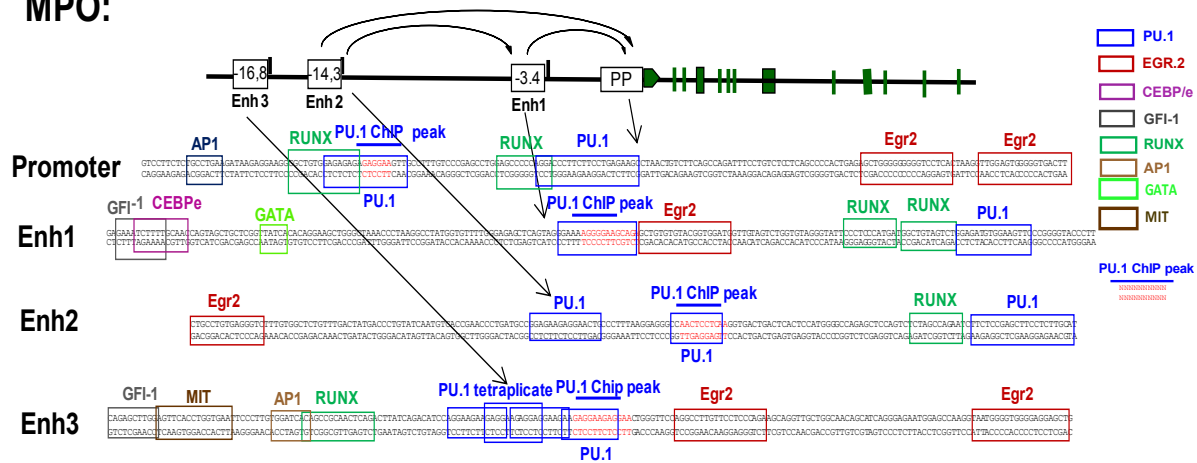
MMP9:

Enhancery:

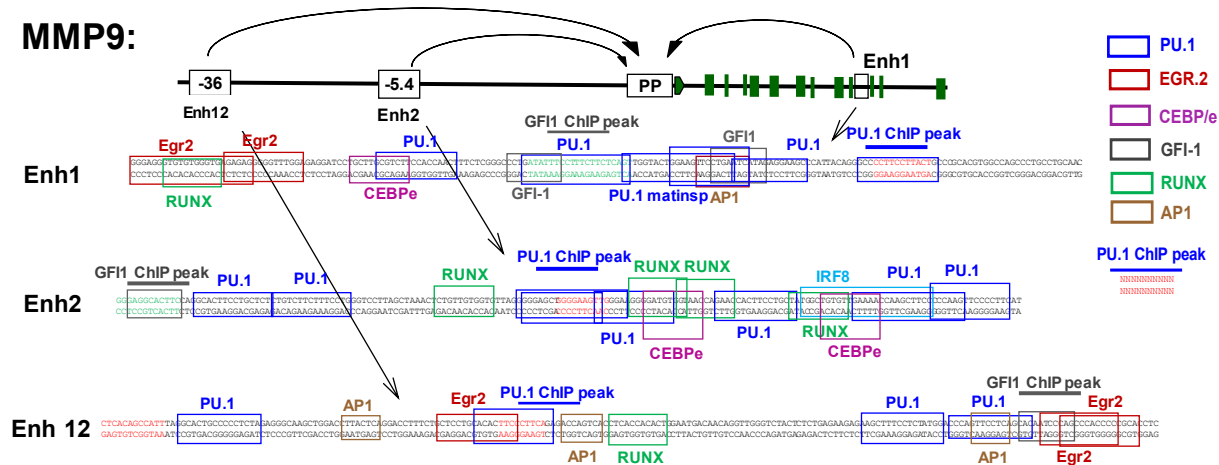


Obr. 20: Analýza regulačních oblastí genu MMP9 a MPO: Data PU.1 vazeb v PUER buňkách, makrofázích a B buňkách jsou značena jako černé obdélníčky ukazující pozici ChIP-seq peaku. Vazby PU.1, GFI-1, chromatinové modifikace a vazba hraničního faktoru CTCF v granulocytech jsou zobrazeny jako kvantitativní křivky. Zelené rámečky znázorňují konzervované, žluté nekonzervované potenciální enhancery.

MPO:



MMP9:



Obr. 21: Predikce vazeb PU.1 a liniově specifických transkripčních faktorů do potenciálních regulačních oblastí MPO a MMP9 genu. Predikce vazeb potenciálních kooperujících transkripčních faktorů analyzovaná pomocí programů Jaspas a Matinspector. Enh-enhancer, PP-proximální promotor. V případě MMP9 jsou zobrazeny reprezentativní 3 enhancery z celkového počtu 14ti testovaných.

4.2.2. Strategie klonování kandidátních regulačních oblastí MPO a MMP9 do luciferázových vektorů

Abychom ověřili funkčnost identifikovaných potenciálních enhancerů genů MPO a MMP9 (aktivovaných ve střední koncentraci PU.1), rozhodli jsme se otestovat aktivační schopnosti uvedených sekvencí pomocí luciferázových reportérových vektorů. Luciferázové reportéry umožňují kvantitativní testování a stanovení aktivačních vlastností testovaných sekvencí vložených do vektoru před gen luciferázy. Aktivita luciferázy (reprezentovaná produkovaným světlem) je následně změřena po přidání substrátu enzymu pomocí luminometru.

Pro regulační oblasti MPO genu jsme zvolili vektor pGl3-Basic, jež kóduje světluškovou luciferázu a jako substrát využívá světluškový luciferin, pro regulační oblasti genu MMP9 jsme zvolili vektor pCluc-Basic 2, kódující cypridiniovou luciferázu a využívající substrát cypridiniový luciferin. Zvolení dvou luciferázových reportérových konstruktů s odlišným substrátem umožnilo současnou transfekci a testování MPO a MMP9 luciferázových reportérových konstruktů.

V případě MPO regulačních oblastí jsme do prázdného vektoru pGl3-Basic nejdříve vložili:

1. prodlužující se sekvence **proximálního promotoru** PP1 (0; -0,2 kb), PP2 (0; -0,4 kb), PP3 (0; -0,6 kb).
2. prodlužující se **Enhancer 1**: (E1.1, E1.2, E1.3, E1.4 short, E1.4). Fragment E1.1 (-3204; -3355 bp) a E1.2 (-3204; -3394 bp) konstrukt neobsahoval PU.1 vazbu v oblasti -3,2 kb identifikovanou ChIP-seq. E1.3 (-3204; -3616 bp) obsahoval PU.1 ChIP vazbu a dále kompozitní EGR2, C/EBP ϵ , GFI-1 a AP1 místo. Enhancer E1.4 (-3204; -4663 bp) k oblasti E1.3 navíc obsahoval sekvenci, jež nesla v ChIP-seq PUER buněk H3K4 monometylacii, E1.4 short (-3500; -4663 bp) obsahoval ChIP-seq H3K4 monometylacii v PUER buňkách, ale neobsahoval PU.1 ChIP vazbu v oblasti -3,2 kb. Pro znázornění porovnejte Obr. 20, 21 a 22.
3. **Enhancer 2** (-14; -14,3 kb), který obsahoval PU.1 ChIP-seq vazbu v granulocytech v oblasti -14,2 kb a kompozitní EGR2 a RUNX1 vazebné místo.
Enhancer 3 (-16,4; -16,8 kb), který obsahoval tetraplikát PU.1 vazebných míst v oblasti -16,6 kb a kompozitní C/EBP ϵ , GFI-1 a RUNX1 místo.

Nakonec spojený **Enhancer 2-3** (-14; -16,8 kb), který navíc obsahoval sekvenci překrývající oba enhancery.

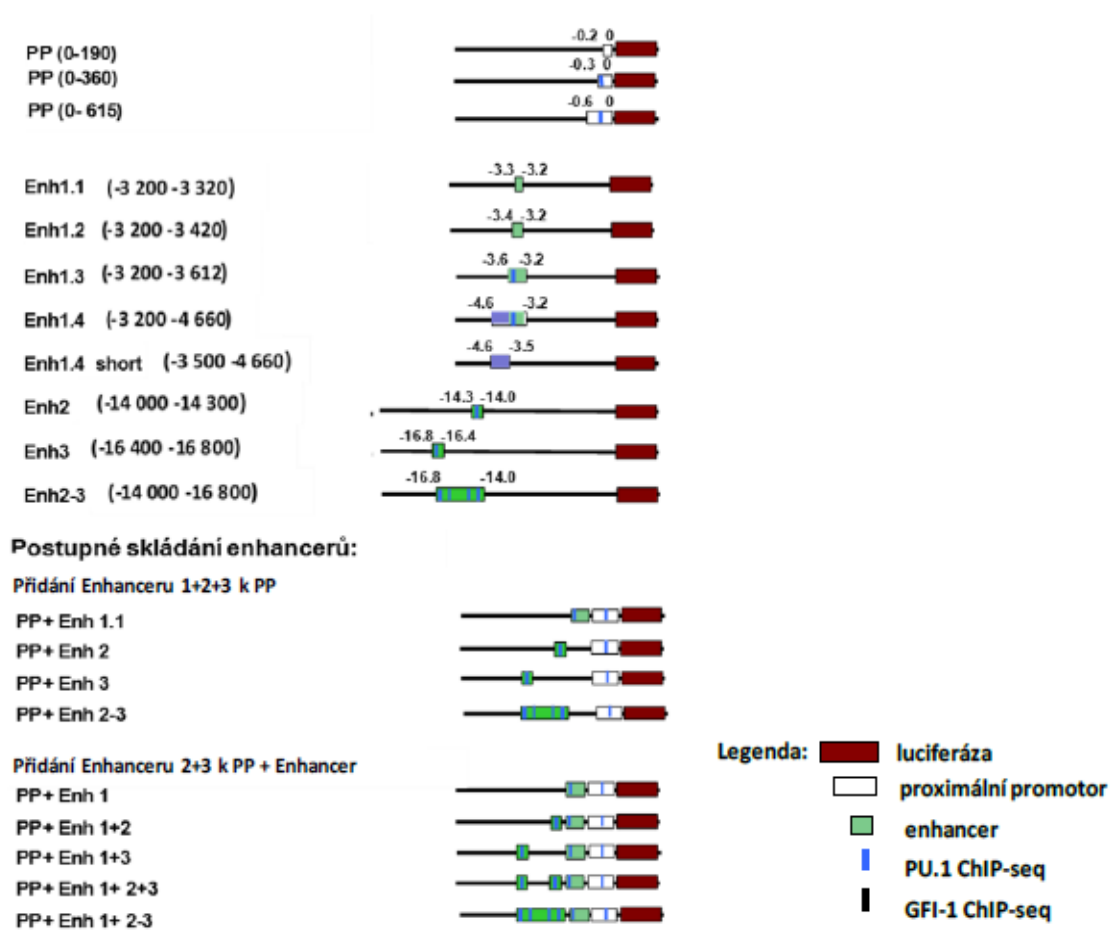
Tato strategie měla za cíl určit bazální aktivitu studovaných enhancerů.

4. V další fázi jsme vložili jednotlivé enhancery před **proximální promotor PP3**. Do vektoru pGL3PP3 jsme vložili **1.** prodlužující se sekvence Enhanceru 1 (E1.1, E1.2, E1.3, E1.4.) **2.** jednotlivé enhancery E2, E3, E2-3. Tato část klonování měla za cíl otestovat nutnost přítomnosti promotoru pro aktivitu enhancerů.

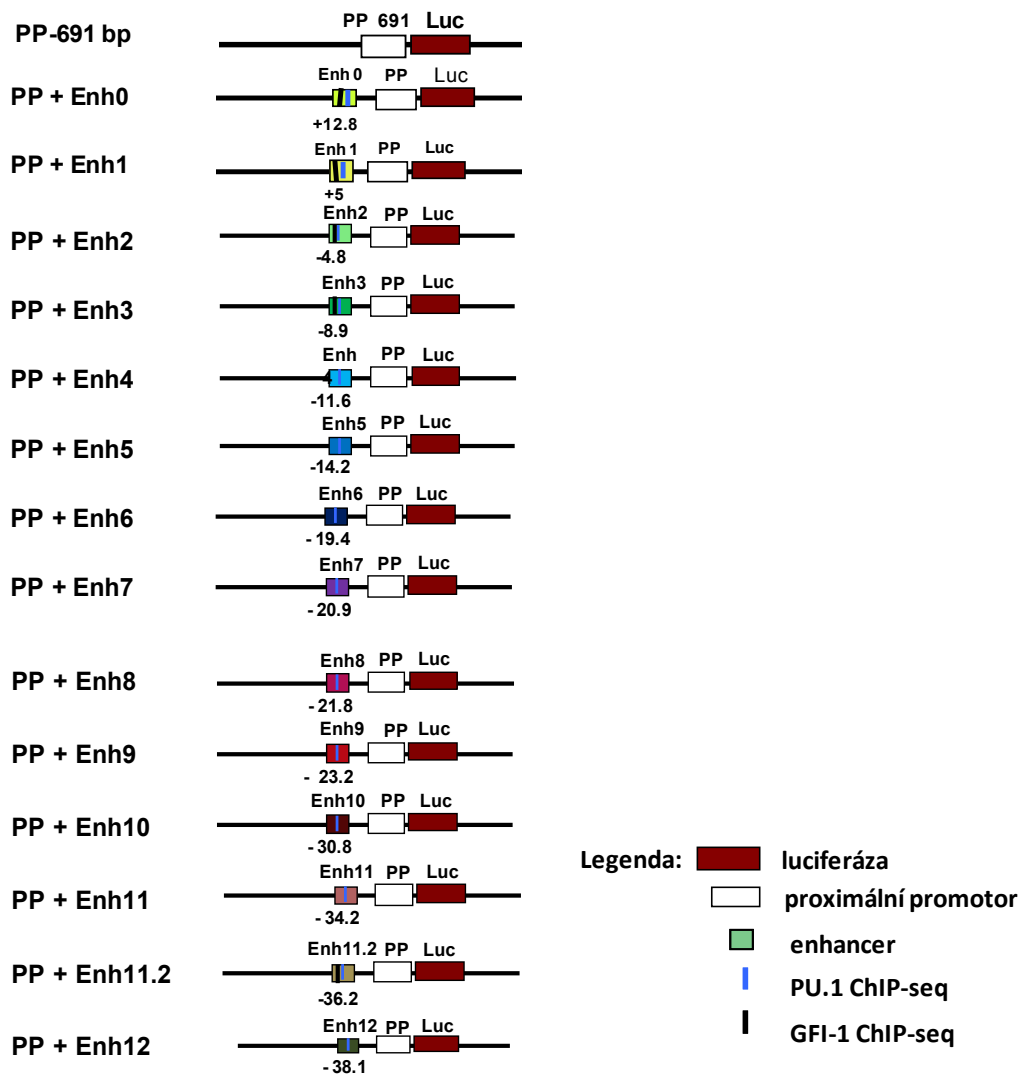
5. Nakonec jsme přistoupili k postupnému ***in vitro* sestavení enhancerů** abychom napodobili nativní potenciální MPO superenhancer. Toho jsme dosáhli tím, že jsme do vektoru obsahujícího PP3 + Enh 1.3 (pGL3 MPO PP3 E1.3) postupně vložili další enhancery E2, E3 a E2-3, vytvářející konstrukty pGL3 MPO PP3 E1.3 E2, pGL3 MPO PP3 E1.3 E3 a pGL3 MPO PP3 E1.3 E2-3, viz spodní část schématu Obr. 22. Touto strategií jsme testovali možnou graduálnost zesilování aktivity způsobenou postupným přidáváním enhancerů a možnost, zda některé enhancery mají aktivační schopnosti závislé na přítomnosti PP a Enh 1.

Strategie klonování MMP9 enhancerových sekvencí: V případě lokusu genu MMP9, kde jsme identifikovali 14 potenciálních enhancerů, jsme zvolili jednodušší strategii: **1.** nejdříve jsme vložili do reportérového vektoru pCluc-Basic2 proximální promotor (PP, 691 bp), který neobsahoval PU.1 vazbu (ChIP-seq), ale obsahoval predikci vazeb řady liniově specifických TFs jako např. C/EBP ϵ , AP1, EGR2, GFI-1. Následně jsme vložili do takto vytvořeného reportéru pCluc MMP9 PP před proximální promotor individuální testované enhancery 1-14 (Obr. 23). Všechny tyto enhancery obsahovaly ve svém centru PU.1 ChIP-seq identifikovanou vazbu nebo jejich multiplicity, a 300 až 500 bp dlouhou sekvenci na obě strany, obsahující predikované vazby dalších liniově specifických transkripčních faktorů. Typicky v okolí středu PU.1 vazebné křivky identifikované ChIP-seq byla predikována řada překrývajících se multiplicitních PU.1 vazebných míst, překrývajících se s predikcí vazby dalších liniově specifických TFs, jako C/EBP ϵ , GFI-1, RUNX1, EGR2, IRF8 či AP1. Např. MMP9 enhancery 0, 1, 2, 3 a 11.2 obsahovaly GFI-1 ChIP-seq identifikovanou vazbu. Příklady predikce vazeb TFs do MMP9 enhancerů a lokální kontext jako např. konzervace, či chromatinové modifikace jsou znázorněny v Obr. 20 a 21.

Následně byly vybrané enhancery (E0, E1.2, E3, E4, E6, E7, E8, E9, E10, E11.2, E12) vloženy do vektoru pCluc MMP9 PP E2.2 před Enhancer 2.2, který projevil největší aktivitu z testovaných MMP9 enhancerů.



Obr. 22: Schéma MPO regulačních oblastí klonovaných do vektoru pGI3-Basic. Zelené boxy označují potenciální enhancer, bílé boxy proximální promotor a červené obdélníčky označují luciferázu. Modré čáry označují PU.1 vazebné místo. V horní polovině schématu je zachována relativní pozice klonovaných úseků od TSS. PP-proximální promotor, Enh-enhancer



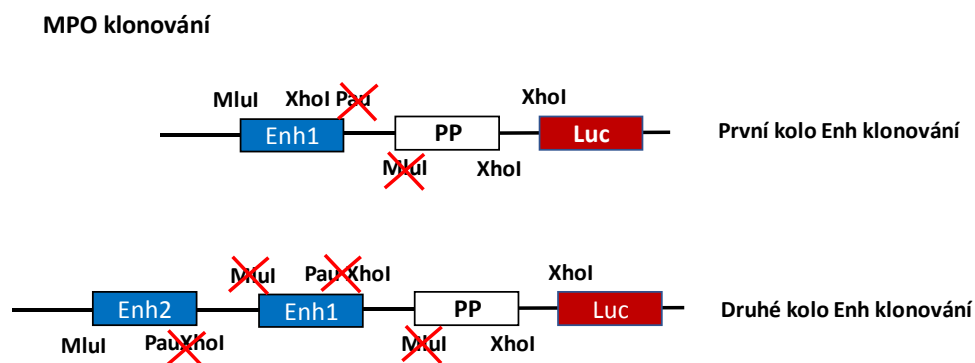
Obr. 23: Schéma MMP9 regulačních oblastí klonovaných do vektoru pCluc-Basic2. Barevné obdélníčky označují enhancer, bílé obdélníčky proximální promotor a červené obdélníčky označují luciferázu. Modré čáry označují PU.1 vazebné místo. Černé čáry označují GFI-1 vazebné místo. PP - proximální promotor, Enh - enhancer, Luc – luciferáza (kódující sekvence).

4.2.3. Tvorba reportérových konstruktů nesoucích potenciální MPO enhancery

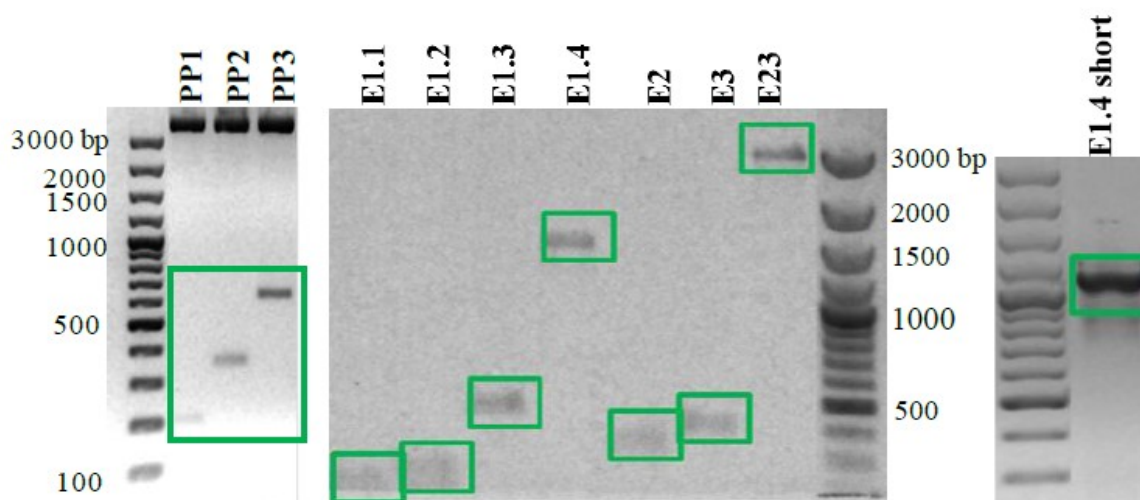
4.2.3.1. Amplifikace fragmentů obsahujících regulační oblasti genu MPO

Pomocí programu Primer3 jsme nejprve navrhli pro každou testovanou regulační oblast genu MPO primery. Pro promotorové fragmenty jsme na 5' konec forward primeru přidali restriční místo pro restriktázu MluI a na 5' konec reverse primeru jsme přidali restriční místo pro XhoI. Pro enhancerové fragmenty jsme vložili do forward primeru MluI a do reverse primeru XhoI a PauI restriční místo. Toto uspořádání umožňuje modulární opakované vkládání fragmentů před proximální promotor a následně poslední vložený fragment, jelikož PauI a MluI mají kompatibilní štěpené konce. Po naštěpení promotorového vektoru (pGL3 MPO PP3) MluI restriktázou a enhancerového insertu restriktázami MluI a PauI a následně ligaci dojde k vložení insertu do MluI místa štěpeného vektoru. Přitom původní MluI místo v parentálním vektoru vložím PauI štěpeného konce zanikne a vytvoří se nové místo MluI na 5' začátku vloženého fragmentu, jež je využito pro další kolo vkládání fragmentů. Schéma modulárního vkládání fragmentů pomocí použitých restriktáz je zobrazeno v Obr. 24.

Fragmenty regulačních oblastí genu MPO byly amplifikovány metodou PCR z myší genomické DNA, která byla izolována z PUER buněk pomocí kitu DNeasy Blood & Tissue kit (Qiagen). Byla použita high fidelity Phusion Hot Start II DNA polymerázy, jež má velmi nízkou četnost chyb (4×10^{-7} nt). Amplifikace fragmentů s vysokým obsahem CG proběhla pomocí CG Rich PCR systému (Roche) (Obr. 25 a Tab. 6).



Obr. 24: Schéma MPO klonování. Schématicky naznačeno jaká restriční místa obsahovaly PP a enhancery. Červeně přeškrtnutá restriční místa při klonování zanikla.



Obr. 25: Amplifikované fragmenty regulačních oblastí genu MPO. Jednotlivé enhancery (E) a proximální promotor (PP) genu MPO zobrazeny pomocí gelové elektroforézy na 1,5% agarózovém gelu. Zelené rámečky vyznačují amplifikované fragmenty ve správné velikosti.

Úsek	Velikost bp
PP1	191
PP2	353
PP3	615
E1.1	119
E1.2	190
E1.3	412
E1.4	1444
E1.4 short	994
E2	297
E3	371
E23	2754

Tab. 6: Velikosti fragmentů regulačních oblastí genu MPO.

4.2.3.2. Restrikční štěpení, purifikace na gelu a ligace fragmentů regulačních oblastí genu MPO do pGL3 reportérových vektorů.

PCR amplifikované fragmenty regulačních oblastí genu MPO jsme následně purifikovali pomocí kitu QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen). Pro vložení do prázdného pGL3-Basic vektoru jsme purifikované fragmenty PP1, PP2, PP3, E1.2, E1.3, E1.4, E2, E3, E23 a pGL3- Basic vektor naštěpili restrikčními enzymy MluI a XhoI.

Pro vkládání enhancerových úseků před proximální promotor jsme vektor pGL3 MPO PP3, vytvořený v prvním kole klonování, štěpili MluI restrikázou a vkládané fragmenty E1.1, E1.2, E1.3, E1.4, E2, E3, E23 jsme štěpili restrikčními enzymy MluI a PvuII. Obdobně jsme postupovali při následném vložení E2, E3, E23 enhancerů do vektoru pGL3 MPO PP3 E1.3, vytvořeného v předešlém kole klonování.

Štěpené fragmenty regulačních oblastí jsme následně purifikovali pomocí kitu PCR Purification Kit (Qiagen) a štěpený pGL3 vektor jsme purifikovali na agarózovém gelu. Štěpené fragmenty a vektor jsme purifikovali z důvodu odstranění odštěpených konců. Tím jsme zabránili jejich zpětnému spojení. Následně jsme naštěpené a purifikované enhancery a PP genu MPO ligovali do naštěpených defosforylovaných a pGL3 vektorů. Vektor a vkládané fragmenty byly v poměru 1:2 až 1:5 s ohledem na poměr délky jednotlivých fragmentů a délky vektorů.

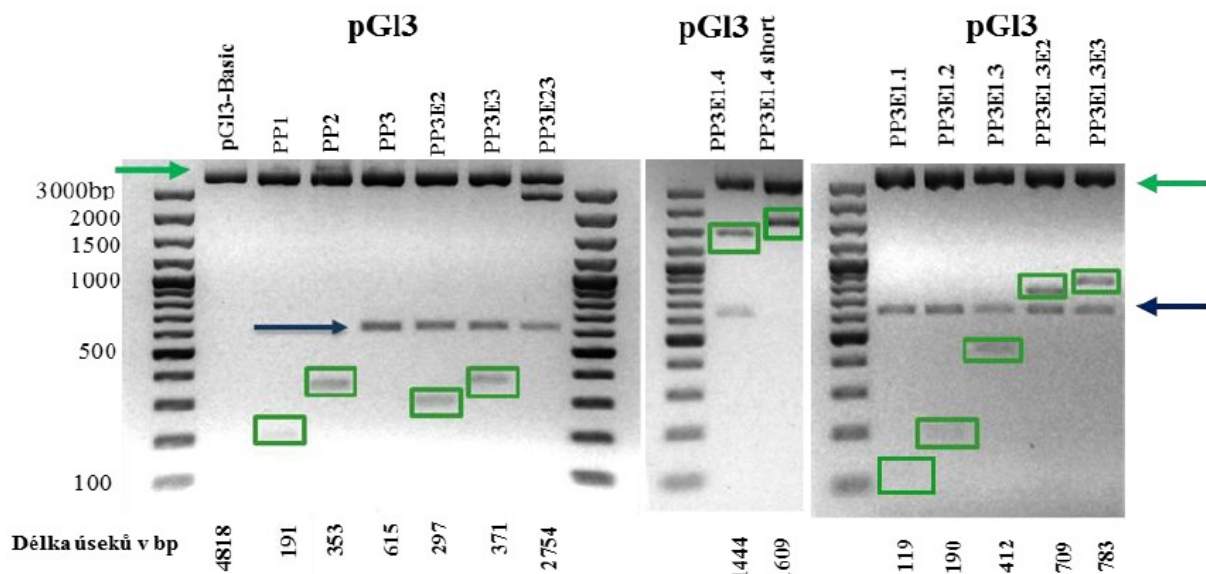
Ligované konstrukty jsme následně transformovali do kompetentních DH5 α nebo Top10 bakterií (Qiagen) pomocí teplotního šoku. Kolonie, které vyrostly přes noc na agarových plotnách, jsme otestovali na přítomnost vkládaného fragmentu pomocí PCR z individuálních bakteriálních kolonií (vždy 10 kolonií pro 1 konstrukt) za použití specifických primerů. Jako forward primer jsme použili primer použitý pro klonování daného enhanceru a jako reverse primer jsme použili primer na kostře pGL3 vektoru na začátku luciferázové sekvence. Díky této kombinaci primerů jsme pak pomocí gelové elektroforézy ověřili, zda byl úsek vložen ve správné orientaci.

4.2.3.3. Restrikční ověření MPO reportérových konstruktů

Z kolonií, které byly pozitivní pro přítomnost klonovaných insertů (PCR, viz výše), jsme nechali přes noc narůst bakteriální kultury a poté jsme izolovali plasmidovou DNA. Následně jsme restrikčně ověřili správnost vložených fragmentů. Pro štěpení jsme použili restrikční enzymy MluI a XhoI a velikost vzniklých fragmentů jsme analyzovali pomocí

gelové elektroforézy. Její výsledky jsou znázorněny v Obr.26. Pokud došlo k správnému vložení fragmentů promotoru, tak se z promotorových konstruktů vyštěpovaly fragmenty ve velikosti ~200, ~350, nebo ~600 bp, odpovídající prodlužujícím se variantám promotoru PP1 až PP3. U konstruktů obsahujících PP3 a různé varianty enhancerů E1, E2 a E3 (druhé kolo klonování) jsme viděli na gelu jednak proužek odpovídající velikosti PP3 (~600 bp) a dále proužek odpovídající velikosti daného enhanceru. U konstruktu PP3 E1.4 short se PP vyštěpil dohromady s E1.4 short, tudíž zde vidíme proužek odpovídající součtu velikosti PP a E1.4 short. U vektorů z třetího kola klonování, nesoucích kombinaci PP+E1+E2 a E3 (PP3 E1.3 E2, PP3 E1.3 E3, sestavování enhancerů) se vyštěpovaly dohromady oba enhancery, tudíž na gelu migroval kromě PP3 proužku (600bp) také proužek odpovídající velikosti součtu délky enhancerů E1+E2, nebo E1+ E3. Nejvýše migrující proužek u všech štěpení odpovídal prázdnému pGL3 vektoru (~4,8 kb).

Konstrukty, u kterých restriční štěpení ověřilo, že do nich byl vložen fragment správné velikosti, jsme nechali sekvenovat a z výsledku ověřili, zda má vložený fragment správnou sekvenci a správnou orientaci. Bakterie, které obsahovaly správné luciferázové konstrukty jsme v 25 % glycerolu zamrazili do -80°C.



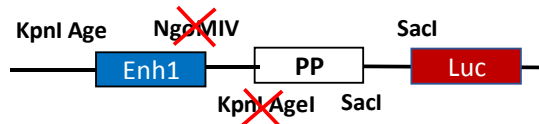
Obr. 26: Restriční ověření reportérových konstruktů s vloženými fragmenty regulačních oblastí genu MPO. Zelená šipka označuje vyštěpený prázdný vektor pGL3-Basic, modrá šipka označuje proximální promotor (PP), zelené rámečky označují vyštěpený enhancer (E) o správné velikosti (viz. Tab. 6), 1,3% agarózový gel. Ukázáno přehledné reprezentativní štěpení vybraných klonovaných MPO fragmentů. Z důvodů místa neukázány gely všech klonovaných variant MPO konstruktů.

4.2.4. Tvorba reportérových konstruktů nesoucích potenciální MMP9 enhancery

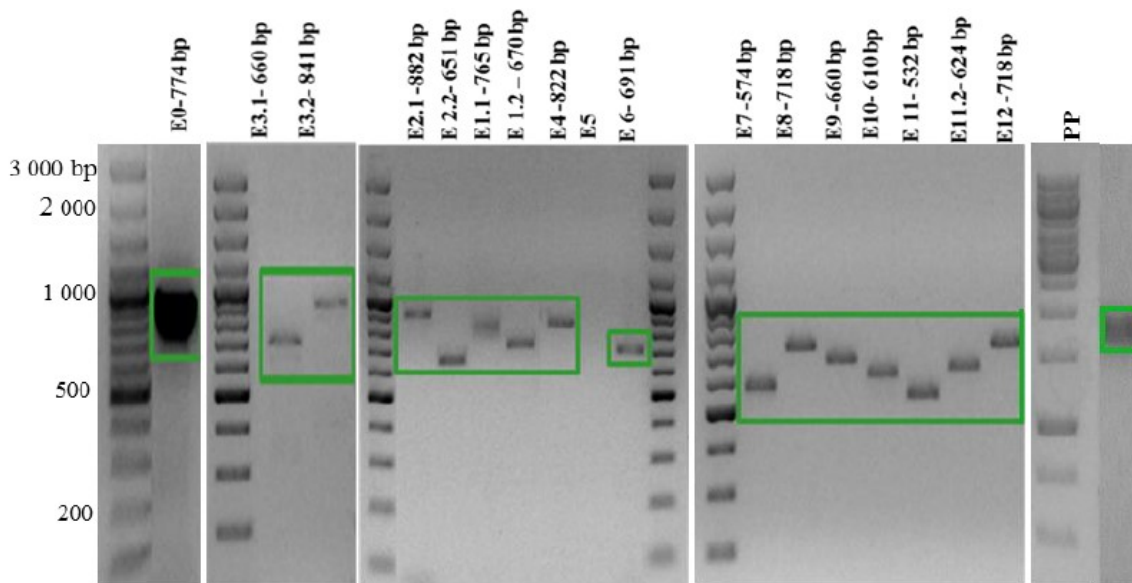
4.2.4.1. Příprava fragmentů obsahujících regulační oblasti genu MMP9

Pomocí programu Primeru3 jsme pro každou regulační oblast genu MMP9 navrhli primery v obou směrech. Primery pro proximální promotor obsahovaly na 5' konci forward primeru KpnI a AgeI restrikční místa a na reverse primeru SacI místo. Primery pro enhancery obsahovaly na 5' konci forward primeru KpnI a AgeI místa a na reverse primeru NgoMIV restrikční místo (schematicky zobrazeno v Obr. 27). Jednotlivé fragmenty byly amplifikovány metodou PCR z myši genomické DNA, která byla izolována z PUER buněk pomocí DNeasy Blood & Tissue kit. Byla použita „high fidelity“ Phusion Hot Start II DNA polymeráza, jež má velmi nízkou četnost chyb (4×10^{-7} nt). Amplifikace fragmentů s vysokým obsahem CG proběhla pomocí CG Rich PCR systému. Výsledky amplifikace jsou znázorněny v Obr. 28.

MMP9 klonování



Obr. 27: Schéma návrhu restrikčních míst pro MMP9 klonování. Primery pro proximální promotor obsahovaly na forward primeru KpnI a AgeI místa a na reverse primeru SacI místo. Primery pro enhancery obsahovaly na forward primeru KpnI a AgeI místa a na reverse primeru NgoMIV místo. Červeně přeškrtnutá restrikční místa při klonování zanikla.



Obr. 28: Amplifikované fragmenty regulačních oblastí genu MMP9: Jednotlivé enhancery (E) genu MMP9 zobrazeny pomocí gelové elektroforézy na 1,5% agarózovém gelu. Zelené rámečky vyznačují amplifikované fragmenty ve správné velikosti.

4.2.4.2. Restriční štěpení, purifikace z gelu a ligace fragmentů regulační oblasti genu MMP9 do pCluc reportérového vektoru a transformace

Amplifikované fragmenty regulačních oblastí genů MMP9 jsme purifikovali pomocí kitu QIAquick PCR Purification Kit. Poté jsme fragmenty štěpili restriktázami. Proximální promotor jsme štěpili KpnI a SacI. Fragmenty E0, E1.1, E1.2, E2.2, E3.1, E3.2, E4, E6, E7, E8, E9, E10, E11 a E12 jsme štěpili KpnI a NgoMIV. E2.1 jsme štěpili AgeI a NgoMIV, protože v sekvenci tohoto enhanceru je KpnI místo, E11.2 jsme štěpili pouze NgoMIV, protože v jeho sekvenci je další NgoMIV místo před AgeI. Luciferázový vektor pCluc-Basic2 do kterého jsme vkládali proximální promotor, jsme štěpili pomocí restričních enzymů KpnI a SacI a poté defosforylovali. V prvním kole klonování jsme vložili proximální promotor MMP9 do pCluc-Basic2. V dalším kole klonování byl vytvořený pCluc PP vektor naštěpen KpnI a AgeI a poté do něj byly ligovány jednotlivé enhancery. Pro vložení úseku E2.1 do pCluc PP byl tento vektor naštěpen pouze AgeI, pro E11.2 pouze NgoMIV z výše uvedených důvodů.

Štěpené fragmenty regulačních oblastí jsme purifikovali pomocí kitu PCR Purification Kit. Štěpený vektor jsme purifikovali na 0,7 % agarózovém gelu abychom odstranili

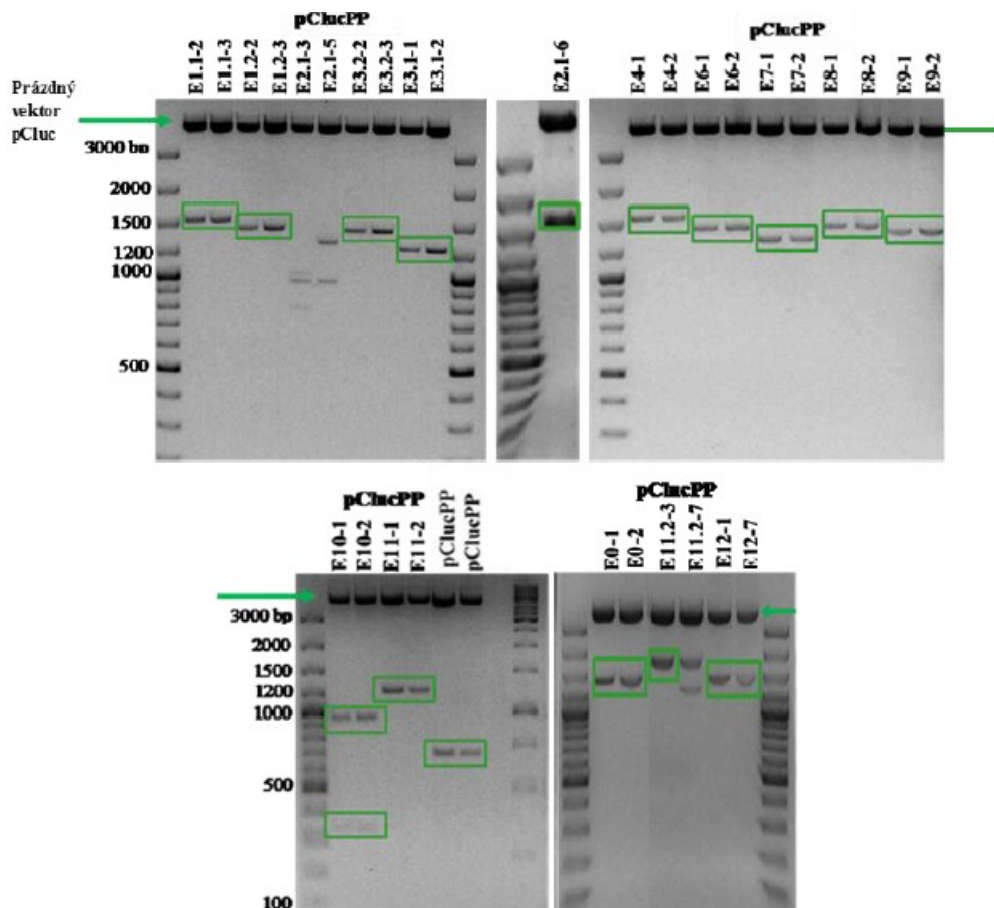
odštěpené konce a tím zabránili jeho zpětnému spojení. DNA z vyříznutého gelu jsme extrahovali pomocí kitu QIAquick gel extraction kit. Následně jsme ligovali fragmenty genu MMP9 do vektoru pCluc-Basic2. Nejdříve byl do vektoru ligován proximální promotor a poté do tohoto vektoru s proximálním promotorem (pCLuc PP) byly ligovány jednotlivé enhancery.

Ligované konstrukty jsme transformovali do kompetentních DH5 α bakterií pomocí teplotního šoku. Bakterie, které vyrostli přes noc na LB agarových plotnách, jsme otestovali na přítomnost fragmentu pomocí PCR z bakteriálních kolonií za použití specifických primerů. Jako forward primer jsme použili primer použitý k amplifikaci vkládaných enhancerů a jako reverse primer jsme použili primer na kostře pCLuc vektoru na začátku luciferázové sekvence.

4.2.4.3. Restrikční ověření MMP9 reportérových konstruktů

Z kolonií, které obsahovaly vložený fragment, jsme izolovali DNA. Pro restrikční ověření jsme použili restrikční enzymy XhoI a SacI a štěpení ověřili pomocí gelové elektroforézy (Obr. 29). Pokud došlo ke správnému vložení fragmentu do vektoru, vyštěpoval se společně proximální promotor a enhancer tudíž jsme na gelu viděli proužek odpovídající součtu délky proximálního promotoru a enhanceru a proužek odpovídající velikosti prázdného pCluc-Basic2 vektoru (viz. Tab. 7). Výjimkou byl konstrukt pCluC PP E10, protože Enhancer 10 obsahuje v sekvenci SacI štěpící místo, vyštěpovaly se zde dva fragmenty o velikosti 322 bp a 980 bp.

Konstrukty, u kterých restrikční štěpení ověřilo, že byl fragment vložen ve správné orientaci, jsme dali osekvenovat. Bakterie, které obsahovaly správné luciferázové konstrukty jsme v 25 % glycerolu zamrazili do -80°C.



Obr. 29: Restrikční ověření reportérových konstruktů s vloženými fragmenty regulačních oblastí genu MMP9. Zelená šipka označuje vyštěpený prázdný vektor pCluc-Basic2, zelené rámečky označují vyštěpený fragment o velikosti proximálního promotoru a enhanceru (viz. Tab. 7), 1,5 % agarózový gel.

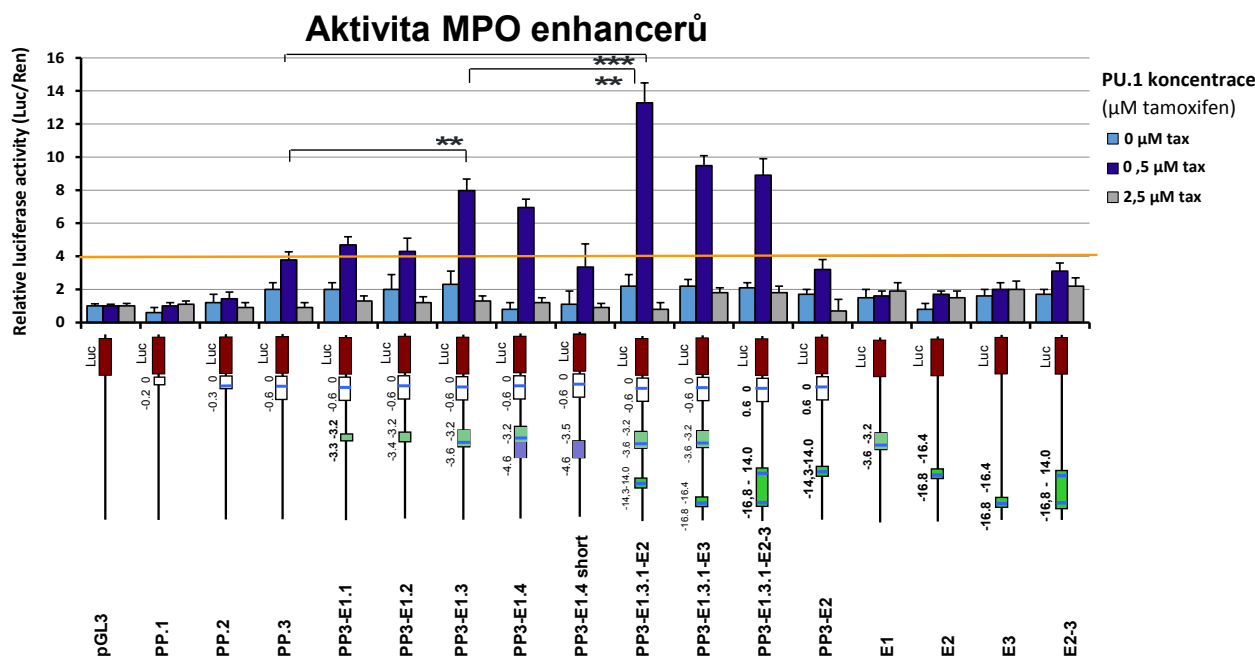
Enhancer	Velikost enhanceru bp	Velikost proximálního promotoru bp	Velikost fragmentu, který se vyštěpí na gelu (E+PP) bp
E1.1	764	691	1455
E1.2	698		1389
E2.1	859		1550
E2.2	618		1309
E3.1	660		1351
E3.2	844		1535
E4	823		1514
E5	735		1426
E6	692		1383
E7	574		1265
E 8	719		1410
E 9	661		1352
E 10	611		1302 (vyštěpoval se fragment 322 bp +980 bp)
E 11	533		1224
E11.2	624		1315
E12	718		1409

Tab. 7: Velikost enhancerů, proximálního promotoru a fragmentu, který se vyštěpí při restričním ověření. Velikosti jednotlivých enhancerů, proximálního promotoru a fragmentu, který by se měl vyštěpit na gelu při restričním ověření restričními enzymy XhoI a SacI. Fragment vyštěpený na gelu se rovná součtu velikosti proximálního promotoru a enhanceru.

4.3. Funkční ověření MPO a MMP9 enhancerových reportérových konstruktů různými koncentracemi transkripčního faktoru PU.1

Vytvořené reportérové konstrukty enhancerů genu MPO a MMP9 byly použity pro studium regulace transkripce těchto genů iniciované různými koncentracemi transkripčního faktoru PU.1. Aktivační potenciál testovaných enhancerových a promotorových regulačních sekvencí a jejich variant byl testován během granulocytární a makrofágové diferenciaci PUER myeloidních progenitorů, indukované zvyšujícími se koncentracemi PU.1 (viz kapitola 4.1).

Abychom minimalizovali počet transfekcí, do buněk jsme vždy kotransfekovali současně jeden pGI3 MPO, jeden pCluc MMP9 vektor a tři prázdné vektory pRLSV40, pNL 1.1 PGK a pCMV-Gluc sloužící k normalizaci transfekce. Použité luciferázové vektory nesou různé modifikace luciferázového enzymu mající odlišné substráty. To umožnilo testovat v jedné transfekci současně všechny uvedené reportéry. Pro ekvalizaci transfekční efektivity byly kotransfekovány prázdné vektory pRLSV40 (alternativně pCMV Gluc) a pNL 1.1 PGK. Pro vizuální kontrolu transfekce byl kotransfekován prázdný pGFP vektor. Následně byla každá transfekce rozdělena na tři části do 12 jamkových destiček a transfekované buňky byly stimulovány třemi koncentracemi tamoxifenu (0, 0,5, 2,5 μM). V příložených schématech Obr. 22 a 23 a grafech Obr. 30 a 31 jsou znázorněny testované regulační oblasti a vytvořené luciferázové konstrukty. Jako kontrola bazální aktivity byly použity prázdné vektory pGI3-Basic (MPO) a pCluc-Basic2 (MMP9). Po 72-84 h diferenciaci do granulocytárních (0,5 μM tax) nebo makrofágových buněk (2,5 μM tax) byly buňky sklizeny pasivním lyzačním pufrem obsahujícím inhibitory proteáz a zamrazeny do té doby, než byla měřena jejich luciferázová aktivita pomocí luminometru (viz metody kapitola 3. 2. 3. 4).



Obr. 30: Funkční analýza MPO enhancerových oblastí. PUER buňky byly transfekovány pGL3 MPO enhancerovými konstrukty a diferenciovány 0,5 a 2,5 μM tamoxifenem po dobu 96 hodin. Osa Y ukazuje aktivitu světluškové luciferázy pGL3 reporterů, jež je nejprve normalizována ke kontrolní renilové luciferáze a následně vztahena k aktivitě prázdného vektoru. Žlutá linie označuje úroveň aktivity pGL3 PP. Chybové úsečky značí směrodatnou odchylku (N=4). Symbol hvězdičky značí hladinu významnosti PP3 E1.3 vzhledem k PP3, PP3 E1.3 E2 vzhledem k PP3 E1.3, PP3 E1.3 E2 vzhledem k PP3. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, Anova Tukey-HSD test, E-enhancer, PP-proximální promotor, tax-tamoxifen.

V případě genu MPO, prodlužování proximálního promotoru ze 190 na 615 bp (PP1 až PP3) vedlo ke graduálnímu zvýšení luciferázové aktivity. Konstrukt s nejdelším úsekem proximálního promotoru pGL3 MPO PP3, obsahující PU.1 ChIP-seq vazbu a predikovaná RUNX1, AP1, EGR2, NFκB a C/EBPε vazebná místa měl největší aktivační potenciál a aktivoval luciferázu 4x ve střední (granulocytární) koncentraci PU.1 (0,5 μM tax) v porovnání s prázdným pGL3-Basic vektorem. V nulové koncentraci PU.1 tento konstrukt aktivoval luciferázu 2x, zatímco nebyl vůbec aktivován ve vysoké (makrofágové) koncentraci PU.1 (2,5 μM tax) (Obr. 30). Krátká varianta MPO PP1 (0-190nt) neobsahující PU.1 vazbu neaktivovala luciferázu vůbec, stejně tak středně dlouhá varianta MPO PP2 (0-360 bp), obsahující PU.1 vazbu ale ne následující vazebná místa transkripčních faktorů, téměř neaktivovala luciferázu v žádné PU.1 koncentraci. To naznačuje, že promotor vyžaduje pro svůj aktivační potenciál ve střední PU.1 koncentraci vazbu PU.1 a pomocných transkripčních

faktorů. Z tohoto důvodu byl nejdelší promotorový konstrukt PP3 použit pro postupné kombinatorní vkládání jednotlivých potenciálních MPO enhancerů.

V druhém kole klonování jsme vkládali jednotlivé MPO enhancery a jejich varianty do luciferázového vektoru obsahujícího proximální promotor. Nejdříve jsme vkládali prodlužující se varianty Enhanceru 1, který byl identifikován v okolí PU.1 ChIP-seq vazby v -3,3 kb. Nejkratší dvě varianty pGL3 MPO PP3 E1.1 (-3,2; -3,3 kb) a E1.2 (-3,2; -3,4 kb), neobsahující PU.1 vazbu a obsahující 3x RUNX1 vazebné místo aktivovaly luciferázu ve středních koncentracích PU.1 stejně jako parentální pGL3 MPO PP3, což ukazuje, že tyto krátké varianty Enhanceru 1 nemají žádné aktivační schopnosti. Naopak delší konstrukt pGL3 MPO PP3 E1.3 (-3,2; -3,6 kb), který již obsahoval PU.1 ChIP-seq vazbu a 2x C/EBP ϵ , GFI-1, AP1 a kompozitní EGR2 predikci vazebných míst zvýšil 8x aktivitu oproti prázdnému pGL3-Basic vektoru a 2x oproti pGL3 MPO PP3, neobsahujícím Enhancer E1.3 ve střední koncentraci PU.1 (viz Obr. 30). Přidání E1.3 nezvýšilo aktivitu v nulové koncentraci PU.1 oproti parentálnímu pGL3 MPO PP. Ve vysoké koncentraci PU.1 nebyl konstrukt pGL3 MPO PP3 E1.3 vůbec aktivován.

Tento výsledek identifikuje Enhancer 1.3 jako funkční enhancer, jež je aktivován pouze v granulocytární a nikoliv v makrofágové koncentraci PU.1 a definuje nezbytnost přítomnosti úseku, kam se váže PU.1 a kooperující faktory.

Další prodloužení Enhanceru 1 v konstrukt pGL3 MPO PP3 E1.4 (-3,2; -4,6 kb) o oblast jež nese v ChIP-seq datech H3K4 monometylace, již nezvýšilo jeho aktivační schopnosti. Zároveň konstrukt, jenž nesl jen oblast H3K4 monometylace, ale nenesl PU.1 vazebné místo, nezvýšil aktivitu oproti pGL3 MPO PP3 konstrukt, což indikuje, že tato oblast již pro aktivitu Enhanceru 1 není potřebná.

Následně jsme v třetím kole klonování do varianty vektoru s identifikovanou optimální délkou PP a Enhanceru 1 (pGL3 MPO PP3 E1.3) přidali Enhancer 2 v konstrukt pGL3 MPO PP3 E1.3 E2 (-14; -14,3 kb), Enhancer 3 v konstrukt pGL3 MPO PP3 E1.3 E3 (-16,4; -16,8 kb) nebo úsek obsahující E2 i E3 v konstrukt pGL3 MPO PP3 E1.3 E2-3 (-14; -16,8 kb). Překvapivě přidání enhanceru E2 do vektoru obsahujícího PP3 E1.3 výrazně zesílilo aktivaci luciferázy, a to 13x oproti prázdnému pGL3-Basic vektoru, 3,5x oproti vektoru pGL3 MPO PP3 a 1,8x oproti konstrukt MPO PP3 E1.3 ve střední koncentraci PU.1, zatímco ve vysoké a v nulové koncentraci došlo k nulové nebo minimální aktivaci. Přidání Enhanceru 3 nebo Enhanceru 2-3 k pGL3 MPO PP3 E1.3 nevedlo k signifikantnímu zvýšení aktivačního potenciálu, což naznačuje, že Enhancer 3 není funkční.

Tato data naznačují, že pro optimální aktivaci genu MPO při granulocytární diferenciaci indukované středními koncentracemi PU.1 je nezbytná spolupráce proximálního promotoru a dvou enhancerů, Enhanceru 1 a 2, přičemž aktivační potenciál graduálně stoupá s přidávanými enhancery E1 a E2.

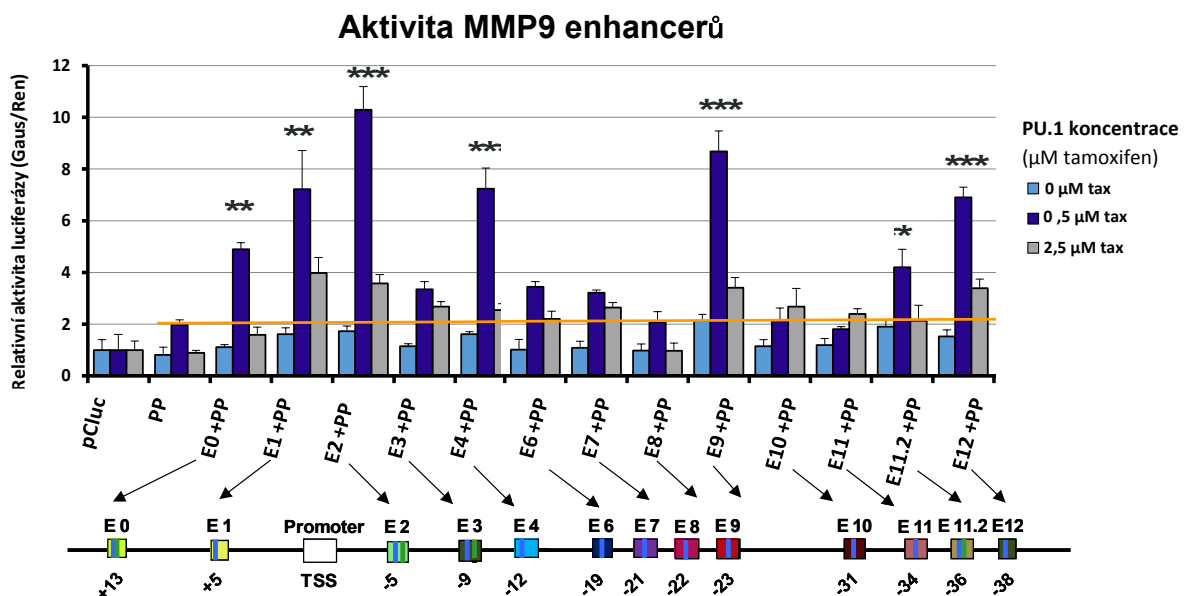
Doposud jsme se zaměřili na popis postupného skládání MPO PP a enhancerů. V pravé části Obr. 30 následují vybraná data, kde jsou jednotlivé enhancery vkládány pouze do prázdného pGL3 vektoru, nebo kde je Enhancer 2 vložen do vektoru obsahující pouze proximální promotor PP3 a neobsahující Enhancer 1.3 (pGL3 MPO PP3 E2). Tato data překvapivě ukazují, že samotné enhancery E1.3, E2 a E3 mají bez přítomnosti proximálního promotoru jen velice malý aktivační potenciál (cca 2x oproti prázdnému pGL3-Basic vektoru). Zároveň pokud vložíme Enhancer 2 pouze za PP3 v konstrukt (pGL3 MPO PP3 E2), tak nedojde v žádné koncentraci PU.1 ke zvýšení aktivity luciferázy oproti konstrukt pGL3 MPO PP3. Tato data překvapivě ukazují, že samotné enhancery E1 a E2 mají malé nebo žádné aktivační vlastnosti, a ty se projeví až v přítomnosti, tj. kontaktu proximálního promotoru v případě Enhanceru 1 a přítomnosti proximálního promotoru a dalšího enhanceru (E1) v případě Enhanceru 2. To naznačuje, že oproti současným paradigmatům, jež předpokládají, že enhancery jsou aktivní samostatně a nezávisle na jejich pozici, tak naše data ukazují, že aktivita některých enhancerů samotných je minimální a projevuje se pouze v přítomnosti proximálního promotoru nebo dalších enhancerů.

Ve výsledcích nejsou pro zjednodušení ukázány výsledky testování reportérů, jež byly vyklonovány, ale jejich testování nepřineslo relevantní informace.

V případě genu MMP9 jsme testovali celkem 14 identifikovaných potenciálních regulačních sekvencí, jež nesly znaky enhancerů a měly identifikovanou PU.1 vazbu. Jeden enhancer byl v pozici za kódující oblastí MMP9 (E0, +13 kb), jeden byl v desátém intronu MMP9 (E1, +5 kb) a zbývajících 12 potenciálních enhancerů bylo ve vzdálenosti -5 až -38 kb ve vztahu k transkripčnímu startu MMP9. Tato hustá přítomnost enhancerů v okolí genu MMP9 naznačuje možnost, že tyto enhancery mezi sebou spolupracují a sestavují se do tzv. superenhanceru (viz literární úvod kapitola 1.1.1.2.3.), který byl v nedávné minulosti popsán, že je typický pro aktivaci tkáňově specifických genů důležitých pro buněčnou identitu.

Výsledky ukazují, že sedm enhancerů vykazovalo aktivační vlastnosti zejména ve střední, ale ne nulové koncentraci PU.1 (Obr. 31). Konkrétně luciferázový vektor nesoucí pouze proximální promotor pCLuc MMP9 PP (1; 691 bp) zvyšoval aktivitu luciferázy 2x, a to pouze ve střední, granulocytární koncentraci PU.1 (0,5 μ M tax). Zvolený PP obsahoval

predikci vazeb řady liniově specifických TFs jako např. C/EBP ϵ , AP1, NF κ B, EGR2, GFI-1, ale je nutné zmínit, že ChIP-seq analýza neidentifikovala PU.1 vazbu do oblastí proximálního promotoru, první PU.1 vazba byla až od Enhanceru 2. Přidání následujících enhancerů do vektoru obsahujícího PP dále zvýšilo aktivitu luciferázy: Enhancer 0 (E0; +12,1; 12,9 kb) zvyšoval 2,5x luciferázovou aktivitu oproti vektoru pCLuc MMP9 PP, Enhancer 1 (E1 +4,3; +5 kb) zvyšoval 4x, Enhancer 2 (E2 -4,7; -5,5 kb) zvyšoval 5x, Enhancer 4 (E4 -11,5; -12,3 kb) zvyšoval 3,5x, Enhancer 9 (E9 -23,2; -23,8 kb) zvyšoval 4,5x, Enhancer 11.2 (E11.2 -36,2; -36,8 kb) zvyšoval 2x a Enhancer 12 (E12 -38; -38,7 kb) zvyšoval 3,5x luciferázovou aktivitu, vše v porovnání s hodnotou aktivace vektoru pCLuc MMP9 PP nesoucího MMP9 proximální promotor při střední (granulocytární) PU.1 koncentraci. Uvedené hodnoty aktivace v porovnání k prázdnému pCLuc vektoru byly dvojnásobné.



Obr. 31: Funkční analýza MMP9 enhancerových oblastí. PUER buňky byly transfekovány pCluc MMP9 enhancerovými konstrukty a diferenciovány 0,5 a 2,5 μ M tamoxifenem po dobu 96 hodin. Osa Y ukazuje aktivitu luciferázy pCLuc vektorů, jež je nejprve normalizována ke kontrolní renilové luciferáze a následně vztahena k aktivitě prázdného vektoru. Žlutá linie označuje úroveň aktivity pCLuc PP. Chybové úsečky značí směrodatnou odchylku (N=4). Symbol hvězdičky značí hladinu významnosti PPE0, PPE1, PPE2, PPE4, PPE9, PPE11.2, PPE12 vzhledem k pClucPP. * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001, Anova Tukey-HSD test. E-enhancer, PP-proximální promotor, tax-tamoxifen

V nulové koncentraci nebyly enhancery, které byly aktivní ve střední PU.1 koncentraci téměř aktivované, zatím co vysoká koncentrace tyto konstrukty aktivovala mírně (cca 2x oproti PP). To odpovídá i mRNA expresním datům, jež ukazují, že zatímco exprese MPO je

ve vysoké PU.1 koncentraci vypnutá kompletně, tak u MMP9 dochází k výrazné, ale nikoliv úplné represi exprese (Obr. 19).

V souhrnu testování MMP9 enhancerových sekvencí naznačuje, že pro optimální tkáňově specifickou expresi MMP9 ve střední koncentraci PU.1 je nezbytná spolupráce sedmi enhancerů a proximálního promotoru. Tomu nasvědčují i naše nová data postupného skládání MMP9 enhancerů, jež z důvodu nutného dalšího ověření nejsou zahrnuta do této diplomové práce.

V souhrnu testování MPO a MMP9 enhancerových sekvencí naznačuje, že pro optimální tkáňově specifickou aktivaci granulocytárních genů MPO a MMP9 je nezbytná spolupráce vícečetných enhancerů a proximálního promotoru, které se sestavují do superenhanceru. Zatím, co aktivační potenciál jednotlivých enhancerů je relativně nízký, tak graduálně stoupá v přítomnosti ostatních enhancerů a proximálního promotoru, což poukazuje na nutnost aditivní kooperace jednotlivých regulačních oblastí, nezbytnou pro optimální tkáňově specifickou expresi MPO a MMP9 genů.

4.4. Mutagenese PU.1 vazebných míst v MPO a MMP9 reportérech

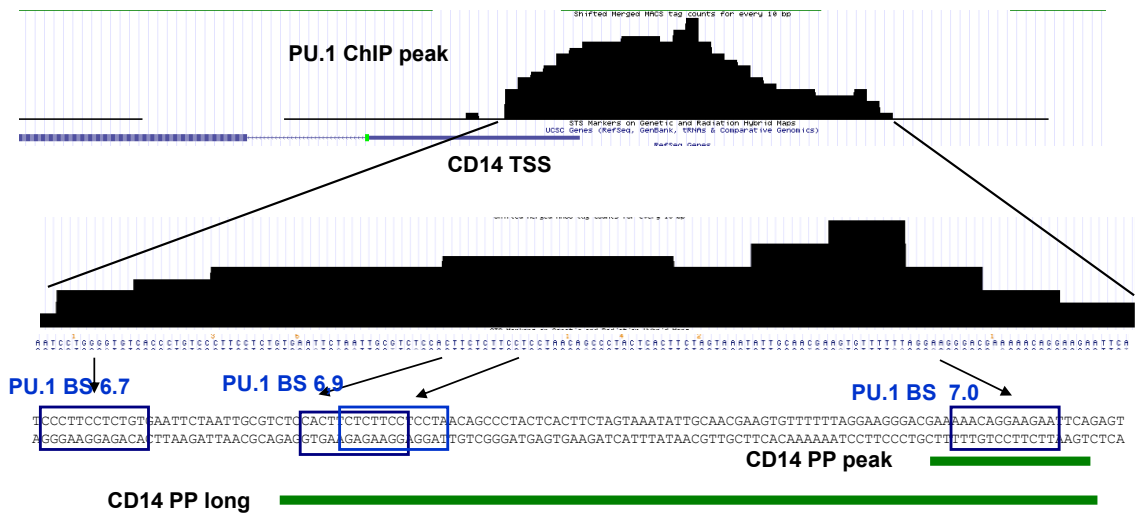
V předešlých kapitolách jsme identifikovali a funkčně ověřili mnohočetné enhancerové sekvence MPO a MMP9 genů. To naznačuje, že regulace těchto genů je závislá na kooperaci vícečetných enhancerových oblastí, ale neodpovídá na otázku, proč jsou tyto granulocytární enhancery a geny aktivovány pouze střední koncentrací PU.1, zatímco makrofágové geny jsou aktivovány vysokou koncentrací PU.1. Naše hypotéza je, že regulační sekvence granulocytárních genů nesou středně/vysoko afinitní vazebná místa, schopná reagovat již na nízké koncentrace PU.1, zatímco makrofágové geny nesou nízko/středně afinitní PU.1 vazebná místa, reagující na vyšší PU.1 koncentrace. Proto byla v naší laboratoři provedena analýza afinity PU.1 vazebných míst v diferencovaných PUER progenitorech s využitím PU.1 ChIP-seq dat (postdoktorální pracovník P. Krsmanovic). K analýze jsme použili nástroj HOMER (Hypergeometric Optimization of Motif Enrichment, www.homer.edu.org) a vlastní skript. Nejdříve algoritmus porovnal všechny vázané sekvence transkripčním faktorem PU.1 a vypočítal „*logo*“ - matici motivu, tj. přesnou nukleotidovou sekvenci, která je nejčastěji vázána transkripčním faktorem PU.1. Poté každá jednotlivá sekvence vázaná PU.1 byla porovnána s touto vypočtenou optimální sekvencí. Na základě podobnosti optimální sekvence a každé individuální sekvence vázané PU.1 bylo vypočteno tzv. „*log odds*“ skóre, které udává stupeň podobnosti posuzované sekvence s vypočtenou maticí motivu. Dříve bylo experimentálně potvrzeno, že „*log odds*“ hodnota silně koreluje

s fyzikálně ověřenou afinitou PU.1 vazebných míst a může být tedy použita pro výpočet odhadované afinity vazebného místa (Pham *et al*, 2013). Čím větší podobnost, tím má vazebné místo větší afinitu. PU.1 rozpoznává sekvenci, která obsahuje zpravidla tzv. „*core motive*“ **GAGGAA** a variabilita 3 nt okolo této sekvence definuje afinitu vazebného místa. Na základě naší analýzy ChIP-seq dat se ukázalo, že regulační sekvence – enhancery, které jsou vázány ve střední koncentraci PU.1 obsahují převážně vazebná místa se střední až vysokou afinitou, zatímco enhancery, které jsou aktivovány ve vysoké koncentraci PU.1 obsahují převážně PU.1 vazebná místa s nižší afinitou.

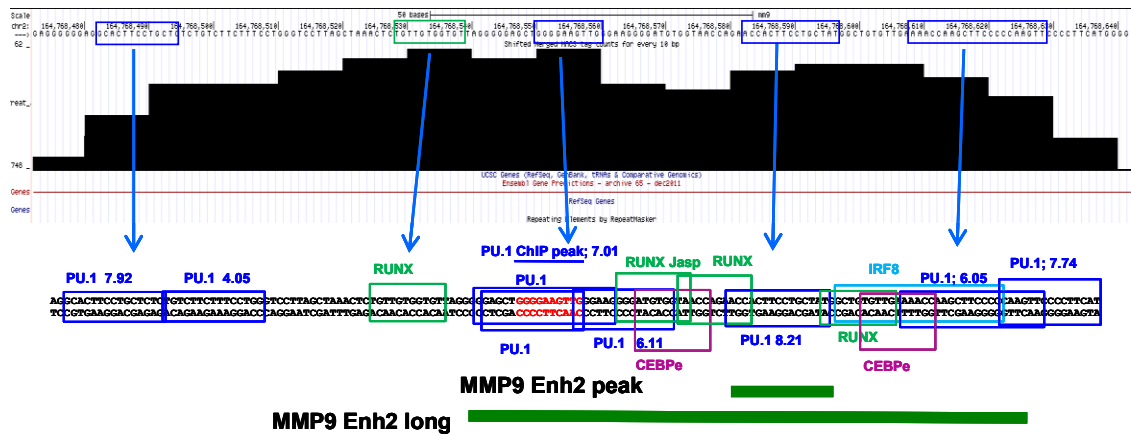
Abychom experimentálně otestovali tuto hypotézu (vliv afinity PU.1 vazebných míst), tak jsme se rozhodli zaměnit středně-vysoko afinitní vazebná místa v MPO a MMP9 granulocytárních enhancerech za nízko afinitní místa z PP a enhanceru makrofágového genu CD14, který je na rozdíl od granulocytárních genů MPO a MMP9 aktivován vysokými koncentracemi PU.1, ve kterých již MPO a MMP9 exprimovány nejsou. Prvním krokem byla uvedená analýza afinity vazebných míst a výběr vhodných sekvencí na výměnu. To bylo velmi komplikované z toho důvodu, že i když vrchol křivky ChIP-seq vazby je často lokalizován nad predikovaným vazebným místem, tak v praxi je pod ChIP-seq vazbou možné nalézt často mnohonásobná vazebná místa, jež mohou zvyšovat celkovou vazebnou afinitu. Příklad analýzy a návrh různě afinitních PU.1 vazebných sekvencí určených k záměně je v Obr. 32.

Mým úkolem bylo provést tuto záměnu různě afinitních míst ve vybraných enhancerových reportérech. K mutagenezi jsme použili modifikovanou inverzní PCR. Metoda je založena na designu primerů, které obsahují za prvé: bezprostředně navazující komplementární sekvence z obou stran DNA úseku, jež bude nahrazen. Reverse primer obsahoval tedy upstream komplementární sekvenci a forward primer obsahoval downstream komplementární sekvenci k reportérovému konstrukturu určenému k modifikaci, ohraničující sekvenci PU.1 vazebného místa určenou k nahrazení. Za druhé, k 5' konci reverse primeru byla přidána 5' polovina nízko afinitního vazebného PU.1 místa z CD14 inzertu, který jsme chtěli vložit (nekomplementární k modifikovanému vektoru) a forward primer obsahoval 3' polovinu vkládané sekvence. Pro návrh primerů byla použita syntéza analýz afinity PU.1 vazebných míst, predikcí vazeb a pozic PU.1 vazebných křivek. Navržené sekvence k deleci a vložení byly sestaveny v programu *NEBaseChanger.neb.com*. Záměna míst je schematicky zobrazena v Obr. 33.

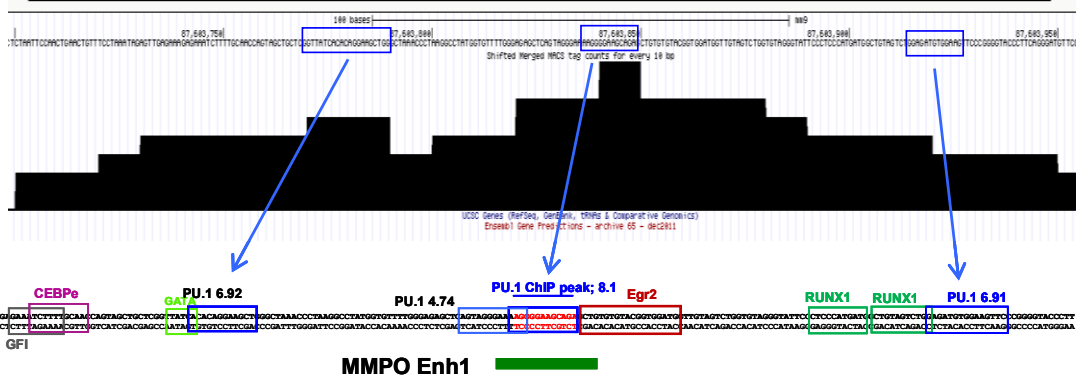
CD14 promotor



MMP9 Enh 2

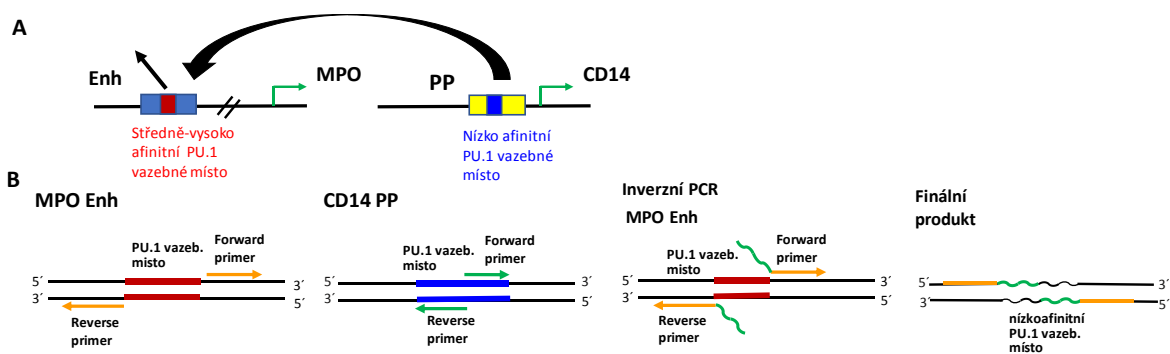


MPO Enh 1



Obr. 32: Analýza PU.1 ChIP-seq vazeb pro záměnu PU.1 vazebných sekvencí. V horní části obrázků CD14 promotoru a MMP9 Enhanceru 2 jsou zobrazeny PU.1 ChIP-seq vazebné křivky, v dolní části zobrazeny promotorové a enhancerové DNA sekvence s predikcí vazeb transkripčních faktorů. Čísla indikují relativní afinitu PU.1 vazebných míst. Zelené boxy pod sekvencemi označují sekvence navržené na vzájemnou výměnu, PU.1 vazebné sekvence v MMP9 enhanceru budou nahrazeny sekvencemi z CD14 promotoru.

Celkem jsme nahrazovali PU.1 vazebná místa v 6ti enhancerových reportérech (MPO: PP3, PP3E1, E3, MMP9: E2, E6, E2E6), přičemž u některých se variantně lišila délka nahrazované sekvence, ta buď obsahovala pouze jednu vazebnou sekvenci PU.1 pod centrem ChIP-seq vazebné křivky nebo obsahovala delší úsek s více PU.1 vazebnými sekvencemi, alternativně obsahovala predikované sekvence kooperujících transkripčních faktorů. Celkem jsme vkládali 4 varianty inzertů – CD14 PP peak (20 bp), CD14 PP long (91 bp), CD14 enh short (21 bp) a CD14 enh (51 bp). Cd14 PP peak a CD14 enh short obsahovaly 1 vazebné místo PU.1, CD14 PP long a CD14 enh obsahovaly delší úsek pod vazebnou křivkou obsahující 2 až 3 vazebná místa PU.1 (viz Tab. 8).



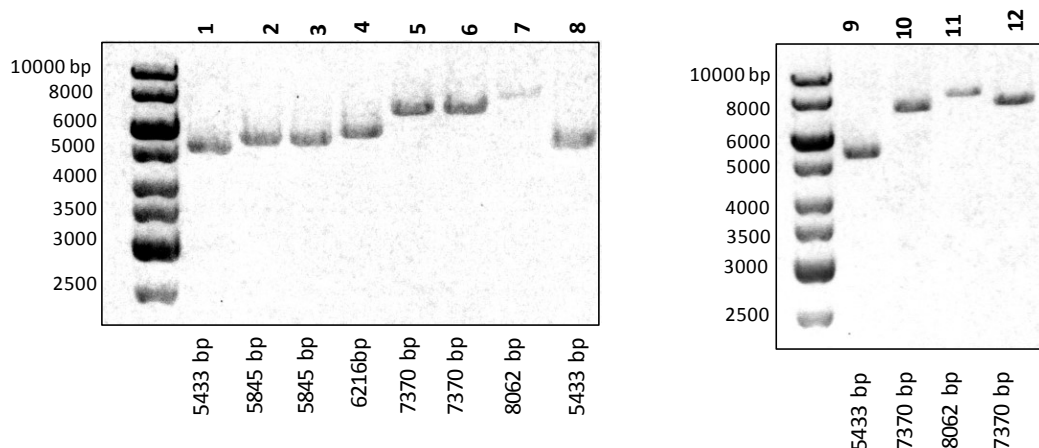
Obr. 33: Schématické znázornění výměny vazebných míst PU.1 a návrh primerů. (A) Středně-vysoko afinitní vazebné místo v MPO a MMP9 enhancerech bude vyměněno za nízko afinitní vazebné místo z PP makrofágového genu CD14. **(B)** Schéma návrhu primerů pro inverzní PCR. Primery byly navrženy tak že 5' konec F i R primeru obsahoval polovinu sekvence inzertu, jež jsme vkládali a 3' konec F a R primeru obsahoval komplementární část k úseku, který ohraničoval vazebné místo, které jsme chtěli nahradit. Enh - enhancer, PP-proximální promotor, oranžová šipka vyznačuje komplementární část k vektoru, zelená šipka vyznačuje komplementární část k inzertu, zelené vlnovka- polovina vkládaného inzertu, oranžová čára-komplementární část k vektoru, která ohraničuje vazebné místo k nahrazení.

Následně jsme provedli inverzní PCR pomocí high fidelity Q5 polymerázy (NEB) polymerázy (NEB, Tm 64 °C) (viz Obr. 34). Amplifikované produkty jsme následně modifikovali enzymatickou reakcí pomocí KLD enzymového mixu (Kinase-Ligase-DpnI, NEB). KLD enzymatická reakce je schopná v jedné reakci provést fosforylaci konců PCR fragmentů, jejich ligaci a cirkularizaci vektoru a současně degradaci templátové DNA. Poté jsme tyto mutované konstrukty transformovali do bakterií s vysokou účinností transformace. Z kolonií, které narostly na agarové plotně, jsme izolovali DNA, přítomnost vektoru ověřili na agarózovém gelu a dali osekvenovat pro ověření, zda zde došlo k záměně vazebného místa.

Z celkem 12 navržených variant se nám podařilo připravit 8 konstruktů s kompletní záměnou PU.1 vazebných míst. Z těchto konstruktů byly následně namnoženy bakteriální kultury a purifikována DNA.

Číslo	Vektor	Nahrazovaná sekvence	Nahrazovaná sekvence	Inzert	Sekvence inzertu
1	MPO pGI3PP3	MPO PP3	TAAGAGGAAGGGGCTGTGGAGAGAGAGGAAGTTGCC	CD14 PP peak	CGAAAAACAGGAAGTAATCAG
2	MPO pGI3PP3E1.3	MPO PPE1 s Egr2 vazebným místem	GGAAAAGGGGAAGCAGAGCTGTGTACGGTGG		
3	MPO pGI3PPE1.3	MPO PPE1 bez Egr2 vazebného místa	GGGAAAAGGGGAAGCAGAGC		
4	MPO pGI3PPE1.3E3	MPO PPE3	GGCCTGTCTCTCCAGAA		
5	MMP9 pClucPPE2.2	MMP9 E2 ChIP peak	GGGAGCTGGGGAAGTTGGGAAG		
6	MMP9 pClucPPE2.2	MMP9 E2 long	GAGCTGGGGAAGTTGGGAAGGGATGTGGTAACCAAGCACTTCTGCTATG		
7	MMP9 pClucPP E2.2E6	MMP9 E6	CCCCAGCTTCTCTCCAGCA		
8	MPO pGI3PP3	MPO PP3	TAAGAGGAAGGGGCTGTGGAGAGAGAGGAAGTTGCC	CD14 Enh	CCCCCTCTCTGTGAAGCTAATGTCTTCCATTTCTCTCTCTAAACA
9	MPO pGI3PP3	MPO PP3	TAAGAGGAAGGGGCTGTGGAGAGAGAGGAAGTTGCC	CD14 enh short	ATTCTCTCTCTCTAAACAGC
10	MMP9 pClucPPE2.2	MMP9 E2 ChIP peak	GGGAGCTGGGGAAGTTGGGAAG		
11	MMP9 pClucPP E2.2E6	MMP9 E6	CCCCAGCTTCTCTCCAGCA		
12	MMP9 pClucPPE2.2	MMP9 E2 long	GAGCTGGGGAAGTTGGGAAGGGATGTGGTAACCAAGCACTTCTGCTATG	CD14PP long	CACCTTCTCTCTCTCTAAACAGCCCTACTACTCTCTAGTAAATTTGCA ACGAAGTGTTTTTTAGGAAGGGACGAAAAACAGGAAGTAATCA

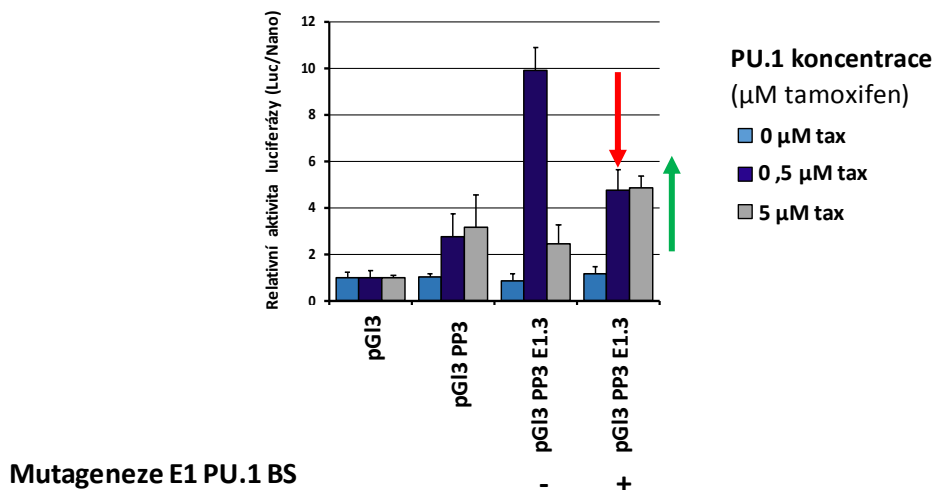
Tab. 8: Vkládané inzerty a nahrazované sekvence ve vektorech.



Obr. 34: Amplifikace vektorů se zaměněnými vazebnými místy PU.1. K amplifikaci použita modifikovaná inverzní PCR. Názvy konstruktů viz Tab. 8, 1,5 % agarózový gel.

Vytvořené reportérové vektory nesoucí enhancerové sekvence se zaměněnými PU.1 vazebnými místy byly následně testovány na jejich aktivační schopnosti během granulocytární a makrofágové diferenciaci PUER progenitorů (0, 0,5 a 5 μ M tax, 72 hodin). V případě pozitivního výsledku, jsme očekávali změnu aktivace mutovaných enhancerů v porovnání s nemutovanými.

V Obr. 35 je znázorněn reprezentativní výsledek záměny PU.1 vazebného místa ve vektoru pGL3 MPO PP3 E1.3 za PU.1 vazebné místo z CD14 promotoru. Je patrné, že nahrazení granulocytárního středně/vysoko afinitního PU.1 vazebného místa v MPO enhanceru za PU.1 nízko afinitní vazebné místo z CD14 promotoru vedlo k signifikantnímu snížení aktivačních schopností MPO Enhanceru 1 ve střední (granulocytární) koncentraci PU.1 a naopak k zvýšení jeho aktivačních schopností ve vysoké (makrofágové) PU.1 koncentraci. To znamená, že záměna jednoho PU.1 vazebného místa v granulocytárním Enhanceru 1 za makrofágové PU.1 vazebné místo (CD14) byla schopná přeprogramovat aktivitu tohoto enhanceru v odpovědi na stoupající PU.1 koncentraci. Tato data naznačují, že různě afinitní PU.1 vazebná místa v regulačních sekvencích PU.1 cílových genů pravděpodobně představují mechanismus, kterým vnímají cílové geny rozdílné koncentrace transkripčního faktoru PU.1, které následně indukují diferenciaci myeloidních progenitorů do různých krevních linií.



Obr. 35: Záměna vazebného místa v pGL3 MPO PP3 E1.3 enhancerovém reportéru.

Jsou zobrazeny kontrolní vektory pGL3 a pGL3 PP3 a dále konstrukt pGL3 MPO PP3 E1.3 s nemutovaným a mutovaným PU.1 vazebným místem. Šipky označují změnu aktivačních schopností mutovaného pGL3 MPO PP3 E1.3 vektoru ve srovnání s nemutovaným parentálním vektorem pGL3 MPO PP3 E1.3. Pod grafem je vyznačena přítomnost zaměněné mutované PU.1 vazebné sekvence. Y osa vyjadřuje aktivitu indikovaných pGL3 konstruktů normalizovanou ke kontrolní Nano luciferáze a vztaženou k aktivitě prázdného pGL3 vektoru, + směrodatná odchylka (N=2).

Souhrnně výsledky této diplomové práce ukazují, že různé koncentrace transkripčního faktoru PU.1 jsou cílovými geny vnímány komplexním mechanismem, kterého se účastní

různě afinitní PU.1 vazebná místa v mnohočetných genově regulačních sekvencích, které v některých genech sestavují superenhancery.

5. Diskuze

Tato diplomová práce je součástí širšího projektu naší laboratoře, který popisuje molekulární mechanismy, jak různé koncentrace transkripčního faktoru PU.1 regulují specifické cílové geny a indukují diferenciaci myeloidních progenitorů do různých krevních linií. Hlavním úkolem mé diplomové práce bylo vytvořit a otestovat sérii luciferázových reportérových konstruktů, které umožní studovat regulaci transkripce granulocytárních genů MPO a MMP9 rozdílnými koncentracemi transkripčního faktorů PU.1.

PU.1 je transkripční faktor (TF), který je absolutně nezbytný pro normální krvetvorbu, konkrétně pro vývoj myeloidní a lymfoidní krevní řady. Je řada nepřímých indicií, že rozdílné koncentrace PU.1 hrají roli v diferenciaci krvetvorných buněk do odlišných buněčných linií a jejich narušení vede k leukemogenezi (Back *et al*, 2005; Dahl *et al*, 2003; DeKoter & Singh, 2000; Rosenbauer *et al*, 2004; Laslo *et al*, 2006). Výsledky naší laboratoře ukazují, že střední koncentrace PU.1 indukuje diferenciaci krvetvorných progenitorových buněk do granulocytů, zatímco vysoká koncentrace PU.1 indukuje diferenciaci do makrofágové krevní linie.

Význam přesných koncentrací PU.1 v průběhu hematopoetické diferenciace je podpořen velmi složitým způsobem regulace PU.1 genu samotného. Regulace exprese PU.1 je detailně studována a PU.1 může složit jako model komplexní genové regulace. Exprese buněčně specifických koncentrací PU.1 je regulována několika konzervovanými enhancery (URE, upstream regulatory element) v -15/-14 kb (relativně k TSS) (Rosenbauer *et al*, 2004) a dále -12 kb (Leddin *et al*, 2011). Ty jsou oba aktivní v makrofázích, což zajišťuje maximální PU.1 expresi, zatímco v B buňkách, které mají nízké koncentrace PU.1, je funkční pouze -15/-14 kb enhancer. -15/-14 kb URE reguluje také expresi antisense nekódujícího RNA transkriptu v třetím PU.1 intronu, jež negativně reguluje expresi PU.1 (Ebraldize *et al*, 2008). Samotné PU.1 pozitivně reguluje svoji expresi vazbou do svého 15/-14 kb (Staber *et al*, 2013). Koncentrace PU.1 jsou navíc postranskripčně koregulovány mikroRNA miR-155 a dalšími mikroRNA (Vargova *et al*, 2011).

Není jednotný názor, zda rozdílné koncentrace transkripčního faktoru PU.1 jsou příčinou, nebo následkem krvetvorné diferenciace. Před mým příchodem do naší laboratoře vznikla charakterizace a diferenciace PUER progenitorové linie, která se stala základem pro moji diplomovou práci. Experimenty z naší laboratoře, které byly dělány v PUER myeloidní linii ukazují, že manipulace koncentrací PU.1 vede k diferenciaci těchto myších myeloidních progenitorů do odlišných krevních linií, a to buď makrofágové, nebo granulocytární linie.

Tyto experimenty indikují, že přesné koncentrace PU.1 jsou pravděpodobně hybnou silou diferenciaci.

Výše popsané komplexní mechanismy regulace genu PU.1 indikují, že přesné koncentrace PU.1 jsou velmi důležité. V kontrastu s velmi podrobně popsanými mechanismy regulace PU.1 samotného, tak mechanismy, na nichž pracuje naše laboratoř, tj. jak jsou přesné koncentrace PU.1 vnímány jeho cílovými geny, nejsou známy.

Celogenomové ChIP-seq analýzy naší laboratoře ukazují, že PU.1 se váže do 40 až 50 000 vazebných sekvencí během diferenciaci myeloidních progenitorů. Většina vazebných sekvencí se nachází v oblastech, které jsou od genů „upstream“, „downstream“, nebo v intragenních/intronových sekvencích vzdálených alespoň 1 kb od anotovaného TSS. To indikuje, že většina PU.1 vazeb je v distálních regulačních sekvencích tj. v enhancerech. Vazby do těchto oblastí mimo promotor ukazují, že PU.1 je transkripční faktor, který přednostně reguluje distální, enhancerové regulační sekvence. U řady genů se PU.1 navíc váže do mnohočetných regulačních oblastí. Tyto oblasti zahrnují husté multiplicity vazby PU.1 do řady genů, což naznačuje, že PU.1 je zapojen do regulace nově objevených superenhancerů (nepublikovaná data naší laboratoře a (Hnisz *et al*, 2013; Heinz *et al*, 2010). Tyto celogenomové metody mají ale své limitace a vazby identifikované pomocí ChIP-seq metody nevypovídají nic o funkčnosti těchto PU.1 vazeb do regulačních sekvencí a mechanismech, jimiž tyto regulační oblasti regulují cílové geny. Z tohoto důvodu jsme se rozhodli analyzovat multiplicitní vazby PU.1 do konkrétních granulocytárních genů MPO a MMP9 a *in vitro* ověřit jejich funkčnost v luciferázových reportérech.

Naše analýzy regulačních oblastí genů MPO a MMP9 identifikovaly 14 potenciálních PU.1 regulovaných enhancerů v genu MMP9 a 3 potenciální enhancery v lokusu MPO. Hustě rozmístěné vazby PU.1 do lokusu MMP9 genu napovídají, že v tkáňově specifickém kontextu dochází pravděpodobně k sestavení těchto sekvencí do superenhanceru. To podporují i další data z naší laboratoře za použití 3C technik (chromosome conformation capture), identifikujících prostorovou interakci mezi DNA lokusy.

Superenhancery jsou nově objevená seskupení mnohočetných enhancerů, které hrají zásadní úlohu při aktivaci tkáňově specifických genů, určení buněčné identity a indukci diferenciaci (Whyte *et al*, 2013; Hnisz *et al*, 2013). Superenhancery se sestavují zejména v buněčně specifických genech, nebo např. aberantně vznikají v onkogenech (Pombo & Dillon, 2015). Přestože je detailně popsán význam superenhancerů pro tkáňově specifickou

diferenciaci či jejich deregulace v karcinogenezi, tak role jednotlivých složek, z kterých je sestaven superenhancer- tj. jednotlivých enhancerů, je víceméně neznámá. Je publikováno minimum dat o tom, jaký je individuální příspěvek jednotlivých složek superenhanceru a jejich nepostradatelnost či redundance pro celkovou aktivaci genu (Hnisz *et al*, 2015; Suzuki *et al*, 2017).

Z tohoto důvodu jsme se rozhodli v tomto projektu otestovat roli jednotlivých kooperujících enhancerů pomocí luciferázových konstruktů. Abychom otestovali naši hypotézu, že se MPO a MMP9 enhancery sestavují do superenhanceru, tak jsme se navíc rozhodli postupně kombinatoricky sestavit superenhancery *in vitro*. Mým úkolem bylo právě vyklonování luciferázových konstruktů nesoucí vícečetné regulační sekvence MPO a MMP9, které umožní studium výše uvedených otázek. Luciferázový systém je léty prověřená technika, velmi často používaná pro testování funkčnosti a aktivačních schopností genově regulačních sekvencí. Námítka ale může být, že je do určité míry arteficiální. Další námítka může být, že v luciferázovém konstruktů může chybět kontext okolních sekvencí – např. vazebná místa kooperujících faktorů, nebo správný kontext chromatinové struktury. Abychom obešli tyto možné slabiny systému, vkládali jsme do luciferázových konstruktů enhancerové úseky dlouhé 600-1500 nt. Je známo, že vektory jsou schopné přijmout za tkánově specifických podmínek strukturu chromatinu dostatečně dlouhého vloženého úseku (V. Riu *et al*, 2007; Mladenova *et al*, 2014; Kamiya *et al*, 2013;). Abychom zajistili přítomnost všech nutných kofaktorů, tak vytvořené enhancerové reportérové konstrukty byly testovány v nativní linii PUER myelodních progenitorů při granulocytární nebo makrofágové diferenciaci, iniciované vzrůstající koncentrací PU.1.

Lepší alternativou by se logicky mohlo zdát inaktivovat individuální enhancery přímo v buňkách CRISPR-Cas9 technikou. To je fyziologičtější postup, nicméně v případě mnohočetných sekvencí (v našem případě 48 testovaných vektorů) prakticky nerealizovatelný a jeho použití by bylo příliš ambiciózní, navíc CRISPR-Cas9 neumožňuje kombinatorní testování, tj. postupné skládání různých kombinací enhancerů do superenhancerů, popř. jejich deleční analýzy. Nicméně i přesto v projektu, jehož je tato diplomová práce součástí, plánujeme vybrané enhancery ověřené funkčně v luciferázových konstruktech otestovat inaktivací CRISPR-Cas9. V jiných biologických modelech CRISPR-Cas9 inaktivace složek superenhancerů ukázala, že většina složek testovaných superenhancerů je neredundantních a přispívá k transkripční aktivitě (např. v genu POU5f1 (OCT4) (Hnisz *et al*, 2015), nebo v miR-290-295 (Suzuki *et al*, 2017).

V této diplomové práci se podařilo vyklonovat celkem 48 enhancerových luciferázových konstruktů a jejich delčnických variant, včetně kombinatorického sestavování jednotlivých enhancerů. To se dříve nepodařilo laboratoři objevitelů superenhancerů (Hnisz *et al*, 2015).

Výsledky funkčního testování enhancerových reportérů poukazují na to, že pro optimální tkáňově specifickou expresi granulocytárních genů MPO a MMP9 je nutná spolupráce mnohočetných enhancerů, které se pravděpodobně skládají do superenhanceru. K aktivaci MPO a MMP9 enhancerů dochází pouze ve střední koncentraci PU.1, jež indukuje granulocytární diferenciaci, ale nikoliv ve vysoké koncentraci, jež indukuje makrofágovou diferenciaci. Granulocytární geny zároveň nesou vysoko/středně afinitní vazebná místa PU.1, což vysvětluje, proč jsou aktivovány střední PU.1 koncentrací.

Zajímavé je, že zatímco aktivační potenciál jednotlivých MPO a MMP9 enhancerů byl relativně nízký, tak výrazně stoupal v přítomnosti ostatních enhancerů. Dalším originálním, dříve nepublikovaným výsledkem je objev enhancerů, jež samotné nemají aktivační vlastnosti, a ty se projeví až v přítomnosti – kontaktu dalších enhancerů a/nebo proximálního promotoru.

Tyto závěry plně podporují i další data z naší laboratoře. Experimenty testující prostorovou interakci za použití 3C technik (Chromosome conformation capture) ukazují, že enhancery E1 a E2 genu MPO interagují s proximálním promotorem a také navzájem. V případě MMP9 jsme identifikovali vícečetné interakce putativních enhancerů s promotorem.

Současně s testováním luciferázových konstruktů probíhalo v naší laboratoři testování nativní aktivity enhancerů pomocí detekce enhancerových eRNA. Jak je psáno v úvodu, aktivní enhancery transkribují krátké nekódující bidirekcionální RNA (Kim *et al*, 2010; de Santa *et al*, 2010). Navrhli jsme proto obousměrné primery a změřili expresi eRNA specifických pro testované enhancery během diferenciaci myeloidních progenitorů.

Tyto experimenty ukázaly, že exprese eRNA korelovala s funkční aktivitou testovaných enhancerů v luciferázových konstruktech. To indikuje, že obojí, jak luciferázové konstrukty, tak eRNA, jsou vhodné pro měření endogenní aktivity enhancerových sekvencí, což je ve shodě s (Lam *et al*, 2013).

V další části diplomové práce jsme testovali naši hypotézu, že regulační sekvence granulocytárních genů nesou středně/vysoko afinitní vazebná místa PU.1, zatímco makrofágové geny nesou nízko/středně afinitní PU.1 vazebná místa. To je podpořeno

několika publikacemi, jež popisují existenci různě afinitních PU.1 vazebných míst (Pham *et al*, 2013; Poon, 2012). Nicméně tyto publikace nepopisují biologickou úlohu tohoto fenoménu. My se domníváme, že různě afinitní PU.1 vazebná místa jsou senzorem rozdílných hladin PU.1. Z toho důvodu jsme se rozhodli tuto hypotézu otestovat záměnou středně-vysoko afinitní vazebných míst v MPO a MMP9 granulocytárních enhancerech za nízko afinitní místa z makrofágového genu CD14. Testování těchto enhancerových reportérů s mutovanými PU.1 vazebnými místy během granulocytární a makrofágové diferenciace PUER progenitorů ukázalo, že záměna afinity jednoho PU.1 vazebného místa byla schopná přeprogramovat aktivační schopnosti enhancerů v odpovědi na různé koncentrace PU.1 (Obr. 35). To indikuje, že různě afinitní vazebná místa PU.1 jsou mechanismem, kterým cílové geny vnímají instrukce různých koncentrací transkripčního faktoru PU.1. Předpokládáme, že tento mechanismus by mohl být univerzální a platit i pro jiné transkripční faktory, které regulují v rozdílných koncentracích různé geny.

Souhrnně výsledky této diplomové práce ukazují, že různé koncentrace transkripčního faktoru PU.1 jsou cílovými geny vnímány komplexním mechanismem, kterého se účastní různě afinitní PU.1 vazebná místa v mnohočetných genově regulačních sekvencích, které v některých genech sestavují superenhancery.

Vytvořené luciferázové konstrukty nesoucí multiplicitní enhancerové sekvence genů MPO a MMP9 a jejich verze s mutovanými vazebnými místy budou následně využity v naší laboratoři k testování během diferenciace PUER progenitorů za současné inhibice (si/shRNA) nebo nadprodukce vybraných liniově specifických transkripčních faktorů, a bude testována možnost, že granulocytární geny jsou ve vysoké koncentraci PU.1 reprimovány PU.1 cílovými makrofágovými geny - transkripčními faktory indukovanými vysokou hladinou PU.1, jak naznačuje dříve publikovaná studie (Laslo *et al*, 2006).

6. Souhrn

Hlavním cílem mé diplomové práce bylo vytvořit molekulární nástroj umožňující studium, jak jsou liniově specifické geny transkripčně regulovány mnohočetnými regulačními sekvencemi (superenhancery) a jak jsou těmito regulačními sekvencemi vnímány instrukce různých koncentrací transkripčního faktoru PU.1 během hematopoetické diferenciaci.

Diplomová práce vedla k následujícím výsledkům:

1. Vytvořili jsme dohromady 48 luciferázových reportérových konstruktů nesoucích potenciální enhancery granulocytárních genů MPO a MMP9 a jejich varianty.
2. Vytvořené luciferázové konstrukty byly následně testovány při granulocytární a makrofágové diferenciaci myeloidních progenitorů iniciované stoupajícími koncentracemi transkripčního faktoru PU.1
3. Funkční testování vedlo k následujícím závěrům:
 1. Pro optimální tkáňově specifickou aktivaci granulocytárních genů MPO a MMP9 je nezbytná spolupráce vícečetných enhancerů a proximálního promotoru, které se sestavují do superenhanceru.
 2. Zatímco aktivační potenciál jednotlivých enhancerů je relativně nízký, tak výrazně graduálně stoupá v přítomnosti ostatních enhancerů a proximálního promotoru, což poukazuje na aditivní efekt spolupráce jednotlivých enhancerů, nezbytný pro tkáňově specifickou expresi MPO a MMP9 genů.
4. Abychom ověřili naši hypotézu vnímání PU.1 koncentrací různě afinitními vazebnými DNA sekvencemi, mutovali jsme PU.1 vazebná místa ve vybraných enhancerech. Středně-vysoko afinitní vazebné místa v MPO a MMP9 granulocytárních enhancerech byla nahrazena za nízko afinitní místa z PP a Enhanceru makrofágového genu CD14.
5. Testování mutovaných konstruktů při diferenciaci myeloidních progenitorů ukázalo, že změna afinity PU.1 vazebného místa vedla k přeprogramování aktivační schopnosti enhancerů v odpovědi na různé koncentrace PU.1. To potvrzuje naši hypotézu, že různě afinitní vazebná místa PU.1 jsou mechanismem, kterým cílové geny vnímají instrukce různých koncentrací transkripčního faktoru PU.1.

6. Vytvořené luciferázové enhancerové konstrukty a jejich mutace budou následně testovány za inhibice (si/shRNA) nebo nadprodukce vybraných PU.1 dependentních kooperujících transkripčních faktorů.

7. Seznam použité literatury

- Adolfsson J, Borge OJ, Bryder D, Theilgaard-Mönch K, Åstrand-Grundström I, Sitnicka E, Sasaki Y & Jacobsen SEW (2001) Upregulation of Flt3 expression within the bone marrow Lin-Scal+c-kit+stem cell compartment is accompanied by loss of self-renewal capacity. *Immunity* **15**: 659–669
- Arinobu Y, Mizuno S ichi, Chong Y, Shigematsu H, Iino T, Iwasaki H, Graf T, Mayfield R, Chan S, Kastner P & Akashi K (2007) Reciprocal Activation of GATA-1 and PU.1 Marks Initial Specification of Hematopoietic Stem Cells into Myeloerythroid and Myelolymphoid Lineages. *Cell Stem Cell* **1**: 416–427
- Akashi K, Traver D, Miyamoto T & Weissman IL (2000) A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature* **404**: 193-7
- Alberts, Bruce. *Molecular biology of the cell*. Sixth edition. New York, NY: Garland Science, Taylor and Francis Group, [2015]. ISBN 978-0815345244
- Allen BL & Taatjes DJ (2015) The Mediator complex: A central integrator of transcription. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **16**: 155–166
- Amano T, Sagai T, Tanabe H, Mizushina Y, Nakazawa H & Shiroishi T (2009) Chromosomal dynamics at the Shh locus: limb bud-specific differential regulation of competence and active transcription. *Dev. Cell* **16**: 47–57
- Andersson R, Gebhard C, Miguel-Escalada I, Hoof I, Bornholdt J, Boyd M, Chen Y, Zhao X, Schmidl C, Suzuki T, Ntini E, Arner E, Valen E, Li K, Schwarzfischer L, Glatz D, Raithel J, Lilje B, Rapin N, Bagger FO, et al (2014) An atlas of active enhancers across human cell types and tissues. *Nature* **507**: 455–461
- Arinobu Y, Iwasaki H, Gurish MF, Mizuno S, Shigematsu H, Ozawa H, Tenen DG, Austen KF & Akashi K (2005) Developmental checkpoints of the basophil/mast cell lineages in adult murine hematopoiesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**: 18105–10
- Back J, Allman D, Chan S & Kastner P (2005) Visualizing PU.1 activity during hematopoiesis. *Exp. Hematol.* **33**: 395–402
- Banerji J, Olson L & Schaffner W (1983) A lymphocyte-specific cellular enhancer is located downstream of the joining region in immunoglobulin heavy chain genes. *Cell* **33**: 729–740
- Banerji J, Rusconi S & Schaffner W (1981) Expression of a β -globin gene is enhanced by remote SV40 DNA sequences. *Cell* **27**: 299–308
- van Berkum NL, Lieberman-Aiden E, Williams L, Imakaev M, Gnirke A, Mirny LA, Dekker J & Lander ES (2010) Hi-C: a method to study the three-dimensional architecture of genomes. *J. Vis. Exp.*: 1869
- Burke TW & Kadonaga JT (1997) The downstream core promoter element, DPE, is conserved from Drosophila to humans and is recognized by TAFII60 of Drosophila. *Genes Dev.*: 3020–3031
- Chalkley GE & Verrijzer CP (1999) DNA binding site selection by RNA polymerase II TAFs: A TAF(II)250-TAF(II)150 complex recognizes the initiator. *EMBO J.* **18**: 4835–4845

- Chang HC, Zhang S, Thieu VT, Slee RB, Bruns HA, Laribee RN, Klemsz MJ & Kaplan MH (2005) PU.1 expression delineates heterogeneity in primary Th2 cells. *Immunity* **22**: 693–703
- Core LJ, Waterfall JJ & Lis JT (2008) Nascent RNA Sequencing Reveals Widespread Pausing and Divergent Initiation at Human Promoters. *Science* **322**: 1845–1848
- Crick F (1970) Central Dogma of Molecular Biology. *Nature* **227**: 561–563
- Creyghton MP, Cheng AW, Welstead GG, Kooistra T, Carey BW, Steine EJ, Hanna J, Lodato M a, Frampton GM, Sharp P a, Boyer L a, Young R a & Jaenisch R (2010) Histone H3K27ac separates active from poised enhancers and predicts developmental state. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**: 21931–21936
- Dahl R, Walsh JC, Lancki D, Laslo P, Iyer SR, Singh H & Simon MC (2003) Regulation of macrophage and neutrophil cell fates by the PU.1:C/EBP α ratio and granulocyte colony-stimulating factor. *Nat. Immunol.* **4**: 1029
- Davies JOJ, Oudelaar a M, Higgs DR & Hughes JR (2017) How best to identify chromosomal interactions: a comparison of approaches. *Nat. Methods* **14**: 125–134
- Davies JO, Telenius JM, McGowan SJ, Roberts NA, Taylor S, Higgs DR & Hughes JR (2015) Multiplexed analysis of chromosome conformation at vastly improved sensitivity. *Nat. Methods* **13**: 74-80
- Dekker J (2002) Capturing Chromosome Conformation. *Science* **295**: 1306–1311
- Dekker J (2006) The three ‘C’ s of chromosome conformation capture: controls, controls, controls. *Nat. Methods* **3**: 17–21
- Dekker J, Marti-Renom MA & Mirny LA (2013) Exploring the three-dimensional organization of genomes: interpreting chromatin interaction data. *Nat. Rev. Genet.* **14**: 390–403
- DeKoter RP & Singh H (2000) Regulation of B lymphocyte and macrophage development by graded expression of PU.1. *Science* **288**: 1439-1441
- DeKoter RP, Lee HJ & Singh H (2002) PU.1 regulates expression of the interleukin-7 receptor in lymphoid progenitors. *Immunity* **16**: 297–309
- Deng W, Roberts SGE, Deng W & Roberts SGE (2005) A core promoter element downstream of the TATA box that is recognized by TFIIB service A core promoter element downstream of the TATA box that is recognized by TFIIB. *Genes Dev.* **19**: 2418–2423
- Dixon JR, Selvaraj S, Yue F, Kim A, Li Y, Shen Y, Hu M, Liu JS & Ren B (2012) Topological domains in mammalian genomes identified by analysis of chromatin interactions. *Nature* **485**: 376–380
- Dolores Delgado M & León J (2006) Gene expression regulation and cancer. *Clin. Transl. Oncol.* **8**: 780–787
- Ebralidze AK, Guibal FC, Steidl U, Zhang P, Lee S, Bartholdy B, Jorda MA, Petkova V, Rosenbauer F, Huang G, Dayaram T, Klupp J, Brien KBO, Will B, Hoogenkamp M, Borden KLB, Bonifer C & Tenen DG (2008) PU.1 expression is modulated by the balance of functional sense and antisense RNAs regulated by a shared cis-regulatory element. *Genes Dev.* **22**: 2085–2092

- Ernst J & Kellis M (2010) Discovery and characterization of chromatin states for systematic annotation of the human genome. *Nat. Biotechnol.* **28**: 817–825
- FitzGerald PC, Sturgill D, Shyakhtenko A, Oliver B & Vinson C (2006) Comparative genomics of Drosophila and human core promoters. *Genome Biol.* **7**: R53
- Fogg D, Sibon C, Miled C, Jung S, Aucouturier, Dan R, Littman, Ana Cumano FG (2006) A clonogenic bone marrow progenitor specific for macrophages and dendritic cells. *Science* **311**: 83–88
- van Groningen T, Koster J, Valentijn LJ, Zwijnenburg DA, Akogul N, Hasselt NE, Broekmans M, Haneveld F, Nowakowska NE, Bras J, van Noesel CJM, Jongejan A, van Kampen AH, Koster L, Baas F, van Dijk-Kerkhoven L, Huizer-Smit M, Lecca MC, Chan A, Lakeman A, et al (2017) Neuroblastoma is composed of two super-enhancer-associated differentiation states. *Nat. Genet.* **49**: 1261-1266
- Grünberg S & Hahn S (2013) Structural insights into transcription initiation by RNA polymerase II. *Trends Biochem. Sci.* **38**: 603–611
- He HH, Meyer C a, Shin H, Bailey ST, Wei G, Wang Q, Zhang Y, Xu K, Ni M, Lupien M, Mieczkowski P, Lieb JD, Zhao K, Brown M & Liu XS (2010) Nucleosome dynamics define transcriptional enhancers. *Nat. Genet.* **42**: 343–7
- Heintzman ND, Stuart RK, Hon G, Fu Y, Ching CW, Hawkins RD, Barrera LO, Van Calcar S, Qu C, Ching K a, Wang W, Weng Z, Green RD, Crawford GE & Ren B (2007) Distinct and predictive chromatin signatures of transcriptional promoters and enhancers in the human genome. *Nat. Genet.* **39**: 311–8
- Heinz S, Benner C, Spann N, Bertolino E, Lin YC, Laslo P, Cheng JX, Murre C, Singh H & Glass CK (2010) Simple combinations of lineage-determining transcription factors prime cis-regulatory elements required for macrophage and B cell identities. *Mol. Cell* **38**: 576–589
- Heinz S, Romanoski CE, Benner C & Glass CK (2015) The selection and function of cell type-specific enhancers. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **16**: 144–154
- Hnisz D, Schuijers J, Lin CY, Weintraub AS, Abraham BJ, Lee TI, Bradner JE YR (2016) Convergence of developmental and oncogenic signaling pathways at transcriptional super-enhancers. *Mol. Cell* **28**: 1304–1314
- Hnisz D, Schuijers J, Lin CY, Weintraub AS, Abraham BJ, Lee TI, Bradner JE & Young RA (2015) Convergence of Developmental and Oncogenic Signaling Pathways at Transcriptional Super-Enhancers. *Mol. Cell* **58**: 362–370
- Hnisz D, Abraham BJ, Lee TI, Lau A, Saint-André V, Sigova A a., Hoke H a. & Young R a. (2013) Super-enhancers in the control of cell identity and disease. *Cell* **155**: 934-47
- Hnisz D, Shrinivas K, Young RA, Chakraborty AK & Sharp PA (2017) A Phase Separation Model for Transcriptional Control. *Cell* **169**: 13–23
- Hock H, Hamblen MJ, Rooke HM, Traver D, Bronson RT, Cameron S & Orkin SH (2003) Intrinsic requirement for zinc finger transcription factor Gfi-1 in neutrophil differentiation. *Immunity* **18**: 109–120
- Hořejší, Václav, Jiřina Bartůňková, Tomáš Brdička a Radek Špišek. *Základy imunologie*. 4. vyd. Praha: Triton, 2009. ISBN 978-80-7387-280-9.

- Hsieh C-L, Fei T, Chen Y, Li T, Gao Y, Wang X, Sun T, Sweeney CJ, Lee G-SM, Chen S, Balk SP, Liu XS, Brown M & Kantoff PW (2014) Enhancer RNAs participate in androgen receptor-driven looping that selectively enhances gene activation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **111**: 7319–7324
- Hsieh TS, Weiner A, Dekker J, Friedman N, Oliver J, Hsieh TS, Weiner A, Lajoie B, Dekker J, Friedman N & Rando OJ (2015) Mapping Nucleosome Resolution Chromosome Folding in Yeast by Micro-C Article Mapping Nucleosome Resolution Chromosome Folding in Yeast by Micro-C. *Cell* **162**: 108–119
- Hughes JR, Roberts N, McGowan S, Hay D, Giannoulatou E, Lynch M, De Gobbi M, Taylor S, Gibbons R & Higgs DR (2014) Analysis of hundreds of cis-regulatory landscapes at high resolution in a single, high-throughput experiment. *Nat. Genet.* **46**: 205
- Iwasaki H, Somoza C, Shigematsu H, Duprez E a, Iwasaki-Arai J, Mizuno S-I, Arinobu Y, Geary K, Zhang P, Dayaram T, Fenyus ML, Elf S, Chan S, Kastner P, Huettnner CS, Murray R, Tenen DG & Akashi K (2005) Distinctive and indispensable roles of PU. 1 in maintenance of hematopoietic stem cells and their differentiation. *Blood* **106**: 1590–1600
- Kamath MB, Houston IB, Janovski AJ, Zhu X, Gowrisankar S, Jegga AG & DeKoter RP (2008) Dose-dependent repression of T-cell and natural killer cell genes by PU.1 enforces myeloid and B-cell identity. *Leukemia* **22**: 1214–1225
- Kamiya H, Miyamoto S, Goto H, Kanda GN & Kobayashi M (2013) Enhanced transgene expression from chromatinized plasmid DNA in mouse liver. *Int. J. Pharm.* **441**: 146–150
- Karsunky H, Zeng H, Schmidt T, Zevnik B, Kluge R, Schmid KW, Dührsen U & Möröy T (2002) Inflammatory reactions and severe neutropenia in mice lacking the transcriptional repressor Gfi1. *Nat. Genet.* **30**: 295-300
- Kaufmann J & Smale ST (1994) Direct recognition of initiator elements by a component of the transcription factor IID complex. *Genes Dev.* **8**: 821–829
- Khazen W, M'Bika JP, Tomkiewicz C, Benelli C, Chany C, Achour A & Forest C (2005) Expression of macrophage-selective markers in human and rodent adipocytes. *FEBS Lett.* **579**: 5631–5634
- Kim T-K, Hemberg M, Gray JM, Costa AM, Bear DM, Wu J, Harmin D a, Laptewicz M, Barbara-Haley K, Kuersten S, Markenscoff-Papadimitriou E, Kuhl D, Bito H, Worley PF, Kreiman G & Greenberg ME (2010) Widespread transcription at neuronal activity-regulated enhancers. *Nature* **465**: 182–7
- Kim TK & Shiekhhattar R (2015) Architectural and Functional Commonalities between Enhancers and Promoters. *Cell* **162**: 948–959
- Klemsz MJ, McKercher SR, Celada A, Van Beveren C & Maki RA (1990) The macrophage and B cell-specific transcription factor PU.1 is related to the ets oncogene. *Cell* **61**: 113–124
- Kondo M, Wagers AJ, Manz MG, Prohaska SS, Scherer DC, Beilhack GF, Shizuru JA & Weissman IL (2003) Biology of hematopoietic stem cells and progenitors: implications for clinical application. *Annu. Rev. Immunol.* **21**: 759–806
- Kondo M, Weissman IL, Akashi K, Akashi K, Weissman IL, Akashi K, Harada M, Shibuya T, Fukagawa K, Kimura N, Sagawa K, Yoshikai Y, Teshima T, Kikuchi M, Niho Y, Akashi K, Taniguchi S, Nagafuji K, Harada M, Shibuya T, et al (1997) Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. *Cell* **91**: 661–72

- Kutach a K & Kadonaga JT (2000) The downstream promoter element DPE appears to be as widely used as the TATA box in Drosophila core promoters. *Mol. Cell. Biol.* **20**: 4754–4764
- Lagrange T, Kapanidis AN, Tang H, Reinberg D & Ebright RH (1998) New core promoter element in RNA polymerase II-dependent transcription: sequence-specific DNA binding by transcription factor IIB. *Genes Dev.* **12**: 34–44
- Lam MTY, Cho H, Lesch HP, Gosselin D, Heinz S, Tanaka-oishi Y, Benner C, Kaikkonen MU, Kim AS, Kosaka M, Lee CY, Watt A, Grossman TR, Rosenfeld MG, Evans RM & Glass CK (2013) Rev-Erbs repress macrophage gene expression by inhibiting enhancer-directed transcription. *Nature* **498**: 511–515
- Laslo P, Spooner CJ, Warmflash A, Lancki DW, Lee HJ, Sciammas R, Gantner BN, Dinner AR & Singh H (2006) Multilineage Transcriptional Priming and Determination of Alternate Hematopoietic Cell Fates. *Cell* **126**: 755–766
- Leddin M, Perrod C, Hoogenkamp M, Ghani S, Assi S, Heinz S, Wilson NK, Follows G, Schönheit J, Vockentanz L, Mosammam AM, Chen W, Tenen DG, Westhead DR, Göttgens B, Bonifer C & Rosenbauer F (2011) Two distinct auto-regulatory loops operate at the PU.1 locus in B cells and myeloid cells. *Blood* **117**: 2827–2838
- Lee DH, Gershenson N, Gupta M, Ilya P, Reinberg D, Lewis BA & Ioshikhes IP (2005) Functional Characterization of Core Promoter Elements: the Downstream Core Element Is Recognized by TAF1 *Mol. Cell. Biol.* **25**: 9674–9686
- Li G, Cai L, Chang H, Hong P, Zhou Q, Kulakova E V., Kolchanov NA & Ruan Y (2014) Chromatin interaction analysis with paired-end tag (ChIA-PET) sequencing technology and application. *BMC Genomics* **15**: S11
- Li W, Notani D, Ma Q, Tanasa B, Nunez E, Chen AY, Merkurjev D, Zhang J, Ohgi K, Song X, Oh S, Kim H-S, Glass CK & Rosenfeld MG (2013) Functional roles of enhancer RNAs for oestrogen-dependent transcriptional activation. *Nature* **498**: 516-520
- Lieberman-Aiden E, van Berkum NL, Williams L, Imakaev M, Ragoczy T, Telling A, Amit I, Lajoie BR, Sabo PJ, Dorschner MO, Sandstrom R, Bernstein B, Bender MA, Groudine M, Gnirke A, Stamatoyannopoulos J, Mirny LA, Lander ES & Dekker J (2009) Comprehensive Mapping of Long-Range Interactions Reveals Folding Principles of the Human Genome. *Science* **326**: 289-293
- Lodish, Harvey F. Molecular cell biology. 6th ed. New York: W.H. Freeman, c2008. ISBN 978-0716776017.
- Mak KS, Funnell APW, Pearson RCM & Crossley M (2011) PU.1 and haematopoietic cell fate: Dosage matters. *Int. J. Cell Biol.* **2011**
- Mathis DJ & Chambon P (1981) The SV40 early region TATA box is required for accurate in vitro initiation of transcription. *Nature* **290**: 310-315
- McKercher SR, Torbett BE, Anderson KL, Henkel GW, Vestal DJ, Baribault H, Klemsz M, Feeney AJ, Wu GE, Paige CJ & Maki RA (1996) Targeted disruption of the PU.1 gene results in multiple hematopoietic abnormalities. *EMBO J.* **15**: 5647–5658
- Mifsud B, Tavares-Cadete F, Young AN, Sugar R, Schoenfelder S, Ferreira L, Wingett SW, Andrews S, Grey W, Ewels PA, Herman B, Happe S, Higgs A, Leproust E, Follows GA, Fraser P, Luscombe NM & Osborne CS (2015) Mapping long-range promoter contacts in human cells with high-resolution capture Hi-C. *Nat. Genet.* **47**: 598–606

- V. Mladenova EM & GR (2014) Organization of Plasmid DNA into Nucleosome- Like Structures after Transfection in Eukaryotic Cells. *Biotechnology & Biotechnological Equipment* **2818**: 1044-1047
- Morrison SJ, Uchida N & Weissman IL (1995) The Biology of Hematopoietic Stem Cells. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **11**: 35–71
- Murakawa Y, Yoshihara M, Kawaji H, Nishikawa M, Zayed H, Suzuki H & Hayashizaki Y (2016) Enhanced Identification of Transcriptional Enhancers Provides Mechanistic Insights into Diseases. *Trends Genet.* **32**: 76–88
- Nerlov C, Querfurth E, Kulesa H & Graf T (2000) GATA-1 interacts with the myeloid PU. 1 transcription factor and represses PU. 1-dependent transcription. *Blood* **95**: 2543–2551
- Nutt SL, Metcalf D, D’Amico A, Polli M & Wu L (2005) Dynamic regulation of PU.1 expression in multipotent hematopoietic progenitors. *J. Exp. Med.* **201**: 221–231
- Okuda T, van Deursen J, Hiebert SW, Grosveld G, Downing JR, Bae S., Yamaguchi-Iwai Y, Ogawa E, Maruyama M, Inuzuka M, Kagoshima H, Shigesada K, Satake M, Ito Y, Boral A., Okenquist S., Lenz J, Daga A, Tighe J., Calabi F, et al (1996) AML1, the target of multiple chromosomal translocations in human leukemia, is essential for normal fetal liver hematopoiesis. *Cell* **84**: 321–30
- Osawa M, Hanada K, Hamada H & Nakauchi H (1996) Long-Term Lymphohematopoietic Reconstitution by a Single CD34-Low/Negative Hematopoietic Stem Cell. *Science* **273**: 242-245
- Pabo C (1992) Transcription Factors: Structural Families and Principles of DNA Recognition. *Annu. Rev. Biochem.* **61**: 1053–1095
- Pham TH, Minderjahn J, Schmidl C, Hoffmeister H, Schmidhofer S, Chen W, Längst G, Benner C & Rehli M (2013) Mechanisms of in vivo binding site selection of the hematopoietic master transcription factor PU.1. *Nucleic Acids Res.* **41**: 6391–6402
- Pombo A & Dillon N (2015) Three-dimensional genome architecture: players and mechanisms. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **16**: 245–257
- Poon GMK (2012) Sequence discrimination by DNA-binding domain of ETS family transcription factor PU.1 is linked to specific hydration of protein-DNA interface. *J. Biol. Chem.* **287**: 18297–18307
- Pospisil V, Vargova K, Kokavec J, Rybarova J, Savvulidi F, Jonasova A, Necas E, Zavadil J, Laslo P & Stopka T (2011) Epigenetic silencing of the oncogenic miR-17-92 cluster during PU.1-directed macrophage differentiation. *EMBO J.* **30**: 4450–4464
- Radomska HS, Huettner CS, Zhang P, Cheng T, Scadden DT & Tenen DG (1998) CCAAT / Enhancer Binding Protein α Is a Regulatory Switch Sufficient for Induction of Granulocytic Development from Bipotential Myeloid Progenitors. *Cell. Biol.* **18**: 4301–14
- Ramani V, Cusanovich DA, Hause RJ, Ma W, Qiu R, Deng X, Blau CA, Disteche CM, Noble WS, Shendure J & Duan Z (2016) Mapping 3D genome architecture through in situ DNase Hi-C. *Nat. Protoc.* **11**: 2104-21
- Razin S V. & Gavrilov AA (2018) Structural–Functional Domains of the Eukaryotic Genome. *Biochem.* **83**: 302–312
- Riu E, Chen Z, Xu H, He C & Kay MA (2007) Histone Modifications are Associated with the Persistence or Silencing of Vector-mediated Transgene Expression In Vivo. *Mol. Ther.* **15**: 1348–135

- Rosenbauer F & Tenen DG (2007) Transcription factors in myeloid development: Balancing differentiation with transformation. *Nat. Rev. Immunol.* **7**: 105–117
- Rosenbauer F, Wagner K, Kutok JL, Iwasaki H, Le Beau MM, Okuno Y, Akashi K, Fiering S & Tenen DG (2004) Acute myeloid leukemia induced by graded reduction of a lineage-specific transcription factor, PU.1. *Nat. Genet.* **36**: 624–30
- Sainsbury S, Bernecky C & Cramer P (2015) Structural basis of transcription initiation by RNA polymerase II. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **16**: 129–143
- de Santa F, Barozzi I, Mietton F, Ghisletti S, Polletti S, Tusi BK, Muller H, Ragoussis J, Wei CL & Natoli G (2010) A large fraction of extragenic RNA Pol II transcription sites overlap enhancers. *PLoS Biol.* **8**
- Schaukowitch K, Joo J-Y, Liu X, Watts JK, Martinez C & Kim T-K (2014) Enhancer RNA Facilitates NELF Release from Immediate Early Genes. *Mol. Cell* **56**: 29–42
- Schoenfelder S, Furlan-Magaril M, Mifsud B, Tavares-Cadete F, Sugar R, Javierre B-M, Nagano T, Katsman Y, Sakthidevi M, Wingett SW, Dimitrova E, Dimond A, Edelman LB, Elderkin S, Tabbada K, Darbo E, Andrews S, Herman B, Higgs A, LeProust E, et al (2015) The pluripotent regulatory circuitry connecting promoters to their long-range interacting elements. *Genome Res.* **25**: 582–597
- Shivdasani RA, Mayer EL & Orkin SH (1995) Absence of blood formation in mice lacking the T-cell leukaemia oncoprotein tal-1/SCL. *Nature* **373**: 432–4
- Shlyueva D, Stampfel G & Stark A (2014) Transcriptional enhancers: from properties to genome-wide predictions. *Nat. Rev. Genet.* **15**: 272–286
- Simonis M, Kooren J & de Laat W (2007) An evaluation of 3C-based methods to capture DNA interactions. *Nat. Methods* **4**: 895–901
- Smale ST & Baltimore D (1989) The ‘initiator’ as a transcription control element. *Cell* **57**: 103–113
- Smale ST & Kadonaga JT (2003) The RNA polymerase II core promoter. *Annu. Rev. Biochem.* **72**: 449–79
- Staber PB, Zhang P, Ye M, Welner RS, Nombela-Arrieta C, Bach C, Kerényi M, Bartholdy BA, Zhang H, Alberich-Jordà M, Lee S, Yang H, Ng F, Zhang J, Leddin M, Silberstein LE, Hoefler G, Orkin SH, Göttgens B, Rosenbauer F, et al (2013) Sustained PU.1 Levels Balance Cell-Cycle Regulators to Prevent Exhaustion of Adult Hematopoietic Stem Cells. *Mol. Cell* **49**: 934–946
- Stopka T, Amanatullah DF, Papetti M & Skoultschi AI (2005) PU.1 inhibits the erythroid program by binding to GATA-1 on DNA and creating a repressive chromatin structure. *EMBO J.* **24**: 3712–3723
- Suzuki HI, Young RA & Sharp PA (2017) Super-Enhancer-Mediated RNA Processing Revealed by Integrative MicroRNA Network Analysis. *Cell* **168**: 1000–1014.e15
- Tamura T, Nagamura-inoue T, Shmeltzer Z, Kuwata T & Ozato K (2000) ICSBP Directs Bipotential Myeloid Progenitor Cells to Differentiate into Mature Macrophages. *Immunity* **13**: 155–165
- Tenen DG, Hromas R, Licht JD & Zhang DE (1997) Transcription factors, normal myeloid development, and leukemia. *Blood* **90**: 489–519

- Thomas MC & Chiang C-M (2006) The General Transcription Machinery and General Cofactors. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **41**: 105–178
- Thurman RE, Rynes E, Humbert R, Vierstra J, Maurano MT, Haugen E, Sheffield NC, Stergachis AB, Wang H, Vernot B, Garg K, John S, Sandstrom R, Bates D, Boatman L, Canfield TK, Diegel M, Dunn D, Ebersol AK, Frum T, et al (2012) The accessible chromatin landscape of the human genome. *Nature* **489**: 75–82
- Vargova K, Curik N, Burda P, Basova P, Kulvait V, Pospisil V, Savvulidi F, Kokavec J, Necas E, Berkova A, Obrtlíkova P, Karban J, Mraz M, Pospisilova S, Mayer J, Trnecny M, Zavadil J & Stopka T (2011) MYB transcriptionally regulates the miR-155 host gene in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **117**: 3816–3825
- Walsh JC, DeKoter RP, Lee HJ, Smith ED, Lancki DW, Gurish MF, Friend DS, Stevens RL, Anastasi J & Singh H (2002) Cooperative and antagonistic interplay between PU.1 and GATA-2 in the specification of myeloid cell fates. *Immunity* **17**: 665–676
- Wang KC, Yang YW, Liu B, Sanyal A, Corces-Zimmerman R, Chen Y, Lajoie BR, Protacio A, Flynn RA, Gupta RA, Wysocka J, Lei M, Dekker J, Helms JA & Chang HY (2011) A long noncoding RNA maintains active chromatin to coordinate homeotic gene expression. *Nature* **472**: 120–124
- Weissman IL, Anderson DJ & Gage F (2001) Stem and progenitor cells: origins, phenotypes, lineage commitments, and transdifferentiations. *Cell Developmental Biol.* **17**: 387–403
- Whyte W a., Orlando D a., Hnisz D, Abraham BJ, Lin CY, Kagey MH, Rahl PB, Lee TI & Young R a. (2013) Master transcription factors and mediator establish super-enhancers at key cell identity genes. *Cell* **153**: 307–319
- Yang C, Bolotin E, Jiang T, Sladek FM & Martinez E (2007) Prevalence of the initiator over the TATA box in human and yeast genes and identification of DNA motifs enriched in human TATA-less core promoters. *Gene* **389**: 52–65
- Zhang P, Iwasaki-Arai J, Iwasaki H, Fenyus ML, Dayaram T, Owens BM, Shigematsu H, Levantini E, Huettner CS, Lekstrom-Himes JA, Akashi K & Tenen DG (2004) Enhancement of hematopoietic stem cell repopulating capacity and self-renewal in the absence of the transcription factor C/EBP α . *Immunity* **21**: 853–863
- Zhao Z, Tavoosidana G, Sjölander M, Göndör A, Mariano P, Wang S, Kanduri C, Lezcano M, Singh Sandhu K, Singh U, Pant V, Tiwari V, Kurukuti S & Ohlsson R (2006) Circular chromosome conformation capture (4C) uncovers extensive networks of epigenetically regulated intra- and interchromosomal interactions. *Nat. Genet.* **38**: 1341–7