

## Abstrakt

miR-17-92 klastř (Oncomir1) kóduje sedm mikroRNA (miRNA, miR) regulujících řadu biologických procesů jako je proliferace, diferenciace nebo apoptóza. Zvýšená exprese mikroRNA kódovaných tímto klastřem byla zjištěna u řady nádorových onemocnění včetně akutní a chronické myeloidní leukémie (Dixon-McIver et al., 2008; Li et al., 2008; Venturini et al., 2007). Myeloidní progenitory významně exprimují miR-17-92 klastř, zatímco makrofágová diferenciace je doprovázena výrazným snížením jeho exprese. V naší laboratoři bylo prokázáno, že miR-17-92 klastř je během diferenciace primárních PUER myeloidních progenitorů indukovaných transkripčním faktorem PU.1 (SPI1) reprimován transkripčním faktorem Early growth response 2 (Egr2). Cílem této diplomové práce bylo vytvořit sérii reportérových vektorů nesoucích fragmenty miR-17-92 putativního promotoru, které by umožnily studium regulace transkripce miR-17-92 klastřu. Výsledně se podařilo připravit 8 fragmentů obsahujících různé úseky regulační oblasti miR-17-92 klastřu v rozsahu -3.3 až 0 kb vzhledem ke kódující oblasti miR-17-5p, a to i přes vysoký CG obsah (~80%), které byly následně vklonovány do pGL3 reporterového vektoru.

Transfekce a následná funkční esej pGL3 reporterového vektoru nesoucího -3.3;-0kb fragment putativního promotoru miR-17-92 v buňkách NIH3T3 a HeLa potvrdily, že miR-17-92 klastř je inhibován Egr2 faktorem. Tato data dále prokázala, že Egr2 reprimuje expresi miR-17-92 klastřu nezávisle na transkripčním faktoru PU.1, jež v myeloidních progenitorech Egr2 transkripčně aktivuje. Na základě těchto výsledků je pravděpodobné, že mechanismus represe miR-17-92 klastřu transkripčním faktorem Egr2 není omezen pouze na hematologické linie.

MikroRNA a jejich cílové geny mezi sebou mohou vytvářet vzájemné regulační okruhy. miR-17-5p, miR-20a a miR-92-1 kódované miR-17-92 klastřem jsou predikovány se vázat do dvou míst v 3' nepřekládané oblasti (3'UTR) transkripčního faktor Egr2 (TargetScan). Dalším úkolem této práce bylo vytvořit pGL3 reportérový vektor nesoucí 3'UTR Egr2 faktoru, obsahující mutovaná predikovaná místa mikroRNA miR-17-92 klastřu. Kofekce reporterového vektoru nesoucího mutovanou a nemutovanou 3'UTR faktoru Egr2 a expresního vektoru nesoucího kódující oblast miR-17-92 klastřu do HeLa buněk ukázala, že mikroRNA miR-17-92 klastřu jsou schopny inhibovat Egr2 transkripční faktor vazbou do jeho 3'UTR.

Data získaná touto diplomovou prací a řadou dalších experimentálních přístupů naší laboratoře naznačují, že mezi Egr2 a miR-17-92 klastřem existuje vzájemná regulace, kdy

miR-17-92 klastr je transkripčně reprimovaný faktorem Egr2 a zároveň posttranskripčně inhibuje Egr2.