

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

DIPLOMOVÁ PRÁCE

2010

Miroslav Auxt

Povoľujem zapožičanie svojej diplomovej práce k študijným účelom a prosím, aby bola vedená presná evidencia vypožičovateľov. Prevzaté údaje je vypožičovateľ povinný poriadne ocitovať.

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta
Katedra genetiky a mikrobiologie

**Úloha *de novo* DNA metyltransferáz
v transkripčním umlčování retrovirusů
a retrovirusových vektorů odvozených
od vtáčieho sarkómoveho a leukóзовého
vírusu.**

Vypracoval: Miroslav Auxt

Praha 2010

Vedúci diplomovej práce: **RNDr. Jiří Hejnar, Csc.**

Oddělení buněčné a virové genetiky

Ústav molekulární genetiky Akademie věd České republiky

Prácu som vypracoval samostatne, iba s použitím citovanej literatury a pod vedením príslušného vedúceho diplomovej práce.

V Prahe dňa.....

.....

vlastnoručný podpis

Pod'akovanie:

V prvom rade by som sa chcel poďakovať svojmu školiteľovi RNDr. Jiřímu Hejnarovi, CSc., ktorý mi umožnil pracovať v Laboratoři buněčné a virové genetiky ÚMG AV ČR. Ďakujem mu za jeho ochotu a odbornú pomoc pri vypracovávaní predkládaného projektu. Veľká vďaka patrí najmä Filipovi Šeniglovi, PhD., ktorý ma sprevádzal počas celej doby vypracovávania práce svojimi neoceniteľnými radami a svojou trpezlivosťou. Chcem poďakovať všetkým ostatným kolegom laboratória za konzultácie a vytvorenie skvelých pracovných podmienok a pracovnej atmosféry. V neposlednom rade chcem veľmi poďakovať svojej rodine, priateľke a priateľom za psychickú podporu a pomoc.

Táto práca vznikla za finančnej podpory grantovej agentúry ČR grant 523/07/1171 a grant 301/09/P667

The role of *de novo* DNA methyltransferases in transcriptional silencing of retroviruses and retroviral vectors derived from avian sarcoma and leukosis virus.

Abstract

Avian sarcoma and leukosis virus-based (ASLV) vectors are retrovirus-derived vectors that can replicate efficiently in avian cells, but are replication-defective in mammalian cells. ASLV genome integration is nonclustered, does not favor gene-rich regions, transcription start sites, or CpG islands. There was no propensity for ASLV insertions within or near proto-oncogenes. Thus, they are quite safe and advantageous for use in gene therapy and vaccines. One of the obstacles to the use of ASLV-derived vectors in mammalian cells is the transcriptional silencing of integrated proviruses. In general, gradual silencing of transduced vectors correlates with epigenetic changes of retroviral long terminal repeats (LTRs). CpG methylation of DNA and/or modifications of histones in nucleosomes linked to the promoter region were found in silenced proviruses in vitro. The aim of this diploma thesis was to reveal the influence of the *de novo* DNA methyltransferases (DNMT) on transcriptional silencing of integrated ASLV proviruses in chicken and human cells. We wanted to find out, if mammalian DNMT3a as holoenzyme is able to recognize integrated avian provirus and silence it. For this purpose we used chicken cell line DF-1, where high level of expression of mammalian DNMT3a induced by mammalian inducible system is present. We also wanted to discover whether human *de novo* DNMT3b has an influence on silencing of ASLV retroviral vector. Therefore we used wild type (WT) and DNMT3b deficient cell lines HCT116 derived from colorectal carcinoma. Silent clones were chosen for reactivation by 5-aza-cytidine (5-azaC) and trichostatin A (TSA) to recover the stability and way of proviral silencing. Proviral methylation statuses of these clones were disclosed by bisulfide conversion and sequencing. Our results proved that mouse DNMT3a is not able to silence integrated provirus by methylation in chicken cell line DF-1. Our data also reveal that DNMT3b plays very important role in proviral silencing and is essential component of *de novo* methylation dependent proviral mechanism of silencing. WT clones were efficiently reactivated by 5-azaC and clones of DNMT3b deficient cell line were much more efficiently reactivated by TSA.

Key words: DNA methylation, *de novo* DNA methyltransferases, ASLV derived vectors, transcriptional silencing, epigenetic modification.

Kľúčové slová: Metylácia DNA, *de novo* DNA metyltransferázy, retrovírusové vektory odvodené od ASLV, transkripčné umlčovanie, epigenetické modifikácie.

Obsah

ZOZNAM SKRATIEK.....	8
1. ÚVOD	11
2. PREHĽAD LITERATÚRY	13
2.1. Metylácia DNA.....	13
2.2. Mechanizmus DNA metylácie.....	13
2.3. CpG dinukleotidy a CpG ostrovy.....	14
2.4. DNA metyltransferázy.....	16
2.4.1. Udržovacia DNMT1.....	16
2.4.1.1. Proteínové interakcie DNMT1.....	17
2.4.1.2. DNMT1 ako súčasť replikačných vidlíc.....	18
2.4.1.3. Izoformy DNMT1.....	20
2.4.2. DNMT2.....	20
2.4.3. <i>De novo</i> DNA metyltransferázy.....	21
2.4.4. DNMT3L.....	22
2.5. Metylácia DNA a jej kooperácia s histonovými modifikáciami.....	23
2.5.1. Metyl CpG väzbové proteíny vo vzťahu k metylácii DNA.....	23
2.5.1.1. MeCP2.....	24
2.5.1.2. MBD1.....	24
2.5.1.3. MBD4.....	24
2.5.2. Histónová modifikácia H3K4 a DNA metylácia.....	24
2.5.3. Histonová metylácia H3K9 a metylácia DNA.....	25
2.6. Retrovírusy.....	28
2.6.1. Replikačný cyklus retrovírusov.....	28
2.6.2. Integrácia retrovírusov a jej produktivita.....	29
2.6.3. Transkripčné umlčovanie retrovírusov a ERV.....	32
2.6.4. Transkripčné umlčanie endogénnych retrovírusov.....	33
2.6.5. Vtáčie retrovírusy ako potenciálny nástroj génovej terapie.....	35
2.6.6. Ochrana retrovírusových vektorov proti umlčaniu.....	35
2.6.6.1. Inzulátorové sekvencie.....	35
2.6.6.2. CpG ostrovy.....	36
2.6.7. Epigenetická reaktivácia.....	37
2.6.8. Provírusová latencia.....	38
3. EXPERIMENTÁLNA ČASŤ	40
3.1. Cieľ práce.....	40
3.2. Schéma experimentu.....	40
4. MATERIÁL A METÓDY	42
4.1. MATERIÁL.....	42
4.1.1. Bakteriálny kmeň.....	42
4.1.2. Bunkové kultúry.....	42
4.1.3. Vektory.....	43
4.2. Laboratórne prístroje.....	45
4.3. Chemikálie.....	45
4.3.1. Komerčné súpravy (Kity).....	45
4.3.2. Roztoky.....	45
4.3.3. Kultivačné médiá.....	46
4.4. Metódy práce s bunkovými kultúrami.....	46
4.4.1. Rozmrazovanie buniek.....	46

4.4.2.	Pasážovanie buniek	46
4.4.3.	Kryoprezervácia buniek	46
4.4.4.	Transfekcia pomocou kalcium -fosfátovej precipitácie	47
4.4.5.	Transfekcia pomocou FUGENE HD Transfection Reagent (Roche)	47
4.4.6.	Meranie prietokovým cytometrom.....	47
4.5.	Práca s vírusmi	48
4.5.1.	Príprava vírusu	48
4.5.2.	Vírusová infekcia	49
4.5.3.	Príprava vírusových konzerv	49
4.6.	Metódy molekulárneho klonovania	49
4.6.1.	Restričné štiepenie	49
4.6.2.	Ligázová reakcia	50
4.6.3.	Transformácia ligovaného plazmidu do baktérií <i>E. coli-XL-1 Blue</i>	50
4.6.4.	Izolácia plazmidu a restričné štiepenie	50
4.6.5.	Izolácia plazmidovej DNA z <i>E.coli</i>	50
4.6.6.	Izolácia genómovej DNA.....	51
4.6.7.	PCR.....	51
4.6.7.1.	Použité primery	52
4.7.	Zavedenie cicavčieho inducibilného systému	52
4.7.1.	Komponenty inducibilného systému:.....	53
4.7.2.	Molekulárna podstata fungovania Inducibilného systému.....	53
4.8.	Globálna Analýza Metylácie genómovej DNA	54
4.9.	Bisulfitová reakcia	55
4.9.1.	Schématický prehľad komponent a priebehu bisulfitovej konverzie	56
4.9.1.1.	Prečistenie DNA po reakčnej konverzii	56
4.9.1.2.	Polymerázová reťazová reakcia	57
4.9.1.2.1.	BIS I PCR reakcia.....	57
4.9.1.2.2.	BIS II PCR reakcia	58
4.9.1.3.	Izolácia PCR produktu z agarózového gélu	59
4.9.1.4.	Ligácia PCR produktu do vektora pGEM-T Easy	60
4.9.1.5.	Transformácia bakteriálneho kmeňa <i>E. coli -X1 Blue</i>	60
4.9.1.6.	Overenie ligovaného inzertu v plazmide pGEM Teasy	61
4.9.1.7.	Sekvenácia	62
4.10.	Kvantitatívna PCR	63
4.10.1.	Izolácia celkovej RNA	64
4.10.2.	Reverzná transkripcia- tvorba cDNA z RNA.....	64
4.10.3.	Priebeh kvantitatívnej PCR reakcie	66
5.	VÝSLEDKY	67
5.1.	Štúdium vplyvu cicavčej DNMT3a na umlčovanie retrovírusového vektoru AG3 zavedením cicavčieho inducibilného systému v kuracej línii DF-1	67
5.1.1.	Klonovanie myšacej DNMT3a do hlavného plazmidu inducibilného systému pNEBR-X1 Hygro.....	67
5.1.2.	Transfekcia pNEBR-X1H-DNMT3a a pNEBR-R1 do DF-1	69
5.1.3.	Testovanie selektovaných klonov	69
5.1.3.1.	Overenie myšacej DNMT3a a pNEBR-R1 v kuracích bunkách PCR	69
5.1.3.2.	Overenie expresie regulačných proteínov z plazmidu pNEBR-R1	70
5.1.4.	Analýza globálnej metylácie	70
5.1.5.	Kvantitatívna PCR	72
5.1.6.	Sledovanie vplyvu expresie DNMT3a na umlčovanie retrovírusového vektoru AG3.....	76

5.2.	Sledovanie priebehu umlčovania retrovírusového vektoru AG3 v divokom kmeni a DNMT3b deficietnej línii HCT116 odvodenej od kolorektálneho karcinómu.	77
5.2.1.	Infekcia DNMT3b ^{-/-} a WT buniek retrovírusovým vektorom AG3	77
5.2.2.	Výber GFP pozitívnych klonov 4 dni po infekcii	77
5.2.3.	Sledovanie expresie GFP v infikovaných bunkách počas doby 3 mesiacov	77
5.2.3.1.	Zastúpenie GFP(+) buniek v klonoch línii WT 29 dpi	78
5.2.3.2.	Zastúpenie GFP(+) buniek v klonoch línii DNMT3b ^{-/-} 29 dpi	78
5.2.3.3.	Zastúpenie GFP(+) buniek v klonoch línii WT 87 dpi	79
5.2.3.4.	Zastúpenie GFP(+) buniek v klonoch línii DNMT3b ^{-/-} 87 dpi	80
5.2.3.5.	Porovnanie percentuálneho zastúpenia GFP(+) buniek klonov WT línii v priebehu meraní 29, 72, 87 dpi	81
5.2.3.6.	Porovnanie percentuálneho zastúpenia GFP (+) buniek klonov DNMT3b ^{-/-} línii v priebehu meraní 29, 72, 87 dpi	81
5.2.4.	Reaktivácia umlčaných klonov	82
5.2.4.1.	Reaktivácia WT klonov za použitia 5-azaC a TSA	82
5.2.4.1.1.	Overenie prítomnosti integrovaného provírusu v nereaktivovaných WT klonoch	84
5.2.4.2.	Reaktivácia DNMT 3b ^{-/-} klonov za použitia 5-azaC a TSA	85
5.2.5.	Bisulfitová konverzia	86
5.2.5.1.	Analýza metylačných profilov LTR sekvencií integrovaných provírusov v klonoch línii DNMT3b ^{-/-}	86
5.2.5.2.	Analýza metylačných profilov LTR sekvencií integrovaných provírusov v klonoch línii WT	87
6.	DISKUSIA	89
6.1.	Vplyv myšacej DNMT3a na umlčovanie ASLV vektoru v línii DF-1	89
6.2.	Vplyv ľudskej DNMT3b na umlčovanie vektoru odvodenej od ASLV	91
7.	ZÁVER	97
8.	ZOZNAM CITOVANEJ LITERATÚRY	98

ZOZNAM SKRATIEK

5 -AZA-dC -5-AZA-2 deoxycitidin

A - adenín

AAV - vírus asociovaný s adenovírusom

AdoMet - Adenozyl methyonín

Amp-r - gén kodujúci β -laktamázu

APOBEC3 - katalytický polypeptid 3 editujúci mRNA apolipoproteínu B

aprt - adenzifosforibozyltransferázový gén

ASLV - vtáčí sarkómový a leukózný vírus

ATP - adenzin trifosfát

5-azaC - 5-aza-cytidín

BAF - barrier-to-autointegration factor - faktor chráni vírovú DNA pred deštrukciou a autointegráciou

BAH - brom homologická doména

BLV - vírus hovädzej leukémie

bp - pár bází

CAF - faktor podieľajúci sa na tvorbe chromatinu

CpG - cytozín-guanínový dinukleotid

CS - teľacie sérum

CTCF - inzulátorový proteín riadiaci represiu inzulín rastového faktoru 2

DF-1 - kuracia bunková línia pripravená Dugem Fosterom

DKO - línia deficientná v dvoch génoch

DMAP1 - korepresor asociujúci s DNMT1

D-MEM - Dulbecco's Modified Eagles's Medium

DNA - kyselina deoxyribonukleotidová

DNáza - Deoxyribonukleáza

DNMT - DNA metyltransferáza

DNMT3L - hlavný DNMT kofaktor

E.coli. - *Escherichia coli*

E2F- jeden z hlavných eukaryotických transkripčných faktorov riadiaci vstup bunky do bunkového cyklu

EBV - vírus Epsteina- Barovej

eIF3e - eukaryotický iniciačný faktor 3

EZH2 - histónmetyltransferáza modifikujúca lyzín

FCS - fetálne hovädzie sérum

G - guanín

G418 - geneticín, antibiotikum blokujúce polypeptidovú syntézu

GFP - zelený fluorescenčný proteín

G - guanin

H3K36 - lyzínový zvyšok 36 na históne H3

H3K4 - lyzínový zvyšok na históne 3

H3K9 - lyzínový zvyšok 9 na históne 3

HBV - Virus hepatitídy B

HCT166 - ľudská bunková línia odvodená od kolorektálneho karcinómu

HDAC1 - histondeacetyláza 1

HDAC2 - histondeacetyláza 2
HEPES - N-2-hydroxyetylpoperazin- N'-ethan sulfonová kyselina
HERV - ľudský endogénny retrovírus
HIV - vírus ľudskej imunodeficiencie
HMG - high mobility group protein- asociujúci s chromatínom
HMSV - Harveyov kmeň vírusu myšacieho sarkómu
HMT - histonmetyltransferáza
HP1 - heterochromatínový proteín 1
ICF - Syndróm imunodeficiencie, centromerickej nestability a anomálií tváre
IgfII - Inzulínový rastový faktor II
IPTG - izopropyl β -D-thiogalaktopyranozid
KAP1 - KRAB asociačný proteín 1
KRAB-ZNF - Krüppelov asociačný box s proteínovým motívom zinkového prstu
KS - kuracie sérum
LB - lysogeny broth, bujón, médium pre kultiváciu baktérií
LEDGF/p75 - rastový faktor odvodený od epitelu šošovky
LINE - dlhý rozptýlený jadrový element
LTR - dlhé koncové repetície
m⁵C - Cytosín modifikovaný na uhlíku 5
MBD - methyl väzbová doména
MeCP1 - metyl cytozín väzbový represorový komplex
MeCP2 - metyl cytozín väzbový proteín 2
Mi-2/NuRD - represorový nukleozomálny remodelačný komplex
MLV - vírus myšacej leukémie
MMSV - Molonyho kmeň vírusu myšieho sarkómu
MMTV - myšací vírus vyvolávajúci tumor mliečnej žľazy
MoMLV - Molonyho kmeň vírusu myšacej leukémie
MSCV - Myšací vírus kmeňových buniek
NLS - jadrový lokalizačný signál
NRE - negatívny regulačný element
OD - optická denzita
ORF - otvorený čítací rámec
PBS - izotonický fosfátový pufor
PBS - primer väzbová doména
PCNA - proliferačný bunkový jadrový antigén
PHD - rastlinná homeodoména DNMT
PIC - preintegračný komplex
PML-RAR - jadrové represorové telieska
PPT - oblasť bohatá na puríny
RBD - represor väzbová doména
RCAS - replikačne kompetentný vtáčí vektor so zostrihovým faktorom
RSV - vírus Rousova sarkómu
RT - reverzná transkriptáza
SDS - sodium dodecylsulfát
SINE - krátky rozptýlený jadrový element
SRA - SET a RING asociačná domain

T- tymín
TRIM - transkripčný represor s tripartitným motívom
TRIM5 α - tripartitny motiv 5 α
TSA - Trichostatin A
Tween20 - polyoxyetylensorbitanmonolaurát
U3 - jedinečná sekvencia retrovírusového genómu na 3' konci.
UHRF1 - doména podobná ubiquitínu, obsahujúca PHD and RING prstovú doménu
Vif- faktor zvyšujúci infektivitu HIV-1 vírusu
Vpr- HIV-1 vírusový proteín regulujúci import
VZV- Vírus vezikulárnej stomatitídy
WNT- wingless signalizačná dráha
WT- divoký kmeň
X-gal- bromo-chloro-indolyl-galactopyranozid
X-SCID- vážna kombinovaná imunodeficiencia viazaná na X ch.
ZF-CxxC - cysteín bohatá doména s motívom zinkového prstu

1. ÚVOD

Metylácia DNA ako epigenetická modifikácia zohráva rozhodujúcu úlohu v regulácii transkripcie a jej represie. Z fyziologického hľadiska sa jedná o esenciálnu modifikáciu DNA, ktorej poruchy vedú k masívnym génovým dereguláciám. Z hľadiska retrovírusov je metylácia DNA jeden z najdôležitejších hostiteľských ochranných mechanizmov, ktorým sa eukaryotické bunky chránia proti vplyvu aberantnej expresie rizikových endogénnych ako aj exogénnych foriem DNA, ako sú retrovírusy a z nich odvodené vektory. Metylácia DNA je katalyzovaná DNA metyltransferázami. Metylácia DNA funguje vo veľmi úzkom spojení s histónovými modifikáciami, ktoré vedú k chromatínovým prestavbám v mieste metylácie provírusovej DNA. Postupnosť krokov v utváraní umlčaného stavu provírusu zatiaľ nie je známa, no je dokázané že metylácia provírusovej DNA je príčinou dlhotrvajúceho umlčania retrovírusového vektoru (McInerney et al., 2000). Metyláciou modifikovaná promotorová LTR oblasť provírusu je primárne rozpoznávaná represorovými metyl väzbovými proteínami, ktoré do tohto miesta nasmerovávajú histondeacetylázové a histonmetyltransferázové represorové komplexy, ktorých aktivitou dochádza k masívnemu pozmeneniu chromatínovej štruktúry v mieste integrácie (Bird et al., 1999).

Transkripčná represia integrovaného provírusu metylačnou modifikáciou nie je jediný spôsob, ktorým aktivita retrovírusového vektoru vyhasína. Za jeden z dôležitých mechanizmov nezávislých na *de novo* metylácii DNA sa uskutočňuje vďaka priamej asociácii histondeacetylázy 1 so štruktúrou provírusovej DNA prostredníctvom adaptorových represorových proteínov, ktoré rozpoznávajú *cis* represor väzbovú doménu vírusovej DNA (Ellis et al., 2007).

Mechanizmus umlčania integrovaného provírusu je zásadným spôsobom ovplyvnený miestom integrácie. Preferencie retrovírusovej integrácie sú v prípade jednotlivých vektorov vrámci genómu nenáhodné. HIV odvodené vektory sa integrujú s vysokou frekvenciou do transkripčne aktívnych oblastí a do oblastí bohatých na gény. Integračná preferencia MLV odvodených vektorov je vysoká v oblasti transkripčných štartov. Retrovírusové vektory odvodené od ASLV majú veľmi nízku preferenciu integrácie do aktívnych oblastí a transkripčných jednotiek, čo je jeden z veľmi podstatných aspektov možného použitia ASLV odvodených vektorov v génovej terapii (Mitchel et al., 2004).

Integrované provírusy sú v mieste integrácie bohaté epigeneticky modifikované. Za použitia špecifických inhibítorov je možné umlčaný stav provírusu zvrátiť. Typ reaktivačného činidla umožňuje do určitej miery analyzovať spôsob akým bol provírus umlčaný. Medzi najdôležitejšie inhibítory DNA metyltransferázovej aktivity patrí Azacitidin. Histondeacetylázovú aktivitu zase blokuje Trichostatin A (Lorincz et al., 2000).

V laboratóriu bunkovej a vírusovej genetiky, ÚMG AV ČR sa sústreďujú veľké úsilie na štúdium vplyvu DNA metyltransferáz na umlčovanie retrovírusových vektorov odvodených od ASLV. Molekulárne mechanizmy transkripčného umlčovania provírusovej DNA integrovaného vektoru sú pomerne dobre charakterizované. No postupnosť krokov, ktorými dochádza k rozpoznaní a ustanoveniu epigenetických

modifikácií v oblasti provírusu sú zatiaľ nejasné. V tejto práci sme sa zamerali na štúdium vplyvu *de novo* cicavčej DNMT3a na umlčanie ASLV vektoru vo fyziologicky odlišnom prostredí vtáčích buniek vzhľadom k pôvodu DNMT3a. V kuracích bunkách dochádza k umlčovaniu vektoru s veľmi nízkou účinnosťou a zavedením expresie myšacej *de novo* DNMT3a sme pozorovali, či myšacia DNMT3a je schopná ako holoenzým rozpoznať integrovaný provírus, metylovať ho a umlčať. Úspech použitia retrovírusových vektorov v génovej terapii je limitovaný integračnými preferenciami vektorov ako aj veľmi stabilným transkripčným umlčaním vektoru. Práve v transkripčom umlčaní vektoru zohráva esenciálnu úlohu hlavná *de novo* metyltransferáza DNMT3b. Preto druhou stratégiou experimentálnej časti bolo štúdium významu *de novo* aktivity ľudskej DNMT3b na umlčovanie retrovírusového vektoru vo WT bunkách línie HCT116 odvodenej od kolorektálneho karcinómu. Vplyv absencie DNMT3b na umlčovanie ASLV vektoru bol sledovaný v DNMT3b deficiентnej línii. Porovnaním transkripčnej aktivity provírusov v klonoch oboch línii sme mohli exaktne sledovať postavenie a dôležitosť DNMT3b v procese umlčania provírusu.

2. PREHĽAD LITERATÚRY

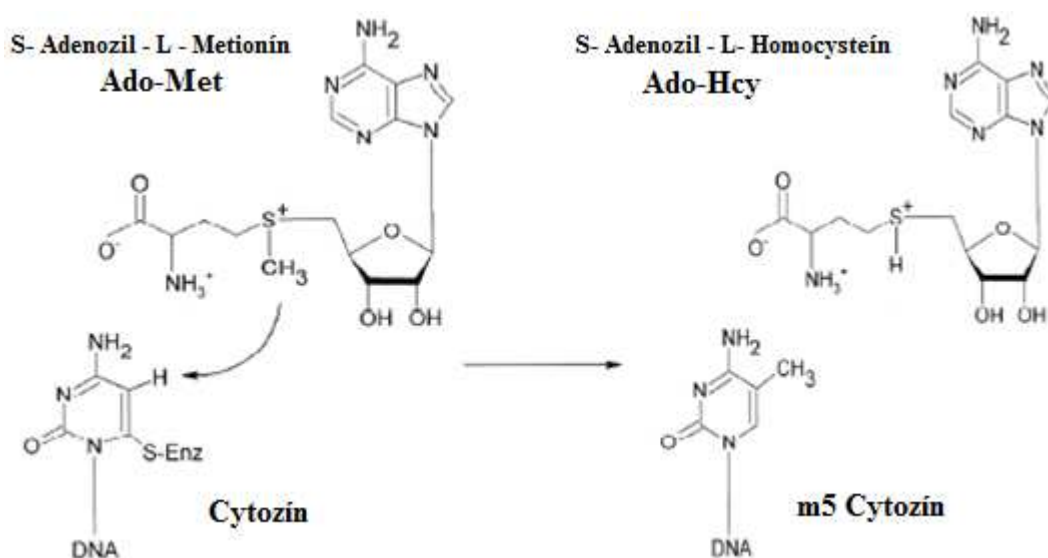
2.1. Metylácia DNA

Metylácia DNA je u stavovcov, niektorých bezstavovcov a rastlín epigenetický mechanizmus, ktorým dochádza k pozmeneniu cytozínovej bázy DNA bez zmeny jej kódujúceho významu. Má represívny charakter a súvisí s chromatinovou prestavbou. Metylácia DNA predstavuje stabilný, ale nie ireverzibilný signál, ktorý vedie po ustanovení k regulácii génovej expresie s následnými vývojovými a genetickými následkami (Hermann et al., 2004). Tkanivovo špecifický metylačný status je ustanovený *de novo* počas skorého embryonálneho vývoja v procese, ktorý je kompletne dokončený pred vlastnou implantáciou embrya v maternici (Reik et al., 2001). Táto kovalentná modifikácia DNA zohráva veľmi podstatnú úlohu v udržovaní kompaktného a umlčaného stavu chromatinu prostredníctvom metyl-DNA väzbových proteínov a histondeacetyláz (Bird and Wolffe 1999). Metylácia DNA udržiava stabilitu a integritu genetickej informácie. To spočíva predovšetkým v dlhotrvajúcom umlčaní mobilných a repetitívnych sekvencií DNA. Mobilné elementy predstavujú u cicavcov približne 40% genómu. Potenciálne mobilné repetitívne elementy, u cicavcov najmä aktívne retrotranspozóny, predstavujú vysokú mieru genotoxicity (Jones and Gonzalgo 1997). Metylácia DNA je ďalej podstatná pri kontrole génovej expresie, bunkovej diferenciácii a embryonálnom vývoji (Okano et al., 1999). Diferenciálna metylácia DNA sa uplatňuje pri ustanovení rodičovského imprintingu a pri stabilizácii inaktivovaného stavu X chromozómu samíc (Barlow et al., 1991). Retrovírusy a retrovírusové vektory sú účinne umlčované v závislosti na *de novo* metylácii CpG dinukleotidov vrámci LTR sekvencií (Feenstra et al., 1986). Metylácia DNA je nepochybne spojená so vznikom génových polymorfizmov, zárodočných mutácií a tranzičných mutácií (zmena metylcytozínu na tymín deamináciou), ktoré v konečnom dôsledku môžu viesť k urýchlenému rastu za prítomnosti mutovaného proteínu (Jones and Laird 1999). Na druhej strane k biogenéze tumoru môže viesť abnormálna hypermetylácia promotorov génov suprimujúcich tumory, ktoré sú bohaté na CpG a spĺňajú kritéria CpG ostrovov. Názorným príkladom je metylácia CpG ostrova tumor supresorového génu p16^{INK4A}, ktorý je takýmto spôsobom inaktivovaný u väčšiny nádorov (Hinshelwood et al., 2009). Metylácia týchto promotorov vedie k inaktivácii príslušných tumor supresorových alel a k vzniku transformačného potenciálu s urýchleným bunkovým rastom. (Herman et al., 1996)

2.2. Mechanizmus DNA metylácie

Počas diferenciácie a vývoja, bunky prekonávajú dramatické morfológické a funkčné zmeny bez zmeny v primárnej štruktúre DNA. Tieto drastické zmeny sú dôsledkom regulácie génovej expresie na epigenetickej úrovni. Génová aktivita alebo represia koreluje s mierou metylácie DNA promotorových oblastí. Metylácia DNA je katalyzovaná enzýmami, ktoré označujeme ako DNA cytozín metyltransferázy (DNMT)

(Bestor et al., 1988). DNMT kovalentne modifikujú uhlík cytozínovej báze v pozícii 5 vrámci CpG dinukleotidov za vzniku 5- metylcytozínu (m^5C). Metylácia DNA taktiež prebieha na pozíciach N6 adenínu a N4 cytozínu, no jediná modifikovaná báza, ktorá sa vo väčšej miere objavuje u vyšších eukaryot je práve m^5C . Pri metylácii dochádza k rozpoznaní substrátových molekúl prostredníctvom DNMT s pomocnými kofaktormi. Nukleofilným napadnutím SH skupinou cysteínu katalytického motívu IV na C6 pozíciu cytozínu sa utvorí kovalentný komplex medzi bázou a enzýmom. Cytozínová báza sa v priebehu nukleofilného napadnutia vytočí zo štruktúry DNA helixu do katalytického miesta DNMT, čím sa zrušia vodíkové mostíky ako aj poschodové interakcie medzi aromatickými kruhmi vo vnútri DNA helixu. Uhlík v pozícii 5 cytozínovej báze sa stane aktivovaným a schopným k nukleofilnému napadnutiu metylovej skupiny Adenosil-L-methionínu. Deprotonáciou v C5 pozícii dochádza k eliminácii cysteínovej skupiny a k obnoveniu aromatickosti (Klimasauskas et al., 1994). Biochemický detail reakcie je zobrazený na Obr.1. Metyláciou DNA dochádza k pozmeneniu vzhľadu veľkého žliabku DNA, ktoré ale stéricky neinterferuje s normálnym Watson- Crickovým párovaním. Takto ustanovené epigenetické značky DNA sú dedičné.



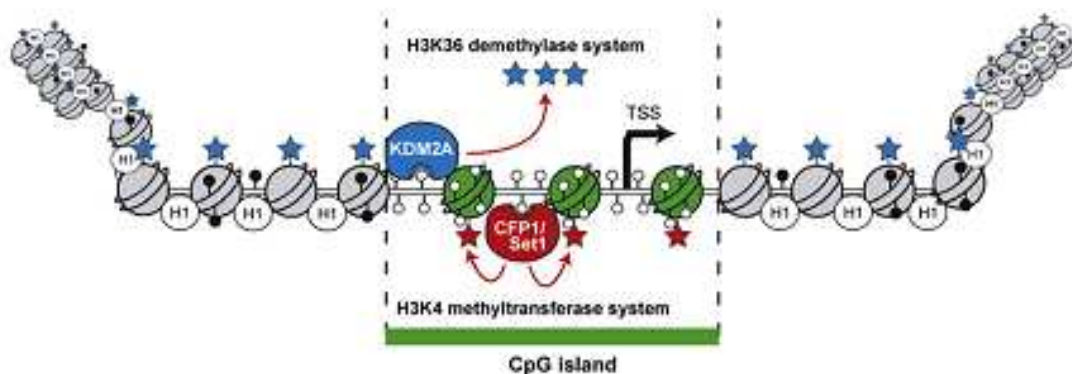
Obr. 1 Metylačný mechanizmus zmeny cytozínu na m^5C . Metylácia cytozínu vrámci CpG dinukleotidov je umožnená DNMT, ktoré využívajú Adenosil- L- metionín ako zdroj metylovej skupiny. Výsledkom tejto katalýzy je S-adenosil-L- homocysteín a modifikovaný m^5C (Turek-Plewa and Jagodzinski 2005).

2.3. CpG dinukleotidy a CpG ostrovy

CpG dinukleotidy sú v ľudskom genóme rozmiestnené náhodne a všetky z nich sú modifikovateľné metyláciou DNA. Z celkového počtu CpG dinukleotidov je 80% metylovaných. Tieto metylované CpG dinukleotidy sú častými miestami mutačných tranzícií. Deamináciou m^5C vznikne T-G pár. V prípade že nie je opravený vzniká TpG dinukleotid. Spontánou deamináciou tymínu vznikne uracyl. Uracyl je veľmi účinne odstraňovaný, keďže je to neštandardná báza DNA (Bestor 2000). U vyšších eukaryot metylované CpG dinukleotidy predstavujú vďaka spontánnym tranzíciám miesta so

zvýšenou mutačnou frekvenciou a tvoria približne 30% všetkých bodových mutácií, ktoré sa vytvoria v zárodočnej línii (Cooper and Youssoufian 1988).

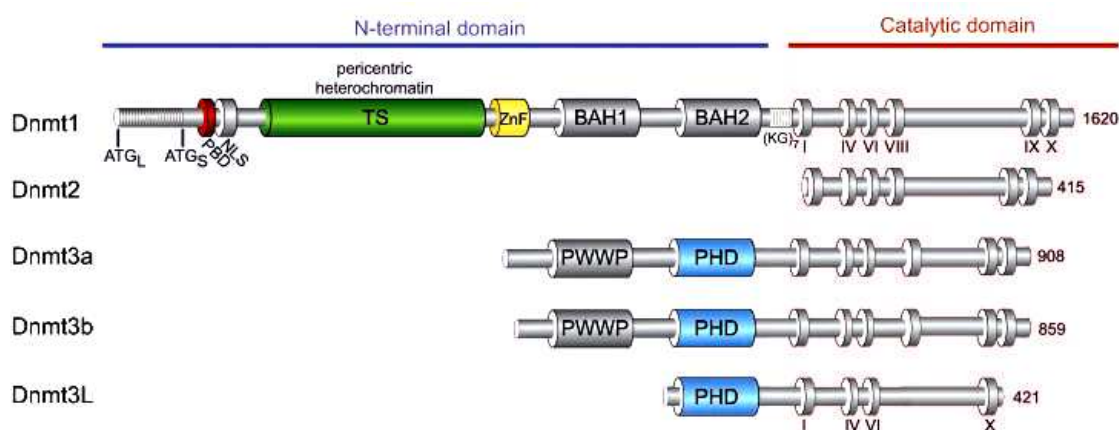
Na druhej strane CpG dinukleotidy, ktoré sú súčasťou CpG ostrovov zostávajú nemetylované i napriek ich vysokému počtu vrámci ostrovu. Obsah C+G vrámci CpG ostrovov predstavuje približne 64-67%, kdežto priemerný výskyt C+G genómu je 41-42%. Tento kontrast medzi ostrovom a rozptýlenou sekvenciou je veľmi ostrý pretože, CpG dinukleotidy ostrovov predstavujú skutočný C+G obsah. Rozptýlené a metylované CpG dinukleotidy podliehajú spontánnym tranzíciám, preto je ich obsah mimo ostrovných sekvencií podhodnotený vzhľadom k očakávanej frekvencii (Medvedeva et al., 2010). Počet CpG ostrovov v ľudskom genóme je približne 50,200, z ktorých polovica je súčasťou repetitívnych sekvencií (Han et al., 2008). Približne 70% exprimovaných ľudských génov je asociovaných s CpG ostrovmi. Ostrovy sú dlhé 0,5-2 kb a asociujú najčastejšie s 5' koncom prvého exónu tkanivovo špecifických génov a udržovacích génov (housekeeping gene), ktoré sú exprimované kontinuálne. Sekvencia CpG ostrovu presahuje do oblasti transkripčných štartov, kde sú rozpoznávané transkripčnými faktormi a zohrávajú regulačnú funkciu. CpG ostrovy sú dôležité v ochrane udržovacích génov pred *de novo* metyláciou a udržujú ich transkripčne aktívny stav (Saxonov et al., 2006). CpG dinukleotidy vrámci CpG ostrovov korelujú s veľmi nízkou hladinou metylácie DNA. Tento efekt je väčšinou vysvetľovaný akousi ochranou CpG ostrovu pred umlčaním prostredníctvom *cis* väzby silných DNA transkripčných faktorov ako napr. E2F, CTCF, Sp1 (Weinmann et al., 2002). Mnoho CpG ostrovov obsahuje tzv G/C boxy, ktoré sú väzbovými miestami transkripčného faktoru SP1, ktorý chráni nemetylované úseky CpG ostrovov pred metyláciou DNA (Macleod et al., 1994). Okrem toho nemetylovanú oblasť CpG ostrova rozpoznáva ZF-CxxC (zinc finger- cystein- rich domain) doména H3K36 demetylázy KDM2, ktorá demetyluje dimetylovaný lyzín 36 na históne 3 (H3K36me2). V prípade DNMT1^{-/-} deficientnej línii je KDM2 bohato zastúpená v oblasti nemetylovanej pericentromerickej DNA. KDM2 prispieva svojou demetylačnou aktivitou k epigenetickému udržaniu nemetylovaného stavu CpG ostrova. V oblasti CpG ostrova dochádza k H3K36 demetylácii a následne k trimetylácii lyzínu 4 na históne 3 (H3K4) Set1 komplexom. V chromatinovej štruktúre CpG ostrova absentuje histón H1 (Obr.2). Zostava týchto modifikácií veľmi výrazným spôsobom odlišuje štruktúru CpG ostrova a robí ju jedinečnou (Blackledge et al., 2010).



Obr. 2. Unikátna chromatinová štruktúra CpG ostrovu a jeho špecifické epigenetické značky: demetylovaný H3K36 a metylovaný H3K4 v kooperácii so Set1 komplexom (Blackledge et al., 2010).

2.4. DNA metyltransferázy

DNA metylačné vzorce u cicavcov sú ustanovované a udržiavané DNMT. Najznámejšími sú DNMT1, DNMT3a a DNMT3b, pričom každá z nich je esenciálna pre normálny vývoj myšacieho embrya (Li et al., 1992). DNMT1 je známa ako udržovacia metyltransferáza, ktorá sa primárne podieľa na udržovaní, zachovaní a rozširovaní už existujúcich metylačných vzorcov počas každého bunkového cyklu. DNMT3a, DNMT3b fungujú primárne ako *de novo* metyltransferázy v ustanovení nových metylačných vzorcov počas vývoja na nemodifikovanom vlákne DNA. DNA metyltransferázy stavovcov obsahujú vysoko konzervované katalytické C terminálne domény, ktoré zahŕňajú 10 sekvenčných motívov, ktoré boli taktiež objavené u prokaryotických DNMT. Takže všetky DNMT využívajú rovnaký katalytický mechanizmus metyltransferázovej reakcie (Goll and Bestor 2005). Druhou doménou DNA metyltransferáz je regulačná N-terminálna doména s niekoľkými špecifickými motívami (Obr.3).



Obr. 3 Štruktúrna schéma DNA metyltransferáz. Všetky typy metyltransferáz majú evolučne konzervovanú C terminálnu doménu. IV motív je hlavné katalytické centrum. N-terminálna doména je pre DNMT1 a DNMT3a odlišná. Súvisí to so zacielením metyltransferáz. DNMT2 neobsahuje žiadnu N-terminálnu regulačnú doménu, je charakteristická len katalytickou aktivitou. DNMT3L neobsahuje konzervované motívy pre metyltransferázovú aktivitu a je hlavným kofaktorom *de novo* metylácie. (Rottach, et al., 2009).

2.4.1. Udržovacia DNMT1

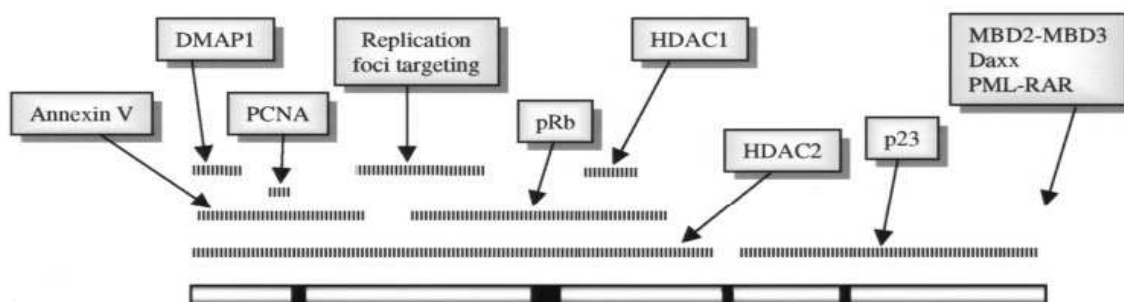
Gén DNMT1 pozostáva zo 40 exónov, 39 intrónov a predstavuje približne 60 kb. Katalytickú doménu tvorí 11 exónov. DNMT1 je veľmi veľký proteín ktorý predstavuje 1620 aminokyselín. C-terminálnu doménu tvorí 500 aminokyselinových zvyškov a okolo 1100 aminokyselín prislúcha N terminálnej doméne. Medzi doménami sa nachádza krátka Lys-Gly vyriabilná oblasť. Podľa bioinformatických analýz je možné, že DNMT1 vznikla fúziou troch génov, pričom jeden prislúši C-terminálnej doméne a dva N-terminálnej doméne (Margot et al., 2000). Zo štruktúrneho hľadiska

DNMT1 obsahuje jadrový lokalizačný signál (NLS), ktorý smeruje DNMT1 do jadra. Ďalej doménu pre väzbu jadrového antigénu preliferujúcich buniek (PCNA). V štruktúre DNMT1 je ďalej pericentrická heterochromatínová doména (TS), ktorá smeruje DNMT1 do replikačných počiatkov. Potom je to CXXC-ZnF motív zinkového prstu a dve susediace bromohomologické domény (BAH), ktoré sú rozpoznávané proteínami chromatinovej regulácie (Obr.3.). DNMT1 obsahuje dva alternatívne iniciačné kodóny pre vznik izoform (ATG_{long form}, ATG_{short form}). Medzi N a C terminálnou doménou je spojovací motív siedmich lyzin-glycin opakovaní (KG₇) (Rottach et al., 2009).

DNMT3a a DNMT3b sú veľmi príbuzné proteíny, ktoré majú N terminálne domény obsahujúce doménu motívu prolín, tryptofan, tryptofan, prolín (PWWP) a cysteinom bohatý zinok väzbový motív. Je to úsek asi 150 aminokyselín, ktorý je prítomný u mnohých chromatin asociujúcich proteínov. PWWP doména je podstatná vo funkčnej špecializácii *de novo* DNMT. Odstránením tejto domény dochádza k zníženiu schopnosti DNMT3a a DNMT3b metylovať majoritné satelitné repetície v oblasti pericentrického heterochromatínu (Chen et al., 2004). Prítomná ATRX doména asociuje s histondeacetylázou (HDAC). Takzvaná rastlinná homeodoména (PHD) je dôležitá pri ďalších protein- protein interakciách a má hlavný represný charakter.

2.4.1.1. Proteínové interakcie DNMT1

N- terminálna doména DNMT1 poskytuje veľkú platformu pre významné protein- proteínové interakcie (Obr. 4). Z nich za zmienku stojí najmä interakcia s PCNA. Ďalšie interakcie ako napr. s transkripčnými korepresormi DAXX a DNMT1 asociujúcim proteínom (DMAP1) ďalej s histondeacetylázami (HDAC1 a HDAC2) predznamenávajú, že DNMT1 bude zohrávať veľmi podstatnú úlohu v represii, chromatinovej remodelácii a jej kondenzácii. Ďalšou je interakcia s PML-RAR, čo je onkogenetický transkripčný represor (Rountree et al., 2000). DNMT1 taktiež interaguje s E2F1 transkripčným faktorom a pRb proteínom suprimujúcim tumor (Robertson et al., 2000). Interakcia s metyl väzbovými doménami (MBD2, MBD3) jednoznačne naznačuje na transkripčnú represiu oblastí modifikovaných metyláciou DNA.

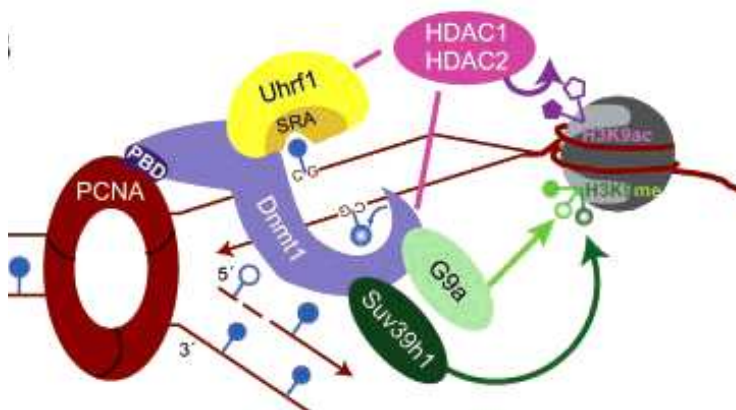


Obr.4 Proteín-proteínové interakcie DNMT1 (Robertson 2002)

2.4.1.2. DNMT1 ako súčasť replikačných vidlíc

DNA metylačný status je klonálne dedičný a preto musí byť udržiavaný v deliacich sa bunkách. Vzorec metylácie je každý bunkový cyklus veľmi presne zachovaný prostredníctvom DNMT1, ktorá má preferenčnú afinitu k hemimetylovanému vláknu. Preto sa táto DNMT označuje ako udržovacia. Koreplikačne dopĺňa hemimetylovaný stav DNA do plne metylovaného.

PCNA, svorkový proteín, poskytuje interakčnú platformu pre Dnmt1 a proteín Uhrf1. Okrem toho PCNA proteín interaguje s CAF (chromatin assembly factor), ktorý utvára histónové komplexy na novosyntetizovanej DNA. Uhrf1 proteín rozpoznáva CpG dinukleotidy hemimetylovaného vlákna DNA prostredníctvom svojej SRA domény (SET and RING asociation domain) a kolokalizuje s DNMT1 (Obr. 5). Interakcia PCNA/DNMT1/Uhrf1 je esenciálnou. Dokazuje to tiež výrazná genómová hypometylácia v prípade neprítomnosti Uhrf1 proteínu, ktorá je porovnateľná s absenciou DNMT1 (Bostick et al., 2007). Zrušenie tejto interakcie vedie k výraznej hypometylácií v ľudských gliomových bunkách a má onkogenetické dôsledky (Hervouet et al., 2010)



Obr.5 Koreplikačný mechanizmus udržovania DNA metylácie prostredníctvom DNMT1. Koreplikačne dochádza k ďalším epigenetickým modifikáciám ako metylácia H3K9 histonmetyltransferázami Suv39H1 a G9a a k deacetylácii H3K9 za prítomnosti HDAC (Rottach, et al., 2009).

V skorej S fáze bunkového cyklu, teda v čase replikácie relaxovaného chromatinu- euchromatinu, ktorý je charakteristický aktívnou transkripciou a výrazne zníženou mierou metylácie, DNMT1 asociuje svojou N terminálnou doménou s transkripčným represorom DMAP1. Ten viaže TSG101 (tumor susceptibility gene 101) korepresor. V neskoršej fáze replikácie heterochromatinovej štruktúry, pericentromerických a telomerických repetícií DNMT1 priamou väzbou interaguje nielen s korepresormi, ale aj s HDAC2. Prítomnosť HDAC2 aktivity ako súčasti „neskoršieho“ replikačného komplexu zaručuje deacetyláciu a kompaktáciu heterochromatinovej štruktúry (Rountree et al., 2000).

Aktivita DNMT1 bola dokázaná premývaním na sukrózových gradientoch v prítomnosti vysokých koncentrácií solí a vždy imunochemicky detekovaná *in vitro* s

replikačnou aktivitou a DNA polymerázovou aktivitou. Okrem toho bola detekovaná slabá *de novo* aktivita DNMT1 v somatických bunkách. Ako proteín je veľmi tesne spojená s hlavnými komponentami replikačného komplexu, tzv. DNA syntezómu (Vertino et al., 2002).

Absencia DNMT1 v zárodočných a somatických bunkách vedie k rapidnému poklesu miery metylácie. Myši deficičné na DNMT1 strácajú približne 90% miery metylácie DNA genómu, čo je nezlučiteľné so životom a zomierajú v skorých fázach embryogenézy. Myšacie embryonálne kmeňové bunky deficičné na DNMT1, hoci schopné rastu, zomierajú akonáhle dochádza i indukciu ich diferenciácie. V prípade podmienených mutantov bunkových fibroblastov dochádza k bunkovej smrti po niekoľkých deleniach od génovej delécie (Li et al. 1992).

Strata DNMT1 vedie k masívnym zmenám príslušného bunkového typu na niekoľkých úrovniach: dochádza k expresii imprintovaných génov, narušeniu kontroly bunkového cyklu, p53 indukovanej apoptóze, k obnoveniu expresie p21^{WAF/CIP1}, k transdukcii pod vplyvom zvýšenej hladiny rastových faktorov/receptorov a v neposlednej miere k mobilizácii retroelementov (Jackson-Grusby et al. 2001). Proteín p53 hrá veľmi podstatnú úlohu v regulácii expresie DNMT1. V HCT116 bunkovej línii deficičnej na p53 dochádza k šesť-násobnému nárastu DNMT1, tak na úrovni mRNA ako aj proteínu. p53 kontroluje expresiu DNMT1 priamou konsenzus väzbou do regulačnej oblasti prvého exónu DNMT1. Strata p53 proteínu ako skorého dôsledku tumorogenézy vedie k zvýšeniu DNMT1 expresie čoho následkom je aberantná genómová metylácia (Peterson et al., 2003).

Zaujímavá je štúdia nádorovej bunkovej línie HCT116 a DNMT deficičných línií z nej odvodených. V prípade absolútnej delécie DNMT1 homologickou rekombináciou *cre* systémom je pozorovaná len veľmi malá zmena metylácie genómu; približný pokles metylácie je len o 20%, pričom aktivita DNMT1 sa znížila o 96%. Potvrďuje to taktiež plný metylačný stav CpG ostrova tumor supresorového génu p16^{INK4a}, ktorý zostáva i po delícii plne metylovaný a umlčaný. Veľmi podobná situácia je i u DNMT3b^{-/-}. DNA metyltransferázová aktivita bola úplne zrušená v bunkách DKO (double knockout) na DNMT3b a DNMT1, kde je 95% redukcia obsahu m⁵C oproti WT (wild type), čo je porovnateľné s výsledkom po použití 5-aza-2-deoxycitidinu (5-aza-dC), inhibítora metyltransferáz. Masívnu redukciu globálnej metylácie potvrdila restrikcia *HpaII* m⁵C citlivou endonukleázou. V DKO došlo k strate metylácie v sekvencii satelitu 2 ako aj v oveľa širšie zastúpených repetitívnych sekvenciách Alu, ale taktiež k úplnej strate imprintingu *IgfII*. Dôkazom je i restrikčná analýza po *MspI* digescii, čo je k m⁵C necitlivý *HpaII* izoschizomer.

Ďalším podkladom tejto štúdie je analýza metylácie promotora génu *TIMP-3* ktorý je umlčaný a hypermetylovaný v najrôznejších ľudských nádorových bunkách. Na základe sekvenácii po bisulfitovej konverzii je zrejмый jeho plný metylačný status v divokom kmeni, pričom výrazná promotorová demetylácia bola dokázaná v DKO, ktorá je porovnateľná s použitím 5-aza-dC. Analogicky je to i u p16^{INK4a}. Čo sa týka štúdia straty genotypového imprintingu *IgfII*, ktorého udržanie je DNMT závislé, u DNMT1^{-/-}, DNMT3b^{-/-} a WT je výrazne exprimovaná maternálna alela A, kdežto paternálna alela B je úplne umlčaná. U DKO dochádza k úplnej strate imprintingu.

Vysvetlením je kooperácia medzi jednotlivými DNMT navzájom. Táto štúdia jednoznačne demonštruje že DNMT3b a DNMT1 kooperatívne udržujú všetku genómovú metyláciu v HCT116 bunkách (Rhee et al. 2002).

2.4.1.3. Izoformy DNMT1

U DNMT1 boli popísané izoformy vytvorené alternatívnym zostrihom pôvodného *DNMT1* génu. Sú to dlhšia DNMT1b a kratšia DNMT1o. Kratšia izoforma DNMT1o je prítomná v myšacích nedeliacich sa oocytoch, kde sa akumuluje vo veľmi vysokom množstve v cytoplazme a následne sa translokuje do jadra počas 8-bunkového štádia. Udržuje metylačný status imprintovaných a stabilne metylovaných oblastí v preimplantačnom vývoji počas masívnej demetylačnej vlny. Špecifický oocytárny promotor a neprítomný prvý 5' exón spôsobujú, že translácia je zahájená z druhého iniciačného kodónu ATG. Tým dochádza ku skráteniu o 118 aminokyselinových zvyškov oproti dlhšej forme. Vďaka tejto restrikcii je možné aby DNMT1o sa viazala na annexin V. Annexin V je proteín viažúci fosfolipid, ktorý je veľmi citlivý na hladinu vápenatých iontov a udržiava DNMT1o izoformu v cytoplazme myšacích oocytov a skorých embryí (Cirio et al. 2008).

DNMT1b je dlhšou variantou alternatívneho zostrihu pôvodného DNMT1 génu. Táto zostrihová forma obsahuje extra 48 párov bazí medzi 4. a 5. exónom, vytvárajúc proteín dlhší o 16 aminokyselín. Je exprimovaná vo všetkých bunkových líniiach a jej enzymatické vlastnosti sú porovnateľné s aktivitou DNMT1 (Hsu et al., 1999).

2.4.2. DNMT2

Je najnovším charakterizovaným členom rodiny DNA metyltransferáz. Jej homológy sú dokázané u všetkých ríš od protist až po živočchy. DNMT2 bola pôvodne identifikovaná vo výskume *de novo* DNMT, ako exprimujúca sa sekvencia, ktorá preukazovala vysokú homológiu s bakteriálnou DNA metyltransferázou *HhaI* (Dong et al. 2001). DNMT2 je charakteristická jedinou C termnálnou katalytickou doménou. To predznamenáva jej DNMT aktivitu. No žiadne biochemické analýzy to nedokázali. V prípade myšacích embryonálnych kmeňových buniek, absencia DNMT2 proteínu žiadnym spôsobom nepreukázala zmeny v DNA metylácii (Okano et al. 1998).

Okrem toho purifikovaný rekombinantný proteín DNMT2 metyluje izolované cytozínové sekvencie *Drosophila melanogaster* bez akejkoľvek rozpoznávacej sekvenčnej špecifity, ktorá by DNMT2 nasmerovala do príslušného miesta metylácie (Lyko et al., 2000). Možným dôvodom nízkej DNMT aktivity, ako aj nízkej špecifity je absencia aktivačného kofaktora ako aj stéricky veľmi nevyhovujúca aminokyselina tyrozín v rozpoznávajúcej doméne metyltransferázy (Goll and Bestor 2005). DNMT2 má však pomerne vysokú afinitu k transferovým RNA transkriptom, konkrétne k tRNA^{Asp}. S vysokou špecifitou dochádza k metylácii transferovej RNA v pozícii cytozínu 38 (Goll et al. 2006). Táto metylácia má dôležitý význam v stabilite a správnom zložení tRNA. tRNA DNMT aktivita DNMT2 bola dokázaná tak *in vivo* ako aj *in vitro* (Schaefer et al. 2009). Využitím metódy miestne špecifickej mutagenézy bola

preukázaná DNA metyltransferázová aktivita závisla na neporušených motívoch IV, VI a VII, ktoré sú nevyhnutné k metylácii. Na rozdiel od iných metyltransferáz, hlavným katalytickým motívom nie je IV ale práve cysteínová skupina motívu IV. DNMT2 je prvým príkladom RNA metyltransferázy s podobným DNA metyltransferázovým mechanizmom ako je tomu u iných členov rodiny metyltransferáz (Jurkowski et al. 2008). Zaujímavosťou je taktiež štúdia Schaefera, ktorý identifikoval demetyláciu tRNA^{Asp} v línii nádorových buniek za použitia 5-azaC. Nádorové bunky po pridaní 5-azaC vykazovali výrazne nízku metabolickú aktivitu. Okrem toho inhibícia RNA metylácie sprostredkovaná DNMT2 má antiproliferačný účinok na nádorové bunky. Preto DNMT2 je možným biomarkerom terapie pomocou 5-azaC (Schaefer et al. 2009).

2.4.3. *De novo* DNA metyltransferázy

De novo DNMT sú zodpovedné za vytvorenie metylačného statusu na nemodifikovanom vlákne DNA. Globálna *de novo* metylácia DNA sa objavuje v skorej embryogenéze po masívnej demetylačnej vlne, kedy DNA metylácia je znovu ustanovená pre epigenetické reprogramovanie.

DNMT3a a DNMT3b su veľmi bohato exprimované v embryonálnych tkanivách, kým v diferencovaných bunkách sa udržiava ich nízka expresia. Sú nevyhnutnými pre ustanovenie metylačných vzorcov a správny embryonálny vývoj. Metylčné vzorce sa zakladajú *de novo* metyláciou počas embryogenézy, kedy metylačný status DNA sa znovu zakladá po takmer kompletnej demetylácii DNA v čase prvého bunkového delenia (Reik et al. 2001).

De novo metylácia sa môže objaviť v neskoršom vývoji a taktiež v dospelých bunkách v prípade umlčania provírusovej DNA, ktorá vnikla do genómu. Aberantná *de novo* metylácia môže viesť k hypermetylácii promotorov génov suprimujúcich tumor a tým k malignému zvrhnutiu a tumorogéze (Baylin and Herman 2000).

Transgénne myši, v ktorých absentuje DNMT3a a zároveň DNMT3b sú výrazne hypometylované a tento stav je nezlučiteľný so životom. Zomierajú na úrovni embryonálneho vývoja alebo veľmi tesne po narodení ako je tomu u DNMT3a deficientných myší. Absencia oboch DNMT je omnoho vážnejšia než absencia jednej z nich. Z toho vyplýva, že sa vo funkcii do určitej miery nahrádzajú (Okano et al. 1999).

DNMT3a veľmi účinne kooperuje s DNMT1 v procese *de novo* metylácie. V prípade kedy DNMT3a predchádza DNMT1 aktivite sa aktivita DNMT1 5-násobne zvýši. To znamená že DNMT3a stimuluje aktivitu DNMT1, bez priamej interakcie. V prípade spoločnej inkubácie enzýmov sa táto stimulácia DNMT1 aktivity mierne zvýši, čo môže byť spôsobené v tomto prípade priamou interakciou enzýmov. Aktivita DNMT1 sa výrazne zvyšuje v prípade už modifikovanej DNA metylovými skupinami, ktoré boli ustanovené DNMT3a a prostredníctvom DNMT1 dôjde k rozšíreniu metylácie po celej DNA doméne. *In vivo* DNMT3a vytvára teda hemimetylované miesta počas *de novo* DNA metylácie. Tie sú rozpoznávané DNMT1, ktorá ma oveľa vyššiu afinitu k hemimetylovanému vláknu. DNMT1 po rozpoznaní metylačnú značku rozšíri do blízkeho okolia. A teda môžeme hovoriť o akejsi *de novo* aktivite DNMT1 (Fatemi et al. 2002).

Nešpecifická metylácia DNA vedie k utváraniu abnormálnych metylačných vzorcov. Tento jav je dôsledkom tumorogenézy. Jedná sa hlavne o hypermetyláciu CpG ostrovov tumor supresorových génov a ich regulačných oblastí. Taktiež hypometylácia protoonkogénov môže viesť k malignému zvrhnutiu a dereguláciám vedúcim k zvýšenej proliferácii. V nádoroch bolo identifikovaných veľké množstvo génov, ktoré sú metylované *de novo* DNMT. DNMT3a má potenciál k špecifickému nasmerovaniu a inhibícii určitého génu. Väčšinou jej účinok sa spája DNMT3b aktivitou. V tumoroch bolo identifikovaných málo génov, ktorých metylačný stav je DNMT3a závislý, jednými z nich sú: plakoglobín a imprintovaný gén *SFRP5*. V hepatocelulárnom karcinóme dochádza k metylácii *PTEN* génu, hlavného regulačného proteínu hepatocelulárnej tumorogenézy, ktorého CpG ostrov promotoru je bohato metylovaný práve vďaka DNMT3a. PTEN proteín je regulačným proteínom PI3/AKT signálnej dráhy. V prípade DNMT3a deficientnej bunkovej línie hepatocelulárneho karcinómu SMMC-7721 dochádza k inhibícii bunkovej proliferácie a formácii bunkových kolónií. Taktiež sa objavuje demetylácia CpG ostrova *PTEN* génu (Zhao et al., 2010). Jedným z ďalších génov, ktoré sú metylované v HCC je Sall3. Jedná sa o priamy inhibítor DNMT3a. Doménou zinkového prstu rozpoznáva PWWP doménu DNMT3a a tým inhibuje aberantnú metyláciu CpG ostrovov iných regulačných génov. Zvýšením jeho expresie dochádza k bráneniu väzby DNMT3a na chromatin. Jeho umlčanie vedie k zvýšeniu DNA metylácie v HCC (Shikauchi et al., 2009).

Na druhej strane DNMT3b v prípade kolorektálneho karcinómu vytvára a udržiava tzv. metylačný fenotyp CpG ostrovov, čo súvisí s vysokou expresiou DNMT3b vedúcej k masívnej metylácii CpG ostrovov génov suprimujúcich tumor. DNMT3b metyluje niektoré preferenčné CpG ostrovy nenáhodne, obzvlášť sa jedná o CpG ostrovy hlavných tumor supresorových génov ako napr. APC, p21, p53, p16, β -katenin a mnoho ďalších (Nosho et al., 2009)

V dôsledku mutácií DNMT3b, ktoré sa vyskytujú v prípade ICF syndrómu (immunodeficiency, centromeric instability, and facial anomalies) dochádza k masívnej demetylačnej vlne pericentromerických majoritných satelitných repetícií (Ehrlich et al. 2001). Následne dochádza k výraznej chromozomálnej nestabilite spojenej s výskytom chromozomálnych zlomov. Jedná sa o imunodeficientné ochorenie, u ktorého úmrtnosť je vo veľmi skorom dectve. Chromozomálna nestabilita sa prejavuje hlavne v pericentromerických oblastiach chromozómov 1, 16 a niekedy 9. Je to spôsobené výraznou hypometyláciou satelitu 2 chromozomu 1, satelitu 3 chromozomu 9 a satelitnej sekvencie chromozomu Y (Ehrlich et al. 2008).

2.4.4. DNMT3L

DNMT3L je hlavný, enzymaticky inaktívny regulačný faktor *de novo* DNMT. I keď neobsahuje hlavné katalitické motívy potrebné k metylácii, je stimulátorom aktivít *de novo* DNMT a je esenciálny pre ustanovenie maternálneho imprintingu a v metylácii transposibilných elementov v samčej zárodočnej línii (Bourc'his and Bestor 2004).

K aktivácii *de novo* DNMT dochádza priamou väzbou C terminálnej domény DNMT3L a ich katalytických domén. Katalytická aktivita DNMT3a a DNMT3b sa asi

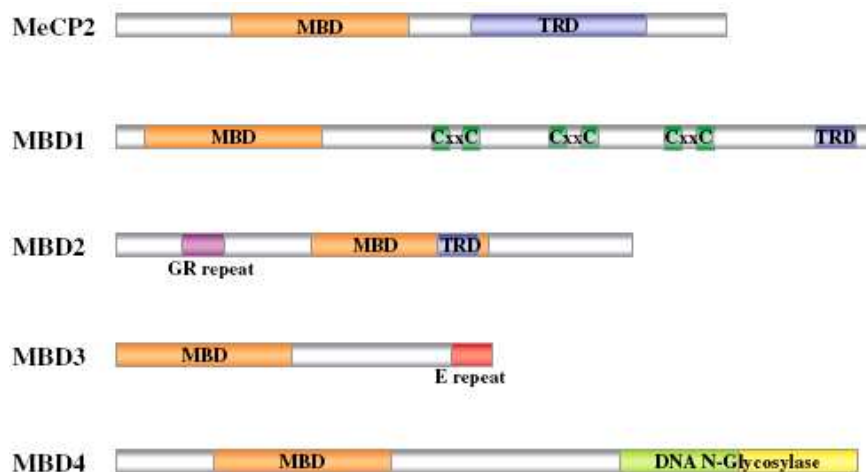
15 -krát zvýši za prítomnosti tohto kofaktoru a zároveň sa veľmi výraznou mierou uľahčí vznik väzby medzi DNMT a DNA. Väzba medzi DNMT3L a DNMT3a navodí konformačnú zmenu a odhalí v metyltransferáze miesto pre väzbu AdoMet. Dnmt3L je pre metyltransferázy vymieňajúcim substrátovým faktorom. Interakcia medzi DNMT3a a DNMT3L je transientná. Po väzbe DNMT3a na DNA dochádza k disociácii DNMT3L, čím sa sťažuje uvoľnenie metyltransferázy z protein-DNA komplexu a dochádza k tesnejšej väzbe (Gowher et al. 2005).

Okrem toho DNMT3L interaguje s HDAC prostredníctvom svojej PHD domény a prispieva ku génovému umlčaniu, ktoré nie je sprostredkované metyláciou DNA (Deplus et al. 2002). DNMT3L v komplexe s DNMT3a dochádza k interakcii ich C terminálnych domén za vzniku heterodiméru. Tieto heterodiméry interagujú prostredníctvom DNMT3a-DNMT3a interakcií za vzniku tetramétnych komplexov s dvoma aktívnymi metyltransferázovými miestami. Tieto sú od seba separované jednou DNA otáčkou. C terminálna doména oligomerizuje a vytvára nukleoproteínové filamentum (Jurkowska et al. 2008).

2.5. Metylácia DNA a jej kooperácia s histonovými modifikáciami

2.5.1. Metyl CpG väzbové proteíny vo vzťahu k metylácii DNA

Modifikované cytozínové bázy metyláciou DNA sú rozpoznávané tzv. metyl-väzbovými doménami (MBD). Tieto proteíny prepájajú vplyv metylácie DNA s represívnymi chromatinovými modifikáciami. Prostredníctvom svojich transkripčných represívnych domén (TRD) interagujú s nukleozomálnymi remodelačnými komplexami represného charakteru. Tieto vzájomné interakcie vedú k transkripčnej represii metyláciou modifikovanej oblasti (Klose and Bird 2006). Každý z týchto proteínov obsahuje MBD, ktorou rozpoznáva m^5C vo veľkom žliabku DNA. Do tejto rodiny patria proteíny MBD1, MBD2, MBD3, MBD4 a MeCP2 (methyl cytozin protein 2) (Obr.6). Okrem MBD4 všetky MBD proteíny formujú komplexy s HDAC a histonmetyltransferázou (HMT) Suv39H1. MBD3 je komponentou represného chromatin remodelujúceho komplexu Mi-2/NuRD, s ktorým asociuje taktiež MBD2 (Wade 2001). MBD1 je zase súčasťou represného chromatin remodelačného komplexu MeCP1 (Cross et al. 1997)



Obr.6 Prehľad m^5C väzbových proteínov (Dhasarathy and Wade 2008).

2.5.1.1. MeCP2

MeCP2 je vysoko zastúpený chromozomálny proteín, ktorý sa vyskytuje s metylovanou DNA v jadre. Zo štruktúrneho hľadiska obsahuje N terminálnu metyl-CpG väzbovú doménu a C terminálnu TRD. MBD doménou rozpoznáva metylovanú cytozínovú bázu. Vďaka represívnej doméne je považovaný za spojovník medzi DNA metyláciou a represívnymi histonovými modifikáciami. TRD doména MeCP2 proteínu interaguje s korepresorom mSin3a čo vedie k naviazaniu HDAC. MeCP2 proteín je teda veľmi podstatný v ustanovení dlhotrvajúceho transkripčného umlčania (Ballestar and Wolffe 2001). Okrem DNA väzbovej špecificity MeCP2 je RNA väzbový proteín, ktorý ovplyvňuje alternatívny zostrih transkriptov v mozgu (Young et al. 2005).

Mutácie v géne *MeCP2* sú príčinou Rettovho syndrómu. Gén *MeCP2* sa nachádza na Xq28 chromozóme. Približne 70% mutácií má tranzičný pôvod. Prejavmi tohoto syndrómu je mentálna retardácia s autistickými prejavmi, neonatálna encefalopatia u mužov a neonatálne spomalenie rastu hlavy (Moretti and Zoghbi 2006).

2.5.1.2. MBD1

Je unikátnym členom MBD represnej rodiny, pretože obsahuje dve alebo tri kópie cysteín bohatých oblastí (CXXC). Na rozdiel od iných MBD proteínov asociuje aj s nemetylovanými promotormi. Ako MeCP2 i MBD1 obsahuje veľmi silne aktívnu TRD doménu (Fujita et al. 2000). Strata MBD1 vedie k rozvoju neuronálnych defektov a k zvýšeniu replikačnej schopnosti niektorých retroelementov (Zhao et al. 2003).

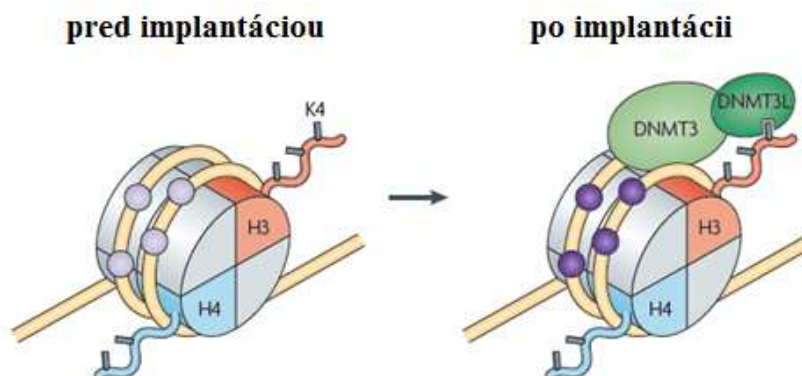
2.5.1.3. MBD4

Je jediným proteínom, ktorý sa neobjavuje v procese transkripčnej represie. Obsahuje MBD doménu a DNA glykozylázovú doménu. Vďaka glykozylázovej, opravnej doméne MBD4 proteín minimalizuje výskyt spontánnych deaminácií m⁵C na T. V konečnom dôsledku svojou aktivitou opravuje tieto mutačné miesta odstránením T alebo U po nasledujúcej replikácii (Millar et al. 2002).

2.5.2. Histónová modifikácia H3K4 a DNA metylácia

Väčšina CpG dinukleotidov živočíšneho genómu je metylovaná, okrem tých ktoré sú súčasťou CpG ostrovov. K zrušeniu metylačného statusu dochádza v skorom embryu a je znovu ustanovený približne v čase implantácie *de novo* metyláciou (Okano, Bell et al. 1999). Nedávne štúdie naznačujú, že ustanovenie základného profilu metylácie DNA veľmi úzko súvisí s histonovou modifikáciou. Podľa tohto modelu metylácia (vrátane mono, di a trimetylácie) lyzínu 4 na históne H3 (H3K4me) predchádza metylácii DNA (Ooi et al. 2007). Metylácia H3K4 je zrejme ustanovená mechanizmom sprostredkovaným RNA-polymerázou II (RNA pol II). V miestach, kde RNA pol II zotrúva sa dostáva H3K4 metyltransferáza a modifikuje ho (Guenther et al. 2007).

Nukleozómy týchto miest a CpG ostrovy sú označené H3K4me, kým zvyšok genomu obsahuje nemetylovaný H3K4. V čase implantácie, DNMT3L ako hlavný kofaktor *de novo* metylácie rozpoznáva svojou aminoterminálnou PHD doménou nemetylované H3K4. Svojou C terminálnou doménou privádza priamou interakciou do týchto miest DNMT3a,b (Hu et al. 2009). Následným krokom je metylácia CpG dinukleotidov kolokalizovaných s nemetylovaným H3K4 (Obr.7). Metylácia H3K4 sa nachádza v transkripčne aktívnych oblastiach a v oblasti CpG ostrovov. Vďaka tejto modifikácii nedochádza k väzbe DNMT3L a teda ani k *de novo* metylácii týchto oblastí, ktoré zostávajú transkripčne aktívne s relaxovanou formou chromatinu (Ooi et al. 2007).



Obr. 7 Metylačný status H3 histónu pred a po implantácii embrya. Nemetylovaný H3K4 je rozpoznávaný DNMT3L kofaktorom, ktorý privádza *de novo* DNMT (Cedar and Bergman 2009).

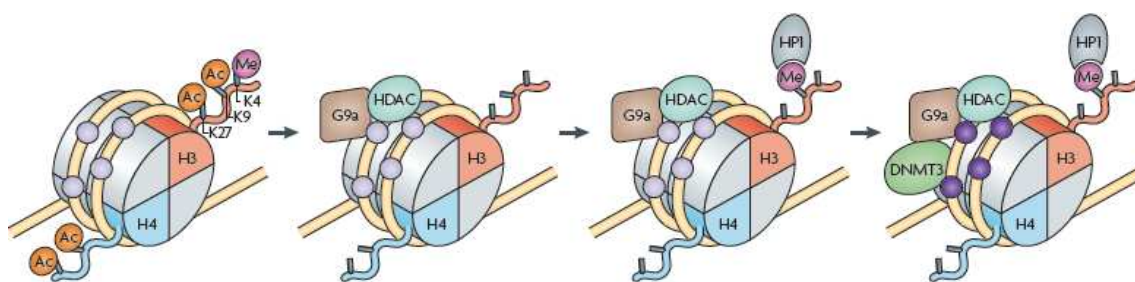
Tento bimodálny systém ustanovenia metylačného statusu závislého na histonovej modifikácii a metylácii DNA sa uskutočňuje v čase implantácie embrya. Ustanovený profil je následne predmetom zmien, ktoré prebiehajú počas ďalšieho vývoja, vrátane *de novo* metylácie ako aj demetylácie. Jedná sa hlavne o *de novo* metyláciu regulačných oblastí génov pluripotencie a to v čase gastrulácie, kedy sa zakladajú zárodočné vrstvy (Weber et al. 2007).

2.5.3. Histonová metylácia H3K9 a metylácia DNA

Metylácia H3K9 je najlepšie preštudovanou histonovou modifikáciou, ktorá iniciuje génové umlčanie. Spolu s metyláciou DNA veľmi úzko spolupracujú pri vytváraní represného chromatinového stavu a tým transkripčne inaktivujú modifikovanú oblasť.

V inhibícii pluripotentných génov ako napr *Oct4* je prvým krokom interakcia represoru s príslušným promotorom pluripotentného génu. Toto je nasledované väzbou histonmetyltransferázy G9a a histondeacetylázy HDAC. Deacetyláciou dôjde k odstráneniu acetylových skupín z kritických oblastí H3K9 čo umožní ich metyláciu prostredníctvom HMT G9a. H3K9 je rozpoznávaný HP1 proteínom. Konečnou modifikáciou je masívna metylácia CpG dinukleotidov prostredníctvom rekrutovanej *de novo* DNMT čo spôsobuje heterochromatinizáciu modifikovanej oblasti (Obr. 8). Táto

dráha je veľmi podstatná v postimplantačnom štádiu embryogenézy kedy dochádza k ustanoveniu expresných génových profilov (Cedar and Bergman 2009).

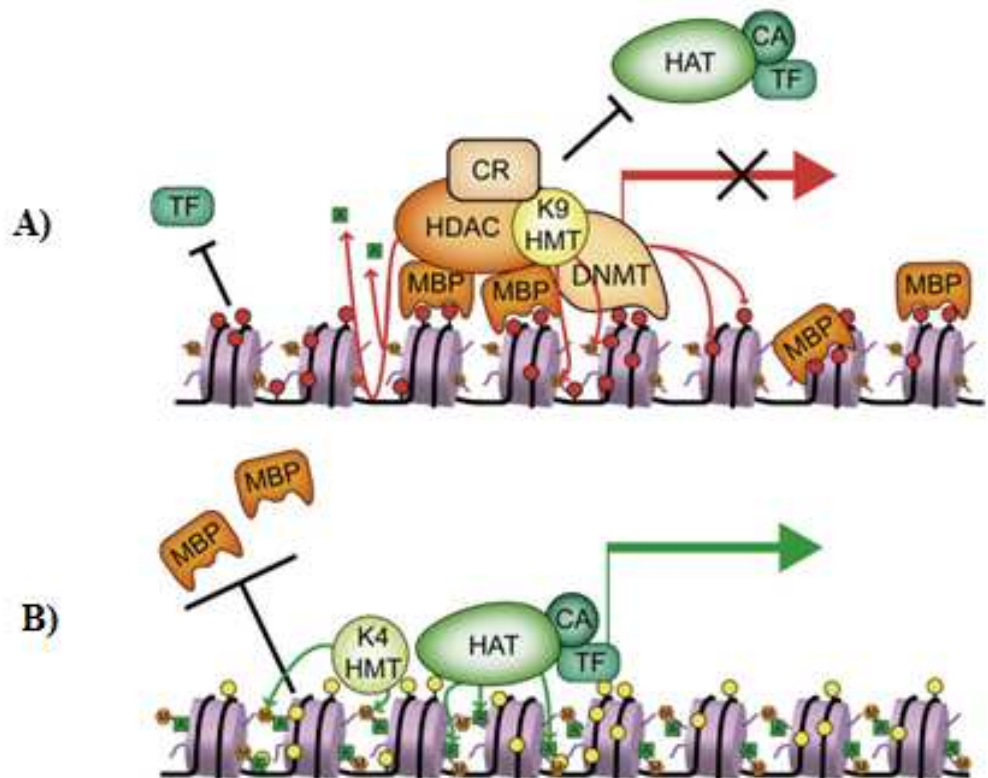


Obr.8 Umlčanie pluripotentných génov počas embryogenézy (Cedar and Bergman 2009)

Tak ako DNMT1 je kolokalizovaná v oblasti replikačných počiatkov, *de novo* metyltransferázy asociujú s pericentromerickým chromatómom a sú prítomné v oblasti bohato metylovaných SINE a LINE elementov, ktoré sú metyláciou stabilne a dlhotrvajúco umlčané (Jeong et al. 2009). Tu sú metyltransferázy v priamej interakcii s MBD proteínami a HDAC2. Po metylácii CpG dinukletidu, ktorý je rozpoznávaný MBD proteínom dochádza k deacetylácii a metylácii histónov. HMT Suv39H1 masívne metyluje H3K9 do trimetylovaného stavu. Táto represná značka je rozpoznávaná heterochromatinovým proteínom 1 (HP1), ktorý navodzuje a udržuje heterochromatinovú štruktúru v pericentrickej oblasti a v oblasti majoritných satelitných sekvencií (Rottach et al. 2009). V myšiacich embryonálnych kmeňových bunkách, kde absentuje histon trimetyltransferáza Suv39H1- Suv39H2 dochádza k výraznej hypometylácii mobilných genetických elementov a zvyšuje sa riziko genotoxicity a zároveň dochádza k výraznému poklesu CpG metylácie závislej na DNMT3b v oblasti majoritných centromerických satelitov (Lehnertz et al. 2003).

Spolupráca metylácie DNA a histonových modifikácií je vzájomne veľmi úzko prepojená (Obr.9) a nedá sa jasne povedať aká je konsekvencia týchto procesov. Zdá sa však že práve histónová modifikácia je predchodcom DNA metylácie. Niektoré práce na to veľmi jasne poukazujú. Jeden z hlavných tumor supresorových génov inhibítora CDK2 p16^{INK4a}, je v bunkách tumoru hypermetylovaný. WT alela tohto génu je umlčaná hypermetyláciou a druhá, bohato mutovaná je exprimovaná, ale nefunkčná v divokom kmeni (WT) bunkovej línie HCT116 odvodenej od kolorektálneho karcinómu. V prípade bunkovej línie HCT116 deficientnej v DNMT1 a DNMT3a géne (DKO-double knockout) je znížené umlčovanie wt alely génu. V 22. pasáži došlo k výraznému zvýšeniu tempa rastu a wt alela p16^{INK4a} bola opäť kompletne umlčaná bez vplyvu metylácie DNA, čo bolo dokladované sekvenáciou CpG ostrova po bisulfitovej konverzii. Analyzovaných 20 CpG dinukleotidov boli bez metylácie cytozínu. Chromatínovou imunoprecipitáciou bol v tejto pasáži u wt alely detekovaný H3K9me, ktorým sa znovuustanovil umlčaný stav. V bunkovej línii divokého kmeňa alela génu je úplne umlčaná a bohato metylovaná. Po strate metylácie dochádza k ustanoveniu H3K9 represnej značky, ktorá v neskorších fázach bunkového rastu asociuje s metyláciou DNA a deacetyláciou H4 histónu, čo vedie ku chromatínovej kompresii (Bachman et al., 2003). Použitie TSA, histondeacetylázového inhibítora má minimálny efekt na

expresiu histonmetyláciou a metyláciou DNA modifikovaných tumor supresorových génov. Za použitia 5-azaC, inhibítora DNMT aktivity, dochádza k rapídnej strate H3K9 metylácie v mieste umlčania, čo vedie k reaktivácii génovej expresie. Metylácia H3K4 je intaktná k TSA, ale jej miera sa zvýši po použití 5-aza-dC a tým prispieva k obnoveniu expresie. Je asociovaná s transkripčne aktívnym chromatínom. Dá sa teda povedať, že zvýšenie H3K9me a zníženie miery H3K4me prispieva k udržaniu DNA metylácie a tým k umlčaniu génov v bunkách korektálneho karcinómu (Kondo et al., 2003). Ďalším príkladom tumor supresorovej inaktivácie prostredníctvom aberantnej DNA metylácie a histonových modifikácií je inaktivácia *sFRP2* inhibítora Wnt signalizačnej dráhy. Inaktivácia vedie k vývoji obličkového nádoru (Kawamoto et al., 2008)



Obr. 9 Epigenetická regulácia génovej transkripcie. Panel A označuje transkripčne inaktívny chromatín s vysokou aktivitou DNMT, čo vedie k bohatej metylácii CpG dinukleotidov. Metylovaná oblasť je rozpoznávaná korepresorovými komplexami (CR), ktorých súčasťou sú MBD, tým bránia naviazaniu obecných transkripčných faktorov (TF) a histonacetyltransferáz (HAT). Súčasťou CR (napr. *mSin3a*) je HDAC, ktorej aktivita vedie k ustanoveniu represívneho stavu deacetyláciou chromatínu nasledovanej metyláciou H3K9. Panel B znázorňuje transkripčne aktívny stav chromatínu, s bohatou acetyláciou H3, metyláciou H3K4, čo umožňuje nasadenie TF a aktivačnými komplexami (AC) (Sigalotti et al., 2007)

2.6. Retrovírusy

2.6.1. Replikačný cyklus retrovírusov

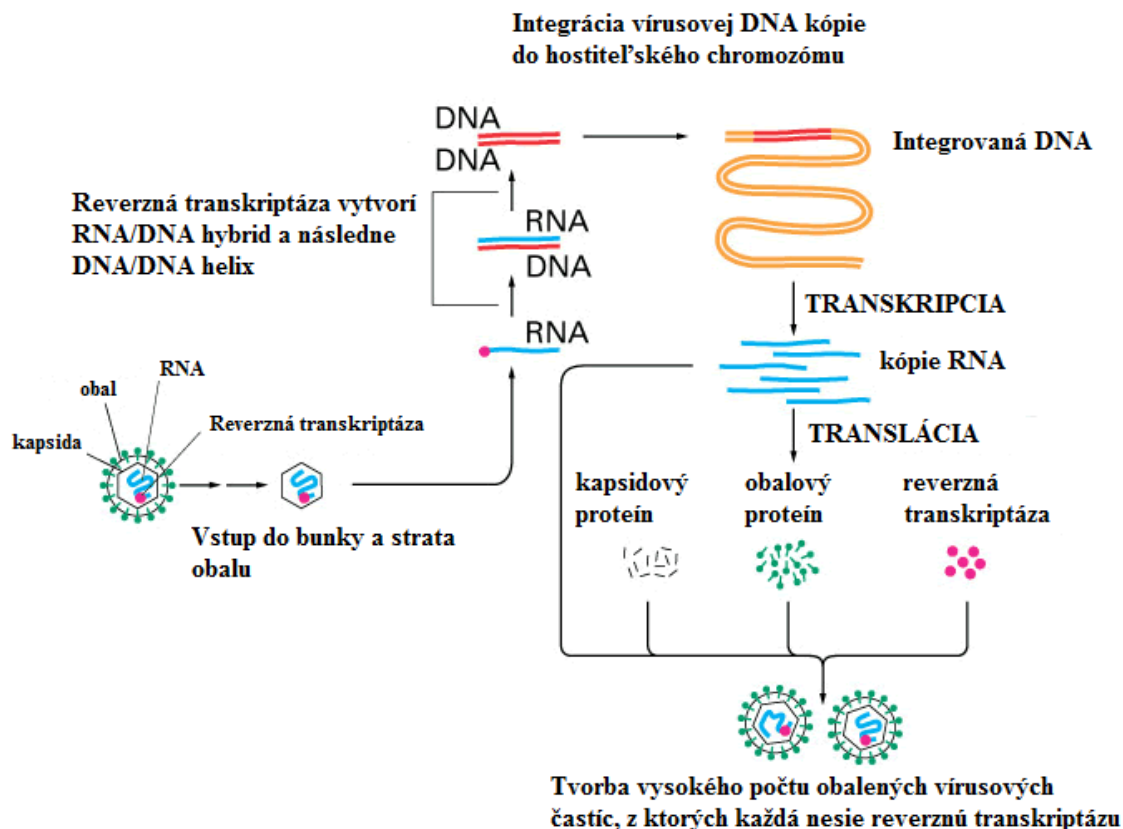
Prototypický retrovírus obsahuje veľmi jednoduchý genóm pozostávajúci z dvoch identických molekúl RNA, ktoré kódujú tri gény: *gag* (group specific antigen), *pol* (polymerase) a *env* (envelope). Replikačný cyklus retrovírusov začína špecifickou receptorovou väzbou viriónu na bunkový povrch a potom ako u všetkých obalených vírusov dochádza k fúzii vírusového obalu s membránou. Fúzia nastáva buď na bunkovom povrchu alebo po internalizácii do endozómu, odkiaľ sa do cytoplazmy uvoľní vírusová kapsida. Po proteolytickej degradácii kapsidy sa uvoľní reverzne transkripčný komplex (Suzuki and Craigie 2007). Druhým krokom replikačného cyklu je reverzná transkripcia, ktorou dôjde k prepisu jednoreťazcového pozitívneho RNA genómu na dvojreťazcovú lineárnu formu DNA. Výsledkom reverznej transkripcie je zdvojenie LTR regulačných oblastí, ktoré lemujú 5' a 3' konce provírusu oproti pôvodnému RNA genómu (Obr. 10).



Obr.10. Schéma štruktúry retrovírusu po priebehu reverznej transkripcie. Jeho súčasťou sú 5' a 3' dlhé terminálne repetície (LTR), 5' väzbová oblasť pre primer reverznej transkripcie (PBS) a 3' polypurínová oblasť (PPT) (Anson 2004)

Retrovírusová DNA je transportovaná vo forme preintegračného komplexu (PIC) k bunkovému jadru prostredníctvom miktortubúl. PIC obsahuje tak vírusové ako bunkové proteínové podjednotky, ako napr. BAF (barrier-to-autointegration factor), HMG (high mobility group protein), LEDGF/p75 (lens epithelium derived growth factor) (Llano et al. 2004). Následným krokom je integrácia dvojreťazcovej lineárnej vírusovej formy DNA do genómu hostiteľa za prítomnosti vírusovej integrázy za vzniku integrovaného provírusu. Väzba na receptor, endocytóza, uvoľnenie kapsidy, reverzná transkripcia a integrácia končiaca provírusom tvoria skorú fázu replikačného cyklu (Obr. 11). Pozdná fáza začína transkripciou integrovaného provírusu hostiteľskou RNA pol II a vírusové RNA sú exportované z jadra do cytoplazmy. Tri vírusové štruktúrne proteínové prekurzory sa translatujú v cytoplazme. Týmto sú: gag, gag-pol polyprotein a povrchový env protein. Vírusové proteíny sú transportované pod cytoplazmatickú membránu vezikulárnou alebo cytoskeletárnou cestou (Nisole and Saib 2004). Pod membránou nasleduje formovanie nového vírusového potomstva v podobe nezrelých častíc, ktoré sú uvoľňované z bunkového povrchu. Aktiváciou vírusovej proteázy dôjde v uvoľnených viriónoch k drastickému preorganizovaniu v dôsledku špecifickej proteolýzy vírusových polyproteínov, čím sa virion stáva zrelým (Goff 2007).

V nasledujúcich kapitolách je stručne popísaný mechanizmus integrácie a transkripcie, ktoré vzhľadom k umlčovaniu retrovírusu sú kľúčové.



Obr. 11. Schéma replikačného cyklu retrovírusov (Alberts et al, 1998)

2.6.2. Integrácia retrovírusov a jej produktivita

Integrácia retrovírusov do hostiteľského genómu je určujúcim krokom ich replikačného cyklu. Po reverznej transkripcii dochádza k vytvoreniu PIC, ktorý pozostáva tak z vírusových ako aj z bunkových proteínových faktorov. Tento komplex zaručuje transport vírusovej DNA do jadra a jeho integráciu do hostiteľského genómu. Vírusová integráza rozpozná invariálny CA/GT dinukleotid v blízkosti každého 3' konca neintegrovanej DNA formy retrovírusového genómu (Katzman and Katz 1999). U mnohých vírusov sa zloženie PIC odlišuje napr. PIC u Moloneyho vírusu myšacej leukémie (MoMLV) pozostáva z kapsidového proteínu a integrázy. Ale napr. u vírusu ľudskej imunodeficiencie (HIV) je oveľa komplexnejší. Obsahuje nukleocapsidový, matrixový proteín, reverznú transkriptázu, integrázu, proteín Vpr a bunkový LEDGF/p75. Deplécia alebo pozmenenie N- koncovej domény tohto faktora vedie k výraznému zníženiu účinnosti ako aj preferencií lentivírusovej integrácie (Iordanskiy et al. 2006). K úspešnej integrácii retrovírusu sa PIC musí dostať ku chromatinu cez jadrovú membránu. Niektoré vírusy využívajú iných mechanizmov integrácie. Vírus myšacej leukémie (MLV) a jemu podobné vyžadujú k tomuto kroku bunkové delenie a rozpad jadrovej membrány. Keď je bunkový cyklus zastavený v G₁/S prechode hladovaním a chemickým zásahom MLV PIC, ktorý obsahuje plnú dĺžku vírusovej DNA je prítomný v cytoplazme a integrácia je blokováná. Akonáhle je bunkový cyklus

obnovený a pokračuje metafázou, jadrová membrána sa rozpadá a objavuje sa integrácia vírusu (Roe et al. 1993). V porovnaní s MLV, HIV-1 ako aj iné vírusy je schopný infikovať tak deliace sa ako aj nedeliace sa bunky (Lewis et al. 1992). Preto sa HIV-1 môže veľmi účinne integrovať v pokojových bunkách, alebo bunkách terminálne diferencovaných ako sú makrofágy a mikroglie, ktoré sú v G₀ fáze. Schopnosť infikovať nedeliace sa bunky vytvára predpoklad pre vývoj lentivírusových vektorov ako účinného nástroja pre génový prenos, ktorý je nasmerovaný hlavne pre ťažko transdukované bunky s nízkym proliferáčnym potenciálom (Weinberg et al. 1991). Retrovírusy a z nich odvodené retrovírusové vektory sa do genómu cieľových buniek integrujú nenáhodne. Na základe integrácie MLV vírusu boli definované rôzne miesta integrácie ako napr. oblasti hypersensitívne k DNáze, transkribované gény a ich štarty, oblasti bohaté na gény, GC bohaté oblasti a CpG ostrovy. Medzi tieto bežné inzerčné miesta MLV vírusu patria vysokoexprimujúce sa protoonkogény zvyšujúce rastový potenciál (Bushman et al., 2005). Vďaka silným retrovírusovým promotorom LTR môže dochádzať k ovplyvneniu expresie génu v blízkosti provírusovej integrácie. Po infekcii Myšacím vírusom mliečnej žľazy (MMTV) dochádza k vzniku klonálnych tumorov, v ktorých bola analyzovaná provírusová integrácia. Medzi génmi, ktoré boli ovplyvnené retrovírusovou inzerciou je rodina Wnt génov, eIF3e, Notch4. Všetky z týchto génov sú podstatné v udržaní bunkovej kmeňovosti (Callahan et al., 2008). Použitie retrovírusových vektorov v génovej terapii nesie so sebou riziko integrácie retrovírusov do blízkosti promotorov protoonkogénov. Toto bolo demonštrované na detských pacientoch liečených vektorom odvodený od MLV na X- dedičnú vážnu kombinovanú imunodeficienciu (X-SCID). V štyroch prípadoch bolo vyvinuté lymfoproliferatívne ochorenie B buniek, spôsobené integráciou vektoru do blízkosti promotora LMO-2 protoonkogénu, čo pravdepodobne viedlo k neoplastickej transformácii (Hacein-Bey-Abina et al., 2008).

Preferencie integrácie HIV vírusu sú zase favorizované do GC bohatých a transkripčne aktívnych génových oblastí, okrem oblastí transkripčných štartov. Veľmi nízka preferencia integrácie je v oblastiach repetitívnych sekvencií ako HERV, SINE, LINE elementov alebo Alu repetícií (Shroder et al., 2002). HIV integrácia do oblastí ako α -satelity centromér s vysokou mierou kompaktácie centromerického heterochromatínu je taktiež veľmi slabá (Carteau et al., 1998). V prípade integrácie MLV retrovírusového vektoru, 80% z 903 analyzovaných integrácií vykazovalo takmer náhodnú tendenciu, ale 20% bolo detekovaných v 5kb veľkej oblasti, ktorá zahŕňala 5' koniec transkripčnej jednotky. Integrácia je taktiež preferovaná do oblastí obsahujúcich CpG ostrovy. Na základe týchto preferencií MLV vektory sú pomerne nebezpečnými nástrojmi génovej terapie (Wu et al., 2003). Vírusová integráza hrá nepochybne dôležitú úlohu v smerovaní retrovírusovej integrácie a je zodpovedná za jej špecifitu. Tvorba HIV vírusovej chiméry substitúciou MLV integrázy a *gag* génu za HIV integrázu a *gag* gén zapríčiňuje integračnú špecifitu modifikovaného HIV vírusu, ktorá je veľmi podobná MLV. Okrem toho takto modifikovaný HIV vírus nie je schopný infikovať nedeliace sa bunky a tým sa tiež pripodobňuje MLV vírusovej integrácii, ktorá prebieha počas M-fáze (Lewinski et al., 2006).

Na ciele integrácie sa zrejme podieľajú niektoré z obecných transkripčných faktorov, ktoré interagujú s vírusovou integrázou v PIC komplexe a smerujú integračný komplex do transkripčne aktívneho chromatinu. V prípade HIV takými faktormi sú

chromatin remodelačný komplex SWI/SNF, opravné DNA komplexy, proteíny skupiny Polycomb ako aj TTRAp proteín patriaci do PML-RAR (Felice et al., 2009)

Jedným z proteínov, ktorý interaguje s PIC je proteín Daxx. Je vysokokonzervovaný a v cicavčích bunkách asociuje s HIV-1 odvodeným lentivírusovým vektorom prostredníctvom interakcie s vírusovou integrázou. Okrem toho k vírusovej DNA privádza HDAC, ktorou reprimuje génovú expresiu lentivírusových génov (Huang et al., 2008). V hre pri umlčovaní vektorov odvodených od ASLV môže Daxx zohrávať podstatnú úlohu. Interaguje s vírusovým DNA integrázovým komplexom veľmi skoro po infekcii a sprostredkúva represiu génovej exprese asociáciou s HDAC aktivitou (Greger et al., 2005). Niektoré vírusy proti Daxx represoru vyvinuly obranné mechanizmy. Ľudský cytomegalovírus exprimuje proteín pp71, ktorý interaguje s Daxx proteínom, čím inaktivuje bunkovú imunitnú odpoveď voči prichádzajúcemu vírusu. U HIV je týmto antagonistom proteín p6, ktorý sprostredkúva modifikáciu Daxx proteínu sumoyláciou (Saffert et al., 2006).

V prípade bunkovej ochrany proti exogénnej DNA je nutné uviesť skupinu tzv. restričných faktorov, ktoré interferujú s exogenou DNA v skoréj fáze infekcie, ako napr. intracelulárne alebo v procese reverznej transkripcie. Najlepšie sú preštudované na HIV-1 víruse (Anderson and Hope 2005). Jednými z restričných faktorov sú adenzín deaminázy. Adenzín deaminázy patria do veľkej rodiny proteínov, ktoré katalyzujú hydrolýzu cytozínovej bázy na uracyl v jednoreťazcovej forme vírusovej cDNA alebo RNA počas reverznej transkripcie, čím indukujú guanin- adenin mutácie v komplementárnom reťazci cDNA. Jednotlivé adenzín deaminázy majú odlišnú afinitu k cieľovej báze. A3G preferenčne edituje druhý cytozin CpC dinukleotidov, kdežto A3F modifikuje cytozin TpC dinukleotidu. Majú teda editačnú a hypermutačnú schopnosť. U ľudí sú známe ako proteíny editujúce mRNA Apolipoproteínu B (APOBEC3) (Harris et al., 2002). APOBEC3G je balený do viriónov v produkujúcich bunkách a blokuje vírusovú replikáciu v cieľových bunkách prevdepodobne degradáciou cDNA medzi pozdnou reverznou transkripciou a integráciou. V obrane proti tomuto účinnému mechanizmu lentivírusy vyvinuly faktor zvyšujúci vírusovú infektivitu (Vif), ktorý zabraňuje zabaleniu APOBEC3 do viriónov a prostredníctvom adapterových degradačných proteínov je APOBEC nasmerovaná na degradačnú dráhu v proteazóme (Mariani et al., 2003). U *Vif* deficientného vírusu dochádza k baleniu APOBEC do viriónu. Po vypučaní a následnej infekcii cieľovej bunky dôjde k hypermutácii DNA proviru počas reverznej transkripcie (Huthoff and Towers 2008)

Ďalším z restričných faktorov je TRIM 5 α , ktorý bol prvý krát identifikovaný ako bunkový inhibitor HIV-1 replikácie (Stremlau et al. 2004). Celá rodina TRIM proteínov má charakteristickú RING doménu, jeden alebo dva B boxy špirály (coiled-coil). RING doména má ubiquitin ligázovú aktivitu. V C terminálnej časti sa nachádza PRY/SPRY doména, ktorá rozpoznáva internalizované kapsidy. TRIM5 sa vyskytuje v cytoplazme v tzv. cytoplazmatických telieskách. Akonáhle dôjde k stretnutiu kapsidy a TRIM5 α komplexu, dochádza k jeho nasmerovaniu do proteazómu a k jeho degradácii (Nakayama and Shioda et al., 2010)

2.6.3. Transkripčné umlčovanie retrovírusov a ERV

Expresia integrovaného provírusu vyžaduje veľkú škálu transkripčných aktivátorov a kompletný RNA polymerázový komplex. Hlavnou regulačnou oblasťou integrovaného provírusu, z ktorého prebieha transkripcia je LTR. Ten pozostáva z unikátnych sekvencií U3, R, U5. U3 je hlavná promotorová a enhancerová oblasť, ktorá obsahuje sekvenčné väzbové motívy pre obecné ako aj špecifické transkripčné faktory. Pomerne názorným príkladom promotorovej komplexnosti je HIV LTR. LTR integrovaného provírusu obsahuje niekoľko regulačných oblastí: negatívny regulačný element (NRE) s väzbovými miestami pre transkripčné faktory AP1, NF-AT, USF. Potom je to hlavný enhancer s väzbou Ets-1, Lef1, NFκB. Ďalej je iniciačný element (INR), potom TATA box za ktorým nasledujú tri tandemové SP1 väzbové motívy. Na transkripcii sa podieľajú SWI/SNF remodelačný komplex, p300/CBP acetyltransferáza a mnoho iných (Angelov et al., 2000).

Eukaryotické bunky v priebehu evolúcie vyvinuly dokonalé obranné systémy pre ochranu štruktúry ich vlastného genómu, čím sa bránia proti expresii abnormálnych alebo cudzorodých transkripčných jednotiek. U cicavcov inzercia retrovírusovej DNA spúšťa umlčanie expresie prostredníctvom metylácie DNA vrámci regulačných LTR oblastí (Bestor 2000). LTR retrovírusov je považovaný za silný promotor. U rôznych retrovírusov sa obsah CpG dinukleotidov vrámci LTR líši. Obvykle dochádza k ich hypermetylácii, čím dochádza k umlčaniu expresie integrovaného provírusu. S metyláciou DNA v LTR oblasti veľmi úzko súvisí masívna deacetylácia histónu H3 (Koiwa et al., 2002; Medvedeva et al., 2010).

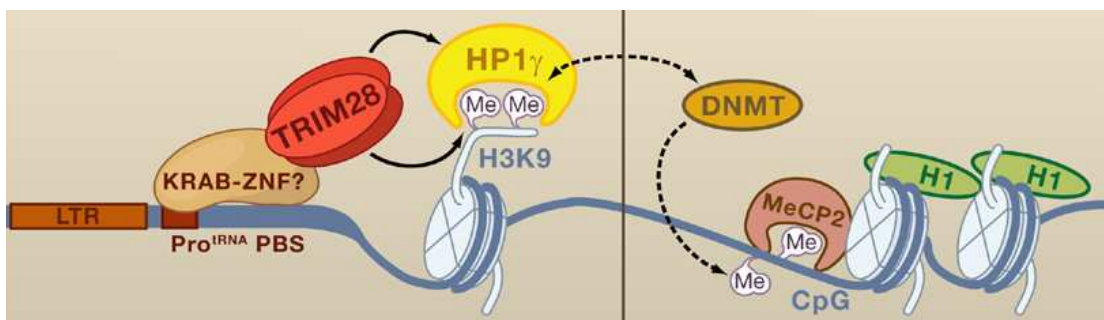
Integrovaný provírus obsahuje určité kritické sekvencie, ktoré sú preferenčne náchylné k metylácii. Je to najmä sekvencia PBS a sekvencia enkapsidačného signálu. U MLV a MoMLV vektoru je PBS oblasť súčasťou tzv. represor väzbovej oblasti (RBS). Nachádza sa tesne za 5' LTR a 17 nukleotidami prekrýva PBS oblasť. PBS a enkapsidačný signál sú v embryonálnych kmeňových bunkách hypermetylované bez ohľadu na okolité chromatinové modifikácie. Tieto miesta sú považované za potenciálne iniciátory metylácie a mutácie v nich ju negatívne ovplyvňujú (He et al., 2005).

Vektor odvodený od Myšacieho vírusu kmeňových buniek (MSCV) neobsahuje represívny *cis* element, ktorý je prítomný u MoMLV, no i tak je citlivý k transkripčnému umlčovaniu. S cieľom zistenia vplyvu metylácie DNA na umlčovanie, niektoré CpG dinukleotidy U3 oblasti LTR sekvencie vektoru MSCV boli mutované. Po zavedení mutácií bola len veľmi malá časť integrovaných provírusov úplne umlčaných. Oblasť CpG LTR promotoru je náchylná k modifikácii metyláciou DNA a môžeme ju považovať za represívny element transkripcie (Swindle et al., 2004) Situácia je očosi komplikovanejšia tým, že náhodné integračné miesto ovplyvňuje pravdepodobnosť *de novo* metylácie. Niektoré provírusy sú *in vivo* nemetylované ale oblasť integrácie je represívne remodelovaná, metylované provírusy sú transkripčne umlčané. V umlčovaní je podstatný MeCP2, ktorý rozpoznáva metylačnú modifikáciu cytozinu a stimuluje HDAC a iné remodelačné komplexy (Lorincz et al., 2001). Vplyv remodelačných komplexov na umlčovanie je jednoznačný. Vektor odvodený od MLV je veľmi rýchlo umlčovaný v ľudských nádorových bunkách, ktoré neexprimujú Brm, čo je katalytická

podjednotka SWI/SNF chromatin remodelačného komplexu. Uvedením exogénneho Brm došlo k supresii naviazania represných proteínových komplexov YY1 a HDAC1,2 k LTR. Remodelácia chromatinu a jeho modifikácie majú priamy vplyv na umlčanie (Mizutani et al., 2002). Metylácia DNA zapríčiňuje latentný stav vírusu ľudskej T bunkovej leukémie (HTLV-1). Bisulfitovou konverziou a následnou sekvenáciou bola zistená hypermetylácia 5' LTR, pričom 3' LTR zostáva hypometylovaný. Vírus je reaktivovateľný za použitia 5-azaC ,inhibítora DNMT (Koiwa et al., 2002) Okrem metylácie regulačného 5' LTR bola detekovaná bohatá metylácia kódujúcej oblasti vírusu. Vírusové gény ako *gag*, *pol* ale aj *env* sú bohato modifikované metyláciou, pričom 3' LTR si ponecháva hypometylovaný stav už ako bolo zistené (Taniguchi et al., 2005)

2.6.4. Transkripčné umlčanie endogénnych retrovírusov

Viac ako 40 % cicavčieho genómu je tvorených retroelementami z ktorých asi jedna štvrtina sú endogénne retrovírusy, ktoré sú rozptýlené v euchromatínových oblastiach (Waterston et al., 2002). Sú zodpovedné za viac ako 10% spontánnych mutácií. Veľmi účinný mechanizmus umlčania, ako hostiteľskej ochrany, je vyvinutý proti transpozibilným elementom (transpozony, retrotranspozony) a retrovírusom. Endogénne retrovírusy nie sú exprimované, ale ich LTR promotory sú intaktné a stabilne modifikované represným mechanizmom metylácie DNA počas skorej embryogenézy a tento stav sa zachováva i v dospelých somatických bunkách. Metylácia DNA je mechanizmus dlho trvajúceho umlčania, ktorý vedie k represívnym chromatinovým prestavbám v oblasti huste metylovaného promotora LTR (Yoder et al., 1997). Nedávne štúdie ukazujú, že ERV sú bohato modifikované H3K9me3 a H4K20me3 v myšacích embryonálnych kmeňových bunkách, ale nie v embryonálnych fibroblastoch (Mikkelsen et al., 2007). Jedným z veľmi dôležitých represných proteínov, ktoré sa podieľajú na umlčovaní ERV ako aj retrovírusových vektorov odvodených od MLV je proteín asociujúci s KRAB motívom (KAP1) alebo tiež známy ako tripartitný motív obsahujúci protein 28 (TRIM28) (Wolf and Goff 2007). KAP1 priamo interaguje s Krüppelovým asociačným proteínovým motívom zinkového prstu (KRAB-ZNF), ktorý rozpoznáva PBS provírusu. S PBS oblasťou interaguje primer vo forme tRNA pre prolín. PBS oblasť je rozhodujúca v syntéze (-)DNA reľazca reverznou transkripciou. Do miesta je atrahovaná histonmetyltransferáza SEDTB1 (ESET), ktorá dimetyluje H3K9. Tento represný signál je rozpoznávaný HP1 proteínom a NuRD represným remodelačným komplexom, ktorý obsahuje silnú deacetylázovú aktivitu (Sripathy et al., 2006). HP1 proteín umožňuje interakciu s DNMTs a dochádza k metylácii CpG, ktoré sú rozpoznávané MeCP2. Prítomný je i H1 histon, ktorý podporuje chromatinovú kondenzáciu (Obr. 12.)



Obr. 12. Regulácia retrovírusového umlčania TRIM sprostredkovanou epigenetickou kaskádou (Ellis et al. 2007)

Okrem toho kombinácia KRAB a jeho korepresoru KAP1 vedie ku umlčaniu promotorov, ktoré sú často až desiatky kb vzdialené od väzbového miesta tohto represného komplexu. V štruktúre promotorov dochádza k masívnej trimetylácii H3K9, zamedzeniu aktivácie transkripcie a odpadnutie RNAPol II a konečne k masívnej heterochromatínovej prestavbe prostredníctvom HP1 proteínu. Taktiež ako metylácia DNA i tento komplex sa podieľa na dlho trvajúcom umlčaní. Tieto dva represné systémy spolu veľmi úzko spolupracujú. V prípade absencie KAP1 proteínu v embryonálnych bunkách dochádza k nárastu LINE transkriptov. Došlo však i k veľmi markantnému nárastu IAP elementov 15-66 násobne (Groner et al. 2010). Počas skorej embryogenézy KAP1 sprostredkovaná represia vedie k ireverzibilnému génovému umlčaniu transpozibilných elementov prostredníctvom metylácie DNA promotora (Wiznerowicz et al., 2007). V prípade *de novo* DNMT a DNMT3L deficientných myší dochádza k dramatickému nárastu transkripcie L1 ako aj IAP. V prípade DNMT3a deficiencie dochádza k výraznej hypometylácii SINE B1 a pri absencii DNMT3b k hypometylácii majoritných a minoritných satelitných sekvencií (Kato et al., 2007)

Ľudské endogénne retrovírusy (HERV) tvoria približne 5-8% ľudského genómu. Majoritná väčšina HERV je stabilne umlčaná. No, niektoré z nich sú stále aktívne. Rodina HERV-K(HML-2) je modifikovaná metyláciou DNA a umlčaná už niekoľko miliónov rokov. Je špecifická svojou kódujúcou kapacitou a niektoré z nich majú otvorený čítací rámec pre gény *gag*, *Prt*, *Pol* a *env*. Jeho vysoká expresia súvisiaca s hypometyláciou je detekovaná v nádore germinálnej bunkovej línie. U pacientov s nádormi germinálnej bunkovej línie je detekovaný veľký titer protilátok proti génom *gag* a *env* rodiny HERV-K(HML-2). *Env* gén kóduje tzv. Rec proteín, ktorý asociuje s promyelocytickým proteínom, čím prispieva k progresii tumoru. Reaktivácia za prítomnosti 5-azaC vedie k zvýšeniu expresie génov ORF (Lavie et al., 2005). Niektoré ERV sú i napriek popísanému mechanizmu umlčania stále aktívne, ba dokonca pre hostiteľa prospešné. Ako napr. Syncytin-1, ktorý je kódovaný jednou z kópií rodiny HERV-W nachádzajúcej sa na chromozóme 7. Povrchový proteín syncytinu-1 je exprimovaný v placentárnom trofoblaste, v ktorom navodzuje bunkovú fúziu za vzniku multijadrového syncytiotrofoblastu. Jeho expresia je hormonálne riadená progesteronom (Noorali et al., 2009). V iných tkanivách však jeho expresia musí byť minimálna, inak by dochádzalo k masívnemu poškodeniu. V placentárnych bunkách je LTR syncytinu-1 výrazne hypometylovaný, čím dochádza k expresii. Iné primárne bunkové línie neexprimujúce syncytin-1 obsahujú bohato metylované LTR sekvencie.

CpG metylácia LTR provírusu je intaktná k vplyvu reaktivačného činidla 5-azaC a nedochádza k jeho demetylácii (Matouskova et al., 2006; Gimenez et al., 2009)

2.6.5. Vtáče retrovírusy ako potenciálny nástroj génovej terapie

Vtáče retrovírusy a z nich odvodené vektory sú vo vtáčích bunkách umlčované len s veľmi nízkou účinnosťou. No v cicavčích bunkách dochádza k ich veľmi efektívnemu umlčovaniu. Po integrácii vtáčieho Rousova sarkomového vírusu v cicavčích bunkách dochádza k jeho veľmi účinnej metylácii a umlčaniu na rozdiel od vtáčích buniek (Hejnar et al. 1999). Vektory odvodené od ASLV sú s veľmi vysokou účinnosťou umlčované v ľudských HeLa bunkách (Katz et al., 2007). ASLV retrovírusy sú charakteristické niekoľkými vlastnosťami. Nie sú schopné replikácie v cicavčích bunkách. Je to dané jednak selekciou promotor- enhancerovej oblasti LTR v ASLV pre optimálnu expresiu vo vtáčích bunkách, v ktorých sa exprimujú veľmi účinne. Okrem toho v cicavčích bunkách chýbajú špecifické vtáče bunkové kofaktory pre zostrih, štiepenie polyproteínov a znovuvytvorenie funkčného infekčného potomstva (Svoboda et al. 2000). Replikačne kompetentný vtáčí vektor so zostrihovým faktorom (RCAS) sa nemnoží a nevytvára infekčné potomstvo v cicavčích bunkách. Okrem toho cicavčie bunky neobsahujú žiadne endogénne retrovírusy, ktoré sú schopné rekombinácie s ASLV. Preto ASLV odvodené retrovírusové vektory sú veľmi stabilnými a bezpečnými pre génovú terapiu (Federspiel et al. 1996). Ďalšou výhodou je integračná špecifita vektorov odvodených od ASLV. V porovnaní s vektormi odvodenými s HIV a MLV, vektory odvodené od ASLV vykazujú najslabšiu preferenciu integrácie do promotorových a transkripčne aktívnych oblastí, GC bohatých oblastí, CpG ostrov, či do transkripčných štartov, ako aj tumor supresorových génov (Michell et al. 2004). Na druhej strane akútny retrovírusový vektor odvodený od RSV, ktorý nesie *v-src* indukuje v pôvodnom hostiteľovi (kuracie bunky) tumory, v ktorých dochádza k dlhotrvajúcej a stabilnej expresii *v-src*. Z RSV- indukovaných tumorov boli klonálne selektované nenáhodné integračné miesta. Preferencia integrácie je vysoká v GC bohatých oblastiach, v blízkosti transkripčných jednotiek, obzvlášť v génoch exprimovaných vo viacerých tkanivách (Plachy et al., 2010). Preto odlišnosti medzi neselektovanými integračnými miestami (vykazujúce nízku preferenciu do génov) a miestami selektovanými na dlhotrvajúcu LTR závislú expresiu sú veľmi podstatné pre retrovírusmi sprostredkovaný génový prenos..

2.6.6. Ochrana retrovírusových vektorov proti umlčaniu

2.6.6.1. Inzulátorové sekvencie

Retrovírusové vektory sú modifikované inzerčnou mutagenézou s cieľom zabezpečiť dlhotrvajúcu expresiu terapeutického génu. V genóme sa nachádzajú špecifické sekvenčné motívy, rozpoznávané regulačnými proteínami, ktoré v danom mieste prispievajú k relaxovanému stavu chromatinovej štruktúry. Medzi najdôležitejšie patria inzulátory, ktorých asociácia s daným génom zabezpečuje jeho stabilnú expresiu a zároveň ovplyvňuje stav epigenetických modifikácií okolia. Inzulátory nachádzajúce

sa medzi enhancerom a promotorom blokujú pozičný vplyv enhanceru na promotor. V prípade rozhrania euchromatínu a heterochromatínu priamo alebo nepriamo ovplyvňujú aktiváciu H3K4, H3K79 histonmetyltransferázy a H3K9 histonacetyltransferázy ako aj ďalších aktivačných euchromatin remodelačných komplexov. Na udržaní euchromatínovej štruktúry sa podieľajú mnohé transkripčné faktory, ktoré s inzulátorom interagujú (Gaszner et al., 2006).

Najznámejším preštudovaným inzulátorom je 5' oblasť kuracieho β -globínového lokusu, ktorá je hypersenzitívna na DNázu-I. Je označovaná tiež ako cHS4. U tohto fragmentu bola popísaná schopnosť blokovat' pozičné efekty promotor/enhaceroých oblastí. Oblasť pred inzulátorom cHS4 je charakteristická kondenzovaným stavom. Oblasť za ním je otvorená, H4 histon acetylovaná a gény sú transkripčne aktívne (Walters et al., 1999). V ľudských K562 erytroleukemických bunkách cHS4 inzulátor blokuje vplyv enhanceru na blízky promotor. Kurací chromatinový inzulátor cHS4 inzertovaný do LTR retrovírusového vektoru zlepšuje expresiu reportérového proteínu a blokuje pozičné efekty umlčovacích chromatinových mechanizmov ako aj vplyv blízkych enhancerov. V HT1080 bunkách za použitia cHS4 modifikovaného vektoru bol detekovaný štvor-násobný nárast stupňa expresie GFP proteínu. Okrem toho je detekovaný výrazný nárast acetylácie H3K9 a H4K14. Integrovaný provírus nie je modifikovaný metyláciou DNA (Li et al., 2007). Iným inzulátorom je *sns5*, izolovaný z ježovky, chráni γ - retrovírusový vektor odvodený od Myšacieho vírusu kmeňových buniek (MSCV) pred negatívnym vplyvom chromatínu v erytroidných leukemických bunkách MEL. Inzulátor zvyšuje pravdepodobnosť expresie reportérového génu v rôznych miestach vektorovej integrácie. Chromatinovou imunoprecipitáciou bola dokázaná hyperacetylácia oblasti pričoms sekvencia inzulátoru je rozpoznávaná silnými transkripčnými faktormi GATA1 a OCT1 (D'Apollito et al., 2009). Inzulátor vložený do blízkosti 5' konca *IL-2R* transgénu po 90 dňoch zostáva nemetylovaný ako aj transgén v jeho blízkosti. Okrem toho bol identifikovaný proteín VEZF-1 ktorý je jedným z tých proteínov, ktorý chráni priamou väzbou inzulátor a inzulátorom ovplyvnený génový promotor pred *de novo* metyláciou DNA. Interaguje tiež s GC bohatou oblasťou CpG ostrova a podieľa sa na jej demetylácii. Je dokázané že chráni *aprt* (adenozifosforibozyltransferázový) CpG ostrov pred metyláciou DNA (Dickson et al., 2010).

2.6.6.2. CpG ostrovy

CpG ostrovy ako druhý prostriedok antimetylačnej ochrany boli použité vo vývoji stabilne exprimujúceho retrovírusového vektoru, ktorý nepodlieha umlčaniu. *Aprt* CpG ostrov je jedným z najznámejších. Na jeho 5' konci sa nachádzajú tri GC boxy, ktoré sú rozpoznávané transkripčným faktorom SP1. Delícia alebo mutagenéza tejto oblasti vedie k *de novo* metylácii CpG ostrova (Macleod et al., 1994). V LTR myeloproliferatívneho sarkómového vírusu čo je derivát Moloneyho vírusu myšacieho sarkómu (MMSV) sa nachádza niekoľko bodových mutácií, ktoré prispievajú k vytvoreniu väzbového motívu pre transkripčný faktor SP1. Tým sa zvyšuje jeho expresia v embryonálnych nádorových bunkách F9. V prípade pôvodného MMSV, ktorý neobsahuje SP1 väzbový motív nedochádza k jeho expresii v bunkách F9 (Prince and Rigby, 1991). V rámci vektorov odvodených od ASLV je pozorované transkripčné

umľčanie integrovaných provírusov a progresívna metylácia ich regulačných promotor/enhancer sekvencií v LTR v cicavčích bunkách.

Už dávnejšie však bola zistená stabilizácia expresie vektorov odvodených od RSV vložením CpG ostrova myšacieho génu *aprt* do oblasti LTR (Hejnar et al. 2001). Vložením hlavného SP1 väzbového cis elementu tohto CpG ostrova do LTR vektoru odvodeného od ASLV bola zistená stabilizácia a dlhotrvajúca expresia reportérového génu (Senigl et al. 2008).

Iným prípadom stabilizácie expresie retrovírusového vektoru je vloženie IFN-SAR (interferon scaffold attachment region) hneď pred 3' LTR vektoru odvodeného od MLV. V CEMSS T- bunkách bez tejto mutačnej inzercie dochádzalo k masívnej 5' LTR a k umľčaniu vektoru. U vektorov so SAR nebola detekovaná 5' LTR metylácia a bola detekovaná dlhotrvajúca expresia reportérového génu. SAR element inhibuje *de novo* metyláciu DNA (Dang et al., 2000)

2.6.7. Epigenetická reaktivácia

V praxi je možné reaktivovať krátkodobu i dlhodobu umľčané integrované provírusy inhibítormi HDAC a DNMT aktivity. Najznámejším inhibítorm DNMT aktivity je 5-azaC, 5-aza-dC, inhibítorm HDAC aktivity je trichostatin A (TSA), butyrát sodný a iné.

5-azaC je nukleozidový analóg, ktorý sa inkorporuje do DNA a kovalentne viaže DNA metyltransferázu. Vďaka tomu je blokovaná efektívna metylácia cytozínov v CpG dinukleotidoch. Na druhej strane TSA pôsobí ako inhibítorm HDAC. V prípade, že metylácia je hustá, umľčanie provírusu už nejde pomocou TSA zvrátiť. Metylácia DNA je zrejme udržiavaná mechanizmom, ktorý je nezávislý na deacetylácii histónov (Lorincz et al., 2000). DNMT inhibítory sú obvyčajne používané v klinických skúškach, kde indukujú bunkovú smrť nádorových buniek. Boli zavedené v liečbe myeloidnej leukémie a myelodysplastického syndrómu. Za použitia 5-azaC v nádorovej bunkovej línii HCT116 odvodenej od kolorektálneho karcinómu dochádza k zastaveniu bunkového cyklu na úrovni G2/M prechodu. Ďalej k masívnej demetylácii a zvýšeniu expresie tumorsupresorových ako aj DNA opravných génov. Dochádza k zvýšeniu expresie proapoptotických faktorov. Výrazne klesá DNMT1, DNMT3a expresia v závislosti vysokej aktivity p53 proteínu (Schneider-Stock et al., 2005). Okrem toho inhibítorm 5-aza-dC vytvára v myšacích ES bunkách veľmi stabilný proteínový komplex s voľným DNMT1 proteínom. V tomto komplexe dochádza k indukcii ubiquitin-E3 ligázovej aktivity, ktorá preferenčne smeruje DNMT1 molekulu k degradácii v proteázome (Patel et al., 2010). Vplyv inhibítorm bol dokázaný štúdiom v DNMT deficientných bunkách. Embryonálne kmeňové bunky deficientné na DNMT3a ako aj DNMT3b sú vysoko rezistentné k účinkom 5-aza-dC (Oka et al., 2005)

Spomenuté inhibítory sa používajú k reaktivácii latentných provírusov. Jedny z najnovších ktoré majú tento účinok su HDAC inhibítory CG05 a CG06. Tieto inhibítory veľmi účinne reaktivujú HIV-1 provírus v ACH2 embryonálnych bunkách. Oba použité inibítory vykazujú oveľa nižšie toxické účinky ako napr TSA. Sprievodným javom použitia HDAC inhibítorm je vysoká miera acetylácie H3K9 a H3K27, čím dochádza k reaktivácii provírusu (Choi et al., 2010).

Romidepsin je ďalším z HDAC inhibítorov, ktorý reaktivuje DNA vírusy ako EBV, HBV a VZV z ich latentného stavu (Ritchie et al., 2009) Použitím 5-azaC a TSA inhibitorov došlo k reaktivácii umlčaného vírusu prasačej leukémie (BLV) v L267 transformovaných B- bunkách, čím sa zvýšil infekčný a onkogenetický potenciál integrovaného vírusu. Okrem toho došlo k zvýšeniu vazby CREB-ATF na promotor viru a k poklesu asociácie HDAC s represorovým komplexom mSin3a s BLV promotorom a tým k jeho aktivácii (Merimi et al. 2007). Transkripčne reprimovaný vírusový vektor odvodený od vírusu asociovaného s adenovírusom (AAV) s *lacZ* reportérovým génom bol účinne reaktivovaný TSA alebo butyrátom sodným v stabilne infikovaných bunkách K562. Za použitia 5-azaC inhibítora k reaktivácii nedošlo (Chen et al., 1997).

Stav dlhotrvajúceho umlčania retrovírusového vektoru je veľmi ťažko zvrátiteľný. V prípade vektorov odvodených od MoMLV a HMSV v hematopoietickej línii FDCP-1 a MEL u 80% klonov z 50 prestala byť detegovateľná β - galaktosidázová aktivita reportérového génu po 70-80 dňoch od infekcie. Stabilne umlčané klony za použitia 5-azaC a TSA, ako aj ich kombinácie neboli reaktivovateľné, nedošlo k zvráteniu umlčania a obnove β -gal aktivity (McInerney et al., 2000).

2.6.8. Provírusová latencia

Stavom provírusovej latencie rozumieme perzistenciu provírusového génu v hostiteľskom génome bez aktívnej transkripcie vírusových génov Ustanovenie latencie vyžaduje expresiu mnohých hostiteľských transkripčných faktorov, HDAC alebo ubiquitin- proteazomálnych génov.

Veľmi dokonale je preštudovaný latentný stav HIV-1 vírusu v CD4⁺ T lymfocytoch, ktorý nastáva niekoľko dní od infekcie. Tým sa vytvára tichý vírusový rezervoár, ktorý má veľmi dlhú životnosť i u pacientov s efektívnou kombinovanou terapiou. V primárnej infekcii však väčšina CD4⁺ lymfocytov je HIV produktívnou infekciou lyzovaná (Chun et al., 1998). U HIV vírusu je definovaná pre a post integračná latencia. Pre integračná latencia súvisí s cytoplazmatickým výskytom HIV vírusu vo forme PIC. Zvýšením metabolickej aktivity bunky sa komplex PIC-HIV presunie do jadra a dochádza k integrácii, ktorá je podmienkou ustanovenia provírusovej latencie (Bisgrove et al., 2005).

Latentný stav nesie so sebou reverzibilné umlčanie integrovaného provírusu. Mechanizmy vedúce k ustanoveniu latencie sú epigenetické modifikácie, stav chromatinu, promotorová interferencia ako aj RNA zostrih. V ACH2 a U1 bunkových líniiach mutácie v TAR oblasti provírusu sú jednou z ďalších príčin ustanovenia latentného stavu (Emiliani et al., 1996).

Vonkajšie vplyvy ako antigénna stimulácia, prítomnosť cytokínových molekúl alebo iných mitogénov menia metabolický profil pauzujúceho lymfocytu a dochádza k jeho aktivácii. Pod vplyvom gradientu mnohých transkripčných faktorov dochádza k produktívnej expresii provírusovej DNA (Bisgrove et al., 2005)

Hlavným úsilím antiretrovírusovej terapie je úplná eliminácia latentného rezervoáru HIV vírusu jeho reaktíváciou za použitia reaktivačných činidiel a následným zničením v produktívnej infekcii antiretrovírusovými prípravkami.

Vplyv epigenetických modifikácií na ustanovenie latentného stavu je zrejmý. HDAC aktivita je nepochybne spojená s reverzibilným umlčaním provírusu v naivných CD4⁺ T lymfocytoch. Blokádou HDAC TSA inhibítorom dochádza k reaktívácii a uvoľneniu vírusu z latentného stavu a progresívnej expresii vírusových génov (Bednarik et al., 1990). Metylácia DNA vedie k supresii promotora v LTR províruse. Použitím 5-azaC dochádza k demetylácii LTR latentného provírusu. Jednotlivé CpG oblasti LTR provírusu sú hypermetylované selektívne. Ako naznačuje sekvenácia po bisulfitovej konverzii provírusu, za použitia cytokínu TNF- α po 24 hodinách dochádza k demetylácii a k provírusovej reaktívácii transkripcie v chronicky infikovaných T lymfocytoch (Ishida et al., 2006).

S metyláciou provírusovej DNA a reguláciou ustanovenia stavu latencie veľmi úzko súvisí vplyv MBD2 proteínu. Dva CpG ostrovy ohraničujúce transkripčný štart sú bohaty metylované v latentne infikovaných Jurkatových bunkách a primárnych CD4⁺ T bunkách. Na jednom z ostrovov bola identifikovaná prítomnosť MBD2 a HDAC2. Po použití 5-aza-dC inhibítora dochádza k znemožneniu naviazania týchto faktorov do oblasti provírusu. 5-aza-dC spolupracuje s aktivátorom NF- κ B signálnej dráhy prostredníctvom ako aj s TNF- α cytokínom čo vedie takmer k 200 násobnému zvýšeniu expresie HIV-1 vírusu oproti negatívnym PBS ošetrovaným bunkám (Kauder et al., 2009)

Kombináciou účinku prostratínu a suberoylanilid hydroxaminovej kyseliny (SAHA) dochádza k prekonaniu a aktivácii mnohých HIV subtypov vrátane A, B, C, D a F. Identifikáciou integračného miesta provírusu v latentných klonoch buniek Jurkat bola dokázaná špecifita reaktívacie provírusu prostredníctvom tejto kombinácie činidiel, keďže nedochádzalo k posilneniu expresie endogénnych génov v blízkosti integračného miesta (Burmett et al., 2010)

Metylácia DNA kontroluje rezistenciu HIV-1 vírusu k reaktívácii, čím je determinovaná stabilita latencie HIV-1. Je neskorším dôsledkom HIV-1 latencie a nie je dôležitá pre prvé umlčanie provírusu. Latentný rezervoár niektorých aviremických pacientov obsahuje vysokú mieru nemetylovaných promotorových LTR sekvencií, kde je latencia kontrolovaná transkripčnou interferenciou a chromatinovým stavom. Tieto provírusy sú veľmi účinne reaktivovateľné. V latentnom rezervoári HIV infikovaných jedincov bez plazmatickej virémie boli objavené hypermetylované promotory a enhancery s represívnymi chromatinovými modifikáciami (trimetylácia H3K9 a H3K27). Tieto sú k reaktívácii rezistentné v porovnaní s hypometylovanými LTR u viremických pacientov. Niektoré z týchto LTR boli in vitro reaktivovateľné za použitia reaktivačných činidiel 5-aza-dC v kombinácii s HDAC inhibítormi, TNF- α cytokínom, zebularínom. K reaktívácii bohaty metylovaných provírusov v inaktívnych T bunkách došlo za použitia SAHA (Blazkova et al., 2009).

3. EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

3.1. Cieľ práce

Cieľom práce je štúdium vplyvu *de novo* DNA metyltransferáz na umlčovanie retrovírusových vektorov odvodených od vtáčieho sarkómového a leukózneho vírusu (ASLV). Tento vplyv bol sledovaný na dvoch úrovniach, ktoré sú súčasťou experimentálnej časti.

V prvom prístupe bol pre štúdium vplyvu metyltransferáz na umlčovanie vektoru zavedený cicavčí inducibilný systém v kuracej bunkovej línii DF-1. Systém poskytuje možnosť regulovanej expresie klonovanej myšacej *de novo* DNMT3a po pridaní syntetického induktora, ligandu RSL1. Vo vtáčích bunkách dochádza k umlčovaniu retrovírusového vektoru odvodeného od ASLV len s veľmi malou účinnosťou. Hlavnou otázkou je, či myšacia DNMT3a vo fyziologicky odlišnom prostredí kuracích buniek je schopná primárne rozpoznať LTR integrovaného ASLV vektoru a metyláciou DNA ho umlčať.

Druhou stratégiou experimentu bolo štúdium vplyvu ľudskej *de novo* DNMT3b na umlčovanie integrovaného provírusu a to na úrovni divokého a DNMT3b deficientného kmeňa ľudskej línii HCT116 odvodenej od kolorektálneho karcinómu. Cieľom bolo štúdium umlčania vektoru za podmienok fyziologickej prítomnosti DNMT3b vo WT bunkách a jej absencii v deficientných bunkách. Druhým cieľom je analýza metylačného statusu regulačných LTR sekvencií integrovaných provírusov a možnosť ich reaktivácie inhibítormi histondeacetyláz a DNA metyltransferáz.

3.2. Schéma experimentu

I. Zavedenie cicavčieho inducibilného systému v kuracích bunkách pre štúdium myšacej DNMT3a na umlčovanie retrovírusového vektoru.

1. Klonovanie myšacej DNMT3a do hlavného plazmidu inducibilného systému pNEBR-X1 pod špecifický regulovateľný promotor.
2. Kótransfekcia buniek DF-1 plazmidmi inducibilného systému: pNEBR-R a pNEBR-X1H-DNMT3a. Po vhodnej antibiotikovej selekcii limitným riedením získané klony otestovať na prítomnosť plazmidov.
3. Infikovanie kuracích buniek DF-1 vtáčim retrovírusovým vektorom AG3 odvodeným od ASLV.
4. Porovnanie expresie DNMT3a u indukovaných a neindukovaných klonov na úrovni metylačných testov a qPCR.
5. Analýza umlčania u indukovaných a neindukovaných buniek na úrovni percentuálneho úbytku GFP pozitívnych buniek.

II. Sledovanie časového priebehu umlčovania retrovírusového vektoru AG3 v divokom kmeni a DNMT3b deficientnej línii HCT116 odvodenej od kolorektálneho karcinómu

1. Infekcia nádorových buniek vírusom AG3 s čo najnižšou multiplicitou vírusovej integrácie na bunku.
2. 3 dni po infekcii výber GFP pozitívnych klonov
3. Sledovanie umlčovania klonov v priebehu doby 3 mesiacov
4. Reaktivácia úplne umlčaných klonov inhibítormi metyltransferázovej a histondeacetylázovej aktivity
5. Analýza metylačného statusu LTR regulačných sekvencií bisulfitovou konverziou

4. MATERIÁL A METÓDY

4.1. MATERIÁL

4.1.1. Bakteriálny kmeň

Escherichia coli XL-1 Blue, genotyp genotyp *recA1 endA1gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac*[F' *proAB lacI*'7Δ*M15 Tn10*(Tet^r)]

4.1.2. Bunkové kultúry

DF-1

Kuracia imortalizovaná, netransformovaná stabilná bunková línia odvodená z kuracích embryonálnych fibroblastov (CEF) imbrednej línie (EV-O). Neobsahuje žiadne endogénne vírusy, ktoré sú príbuzné exogénnym vírusom komplexu ASLV. Má normálnu fibroblastickú morfológiu a v *in vitro* kultivácii podlieha kontaktnej inhibícii.

Podporujú replikáciu vtáčích retrovírusov a rekombinácie vírusu s endogénnymi sekvenciami sú nepravdepodobné. V línii sa veľmi efektívne replikuje replikačne kompetentný vektor RCASBP. Okrem toho sa v nich účinne replikujú amfotrofický MLV ako aj ASLV odvodený replikačne kompetentný retrovírusový vektor RCASBP(M2P), ktorého *env* gén je z amfotrofického MLV. Sú ľahko transformovateľné a pod vplyvom onkogénov menia štruktúru a vytvárajú bunkové fokusy v monovrstve. Poskupiny B, D a C vtáčích leukózných vírusov v nich pôsobia cytopaticky a formujú vírusové plaky. DF-1 bunková línia napomáha pri štúdiu onkogenetických a apoptotických vplyvov vtáčích vírusov ako aj v štúdiu retrovírusových vektorov odvodených od ASLV (Himly et al., 1998)

HCT116

Imortalizovaná nestabilná bunková línia odvodená od ľudského kolorektálneho karcinómu. Má diploidný charakter. Na rozdiel od aneuploidných línií vykazuje malé chromozomálne odchylky. Línia je neschopná opravných mechanizmov bodových mutácií, ktoré sú veľmi frekventovné. Má inaktivované hypermetyláciou jedny z hlavných tumor supresorových génov *APC* a *p53*. Línia je nestabilná s rozsiahlymi génovými dereguláciami a intragénovým restričným polymorfizmom, čoho dôsledkom je vysoký stupeň bunkovej heterogenity. Cielená homologická rekombinácia je u tejto línie veľmi účinná a línia je k nej náchylná (Rhee et al., 2002).

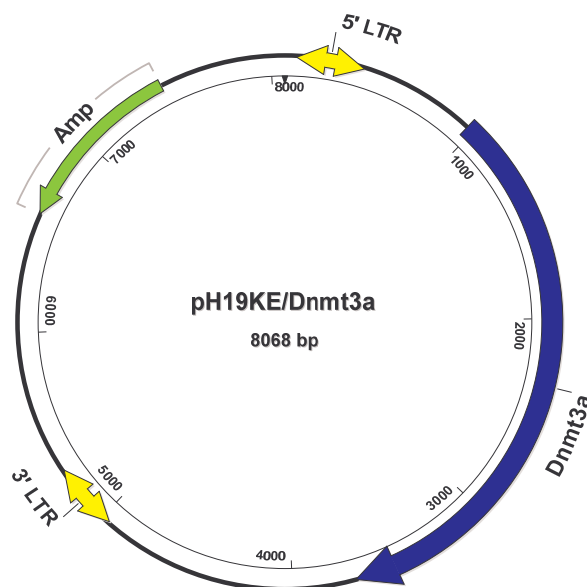
Len pre doplnenie, aneuploidné línie ktoré boli odvodené zároveň s diploidnými (s ktorými pracujeme) majú veľmi vysokú mieru chromozomálnej nestability. Nevykazujú nestabilitu v mikrosatelitných oblastiach, ako je to u mnohých iných tumorov, ale hlavný defekt spočíva v chybnej chromozomálnej segregácii. Tým dochádza ku strate chromozómu prinajmenšom každý piaty bunkový cyklus. V tejto spojitosti úplná strata tumor supresorových génov je veľmi pravdepodobná (Lengauer et al., 1997).

HCT116_DNMT3b^{-/-}

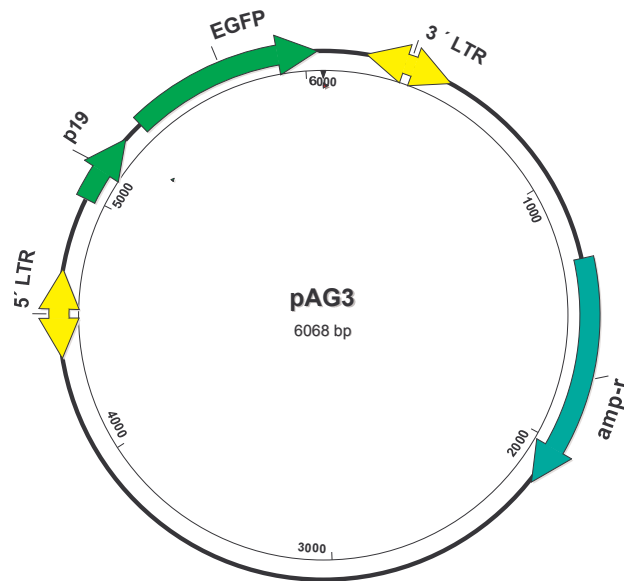
Je to immortalizovaná bunková línia odvodená od kolorektálneho karcinómu, u ktorej absentuje *de novo* aktivita DNMT3b. V tejto línii chýbajú obe alely DNMT3b, ktoré boli prerušené homologickou rekombináciou, nahradením 2-21 exónu neomycinovou rezistenciou exprimovanou po integrácii z endogénneho DNMT3b promotora. Táto delécia zahŕňa miesto prolylcysteinylového dipeptidu, ktorý je kritický pre katalýzu metyltransferázy. Naproti tomu je preukázaná len veľmi mierna redukcia globálnej DNA metylácie, len 3% oproti WT. Paradoxne len niektoré klony línie preukázali veľmi malé zníženie metyltransferázovej aktivity. V prípade tejto línie je väčšia ako 87%. Súdržne s touto nízkou zmenou metyltransferázovej aktivity u DNMT3b^{-/-} si bunky zachovávajú viac ako 97% obsahu m⁵C v porovnaní s WT. V línii bola detekovaná len mierna demetylácia pericentromerického satelitu 2, ale zato žiadne zmeny charakteristickej metylácie alebo expsie jednokópiových génov, vrátane p16^{INK4a}.

Len pre porovnanie, v prípade bunkovej línie HCT116 deficientnej na DNMT3b ako aj na DNMT1 dochádza k zníženiu metyltransferázovej aktivity o 95%. To znamená zásadnú zmenu globálnej metylácie a udržovania metylačného statusu stabilne umlčaných alebo imprintovaných oblastí. Dochádza k demetylácii repetitívnych sekvencií, k strate IGF2 (insulin-like growth factor II) imprintingu, zrušeniu umlčania tumor supresorového génu p16^{INK4A} a k iným dereguláciám (Rhee et al. 2002).

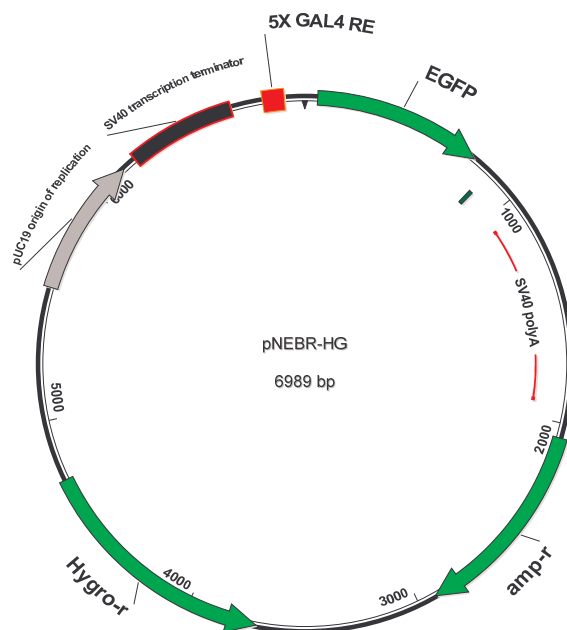
4.1.3. Vektory



Obr. 4.1. Mapa plazmidu pH19KE/DNMT3a. Je to zdrojový plazmid myšacej DNMT3a. Plazmid obsahuje ampicilínovú rezistenciu (zelená šípka), LTR retrovírusové regulačné sekvencie (žltá dvojšípka) a gén DNMT3a. Z vektoru bola DNMT3a získaná za použitia restričných endonukleáz DraI a Eco47III.



Obr.4.2. Mapa vírusového plazmidu pAG3: ASLV odvodený retrovírusový vektor ohraničený hlavnými retrovírusovými regulačnými LTR sekvenciami (žlté dvojšípky). Vo vnútri vektoru je klonovaná kódujúca sekvencia zeleného fluorescenčného proteínu (GFP) (zelená šípka). Pre potrebu namnoženia a izolácie plazmidu v baktériách je vo vírusovom plazmide prítomná ampicilínová rezistencia. Vírusom boli infikované tak D3aB7 klony ako aj HCT116 (WT, DNMT3b deficientné)



Obr. 4.3. Mapa plazmidu pNEBR-HG. Plazmid je odvodený od pNEBR-X1 hlavného plazmidu indukčného systému. Namiesto klonovanej DNMT3a obsahuje zelený fluorescenčný proteín (GFP). Bol vytvorený so zámerom otestovania účinnej expície regulačných molekúl indukčného systému (Rhoaktivátoru a jeho receptora) za prítomnosti RSL1 ligandu. Zavedením plazmidu bolo možné potvrdiť funkčnosť indukčného systému in vitro.

4.2. Laboratórne prístroje

Centrifúga Multifuge 3 S-R (Heraeus), centrifúga Biofuge 13 (Heraeus), elektroforetický zdroj Consort EV243 (P-lab), PCR cyklier Peltier thermal cyklier (MJ Research), svetelný cyklér Real Time PCR Chromo4 (Bio Tech), fluorescenčný inverzný mikroskop Olympus IX-51, spektrofotometer Beckman DU 640, box s fotoaparátom na dokumentáciu agarózových gélov Olympus SP-500, termostat HB-1D, inkubátor IG150 (Jouan), trepačka Edmund Buhler GmbH KS-15 Kontrol, prietokový cytometer LSR II (Becton-Dickinson, San Jose, CA)

4.3. Chemikálie

Agaróza (Serva), agaróza Ultra-Pure (Gibco), antibiotika: Ampicylin (Sigma), Hygromycin, Neomycin, roztok antibiotik: ((streptomycin sulfát 0,1 mg/ml (Sigma), Penicilin G draselná soľ 100 i.u./ml (Sigma))- rozpúšťané v PBS, G 418 (Gibco), 5-azacitidin (20 mM), BSA (boviný sérum albumin) (Sigma), CS (teľacie sérum), DMSO (dimetylsulfoxid), D-MEM F12 kultivačné médium, EDTA (kyselina etylendiamin tetraoctová) (Serva), enzýmy ((restrikčné endonukleázy a príslušné pufry, M-MLV reverzná transkriptáza (200 U/ μ l, Promega), Proteináza K (Boehring Mannheim), T4 DNA ligáza, Taq polymeráza, DNáza)), FUGENE HD Transfection Reagent (Roche), trypsin (0,5% v PBS)+EDTA (0,02% v PBS) (Invitrogen), etidium bromid (Sigma), FCS (fetálne teľacie sérum), formaldehyd (Sigma), glycerol (Lachema), IPTG (izopropyl β -D- thiogalaktopyranozid) (Sigma), KS (Kuracie sérum), LBBroth (Sigma), 100 a 1 kB DNA Ladder (NEB), RSL1(5 mM)- Rheoswitch ligand, (NEB), SDS (sodium dodecylsulfát), Trichostatin (6,61 mM), Tris (Sigma), Triton X-100 (Sigma), TRIzol reagent (Sigma), Tween^R 20 (Sigma), X-gal (Sigma)

4.3.1. Komerčné súpravy (Kity)

QIAGEN plazmid Mini Kit (Quiagen)
QIAGEN plazmid Midi Kit (Quiagen)
QIAGEN Epithec Bisulfit Modification Kit (Quiagen)
QIAquick PCR purification Kit (Quiagen)
QUIAEX II Gel Extraction Kit (Quiagen)
pGEM- T easy Vector System (Promega)
MESA GREEN qPCR MasterMix Plus for SYBR Assay (Eurogentec)
MethylampTM Global DNA methylation Quantification Ultra Kit (Epigenet)
RheoSwitch Mammalian Inducible Expression System (NEB)

4.3.2. Roztoky

50xTAE- 121,1 g Tris Base (2M), 50 ml 0,5 M EDTA pH 8,0 (50 mM), 28 ml kyseliny octovej (5,6%)

T₁₀E_{0,1}- 1 ml 1 M Tris pH 7,6 (10 mM); 20µl 0,5 M EDTA pH 8,0 (0,1 mM); 0,5 M EDTA pH 8; 55,83 g EDTA rozpúšťané, pH upravené pomocou NaOH, doplnené do 300 ml.

HBS (2x) - NaCl 820 mg, Na₂HPO₄, HEPES 595 mg, H₂O ad 50 ml; pH 7,1
elektroforetický pufor (5x) - 36g 192 mM glycin; 7,55 g 25 mM Tris; 0,5 g SDS

lyzačný pufor- 1 ml 0,5 M EDTA, 200 µl 10% SDS, 200 µl proteinázy K (10mg/ml), 600 µl H₂O

restrikčné pufry 1,2,3,4 (NEB)

4.3.3. Kultivačné médiá

Pri práci s tkanivovými kultúrami bolo použité komplexné médium MEM-D/F12 (Gibco- Invitrogen). Médium bolo doplnené L-glutaminom, 15 mM HEPES, 1200 mg NaHCO₃/1 liter média, ďalej roztokom antibiotík (streptomycin sulfát 0,1 mg/ml (Sigma)), penicilin G draselná soľ 100 i.u./ml (Sigma)- rozpúšťané v PBS a objem pripraveného média bol doplnený 5% CS, 1% KS, 1% FCS, 10% TBP.

4.4. Metódy práce s bunkovými kultúrami

4.4.1. Rozmrazovanie buniek

Pred rozmrazením bola pripravná Petriho miska (P100) s 10 ml objemom média pre čo najväčšie rozriedenie bunkovej suspenzie, ktorá bola zamrazená spolu s kryoprotektívnym činidlom (DMSO). Po dôkladnom rozmrazení a pretrepaní bol jej obsah prepipetovaný na P100 s médiom. Médium bolo dôkladne resuspendované. Bunky boli kultivované v termostate pri 37°C a humidite 3,5% CO₂.

4.4.2. Pasážovanie buniek

Z misky P100 sa odsaje médium. Opláchnu sa 5 ml PBS. Pre rozvoľnenie sa použije zmes trypsinu (0,5% v PBS) s EDTA (0,02% v PBS) v pomere 1:1. Miska je uložená do termostatu a inkubovaná 5-10 min. Bunky sa uvoľňujú od dna a zakulatujú. Pridá sa k nim 5 ml média. Podľa bunkovej hustoty sa odoberie časť buniek resuspendovaných v médiu. Miska je doplnená médiom do objemu 10ml.

4.4.3. Kryoprezervácia buniek

Z buniek sa odsaje médium, opláchnu sa PBS a uvoľnia sa od dna pridaním Trypsin (0,5% v PBS) + EDTA (0,02% v PBS). Miska je niekoľkokrát dôkladne opláchnutá médiom, ktoré je prenesené do 13ml centrifugačnej skúmavky. Potom je centrifugovaná 15 min/250 g/5°C. Médium sa odsaje, bunkový pelet sa ponechá a resuspenduje sa vo vhodnom objeme zamrazovacieho média ktoré obsahuje 80%

médium, 10%FCS, 10% dimetylsulfoxidu. Zamrazovacia ampula je naplnená 1ml zmesy buniek a zamrazená v izopropanolových stojanoch pri -80°C .

4.4.4. Transfekcia pomocou kalcium -fosfátovej precipitácie

Plazmidové konštrukty použité pri experimentálnej práci boli do bunkových kultúr transfekované pomocou kalcium fosfátovej precipitácie. Bunkám v deň transfekcie bolo vymenené médium. Po troch hodinách od výmeny prebehla transfekcia. Pre transfekciu boli pripravené dva reakčné roztoky s príslušnými komponentami (Tab. 4.1.)

roztok A	roztok B
375 μl HBS (2x)	45 μl 2 M CaCl_2 (18,37/50 ml H_2O)
	10 μg DNA
7,5 μl $\text{HPO}_4 + \text{H}_2\text{PO}_4$	350 μl H_2O

Tab. 4.1. Komponenty pre kalcium -fosfátovú transfekciu

Roztok B bol pomalým prikvapkávaním za stáleho premiešavania pridávaný do roztokou A za vzniku matne sfarbenej zmesy, ktorá naznačovala vznik jemného precipitátu. Zmes bola napipetovaná na misku s médiom a bunkami. Následne miska bola inkubovaná v termostate. Pri vizuálnej kontrole buniek pod mikroskopom bol viditeľný jemný precipitát, ktorý bol prisadnutý na bunkách. Po 4 hodinách boli bunky opláchnuté 15% roztokom glycerolu v HBS a ešte raz PBS, pre úplné odstránenie toxického precipitátu. Bunkám bolo dodané čerstvé médium.

4.4.5. Transfekcia pomocou FUGENE HD Transfection Reagent (Roche)

Je to lipofekčné činidlo, ktoré obsahuje zmes lipidov a iných komponent, ktoré sú rozpustené v 80% etanole. Vytvára vysokoafinitné komplexy s DNA, pre potreby lipofekcie. Lipofekcia bola realizovaná na adherentných bunkách, ktoré boli deň pred transfekciou vysiate do hustoty 50000 buniek na 24 jamkovú doštičku. Podmienkou bola kultivácia buniek bez antibiotík. Pre transfekciu bolo použité bezsérové médium OPTI-MEM (OPTI-MEM/+GlutamaxTM, Gibco). Na 100 μl tohto média bolo pridané 2 μg DNA a 4 μl transfekčného činidla FUGENE HD. Na každú jamku pripadalo 25 μl z tejto zmesy. Zmes činidla a DNA bola dôkladne vortexovaná a nechaná 15 min pri pokojovej teplote a následne aplikovaná tesne pod hladinu média. Na druhý deň bolo médium vymenené za médium s antibiotikami.

4.4.6. Meranie prietokovým cytometrom

Bunky určené k meraniu boli opláchnuté PBS a trypsinované, niekoľko minút inkubované v termostate pri 37°C . Po trypsinácii do jamky bolo pridané 0,5ml média.

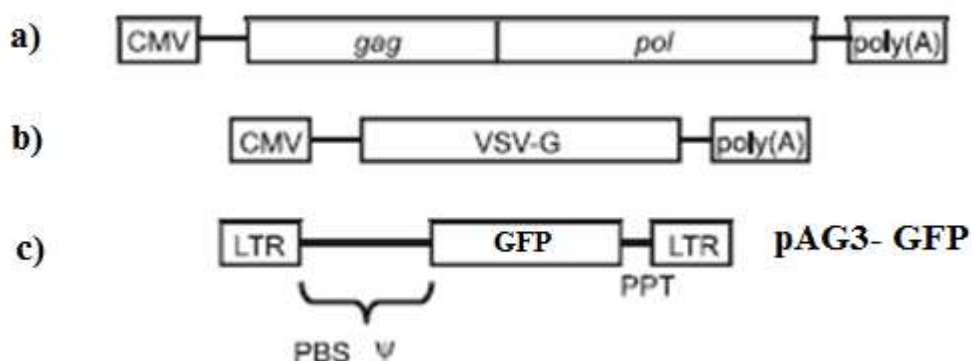
Bunky boli dôkladne resuspendované a časť prepipetovaná do jamky na mikrotitračnej doštičke vhodnej k meraniu na prietokovom cytometri. Mikrotitračná doštička bola scentrifugovaná, 10 min/180 x g/6 °C. Objem média bol vykvapkaný a na bunky bolo pridané činidlo HOECHST 33258 v PBS. Je to fluorescenčná farba, ktorá je akívne exportovaná von z buniek, v prípade mŕtvych buniek dochádza k jej naviazaniu na DNA. Pre meranie intenzity fluorescencie GFP buniek infikovaných vírusovým vektorom AG3 bol použitý prietokový cytometer LSRII cytometer (Becton-Dickinson, San Jose, CA). Meranie prebiehalo pri excitačnej vlnovej dĺžke 488 nm a zmeraných bolo 10000 buniek.

4.5. Práca s vírusmi

4.5.1. Príprava vírusu

Vírus AG3, ktorý bol použitý pre potreby infekcie bol pripravený v pakážovacej bunkovej línii AviPack (Plachy et al., 2010) . Táto bunková línia bola pripravená Filipom Šeniglom, PhD. Línia obsahuje pakážovací konštrukt obsahujúci gén *gag* a *pol* pod kontrolou cytomegalovírusového promotora (Obr. 4.4. a).

V prvý deň boli bunky vysiate do hutoty 15 mil na misku P150. Na druhý deň boli transfekované plazmidom pAG3 (50 µg) a pVSVg (10 µg) kalcium- fosfátovou metódou . Produkt génu VSV-G je komponentou obalu vzniknutého vírusu, je potrebný pre prienik vírusu do bunky (Obr. 4.4. b). Plazmid pAG3 obsahuje 5´ a 3´ LTR, PBS (primer binding site) s pakážovacím signálom Ψ za ktorým nasleduje gén pre GFP a 3´ PPT oblasť (polypurin tract) (Obr. 4.4. c) . Po transfekcii konštruktov do pakážovacej línie nasledoval zber vírusu po 24h, 36h, 48h, 60h. Zozbierané médium s vírusom bolo zamrazené v -80. Zozbieraný vírus bol následne zakoncentrovaný. Po centrifugácii 200g/4°C/10min bol odobratý supernatant a stočený v ultracentriuge pri 23000rpm/4°C/2 hod30 min (rotor SW 28). Virusový pelet bol resuspendovaný v médiu, alikvotovaný po 1ml a zamrazený. Riediacou radou bol stanovený titer vírusu podľa počtu GFP+ bunkových kolónií (focus forming unit-FFU)



Obr. 4.4. Komponenty pakážovacieho systému. Schéma A predstavuje pakažovací konštrukt potrebný k vírovej replikácii a tvorbe infekčných viriónov. Gény Gag a Pol sú

pod CMV promotorom. Schéma B predstavuje konštrukt s pleiotropným génom VSV-G. Schéma C je konštrukt nami používaného vírusu AG3.

4.5.2. Vírusová infekcia

Suspenná zmes buniek D3aB7 klonu bola infikovaná AG3 vírusom. Bunky dva dni pred infekciou boli vysiate do hustoty 100 000 buniek na 6 jamkovú doštičku. V deň infekcie im bolo odsaté médium a do každej jamky bolo pridané 100µl vírusovej suspenzie, ktorá bola čertsvo rozmrazená. Pre zvýšenie účinnosti infekcie bol k bunkám pridaný polybren do koncentrálcie 20 µg/ml. Bunky boli následne inkubované 1 h/37°C. Následne k nim bolo pridané médium. Bunky po dvoch dňoch začali exprimovať GFP. Bunková suspenzia úspešne a neúspešne infikovaných buniek bola rozklonovaná limitným riedením na 96 jamkové doštičky, kedy na jednu jamku pripadala jedna bunka. Limitným riedením sa predišlo strate úspešne infikovaných klonov vďaka heterogenosti bunkovej kultúry v bunkovom delení. Týmto riedením sa docielil výber len tých klonov ktoré sú úspešne infikované a exprimujú GFP. Takto získané kony boli podrobené detailnejšiemu štúdiu.

4.5.3. Príprava vírusových konzerv

Vírus bol vyprodukovaný pakážovacím systémom, ktorý bol k tomuto účelu určený. Médium, ktoré obsahovalo vírus bolo odobraté z P150. Ultracentrifugáciou stočený vírusový pelet bol zakoncentrovaný, aliqotovaný po 1 ml a zamrazený.

4.6. Metódy molekulárneho klonovania

4.6.1. Restričné štiepenie

Restričné štiepenie zdrojového a cieľového plazmidu pre klonovanie myšacej Dnmt3a zo zdrojového pH19KE/Dnmt3a plazmidu do hlavného plazmidu indukibilného systému pNEBR-X1 je schématicky popísané v Tab. 4.2.

východiskový plazmid pH19KE/Dnmt3a		cieľový plazmid: pNEBR-X1	
pH19KE/Dnmt3a	2 µg	pNEBR-X1	1,5 µl
8 U Eco47III (5U/ µl)	1,5 µl	5U EcoR V (10U/µl)	0,5 µl
10 U Dra I (20U/ µl)	0,5 µl	pufR 3	2 µl
pufR D	2 µl	BSA	2 µl
BSA	2 µl	H ₂ O	15,25 µl
H ₂ O	10,7 µl	-po naštiepení sú konce defosforylované antarktickou fosfatáou (1,5 µl) + AP pufor (2 µl) ;37 °C/1 hod; inktivácia 65 °C	

Tab. 4.2. Schéma restričného štiepenia a príprava plazmidu pNEBR-X1-DNMT3a

4.6.2. Ligázová reakcia

Po restričnom štiepení, boli fragmenty nanosené na 0,9% gel a izolované použitím Gel extraction Kit (Qiagen). Po izolácii fragmentu a linearizovaného plazmidu bola pripravená ligázová reakcia. Ligázová reakcia obsahovala: 8 μ l Dnmt3a fragmentu, 4 μ l plazmid pNEBR-X1, 1 μ l ATP, 0,5 μ l T4 DNA ligáza, 1,5 μ l 10x T4 ligačný pufor. Ligácia prebiehala cez noc pri 15°C.

4.6.3. Transformácia ligovaného plazmidu do baktérií *E. coli-XL-1 Blue*

Ligázová reakcia je napipetovaná do čerstvo rozmrazenej bakteriálnej suspenzie XL-1 Blue. Po dobu 45 minút bola držaná na ľade a pár krát dôkladne premiešaná. Následne na to bola mikroskúmavka položená do vodného kúpeľa o teplote 42 °C na 1 min. Hneď na to bola prenesená na ľad a inkubovaná 1,5min. Potom bola transformovaná zmes prenesená do predpripravenej bakteriálnej kultivačnej skúmavky s 0,6 ml LB média. Nasleduje inkubácia 45 min/37 °C v trepačke. Zmes bola nanosená na agarové platne s ampicilínom a rozotrená.

4.6.4. Izolácia plazmidu a restričné štiepenie

Po vysiatí baktérií na agarovej platni vyrástli kolónie, ktoré boli vypichnuté a kultivované 45 min v bakteriálnych skúmavkách s 1,5 ml LB média. Potom objem bol preliaty do 1,5 ml mikroskúmaviek a suspenzia bola stočená 2 min/10000 rpm. Supernatant sa odsal a plazmid bol vyizolovaný za použitia Miniprep Kit (Qiagen). Na pelet bolo napipetované 100 μ l P1 pufru (obsahuje RNázu-zničenie RNA), zmes sa dôkladne premiešala vortexom. Následne sa k nej pridalo 100 μ l P2 pufru (obsahuje SDS, rozbitie baktérií) a inkubovala sa 5 min. Potom sa pridalo 100 μ l P3 pufru (obsahuje octan sodný-vyvrážanie proteínov) a nasledovala inkubácia na ľade 10 min. Potom mikroskúmavky boli stočené 10 min/13000 rpm/4 °C. Supernatant sa odobral do čistej mikroskúmavky a pridalo sa k nemu 250 μ l fenol-chloroformovej zmesi (1:1, pH7,9). Zmes bola centrifugovaná 2 min/13000 rpm a po nej sa odobrala vodná fáza, v ktorej sa nachádzala rozpustená DNA. Pridalo sa k nej 250 μ l izopropylalkoholu a zmes sa dôkladne premiešala. Nasledovala centrifúga 12 min/13000 rpm, tekutá fáza sa odliala, pridalo sa 450 μ l 75% etanolu a zmes sa opäť centrifugovala 5 min/13000 rpm. Alkohol sa následne odlial a pelet DNA sa mierne vysušil a rozpustil v 40 μ l T₁₀E_{0,1}. Takto prečistená DNA bola použitá pre restričné štiepenie a zistenie správnosti klonovania fragmentu do vektoru.

4.6.5. Izolácia plazmidovej DNA z *E.coli*

Plazmidová DNA transformovaná do bakteriálneho kmeňa *E.coli* XL Blue po kultivácii s vhodným antibiotikom bola izolovaná komerčne dostupným kitom Plazmid Midi Kit (Qiagen). Bakteriálna kultúra bola centrifugovaná 15min/4500 rpm /4 °C. Bakteriálny pelet bol resuspendovaný a spracovaný postupným použitím P1, P2 a P3 pufru a centrifugovaný 15 min/20000rpm/4 °C. Supernatant bol odobratý a nanosený na

kolonku s vnútorným filtrom pre zachytenie izolovanej DNA. Premývaním kolonky puframi QBT, QC sa DNA prečistila a QF pufrum eluovala. Jednomilitrové frakcie boli v priebehu prevapkovania kolonky QF pufrum zachytené do čistých mikroskúmaviek. Do každej z nich bolo pridané 700 μ l izopropanolu a dôkladne pretrepané. Mikroskúmavky boli centrifugované 30 min/13000rpm/4 °C, supernatant odliaty a plazmidové pelety prečistené etanolom. Po prečistení boli rozpustené v 20 μ l T₁₀E_{0,1} a uskladnené v chladničke.

4.6.6. Izolácia genómovej DNA

Čerstvý alebo rozmrznutý bunkový pelet (cca 5 mil. buniek, centrifugácia 700 x g, 3 min) sa resuspendoval v 1ml lyzačného pufru (800 μ l H₂O, 1 ml 0.5M EDTA pH 8, 200 μ l 10% SDS, -pomer zložiek pufru 4:5:1). K lyzátu sa pridalo 80 μ l proteinázy K (10mg/ml) do výslednej koncentrácie 1 mg/ml. Po rolovaní a prevracaní suspenzie v termostate pri teplote 55°C počas noci nasledovalo pridanie 20 μ l RNázy (25 mg/ml). Opätovne sa zmes rolovala a prevracala počas 1 hodiny pri 37 °C. Do zmesi bolo pridaných 800 μ l fenol-chloroformu (1:1, pH 7,4). Nasledovala centrifugácia 15000 rpm, 5 min. Vodná fáza obsahujúca rozpustenú DNA sa odobrala do čistej mikroskúmavky a pridalo sa k nej 700 μ l 96% etanolu. Inkubácia 5 min pri pokojovej teplote. Centrifugácia 14000 rpm, 3 min. Konečné opláchnutie 75% etanolom, stočenie, usušenie a rozpustenie genómovej DNA v 50 μ l T₁₀E_{0,1} cez noc. Koncentrácia rozpustenej chromozomálnej DNA bola stanovená spektrofotometricky pri vlnovej dĺžke 260 nm. Pre zachovanie kvality bola rozpustená DNA skladovaná v chladničke pri teplote 4 °C.

4.6.7. PCR

Pri práci s tkanivovými kultúrami pre overenie transfekovaných plazmidov bola použitá metóda tzv. crude extract PCR. Je to analýza genómovej DNA na prítomnosť plazmidu bez procedúry izolácie bunkovej genómovej DNA. V prvom kroku bol pripravený K pufr (250 μ l), ktorý obsahoval tieto zložky: 0,5% Tween20 a Proteinázu K (25 mg/ml)- nariadená v 1 x PCR pufré do konečnej koncentrácie 1mg/ml. Bunky boli trypsinované a spočítané v Bürkerovej komôrke. Odobralo sa príslušné množstvo buniek, aby po resuspendovaní v K pufré bunky odpovedali hustote 5000 buniek / μ l. V K pufré resuspendované bunky analyzovaných klonov boli po 20 μ l rozpipetované do PCR mikroskúmaviek.

- Následne bol použitý program v PCR termálnom cykléri:
 - inkubácia 45 min/ 56°C
 - inaktivácia proteinázy K 10 min/95°C

Z takto upravenej zmesi bol použitý 1 μ l do PCR reakcie (10 μ l) a PCR programom (Tab. 4.3.) je amplifikovaný cieľový fragment za použitia špecifických primerov.

úvodná denaturácia	93 °C	2 min	
denaturácia	93 °C	10 sek	25 x
nasadnutie primerov	65 °C	30 sek	
extenzia reťazcov	68 °C	1 min 30 sek	
konečná extenzia	68 °C	5 min	
do odvolania	10 °C		

Tab. 4.3. Všeobecná schéma PCR reakcie a reakčné parametre jednotlivých krokov. Pre každý navrhovaný pár primerov a podľa očakávanej dĺžky fragmentu sa reakčné podmienky modifikovali.

4.6.7.1. Použité primery

- Test prítomnosti DNMT3a klonovanej v pNEBR-X
forward: pNEBR-X1-L: TGTGGAATTGTGAGCGGATA
reverse: pNEBR- X1-R: GTTTTCCCAGTCACGACGTT
- Test prítomnosti pNEBR- R
forward: pNEBR-R1-L: ATGGCTCCTACTCCTGCTGA
reverse: pNEBR-R1-R: AAAACCATGGGTCTGTCTGC
- GFP test
forward: CCAGGAGCGCACCATCTTCT
reverse: TGCCGTTCTTCTGCTTGTCG
- Bisulfitová sekvenácia
forward: bisRV-LTR-L: GTTTTATAAGGAGAGAAAAAG
reverse: bisRV-LTR-R vonkajší: CAACTTCTACCTCCCTAAAC
bisRV-LTR-R vnútorný: CAACCCCCTCCACCAAATC

4.7. Zavedenie cicavčieho inducibilného systému

Cicavčí inducibilný systém použitý v experimente je vyvinutý na základe štúdia hmyzej regulovanej expzie morfológického faktoru ekdysonu. Je to steroidný hormón, ktorý interaguje s ekdysonovým receptorom prítomným v jadre. V cicavčích bunkách bola zavedená stabilná expzia ekdysonového receptora ktorý reguluje k nemu optimalizovaný promotor. V transgénnych myšiach exprimujúcich modifikovaný ekdysonový receptor za pridania hormónu dochádza k aktivácii promotora a k expzii vloženého génu. Systém vykazuje nižšiu bazálnu aktivitu a vyššiu inducibilitu. Najvhodnejšou kombináciou heterodimérnych receptorov vedúcich k indukcii β -gal génu autori docielili až 212 násobné zvýšenie aktivity oproti neindukovaným kontrolám (No et al., 1996).

Podľa referencií inducibilný systém (RheoSwitch, Mammalian Inducible Expression System, New England Biolabs, Inc.) bol zvolený ako najvhodnejší pre náš zvolený cieľ a to pre štúdium vplyvu myšacej DNMT3a na umlčovanie retrovírusového

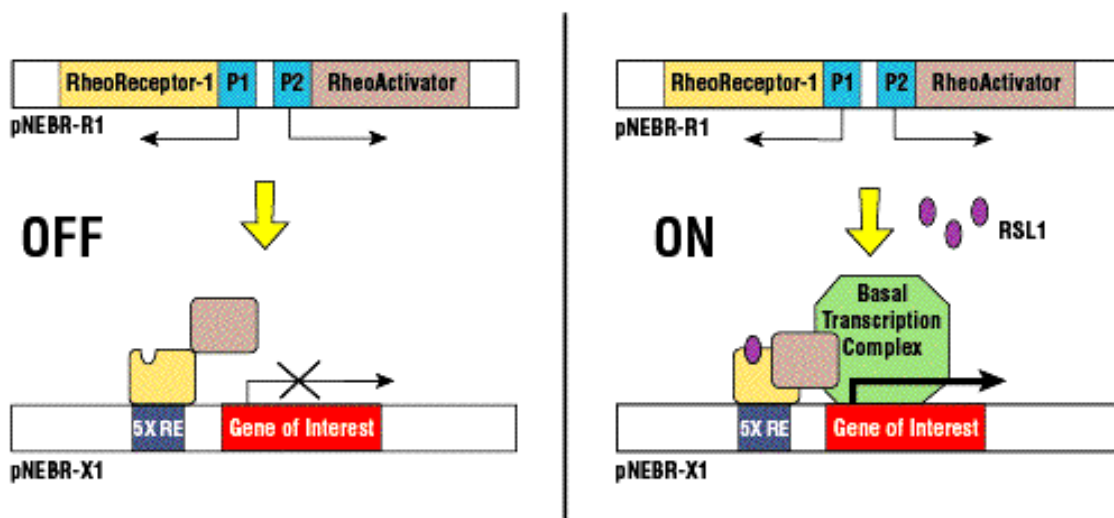
vektoru odvodeného od ASLV v kuracej línii DF-1. Princíp inducibilného systému je zobrazený na Obr. 4.5.

4.7.1. Komponenty inducibilného systému:

- Plazmid pNEBR-X1 - je cieľový plazmid, do ktorého je klonovaný gén myšacej DNMT3a. Obsahuje transkripčné regulačné oblasti: 5 kópií GAL4 odpovedajúceho elementu (5x RE). Besprostredne za týmto elementom sa nachádza TATA box a krátka vedúca sekvencia ktorá je nasledovaná polyklonovacím miestom (MCS) a SV40 poly A signálom. V plazmide sa nachádza hygromycínová rezistencia pod tymidin kinázovým promotorom (Obr. 4.6.)
- Plazmid pNEBR-R1 - regulačný plazmid. Z dvoch promotorov sa transkribujú dve regulačné molekuly. Z ľavého promotoru chimerický bipartitný jadrový Rheoreceptor a z pravého Rheoaktivátor. Plazmid nesie neomycínovú rezistenciu pod kontrolou skorého SV 40 promotoru (Obr. 4.7.).
- RSL1 ligand - syntetická induktorová molekula. Nevykazuje žiadne pleiotropné efekty a nepôsobí ako transaktivátor bunkovej transkripcie.

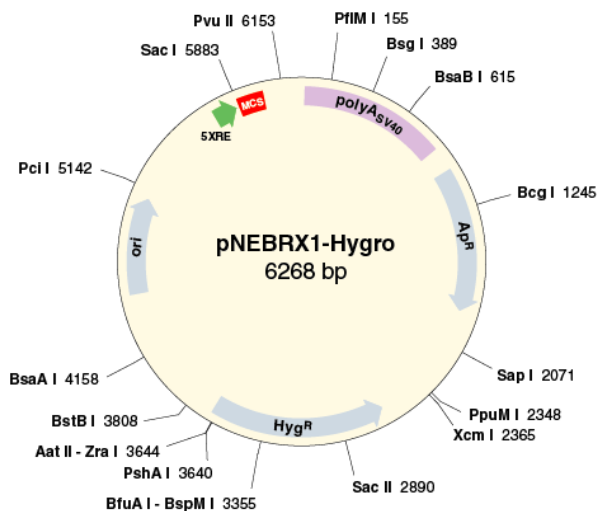
4.7.2. Molekulárna podstata fungovania Inducibilného systému

Kombinácia dvoch plazmidov pNEBR-X1 a pNEBR-R1, ktoré sú transfekované do buniek DF1 poskytuje možnosť kontroly expresie DNMT3a. Po kontrasfekcii buniek kombináciou týchto dvoch plazmidov dôjde k expresii regulačných molekúl z plazmidu pNEBR-R1 za vzniku holoreceptoru. Rheoreceptor ako chimerický proteín rozpoznáva regulačnú oblasť piatich tandemových repetícií GAL4 elementu plazmidu pNEBR-X1. Ako kofaktor je podstatný Rheoaktivátor. Po pridaní RSL1 (RheoSwitch ligand) zaujíma Rheoreceptor a aktivátor správnu konformáciu a atrahuje do tohto miesta transkripčný aparát. Gén nášho záujmu je následne exprimovaný.

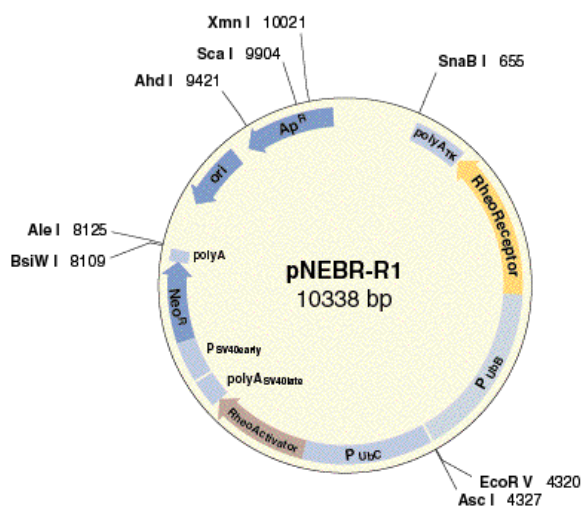


Obr. 4.5. Schématické znázornenie podstaty inducibilného systému. OFF stav- pri absencii RSL1 ligandu , Rheoreceptor a Rheoaktivátor zaujímajú inaktívnu konformáciu

a transkripčia je vypnutá. ON stav – v prítomnosti RSL1 ligandu, dva regulačné proteíny stabilne dimerizujú a viažu sa na príslušný element pNEBR-X1 plazmidu v aktívnej konformácii a transkripčia je zahájená.



Obr. 4.6. Plazmid pNEBR-X1.



Obr. 4.7. Plazmid pNEBR-R1

4.8. Globálna Analýza Metylácie genómovej DNA

Táto metóda bola použitá pre analýzu miery metylácie CpG dinukleotidov genómovej DNA buniek DF-1 po účinnej transfekcii plazmidu pNEBR-X1- DNMT3a do DF-1. Izolácii genómovej DNA predchádzala intenzívna indukcia expresie DNMT3a pridávaním RSL1 ligandu (pridaný do 500 nM) po dobu 14 dní. Analýza globálnej metylácie DNA bola vykonaná použitím (MethylampTM DNA Methylation Quatification Ultra Kit) podľa priloženého protokolu (Tab. 4.4.) . Spočíva v naviazaní genómovej DNA (100 ng) na dno jamiek s afinitnou substanciou a následnej

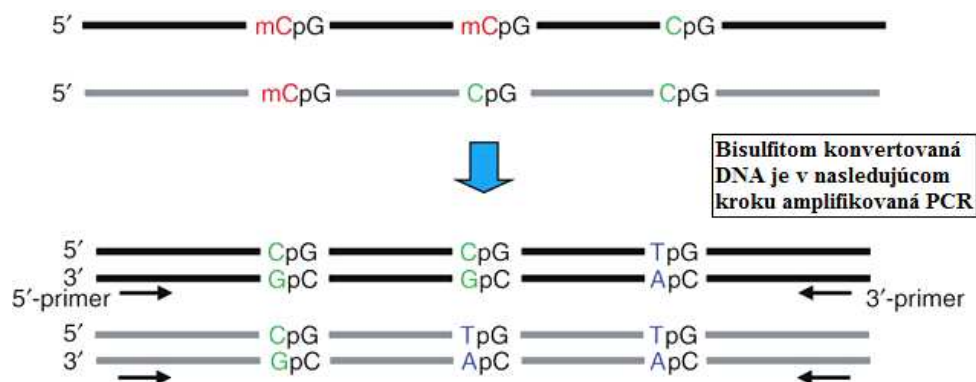
protilátkovej detekcii. Je to princíp ELIZA reakcie. Pre túto analýzu je rozhodujúcou veľmi presne zmeraná koncentrácia aplikovanej genomovej DNA pre presnú kvantifikáciu miery metylácie CpG. Metylované časti sú rozpoznané primárnou protilátkou proti m⁵C. Pridaním sekundárnej protilátky a následne vyvolávajúceho roztoku (developing solution) dôjde k farebnej zmene roztoku, ktorého optická denzita (OD) je zmeraná na ELIZA meriacom prístroji.

Globálna Analýza Metylácie genómovej DNA	
vazba genomovej DNA na dno jamky (100 ng)	90 min
primárna protilátka (1µg/ml)_objem 50 µl/jamka	1 h 20 min
sekundárna protilátka (0,4µg/ml)_objem 50 µl/jamka	45 min
urýchľovací roztok_(enhance solution) 50 µl/jamka	30 min
vyvíjajúci roztok_(developing solution) 100 µl/jamka	5 min, mimo svetla
blokovateľ roztok_(stop solution) 50 µl/jamka	
zmeranie OD _ 450 nm	
výpočet percentuálnej metylácie podľa vzťahu:	VZ- zvroka
OD (VZ-B) / X	B -blank- roztok bez DNA
metylácia% = ----- x 100%	PK- pozitivna kontrola, bohato
OD (PK - B)	metylovaná matrica DNA
	X- obsah CG
v živočíšnom druhu- 41%	

Tab. 4.4. Schéma krokov pre analýzu globálnej metylácie za použitia *MethylampTM DNA Methylation Quantification Ultra Kit*

4.9. Bisulfitova reakcia

Metylačný status LTR sekvencií je veľmi dobre definovateľný bisulfitovou konverziou za použitia EpiTec Bisulfite Kit (Epigentec). LTR regulačná provírusová oblasť obsahuje veľké množstvo CpG dinukleotidov, ktoré sú predmetom metylačnej modifikácie katalyzovanej DNMT. Vďaka svojmu represnému charakteru, metyláciou dochádza k umlčaniu integrovaného provírusu. Bisulfitova reakcia poskytuje možnosť zistenia miery metylácie, presnejšie počtu metyláciou modifikovaných CpG dinukleotidov vrámci LTR sekvencie. Inkubáciou bisulfitu sodného o vysokej koncentrácii s metylovanou DNA za vysokej teploty a nízkeho pH dochádza ku konverzii nemetylovaných cytozínových bází na uracily, pričom metylované cytozíny CpG dinukleotidov zostávajú nezmenené. Uracyly sa v následnej PCR reakcii prepíšu na tymíny (Obr. 4.8.). Metylová skupina na cytozíne v pozícii 5 pyrimidinového cyklu bráni vazbe bisulfitu sodného a teda i konverzii. V prípade nemetylovaného cytozínu dôjde najskôr k sulfonácii na 6. uhlíku a ďalej k hydrolytickej ireverzibilnej deaminácii v pozícii C4 za vzniku 6-sulfonát-uracilu a konečne k desulfonácii za alkalických podmienok za vzniku uracylu. Najkritickejším krokom pre správnu kvantifikáciu metylačného statusu analyzovanej sekvencie je kompletná konverzia všetkých nemetylovaných cytozínov.



Obr. 4.8. Princíp bisulfitovej konverzie. Metylované cytozíny sú intaktné k bisulfitu sodnému. Nemetylované cytozíny sú skonvertované na uracyly, ktoré sú následne prepísané na tymíny.

4.9.1. Schématický prehľad komponent a priebehu bisulfitovej konverzie

Pripravené reakcie s komponentami uvedenými v Tab. 4.5. boli napipetované do PCR mikroskúmaviek uložené do PCR cykléru s programom vlastnej konverzie uvedeným v Tab. 4.6.

chromozómálna DNA	1 µg
voda bez RNázy	dopočet do 20 µl podľa koncentrácie pridanej DNA
Bisulfitový Mix	85 µl
DNA ochranný pufor	35 µl
celkový objem	140 µl

Tab. 4.5. Komponenty reakčnej zmesi

	Čas (min)	teplota (°C)
denaturácia	5	99
Inkubácia	25	60
denaturácia	5	99
inkubácia	85	60
denaturácia	5	99
inkubácia	175	60
inkubácia		20

Tab. 4.6 Program bisulfitovej konverzie

4.9.1.1. Prečistenie DNA po reakčnej konverzii

PCR mikroskúmavky s reakciami boli scentrifugované a supernatant prevedený do čistých 1,5 ml mikroskúmaviek. DNA bola následne prečistená na špeciálnej

kolonke za použitia 500 µl pufrov BL, BW, BD. Prečistená skonvertovaná DNA bola eluovaná 20 µl elučného EB pufrou. Prečistená DNA bola použitá pre následnú BIS I PCR reakciu.

4.9.1.2. Polymerázová reťazová reakcia

Pre namnoženie úseku genomovej DNA po bisulfitovej konverzii bol použitý tzv „semi nested“ PCR. Reakcia prebieha v dvoch krokoch BIS1 a BIS2. BIS1 reakcia prebieha za použitia forward primeru bisRV-LTR-L a tzv. vonkajšieho reverse primeru (bisRV-LTR-R_outer). V BIS2 reakcii je použitý rovnaký forward 5' primer ale namiesto vonkajšieho je použitý 3' vnútorný reverse primer (bisRV-LTR-R_inner). Táto konštalácia primerov bola navrhnutá do oblasti bohatej na cytozín, ktoré nie sú v kontexte CpG dinukleotidov. Presné pozície nasadenia primerov sú zobrazené na Obr. 4.9. Primery sú navrhované bez použitia obvyklého programu a pri navrhovaní sa berie do úvahy konvertovanie C na T. Táto oblasť do ktorej boli primery navrhnuté neobsahuje tie CpG ktoré sú súčasťou analyzovanej sekvencie, v našom prípade úseku U3 promotor/enhancer regulačnej oblasti LTR.

použité primery:

bisRV-LTR-L forward: GTTTTATAAGGAGAGAAAAAG

bisRV-LTR-R_outer: CAACTTCTACCTCCCTAAAC

bisRV-LTR-R_inner: CAACCCCCTCCACCAAATC

GTAGTCTTATGCAATACTCTGTAGTCTTGCAACATGGTAACGATGAGTTAGCAACATGCCTT
ACAAGGAGAGAAAAAGCACCGTGCATGCCGATTGGTGGAAGTAAGGTGGTACGATCGTGCC
TTATTAGGAAGGCAACAGACGGGTCTGACATGGATTGGACGAACCACTGAATTCCGCATTGC
AGAGATATTGTATTTAAGTGCCTAGCTCGATACAATAAACGCCATTTGACCATTCACCACA
TGGTGTGCACCTGGGTTGATGGCCGGACCGTTGATTCCCTGACGACTACGAGCACCTGCATG
AAGCAGAAGGCTTCATTGGTGACCCCGACGTGATAGTTAGGGAATAGTGGTCCGCCACAG
ACGGCGTGGCGATCCTGTCTCCATCCGTCTCGTCTATCGGGAGGCGAGTTCGATGACCCTGG
TGGAGGGGGCTGCGGCTTAGGGAGGCAGAAGCTGA

Obr. 4.9. Detail sekvencie LTR AG3 vtáčieho retrovírusového vektoru s vyznačenými primerami pre semi-nested PCR. Žlte značená je 5' U3 regulačná oblasť, šedo R a zelene U5 oblasť. Farbou neznačená je pokračujúca sekvencia (leader sequence) plazmidu. Do tejto oblasti je navrhnutý reverse vonkajší a vnútorný primer.

4.9.1.2.1. BIS I PCR reakcia

Pre reakciu boli použité primery: forward primer (bisRV-LTR-L) a tzv. vonkajší reverse primer (bisRV-LTR-R_outer). Použitím kombinácie týchto primerov dôjde k vzniku mnohých PCR produktov kvôli skonvertovanému stavu DNA. Špecifita použitia kombinácie týchto primerov nie je dostatočná. Pri ich použití vzniká len časť produktov, ktorých amplifikáciou v BIS II reakcii vznikne náš požadovaný produkt. V BIS II reakcii je použitý forward primer s tzv. vnútorným reverse primerom.

Vnútný primer je navrhnutý vzhľadom na konverziu veľmi špecificky pre oblasť, ktorá má byť amplifikovaná a tým dochádza k amplifikácii len určitého DNA fragment z BIS I reakcie. Použitím tejto kombinácie primerov dochádza k výraznému zvýšeniu špecifity amplifikácie nášho požadovaného produktu.

Zloženie reakčnej zmesi o objeme 20 μl pre 1 vzorku je uvedené v Tab 4.7. V experimente bolo analyzovaných 16 vzoriek, každá z nich bola realizovaná v triplikáciách. Zloženie zmesi PCR premixu bolo prepočítané na 48 reakcií. Po príprave vzorkov bol spustený v PCR cykleri program uvedený v Tab. 4.8.

H ₂ O	14,6 μl
MgCl ₂ (50 mM)	0,6 μl
long template buffer 3 (10x)	2 μl
dNTPs (2.5 μM each)	1,6 μl
primery (100 μM)	0,2 μl
rTaq polymerase (5U/ μl , Takara)	0,3 μl
konvertovaná DNA	1 μl

Tab. 4.7. Zloženie PCR reakčnej zmesi pre jednu reakciu

PROGRAM BIS I			opakovanie
úvodná denaturácia	95°C	5 min	
denaturácia	95°C	1 min	7 x
nasadnutie primerov	58°C	2 min	
extenzia reťazcov	72°C	1 min 30s	
denaturácia	95°C	50 s	35 x
prichytenie primerov	54°C	2 min	
extenzia reťazcov	72°C	1 min 30 s	
záverečná extenzia	72°C	10 min	
	10°C	do odvolania	

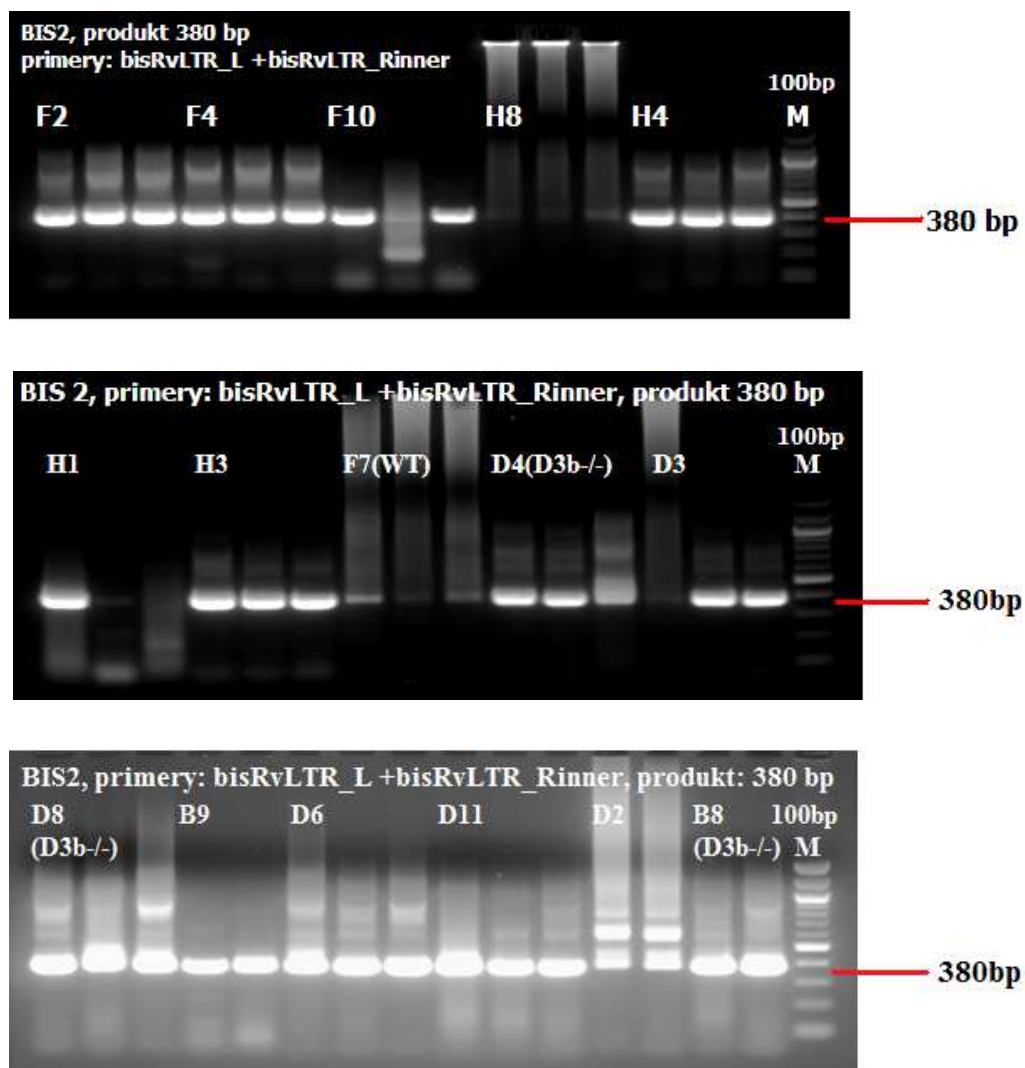
Tab. 4.8. BIS I program s uvedenými reakčnými krokmi a ich parametrami

4.9.1.2.2. BIS II PCR reakcia

Zloženie reakčnej zmesi je rovnaké ako v BIS I reakcii, pričom namiesto DNA sa dávajú 2 μl z BIS I reakcie. V reakcii je použitý forward primer a vnútný reverse primer. Reakčné podmienky sú zhrnuté v Tab. 4.9. Produkty BIS II sú veľkosti 380 bp (Obr. 4.10.). Ako je dokumentované elektroforetickým gélom účinnosť reakcie bola vysoká a primery k amplifikácii požadovanej sekvencie úseku U3 LRT boli navrhnuté správne a špecificky.

PROGRAM BIS II			opakovanie
úvodná denaturácia	95°C	3 min	40 x
denaturácia	95°C	45 s	
prichytenie primerov	54°C	2 min	
extenzia reťazcov	72°C	1 min 30 s	
záverečná extenzia	72°C	10 min	
inkubácia	10°C		

Tab. 4.9 BIS II program



Obr.4.10. Elektroforetická analýza produktu BIS II reakcie za použitia forward a vnútorného reverse primeru. Produkt má veľkosť 380 bp a odpovedá konvertovanému úseku U3 LTR s bohatým zastúpením CpG dinukleotidov, ktorých metylačný status zisťujeme.

4.9.1.3. Izolácia PCR produktu z agarózového gélu

Po bisulfitovej konverzii a následnej PCR reakcii boli jednotlivé triplikácie zmiešané a DNA požadovaného fragmentu bola vyizolovaná z gelu. Na prípravu

agarózového gelu pre izoláciu amplifikovanej DNA po PCR reakcii bola použitá ultra čistá agaróza v TAE pufre(1x). PCR produkt požadovanej veľkosti bol vyrezaný skalpelom pod UV lampou pri čo najnižšej intenzite UV žiarenia pre čo najmenšie porušenie izolovaného fragmentu. Pre izoláciu bol použitý QIAEX II Gel Extraction Kit (QIAGEN). Podľa hmotnosti vyrezaného fragmentu bol k nemu do mikroskúmavky pridaný QX1 pufo, ktorého objem v mikrolitroch odpovedal trojnásobnej hodnote hmotnosti vyrezaného fragmentu v miligramoch. Do mikroskúmavky bola pridaná suspenzia sklenených guľčiek pre vychytenie DNA a nasledovala inkubácia 10 min, 50°C. Následne boli krátko centrifugované a premyté QX1 a PE pufo. Vysušením peletu a pridaním 20µl vody došlo k uvoľneniu DNA z komplexu. DNA rozpustená vo vode bola zamrazená pri -20°C.

4.9.1.4. Ligácia PCR produktu do vektora pGEM-T Easy

Pre ligáciu amplifikovaného fragmentu DNA bol použitý ligačný kit pGEM-T Easy Vector System (Promega). Vyizolovaný fragment DNA je doň vložený metódou A-T klonovania. Vektor je linearizovaný s koncovými 3' T presahmi. Taq polymeráza, ktorá bola použitá pri amplifikácii vytvára na každom novosyntetizovanom reťazci koncové 3' A presahy vďaka svojej terminálnej transferázovej aktivite. Konce fragmentu a vektora sú teda komplementárne a za použitia T4- DNA ligázy dochádza k veľmi účinnej ligácii fragmentu do vektora. Ligačná zmes obsahuje 100 ng vkladného fragmentu, 1µl pGEM vektora (50 ng/µl), 5 µl 2x T4 DNA ligačného pufo a doplnené vodou do 10 µl. Ligácia prebieha cez noc pri 15°C.

Miesto pre vloženie inzertu je v géne pre β-galaktosidázu, ktorá štiepi chromogénny substrát X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indoyl-β-D-galaktopyranosid) za tvorby modrého a v prípade použitia S-gal čierne sfarbeného produktu . Správne vloženie fragmentu do vektora spôsobí prerušenie génu, β-galaktosidáza absentuje a nedochádza k metabolizmu chromogénneho substrátu. Bakteriálne kolónie so správne vloženým inzertom vo vektore sú po vysiatí na agarové platne bieleho sfarbenia a sú predmetom nášho nájmu.

4.9.1.5. Transformácia bakteriálneho kmeňa E. coli –X1 Blue

Ligačná zmes bola prevedená do mikroskúmavky s čerstvo rozmrazenými *XL-1* baktériami. V priebehu inkubácie na ľade (45 min) boli baktérie niekoľkokrát dôkladne pretrepané. Potom boli premiestnené do vyhriateho vodného kúpeľa (42°C) na 90 s a potom opäť na ľad na 1 min. Potom boli čo najrýchlejšie prepipetované do kultivačnej skúmavky s 500 µl LB média. Po dobu 45 minút boli kultivované pri 37°C. Následne bola časť kultúry vysiatá na misky s 1,5% agarom s ampicilinovou rezistenciou s výslednou koncentráciou 100 µg/ml.

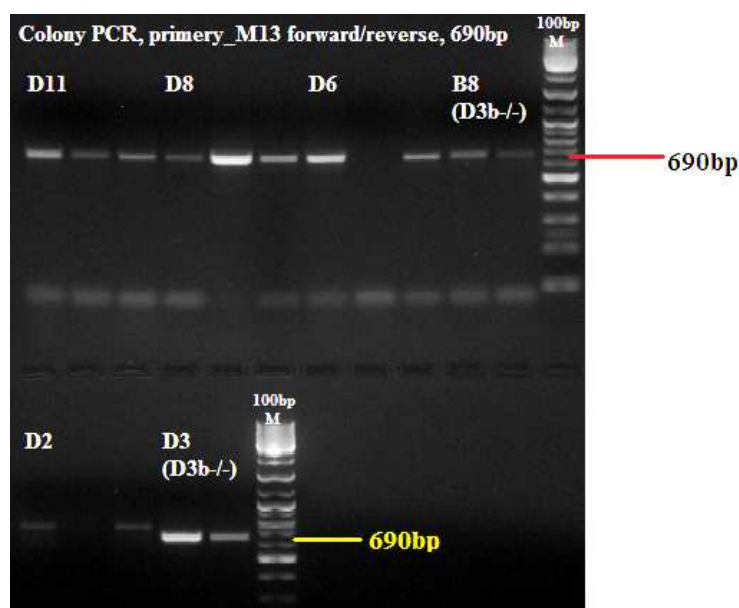
V prípade klonovania inzertu do pGEM vektora je potrebné, aby na misky pred vysiatím bakteriálnej suspenzie bol aplikovaný chromogénny substrát X-gal alebo S-gal a induktor β-galaktosidázy IPTG (izopropyl-β-D-1-thiogalaktosid) pre farebné odlíšenie bakteriálnych kolónií s klonovaným inzertom.

4.9.1.6. Overenie ligovaného inzertu v plazmide pGEM Teasy

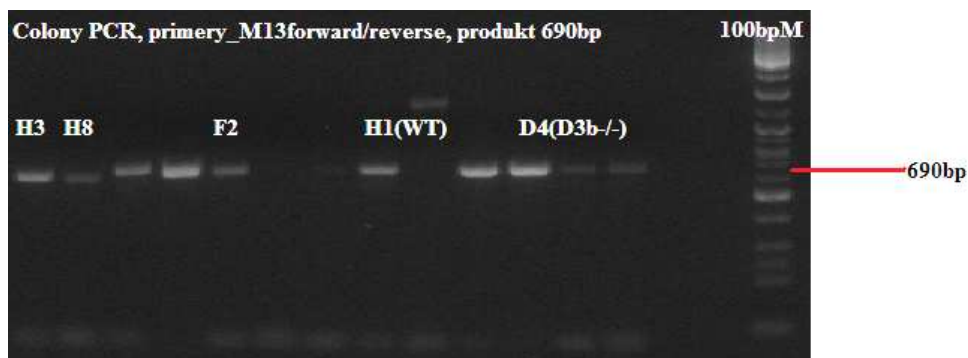
Pre overenie úspešného klonovania inzertu do plazmidu je možné použiť metódu tzv. colony PCR s použitím primerov M13 forward a M13 reverse. Primery lemujú hranice klonovacieho miesta vo vektore. Bakteriálne kolónie bieleho zafarbenia boli vypichané z agarovej platne a resuspendované v 20 µl LB média s ampicilínom (100 µg/ml). Boli inkubované asi 20 min pri pokojovej teplote. Do každej PCR reakcie bol pridaný 1µl suspenzie. Následne bol spustený PCR program (Tab. 4.10.). Úvodnou denaturáciou dôjde k rozpadu do reakcie pridaných baktérií a DNA sa stane prístupnou pre nasadenie primerov. Týmto spôsobom je možné veľmi rýchlo zistiť účinnosť ligácie amplifikovaného PCR produktu ligovaného A-T klonovaním do pGEM- T Easy vektoru. Takto otestované vzorky bolo možné použiť pre sekvenáciu klonovaného fragmentu, v našom prípade sa jedná o konvertovanú U3 regulačnú oblasť LTR integrovaného provírusu AG3 (Obr. 4.11. a,b,c).

úvodná denaturácia	95°C	3 min	29 x
denaturácia	95°C	30 s	
nasadenie primerov	60°C	30 s	
extenzia templátov	72°C	30 s	
dokončenie extenzie	72°C	10 min	
do odvolannia	10°C		

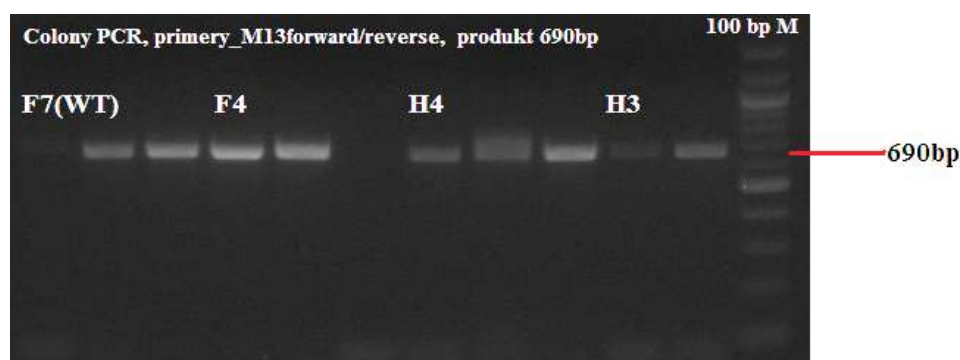
Tab. 4.10. Program screen, ktorým bolo možné otestovať účinnosť ligácie konvertovaného úseku LTR do pGem-T easy vektoru



Obr 4.11a



Obr. 4.11. b



Obr. 4.11. c

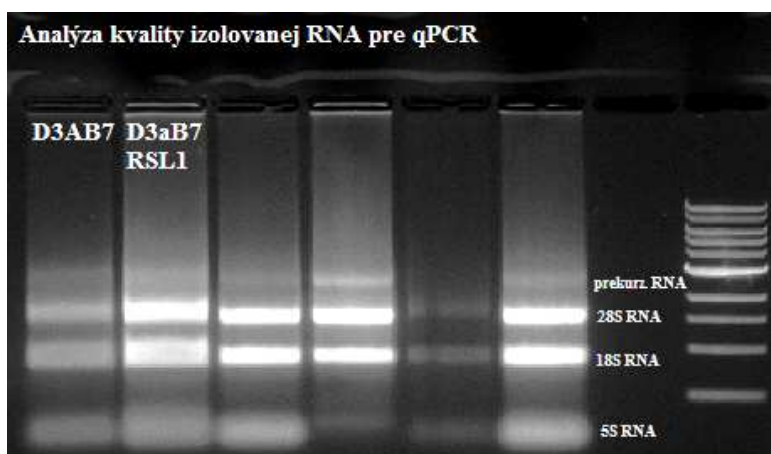
Obr 4.11 a,b,c. Overenie prítomnosti konvertovaného U3 LTR fragmentu ligovaného v pGem-T Easy vektore. Veľkosť amlifikovaného fragmentu je 690 bp. Z každého klonu boli analyzované 3 kolónie. Vždy aspoň jedna z troch analyzovaných kolónií obsahovala požadovaný fragment.

4.9.1.7. Sekvenácia

Bakteriálne kolónie, ktoré boli otestované a overené na prítomnosť ligovaného fragmentu DNA odpovedajúceho časti U3 LTR boli zachované a osekvenované. Porovnaním pôvodnej a získanej sekvencie bol definovaný počet nekonvertovaných, teda metylovaných cytozínov analyzovanej oblasti (Obr. 4.12.). Kolónie boli vypichané do jamiek 96 jamkovej doštičky s naliatym 1,5% agarom v LB médiu s ampicilínom a poslané pre komerčnú sekvenáciu do firmy GATC Konstanz, Nemecko. Výsledné sekvencie boli porovnané s pôvodnou sekvenciou pomocou serveru: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. Podmienky pre porovnávanie sekvencií neboli stringentné ako pri porovnávaní identických sekvencií, keďže pri bisulfitovej reakcii dochádza ku konverzii nemetylovaných cytozínov na tymíny.

4.10.1. Izolácia celkovej RNA

Trypsinované a v PBS opláchnuté bunky boli centrifugované a pelet prenesený do mikroskúmavky. K peletu bol pridaný 1ml TRIzol reagentu. Po dôkladnom vortexovaní sa zmes inkubovala na ľade 5 min, počas ktorej došlo k lýze buniek. Lyzované bunky boli následne ponechané 5 min pri pokojovej teplote. Potom k nim bolo pridané 200 μ l chloroformu. Na 20 s zmes bola dôkladne vortexovaná a potom ponechaná pri pokojovej teplote 15 min. Po centrifugácii 12000 rpm/15 min sa vytvorilo fázové rozhranie, pričom bola odobraná vodná fáza. K nej bolo pridané 500 μ l izopropanolu. Po intenzívnom premiešaní zmes je sцентрифugovaná 12000 rpm/10 min/4°C, pelet prepláchnutý 75% etanolom a opäť sцентрифugovaný. Pelet je následne rozpustený v sterilnej H₂O. Po rozpustení bola spektrofotometricky stanovená koncentrácia pri OD 260 nm. Kvalita vyizolovanej RNA bola prekontrolovaná elektroforézou, kde boli použité 2 μ g (Obr. 4.13.)



Obr 4.13. Elektroforetická analýza kvality RNA. Gel bol 1% a nanášalo sa 2 μ g RNA, ktorej koncentrácia bola zmeraná spektrofotometricky. RNA je vysokej kvality bez znečistení a detekovanými charakteristickým fragmentami 40S prekurzorovej RNA, 28S, 18S a 5S RNA.

4.10.2. Reverzná transkripcia- tvorba cDNA z RNA

Izolovaná RNA bola reverznou transkripciou prevedená na cDNA, pričom sa postupovalo podľa nasledujúcich krokov.

- Degradácia zvyškov DNA za použitia DNázy
10 μ l 5x pufor pre M-MLV
1 μ l DNáza (2U/ μ l)
1 μ g RNA
35, 65 μ l H₂O

- Reakčná zmes bola inkubovaná v PCR cykléri za podmienok: 37°C/15min, 70°C/5 min, 4°C do odvolania.
- K zmesi boli pridané: 1 µl primerov oligo (dT) (50 ng/µl), 125 µl dNTP a 0,5 µl M-MLV reverznej transkriptázy (200 U/µl). Opätovne bola zmes inkubovaná v PCR cykléri pri týchto podmienkach: 37°C/1 hod, 70°C/10 min, 4°C do odvolania.
- Vzniknutá **cDNA** bola 2x nariadená vodou. Pre overenie, je potrebné skontrolovať novopripravenú cDNA za použitia univerzálneho markeru GAPDH (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenáza) exprimovaného vo všetkých bunkách ako konštitutívny gén (housekeeping gene). Reakcia je pripravená v 20 µl tohto zloženia: 1µl cDNA, 13 µl H₂O, 2 µl 10xTaq pufru, 1,6 µl dNTP, 1µl 10 µM priamy primer, 1µl (10 µM) reverzný primer, 0,4 µl Taq polymeráza (5 U/1 µl). Bol zvolený program uvedený v Tab 4.11.

úvodná denaturácia	95°C	5 min	25x
denaturácia	95°C	20 s	
nasadenie primerov	60°C	20 s	
polymerácia reťazcov	72°C	20 s	
záverečná polymerácia	72°C	10 min	
do odvolania	16°C		
očakávaný produkt	170 bp		

Tab. 4.11 Parametre reakčných krokov pri otestovaní GAPDH referenčného markeru

- V rovnakom zložení reakčnej zmesi bola cDNA otestovaná na prítomnosť myšacej DNMT3a PCR programom uvedeným v Tab. 4.12. za použitia špecifických primerov proti DNMT3a

úvodná denaturácia	95°C	5 min	35 x
denaturácia	95°C	20 s	
nasadenie primerov	58°C	30 s	
polymerácia reťazcov	72°C	40 s	
záverečná polymerácia	72°C	10 min	
do odvolania	16°C		
očakávaný produkt	253bp		

Tab 4.12. Reakčné podmienky PCR reakcie pre overenie prítomnosti DNMT3a cDNA

4.10.3. Priebeh kvantitatívnej PCR reakcie

Po analýze kvality cDNA a špecifickosti navrhnutých primerov pre Dnmt3a bolo možné pristúpiť ku kvantitatívnej PCR. Reakcie pre priebeh qPCR boli pripravené vždy v triplikáciách. Našou analyzovanou vzorkou je cDNA DNMT3a pripravená z indukovaných a neindukovaných buniek klonu D3aB7. Táto cDNA je použitá v kombinácii so špecifickými primermi pre DNMT3a. Pre identifikáciu referenčného génu je izolovaná cDNA v kombinácii s primermi proti GAPDH. Ako negatívna kontrola bol použitý mastermix bez pridania cDNA.

- Reakcia prebiehala v 20 μ l. Obsahuje tieto komponenty: 2 μ l cDNA, 10 μ l 2x Mesa Geen Mix, 0,5 μ l 10 μ M priamy primer, 0,5 μ l 10 μ M reverzný primer, 2 μ l 2,5mM dNTP, 5 μ l H₂O. K reakcii bol využitý svetelný cyklér Real Time PCR Chromo4 (Bio Tech) s programom uvedeným v Tab. 4.13. Po priebehu qPCR sme získali výstupy o hodnote C_t u jednotlivých vzoriek. Tieto sú súčasťou výsledkovej časti. Hodnoty C_t boli následne použité pre výpočet zmeny počtu molekúl.

úvodná denaturácia	95°C	5 min	40 x
denaturácia	95°C	20 s	
nasadnutie primerov	58°C	30 s	
polymerácia reťazcov	60°C	40 s	
záverečná polymerácia	72°C	10 min	
do odvolania	16°C		

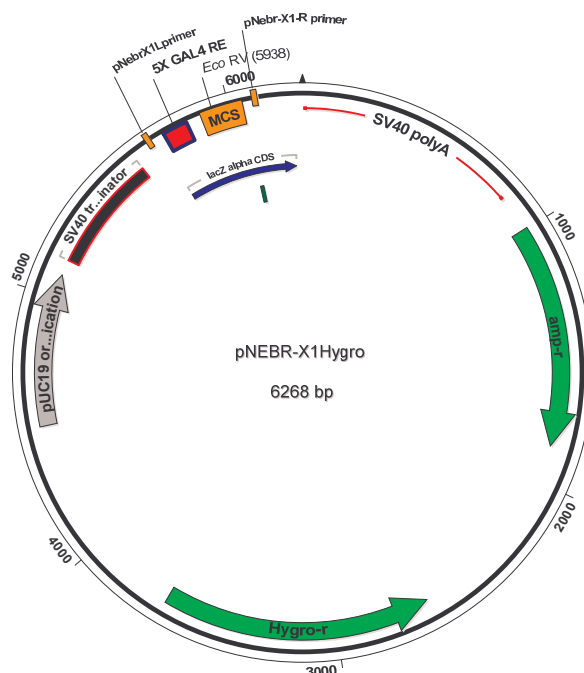
Tab 4.13. Parametre jednotlivých krokov qPCR reakcie

5. VÝSLEDKY

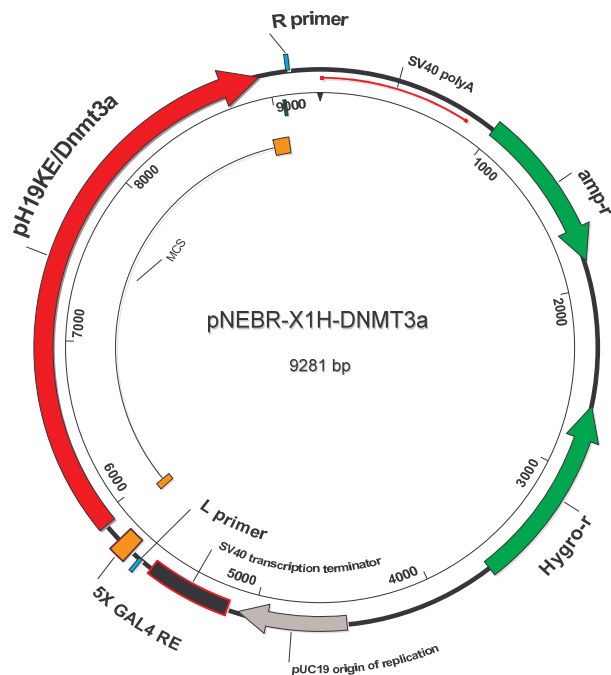
5.1. Štúdium vplyvu cicavčej DNMT3a na umlčovanie retrovírusového vektoru AG3 zavedením cicavčieho indukčného systému v kuracej línii DF-1

5.1.1. Klonovanie myšacej DNMT3a do hlavného plazmidu indukčného systému pNEBR-X1 Hygro.

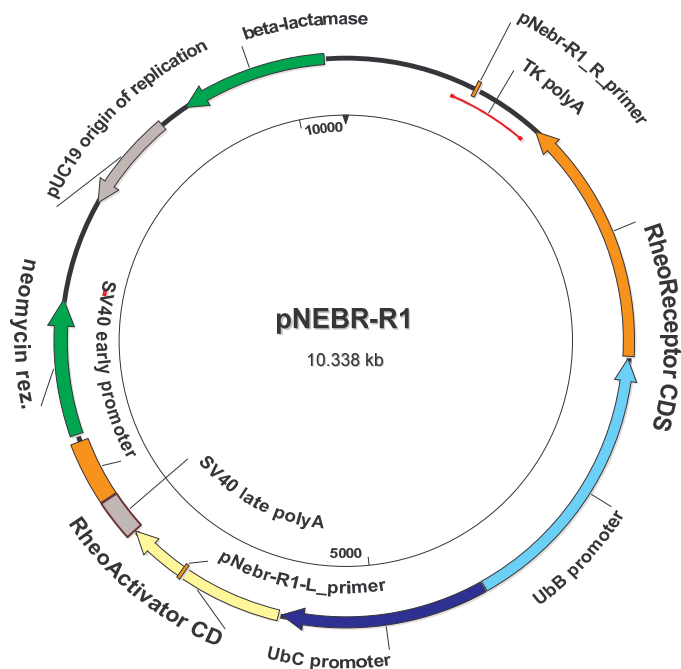
Zdorojovým plazmidom myšacej DNMT3a je pH19KE/Dnmt3a, kde DNMT3a je klonovaná medzi dve LTR regulačné sekvencie (Obr. 4.1.). Restričnými endonukleázami *Eco47III* a *Dra I* bola z tohto plazmidu vyštiepená ako fragment s tupými koncami. Cieľový plazmid pNEBR-X1Hygro (Obr. 5.1.) bol linearizovaný restričnou endonukleázou *EcoRV*, ktorá štiepi v oblasti MCS (multiple cloning site) za vzniku tupých koncov. Proti znovu spojeniu boli konce plazmidu defosforylované antarktickou fosfatázou. Po ligácii fragmentu a plazmidu bola endonukleázou *PstI* overená správnosť nového konštrukt pNEBR-X1H-Dnmt3a (Obr. 5.2.). Plazmid spolu s regulačným plazmidom pNEBR-R1 (Obr 5.3.) bol použitý pre transfekciu.



Obr 5.1. Mapa hlavného plazmidu indukčného systému pNEBR-X1Hygro. Obsahuje ampicilinovú a hygromycínovú rezistenciu, pUC19 počatok replikácie, SV40 terminátor. Plazmid obsahuje hlavnú regulačnú oblasť 5x opakujúci sa motív GAL4 elementu, ktorá sa nachádza pred TATA boxom.



Obr. 5.2. Mapa plazmidu pNEBR-X1H-DNMT3a. Obsahuje všetky génové komponenty ako pNEBR-X1. Myšacia DNMT3a je klonovaná v MCS. V PCR reakcii s navrhnutými primermi je možné overiť prítomnosť klonovanej myšacej DNMT3a; amplifikovaný fragment má veľkosť 3446 bp.



Obr 5.3. Regulačný plazmid pNEBR-R1. Z odlišných promotorov exprimuje hlavné regulačné molekuly Rheoreceptor a Rheoaktivátor. Tie za pridania RSL1 ligandu nadobudnú správnu konformáciu v regulačnej oblasti transkripcie pNEBR-X1H-Dnmt3a plazmidu a aktivujú transkripciu myšacej DNMT3a v kuracích DF-1 bunkách. Obsahuje neomycínovú rezistenciu. Navrhnutými primermi sa amplifikuje oblasť o veľkosti 5413bp.

5.1.2. Transfekcia pNEBR-X1H-DNMT3a a pNEBR-R1 do DF-1

Linearizované plazmidy inducibilného systému boli transfekované kalcium-fosfátovou metódou do DF-1 buniek. Transfekované bunky bolo možné selektovať vďaka odlišnej antibiotikovej selekcii, ktorú plazmidy nesú. pNEBR-X1H-Dnmt3a obsahuje hygromycinovú a pNEBR-R1 neomycínovú rezistenciu. Bunkám v priebehu pasážovania bolo pridávané antibiotikum hygromycín do koncentrácie 100 µg/ml. V prípade plazmidu pNEBR-R1 je k bunkám po každej pasáži pridané antibiotikum neomycín (G418) do koncentrácie 200 µg/ml.

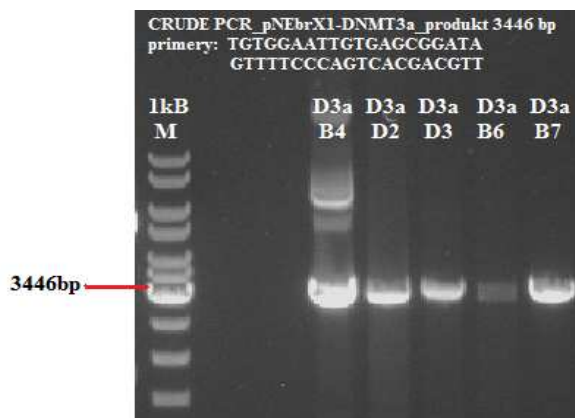
Takto vyselektovaná bunková kultúra bola následne limitným riedením klonovaná na jednotlivé klony. Riedenie bolo zvolené tak, aby jedna bunka pripadala na jednu jamku 96 jamkovej doštičky. Klony boli kultivované za prídania antibiotík neomycínu a hygromycínu do väčších hustôt, pre potreby izolácie genómovej DNA a ďalších testovacích metód.

5.1.3. Testovanie selektovaných klonov

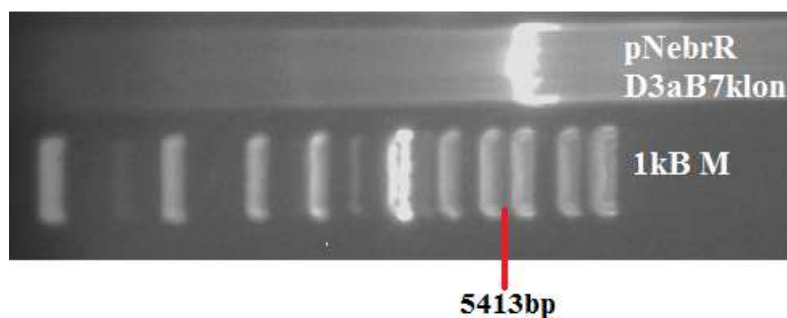
Testovanie klonov prebiehalo na niekoľkých úrovniach ako bude demonštrované. Na záver bol na základe výsledkov PCR a metylačnej overovacej metódy vybraný jeden klon, ktorý bol následne podrobený štúdiu vplyvu regulovanej expresie DNMT3a na umlčovanie vtáčieho vírusu AG3, ktorým bunky boli infikované.

5.1.3.1. Overenie myšacej DNMT3a a pNEBR-R1 v kuracích bunkách PCR

PCR reakciou bola dokázaná prítomnosť myšacej Dnmt3a v bunkách DF-1. Transfekcia plazmidu pNEBR-X1-DNMT3a bola úspešná. Miesta navrhnutých primerov sú zobrazené na Obr. 5.2. a lemujú oblasť, kam bola DNMT3a klonovaná. Produkty PCR reakcie sú zobrazené na Obr. 5.4. Úspešnosť transfekcie plazmidu pNEBR-R1 bola overená taktiež PCR reakciou (Obr. 5.5.)



Obr. 5.4. Elektroforetická analýza crude PCR pNEBR-X1H-DNMT3a. Fragment veľkosti 3446 bp odpovedá úseku, ktorý zahŕňa DNMT3a.



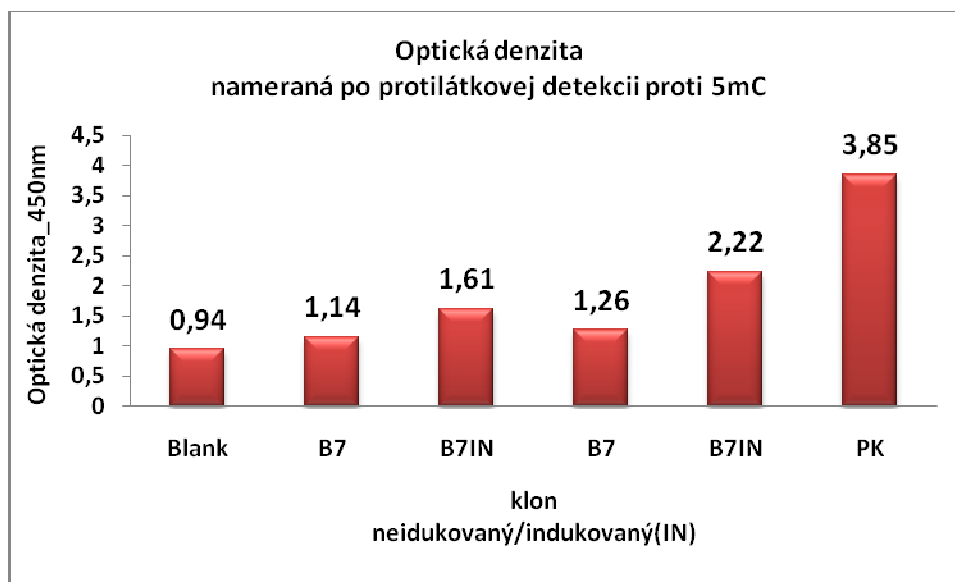
Obr 5.5. Elektroforetická analýza D3aB7 klonu na pNEBR-R1. Veľkosť očakávaného fragmentu je 5413bp.

5.1.3.2. Overenie expresie regulačných proteínov z plazmidu pNEBR-R1

Časť buniek klonu D3aB7 bola pri pasáži prenesená na šesťjamkovú doštičku, kde 3 jamky buniek boli kalcium-fosfatovou metódou transfekované plazmidom pNEBR-HG (Obr 4.3.). Plazmid je odvodený od pNEBR-X1Hygro a namiesto DNMT3a je v ňom klonovaný GFP. Transfekované bunky boli následne indukované pridaním ligandu RSL1. Dva dni po indukcii na fluorescenčom mikroskope bolo možné vizuálne pozorovať expresiu GFP v indukovaných bunkách. Tým bola potvrdená expresia Rheoreceptoru ako aj Rheoaktivátoru z pNEBR-R1 v bunkách klonu D3aB7 ako aj v iných analyzovaných klonoch.

5.1.4. Analýza globálnej metylácie

Touto metódou bolo možné otestovať aktivitu DNMT3a *in vivo*. Po transfekcii a následnej indukcii transkripcie DNMT3a z plazmidu pNEBR-X1H-DNMT3a predpokladáme zvýšenú globálnu hladinu metylácie genómovej DNA. K analýze globálnej metylácie bol použitý kit MethylampTM DNA Methylation Quantification Ultra Kit (Epigentec). Bunky klonu D3aB7 boli pre potrebu tejto analýzy vysiate na P100 kultivačných miskách a to v duplikácii. Boli kultivované 2 týždne, pričom do jednej série buniek bol vždy pri každej pasáži pridaný RSL1 ligand do koncentrácie 250 nM. Po týchto dvoch týždňoch bola z buniek vyizolovaná genómová DNA, ktorá bola použitá pre analýzu globálnej metylácie. Metóda je založená na protilátkovej detekcii m⁵C, ktorého hustota by mala byť odlišná v indukovaných (DNMT3a exprimujúcich) a neindukovaných bunkách. Hustota m⁵C po protilátkovej detekcii odpovedá optickej denzite nameranej na ELIZA meracom prístroji (Obr. 5.6.)

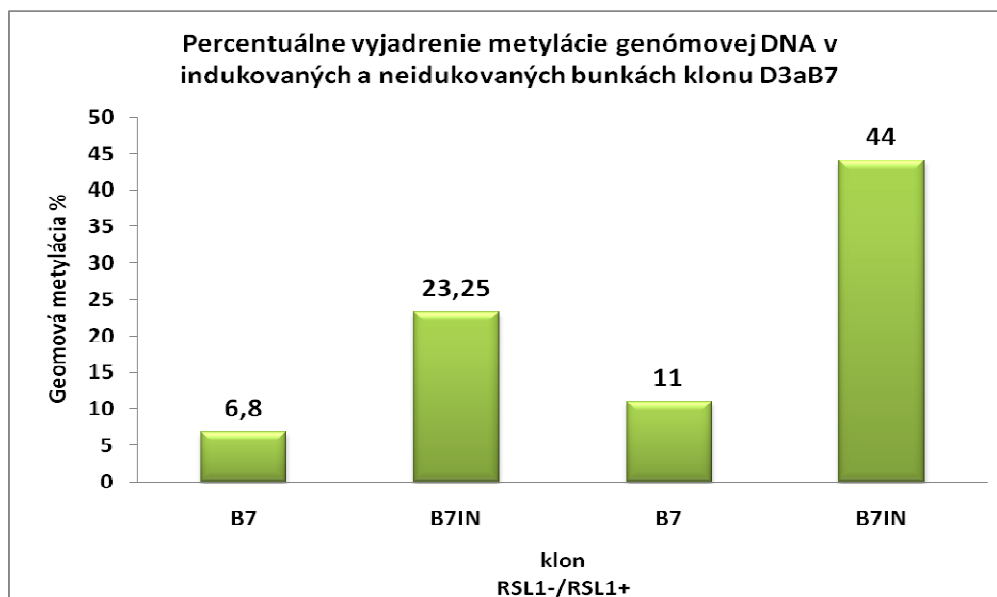


Obr. 5.6. Grafické znázornenie optickej denzity imunodetekovanej DNA izolovanej z indukovaných a neidukovaných buniek klonu D3aB7. Reakcia bola realizovaná v duplikácii. Indukované su označené ako B7IN, neidukované ako B7. Ako blank je použitý celkový roztok použitých protilátok bez prítomnosti DNA. Pozitívna kontrola je plne metylovaná matrica DNA.

Na základe výsledkov OD je možné sledovať u druhej dvojice takmer 45% nárast optickej denzity u buniek ktoré boli indukované ligandom RSL1. V prvej dvojici tento rozdiel nie je taký markantný hoci sa jedná o tú istú DNA (Obr. 5.6.) OD bola podľa uvedeného vzorca (Obr. 5.7.) priloženého v protokole prepočítaná podľa celkového počtu CpG dinukleotidov v určitom živočíšnom druhu na percentuálnu metyláciu genómovej DNA (Obr. 5.8.) Je tu zrejmy rozdiel medzi bunkami, v ktorých je DNMT3a indukovaná a v ktorých nie je. V indukovaných je pozorovaný zhruba 3,6 násobný nárast metylácie DNA ako v neidukovaných bunkách.

$$\text{metylácia \%} = \frac{(\text{OD vz} - \text{OD blank}) / X}{\text{OD (pozitívna kontrola- blank)}} \times 100$$

Obr 5.7. Vzorec pre prepočet zistenej OD na percentuálnu globálnu DNA metyláciu. Za X bola doplnená hodnota 41%, čo odpovedá percentuálnemu GC obsahu v kuracom genóme. Ostatné doplnené údaje sú namerané hodnoty.



Obr. 5.8. Grafické znázornenie percentuálnej metylácie genómovej DNA pred a po indukcii inducibilného systému na základe nameranej optickej denzity.

Po predošlých PCR analýzach klon D3aB7 vykazoval úplne kompletnú výbavu plazmidov a ako bolo potvrdené metódami analýzy globálnej metylácie vykazoval najlepšie parametre fungovania zavedeného inducibilného systému. Následne po indukcii DNMT3a bol klon otestovaný na úrovni expresie DNMT3a mRNA pomocou qPCR.

5.1.5. Kvantitatívna PCR

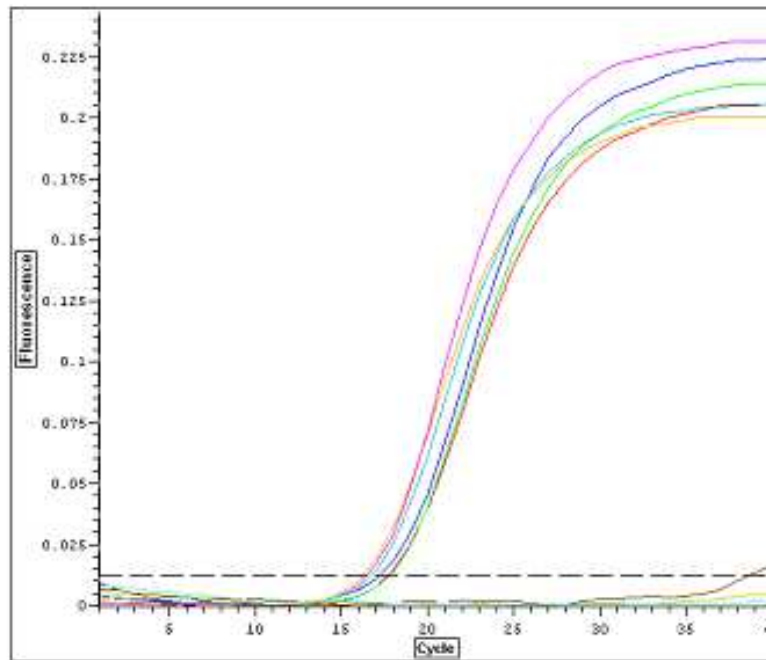
Bunky klonu D3aB7 boli vysiate na P100 kultivačné misky. Do jednej z misiek bol pridaný ligand (250 nM). Dva dni na to bola vyizolovaná celková RNA z buniek, ktorá bola použitá pre qPCR. Z izolovanej RNA bola v ďalšom kroku reverznou transkripciou pripravená cDNA. Pri reverznej transkripcii boli použité oligodT primery. Po reverznej transkripcii sa na získanej cDNA otestovali primery určené pre qPCR (Obr. 5.9.). Z elektroforetogramu je zjavné, že primery sú navrhnuté špecificky tak pre DNMT3a ako aj pre referenčný gén GAPDH. Okrem toho je možné vidieť, že amplifikovaný fragment na elektroforetogramе je oveľa výraznejší v prípade cDNA pripravenej z indukovaných buniek (cDNAD3aB7RSL1) ako u cDNA pripravenej z neindukovaných (cDNA D3aB7). To nasvedčuje na väčšie množstvo molekúl cDNA DNMT3a v indukovaných bunkách pri rovnakom množstve cDNA použitej k elektroforetickej analýze (2µg).



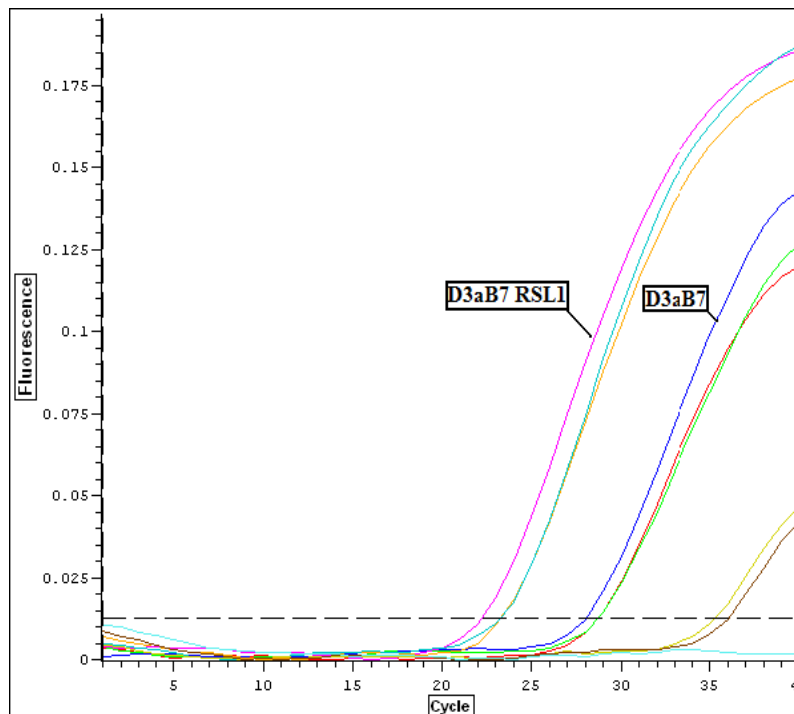
Obr. 5.9. Elektroforetická analýza špecificity primerov pre cDNA. Pozitívna kontrola je plazmid, v ktorom je DNMT3a klonovaná. Negatívna kontrola je cDNA pripravená z buniek DF-1 bez plazmidu. Referenčný gén GAPDH pre qPCR je amplifikovaný z cDNA vytvorenej z izolovanej RNA indukovaných a neindukovaných buniek.

GAPDH je štandardom, ktorého expresia je nezávislá na indukcii ligandom. Preto C_t tohto referenčného génu, sledovaného tak u indukovaných ako aj u neindukovaných bunkách klonu D3aB7 by mala byť približne rovnaká, čo potvrdzuje aj grafické znázornenie na Obr. 5.10. Odchyľky medzi jednotlivými reakciami referenčného génu vznikajú náhodnými chybami, ktoré sa objavia v priebehu reakcie. Vzniknutá odchylka C_t referenčného génu v indukovaných a neindukovaných bunkách sa zohľadňuje vo výpočte C_t u vzoriek, v ktorých porovnávame expresiu DNMT3a. Rozdiel priemerných hodnôt počtu cyklov referenčného génu GAPDH v indukovaných a neindukovaných bunkách je 1,08 cyklu. Vzhľadom k tejto odchylke sa priemerný počet cyklov, ktorým sa líši cyklus nástupu fluorescencie pre gén DNMT3a zníži o jeden cyklus pri neindukovaných bunkách (Tab. 5.1.). Keďže sa každým cyklom PCR počet molekúl zdvojnásobí tak rozdiel v počte molekúl v bunkách pred a po indukciu RSL1 ligandom je $2^{\Delta C_t}$, teda $2^{4,48}$ násobný. V konečnom dôsledku je východiskový počet molekúl DNMT3a mRNA v indukovaných bunkách 22 -krát väčší ako v neindukovaných bunkách (Obr. 5.12.). Keďže týchto molekúl DNMT3a mRNA (po RT cDNA) po indukciu je oveľa viac, nástup fluorescencie v indukovaných bunkách nastáva v skoršom cykle cca v 23. V prípade buniek bez indukcie v cca 28 (Obr 5.11.).

Záverne zhrnutím môžeme tvrdiť, že indukibilný systém vykazuje výraznú expresiu DNMT3a bez indukcie, naznačuje je to pomerne malý rozdiel relatívnej expresie medzi indukovanými a neindukovanými bunkami. Tým že v neindukovaných bunkách dochádza k bazálnej expresii DNMT3a strácame negatívnu kontrolu k bunkám indukovaným a tým nie je možné jasne povedať, či zvýšená expresia myšacej DNMT3a je alebo nie je dôvodom umlčania integrovaného provírusu.



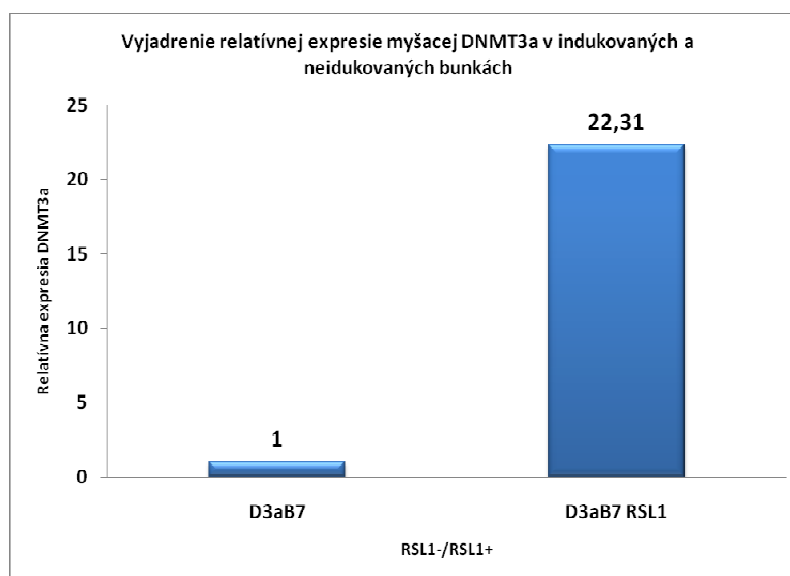
Obr 5.10. Grafické znázornenie exponencialneho priebehu qPCR GAPDH referenčného génu. C_t indukovaného a neindukovaného vzorku predstavuje len veľmi miernu odchylku jedného cyklu.



Obr 5.11. Grafické znázornenie exponenciálneho priebehu qPCR reakčných triplikácií D3aB7 a D3aB7 RSL1. Z grafu je zrejмый skorý nástup fluorescence u D3aB7 RSL1 cca v 23. cykle a D3aB7 cca v 28. cykle.

vzorka	referenčný gén	C _t	D3aB7	C _t
hodnota Ct	GAPDH D3aB7	17,72	D3aB7	28,7
	GAPDH D3aB7	17,88	D3aB7	28,74
	GAPDH D3aB7	17,24	D3aB7	28,03
	GAPDH D3aB7 RSL1	16,27	D3aB7 RSL1	23,29
	GAPDH D3aB7 RSL1	16,51	D3aB7 RSL1	22,23
	GAPDH D3aB7 RSL1	16,8	D3aB7 RSL1	23,26
Aritmetický priemer Ct	GAPDH D3aB7	17,61	D3aB7	27,41
Aritmetický priemer Ct	GAPDH D3aB7 RSL1	16,53	D3aB7 RSL1	22,93
$\Delta Ct = C_{t(D3aB7)} - C_{t(D3aB7RSL1)}$		1,08	rozdiel C _t	4,48
$2^{\Delta Ct}$				22,31

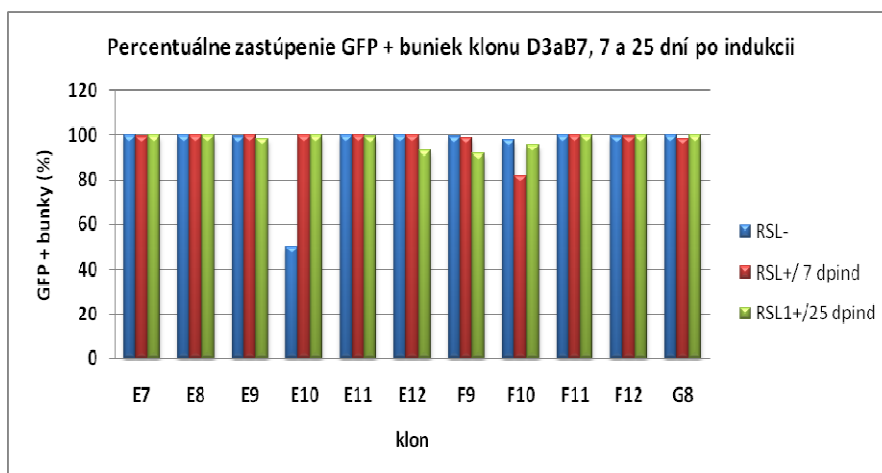
Tab 5.1. Súhrný prehľad hodnôt počtu cyklov, v ktorých došlo k prekonaniu prahovej hodnoty fluorescence a konečné vyjadrenie vzrastu počtu molekúl DNMT3a v indukovaných bunkách oproti neindukovaným.



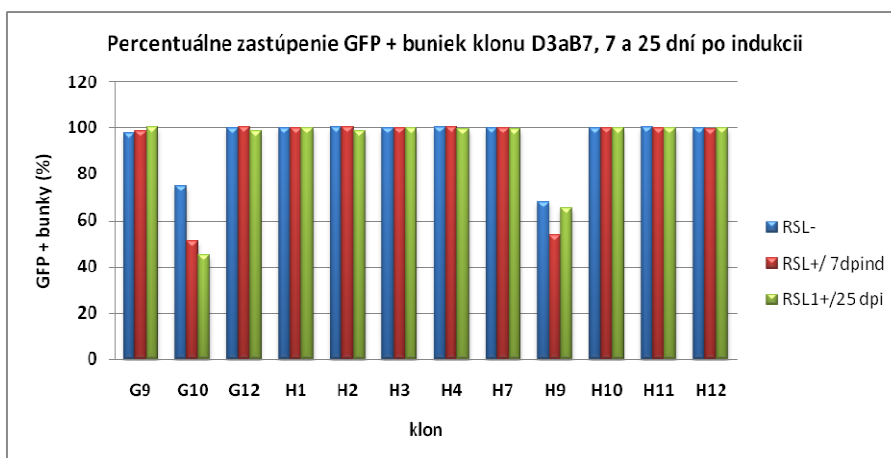
Obr. 5.12. Grafické znázornenie nárastu počtu molekúl DNMT3a mRNA v indukovaných a neindukovaných bunkách. V indukovaných bunkách je 22 krát viac molekúl ako v bunkách bez pridania ligandu RSL1.

5.1.6. Sledovanie vplyvu exprese DNMT3a na umlčovanie retrovírusového vektoru AG3.

Bunky klonu D3aB7 boli infikované retrovírusovým vektorom AG3 exprimujúcim GFP. Po infekcii boli limitným riedením získané GFP pozitívne klony. Po zvýšení bunkovej hustoty klonov sme k nim po každej pasáži pridávali induktor RSL1 ligand. Po siedmich dňoch indukcie boli bunky zmerané prietokovým cytometrom. Druhé meranie prebehlo 25 dní po indukcii. Klony tak na začiatku merania ako aj v priebehu indukcie vykazovali vysoké percento GFP pozitívnych buniek (GFP+). K umlčovaniu integrovaného provírusu takmer vôbec nedochádzalo. Provírus vykazoval počas celej doby veľmi stabilnú expresiu a klony si zachovali pôvodné percento GFP+ buniek, ktorá sa blížila k 100% (Obr. 5.13. a,b). Pre zvýšenie účinnosti umlčania boli bunky lipofekciou transfekované hlavným kofaktorom *de novo* DNMT a to DNMT3L. No k zmenám percentuálneho zastúpenia GFP(+) buniek nedošlo.



Obr. 5.13. a) Percentuálne vyjadrenie počtu GFP pozitívnych buniek v priebehu mesačnej indukcie inducibilného systému.



Obr. 5.13.b) Percentuálne vyjadrenie počtu GFP pozitívnych buniek v priebehu mesačnej indukcie a exprese myšacej DNMT3a.

5.2. Sledovanie priebehu umlčovania retrovírusového vektoru AG3 v divokom kmeni a DNMT3b deficientnej línii HCT116 odvodenej od kolorektálneho karcinómu.

5.2.1. Infekcia DNMT3b^{-/-} a WT buniek retrovírusovým vektorom AG3

Nádorové bunky DNMT3b^{-/-} a WT boli infikované replikačne defektným retrovírusovým vektorom AG3 odvodeným od ASLV. Na kultivačnú misku P60 bolo vysiaté 300 000 buniek a infikované obvyklým spôsobom za použitia polybrenu pre zvýšenie účinnosti infekcie. Multiplicita infekcie bola 1. Teda na jednu bunku pripadá jeden integrovaný provírus, ktorého aktivitu môžeme sledovať vďaka exprimovanému GFP génu.

5.2.2. Výber GFP pozitívnych klonov 4 dni po infekcii

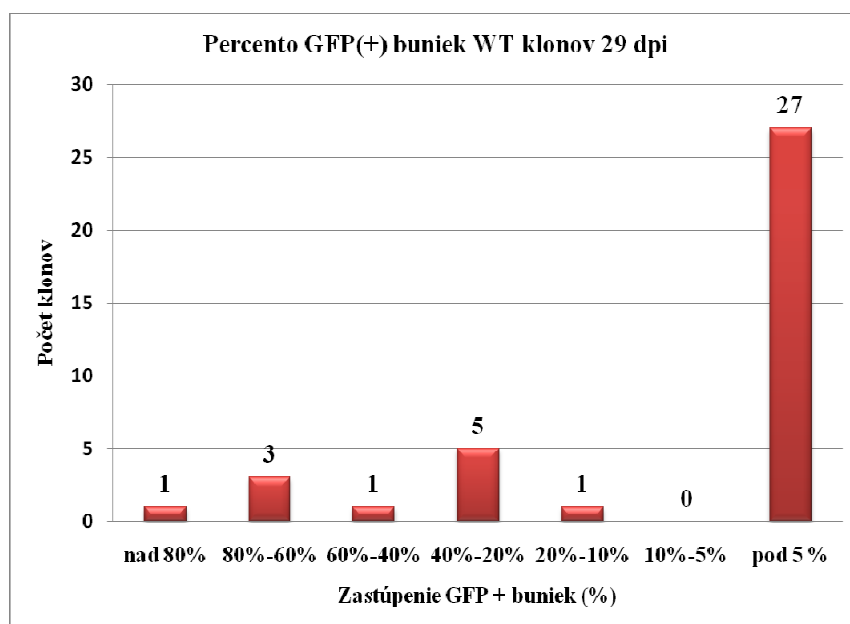
Infikované bunky HCT116 (WT, DNMT3b^{-/-}) 4 dni po infekcii (4 dpi) boli rozklonované na GFP pozitívne (GFP+) klony. Bunkové klonovanie do 96 jamkových doštičiek prebehlo na Mikrobiologickom ústave AV ČR v laboratóriu prietokovej cytometrie za použitia FACS Vantage SE s vysokorýchlostným sorterom. V priebehu klonovania orientačne na meracom prístroji a po konzultácii s obsluhou sorteru bolo možné už po tak krátkom čase od infekcie sledovať okrem GFP(+) buniek veľký počet WT GFP negatívnych (GFP-) buniek. Vysoký počet GFP(-) buniek je možné vysvetliť takmer okamžitým umlčaním GFP exprimujúceho vektoru vo WT bunkách v krátkom časovom rozmedzí od infekcie. Po rozklonovaní bunkovej suspenzie sorterom sme získali k experimentálnemu využitiu 40 GFP(+) klonov divokého kmeňa a 55 klonov DNMT3b^{-/-}, u ktorých bolo následne pozorované umlčovanie v priebehu času na základe úbytku GFP(+) buniek. Percentuálne zastúpenie GFP(+) buniek vysortovaných klonov bolo merané prietokovým cytometrom v priebehu 3 mesiacov. Od infekcie po prvé meranie percentuálneho zastúpenia GFP(+) buniek ubehlo 29 dní. Táto doba od rozklonovania po prvé meranie bola potrebná k tomu, aby jednotlivé klony porástli do dostatočnej hustoty, aby ich bolo možné spracovať pre meranie prietokovou cytometriou.

5.2.3. Sledovanie expresie GFP v infikovaných bunkách počas doby 3 mesiacov

Všetky merania prebiehali v laboratóriu prietokovej cytometrie Ústavu molekulárnej genetiky AV ČR pri špecifickom výbere vhodného lasera a pri nastaveniach vhodných parametrov pre meranie GFP. Pri meraní bol používaný LSR II cytometer (Becton- Dickinson, San Jose, CA).

5.2.3.1. Zastúpenie GFP(+) buniek v klonoch línie WT 29 dpi

V prípade bunkovej línie divokého kmeňa, ktorý obsahuje plnú zostavu metyltransferáz (*de novo* + udržovcia DNMT1) je markantne vysoký počet klonov umlčaných už pri prvom meraní. Z počtu 38 meraných klonov je 27 umlčaných, u ktorých percento GFP(+) buniek nepresahuje 5% zmeranej bunkovej populácie (Obr. 5.14.). Len jeden klon vykazuje stabilnú expresiu, v ktorom expresia GFP je nameraná u viac než 80% buniek. Aktivita tohto klonu zrejme súvisí s integračným miestom, kam sa vírus integroval. Môže to byť najskôr chromatin relaxovaná transkripčne aktívna oblasť. Klony prechodnej fázy, teda v rozmedzí 10-80% buniek exprimujúcich GFP vykazujú určitú mieru nestability expresie GFP. Rozmedziu 10%-40% prislúcha šesť klonov. Rozmedziu kde 40%-80% buniek exprimuje GFP prislúcha päť klonov.

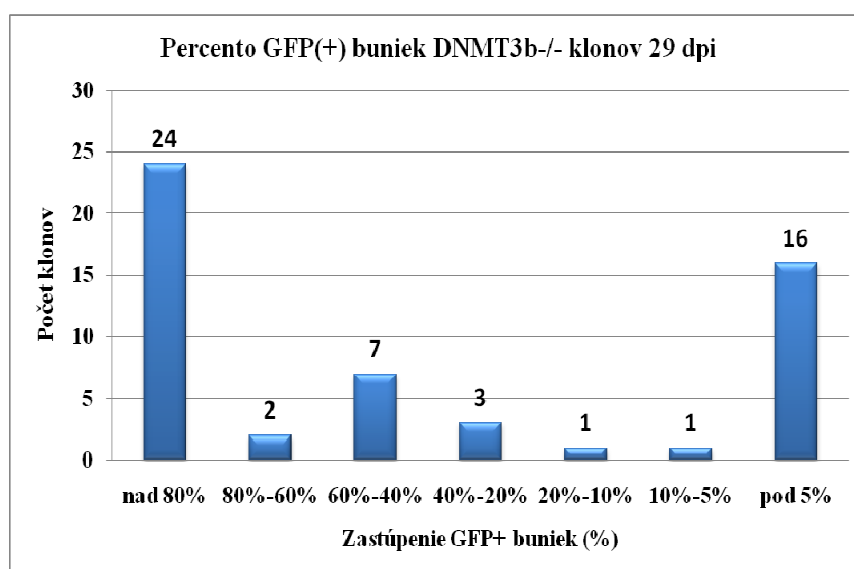


Obr. 5.14. Grafické znázornenie počtu klonov WT línie podľa percentuálneho zastúpenia GFP pozitívnych buniek 29 dpi.

5.2.3.2. Zastúpenie GFP(+) buniek v klonoch línie DNMT3b^{-/-} 29 dpi

Nádorová línia deficientná na DNMT3b vykazuje 24 klonov, ktoré sú aktívne a expresia GFP u nich neklesá pod 80% GFP(+) buniek (Obr. 5.15.). Je tu markantný rozdiel vzhľadom ku WT línii, kde je iba jeden klon kategórie nad 80% GFP(+) buniek. Na základe tohto porovnania môžeme tvrdiť, že *de novo* metyltransferáza DNMT3b je dôležitým faktorom retrovírusového umlčania vo WT klonoch a tento výrazný rozdiel pripisujeme práve jej absencii v DNMT3b^{-/-} klonoch. Na druhej strane 16 klonov vykazuje max 5% GFP pozitívnych buniek, čo súvisí s takmer úplným umlčaním retrovírusového vektoru. Pri týchto klonoch môžeme predpokladať integračné miesto

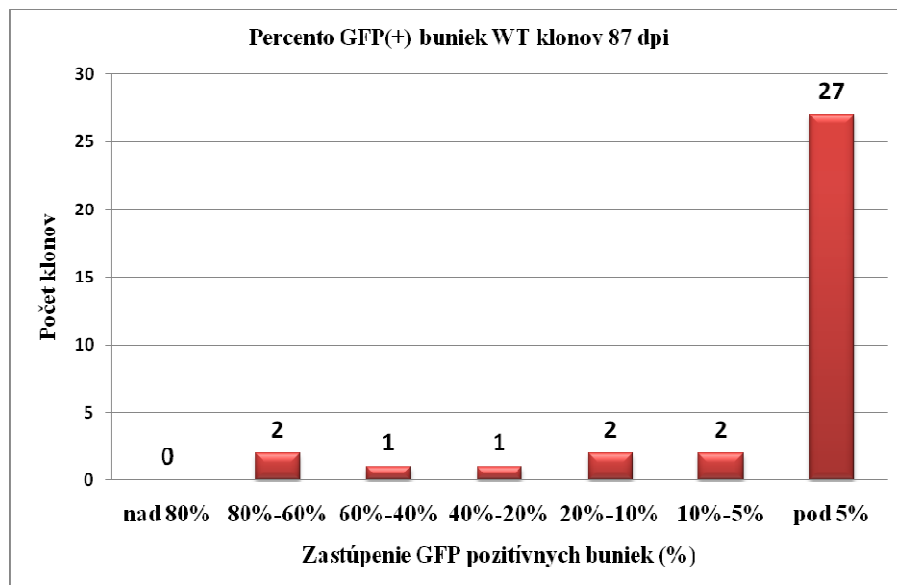
vektoru do heterochromatinizovanej oblasti, čím aktivita vektoru vyhasína. Je možné, že integrovaný vektor i napriek absentujúcej aktivite DNMT3b je modifikovaný metyláciou nejakou inou DNMT z rodiny metyltransferáz, napr. DNMT3a. Alebo vôbec nemusí byť modifikovaný metyláciou a je umlčaný DNMT nezávislou cestou prostredníctvom iných epigenetických mechanizmov (napr. metylácia H3K9, masívna lokálna deacetylácia...) Prechodnú fázu tvorí 14 klonov, z ktorých 9 je pomerne stabilných, u ktorých expresia GFP prevláda u viac než 40% buniek.



Obr. 5.15. Grafické znázornenie počtu klonov DNMT3b^{-/-} línie podľa percentuálneho zastúpenia GFP (+) 29 dpi. Bunky exprimujúce GFP sú rozdelené do kategórií extrémov expresie GFP a prechodovej fáze, ktorá mapuje počet klonov percentuálnymi intervalmi GFP pozitívnych buniek.

5.2.3.3. Zastúpenie GFP(+) buniek v klonoch línie WT 87 dpi

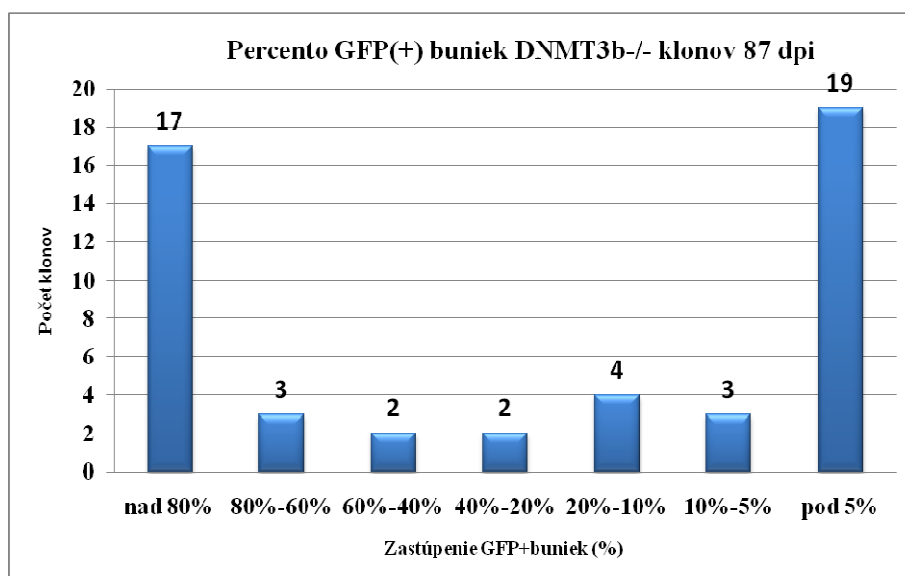
V porovnaní s meraním 29 dpi sa celkový počet klonov, ktorých bunky sú GFP negatívne takmer vôbec nezmenil (Obr. 5.16.). Umlčanie je veľmi stabilné a dlhotrvajúce. Žiadny klon nevykazuje percentuálny počet GFP(+) buniek väčší ako 80%. V ostatných GFP rozmedziach sa vyskytuje po dva klony, ktorých časť buniek si udržuje expresiu GFP v priebehu celého merania. V porovnaní s meraním 29 dpi je tu tendencia provírusy udržať stabilne umlčané v priebehu celého času alebo umlčať tie, ktoré vykazujú ešte nejakú GFP aktivitu. Klony v oblasti prechodnej fáze, sú aktívne najskôr vďaka svojmu výhodnému integračnému miestu. Aktivita integrovaného provírusu môže byť ovplyvnená blízkosťou heterochromatínu, v dôsledku čoho určité percento bunkovej populácie vykazuje GFP expresiu, zatiaľ čo v iných bunkách je provírus umlčaný.



Obr. 5.16. Grafické znázornenie počtu klonov WT línie podľa percentuálneho zastúpenia GFP pozitívnych buniek 87 dpi.

5.2.3.4. Zastúpenie GFP(+) buniek v klonoch línie DNMT3b^{-/-} 87 dpi

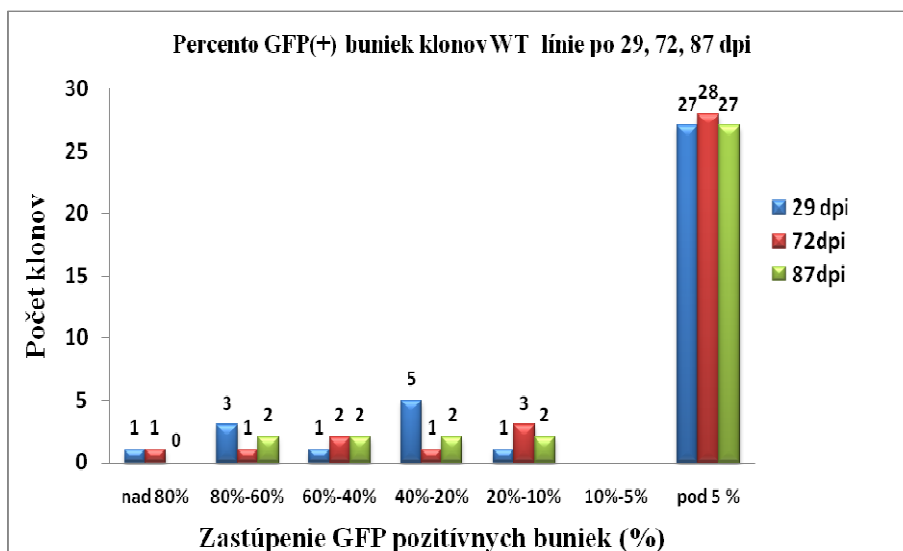
Stav celkového umlčania aktivity provírusov sa takmer vôbec nemení vzhľadom k meraniu 29dpi. Klony, ktorých žiadne bunky nevykazujú GFP aktivitu zostávajú umlčané, pričom ich počet sa zvýšil o tri. Pomaly umlčujúce sa klony, ktoré sú distribuované medzi umlčaným a neumlčaným extrémom sú charakteristické akýmsi kolísaním ich percentuálneho zastúpenia GFP+ buniek v priebehu merania (Obr. 5.17.). U 17 klonov nebolo pozorované žiadne umlčovanie ani 87 dpi.



Obr. 5.17. Grafické znázornenie počtu klonov DNMT3b^{-/-} línie podľa percentuálneho zastúpenia GFP pozitívnych buniek 87 dní po infekcii.

5.2.3.5. Porovnanie percentuálneho zástúpenia GFP(+) buniek klonov WT línie v priebehu meraní 29, 72, 87 dpi

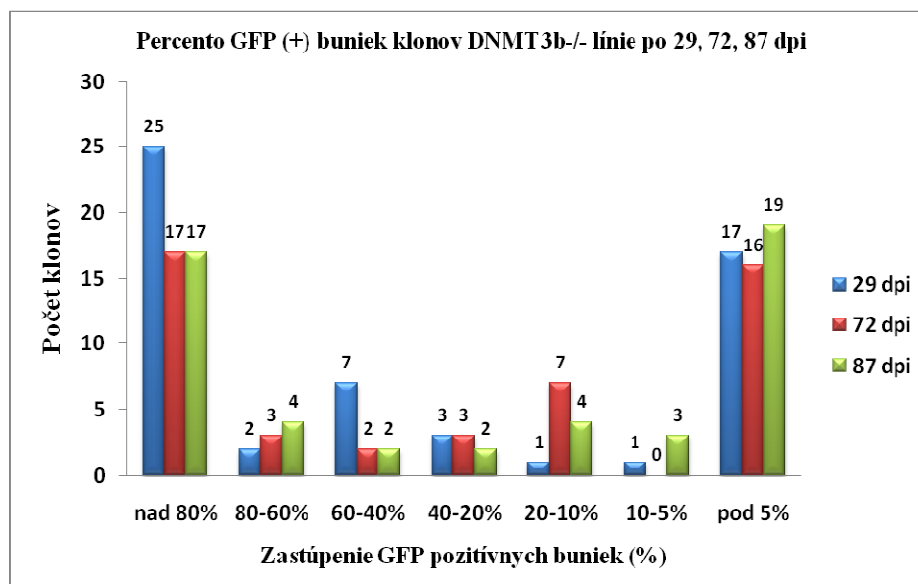
Počas celého merania percentuálneho zastúpenia GFP (+) buniek je najstabilnejší extrém, kde GFP exprimuje max 5% bunkovej populácie klonov. Provírusy sú stabilne a dlhotrvajúco umlčané, ich počet sa v priebehu nemení. Zmeny stavu niektorých klonov nastávajú v prechodnej fáze. Celkovo systém má tendenciu klony a v nich integrované provírusy umlčať. V prípade posledného merania zostávajú aktívne len 4 klony, nad 40% buniek exprimujúcich GFP (Obr. 5.18)



Obr. 5.18. Grafické porovnanie počtu klonov WT línie podľa percentuálneho zastúpenia GFP pozitívnych buniek v čase merania 29, 72, 87 dpi.

5.2.3.6. Porovnanie percentuálneho zastúpenia GFP (+) buniek klonov DNMT3b^{-/-} línie v priebehu meraní 29, 72, 87 dpi

Bunková línia DNMT3b^{-/-} má i napriek absencii DNMT3b len veľmi málo zníženú globálnu metyláciu DNA, ako aj len veľmi mierne zníženú metyltransferázovú aktivitu. Od WT buniek sa DNMT3b^{-/-} výrazne neodlišuje, a má veľmi podobný fenotyp, ako povodná bunková línia. Meranie percentuálneho zastúpenia expresie GFP(+) buniek u WT a DNMT3b^{-/-} klonov sa odlišuje práve na základe prítomnosti DNMT3b. Sledovanie percentuálneho zastúpenia GFP(+) buniek DNMT3b^{-/-} klonov je sprevádzané výskytom vysokého počtu klonov v maximálnom a minimálnom extrémne percentuálnej GFP pozitivite (Obr. 5.19.). Tieto extrémny sú udržiavané počas celej doby merania, pričom počty klonov prechodnej fáze medzi jednotlivými percentuálnymi kategóriami kolíšu.



Obr. 5.19. Grafické porovnanie počtu klonov DNMT3b^{-/-} línie podľa percentuálneho zastúpenia GFP(+) buniek v časoch 29, 72, 87 dpi.

5.2.4. Reaktivácia umlčaných klonov

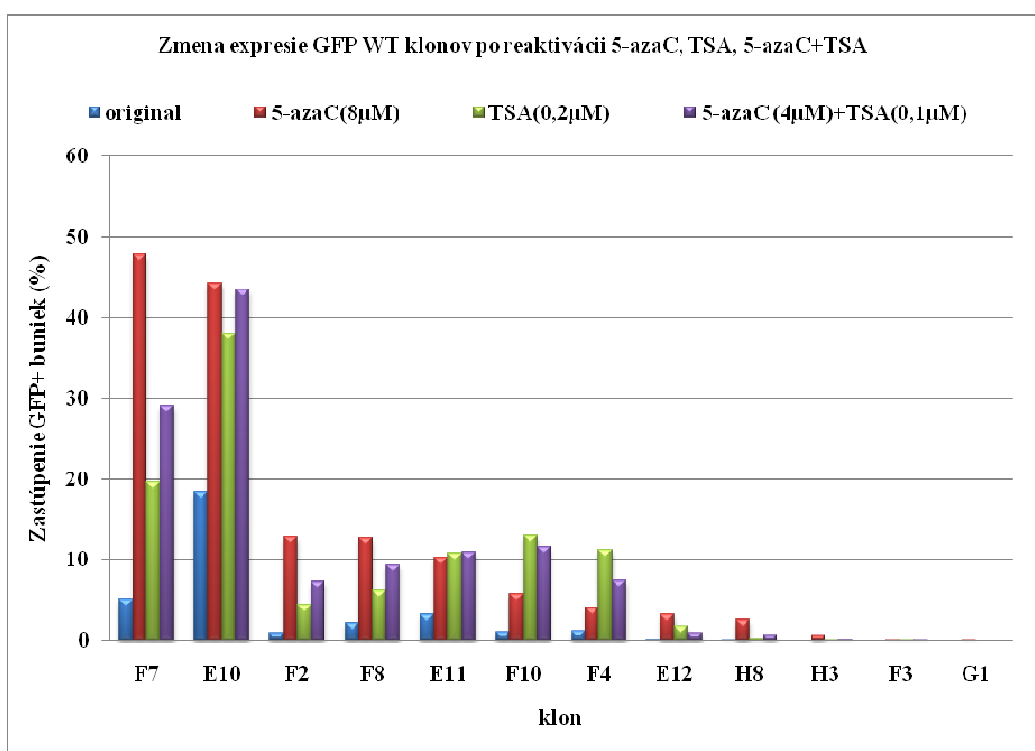
Po troch mesiacoch pozorovania klonov bunkových línií WT a DNMT3b^{-/-} sme získali súbor klonov, u ktorých aktivita integrovaného provírusu bola minimálna alebo žiadna. V týchto klonoch len veľmi malé alebo takmer žiadne percento buniek vykazovalo GFP expresiu. Retrovírusový vektor, ktorý je integrovaný bol v priebehu času umlčaný. Pre zistenie pôvodu retrovírusového umlčania, klony boli ošetrené použitím reaktivačných činidiel 5-azaC a TSA. Pre bunky sú toxické a koncentrácie použité k reaktivácii boli zvolené tak, aby bolo možné pozorovať čo najefektívnejšiu reaktiváciu pri čo najnižšej toxicite. Použité limitné koncentrácie sú 8 μ M pre 5-azaC a 0,2 μ M pre TSA. Klony boli kultivované na 24 jamkových doštičkách s objemom média 1 ml na jamku. Po pridaní reaktivačného činidla boli bunky dva dni od pridaní inhibítora zmerané prietokovým cytometrom pre zistenie percentuálneho zastúpenia GFP(+) buniek. Pri vizuálnej kontrole buniek sme pozorovali výraznú toxicitu podaného činidla, takže veľký počet buniek bolo mŕtvych. Z každej línie bolo pre reaktiváciu použitých 24 klonov, ktoré sú v nasledujúcich grafoch zoradené podľa reaktivačného činidla, prostredníctvom ktorého bol umlčaný klon najefektívnejšie reaktivovaný.

5.2.4.1. Reaktivácia WT klonov za použitia 5-azaC a TSA

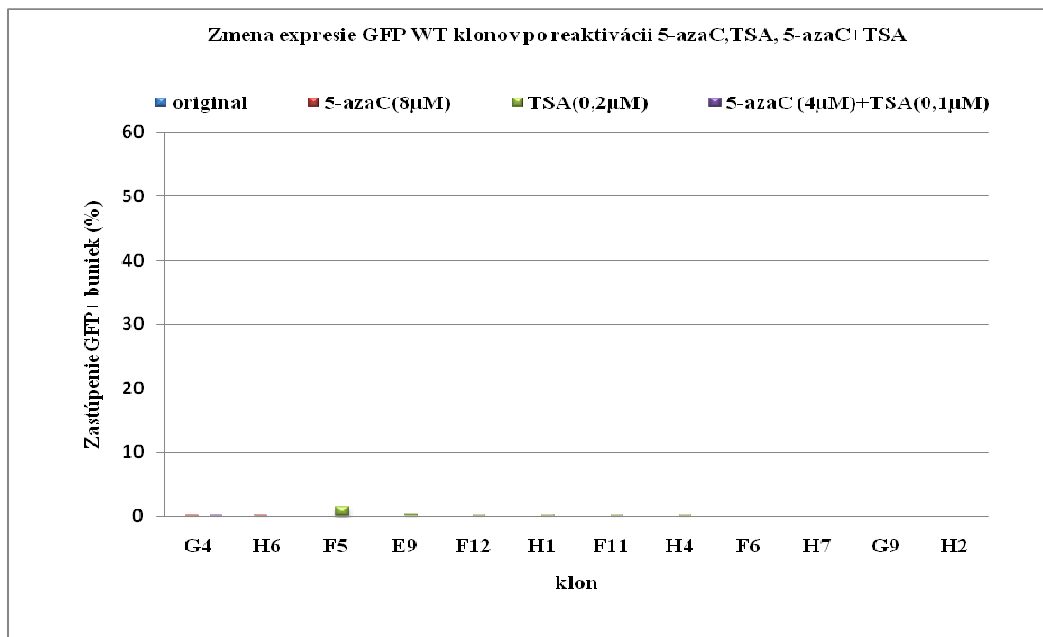
Reaktivačný profil buniek WT klonov je znázornený na Obr. 5.20. a,b. Prvým markantným záverom reaktivácie WT umlčaných klonov je ich výrazná citlivosť k 5-azaC, ktorým je účinne reaktivovaných 9 klonov. Keďže 5-azaC je inhibítorom DNMT aktivity, umlčanie provírusov je najkôr DNMT závislé, resp. metyltransferázová aktivita hrá podstatnú úlohu pri umlčaní aktívneho provírusu. Okrem toho klony, ktoré majú na rozdiel od iných klonov vyššie pôvodné percentuálne zastúpenie GFP+ buniek, sú

reaktivovateľné 5-azaC oveľa účinnejšie, ako napr. F7 a E10. Provírusy týchto aktívnych klonov sú zrejme odolné voči umlčaniu. Taktiež ostatné klony, ktoré si zachovávajú čo i len nižšie percento GFP(+) buniek sú reaktivované pomerne účinne. Klony F7-E12 sú reaktivovateľné TSA, čo potvrdzuje vplyv HDAC aktivity v transkripčnom umlčení. Čiastočne reaktivované klony F10, F4 sú reaktivovateľné skôr TSA. V porovnaní s reaktivačným profilom DNMT3b^{-/-} klonov je tu oveľa menší počet klonov ktoré sú reaktivovateľné vo veľmi obmedzenej miere.

Táto skutočnosť je ostro v kontraste s klonmi, ktoré nevykazujú žiadnu expresiu GFP (napr. F3-H2). V prípade týchto klonov nedochádza k reaktivácii žiadnym reaktivačným činidlom. Provírusy sú úplne umlčané a reaktivácia je zrejme ovplyvnená integračným miestom provírusu ktoré môže byť v blízkosti heterochromatínovej oblasti. Umlčanie má dlhotrvajúci charakter.



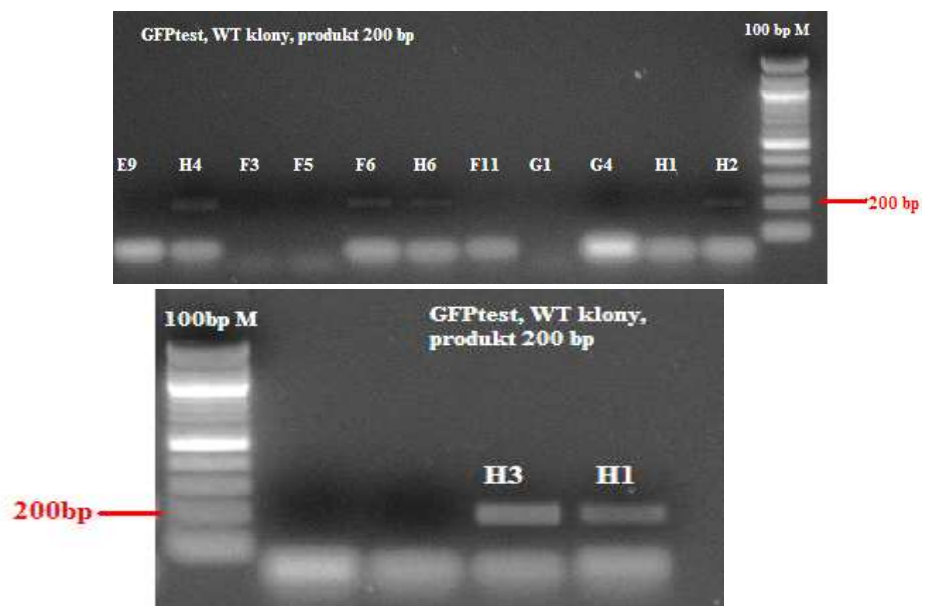
Obr. 5.20. a Grafické znázornenie zmeny percentuálneho zastúpenia GFP+ buniek WT klonov pred a po reaktivácii 5-azaC, TSA a ich kombináciou 5-azaC+TSA.



Obr. 5.20b Grafické znázornenie zmeny percentuálneho zastúpenia GFP+ buniek klonov pred a po reaktivácii 5-azaC, TSA a ich kombináciou 5-azaC+TSA.

5.2.4.1.1. Overenie prítomnosti integrovaného provírusu v nereaktivovaných WT klonoch.

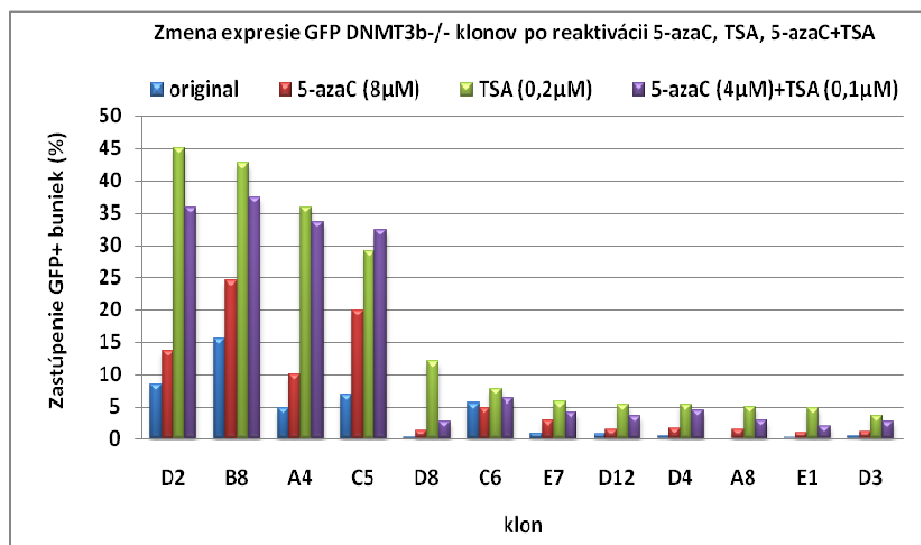
Úplne umlčané klony WT kmeňa, ktoré neboli reaktivovateľné boli testované PCR pre overenie prítomnosti GFP génu, ktorý je súčasťou retrovírusového vektoru a tým aj klonu (Obr. 5.21.). U niektorých klonov však PCR produkt detekovaný nebol. Týmto testom sme overili prítomnosť provírusu v klonoch a znížili riziko práce s provírus negatívnymi klonmi.



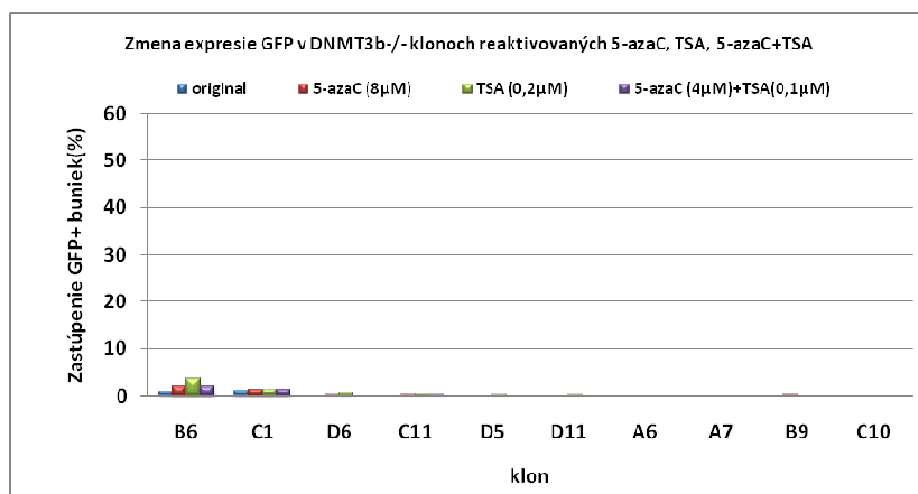
Obr. 5.21. Elektroforetická analýza prítomnosti integrovaného vírusu prostredníctvom PCR s primermi navrhnutými proti GFP.

5.2.4.2. Reaktivácia DNMT3b^{-/-} klonov za použitia 5-azaC a TSA

Klony DNMT3b^{-/-} vykazujú veľmi efektívnu reaktiváciu za prítomnosti TSA oproti 5-azaC (obr 5.22. a,b). V porovnaní s reaktiváciou u WT je tu oveľa viac čiastočne reaktivovateľných klonov, pričom len 5 klonov sa nereaktivovalo takmer vôbec. Klony, ktoré vykazujú určité percento GFP(+) buniek sú reaktivovateľné omnoho účinnejšie ako úplne umlčané. V tomto prípade je taktiež veľmi účinná reaktivácia kombináciou reaktivačných činidiel. Spôsob umlčania nie je pravdepodobne závislý na DNMT aktivite. Zvýšená citlivosť klonov na TSA predznamenáva možný epigeneticky odlišný spôsob umlčania a to práve na úrovni stavu chromatinu a jeho modifikácií závislých na histondeacetylázovej aktivite. Inhibícia histondeacetylázovej aktivity vedie k relaxácii chromatinu a pravdepodobne takto sprístupnený provirus sa stáva transkripčne aktívnejším.



Obr. 5.22 a) Grafické znázornenie zmeny percentuálneho zastúpenia GFP+ buniek klonov DNMT3b^{-/-} pred a po reaktivácii 5-azaC, TSA a ich kombináciou 5-azaC+TSA.



Obr. 5.22 b) Grafické znázornenie zmeny percentuálneho zastúpenia GFP+ buniek klonov DNMT3b^{-/-} pred a po reaktivácii 5-azaC, TSA a ich kombináciou 5-azaC+TSA.

5.2.5. Bisulfitova konverzia

Pre najlepšie vyjadrenie miery metylácie oblasti bohatej na CpG dinukleotidy sa využíva bisulfitova konverzia. Touto metódou boli v našom prípade analyzované LTR oblasti integrovaných provírusov, ktorých miera metylácie môže výrazne ovplyvniť transkripčnú aktivitu integrovaného provírusu. Vpredchádzajúcej kapitole mnoho klonov príslušnej bunkovej línie bolo reaktivovaných inhibítormi, ale aj takých u ktorých k reaktivácii nedošlo vôbec. Bisulfitovou reakciou boli analyzované tri kategórie klonov vzhľadom k ich schopnosti reaktivovať sa (Tab. 5.2.).

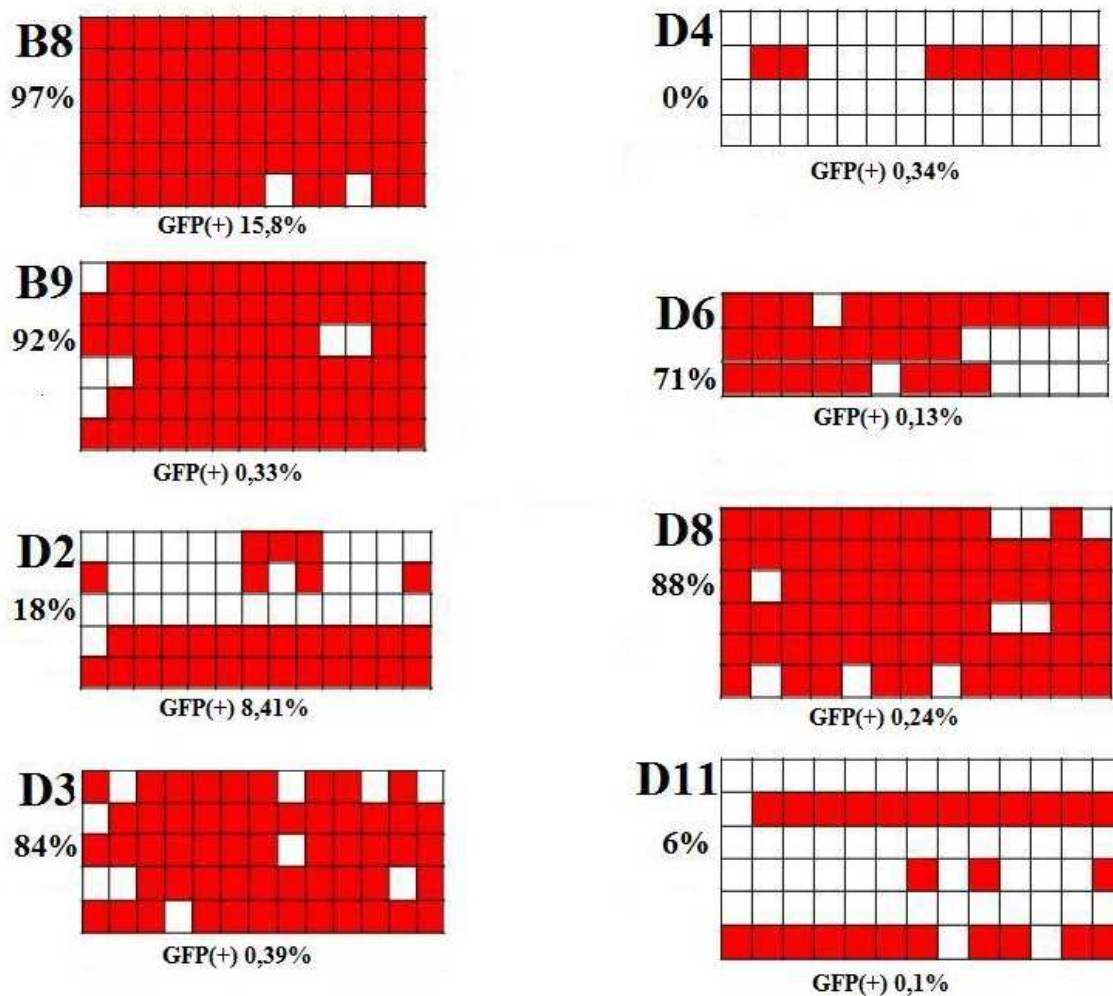
kategória	klony WT	klony DNMT3b ^{-/-}
Umlčaný reaktivovateľný	F2, F4, F10, H8	D4, D3, D8
Umlčaný nereaktivovateľný	H1,H2,H4	A7, B9, C10
Aktívny reaktivovateľný	F7	D2, B8

Tab. 5.2. Kategórie a zoznam analyzovaných klonov bisulfitovou reakciou.

Po sekvenácii bolo od väčšiny klonov získaných 6 sekvencií. U niektorých menej. Tieto sekvencie boli porovnané s pôvodnou nemodifikovanou sekvenciou LTR. Výsledkom porovnania je cca 265 nukleotidov dlhá sekvencia, na ktorej bol definovaný metylačný stav 13 CpG dinukleotidov (Obr. 4.12.).

5.2.5.1. Analýza metylačných profilov LTR sekvencií integrovaných provírusov v klonoch línie DNMT3b^{-/-}

Promotory LTR integrovaných provírusov v klonoch DNMT3b^{-/-} (B8,B9,D3 a D8) vykazujú vysoký počet metylovaných CpG dinukleotidov (Obr. 5.23.). Celková metylácia je väčšia než 80%. Paradoxný je však stav klonu B8, ktorého provírus je plne metylovaný, no klon je stále čiastočne GFP aktívnym. Druhým súborom sú klony D2,D4 a D11 s veľmi nízkou metyláciou. Klon D2 je aktívne exprimujúcim GFP. Zároveň je výrazne reaktivovateľný 5-azaC ako aj TSA, čo môže svedčiť o integrácii v blízkosti relaxovanej formy chromatinu. Klony D4 a D11 vykazujú minimálnu aktivitu, sú málo metylované ale aj málo reaktivovateľné. To nasvedčuje na mechaizmus umlčania klonov, v ktorom DNMT aktivita nehrá rozhodujúcu úlohu.

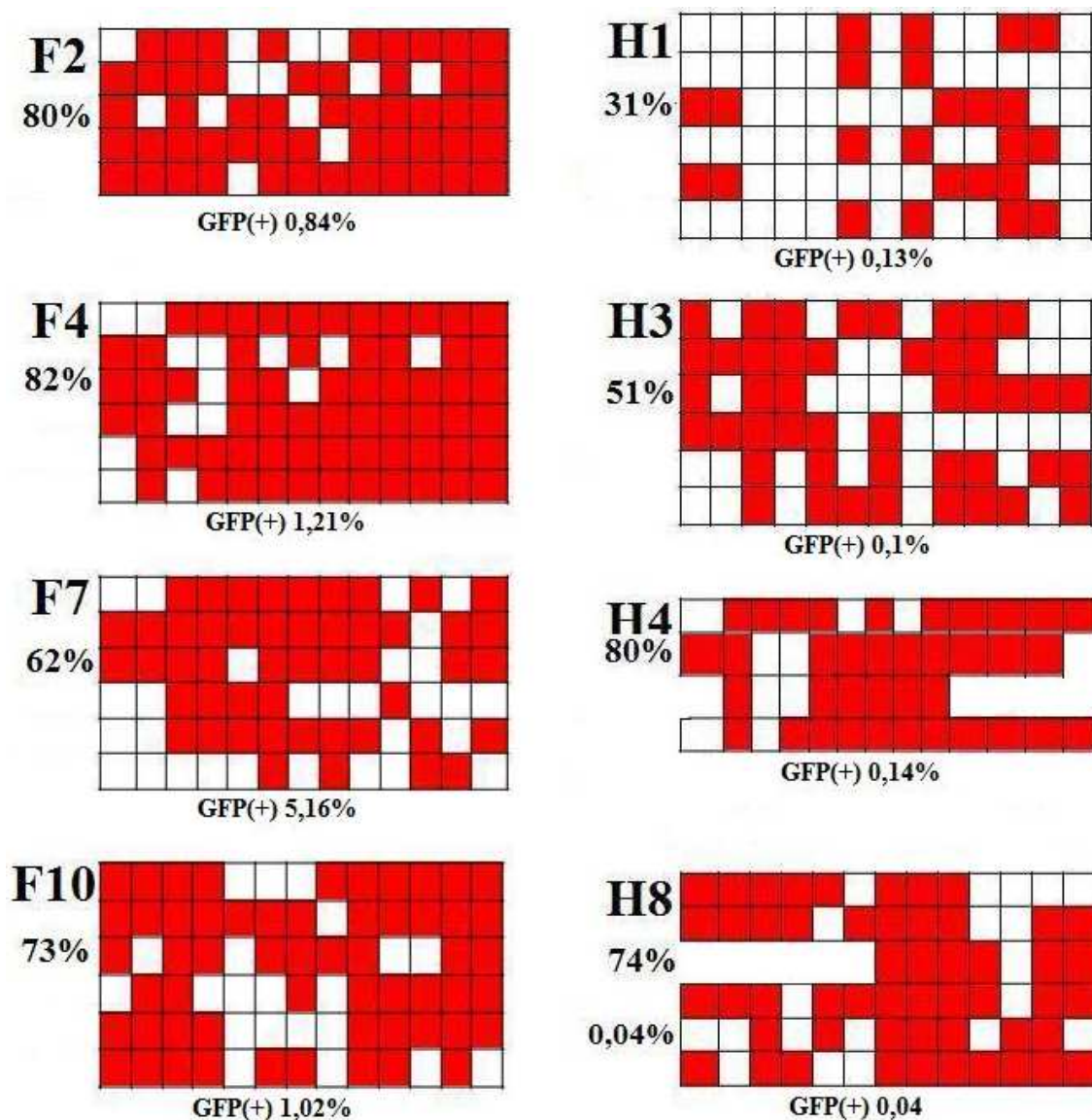


Obr. 5.23. Grafické znázornenie metylovaných CpG dinukleotidov *DNMT3b*^{-/-} klonov, ktoré sú zobrazené červeno. Nemetylované CpG dinukleotidy sú zobrazené bielymi políčkami. Pri každom súbore sekvencií sa nachádza popis klonu pod ním percentuálne vyjadrenie počtu metylovaných CpG dinukleotidov. Posledným údajom pod jednotlivými tabuľkami je percentuálne zastúpenie GFP(+) buniek v jednotlivých klonoch namerané pre bisulfitovou konverziou.

5.2.5.2. Analýza metylačných profilov LTR sekvencií integrovaných provírusov v klonoch línie WT

Klony WT s plnou zostavou metyltransferáz vykazujú rozdielny metylačný motív. Úroveň metylácie jednotlivých sekvencií vrámci jedného klonu je veľmi podobná a vysoká (Obr. 5.24.). Bohato metylované klony F2, F4, H4 sú transkripčne veľmi slabo aktívne. U klonu F2 je výraznejšia citlivosť pre 5-azaC a teda provírus je zrejme umlčaný DNMT závislým mechanizmom. Klon F4 podľa reaktivačného profilu je citlivý opačne zase k TSA, v tomto prípade hrá zrejme dôležitejšiu funkciu v umlčaní deacetylázová aktivita. Klon H4 je takmer nereaktivovateľný, ale bohato metylovaný. Tento fakt je možné vysvetliť integráciou provírusu do oblasti heterochromatínu alebo transkripčne inaktívnej oblasti. Klon H1 je úplne umlčaný a nie je reaktivovateľný žiadnym inhibičným činidlom. Veľmi podobným metylačným profilom sú

charakteristické klony F10 a H8, ktoré sú reaktivovateľné odlišnými činidlami. Klon F10 je reaktivovateľný najmä TSA a H8 zase 5-azaC.



obr 5.24. Úroveň metylácie LTR sekvencií vo WT klonov. Každá tabuľka obsahuje označenie klonu pod ním percentuálne zastúpenie metylovaných CpG v analyzovaných sekvenciách. Posledným údajom je percentuálne zastúpenie GFP(+) buniek zmerane pred realizáciou bisulfitovej konverzie. Každý riadok tabuľky prislúcha jednej sekvencii. Červeno sú značené metylované CpG dinukleotidy bielo nemetylované.

6. DISKUSIA

V experimentálnej časti tejto diplomovej práce som sa sústredil na vplyv *de novo* DNMT v umlčovaní vtáčieho retrovírusového vektoru odvodeného od ASLV, ktorý patrí medzi α -retrovírusy. Vplyv myšacej *de novo* DNMT3a na umlčovanie retrovírusového vektoru bol sledovaný prostredníctvom zavedenia cicavčieho indukčného systému v kuracej bunkovej línii DF-1. Druhá stratégia experimentu nám umožnila sledovať vplyv ľudskej *de novo* DNMT3b na umlčanie vektoru v nádorovej línii HCT116 odvodenej od kolorektálneho karcinómu a to v bunkách divokého kmeňa ako aj DNMT3b deficientných.

6.1. Vplyv myšacej DNMT3a na umlčovanie ASLV vektoru v kuracích bunkách DF-1

Zavedenie indukčného systému v kuracích bunkách nám umožňuje kontrolovanú reguláciu expície myšacej DNMT3a, čím je možné sledovať jej vplyv na umlčanie provírusu. Nakoľko nie je veľmi známa konsekvencia krokov, ktorými je provírus umlčaný, našim hlavným cieľom je pokúsiť sa objasniť, či cicavčia DNMT3a ako holoenzým je schopná rozpoznať sekvenciu provírusu vo vtáčích bunkách DF-1, metylovať ju a následne umlčať. Vo vtáčích bunkách dochádza k umlčovaniu a metylácii ASLV vektoru len s veľmi malou účinnosťou a práve preto sme zavádzali cicavčiu *de novo* DNMT do vtáčích buniek. Model vtáčích buniek a v nich exprimovaná cicavčia DNMT3a nám poskytuje optimálnejšie podmienky k tomuto štúdiu.

Prvým krokom bolo funkčné zavedenie indukčného systému v kuracej bunkovej línii DF-1. Klonovanie myšacej DNMT3a do hlavného plazmidu pNEBR-X1-Hygro bolo jeho prvou podmienkou. Úspešne klonovaný plazmid bol s regulačným plazmidom pNEBR-R1 kotransfekovaný do línii kuracích fibroblastov DF-1. Takto transfekovaná bunková kultúra bola selektovaná na hygromycínovú a neomycínovú rezistenciu po dobu dvoch týždňov. Z vyselektovaných buniek bol limitným riedením získaný dostatočný počet klonov. Prítomnosť plazmidov v klonoch bola overená PCR. Pre overenie fyziologickej aktivity zavedeného indukčného systému bol použitý plazmid pNEBR-HG. Ten je odvodený od pNEBR-X1Hygro hlavného plazmidu indukčného systému. Plazmid pNEBR-HG obsahuje klonovaný GFP reportérový gén v mnohonásobnom klonovacom mieste (MCS) za regulačným elementom 5xRE. Po transfekcii plazmidu do vybraných bunkových kultúr klonov bol pridaný RSL1 ligand. Pridaním ligandu bola detekovaná expícia GFP čím bola overená expícia a prítomnosť regulačných molekúl Rheoreceptoru a Rheoaktivátoru exprimujúcich sa z pNEBR-R1.

O možnej fyziologickej aktivite DNMT3a hovorí test globálnej metylácie. Klon D3aB7 vykazoval najväčší rozdiel v metylácii genómovej DNA pred a po indukcii. K vyjadreniu orientačnej predstavy metylácie genómovej DNA pred a po indukcii bola použitá restrikcia špecifickými izoschzoméznymi endonukleázami *MspI* a *HpaII* (data neuvedené). Pre presnejšie vyjadrenie globálnej metylácie DNA pred a po indukcii sme

pristúpili k analýze globálnej metylácie komerčným kitom. V priebehu niekoľkonásobného opakovania sa vyskytli problémy hlavne vysokých hodnôt OD blanku ako aj veľmi veľký rozptyl hodnôt globálnej metylácie totožných, opakovane analyzovaných vzoriek indukovaných a neindukovaných buniek. V metylačnom protokole boli preto optimalizované niektoré doby protilátkovej inkubácie. Po úprave týchto podmienok, predkladaný výsledok (Obr. 5.8) je najrelevantnejším, ktorý bol touto metódou dosiahnutý. Keďže namerané hodnoty globálnej metylácie sú analyzované len v jednej reakčnej duplikácii, čo nie je štatisticky významný súbor, mieru globálnej metylácie môžeme brať iba za orientačnú analýzu fungovania zavedeného inducibilného systému. Miera bazálnej metylácie, ktorú sme namerali analýzou globálnej metylácie môže súvisieť s dvoma aspektami. Vo vtáčích bunkách sú exprimované vtáče DNMT, ktoré sa podieľajú na metylácii vtáčieho genómu. Hladina globálnej metylácie nameraná v neindukovaných bunkách súvisí najskôr s ich fyziologickou aktivitou. Na základe globálnej analýzy metylácie ale nie je jasné, či daná hodnota celkovej genómovej metylácie neindukovaných buniek nesúvisí s prípadnou bazálnou expresiou myšacej DNMT3a alebo je to prirodzená úroveň metylácie DNA vtáčieho genómu ustanoveného hostiteľskou metyltransferázou. Na túto otázku odpovedala qPCR. Podľa pomerného zastúpenia exprimovaných molekúl mRNA myšacej DNMT3a na základe qPCR je možné tvrdiť, že po indukcii dochádza približne k 22-krát vyššej expresii myšacej DNMT3a ako v bunkách neindukovaných ligandom. Takmer päť cyklový rozdiel v C_t medzi indukovanými a neindukovanými bunkami nie je výrazný a hovorí o bazálnej expresii myšacej DNMT3a v neindukovaných bunkách. Je možné, že hlavný plazmid pNEBR-X1H- DNMT3a sa integroval pod nejaký endogénny promotor alebo enhancer, čo vedie k expresii myšacej DNMT3a i bez pridania ligandu. Tým, že dochádza k bazálnej expresii myšacej DNMT3a i v neindukovaných bunkách, robí tento systém nekompatibilným k sledovaniu vplyvu myšacej DNMT3a v umlčovaní provírusu. Toto zistenie viedlo k strate dostatočne negatívnej kontroly k indukovaným bunkám, kde indukciou je možné regulovať expresiu DNMT3a a tým sledovať jej vplyv na umlčovanie provírusu. V štúdiu vplyvu exprimovanej myšacej DNMT3a v umlčovaní integrovaného provírusu nie je možné jasne povedať, či za prípadné umlčanie provírusu je alebo nie je zodpovedná, keďže sa exprimuje v oboch prípadoch s vysokým stupňom. Záverečným krokom k zisteniu vplyvu myšacej DNMT3a na umlčovanie provírusu bol zavedený inducibilný systém využitý k infekcii a následnému pozorovaniu zmeny percentuálneho zastúpenia GFP(+) buniek v priebehu indukcie DNMT3a. Bunky klonu D3aB7 sme infikovali replikačne defektným vírusom AG3. Počas doby 25 dní bol pozorovaný vplyv indukcie na umlčovanie provírusu. Na základe merania prietokovou cytometriou sme zistili že k žiadnemu umlčovaniu nedochádzalo a percento GFP(+) buniek sa v priebehu indukcie u klonov vôbec nemenilo. Len u dvoch klonov bol pozorovaný náznak umlčania, ale v žiadnom prípade sa nejedná o umlčanie závislé na DNMT3a aktivite. Možným vysvetlením je vplyv stavu chromatinu v blízkosti integrovaného provírusu. Konečným záverom sme u 99% analyzovaných klonov nepozorovali pokles percentuálneho zastúpenia GFP (+) buniek s indukovanou expresiou myšacej DNMT3a, čo jasne naznačuje že myšacia DNMT3a nerozpoznáva vo vtáčích bunkách integrovaný ASLV provírus a neumlčuje ho.

Keďže bolo dokázané, že v bunkách klonu D3aB7 sa myšacia DNMT3a exprimuje je otázne, prečo nedochádza k umlčovaniu integrovaných provírusov. Jednou z veľmi pravdepodobných príčin je odlišnosť pôvodu enzýmu a hostiteľa. Myšacia DNMT3a je odlišného pôvodu a nie je kompatibilná s vtáčim umlčovacím mechanizmom vďaka čomu k umlčovaniu vôbec nedochádza. Obecne je možné povedať, že na umlčovaní sa podieľa obrovské množstvo faktorov. No niektoré z týchto faktorov môžeme považovať za iniciálne a esenciálne pre rozpoznanie provírusu a nasmerovanie umlčovacej mašinerie, ktorej súčasťou je i DNMT, k vektorovej DNA. Tymi faktormi môžu byť napr. TRIM proteíny, Daxx a iné. Je vysoko pravdepodobné že i v prípade myšacej DNMT3a exprimovanej v kuracích bunkách chýba vhodný faktor, ktorý rozpozna vírusovú DNA a interakciou s DNMT dôjde k jej nasmerovaniu do blízkosti provírusu čím môže dôjsť k jeho umlčaniu. Okrem toho efektívnosť aktivity DNMT výrazne ovplyvňuje hlavný kofaktor *de novo* metyltransferáz DNMT3L (Gowher et al. 2005). Z tohto dôvodu infikované klony boli transfekované plazmidom ktorý obsahoval *de novo* myšací kofaktor DNMT3L. Zníženie percenta GFP(+) buniek sme však vôbec nepozorovali. Bunky po transfekcii vykazovali rovnaký GFP profil ako bez prítomnosti kofaktora a k umlčaniu provírusu nedošlo. Vírusový vektor je teda v DF-1 bunkách exprimovaný veľmi stabilne. Je možné, že kuracie bunky sa proti nadmernej expresii DNMT3a bránia. V cicavčích bunkách je identifikovaný Sall3 proteín, ktorý znižuje aktivitu DNMT3a v cicavčích bunkách a je jedným z tumorsupresorových génov. Je možné že existuje jeho vtáčí analóg (Shikauchi et al., 2009) Inducibilný systém sa ukázal ako nedostatočný pre štúdium

6.2. Vplyv ľudskej DNMT3b na umlčovanie vektoru odvodeného od ASLV

Umlčovanie vektoru odvodeného od ASLV v hostiteľovi, ktorý je vírusu nepríbuzný dochádza k oveľa intenzívnejšiemu vplyvu metylácie na umlčovanie (Svoboda et al., 2000) V našom prípade sme ku štúdiu použili líniu HCT116, ktorá je odvodená od kolorektálneho karcinómu. Pracovali sme s dvomi príbuznými líniami, z ktorých jedna bola divoký kmeň a druhá bola deficientná v DNMT3b aktivite. Na fyziologickej úrovni sa línie medzi sebou tamer vôbec nelíšia. Línia DNMT3b^{-/-} je charakteristická svojím stabilným metylačným profilom, ktorý je takmer identický s líniou divokého kmeňa (Rhee et al., 2002). Použité línie sa od seba odlišujú práve prítomnosťou hlavnej *de novo* DNMT3b. Použitie tohto modelu pri sledovaní umlčovania retrovírusového vektoru sme mali možnosť exaktného štúdia vplyvu DNMT3b na umlčanie vtáčieho retrovírusového vektoru AG3, ktorým boli bunky oboch línii infikované. Štúdium bolo realizované na niekoľkých úrovniach.

Jednak to bolo sledovanie časovej zmeny percentuálneho zastúpenia GFP(+) buniek počas doby troch mesiacov. Prvé ako aj posledné meranie, ktoré bolo spracované a je súčasťou experimentálnej časti naznačuje výrazný vplyv DNMT3b vo WT bunkách na umlčovanie retrovírusového vektoru. Vyplýva to z porovnania počtu klonov WT a DNMT3b^{-/-} línie, ktoré vykazovali vysoké percento GFP(+) buniek i po dlhodobej kultivácii. U WT buniek je to úplné minimum, v 29dpi bol prítomný z 38 klonov len jeden klon, ktorého nad 80% buniek exprimovalo GFP, pričom 27 klonov vykazovalo žiadne alebo len veľmi nízke percento GFP(+) buniek. Na druhej strane počet klonov

línie DNMT3b^{-/-}, ktoré vykazovali nad 80% GFP(+) buniek bolo z celkového počtu 55 klonov, 27. Klonov s nízkym percentom GFP(+) buniek bolo 16. Z celkového vyhodnotenia jednotlivých meraní počas doby troch mesiacov je možné jasne poukázať na veľmi stabilný počet klonov oboch línii, ktorých percentuálne zastúpenie GFP(+) buniek sa nemení v extrémoch viac než 80% a menej než 5%. Percentuálna kategorizácia GFP(+) buniek v medzifáze vykazuje kolísanie počtu klonov medzi jednotlivými meraniami. Nezrovnalosti s pôvodným počtom získaných klonov a počtom klonov v niektorých meraniach súvisí so stratou niektorých klonov nedostatočne sterilnou prácou. Na základe ustanovených extrémov počtu klonov môžeme povedať, že systém WT bunkovej línie má silnú tendenciu integrovaný provírus umlčať. Pri plnej zostave metyltransferáz vo WT bunkách bol toto očakávaný priebeh. Medzi líniami je možné pozorovať markantný rozdiel v počte klonov s viac než 80% GFP(+) buniek, čo jednoznačne naznačuje na mechanizmu umlčania, kde DNMT3b hrá nezastupiteľnú úlohu.

Umlčané klony WT línie boli následne analyzované reaktivačnou procedúrou a detailnou analýzou metylácie DNA bisulfitovou konverziou a sekvenáciou. U týchto umlčaných klonov sme sa museli najskôr presvedčiť že sa skutočne jedná o bunky, ktorých integrovaný provírus je úplne umlčaný v celej populácii a že sa nejedná o negatívnu bunku klonu bez provírusu. Sortovací prístroj s určitou frekvenciou chybuje a rozpozná negatívnu bunku ako pozitívnu, obzvlášť ak pozitívnych buniek je pri sortovaní pomenej a prevládajú negatívne. Preto sme potrebovali overiť prítomnosť provírusu. Pre potvrdenie jeho integrácie v umlčaných klonoch WT línie, v ktorých percentuálne zastúpenie GFP(+) buniek sa blížilo k nule, boli analyzované PCR proti provírusovému génu GFP. Tým bolo zistené, či vôbec to čo považujeme za klon s umlčaným provírusom nie je negatívne zaradená bunka pri pôvodnom sortovaní. U šiestich z dvanástich klonov bol detekovaný GFP odpovedajúci PCR produkt. U zvyšných klonov nebol detekovaný, čo by predznamenovalo prácu s klonmi bez provírusu. Je možné že PCR reakcia neprebehla u zvyšných klonov dostatočne účinne. Pravdepodobnosť neprítomnosti provírusu v umlčaných klonoch znižuje sekvenácia konvertovanej DNA provírusu, ktorou boli detekované provírusy u iných klonov s takmer nulovou populáciou GFP(+) buniek. Prítomnosť provírusu v bunkách klonov s nízkym percentom GFP pozitivity tiež dokazuje reaktívacia inhibičnými činidlami, kde u niektorých došlo aspoň k minimálnej reaktívácii. Príkladom sú úplne umlčané klony H3, a H8. Takže riziko, že pracujeme s negatívnymi bunkami bez provírusu je veľmi nízke, keďže sme u väčšiny klonov provírus detekovali.

Pre objasnenie pôvodu mechanizmu umlčania retrovírusových vektorov klony s minimálnym alebo veľmi miernym percentuálnym zastúpením GFP(+) buniek boli reaktivované inhibítormi DNMT aktivity 5-azaC a HDAC aktivity TSA. Tieto reaktivačné činidlá sa používajú pre aktiváciu umlčaných provírusov ako aj aberantne metylovaných génov. Napr. v bunkovej línii HCT116 bolo detekovaných mnoho metylovaných tumorsupresorových génov, ktoré sa reaktivovali reaktivačnými činidlami. Okrem toho v HCT116 línii sa študovali mnohé zmeny na úrovni ďalších epigenetických modifikácií ako je metylácia DNA a histondeacetylácia. Pri aplikovaní TSA dochádza k acetylácii H3K9, metylácii H3K4; metylácia H3K9 sa však nemení.

Pri použití 5-azaC došlo k strate inhibičnej modifikácie metylácie H3K9 (Meng et al., 2007) Možnosť reaktívácie provírusov nami vybraných klonov tejto línie bola vyhodnocovaná prietokovou cytometriou 2 dni po aplikovaní reaktivačného činidla. Časová rezerva 2 dní od pridania inhobítora po vyhodnotenie je potrebná pre priebeh bunkovým cyklom, aby sa prejavil inhibičný účinok činidla. Obidva inhibítory sú pre bunky toxické. Pre reaktíváciu boli zvolené koncentrácie, pri ktorých populácia buniek nebola masívne zredukovaná pri čo najúčinatejšej reaktívácii. Ale aj pri týchto limitných koncentráciách bola zistená vysoká citlivosť HCT116 k inhibítoram, ktorá sa prejavila vysokou bunkovou úmrtnosťou. Použitím 5-azaC sme sledovali vplyv metylácie DNA na umlčanie provírusov. 5-azaC inhibuje DNMT aktivitu čím dochádza k demetylácii DNA provírusu a obnove jeho transkripčnej aktivity. Vybrané klony WT línie boli výrazne reaktivované 5-azaC, čo predznamenáva dôležité postavenie metylácie DNA v umlčovaní provírusu. Provírusy ktoré boli takto reaktivovateľné sú teda najskôr umlčané DNMT závislým spôsobom.

Zároveň veľa klonov WT línie nebolo reaktivovaných čo naznačuje na ich dlhotrvajúce umlčanie. V prípade dlhotrvajúceho umlčania provírusu sa môžu uplatňovať i mechanizmy nezávislé na metylácii DNA. V prípade, žeby dlhotrvajúce umlčanie provírusu bolo závislé len na metylácii DNA, došlo by k reaktívácii provírusu za použitia 5-azaC. Transkripčnú aktivitu integrovaného provírusu veľmi výrazným spôsobom ovplyvňuje stav chromatínu v mieste integrácie (Barr et al., 2005). Ak je provírus integrovaný v transkripčne aktívnej oblasti relaxovaného euchromatínu, nedochádza k jeho umlčaniu, ba priam je proti nemu chránený. V prípade klonov, kde aktivita provírusu ako aj jeho schopnosť reaktívácie je minimálna môže svedčiť o integračom mieste v oblasti stabilného heterochromatínu s vysokou hustotou represívnych epigenetických modifikácií. Represný charakter týchto oblastí je permanentne udržiavaný priamou interakciou *de novo* DNMT s HP1 proteínom. S komplexom DNMT a HP1 sú kolokalizované ďalšie aktivity ako HDAC a histon H3K9 metyltransferázová aktivita. S N-terminálnou doménou *de novo* DNMT asociuje hlavný represný proteín MeCP2, ktorý priamo rozpoznáva metylovaný cytozín. MBD proteíny rozpoznávajúce m⁵C a svojimi transkripčnými represívnymi doménami prispievajú k umlčaniu ako aj rozšíreniu metylačnej vlny vedúcej k tvorbe heterochromatínovej štruktúry. Zároveň MBD proteíny pôsobia antagonisticky voči vplyvu aktívnych remodelačných komplexov. Oblasti heterochromatínu sú teda hypermetylované a bohato modifikované. Hypermetylačnou vlnou môže byť zasiahnutý integrovaný provírus v jej blízkosti a umlčaný natoľko, že nemusí dochádza ani k jeho k reaktívácii silnými inhibítormi. V tomto prípade hovoríme o pozitívnom vplyve heterochromatínu (Bachman et al., 2001).

Ako je z výsledku reaktívácie viditeľné DNMT závislý spôsob umlčania je v úzkej kooperácii s HDAC aktivitou, čo bolo dokázané taktiež efektívnou reaktíváciou umlčaných provírusov za použitia TSA. No primárnym reaktivačným činidlom je 5-azaC, čo nasvedčuje dôležité postavenie metylácie DNA v procese transkripčného umlčania. Transkripčné umlčovanie prebieha teda na úrovni chromatínu a jeho represných modifikácií, ale metylácia DNA tu zohráva obzvlášť rozhodujúcu úlohu. Faktory metylačnej mašinerie veľmi intenzívne s DNMT aktivitou kooperujú a je

prítomná v umlčovacom mechanizme. Dá sa povedať že u WT buniek je DNMT závislá cesta umlčania provírusu majoritným mechanizmom umlčania. Okrem nami získaných výsledkov by však bolo zaujímavé porovnanie reaktivácie za použitia kombinácie inhibítorov s postupnosťou použitia 5-azaC a za ním po 24 hodinách TSA. V prípade použitia konsekvencie podania inhibítorov v tomto poradí došlo až k 10- násobnému zvýšeniu účinku TSA na umlčaný provírus a obnove jeho aktivity. Dá sa teda tvrdiť, že DNA metylácia má oveľa represívnejšie dôsledky ako samotná deacetylácia histónov, ktorá je ľahšie zvrátiteľnou epigenetickou modifikáciou. HDAC aktivita sa najskôr uplatňuje v prvých fázach umlčania provírusu, DNA metylácia je definitívnym represívnym dôsledkom už prítomných represívnych epigenetických modifikácií (Lorinz et al., 2000). V našom prípade k takémuto kroku sme nepristúpili, pretože majoritná časť buniek po podaní inhibítora vykazovala silný toxický efekt inhibítora a odumierala. Po pridaní ďalšieho inhibítora by došlo k totálnej eliminácii bunkovej kultúry. Taktiež by bolo zaujímavým sledovať možnosť obnovenia expresie umlčaného provírusu v priebehu času priebežnou reaktiváciou inhibítormi. Frakcia bunkovej populácie klonu by bola reaktivovaná v priebehu merania, čím by sme mohli presnejšie identifikovať vplyv utvárania progresívnejšej metylácie a umlčania provírusu v čase. Pravdepodobne by sa účinok reaktivačných činidiel znižoval s časom ustanovovania metylácie, čo by znamenalo intenzívnejšiu provírusovú represiu metyláciou a ďalšími modifikáciami 5' LTR. Reaktivácia v skorých fázach po infekcii by pravdepodobne bola účinná najmä za použitia TSA. S časom by zrejme vplyv TSA na reaktiváciu klesal a zvyšovala by sa účinnosť 5-azaC inhibítora (Katz et al., 2007). Zároveň je otáznе, ktoré miesta provírusu sú metylované preferenčne. Je známe že provírusy obsahujú tzv *cis* represor väzbové oblasti a že oblasť PBS a iné sú citlivými pre zahájenie represívneho stavu metyláciou. Metylačná vlna sa následne pravdepodobne rozšíri do CpG bohatej oblasti LTR. Metylaáciou DNA je však postihnutý celý provírus ako aj gény, ktoré nesie. Výsledok sekvenácie po bisulfitovej konverzii jasne ukazuje bohatú metyláciu vo všetkých 8 klonoch WT línie, ktoré sme analyzovali. Klony vykazujú veľmi nízke percento GFP(+) buniek pred bisulfitovou analýzou. Sú bohato metylované čo jasne naznačuje na mechanizmus umlčania spojený s metyláciou DNA. Z bohato metylovaných má najnižšiu hodnotu metylácie provírus klonu H3 (51%), najvyššiu zase provírus klonu F4 (82%). U WT klonov nebol bisulfitovou reakciou a následnou sekvenáciou detekovaný hypometylovaný provírus.

Časové sledovanie umlčovania ASLV vektoru v DNMT3b deficientnej línii.

Pri sledovaní časového priebehu provírusy klonov DNMT3b^{-/-} línie už pri prvom meraní vykazovali veľmi jasné extrémne vysokého počtu klonov s nízkym a vysokým percentuálnym zastúpením GFP(+) buniek. V porovnaní s Wt klonmi je až 24 klonov, ktorých minimálne 80% bunkovej populácie exprimuje GFP. Na druhej strane klonov s minimálnym percentom GFP(+) buniek je 16. Tieto dva pozorované extrémne sa udržali až do konca merania. Počet klonov s vysokým percentom GFP(+) buniek pretrváva, čo v porovnaní s WT veľmi jasne naznačuje na význam absencie DNMT3b. Klony, ktorých provírus bol účinne umlčaný boli predmetom reaktivácie ako v prípade WT línie. Výrazným rozdielom v reaktivačnom profile medzi WT líniou a DNMT3b^{-/-} je účinná reaktivácia umlčaných klonov TSA inhibítormi. Okrem toho je reaktivovaných

oveľa viac klonov s umlčaným provírusom, čo predznamenáva menej účinný stupeň umlčania. Umlčanie najskôr prebieha na úrovni remodelácie chromatinu vďaka histondeacetylázovej aktivite. Zdá sa že práve HDAC aktivita je podstatná veľmi krátko po infekcii a asociuje a s DNA provírusu, čím dochádza k skorej represii vírusovej transkripcie na úrovni chromatinu. Na tomto skorom umlčaní provírusu sa môžu podieľať hostiteľské faktory ako Daxx, TRIM proteín a iné. Na druhej strane, v klonoch s minimálnym percentom GFP(+) buniek integrované provírusy môžu byť umlčané na základe prítomnosti DNMT1 a DNMT3a. Metyltransferázy medzi sebou vzájomne kooperujú, čo môže viesť k provírusovej metylácii a umlčaniu. Môže tomu naznačovať menej účinná reaktivácia klonov za prítomnosti 5-azaC. Ako bolo dokázané po pôsobení TSA umlčanie provírusu bolo znovu obnovené u skupiny umlčaných klonov a GFP expresia bola detekovaná v ďalších bunkových cykloch. Strata GFP expresie bola pozorovaná asi po týždni. To znamená, že provírus je síce reaktivovaný, ale integračné miesto provírusu je značené represnými epigenetickými modifikáciami, ktoré vedú k jeho opätovnému umlčaniu (Katz et al., 2007).

Klony ktoré sme analyzovali bisulfitovou konverziou vykazujú veľmi nízke percento GFP(+) buniek. Po sekvenácii sme zistili, že nemajú tak jednoznačný metylačný profil ako u analyzovaných klonoch WT línie. Na základe získania metylačných profilov môžeme umlčané klony rozdeliť na dve kategórie. Súbor klonov D2, D4 a D11, je charakteristický minimálnou expresiou ako aj metyláciou LTR provírusov. Klon D2 má od ostatných trochu odlišný metylačný motív, keďže dve z piatich analyzovaných sekvencií sú plne metylované. Klon vykazuje nízku, ale predsa nejakú hladinu GFP pozitivity a zrejme pri bisulfitovej konverzii bola analyzovaná časť GFP(+) buniek, kde provírus bol nemetylovaný. Nič to nemení na situácii, že všetky tri klony sú umlčané a hypometylované. Metylačný mechanizmus DNMT3b^{-/-} je narušený a nastupuje iný mechanizmus, ktorý je nezávislý na metylácii DNA. Hlavne sa môže jednať o umlčovací mechanizmus súvisiaci s chromatinovým stavom a jeho modifikáciami, ako napr. deacetylácia a metylácia histónov ako aj s inými represnými modifikáciami. Tento spôsob umlčania, ktorý je primárne nezávislý na *de novo* aktivite DNMT nie je nijak neobvyklý, ale je veľmi častý a primárne iniciačný. Napr. k umlčaniu MoMLV dochádza už po dvoch dňoch od infekcie, pričom metylácia DNA sa objavuje 8-16 dní po infekcii (Pannel et al., 2000). Chromatin závislý spôsob umlčania je rozhodujúcim v ustanovení latentného stavu HIV-1 provírusu. HIV-1 provírus je hypometylovaný ale transkripčne umlčaný. DNA metylácia sa objavuje ako neskorší dôsledok ustanovenia latencie a nie je rozhodujúca pre počiatkové provírusové umlčanie. Latencia je kontrolovaná transkripčnou interferenciou ako aj chromatin závislým spôsobom umlčania, bez výraznej LTR metylácie čo vedie k pomerne ľahkej a účinnej reaktivácii umlčaného provírusu (Blazkova et al., 2009). Na druhej strane však z bisulfitovej konverzie tiež vyplýva, že metylačný mechanizmus v DNMT3b deficientnej línii je zachovaný a uplatňuje sa v umlčovaní. Len pre pripomenutie WT línia a DNMT3b deficientná línia sa z hľadiska globálnej metylácie genómu takmer vôbec nelíšia. V deficientnej línii je však výrazne narušený *de novo* metylačný mechanizmus na základe neprítomnosti DNMT3b. DNMT3b aktivita v deficientných klonoch môže byť účinne nahradená *de novo* aktivitou DNMT3a a slabou *de novo* aktivitou DNMT1 (Fatemi et al. 2002). Jedným z modelov DNMT1 a DNMT3a

kooperácie spočíva v modifikácii niekoľkých CpG dinukleotidov DNMT3a a následne DNMT1 aktivitou dôjde k rozšíreniu metylácie do väčšej oblasti. Vďaka tejto dynamickosti metylačnej mašínérie dôjde k zahrnutiu provírusovej sekvecie a k jej metylácii v mieste integrácie. Dá sa povedať, že mechanizmus chromatinového umlčania nezávislý na metylácii DNA je nepochybne účinný, ale prípad metylovaných klonov B8, B9, D3, D8 a D6 deficientnej línie potvrdzuje prítomnosť jednej alebo oboch z už uvedených DNMT aktivít pri absencii hlavnej *de novo* DNMT3b. Táto aktivita DNMT je zrejme len akýmsi prídavným mechanizmom umlčania (Pannel et al., 2000).

Z počiatočného stavu 55 klonov DNMT3b^{-/-} línie bolo umlčaných 16 klonov. Vďaka narušeniu *de novo* metylácie absenciou DNMT3b je oveľa menej efektívny *de novo* DNMT závislý mechanizmus umlčania. Práve u týchto klonov bude pravdepodobne prevládať DNMT nezávislý mechanizmus umlčovania.

U WT línie bol zrejme len malý počet klonov umlčaných DNMT nezávislou cestou, čo aj naznačuje metylačný profil ôsmich analyzovaných WT klonov. Z ôsmich nie je ani jeden nemetylovaný. To naznačuje že umlčanie klonov nezávislé na *de novo* metylácii u nich bude pravdepodobne minoritným mechanizmom umlčania a DNMT3b sa bude v umlčovaní uplatňovať veľmi často a bude veľmi dôležitým faktorom umlčovacej mašínérie.

Bunkové línie WT a DNMT3b^{-/-} odvodené od kolorektálneho karcinómu sa od seba odlišujú síce veľmi mierne a z fyziologického hľadiska sú takmer identické, ale z hľadiska mechanizmu umlčovania sa zásadne odlišujú v prítomnosti *de novo* DNMT3b. Obe línie boli kultivované pri rovnakých podmienkach a infikované rovnakým vírusom, ktorý má takmer náhodný vzorec integrácie. Keby DNMT3b nehrala vo WT bunkách rozhodujúcu úlohu v umlčaní provírusu, umlčaný profil WT buniek ako aj počet klonov prislúchajúci k jednotlivým intervalom percentuálneho zastúpenia GFP(+) buniek klonov by vykazoval veľmi podobné až totožné výsledky s deficientnou líniou.

7. ZÁVER

Cieľom predkladanej diplomovej práce bolo štúdium vplyvu *de novo* DNMT na umlčovanie retrovírusového vektoru odvodeného od ASLV. Vplyv myšacej DNMT3a na umlčovanie bol pozorovaný za využitia cicavčieho inducibilného systému, ktorým bolo možné regulovať expresiu DNMT3a v bunkách kuracej línie DF-1.

Vplyv ľudskej *de novo* DNMT3b na umlčovanie vektoru bol pozorovaný vo WT a DNMT3b deficientnej nádorovej línii HCT116 odvodenej od kolorektálneho karcinómu.

V tejto práci boli získané nasledujúce výsledky:

1. Naše výsledky naznačujú že myšacia DNMT3a exprimovaná v kuracích bunkách nerozpoznáva retrovírusový vektor odvodený od ASLV pri jej zvýšenej expresii vďaka pravdepodobnej absencii špecifického faktoru, ktorý DNMT nasmeruje k vírusovej DNA.
2. Pri zvýšenej expresii myšacej DNMT3a v kuracích bunkách nedochádza k umlčovaniu transkripčnej aktivity vtáčieho retrovírusového vektoru integrovaného v DF-1 bunkách.
3. Ľudská DNMT3b zásadným spôsobom ovplyvňuje umlčovanie retrovírusového vektoru vo WT bunkách línie HCT116 odvodenej od ľudskeho kolorektálneho karcinómu.
4. Majoritný umlčovací mechanizmus ovplyvňujúci transkripčnú aktivitu integrovaného vektoru vo WT bunkách HCT116 línie je závislý na *de novo* aktivite prítomnej DNMT3b, čo potvrdzuje vysoký počet klonov s transkripčne aktívnymi provírusmi v DNMT3b deficientnej línii.
5. Umlčané klony WT línie boli efektívne reaktivované 5-azaC, inhibítorom DNMT aktivity, čím sme potvrdili umlčovací mechanizmus závislý na DNMT3b aktivite.
6. V DNMT3b deficientnej línii dochádza k umlčovaniu provírusu, no mechanizmus, ktorým sa tak deje je z veľkej časti nezávislý na *de novo* aktivite DNMT. Výrazne sa tu uplatňuje mechanizmus umlčania závislý len na chromátínovom stave a jeho modifikáciách.
7. Umlčané provírusy DNMT3b deficientnej línie sú veľmi účinne reaktivovateľné za použitia TSA, čo potvrdzuje odlišný spôsob umlčania vektoru ako v klonoch WT línie.

8. ZOZNAM CITOVANEJ LITERATÚRY

- Anderson, J. L. and T. J. Hope (2005). "Intracellular trafficking of retroviral vectors: obstacles and advances." *Gene Ther* **12**(23): 1667-78.
- Angelov, D., M. Charra, et al. (2000). "Differential remodeling of the HIV-1 nucleosome upon transcription activators and SWI/SNF complex binding." *J Mol Biol* **302**(2): 315-26.
- Anson, D. S. (2004). "The use of retroviral vectors for gene therapy-what are the risks? A review of retroviral pathogenesis and its relevance to retroviral vector-mediated gene delivery." *Genet Vaccines Ther* **2**(1): 9.
- Arita, K., M. Ariyoshi, et al. (2008). "Recognition of hemi-methylated DNA by the SRA protein UHRF1 by a base-flipping mechanism." *Nature* **455**(7214): 818-21.
- Bachman, K. E., M. R. Rountree, et al. (2001). "Dnmt3a and Dnmt3b are transcriptional repressors that exhibit unique localization properties to heterochromatin." *J Biol Chem* **276**(34): 32282-7.
- Bachman, K. E., B. H. Park, et al. (2003). "Histone modifications and silencing prior to DNA methylation of a tumor suppressor gene." *Cancer Cell* **3**(1): 89-95.
- Ballestar, E. and A. P. Wolffe (2001). "Methyl-CpG-binding proteins. Targeting specific gene repression." *Eur J Biochem* **268**(1): 1-6.
- Barlow, D. P., R. Stoger, et al. (1991). "The mouse insulin-like growth factor type-2 receptor is imprinted and closely linked to the Tme locus." *Nature* **349**(6304): 84-7.
- Barr, S. D., J. Leipzig, et al. (2005). "Integration targeting by avian sarcoma-leukosis virus and human immunodeficiency virus in the chicken genome." *J Virol* **79**(18): 12035-44.
- Baylin, S. B. and J. G. Herman (2000). "DNA hypermethylation in tumorigenesis: epigenetics joins genetics." *Trends Genet* **16**(4): 168-74.
- Bednarik, D. P., J. A. Cook, et al. (1990). "Inactivation of the HIV LTR by DNA CpG methylation: evidence for a role in latency." *EMBO J* **9**(4): 1157-64.
- Bestor, T., A. Laudano, et al. (1988). "Cloning and sequencing of a cDNA encoding DNA methyltransferase of mouse cells. The carboxyl-terminal domain of the mammalian enzymes is related to bacterial restriction methyltransferases." *J Mol Biol* **203**(4): 971-83.
- Bestor, T. H. (2000). "The DNA methyltransferases of mammals." *Hum Mol Genet* **9**(16): 2395-402.
- Bestor, T. H. (2000). "Gene silencing as a threat to the success of gene therapy." *J Clin Invest* **105**(4): 409-11.
- Bird, A. P. and A. P. Wolffe (1999). "Methylation-induced repression--belts, braces, and chromatin." *Cell* **99**(5): 451-4.
- Bisgrove, D., M. Lewinski, et al. (2005). "Molecular mechanisms of HIV-1 proviral latency." *Expert Rev Anti Infect Ther* **3**(5): 805-14.
- Blazkova, J., K. Trejbalova, et al. (2009). "CpG methylation controls reactivation of HIV from latency." *PLoS Pathog* **5**(8): e1000554.

- Bostick, M., J. K. Kim, et al. (2007). "UHRF1 plays a role in maintaining DNA methylation in mammalian cells." *Science* **317**(5845): 1760-4.
- Bouard, D., D. Alazard-Dany, et al. (2009). "Viral vectors: from virology to transgene expression." *Br J Pharmacol* **157**(2): 153-65.
- Bourc'his, D. and T. H. Bestor (2004). "Meiotic catastrophe and retrotransposon reactivation in male germ cells lacking Dnmt3L." *Nature* **431**(7004): 96-9.
- Bowen, N. J., M. B. Palmer, et al. (2004). "Chromosomal regulation by MeCP2: structural and enzymatic considerations." *Cell Mol Life Sci* **61**(17): 2163-7.
- Burnett, J. C., K. I. Lim, et al. "Combinatorial latency reactivation for HIV-1 subtypes and variants." *J Virol* **84**(12): 5958-74.
- Bushman, F., M. Lewinski, et al. (2005). "Genome-wide analysis of retroviral DNA integration." *Nat Rev Microbiol* **3**(11): 848-58.
- Callahan, R. and G. H. Smith (2008). "Common integration sites for MMTV in viral induced mouse mammary tumors." *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **13**(3): 309-21.
- Carteau, S., C. Hoffmann, et al. (1998). "Chromosome structure and human immunodeficiency virus type 1 cDNA integration: centromeric alphoid repeats are a disfavored target." *J Virol* **72**(5): 4005-14.
- Cedar, H. and Y. Bergman (2009). "Linking DNA methylation and histone modification: patterns and paradigms." *Nat Rev Genet* **10**(5): 295-304.
- Cirio, M. C., J. Martel, et al. (2008). "DNA methyltransferase 1o functions during preimplantation development to preclude a profound level of epigenetic variation." *Dev Biol* **324**(1): 139-50.
- Clouaire, T. and I. Stancheva (2008). "Methyl-CpG binding proteins: specialized transcriptional repressors or structural components of chromatin?" *Cell Mol Life Sci* **65**(10): 1509-22.
- Cooper, D. N. and H. Youssoufian (1988). "The CpG dinucleotide and human genetic disease." *Hum Genet* **78**(2): 151-5.
- Cross, S. H., R. R. Meehan, et al. (1997). "A component of the transcriptional repressor MeCP1 shares a motif with DNA methyltransferase and HRX proteins." *Nat Genet* **16**(3): 256-9.
- Dang, Q., J. Auten, et al. (2000). "Human beta interferon scaffold attachment region inhibits *de novo* methylation and confers long-term, copy number-dependent expression to a retroviral vector." *J Virol* **74**(6): 2671-8.
- D'Apolito, D., E. Baiamonte, et al. (2009). "The sea urchin *sns5* insulator protects retroviral vectors from chromosomal position effects by maintaining active chromatin structure." *Mol Ther* **17**(8): 1434-41.
- Deplus, R., C. Brenner, et al. (2002). "Dnmt3L is a transcriptional repressor that recruits histone deacetylase." *Nucleic Acids Res* **30**(17): 3831-8.
- Dhasarathy, A. and P. A. Wade (2008). "The MBD protein family-reading an epigenetic mark?" *Mutat Res* **647**(1-2): 39-43.
- Dickson, J., H. Gowher, et al. "VEZF1 elements mediate protection from DNA methylation." *PLoS Genet* **6**(1): e1000804.
- Dong, A., J. A. Yoder, et al. (2001). "Structure of human DNMT2, an enigmatic DNA methyltransferase homolog that displays denaturant-resistant binding to DNA." *Nucleic Acids Res* **29**(2): 439-48.

- Ehrlich, M., K. L. Buchanan, et al. (2001). "DNA methyltransferase 3B mutations linked to the ICF syndrome cause dysregulation of lymphogenesis genes." *Hum Mol Genet* **10**(25): 2917-31.
- Ehrlich, M., C. Sanchez, et al. (2008). "ICF, an immunodeficiency syndrome: DNA methyltransferase 3B involvement, chromosome anomalies, and gene dysregulation." *Autoimmunity* **41**(4): 253-71.
- Elleder, D., A. Pavlicek, et al. (2002). "Preferential integration of human immunodeficiency virus type 1 into genes, cytogenetic R bands and GC-rich DNA regions: insight from the human genome sequence." *FEBS Lett* **517**(1-3): 285-6.
- Ellis, J., A. Hotta, et al. (2007). "Retrovirus silencing by an epigenetic TRIM." *Cell* **131**(1): 13-4.
- Emiliani, S., C. Van Lint, et al. (1996). "A point mutation in the HIV-1 Tat responsive element is associated with postintegration latency." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(13): 6377-81.
- Fatemi, M., A. Hermann, et al. (2002). "Dnmt3a and Dnmt1 functionally cooperate during *de novo* methylation of DNA." *Eur J Biochem* **269**(20): 4981-4.
- Federspiel, M. J., D. A. Swing, et al. (1996). "Expression of transduced genes in mice generated by infecting blastocysts with avian leukosis virus-based retroviral vectors." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(10): 4931-6.
- Feenstra, A., J. Fewell, et al. (1986). "In vitro methylation inhibits the promotor activity of a cloned intracisternal A-particle LTR." *Nucleic Acids Res* **14**(10): 4343-52.
- Felice, B., C. Cattoglio, et al. (2009). "Transcription factor binding sites are genetic determinants of retroviral integration in the human genome." *PLoS One* **4**(2): e4571.
- Fujita, N., N. Shimotake, et al. (2000). "Mechanism of transcriptional regulation by methyl-CpG binding protein MBD1." *Mol Cell Biol* **20**(14): 5107-18.
- Fuks, F., W. A. Burgers, et al. (2001). "Dnmt3a binds deacetylases and is recruited by a sequence-specific repressor to silence transcription." *EMBO J* **20**(10): 2536-44.
- Gaszner, M. and G. Felsenfeld (2006). "Insulators: exploiting transcriptional and epigenetic mechanisms." *Nat Rev Genet* **7**(9): 703-13.
- Gimenez J, Montgiraud C, Oriol G, et al. (2009). "Comparative methylation of ERV/syncytin-1 and other human endogenous retrvirus LTRs in placenta tissues." *DNA res.* **16**(4): 195-211.
- Goff, S. P. (2007). "Host factors exploited by retroviruses." *Nat Rev Microbiol* **5**(4): 253-63.
- Gold, M. and J. Hurwitz (1964). "The Enzymatic Methylation of Ribonucleic Acid and Deoxyribonucleic Acid. Vi. Further Studies on the Properties of the Deoxyribonucleic Acid Methylation Reaction." *J Biol Chem* **239**: 3866-74.
- Goll, M. G. and T. H. Bestor (2005). "Eukaryotic cytosine methyltransferases." *Annu Rev Biochem* **74**: 481-514.
- Goll, M. G., F. Kirpekar, et al. (2006). "Methylation of tRNA^{Asp} by the DNA methyltransferase homolog Dnmt2." *Science* **311**(5759): 395-8.
- Gowher, H., K. Liebert, et al. (2005). "Mechanism of stimulation of catalytic activity of Dnmt3A and Dnmt3B DNA-(cytosine-C5)-methyltransferases by Dnmt3L." *J Biol Chem* **280**(14): 13341-8.

- Greger, J. G., R. A. Katz, et al. (2005). "The cellular protein daxx interacts with avian sarcoma virus integrase and viral DNA to repress viral transcription." *J Virol* **79**(8): 4610-8.
- Groner, A. C., S. Meylan, et al. (2010) "KRAB-zinc finger proteins and KAP1 can mediate long-range transcriptional repression through heterochromatin spreading." *PLoS Genet* **6**(3): e1000869.
- Gruenbaum, Y., H. Cedar, et al. (1982). "Substrate and sequence specificity of a eukaryotic DNA methylase." *Nature* **295**(5850): 620-2.
- Guenther, M. G., S. S. Levine, et al. (2007). "A chromatin landmark and transcription initiation at most promoters in human cells." *Cell* **130**(1): 77-88.
- Hacein-Bey-Abina, S., A. Garrigue, et al. (2008). "Insertional oncogenesis in 4 patients after retrovirus-mediated gene therapy of SCID-X1." *J Clin Invest* **118**(9): 3132-42.
- Han, L., B. Su, et al. (2008). "CpG island density and its correlations with genomic features in mammalian genomes." *Genome Biol* **9**(5): R79.
- Harris, R. S., S. K. Petersen-Mahrt, et al. (2002). "RNA editing enzyme APOBEC1 and some of its homologs can act as DNA mutators." *Mol Cell* **10**(5): 1247-53.
- He, J., Q. Yang, et al. (2005). "Dynamic DNA methylation and histone modifications contribute to lentiviral transgene silencing in murine embryonic carcinoma cells." *J Virol* **79**(21): 13497-508.
- Hejnar, J., P. Hajkova, et al. (2001). "CpG island protects Rous sarcoma virus-derived vectors integrated into nonpermissive cells from DNA methylation and transcriptional suppression." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(2): 565-9.
- Hejnar, J., J. Plachy, et al. (1999). "Inhibition of the rous sarcoma virus long terminal repeat-driven transcription by in vitro methylation: different sensitivity in permissive chicken cells versus mammalian cells." *Virology* **255**(1): 171-81.
- Hendrich, B. and S. Tweedie (2003). "The methyl-CpG binding domain and the evolving role of DNA methylation in animals." *Trends Genet* **19**(5): 269-77.
- Herman, J. G., J. R. Graff, et al. (1996). "Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(18): 9821-6.
- Hermann, A., H. Gowher, et al. (2004). "Biochemistry and biology of mammalian DNA methyltransferases." *Cell Mol Life Sci* **61**(19-20): 2571-87.
- Hervouet, E., L. Lalier, et al. "Disruption of Dnmt1/PCNA/UHRF1 interactions promotes tumorigenesis from human and mice glial cells." *PLoS One* **5**(6): e11333.
- Himly, M., D. N. Foster, et al. (1998). "The DF-1 chicken fibroblast cell line: transformation induced by diverse oncogenes and cell death resulting from infection by avian leukosis viruses." *Virology* **248**(2): 295-304.
- Hinshelwood, R. A., J. R. Melki, et al. (2009). "Aberrant *de novo* methylation of the p16INK4A CpG island is initiated post gene silencing in association with chromatin remodelling and mimics nucleosome positioning." *Hum Mol Genet* **18**(16): 3098-109.
- Hotchkiss R. D. (1948) The quantitative separation of purines, pyrimidines and nucleosides by paper chromatography. *J. Biol. Chem.* 175: 315-332

- Hsu, D. W., M. J. Lin, et al. (1999). "Two major forms of DNA (cytosine-5) methyltransferase in human somatic tissues." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(17): 9751-6.
- Hu, J. L., B. O. Zhou, et al. (2009). "The N-terminus of histone H3 is required for *de novo* DNA methylation in chromatin." *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(52): 22187-92.
- Huang, L., G. L. Xu, et al. (2008). "Daxx interacts with HIV-1 integrase and inhibits lentiviral gene expression." *Biochem Biophys Res Commun* **373**(2): 241-5.
- Huthoff, H. and G. J. Towers (2008). "Restriction of retroviral replication by APOBEC3G/F and TRIM5alpha." *Trends Microbiol* **16**(12): 612-9.
- Chen, T., N. Tsujimoto, et al. (2004). "The PWWP domain of Dnmt3a and Dnmt3b is required for directing DNA methylation to the major satellite repeats at pericentric heterochromatin." *Mol Cell Biol* **24**(20): 9048-58.
- Chen, W. Y., E. C. Bailey, et al. (1997). "Reactivation of silenced, virally transduced genes by inhibitors of histone deacetylase." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(11): 5798-803.
- Choi, B. S., H. S. Lee, et al. "Novel histone deacetylase inhibitors CG05 and CG06 effectively reactivate latently infected HIV-1." *AIDS* **24**(4): 609-11.
- Chun, T. W., D. Engel, et al. (1998). "Early establishment of a pool of latently infected, resting CD4(+) T cells during primary HIV-1 infection." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(15): 8869-73.
- Iordanskiy, S., R. Berro, et al. (2006). "Intracytoplasmic maturation of the human immunodeficiency virus type 1 reverse transcription complexes determines their capacity to integrate into chromatin." *Retrovirology* **3**: 4.
- Ishida, T., A. Hamano, et al. (2006). "5' long terminal repeat (LTR)-selective methylation of latently infected HIV-1 provirus that is demethylated by reactivation signals." *Retrovirology* **3**: 69.
- Jackson-Grusby, L., C. Beard, et al. (2001). "Loss of genomic methylation causes p53-dependent apoptosis and epigenetic deregulation." *Nat Genet* **27**(1): 31-9.
- Jeong, S., G. Liang, et al. (2009). "Selective anchoring of DNA methyltransferases 3A and 3B to nucleosomes containing methylated DNA." *Mol Cell Biol* **29**(19): 5366-76.
- Jones, P. A. and M. L. Gonzalgo (1997). "Altered DNA methylation and genome instability: a new pathway to cancer?" *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(6): 2103-5.
- Jones, P. A. and P. W. Laird (1999). "Cancer epigenetics comes of age." *Nat Genet* **21**(2): 163-7.
- Jurkowska, R. Z., N. Anspach, et al. (2008). "Formation of nucleoprotein filaments by mammalian DNA methyltransferase Dnmt3a in complex with regulator Dnmt3L." *Nucleic Acids Res* **36**(21): 6656-63.
- Jurkowski, T. P., M. Meusburger, et al. (2008). "Human DNMT2 methylates tRNA(Asp) molecules using a DNA methyltransferase-like catalytic mechanism." *RNA* **14**(8): 1663-70.
- Kato, Y., M. Kaneda, et al. (2007). "Role of the Dnmt3 family in *de novo* methylation of imprinted and repetitive sequences during male germ cell development in the mouse." *Hum Mol Genet* **16**(19): 2272-80.

- Katz, R. A., E. Jack-Scott, et al. (2007). "High-frequency epigenetic repression and silencing of retroviruses can be antagonized by histone deacetylase inhibitors and transcriptional activators, but uniform reactivation in cell clones is restricted by additional mechanisms." *J Virol* **81**(6): 2592-604.
- Katzman, M. and R. A. Katz (1999). "Substrate recognition by retroviral integrases." *Adv Virus Res* **52**: 371-95.
- Kauder, S. E., A. Bosque, et al. (2009). "Epigenetic regulation of HIV-1 latency by cytosine methylation." *PLoS Pathog* **5**(6): e1000495.
- Kawamoto, K., H. Hirata, et al. (2008). "DNA methylation and histone modifications cause silencing of Wnt antagonist gene in human renal cell carcinoma cell lines." *Int J Cancer* **123**(3): 535-42.
- Klimasauskas, S., S. Kumar, et al. (1994). "HhaI methyltransferase flips its target base out of the DNA helix." *Cell* **76**(2): 357-69.
- Klose, R. J. and A. P. Bird (2006). "Genomic DNA methylation: the mark and its mediators." *Trends Biochem Sci* **31**(2): 89-97.
- Koiwa, T., A. Hamano-Usami, et al. (2002). "5'-long terminal repeat-selective CpG methylation of latent human T-cell leukemia virus type 1 provirus in vitro and in vivo." *J Virol* **76**(18): 9389-97.
- Kondo, Y., L. Shen, et al. (2003). "Critical role of histone methylation in tumor suppressor gene silencing in colorectal cancer." *Mol Cell Biol* **23**(1): 206-15.
- Lan, J., S. Hua, et al. "DNA methyltransferases and methyl-binding proteins of mammals." *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* **42**(4): 243-52.
- Lavie, L., M. Kitova, et al. (2005). "CpG methylation directly regulates transcriptional activity of the human endogenous retrovirus family HERV-K(HML-2)." *J Virol* **79**(2): 876-83.
- Lehnertz, B., Y. Ueda, et al. (2003). "Suv39h-mediated histone H3 lysine 9 methylation directs DNA methylation to major satellite repeats at pericentric heterochromatin." *Curr Biol* **13**(14): 1192-200.
- Lengauer, C., K. W. Kinzler, et al. (1997). "Genetic instability in colorectal cancers." *Nature* **386**(6625): 623-7.
- Lewinski, M. K., M. Yamashita, et al. (2006). "Retroviral DNA integration: viral and cellular determinants of target-site selection." *PLoS Pathog* **2**(6): e60.
- Lewis, P., M. Hensel, et al. (1992). "Human immunodeficiency virus infection of cells arrested in the cell cycle." *EMBO J* **11**(8): 3053-8.
- Li, E., T. H. Bestor, et al. (1992). "Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality." *Cell* **69**(6): 915-26.
- Li, C. L. and D. W. Emery (2007). "The cHS4 chromatin insulator reduces gammaretroviral vector silencing by epigenetic modifications of integrated provirus." *Gene Ther* **15**(1): 49-53.
- Llano, M., M. Vanegas, et al. (2004). "LEDGF/p75 determines cellular trafficking of diverse lentiviral but not murine oncoretroviral integrase proteins and is a component of functional lentiviral preintegration complexes." *J Virol* **78**(17): 9524-37.
- Lorincz, M. C., D. Schubeler, et al. (2000). "Dynamic analysis of proviral induction and *De novo* methylation: implications for a histone deacetylase-independent,

- methylation density-dependent mechanism of transcriptional repression." *Mol Cell Biol* **20**(3): 842-50.
- Lorincz, M. C., D. Schubeler, et al. (2001). "Methylation-mediated proviral silencing is associated with MeCP2 recruitment and localized histone H3 deacetylation." *Mol Cell Biol* **21**(23): 7913-22.
- Luczak, M. W. and P. P. Jagodzinski (2006). "The role of DNA methylation in cancer development." *Folia Histochem Cytobiol* **44**(3): 143-54.
- Lyko, F., B. H. Ramsahoye, et al. (2000). "DNA methylation in *Drosophila melanogaster*." *Nature* **408**(6812): 538-40.
- Macleod, D., J. Charlton, et al. (1994). "Sp1 sites in the mouse *aprt* gene promoter are required to prevent methylation of the CpG island." *Genes Dev* **8**(19): 2282-92.
- Margot, J. B., A. M. Aguirre-Arteta, et al. (2000). "Structure and function of the mouse DNA methyltransferase gene: *Dnmt1* shows a tripartite structure." *J Mol Biol* **297**(2): 293-300.
- Mariani, R., D. Chen, et al. (2003). "Species-specific exclusion of APOBEC3G from HIV-1 virions by Vif." *Cell* **114**(1): 21-31.
- Matouskova, M., J. Blazkova, et al. (2006). "CpG methylation suppresses transcriptional activity of human syncytin-1 in non-placental tissues." *Exp Cell Res* **312**(7): 1011-20.
- McInerney, J. M., J. R. Nawrocki, et al. (2000). "Long-term silencing of retroviral vectors is resistant to reversal by trichostatin A and 5-azacytidine." *Gene Ther* **7**(8): 653-63.
- Medvedeva, Y. A., M. V. Fridman, et al. "Intergenic, gene terminal, and intragenic CpG islands in the human genome." *BMC Genomics* **11**: 48.
- Merimi, M., P. Klener, et al. (2007). "Suppression of viral gene expression in bovine leukemia virus-associated B-cell malignancy: interplay of epigenetic modifications leading to chromatin with a repressive histone code." *J Virol* **81**(11): 5929-39.
- Mikkelsen, T. S., M. Ku, et al. (2007). "Genome-wide maps of chromatin state in pluripotent and lineage-committed cells." *Nature* **448**(7153): 553-60.
- Millar, C. B., J. Guy, et al. (2002). "Enhanced CpG mutability and tumorigenesis in MBD4-deficient mice." *Science* **297**(5580): 403-5.
- Mitchell, R. S., B. F. Beitzel, et al. (2004). "Retroviral DNA integration: ASLV, HIV, and MLV show distinct target site preferences." *PLoS Biol* **2**(8): E234.
- Mizutani, T., T. Ito, et al. (2002). "Maintenance of integrated proviral gene expression requires Brm, a catalytic subunit of SWI/SNF complex." *J Biol Chem* **277**(18): 15859-64.
- Moretti, P. and H. Y. Zoghbi (2006). "MeCP2 dysfunction in Rett syndrome and related disorders." *Curr Opin Genet Dev* **16**(3): 276-81.
- Nakayama, E. E. and T. Shioda "Anti-retroviral activity of TRIM5 alpha." *Rev Med Virol* **20**(2): 77-92.
- Nisole, S. and A. Saib (2004). "Early steps of retrovirus replicative cycle." *Retrovirology* **1**: 9.
- No, D., T. P. Yao, et al. (1996). "Ecdysone-inducible gene expression in mammalian cells and transgenic mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(8): 3346-51.

- Noorali, S., I. C. Rotar, et al. (2009). "Role of HERV-W syncytin-1 in placentation and maintenance of human pregnancy." *Appl Immunohistochem Mol Morphol* **17**(4): 319-28.
- Nosho, K., K. Shima, et al. (2009). "DNMT3B expression might contribute to CpG island methylator phenotype in colorectal cancer." *Clin Cancer Res* **15**(11): 3663-71.
- Oka, M., A. M. Meacham, et al. (2005). "*De novo* DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b primarily mediate the cytotoxic effect of 5-aza-2'-deoxycytidine." *Oncogene* **24**(19): 3091-9.
- Okano, M., D. W. Bell, et al. (1999). "DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for *de novo* methylation and mammalian development." *Cell* **99**(3): 247-57.
- Okano, M., S. Xie, et al. (1998). "Cloning and characterization of a family of novel mammalian DNA (cytosine-5) methyltransferases." *Nat Genet* **19**(3): 219-20.
- Ooi, S. K., C. Qiu, et al. (2007). "DNMT3L connects unmethylated lysine 4 of histone H3 to *de novo* methylation of DNA." *Nature* **448**(7154): 714-7.
- Pannell, D., C. S. Osborne, et al. (2000). "Retrovirus vector silencing is *de novo* methylase independent and marked by a repressive histone code." *EMBO J* **19**(21): 5884-94.
- Patel, K., J. Dickson, et al. "Targeting of 5-aza-2'-deoxycytidine residues by chromatin-associated DNMT1 induces proteasomal degradation of the free enzyme." *Nucleic Acids Res* **38**(13): 4313-24.
- Peterson, E. J., O. Bogler, et al. (2003). "p53-mediated repression of DNA methyltransferase 1 expression by specific DNA binding." *Cancer Res* **63**(20): 6579-82.
- Plachy, J., J. Kotab, et al. (2010) "Provirus selected for high and stable expression of transduced genes accumulate in broadly transcribed genome areas." *J Virol* **84**(9): 4204-11.
- Prince, V. E. and P. W. Rigby (1991). "Derivatives of Moloney murine sarcoma virus capable of being transcribed in embryonal carcinoma stem cells have gained a functional Sp1 binding site." *J Virol* **65**(4): 1803-11.
- Reik, W., W. Dean, et al. (2001). "Epigenetic reprogramming in mammalian development." *Science* **293**(5532): 1089-93.
- Rhee, I., K. E. Bachman, et al. (2002). "DNMT1 and DNMT3b cooperate to silence genes in human cancer cells." *Nature* **416**(6880): 552-6.
- Ritchie, D., R. L. Piekarz, et al. (2009). "Reactivation of DNA viruses in association with histone deacetylase inhibitor therapy: a case series report." *Haematologica* **94**(11): 1618-22.
- Robertson, K. D. (2002). "DNA methylation and chromatin - unraveling the tangled web." *Oncogene* **21**(35): 5361-79.
- Robertson, K. D., S. Ait-Si-Ali, et al. (2000). "DNMT1 forms a complex with Rb, E2F1 and HDAC1 and represses transcription from E2F-responsive promoters." *Nat Genet* **25**(3): 338-42.
- Roe, T., T. C. Reynolds, et al. (1993). "Integration of murine leukemia virus DNA depends on mitosis." *EMBO J* **12**(5): 2099-108.

- Rottach, A., H. Leonhardt, et al. (2009). "DNA methylation-mediated epigenetic control." *J Cell Biochem* **108**(1): 43-51.
- Rountree, M. R., K. E. Bachman, et al. (2000). "DNMT1 binds HDAC2 and a new co-repressor, DMAP1, to form a complex at replication foci." *Nat Genet* **25**(3): 269-77.
- Saffert, R. T. and R. F. Kalejta (2006). "Inactivating a cellular intrinsic immune defense mediated by Daxx is the mechanism through which the human cytomegalovirus pp71 protein stimulates viral immediate-early gene expression." *J Virol* **80**(8): 3863-71.
- Saxonov, S., P. Berg, et al. (2006). "A genome-wide analysis of CpG dinucleotides in the human genome distinguishes two distinct classes of promoters." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(5): 1412-7.
- Senigl, F., J. Plachy, et al. (2008). "The core element of a CpG island protects avian sarcoma and leukosis virus-derived vectors from transcriptional silencing." *J Virol* **82**(16): 7818-27.
- Schaefer, M., S. Hagemann, et al. (2009). "Azacytidine inhibits RNA methylation at DNMT2 target sites in human cancer cell lines." *Cancer Res* **69**(20): 8127-32.
- Schaefer, M., T. Pollex, et al. (2009). "RNA cytosine methylation analysis by bisulfite sequencing." *Nucleic Acids Res* **37**(2): e12.
- Schneider-Stock, R., M. Diab-Assef, et al. (2005). "5-Aza-cytidine is a potent inhibitor of DNA methyltransferase 3a and induces apoptosis in HCT-116 colon cancer cells via Gadd45- and p53-dependent mechanisms." *J Pharmacol Exp Ther* **312**(2): 525-36.
- Schroder, A. R., P. Shinn, et al. (2002). "HIV-1 integration in the human genome favors active genes and local hotspots." *Cell* **110**(4): 521-9.
- Sigalotti, L., E. Fratta, et al. (2007). "Epigenetic drugs as pleiotropic agents in cancer treatment: biomolecular aspects and clinical applications." *J Cell Physiol* **212**(2): 330-44.
- Sripathy, S. P., J. Stevens, et al. (2006). "The KAP1 corepressor functions to coordinate the assembly of *de novo* HP1-demarcated microenvironments of heterochromatin required for KRAB zinc finger protein-mediated transcriptional repression." *Mol Cell Biol* **26**(22): 8623-38.
- Strelau, M., C. M. Owens, et al. (2004). "The cytoplasmic body component TRIM5alpha restricts HIV-1 infection in Old World monkeys." *Nature* **427**(6977): 848-53.
- Suzuki, Y. and R. Craigie (2007). "The road to chromatin - nuclear entry of retroviruses." *Nat Rev Microbiol* **5**(3): 187-96.
- Svoboda, J., J. Hejnar, et al. (2000). "Retroviruses in foreign species and the problem of provirus silencing." *Gene* **261**(1): 181-8.
- Swindle, C. S., H. G. Kim, et al. (2004). "Mutation of CpGs in the murine stem cell virus retroviral vector long terminal repeat represses silencing in embryonic stem cells." *J Biol Chem* **279**(1): 34-41.
- Taniguchi, Y., K. Nosaka, et al. (2005). "Silencing of human T-cell leukemia virus type I gene transcription by epigenetic mechanisms." *Retrovirology* **2**: 64.

- Turek-Plewa, J. and P. P. Jagodzinski (2005). "The role of mammalian DNA methyltransferases in the regulation of gene expression." *Cell Mol Biol Lett* **10**(4): 631-47.
- Vertino, P. M., J. A. Sekowski, et al. (2002). "DNMT1 is a component of a multiprotein DNA replication complex." *Cell Cycle* **1**(6): 416-23.
- Wade, P. A. (2001). "Methyl CpG binding proteins: coupling chromatin architecture to gene regulation." *Oncogene* **20**(24): 3166-73.
- Waterston, R. H., K. Lindblad-Toh, et al. (2002). "Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome." *Nature* **420**(6915): 520-62.
- Weber, M., I. Hellmann, et al. (2007). "Distribution, silencing potential and evolutionary impact of promoter DNA methylation in the human genome." *Nat Genet* **39**(4): 457-66.
- Weinberg, J. B., T. J. Matthews, et al. (1991). "Productive human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) infection of nonproliferating human monocytes." *J Exp Med* **174**(6): 1477-82.
- Weinmann, A. S., P. S. Yan, et al. (2002). "Isolating human transcription factor targets by coupling chromatin immunoprecipitation and CpG island microarray analysis." *Genes Dev* **16**(2): 235-44.
- Wiznerowicz, M., J. Jakobsson, et al. (2007). "The Kruppel-associated box repressor domain can trigger *de novo* promoter methylation during mouse early embryogenesis." *J Biol Chem* **282**(47): 34535-41.
- Wolf, D. and S. P. Goff (2007). "TRIM28 mediates primer binding site-targeted silencing of murine leukemia virus in embryonic cells." *Cell* **131**(1): 46-57.
- Wu, Y. (2004). "HIV-1 gene expression: lessons from provirus and non-integrated DNA." *Retrovirology* **1**: 13.
- Wu, X., Y. Li, et al. (2003). "Transcription start regions in the human genome are favored targets for MLV integration." *Science* **300**(5626): 1749-51.
- Yoder, J. A., C. P. Walsh, et al. (1997). "Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites." *Trends Genet* **13**(8): 335-40.
- Young, J. I., E. P. Hong, et al. (2005). "Regulation of RNA splicing by the methylation-dependent transcriptional repressor methyl-CpG binding protein 2." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(49): 17551-8.
- Zhao, X., T. Ueba, et al. (2003). "Mice lacking methyl-CpG binding protein 1 have deficits in adult neurogenesis and hippocampal function." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(11): 6777-82.
- Zhao, Z., Q. Wu, et al. "Depletion of DNMT3A suppressed cell proliferation and restored PTEN in hepatocellular carcinoma cell." *J Biomed Biotechnol* **2010**: 737535.