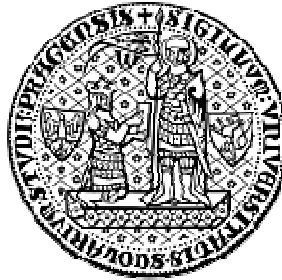


PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA UNIVERZITY KARLOVY V PRAZE

KATEDRA BUNĚČNÉ BIOLOGIE



Diplomová práce

Regulace transkripce mikroRNA klastru miR-17-92 v průběhu diferenciaci makrofágů

Transcriptional regulation of miR-17-92 microRNA
cluster during macrophage differentiation

Jana Rybářová

Vedoucí diplomové práce: MUDr. Tomáš Stopka Ph.D a Mgr. Vít Pospíšil

Praha 2010

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci na téma **Regulace transkripce mikroRNA klastru miR-17-92 v průběhu diferenciaci makrofágů** vypracovávala samostatně, pod odborným vedením mých školitelů MUDr. Tomáše Stopky, Ph.D a Mgr. Víta Pospíšila. Veškeré použité literární zdroje jsou uvedeny v seznamu literatury.

Srpen 2010

Jana Rybářová

Poděkování patří mým školitelům MUDr. Tomáši Stopkovi, Ph.D a Mgr. Vítu Pospíšilovi za odborné vedení mé diplomové práce a cenné rady během mé práce v laboratoři. Dále bych ráda poděkovala ostatním členům laboratoře za pomoc a užitečné rady.

Mé poděkování patří také mé rodině za morální i materiální podporu a důvěru, kterou ve mě vložili a mému příteli za podporu a trpělivost.

Obsah

Seznam zkratk.....	7
Abstrakt	8
Klíčová slova	9
Abstract.....	10
Key words.....	11
1 LITERÁRNÍ PŘEHLED	12
1.1 Regulace genové exprese	12
1.1.1 Regulace transkripce.....	12
1.1.1.1 Oblasti kontrolující iniciaci transkripce	13
1.1.1.1.1 Jádru promotoru.....	13
1.1.1.1.2 Proximální a distální úsek promotoru.....	14
1.1.1.1.3 Enhancery a silencery	14
1.1.1.2 Faktory podílející se na regulaci transkripce.....	14
1.1.1.2.1 Obecné transkripční faktory	14
1.1.1.2.2 Specifické transkripční faktory.....	15
1.1.1.3 Chromatinová struktura a její vliv na regulaci transkripce.....	15
1.1.1.3.1 Chromatinové modifikace	16
1.1.1.4 DNA metylace a genová exprese.....	17
1.2 MikroRNA.....	18
1.2.1 Genová organizace mikroRNA	18
1.2.2 Biogeneze mikroRNA	18
1.2.3 Struktura vazebného místa mikroRNA	20
1.2.4 Role mikroRNA v krvetvorbě	21
1.2.4.1 MikroRNA v myeloidní diferenciaci.....	21
1.3 miR-17-92 klastr	22
1.3.1 Funkce miR-17-92 klastru	23
1.3.2 miR-17-92 klastr v onkogenezi	24
1.3.3 Regulace miR-17-92 klastru	24
1.4 Krvetvorba a diferenciaci makrofágů	26
1.4.1 Hematopoetické kmenové buňky	26
1.4.2 Myeloidní a lymfoidní progenitorové buňky	27
1.4.3 Myeloidní diferenciaci	28
1.4.3.1 Hlavní faktory účastníci se myeloidní diferenciaci	29
1.4.3.2 Hlavní faktory podílející se na diferenciaci makrofágů	31

2 CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE	32
3 MATERIÁL A METODY	33
3.1 Materiál	33
3.1.1 Buněčné linie a bakteriální kmeny	33
3.1.1.1 Buněčné linie	33
3.1.1.2 Bakteriální kmeny	33
3.1.2 Kultivační média	33
3.1.2.1 Pevná média.....	33
3.1.2.2 Tekutá média	33
3.1.3 Použité vektory a expresní plasmidy	34
3.1.4 Použité enzymy a DNA markery:.....	35
3.1.5 Komerčně dodávané kity	35
3.1.6 Seznam použitých přístrojů	35
3.1.7 Seznam použitých chemikálií.....	36
3.2 Metody	38
3.2.1 Práce s buněčnými liniemi.....	38
3.2.2 Metody použité k přípravě luciferázových konstruktů nesoucích různé úseky regulační oblasti miR-17-92 klastru	38
3.2.2.1 Příprava fragmentů regulační oblasti miR-17-92 klastru	38
3.2.2.2 Příprava vektoru pGL3-basic.....	42
3.2.2.3 Purifikace vektoru pGL3-basic a fragmentů regulační oblasti miR-17-92 klastru na agarózovém gelu.....	42
3.2.2.4 Ligace pGL3-basic vektoru a fragmentů regulační oblasti miR-17-92 klastru	43
3.2.2.5 Transformace luciferázových konstruktů, jejich namnožení a izolace.....	44
3.2.2.6 Restrikční ověření luciferázových konstruktů.....	45
3.2.3 Metody použité k místně specifické mutagenезi vektoru pGL3-Egr2-3'UTRwt.....	46
3.2.4 Transfekce DNA do savčích buněčných linií.....	49
3.2.4.1. DNA transfekce pomocí jetPEI	49
3.2.4.2 DNA transfekce pomocí lipofectaminu	50
3.2.4.3 Sklizení buněk	51
3.2.4.4 Stanovení luciferázové aktivity	52
4 VÝSLEDKY	53
4.1 Strategie pro vytvoření systému vhodného ke studiu regulace transkripce miR-17-92 klastru	53
4.1.1 Tvorba reportérových konstruktů nesoucích fragmenty regulační oblasti miR-17-92 klastru	55
4.1.1.1 Příprava fragmentů obsahujících regulační oblasti miR-17-92 klastru	55

4.1.1.2 Restrikční štěpení, purifikace z gelu a ligace fragmentů regulační oblasti miR-17-92 klastru do pGL3 reporterového vektoru a transformace do bakterií DH5 α	56
4.1.1.3 Restrikční ověření reportérových konstruktů nesoucích regulační oblasti miR-17-92 klastru	60
4.2 Funkční ověření regulace transkripce miR-17-92 klastru transkripčními faktory Egr2 a PU.1.....	63
4.3 Identifikace vzájemné regulace mezi Egr2 a miRNA miR-17-92 klastru	68
4.3.1 Místně specifická mutageneze 3'UTR Egr2 transkripčního faktoru.....	68
4.3.2 Funkční ověření vztahu mezi miRNA miR-17-92 klastru a transkripčním faktorem Egr2	72
5 DISKUZE	73
6 SHRNU TÍ VÝSLEDKŮ.....	77
7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	78

Seznam zkratek:

3'UTR	3' nepřekládaná oblast
CLP	lymfoidní progenitory
CMP	myeloidní progenitory
DNA	deoxyribonukleová kyselina
GMP	granulocyt-makrofágové progenitory
GTF	obecné transkripční faktory
HSC	hematopoetické kmenové buňky
hnRNA	heterogenní jaderná RNA
Inr	iniciátor
LMPP	lymfo-myeloidní progenitory
LT-HSC	dlouhodobé HSC
MEP	megakaryocyt-erytroidní progenitory
miRNA, miR	mikroRNA
MPP	multipotentní progenitory
mRNA	mediátorová RNA
PCR	polymerázová řetězová reakce
PIC	preiniciační komplex
Pol II	RNA polymeráza II
pre-miRNA	miRNA prekurzor
pri-miRNA	primární miRNA transkript
ST-HSC	krátkodobé HSC
TSS	transkripční startovací místo

Abstrakt

miR-17-92 klastr (Oncomir1) kóduje sedm mikroRNA (miRNA, miR) regulujících řadu biologických procesů jako je proliferace, diferenciace nebo apoptóza. Zvýšená exprese mikroRNA kódovaných tímto klastrem 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 klastr, zatímco makrofágová diferenciace je doprovázena výrazným snížením jeho exprese. V naší laboratoři bylo prokázáno, že miR-17-92 klastr 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 klastru. Výsledně se podařilo připravit 8 fragmentů obsahujících různé úseky regulační oblasti miR-17-92 klastru 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 klastr je inhibován Egr2 faktorem. Tato data dále prokázala, že Egr2 reprimuje expresi miR-17-92 klastru 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 klastru 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 klastrem jsou predikovány se vázat do dvou míst v 3' nepřekládané oblasti (3'UTR) transkripčního faktoru Egr2 (TargetScan). Dalším úkolem této práce bylo vytvořit pGL3 reportérový vektor nesoucí 3'UTR Egr2 faktoru, obsahující mutovaná predikovaná místa mikroRNA miR-17-92 klastru. Kotretransfekce reporterového vektoru nesoucího mutovanou a nemutovanou 3'UTR faktoru Egr2 a expresního vektoru nesoucího kódující oblast miR-17-92 klastru do HeLa buněk ukázala, že mikroRNA miR-17-92 klastru 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 klastrem existuje vzájemná regulace, kdy miR-17-92 klastr je transkripčně reprimovaný faktorem Egr2 a zároveň posttranskripčně inhibuje Egr2.

Klíčová slova: regulace transkripce, mikroRNA, miR-17-92 klastr, makrofágová diferenciace, PU.1, Egr2

Abstract

miR-17-92 cluster (Oncomir1) encodes seven microRNAs (miRNA, miR) regulating many biological processes including proliferation, differentiation or apoptosis. Overexpression of microRNAs encoded by miR-17-92 cluster is found in a number of tumors including acute and chronic myeloid leukemias (Dixon-McIver et al., 2008; Li et al., 2008; Venturini et al., 2007). Myeloid progenitors express miR-17-92 cluster at a high level, while macrophage differentiation associates with its downregulation. Our laboratory found, that miR-17-92 cluster is repressed by transcription factor Early growth response 2 (Egr2) upon differentiation of primary myeloid PUER progenitors, induced with transcription factor PU.1. Aim of this thesis is to further test the abovementioned data by preparing a reporter vectors set, carrying various fragments of miR-17-92 putative promoter, which enables us to study regulation of transcription of miR-17-92 cluster. This task complicated by presence of increased GC content of the miR-17-92 promoter was successfully accomplished resulting in amplification of eight fragments containing the various parts of miR-17-92 promoter including region -3.3 to 0 kb relative to the start of miR-17-5p sequence, that were inserted into pGL3 reporter vector.

Transfection of pGL3 reporter vector carrying -3.3;-0kb fragment of miR-17-92 putative promoter to NIH3T3 and HeLa cells followed by functional assay resulted in significant inhibition of miR-17-92 cluster regulatory regions by Egr2 factor. These results further documented that the repression of miR-17-92 cluster by Egr2 is independent on transcription factor PU.1, that transcriptionally activates expression of Egr2 in myeloid progenitors. The repression mechanism of miR-17-92 cluster that newly includes Egr2 is probably not limited to hematopoietic cells.

MicroRNAs and their target genes can create mutually reciprocal regulatory circuits. Three microRNAs encoded by miR-17-92 cluster (miR-17-5p, miR-20a and miR-92-1) are predicted (TargetScan) to inhibit expression of the transcription factor Egr2, presumably by binding to 3' untranslated region (3'UTR) of Egr2 mRNA. We therefore prepared reporter vectors carrying (3'UTR) of Egr2, containing either predicted binding sites of miR-17-92 cluster or their mutants. Cotransfection of the reporter vectors carrying 3'UTR of transcription factor Egr2 together with the expression vector carrying and overexpressing miR-17-92 cluster into HeLa cells resulted in inhibition of the reporter expression thus confirmed earlier observation from myeloid progenitors, that microRNA of miR-17-92 cluster are able to inhibit Egr2 transcription factor by binding into its 3'UTR region.

In conclusion, my data support the overall conclusion found in the laboratory that miR-17-92 cluster is transcriptionally repressed by Egr2 and in turn that miR-17-92 cluster has ability to inhibit Egr2, indicating the existence of possible mutual regulation between Egr2 and miR-17-92 cluster.

Key words: regulation of transcription, microRNA, miR-17-92 cluster, macrophage differentiation, PU.1, Egr2

1 Literární přehled

1.1 Regulace genové exprese

Eukaryotický organizmus je složen z mnoha různých typů buněk. Jednotlivé buňky mají stejnou genetickou výbavu, ale odlišují se na úrovni exprese genů. Genová exprese se skládá z řady procesů zahrnujících transkripci, posttranskripční úpravy, translaci a posttranslační úpravy. Transkripce nebo-li překlad představuje proces, při kterém je sekvence DNA kódující určitý gen přepsána v heterogenní jadernou RNA (hnRNA). hnRNA následně podstupuje sérii úprav zahrnujících přidání čepičky (modifikace 5' konce metylovou skupinou), polyadenylaci 3' konce a sestřih intronů. Tyto úpravy vedou ke vzniku mediátorové RNA (mRNA), která je jadernými póry transportována z jádra do cytoplasmy. V cytoplasmě je informace uložená v mRNA na ribosomech přeložena do aminokyselinové sekvence proteinů. Tento proces se označuje jako translace a je následován řadou posttranslačních modifikací. Genová exprese je pravděpodobně regulována na všech zmíněných úrovních (Alberts et al., 1998).

V posledním desetiletí byl identifikován zcela nový mechanismus regulace genové exprese na posttranskripční úrovni pomocí krátkých RNA molekul, které byly označeny jako miRNA (Bartel, 2004).

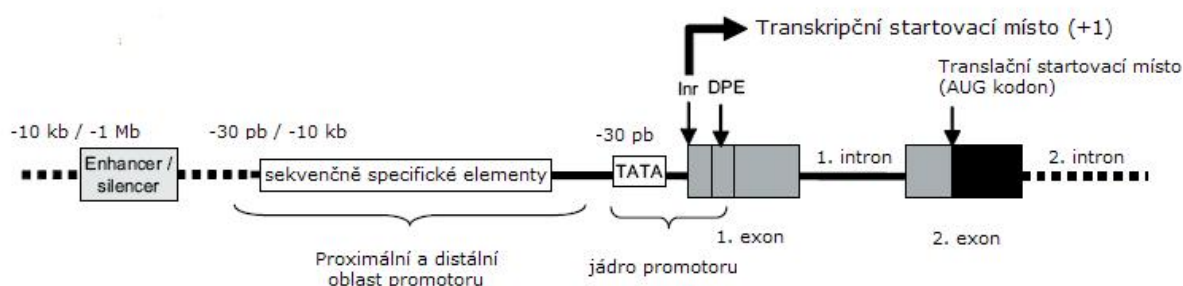
1.1.1 Regulace transkripce

První klíčový krok v regulaci genové exprese představuje iniciace transkripce. Transkripce je kontrolována ze dvou regulačních oblastí. První z nich se nachází v bezprostřední blízkosti kódující oblasti genu a je označována jako promotor. Oblast promotoru můžeme rozdělit do dvou částí: jádra promotoru a proximální a distální části (viz *Obr. 1*) (Delgado and Leon, 2006). Druhou oblastí jsou enhancery nebo silencery. Regulační oblasti jsou tvořeny specifickými elementy rozpoznávanými buď obecnými transkripčními faktory zajišťujícími bazální transkripci a nebo specifickými transkripčními faktory, které určují, v jaké míře bude daný gen exprimován (Rosypal, 2000). Další úrovní, na které může být iniciace transkripce kontrolována je chromatin nebo DNA metylace.

1.1.1.1 Oblasti kontrolující iniciaci transkripce

1.1.1.1.1 Jádru promotoru

Jádrem promotoru je označována minimální oblast DNA dostačující pro řízení iniciace transkripce *in vitro*, pouze za pomoci RNA polymerázy II (Pol II) a obecných transkripčních faktorů (GTF) (Martinez, 2002). Nacházejí se zde specifické promotorové elementy pomáhající určit místo transkripčního startu (TSS) (viz *Obr. 1*). Prvním klíčovým motivem je TATA box, sekvence bohatá na A/T nukleotidy nacházející se 25 až 30 nukleotidů před TSS. Je rozpoznáván TBP (TATA-binding protein), pomocí kterého řídí iniciaci transkripce. Dalším motivem je Iniciátor (Inr) (Smale and Baltimore, 1989). Inr je tvořen na pyrimidin bohatou sekvencí a nachází se v těsném okolí TSS. Jeho sekvence je rozpoznávána některými TAF (TBP-associated factors), které jsou spolu s TBP součástí TFIID (transcription IID) (Chalkley and Verrijzer, 1999). Třetím motivem je DPE. Tento motiv se nachází přibližně 30 nukleotidů za TSS. Je převážně součástí promotorů, které postrádají TATA box a stejně jako předchozí elementy je rozpoznáván TFIID (Burke and Kadonaga, 1996). Promotory se mohou lišit skladbou sekvencně specifických elementů (Suzuki et al., 2001). Odlišná architektura jader promotorů naznačuje, že obecné transkripční faktory mohou také přispívat k regulaci genové exprese nezávisle na enhancerech (Novina and Roy, 1996).



Obr. 1 Schéma regulačních oblastí kontrolujících genovou expresi. Jádru promotoru s TATA boxem, iniciátorem a „downstream“ promotorovým elementem (DPE), proximální a distální regulační oblasti se sekvencně specifickými elementy a enhancery/silencery. Převzato a upraveno z (Delgado and Leon, 2006).

1.1.1.1.2 Proximální a distální úsek promotoru

Proximální a distální části promotoru obsahují specifické elementy, které jsou rozpoznatelné sekvenčně specifickými faktory. Přesná hranice mezi oběma částmi není přesně stanovena. Jako proximální oblast se většinou označuje úsek ležící 30 až 200 nukleotidů před TSS. Najdeme zde elementy typické pro velkou řadu promotoru jako například GC box, CAAT box nebo oktamer. Proximální oblast se spolu s jádrem promotoru podílí na bazální transkripci. Distální část je důležitá pro tkáňově specifickou expresi, může se nacházet i v poměrně velké vzdálenosti od TSS (~10kb a více) (Delgado and Leon, 2006).

1.1.1.1.3 Enhancery a silencers

Enhancery a silencers se podílejí na tkáňově specifické regulaci. Tyto oblasti se mohou nacházet několik kb až 1 Mb daleko od promotorové oblasti genů, na jejíž regulaci se podílejí (Lettice et al., 2003). Transkripci mohou jak aktivovat, tak inhibovat. Mohou být rozsáhlé až 1 kb a můžeme je nalézt před nebo za TSS, dokonce i v oblasti intronů (Gillies et al., 1983). Jedním z modelů komunikace mezi enhancery/silencers a promotorovou oblastí je ohyb DNA vlákna, což umožní přiblížení těchto dvou oblastí k sobě (Petrascheck et al., 2005).

1.1.1.2 Faktory podílející se na regulaci transkripce

1.1.1.2.1 Obecné transkripční faktory

Transkripce protein kódujících genů je zajištěna pomocí Pol II. Tato DNA dependentní RNA polymeráza je složitý komplex tvořený 12-ti podjednotkami (Cramer et al., 2000). I přes svoji značnou komplexitu není Pol II sama schopna rozpoznat oblast promotoru a začít iniciaci transkripce (Matsui et al., 1980). Důležitá je přítomnost GTF, které se spolu s Pol II postupně vážou do oblasti promotoru a vytvářejí preiniciační komplex (PIC) (Buratowski et al., 1989). Tvorba PIC začíná vazbou TFIID do malého žlábků TATA boxu, což způsobí ohyb DNA a umožní rozpoznání dalších sekvencí jako je Inr popřípadě DPE pomocí TAF (Nakajima et al., 1988). Následuje navázání TFIIA, TFIIB, TFIIF-Pol II a TFIIIE (Maxon et al., 1994; Nikolov et al., 1995; Tan et al., 1996). Posledním navázaným GTF je

TFIIH vlastní helikázovou a kinázovou aktivitu, díky které může dojít k uvolnění Pol II z oblasti promotoru (Kumar et al., 1998). Některé práce ukazují, že PIC se netvoří postupným skládáním, ale pomocí Pol II holoenzymového komplexu (Chao et al., 1996; Ossipow et al., 1995).

1.1.1.2.2 Specifické transkripční faktory

Specifické transkripční faktory zajišťují tkáňově specifickou expresi genů. Váží se na základě sekvenční komplementarity do specifických DNA regulačních oblastí prostřednictvím DNA-vazebných motivů. Příkladem takovýchto motivů můžeme uvést homeodoménu, motiv zinkového prstu nebo leucitového zipu. Transkripční faktory můžeme rozdělit podle jejich působení na aktivátory a represory. Jedním ze způsobů, jak mohou specifické transkripční faktory regulovat transkripci, je ovlivnění uspořádání PIC. Aktivátory usnadňují jeho vznik, zatímco represory jeho vznik zpomalují nebo inhibují. Další možností ovlivnění transkripce pomocí specifických transkripčních faktorů je jejich interakce s regulačními proteiny s enzymatickou aktivitou, která umožní remodelaci chromatinové struktury (Alberts et al., 1998). V buňce se koncentrace specifických transkripčních faktorů pohybuje na velmi nízké úrovni, prostřednictvím vnějších signálů může dojít k výraznému zvýšení jejich hladiny. Každý promotor může být ovlivněn velkou řadou transkripčních faktorů, jejich společná souhra poté určuje v jaké míře bude daný gen v buňce exprimován. Příklad specifických transkripčních faktorů najdeme v kapitole 1.4.3.1.

1.1.1.3 Chromatinová struktura a její vliv na regulaci transkripce

DNA je spolu s pomocnými proteiny organizována do kompaktní chromatinové struktury. Základní stavební jednotkou chromatinového vlákna je nukleosom. Jádrem nukleosomu je tvořeno histonovým oktamerem, který je složený vždy dvojicí histonů H2A, H2B, H3 a H4 (Luger et al., 1997), kolem kterého je obtočeno 146 bp DNA. Jednotlivá histonová jádra jsou mezi sebou propojená 80 - 200 nukletidů dlouhým úsekem DNA. Propojení jednotlivých nukleosomů pomocí histonu H1 kompaktuje DNA do 30 nm vlákna (Hizume et al., 2005). Další stupně kondenzace jsou zajištěny postupným sbalováním chromatinových vláken. Chromatin hraje centrální roli v řadě biologických procesů. Umožňuje rozdělení mateřské DNA do dceřiných buněk, stabilizuje DNA nebo se může

podílet na regulaci transkripce. Jako dynamická struktura je schopen přecházet z transkripčně inhibovaného heterochromatinu do transkripčně aktivního euchromatinu. Aby mohlo dojít k iniciaci transkripce, musí se kompaktní struktura DNA otevřít, čímž umožní transkripčním faktorům s ní interagovat (Wolffe, 2001).

1.1.1.3.1 Chromatinové modifikace

Každý histon má N-terminální ocásek, který je často předmětem kovalentních modifikací. Modifikace zahrnují přidání nebo odebrání specifických skupiny jako je metylová, acetylová, fosfátová, ADP-ribosilová, ubiquitinová nebo sumoylová (Kouzarides, 2007). Posttranslační modifikace histonů jsou zprostředkovány pomocí chromatin modifikujících komplexů. Mezi nejvíce prostudované modifikace patří acetylace a metylace.

Histon acetyltransferázy jsou enzymy schopné přinášet acetylovou skupinu na lysinový zbytek N-terminálního ocásku histonu. Histony jsou tvořeny velkým množstvím kladně nabitých aminokyselin, které neutralizují záporný náboj DNA. Po přidání acetylové skupiny k histonovému ocásku dochází ke změně náboje a oslabení histon-DNA vazby. Acetylace může mít také vliv na interakce mezi dvěma histony. Tyto změny vedou k rozvolnění struktury chromatinu, který se tím stává dostupný pro transkripční faktory (Hebbes et al., 1988; Lee et al., 1993a). Acetylace histonů je reverzní proces. Acetylová skupina může být z histonového ocásku odstraněna pomocí histon deacetyláz, což vyústí v genovou represi.

Druhou velmi častou modifikací histonů je metylace. Metylová skupina může být připojena k lysinovému nebo argininovému zbytku histonu H3 nebo H4 (Ma et al., 2001; Wang et al., 2001). Na rozdíl od acetylace, metylace lysinu se zdá být relativně stabilní histonovou modifikací poskytující ideální epigenetickou značku pro dlouhodobé udržení chromatinového stavu, který je přenášen do dceřiných buněk (Jenuwein, 2001). Regulační aktivita, kterou metylová skupina zprostředkovává závisí nejen na umístění, ale také na metylovaném stavu, tzn. jestli se nachází v mono-, di- nebo trimetylovaném stavu (Santos-Rosa et al., 2002). Teprve nedávno bylo ukázáno, že metylace lysinu může být enzymaticky odstraněna. První popsanou demetylázou je lysin specifická demetyláza 1 (LSD1) (Shi et al., 2004). Jarid1b, patřící do Jarid1 rodiny demetyláz H3K4 (Secombe and Eisenman, 2007), byl popsán v souvislosti s represí miR-17-92 klastru (Pospíšil et al., připraveno pro publikaci).

1.1.1.4 DNA metylace a genová exprese

DNA metylace je postreplikační modifikací cytosinu nacházejícího se v CpG dinukleotidech. Metylace CpG ostrovů se obvykle projeví v represi daného genu (Bird and Wolffe, 1999). Metylační vzorec DNA se v průběhu vývoje mění (Kafri et al., 1992). Na začátku embryonálního vývoje, v době prvních dělení zygoty, nastává demetylace celého genomu s výjimkou imprintovaných genů. Nový metylační vzorec se začne vytvářet během gastrulace pomocí *de novo* metyltransferáz Dmnt3a a Dmnt3b (Okano et al., 1999). Vytvořený metylační vzorec je dále zachováván pomocí udržovací metyltransferázy Dmnt1 (Bestor, 2000). V průběhu diferenciaci buněk poté dochází k nárůstu metylace. Až 90% CpG dinukleotidů v genomu podléhá metylaci, která je dále přenášena do dceřiných buněk.

1.2 MikroRNA

MikroRNA jsou nová skupina nekódujících jednořetězcových RNA dlouhých 18 až 22 nukleotidů, které se podílejí na kontrole genové exprese na posttranskripční úrovni. Prostřednictvím sekvenčně specifické vazby do 3'UTR cílové mRNA způsobí mikroRNA, v závislosti na míře komplementarity, represi nebo degradaci cílové mRNA a tím umlčení exprese daného genu. (Bartel, 2004; Lim et al., 2005). První miRNA Lin-4 byla objevena v roce 1993 u *Caenorhabditis elegans*. Tento gen kontrolující časování larválního vývoje *C. elegans* nekóduje protein, ale malou RNA (Lee et al., 1993b). Od té doby byly miRNA identifikovány u všech studovaných mnohobuněčných organismů, nedávno byly dokonce popsány i u organismů jednobuněčných (Molnar et al., 2007). U člověka již bylo identifikováno více jak 700 miRNA, které se účastní řady biologických procesů zahrnujících diferenciaci, proliferaci nebo apoptózu. Na důležitost regulace genové exprese pomocí miRNA ukazuje i fakt, že miRNA jsou dysregulovány v řadě nádorů a onemocnění (Petrocca et al., 2008; Volinia et al., 2006).

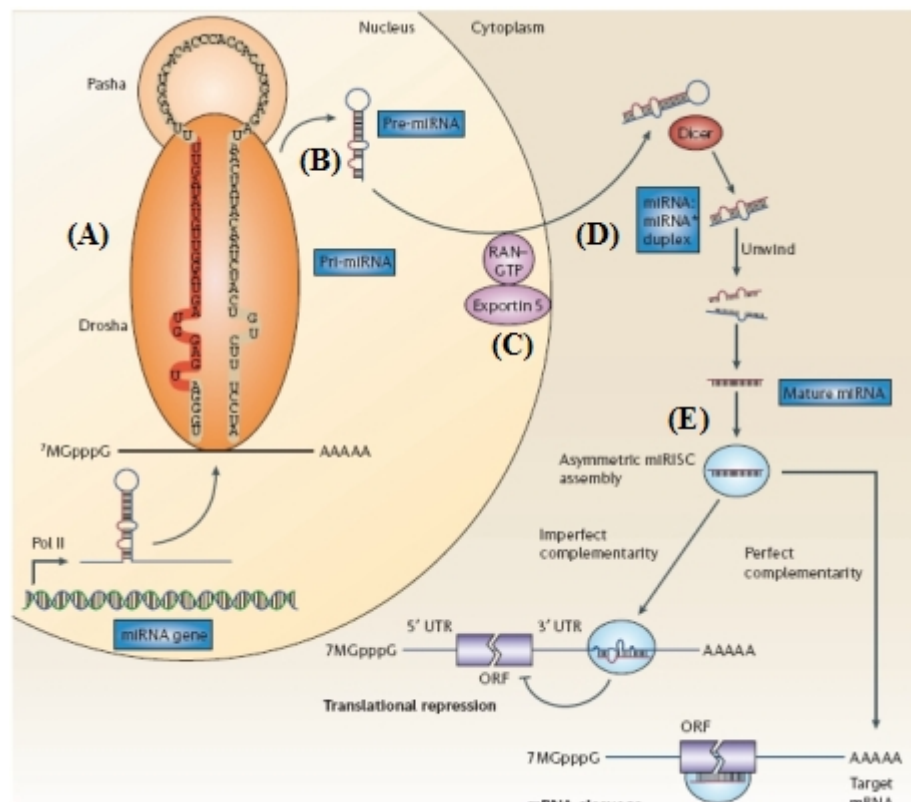
1.2.1 Genová organizace mikroRNA

MikroRNA mohou být kódované jako nezávislé intergenové transkripční jednotky se strukturou obdobnou protein kódujícím genům. Až 30 % miRNA je kódováno v intronech protein kódujících genů (Rodriguez et al., 2004), jejich orientace je převážně stejná jako jejich hostitelské geny. miRNA ležící v intronových oblastech mohou být transkribovány z vlastního promotoru, nebo jsou přepisovány současně s hostitelským genem (Bartel, 2004). MikroRNA jsou v genomu často lokalizovány do klastrů, jež se přepisují jako polycistronní mRNA. Tyto miRNA sdružené v jednom klastru mají společnou regulaci exprese a velmi často spolu funkčně souvisí.

1.2.2 Biogeneze mikroRNA

MikroRNA jsou přepisovány pomocí Pol II, stejně jako protein kódující geny, za vzniku primárního transkriptu (pri-miRNA). Pri-miRNA může být až stovky bazí dlouhý a je opatřený 5' čepičkou a poly A koncem (viz Obr. 2A). V jádře je pri-miRNA štěpen pomocí

RNA III endonukleázy Drosha na 60-ti až 70-ti nukleotidové miRNA prekurzorové vlásenky (pre-miRNA), které jsou zakončené 5' fosfátem a přibližně dvou nukleotidovým 3' přesahem (viz *Obr. 2B*) (Lee et al., 2002). pre-miRNA jsou aktivně transportovány z jádra do cytoplasmy pomocí Ran-GTP závislým jaderným receptorem Exportin-5 (viz *Obr. 2C*) (Lund et al., 2004). V cytoplasmě další enzymatický komplex obsahující RNA III endonukleázu Dicer, procesuje pre-miRNA za vzniku 18 až 22 nukleotidů dlouhé dvouvláknové RNA označované jako miRNA:miRNA* duplex (viz *Obr. 2D*) (Hutvagner et al., 2001; Ketting et al., 2001), jež dá následně vzniknout jednovláknové maturované miRNA. Maturovaná miRNA obsahuje v oblasti zvané „seed“ sekvence sekvenci komplementární k 3'UTR cílového genu. Maturovaná miRNA je inkorporována do multiproteinového komplexu RISC (RNA inducing silencing complex). RISC komplex se poté váže k cílové mRNA na základě komplementarity mezi maturovanou miRNA a 3'UTR cílové mRNA, a způsobí translační umlčení nebo degradaci mRNA v závislosti na míře komplementarity dané miRNA (viz *Obr. 2E*) (Martinez et al., 2002; Schwarz et al., 2003).

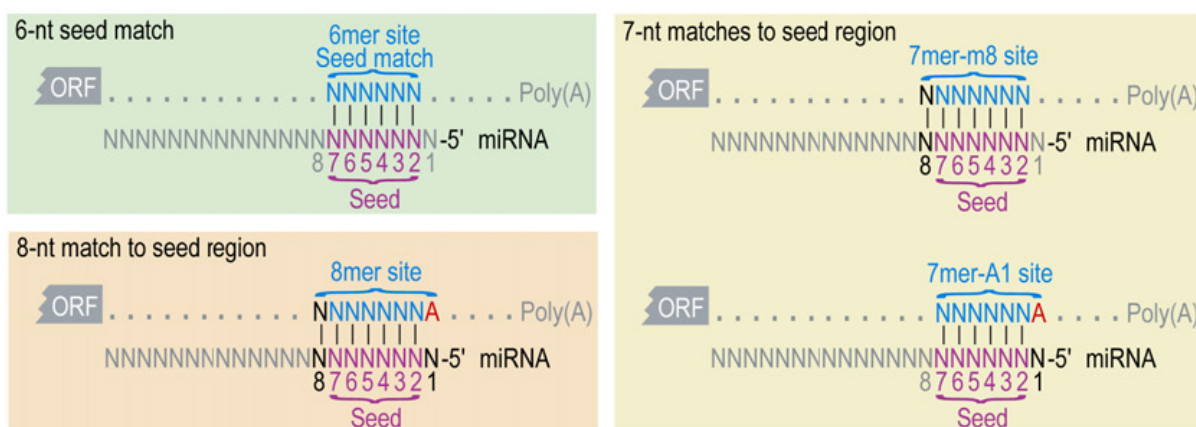


Obr. 2 Schéma biogeneze mikroRNA. A) pri-miRNA B) pre-miRNA C) transport pre-miRNA z jádra do cytoplasmy D) miRNA:miRNA* duplex E) maturované miRNA vlákno vázající se do RISC

komplexu a inhibice cílové mRNA na základě míry komplementarity bazí. Převzato a upraveno z (Esquela-Kerscher and Slack, 2006).

1.2.3 Struktura vazebného místa mikroRNA

Pro vazbu miRNA do 3'UTR mRNA cílového genu na základě párování komplementárních nukleotidů má rozhodující význam oblast komplementarity takzvaná „seed“ sekvence. Jako „seed“ sekvence je označován úsek 1. až 8. nukleotidu na 5' konci miRNA. Minimální nutná komplementarita je na pozici 2. až 7. nukleotidu („6mer seed match“), maximální pak na pozici 1. až 8. nukleotidu („8mer seed match“). Inhibice mRNA prostřednictvím miRNA je nejčastěji spojována se čtyřmi typy vazeb, jsou znázorněny na *Obr. 3* (Lewis et al., 2005; Lewis et al., 2003). Síla vazby k 3'UTR cílové mRNA může být ještě zvýšena komplementaritou na zbývajících pozicích nukleotidů miRNA. Na sílu vazby má dále vliv lokální kontext 3'UTR mRNA cílového genu v okolí vazebného místa mikroRNA. Vazbu a tím i represivní funkci mikroRNA zvětšuje AU (Adenosin,Uracyl) bohaté složení v okolí vazebného místa. Naopak efektivitu vazebného místa snižuje jeho blízkost do 15-ti nukleotidů k stop kodonu nebo pozice uprostřed dlouhých UTR (Grimson et al., 2007).



Obr. 3 Schéma možné komplementarity vazebných míst mezi miRNA a cílovou mRNA. Horní řádek znázorňuje cílovou mRNA v 5' - 3' orientaci, dolní pak miRNA v orientaci 3' - 5'. Převzato z (Grimson et al., 2007).

1.2.4 Role mikroRNA v krvetvorbě

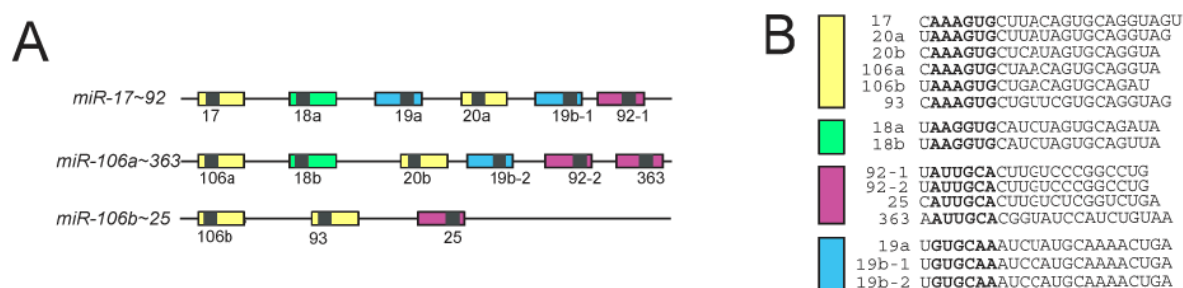
MikroRNA hrají důležitou roli v hematopoéze. Téměř každé stádium hematopoézy je ovlivněno určitými miRNA a jejich chybná exprese je spojena s řadou onemocnění. První důkaz o tom, že miRNA se účastní hematopoézy poskytli Chen a kol., 2004, kteří zjistili, že miR-181a, miR-223 a miR-142 jsou preferenčně exprimované v hematopoetické tkáni (kostní dřeni, brzlíku a slezině). miR-181a je vysoce exprimována v B lymfocytech a její zvýšená exprese v hematopoetických kmenových buňkách vede přednostně ke vzrůstu tohoto typu buněk (Chen et al., 2004). Pro B-buněčnou diferenciaci jsou dále důležité miR-150 podílející se na kontrole přechodu z pro-B do pre-B buněčného stádia (Monticelli et al., 2005) a miR-155 podílející se na imunoglobulinovém přesmyku v B lymfocytech (Rodriguez et al., 2007; Vigorito et al., 2007). Mezi ověřené cíle miR-155 patří i PU.1 transkripční faktor důležitý při myeloidní a B-buněčné diferenciaci (O'Connell et al., 2008). Během diferenciaci a maturace erytrocytů dochází ke snížení hladiny miR-221 a miR-222. Obě tyto miRNA inhibují Kit receptor, klíčový faktor kontrolující proliferaci hematopoetických buněk (Felli et al., 2005).

1.2.4.1 MikroRNA v myeloidní diferenciaci

Důležitou roli v myeloidní diferenciaci hraje miR-223. V hematopoetických prekurzorových buňkách je tato miRNA exprimována na nízké úrovni, v průběhu granulocytární diferenciaci, nikoli však monocytární diferenciaci, dochází k výraznému nárůstu hladiny miR-223 (Fazi et al., 2005). Další miRNA, která se podílí na vývoji granulocytů, je miR-27. Jedním z cílů miR-27 je AML1 faktor, jehož exprese se v průběhu granulocytární diferenciaci značně snižuje. Pro správný průběh granulocytární diferenciaci je nutné, aby došlo k navýšení miR-27, která inhibuje AML1 faktor (Feng et al., 2009). Pro monocytární diferenciaci je důležitý miR-424 (Rosa et al., 2007) a miR-17-5p, 20a a 106b kódované miR-17-92 klastrem a jeho paralogem miR-106a-92, jejichž exprese se během monocytární diferenciaci snižuje (Fontana et al., 2007).

1.3 miR-17-92 klastř

miR-17-92 je příkladem polycistronního genu kódujícího celkem sedm mikroRNA (miR-17-5p, miR-17-3p, miR-18a, miR-19a, miR-20a, miR-19b-1 a miR-92-1) (viz *Obr. 4A*). U člověka je lokalizovaný na 13 chromosomu ve třetím intronu genu C13orf25 (Chromosome 13 open reading frame 25) (Ota et al., 2004), u myši ho nalezneme na chromosomu 14. Série duplikačních a delečních událostí v průběhu evoluce dala vzniknout jeho dvěma paralogům miR-106a-363 a miR-106b-25 (Tanzer and Stadler, 2004). Klastř miR-106a-363 je u člověka a myši lokalizován na chromosomu X a kóduje celkem šest miRNA (miR-18b, miR-19b-2, miR-20b, miR-92-2, miR-106a a miR-363). Klastř miR-106b-25 je u člověka lokalizovaný ve třináctém intronu genu Mcm7 na chromosomu 7 a u myši na chromosomu 5, celkem kóduje tři miRNA (miR-25, miR-93 a miR-106b) (viz *Obr. 4A*). O významu miR-17-92 klastřu a jeho paralogů svědčí fakt, že jejich genové uspořádání a sekvence jsou vysoce konzervovány u všech obratlovců a podobné uspořádání můžeme najít i u řady bezobratlých (Tanzer and Stadler, 2004). Na rozdíl od miR-17-92 a miR-106b-25 klastřů, které jsou oba v řadě tkání a buněčných linií exprimovány na vysoké úrovni, miR-106a-363 klastř je nedetekovatelný nebo je exprimován na minimální úrovni (Ventura et al., 2008). Všechny mikroRNA kódované těmito klastřy jsou si sekvenčně velmi podobné. Podle identické „seed“ sekvence je můžeme rozdělit do čtyř rodin (viz *Obr. 4B*).



Obr. 4 Organizace miR-17-92 klastřu a jeho paralogů. A) Schématické znázornění tří mikroRNA klastřů. Barvené boxy označují pre-miRNA. Černé boxy vyznačují maturované miRNA. B) Sekvenční srovnání miRNA všech tří klastřů. miRNA se stejnou „seed“ sekvencí jsou rozděleny do čtyř barevně označených skupin. Převzato a upraveno z (Ventura et al., 2008).

1.3.1 Funkce miR-17-92 klastru

K objasnění funkce miR-17-92 klastru přispěla identifikace genů, jejichž mRNA jsou tímto klastrem inhibovány. Řada z nich patří mezi klíčové regulátory buněčného cyklu, apoptózy a významné tumor supresory. miR-17-92 klastr inhibuje CDKN1A/p21^{Cip1/Waf1} (Cyclin-dependent kinase inhibitor 1) blokující přechod buněčného cyklu z G1 do S fáze (Fontana et al., 2008), TGFβ (Transforming growth factor-β) (Petrocca et al., 2008), BIM (Bcl2 interacting mediator of cell death) významný proapoptotický protein (Fontana et al., 2008; Ventura et al., 2008; Xiao et al., 2008), dále Rbl2 (retinoblastoma-like 2 protein) patřící do pRB tumor supresorů (Lu et al., 2007) a fosfatázu PTEN (Phosphate and tensin homolog) negativní regulátor proteinkynázy B (Fontana et al., 2008; Xiao et al., 2008). miR-17-92 klastr dále stimuluje nádorovou neovaskularizaci inhibicí antiangiogenních faktorů CTGF (Connective tissue growth factor) a Tsp1 (Thrombospondin-1) (Dews et al., 2006). Fontana a kol., 2007 prokázali, že miR-17-5p, miR-20a a miR-106b, které jsou kódované miR-17-92 klastrem a jeho paralogem miR-106b-25, se podílejí na regulaci faktoru AML1 a tím i na monocytární-makrofágové diferenciaci. AML1 je DNA-vazebnou podjednotkou hematopoetického transkripčního faktoru CBF (Core binding factor), který mimo jiné kontroluje expresi M-CSF receptoru, jenž má zásadní význam pro monocytární-makrofágovou diferenciaci. Ztráta AML1 faktoru u embryonální kmenové buněčné kultury se projeví poškozením monocytární diferenciace, což jasně ukazuje, že AML1 je pro diferenciaci monocytů nepostradatelný (Okuda et al., 1996). V hematopoetických prekurzorových buňkách je AML1 na nízké úrovni, v průběhu maturace dochází k jeho navýšení, naopak hladina miR-17-5p, 20a a 106a se v průběhu diferenciace makrofágů snižuje. AML1 je zřejmě schopen inhibovat hladinu jednotlivých mikroRNA vazbou do promotorové oblasti příslušných klastrů. miR-17-5p, 20a a 106b jsou naopak schopné inhibovat AML1 prostřednictvím jejich interakcí s 3'UTR tohoto faktoru. Mezi miR-17-5p, 20a, 106b a AML1 faktorem existuje negativní zpětná vazba (Fontana et al., 2007).

Nepostradatelnost miR-17-92 klastru prokázaly pokusy na myších, u kterých byl miR-17-92 klastr a jeho paralogy deletovány. Delece miR-17-92 klastru vedla k neonatální smrti jedinců, která byla způsobena hypoplasií plic a defekty v uzavírání ventrikulárního septa. Při současné deleci miR-17-92 klastru a jeho paralogu miR-106b-25 došlo k ještě těžším patologickým defektům a zvýšené apoptóze v oblasti nervové soustavy a jater. Delece klastrů miR-106b-25 a miR-106a-363, ať už jednotlivě nebo v kombinaci, neměly žádný

(dosud zjištěný) fenotyp. Tyto výsledky poskytují důkaz, že mikroRNA kódované miR-17-92 klastrem jsou nepostradatelné pro vývoj myšního organismu a dále, že miR-17-92 klastr je schopen substituovat esenciální mikroRNA kódované miR-106b-25 klastrem (Ventura et al., 2008). Další deleční pokusy ukázaly, že hlavními onkogenními miRNA miR-17-92 klastru jsou miR-19a a 19b (Mu et al., 2009; Olive et al., 2009; van Haften and Agami, 2010).

1.3.2 miR-17-92 klastr v onkogenezi

miR-17-92 klastr známý též jako Oncomir1 byl prvním mikroRNA klastrem, jehož amplifikace byla potvrzena v nádorech. Lidský genomický lokus C13orf25 zahrnující miR-17-92 klastr je amplifikován v různých typech B buněčných lymfomů (Ota et al., 2004). Od té doby byly zvýšené hladiny miR-17-92 klastru potvrzeny u narůstajícího počtu malignit zahrnujících malobuněčný plicní nádor (Hayashita et al., 2005), akutní myeloidní leukémii (Dixon-McIver et al., 2008; Li et al., 2008), chronickou myeloidní leukémii (Venturini et al., 2007), B-buněčný a NeHodgkinský lymfom z plášťové zóny (He et al., 2005; Ota et al., 2004; Tagawa et al., 2005; Tagawa et al., 2007; Tagawa et al., 2004), neuroblastomy (Fontana et al., 2008) a nádory odvozené z prsu, prostaty, slinivky břišní, žaludku a tlustého střeva (Petrocca et al., 2008; Volinia et al., 2006). Lokus *13q31,3* kódující miR-17-92 klastr je častým inzerčním místem retrovirálně indukovaných myších leukémií (Cui et al., 2007; Wang et al., 2006).

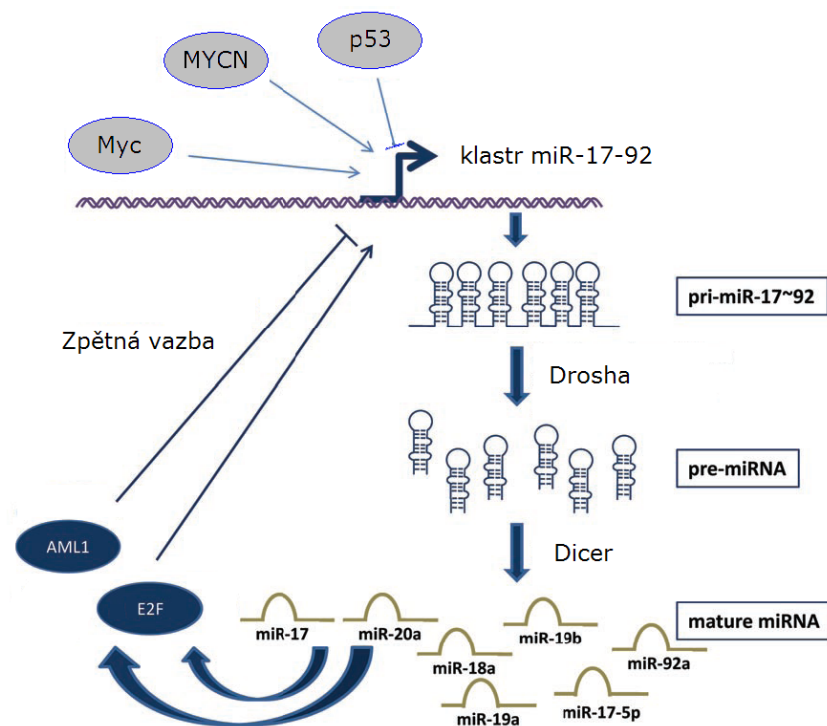
Vysoká hladina miRNA může mít několik příčin. Jednou z nich je již zmíněná amplifikace genomického lokusu *13q31,3* (Ota et al., 2004), kde se nachází miR-17-92 klastr. Další příčiny vysoké hladiny miRNA můžeme hledat v regulaci transkripce miR-17-92 klastru.

1.3.3 Regulace miR-17-92 klastru

miR-17-92 klastr je pozitivně regulován proto-onkogenem Myc (viz *Obr. 5*). Chromatinové imunoprecipitační experimenty prokázaly, že Myc je schopen vázat se do regulační oblasti miR-17-92 klastru v pozici -1480 nukleotidů před kódující oblastí miR-17-5p (O'Donnell et al., 2005). Pozitivní regulace tohoto proto-onkogenu na miR-17-92 klastr byla také potvrzena Dews a kol., 2006, kteří zjistili, že tumory s vysokou hladinou Myc mají značně zvýšenou neovaskularizaci. Dalším faktorem, který pozitivně reguluje miR-17-92

klastr vazbou do jeho promotorové oblasti je Myc homolog MYCN. Agresivní formy neuroblastomů jsou spojeny s amplifikací tohoto transkripčního faktoru, který stimuluje expresi miR-17-92 klastru (Fontana et al., 2008). Dále bylo prokázáno, že členové rodiny E2F (E2F1, E2F2 a E2F3), mající důležitou roli v regulaci buněčného cyklu, jsou schopni vázat se do promotorové oblasti miR-17-92 klastru a aktivovat jeho expresi. miR-17-5p a miR-20a jsou naopak schopné inhibovat E2F transkripční faktory vazbou do jejich 3'UTR, čímž se zde vytváří negativní zpětná vazba (O'Donnell et al., 2005; Sylvestre et al., 2007; Woods et al., 2007).

Jsou známy také represory miR-17-92 klastru. Jedním z nich je AML1 faktor hrající důležitou roli v monocytární-makrofágové diferenciaci. AML1 je schopen inhibovat expresi miR-17-92 klastru vazbou do jeho promotorové oblasti (Fontana et al., 2007). Nedávno bylo zjištěno, že p53 tumor supresor je schopen vázat se poblíž TATA boxu v regulační oblasti miR-17-92 klastru a tím ho inhibovat během hypoxie (Yan et al., 2009).



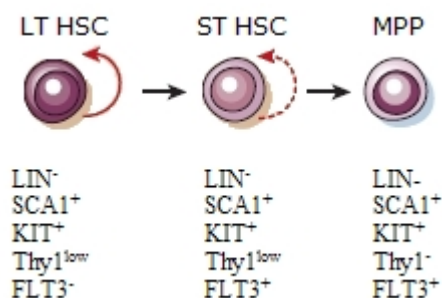
Obr. 5 Schéma regulace transkripce miR-17-92 klastru. Pozitivní regulace miR-17-92 klastru molekulami: Myc, MYCN a členů rodiny E2F, negativní regulace pomocí AML1 a p53 faktorů. Mezi miRNA kódovanými miR-17-92 klastrem a faktory AML1 a E2F existuje negativní zpětná vazba. Převzato a upraveno z (Bonauer and Dimmeler, 2009).

1.4 Krvetvorba a diferenciacie makrofágů

1.4.1 Hematopoetické kmenové buňky

Hematopoetické kmenové buňky (HSC) představují nezralé prekurzory všech krevních buněk využívající mechanismy zahrnující diferenciaci, proliferaci a apoptózu. Jsou to pluripotentní buňky se schopností diferenciacie do liniově i funkčně odlišných krevních buněk. Další jejich důležitou vlastností je schopnost sebeobnovy. Obě tyto vlastnosti jsou evidentní při transplantacích, kdy dochází ke kompletnímu obnovení krevního systému z dárcovských HSC (Korbling and Anderlini, 2001). HSC můžeme rozdělit na dlouhodobé (LT-HSC), jež jsou schopné sebeobnovy prakticky po neomezenou dobu, a krátkodobé (ST-HSC), u nichž je tato doba omezená. Další populací buněk vznikající z ST-HSC jsou multipotentní progenitory (MPP) (viz *Obr. 6*), jejichž schopnost sebeobnovy je snížena výrazně, přesto ji lze indukovat (Rosenbauer and Tenen, 2007). Jedním z faktorů ovlivňujících tuto vlastnost je FLT3 (FMS-related tyrosine kinase 3). Bylo zjištěno, že zvyšující se hladina tohoto faktoru v HSC je doprovázena ztrátou schopnosti sebeobnovy (Adolfsson et al., 2001). FLT3 se stal jedním z markerů umožňujících izolaci HSC (Christensen and Weissman, 2001). Myší HSC jsou dále charakterizovány tím, že neexprimují žádný liniově specifický antigen LIN (LIN⁻ - lineage specific antigen), jsou pozitivní na SCA1 (SCA1⁺ - stem cells associated antigen) a KIT antigeny (KIT⁺), a na nízké úrovni exprimují Thy1 (Thy1^{low} - T-cell antigen) (viz *Obr. 6*) (Ikuta and Weissman, 1992; Spangrude et al., 1988; Uchida and Weissman, 1992). Typickým markerem lidských HSC je povrchový antigen CD34 (Krause et al., 1996). Jak HSC diferencují, exprimují stále na vyšší úrovni antigen CD38, lidské HSC jsou proto často označovány jako CD34⁺ CD38⁻ (Terstappen et al., 1991).

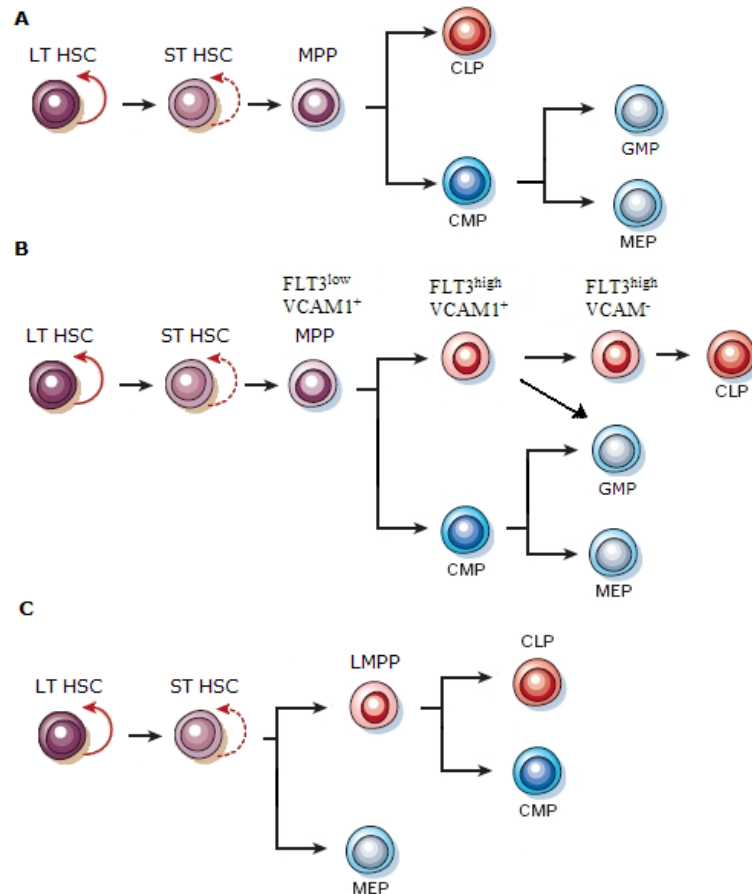
MPP mohou diferencovat do lymfoidní, myeloidní a erytroidní linie. Otázkou zůstává, jak je progenitorovým buňkám vybrán směr, kterým se vydají (determinace). Řada studií ukázala, že procesu determinace a diferenciacie buněk předchází zapnutí několika různých liniově přidružených expresních programů (Hu et al., 1997; Miyamoto et al., 2002). Tento proces je označován jako „priming“. Následná determinace a diferenciacie buněk do vybrané linie poté zahrnuje upevnění vybraného expresního programu a inhibici programů zbylých, které již nejsou zapotřebí.



Obr. 6 Hematopoetické kmenové buňky s typickými markery. LT-HSC dávají vzniknout ST-HSC, které diferencují v MPP. Červené šipky znázorňují schopnost sebeobnovy. Převzato a upraveno z (Lai et al., 2005; Reya et al., 2001).

1.4.2 Myeloidní a lymfoidní progenitorové buňky

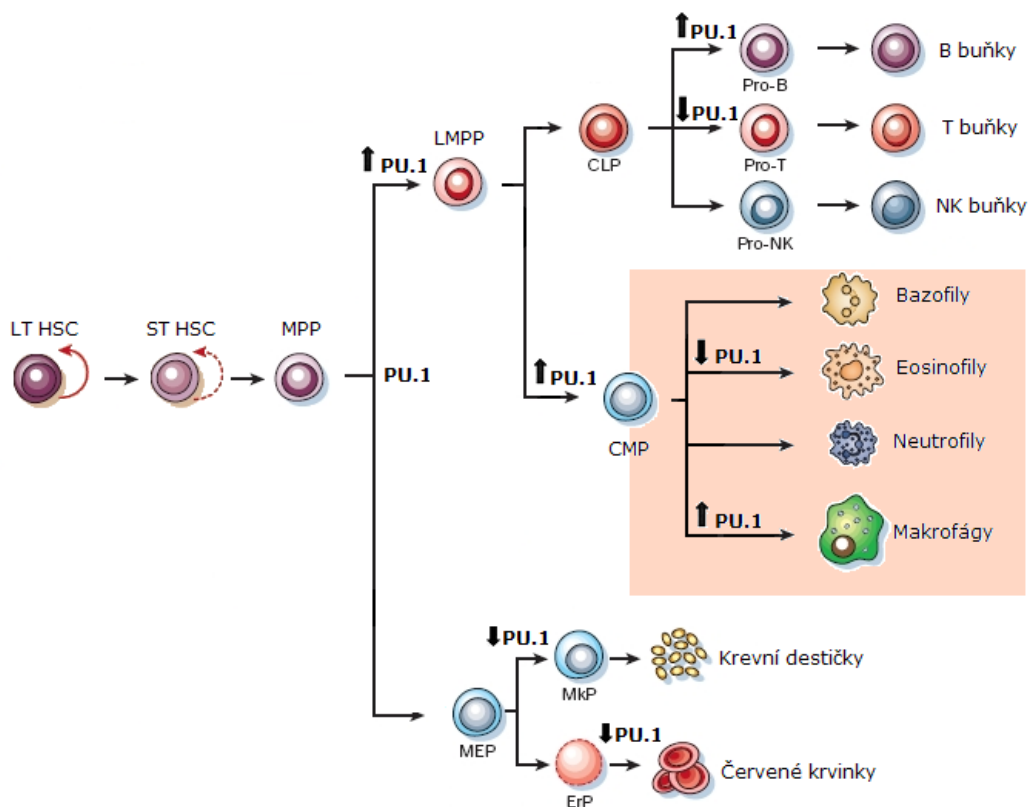
První krok liniové determinace nastává ve stádiu MPP. Původní model hematopoézy předpokládá, že MPP mohou diferencovat směrem k myeloidním nebo lymfoidním progenitorům (CMP, CLP) (viz *Obr. 7A*) (Kondo et al., 2001). CMP jsou buňky mající schopnost dát vzniknout všem buňkám myeloidní linie (Akashi et al., 2000). Jejich obdobou jsou CLP, které dají vzniknout všem buňkám lymfoidní linie (Kondo et al., 1997). Na základně expresní úrovně faktorů FLT3 a VCAM1 (vascular cell adhesion molecule 1) bylo zjištěno, že liniová determinace není přesně symetrická. Byly identifikovány buňky, které si udržují lymfoidní potenciál a zároveň jsou schopny dát vzniknout myeloidním buňkám (granulocytům a makrofágům) (viz *Obr. 7B*) (Lai and Kondo, 2006; Lai et al., 2005). Oba předešlé modely předpokládají, že megakaryocyt-erytroidní progenitory (MEP) se vyvíjejí z CMP. Adolfson a kol., 2005 navrhli, že MEP se oddělují mnohem dříve, aniž by prošly stádiem CMP (viz *Obr. 7C*).



Obr. 7 První krok liniové determinace multipotentních progenitorových buněk. **A)** Původní model vývoje krvetvorby z kmenových buněk. MPP dají vzniknout CLP nebo CMP. **B)** Model asymetrické determinace MPP založený na expresní úrovni FLT3 a VCAM1. **C)** Model předpokládající oddělení MEP v časných stádiích hematopoézy. LMPP – lymfo-myeloidní progenitory, GMP – granulocyt-makrofágové progenitory. Převzato a upraveno z (Adolfsson et al., 2005; Lai and Kondo, 2006).

1.4.3 Myeloidní diferenciaci

Myeloidní progenitorové buňky mohou diferencovat do granulocytárních buněk, mezi které patří neutrofilů, eosinofilů a bazofilů, nebo mohou dát vzniknout monocytům, které po vstupu do tkání diferencují do makrofágů (viz *Obr. 8*).



Obr. 8 Schéma hematopoézy a měnící se hladina PU.1 transkripčního faktoru. LH-HSC postupně diferencují do ST-HSC a MPP. MPP mohou diferencovat do MEP, ze kterých vznikají červené krvinky a krevní destičky, nebo do LMPP. LMPP mohou diferencovat směrem lymfoidním, dávající vzniknout B, T nebo NK (nature killer) buňkám nebo směrem myeloidním za vzniku granulocytů nebo makrofágů. Hnědě podbarvená oblast vyznačuje myeloidní linii. Šipky u PU.1 značí zvyšující nebo snižující se hladinu PU.1 transkripčního faktoru u dané linie. Převzato a upraveno z (Gangenahalli et al., 2005; Reya et al., 2001).

1.4.3.1 Hlavní faktory účastnící se myeloidní diferenciace

Transkripční faktory hrají zásadní úlohu v regulaci buněčného osudu. Jedním z klíčových regulátorů determinace myeloidních progenitorových buněk je transkripční faktor PU.1 (SPI1). Exprese tohoto transkripčního faktoru je omezena pouze na buňky hematopoetické linie. PU.1 patří do Ets rodiny, jejichž členové mají vysoce konzervovanou DNA-vazebnou doménu (ETS doména). ETS doména se nachází na C-terminálním konci proteinu, je tvořená přibližně 85 aminokyselinami a rozpoznává na purin bohatou DNA

sekvenci (Karim et al., 1990). PU.1 je schopen regulovat expresi velké řady genů vazbou do jejich promotorové oblasti. Můžeme zde zařadit M-CSF (macrophage colony-stimulating factor) receptor, GM-CSF (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor) receptor, G-CSF (granulocyte colony-stimulating factor) receptor, CD11b a další (Hohaus et al., 1995; Pahl et al., 1993; Smith et al., 1996; Zhang et al., 1994). ETS doména se neváže pouze do DNA, může také interagovat s řadou proteinů jako je c-Jun, GATA1 (GATA binding protein 1), C/EBP α (CCAAT enhancer-binding protein α) a AML1 (acute myeloid leukaemia-1) (Behre et al., 1999; Petrovick et al., 1998; Reddy et al., 2002; Rekhtman et al., 1999). Blíže k N-terminálnímu konci PU.1 proteinu leží trans-aktivační doména (Klemsz and Maki, 1996), v centrální oblasti se nachází PEST doména důležitá pro protein-protein interakci. Delece PU.1 faktoru prokázala jeho důležitou roli při myeloidní a B buněčné diferenciaci (McKercher et al., 1996; Scott et al., 1994). PU.1 je schopen interagovat s transkripčním faktorem GATA1, který je nezbytný pro diferenciaci erytrocytů (Rekhtman et al., 1999). Tyto dva transkripční faktory mezi sebou antagonizují a navzájem transkripčně inhibují své expresní programy (Stopka et al., 2005; Zhang et al., 1999). Pro diferenciaci progenitorových buněk je zásadní, který z těchto dvou expresních programů převládne. Pokud převládne GATA1, buňky diferencují do megakaryocyt-erytroidní linie (Nutt et al., 2005). V případě, že převládne transkripční faktor PU.1, je velmi důležitá hladina jeho exprese. Vysoká koncentrace PU.1 směřuje diferenciaci směrem k vývoji makrofágů, střední ke granulocytům a nízká koncentrace k B buňkám (viz *Obr.8*) (Dahl et al., 2003; DeKoter and Singh, 2000).

Dalšími faktory, které se podílejí na vývoji myeloidních buněk jsou členové rodiny C/EBP (CCAAT enhancer-binding protein). C/EBP α a C/EBP ϵ jsou spolu s PU.1 hlavními faktory podporujícími vývoj granulocytů. Delece C/EBP α vede k narušení vývoje neutrofilů a eozinofilů, ostatní hematopoetické linie nejsou ztrátou tohoto faktoru nijak ovlivněné (Zhang et al., 1997). Další deleční pokusy ukázaly, že C/EBP α je důležitý pro přechod myeloidních progenitorů do GMP, následný vývoj GMP již ale ovlivněný není (Zhang et al., 2004). Pro vývoj neutrofilů a eozinofilů je také důležitý C/EBP ϵ (Yamanaka et al., 1997). Dalším faktorem podílejícím se na vývoji neutrofilů je transkripční faktor Gfi-1 (Hock et al., 2003). Liniově specifické proteiny, které jsou aktivované transkripčními faktory, se mohou také podílet na určování směru, kterým se progenitorové buňky vydají. Příkladem je G-CSF podporující vývoj granulocytárních buněk (Dahl et al., 2003).

1.4.3.2 Hlavní faktory podílející se na diferenciaci makrofágů

Pro vývoj makrofágů je důležitá vysoká hladina transkripčního faktoru PU.1 (Dahl et al., 2003). PU.1 zřejmě funguje jako primární faktor vyvolávající počáteční změny chromatinové struktury specifických genů. Změnou chromatinu dochází k aktivaci následných t.j. sekundárních faktorů, které se spolu s primárními faktory podílejí na udržování vhodné hladiny proteinů specifických pro určitou linii, většinou mechanizmy transkripční koaktivace a koreprese a eventuálně se zapojením dalších posttranskripčních mechanismů (viz dále). Mezi sekundární faktory aktivované pomocí PU.1 patří například transkripční faktory Egr1 a Egr2 (Laslo et al., 2006). Egr1 byl již dříve popsán jako důležitý faktor makrofágové diferenciaci (Krishnaraju et al., 1995; Nguyen et al., 1993). Transkripční faktory Egr1 a Egr2 mají zřejmě dvojí funkci, která jim umožňuje směřovat vývoj k makrofágové linii. Podílejí se na aktivaci specifických genů makrofágové linie a zároveň jsou schopny inhibovat alternativní granulocytární vývoj (Laslo et al., 2006). Inhibice je způsobena represí Gfi-1 transkripčního faktoru podporujícího vývoj neutrofilů (Hock et al., 2003). Na inhibici Gfi-1 se spolu s Egr1 a Egr2 faktory podílí Nab2 (NGFI-A-binding protein) korepresor (Laslo et al., 2006), který inhibuje schopnost Egr proteinů aktivovat transkripci (Svaren et al., 1996).

Pro vývoj makrofágů jsou důležité faktory AML1, ICSBP/IRF-8 (interferon consensus sequence binding protein) a M-CSF receptor (Dai et al., 2002; Okuda et al., 1996; Tamura et al., 2000). M-CSF receptor je kódovaný c-fms protoonkogenem, jehož exprese je závislá na faktoru PU.1. Zvýšená exprese c-fms u myeloidních progenitorů umožní jejich vývoj směrem k makrofágům. Progenitory s delecí genu PU.1 mají narušenou expresi c-fms, což je zřejmě jednou z příčin, proč tyto buňky nejsou schopny iniciovat makrofágovou diferenciaci (Krysinska et al., 2007). Na regulaci M-CSF receptoru se podílí také transkripční faktor AML1 (Zhang et al., 1996).

2 Cíle diplomové práce

1. Hlavním cílem mé diplomové práce bylo vytvořit model pro studium transkripce miR-17-92 klastru, založený na pGL3 luciferázových konstruktech obsahujících deleční fragmenty regulační oblasti miR-17-92 klastru.
2. Dále, ověřit represi miR-17-92 klastru transkripčním faktorem Egr2 v nehematologických buněčných liniích NIH3T3 a HeLa a popsat případnou závislost represe miR-17-92 klastru na transkripčním faktoru PU.1.
3. Připravit konstrukty s využitím mutagenese 3' nepřekládané oblasti Egr2 transkripčního faktoru a popsat vzájemné regulace mezi mikroRNA kódovanými miR-17-92 klastrem a Egr2 transkripčním faktorem.

3 Materiál a metody

3.1 Materiál

3.1.1 Buněčné linie a bakteriální kmeny

3.1.1.1 Buněčné linie

- HeLa – buněčná linie lidských epitelálních buněk karcinomu děložního čípku
- NIH3T3 – buněčná linie myších fibroblastů
- PUER progenitory – progenitorové krvetvorné buňky izolované z PU.1 -/- myši stabilně transfekované PU.1-ER (PU.1 fúzované s ligand vazebnou doménou Estrogenového Receptoru) transgenem indukovatelným tamoxifenem

3.1.1.2 Bakteriální kmeny

- *Escherichia coli* kmen DH5α (Invitrogen, USA)

3.1.2 Kultivační média

3.1.2.1 Pevná média

- LB (Luria Bertani) agar (Sigma, USA)

kompletní médium: 35 g/l	LB agar
100 µg/ml	ampicilin

3.1.2.2 Tekutá média

- LB (Luria Bertani) médium (Sigma, USA)

kompletní médium: 20 g/l	LB médium
100 µg/ml	ampicilin

- S.O.C. médium (Invitrogen, USA)

- DMEM 1x (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (Gibco, USA)

kompletní médium: 500 ml	D-MEM 1x
10 %	FBS
100 µg/ml	penicilin/streptomycin

- DMEM + GlutaMAX™-I (Gibco, USA)

kompletní médium: 500 ml	D-MEM 1x
10 %	FBS
100 µg/ml	penicilin/streptomycin

- IMDM 1x (Iscove's Modified Dulbecco's medium) (Gibco, USA)

kompletní médium: 500 ml	I-MDM 1x
10 %	FBS
100 µg/ml	penicilin/streptomycin

-OPTI-MEM® 1x (Gibco, USA)

3.1.3 Použité vektory a expresní plasmidy

pGL3-promo (Promega, USA)

pGL3-basic (Promega, USA)

pGL4.17 (Promega, USA)

pRL(SV40) (Promega, USA)

pcDNA3.1 (Invitrogen, USA)

pcDNA3-PU.1

pcDNA3-Egr2

pcDNA3-Nab2 (všechny poskytl P. Laslo, Institute of Molecular Medicine, St.

James' sUniversity Hospital, Leeds UK)

pcDNA4(17-92) (V. Pospíšil, 1LF UK Praha)

3.1.4 Použité enzymy a DNA markery:

AccuTaq polymeráza (Sigma, USA)
AccuTaq polymerační pufr (Sigma, USA)
T4 DNA ligáza (Fermentas, Litva)
T4 DNA ligační pufr (Fermentas, Litva)
DpnI (Fermentas, Litva)
XhoI (Fermentas, Litva)
HindIII (Fermentas, Litva)
Trypsin(Gibco, USA)
Purf R (Fermentas, Litva)
Pufr TangoTM (Fermentas, Litva)
Marker DNA High range (Fermentas, Litva)
Marker DNA Low range (Fermentas, Litva)

3.1.5 Komerčně dodávané kity

- DNasy Blood & Tissue Kit; (Qiagen, USA)
- Dual-Luciferase® Reporter Assay systém (Promega, USA)
- GC-RICH PCR systému (Roche, Švýcarsko)
- MinElute PCR Purification Kit (Qiagen, USA)
- Plasmid Miniprep Spin kit (Genomed, BRD)
- HiPurePlasmid DNA Purification Kit (Invitrogen, USA)
- QIAquick gel extraction kit (Qiagen, USA)

3.1.6 Seznam použitých přístrojů

- Spektrofotometr NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologie, USA)
- Centrifugy: 5804 R (Eppendorf, BRD)
5810 R (Eppendorf, BRD)
5415 R (Eppendorf, BRD)
- Stolní centrifuga C1301 spectrafuge mini (Labnet, USA)

- Magnetický míchač (VELP Scientifica, Itálie)
- Termoblok Termomixer compact (Eppendorf, BRD)
- Termoblok Termomixer komfort (Eppendorf, BRD)
- PCR cyklér Master-cycler gradient (Eppendorf, BRD)
- Vortex 2x³ vortex mixer (VELP Scientifica, Itálie)
- Analytické váhy: ALJ 220-4NM (KERN, BRD)
- Aparatura pro DNA elektroforézu: mini HE 33 (Hofer, USA)
- Zdroj napětí PowerPacTM Basic (BIO-RAD, USA)
- Transiluminátor T2202 (Sigma, USA)
- CO² inkubátor IGO 150 CO₂ incubator (Jouan, Francie)
- Laminární box MSC 12 (Jouan, Francie)
- Luminometr Sírius (Berthold detection systém, BRD)
- Optický mikroskop eclipse TS100 (Nikon, Japonsko)
- Fluorescenční mikroskop DP70 (OLYMPUS, Japonsko)
- Sterilizátor Sterilab (BMT Medical Technology, Česká republika)
- Inkubátor s integrovanou třepačkou (Gallenkamp, UK)

3.1.7 Seznam použitých chemikálií

- 6x Orange DNA loading day (Fermentas, Litva)
- Acetát sodný trihydrát (Amresco, USA)
- Agaróza I (Amresco, USA)
- Ampicilin (Amresco, USA)
- Ethidium bromid (Amresco, USA)
- Ethylalkohol (P-LAB, Česká republika)
- Fetální bovinní sérum (FBS) (Gibco, USA)
- Glycerol (Amresco, USA)
- 150 mM Chlorid sodný (Polyplus transfection, Francie)
- Isopropanol (Penta, Česká republika)
- JetPEITM transfekční reagens (Polyplus transfection, Francie)
- Kyselina chlorovodíková (Amresco, USA)
- Lipofectamine 2000 (Invitrogen, USA)
- Pasivní lyzační pufr (Promega, USA)

PBS pH 7.4 10x (Gibco, USA)

Penicilin/streptomycin (Gibco, USA)

TE pufr (10mM Tris, 1mM EDTA, pH8)

TBE - Tris-hydrochlorid (Amresco, USA)

- EDTA (Riedel-de Haen, BRD)

- kyselina boritá (Riedel-de Haen, BRD)

3.2 Metody

3.2.1 Práce s buněčnými liniemi

Pracovali jsme s následujícími buněčnými liniemi: NIH3T3, HeLa a PUER progenitory. PUER buňky jsou myší myeloidní progenitory s delecí transkripčního faktoru PU.1, jež exprimují transgenně vložený konstrukt fúzního proteinu PU.1-Estrogen Receptor, jež je kondičiálně aktivovatelný Tamoxifenem. Buňky byly pěstovány v jim vyhovujícím kompletním médiu obsahujícím 10% FCS a 100 µg/ml Penicilin/Streptomycin (Gibco):

NIH3T3 – DMEM +GlutaMAX™

HeLa – DMEM

PUER – IMDM

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

3.2.2 Metody použité k přípravě luciferázových konstruktů nesoucích různé úseky regulační oblasti miR-17-92 klastru

3.2.2.1 Příprava fragmentů regulační oblasti miR-17-92 klastru

Izolace genomické DNA

Materiál, chemikálie, přístroje:

- DNasy Blood & Tissue Kit (Qiagen)
- PUER buňky
- centrifuga, vortex, spektrofotometr
- 1,5 ml eppendorfky

Postup:

Genomickou DNA jsme izolovali z PUER buněk pomocí DNasy Blood & Tissue Kit od firmy Qiagen. Nejprve jsme odebrali přibližně 5×10^6 PUER buněk. Ty jsme 5 min

centrifugovali na 300 x g. Odlili jsme supernatant a peletu jsme resuspendovali v 200 μ l PBS. Přidali jsme 20 μ l proteinázy K, 5 μ l RNázy A a 200 μ l AL pufru. Vše jsme vortexovali a inkubovali 10 min na 56°C. Dále jsme přidali 200 μ l 96% ethanolu a vortexovali. Získanou směs jsme přenesli na kolonku, která byla vložena do 2 ml sběrné tuby. Kolonku jsme 1 min centrifugovali na \geq 6000 x g. Přenesli jsme kolonku do nové 2 ml sběrné tuby, přidali jsme 500 μ l AW1 pufru a 1 min centrifugovali na \geq 6000 x g. Opět jsme přenesli kolonku do nové 2 ml sběrné tuby, přidali jsme 500 μ l pufru AW2 a 3 min centrifugovali na 20 000 x g. Nyní jsme kolonku vložili do 1,5 ml eppendorfky. Na střed kolonky jsme napipetovali 200 μ l TE pufru a nechali 1 min inkubovat na pokojové teplotě. Kolonku jsme poté 1 min centrifugovali na \geq 6000 x g. Koncentraci DNA jsme změřili na spektrofotometru. Získaná DNA byla následně použita jako templátová DNA pro amplifikaci fragmentů regulační oblasti miR-17-92 klastru.

Amplifikace fragmentů regulační oblasti miR-17-92 klastru pomocí PCR

Materiál, chemikálie, přístroje:

- GC-RICH PCR systém (Roche)
- primery, templátová DNA (genomická DNA izolovaná z PUER buněk), mix dNTP
- 0,2 ml a 1,5 ml eppendorfky
- cyklér (Master-cycler gradient; Eppendorf)
- aparatura pro gelovou elektroforézu, zdroj napětí, transiluminátor
- agaróza, marker, ethidium bromid, TBE

Postup:

Jednotlivé fragmenty jsme amplifikovali pomocí metody PCR. Využili jsme GC-RICH PCR systému od firmy Roche, který je navržený speciálně pro amplifikaci CG bohatých úseků. V programu Primer3 jsme navrhli primery v obou směrech (viz *Obr. 9*).

m17-92(-3,3kb)XhoI F gat**CTCGAG**gagagcccagacttctcggtgctgcactagg
 m17-92(-2,8kb)XhoI F gat**CTCGAG**ctcgcctggccgccaagaacgagc
 m17-92(-2,0kb)XhoI F gat**CTCGAG**gcactcggcgtccccgaaactttgtgc
 m17-92(-1,2kb)XhoI F ata**CTCGAG**cgtggctgcacgcgggataaaagagttg
 m17-92(-0,6kb)XhoI F gat**CTCGAG**tgagacctttggttttcaacttttgtctttgagc
 m17-92(0kb)HindIII R ata**AAGCTT**gactggctcacagcttcagtccaaggtgagg
 m17-92(-2,7kb)HindIII R gat**AAGCTT**tcccgcctcaacgtaaagacggacaagcccc
 m17-92(-1,9kb)HindIII R gat**AAGCTT**tgttctggaggcgctttaactctc

Obr. 9 Primery použité k PCR reakci. Tučná písmena označují místa rozpoznávaná restričními enzymy XhoI (CTCGAG) nebo HindIII (AAGCTT).

Reakční směs pro PCR doplněná do 50 µl vodou

GC-RICH polymeráza	1 µl
GC-RICH pufr	10 µl
GC-RICH rozlišovací roztok	10 µl
DNA templát	400 ng
10 mM mix dNTP	0,5 µl
20 µM mix primerů	1 µl
25 mM MgCl ₂	0,3 µl

Program

	<i>počet cyklů</i>	<i>teplota</i>	<i>čas</i>
<u>počáteční denaturace</u>	<u>1</u>	<u>95°C</u>	<u>3 min</u>
denaturace	10	95°C	30 s
annealing		61°C	30 s
<u>elongace</u>		<u>72°C</u>	<u>45 s /kb</u>
denaturace	25	95°C	30 s
annealing		61°C	30 s
<u>elongace</u>		<u>72°C</u>	<u>45 s /kb + 5 s každý další cyklus</u>
finální elongace	1	72°C	7 min

Přítomnost PCR produktů jsme ověřili pomocí gelové elektroforézy na 0,8% agarózovém gelu s využitím ethidium bromidu pro vizualizaci DNA.

Purifikace fragmentů regulační oblasti miR-17-92 klastru

Materiál, chemikálie, přístroje:

- MinElute PCR Purification Kit (Qiagen)
- amplifikované fragmenty miR-17-92 klastru
- 1,5 ml eppendorfky
- centrifuga, termobloček, spektrofotometr

Postup:

Amplifikované fragmenty jsme purifikovali pomocí MinElute PCR Purification Kit od firmy Qiagen. K amplifikovaným fragmentům jsme nejprve přidali 5-ti násobek jeho objemu PB pufru a promíchali. Vzorek jsme přenesli na kolonku, která byla vložena do sběrné tuby, a 1 min centrifugovali na 17 900 x g. Vzorek jsme promyli 750 µl PE pufru a opět 1 min centrifugovali na 17 900 x g. Kolonku jsme přenesli do 1,5 ml eppendorfky a na střed jsme napipetovali 20 µl TE pufru ohřátého na 70°C. Kolonku jsme 1 min centrifugovali na 17 900 x g.

Koncentraci vzorku jsme ověřili pomocí spektrofotometru.

Štěpení fragmentů regulační oblasti miR-17-92 klastru

Materiál, chemikálie, přístroje:

- purifikované fragmenty miR-17-92 klastru
- restrikční enzymy XhoI, HindIII, pufr R (Fermentas)
- inkubátor

Postup:

Konce purifikovaných fragmentů jsme štěpili restrikčními enzymy XhoI a HindIII podle návodu od firmy Fermentas, která nám enzymy dodala. Štěpení probíhalo 2 h při 37°C v inkubátoru.

Reakční směs pro štěpení byla doplněna do 50 μ l vodou

Pufr R	5 μ l
Enzym XhoI + HindIII	2 μ l + 2 μ l
Purifikovaný PCR produkt	0,5 μ g

3.2.2.2 Příprava vektoru pGL3-basic

Štěpení vektoru pGL3-basic, rozdělení pomocí gelové elektroforézy a izolace

Materiál, chemikálie, přístroje:

- vektor pGL3-basic (Promega)
- pufr R, restriktivní enzymy XhoI a HindIII (Fermentas)
- 1,5 ml eppendorfky
- inkubátor

Postup:

Vektor pGL3-basic jsme štěpili restriktázami XhoI a HindIII podle návodu od firmy Fermentas, která nám enzymy dodala. Vektor byl štěpen 2 h při 37°C v inkubátoru.

Reakční směs pro štěpení byla doplněna do 90 μ l vodou

Pufr R	9 μ l
Enzym XhoI + HindIII	3 μ l + 3 μ l
Vektor	30 μ g

3.2.2.3 Purifikace vektoru pGL3-basic a fragmentů regulační oblasti miR-17-92 klastru na agarózovém gelu

Materiál, chemikálie, přístroje:

- vektor pGL3-basic (Promega), fragmenty miR-17-92 regulační oblasti
- aparatura pro gelovou elektroforézu, zdroj napětí, transiluminátor
- agaróza, marker, ethidium bromid, TBE
- QIAquick gel extraction kit (Qiagen)
- centrifuga, termobloček, spektrofotometr

Štěpený vektor pGL3-basic a jednotlivé fragmenty regulační oblasti miR-17-92 jsme pustili na 60V na 0,8% agarózové gely a rozdělili pomocí gelové elektroforézy. Poté jsme vyřezali oblast obsahující vektor nebo fragment a ty jsme z gelu izolovali pomocí QIAquick gel extraction kit od firmy Qiagen.

K vzorku jsme přidali trojnásobek jeho objemu QP pufru a nechali inkubovat na 50°C dokud se gel úplně nerozpustil. Směs jsme přenesli na kolonku a 1 min centrifugovali na 17 900 x g. Na kolonku jsme poté nanесли 0,5 ml QG pufru a opět 1 min centrifugovali na 17 900 x g. Následně jsme kolonku promyli 0,75 ml PE pufru a opět centrifugovali. Nakonec jsme kolonku vložili do 1,5 ml eppendorfky, na střed jsme napipetovali 20 µl TE pufru, nechali 1 min inkubovat na pokojové teplotě a centrifugovali.

Koncentraci štěpeného vektoru a fragmentů jsme změřili spektrofotometrem a jejich přítomnost ověřili gelovou elektroforézou na 0,8% agarózovém gelu s pomocí ethidium bromidu sloužícího k vizualizaci DNA.

3.2.2.4 Ligace pGL3-basic vektoru a fragmentů regulační oblasti miR-17-92 klastru

Materiál, chemikálie, přístroje:

- štěpený vektor pGL3-basic, fragmenty regulační oblasti miR-17-92 klastru
- T4 DNA ligáza, T4 DNA ligační pufr
- cyklér (Master-cycler gradient; Eppendorf)

Postup:

Štěpený vektor jsme ligovali s připravenými fragmenty v poměru 1 : 5 s ohledem na délku jednotlivých fragmentů. K ligaci jsme použili T4 DNA ligázu. Směs vektoru a fragmentu byla inkubována v cykléru 1,5 h na 16°C.

Reakční směs byla doplněna do 20 µl vodou

T4 DNA ligáza	1,5 µl
T4 DNA ligační pufr	2 µl
Štěpený vektor	120 ng
Fragment	x ng (v závislosti na délce fragmentu, v poměru 1 : 5 k vektoru)

Ligací byly získány luciferázové konstrukty.

3.2.2.5 Transformace luciferázových konstruktů, jejich namnožení a izolace

Materiál, chemikálie, přístroje:

- DH5 α bakterie (Invitrogen)
- luciferázové konstrukty získané ligací
- vodní lázeň, inkubátor s integrovanou třepačkou, inkubátor, centrifuga
- 1,5 ml eppendorfky
- S.O.C médium, LB médium
- agarózové plotny s ampicilinovou rezistencí
- Plasmid Miniprep Spin kit (Genomed)
- aparatura pro gelovou elektroforézu, zdroj napětí, transiluminátor
- agaróza, marker, ethidium bromid, TBE

Postup:

Luciferázové konstrukty získané ligací jsme transformovali do kompetentních bakterií kmene DH5 α pomocí teplotního šoku. Nejprve jsme odebrali 25 μ l DH5 α bakterií. K nim jsme přidali 5 ng DNA, lehce zamíchali a 30 min inkubovali na ledu. Poté jsme směs ponořili na 20 s do vodní lázně ohřáté na 42°C a vrátili na 2 min zpátky na led. Ke směsi jsme přidali 500 μ l předeřátého S.O.C média a 1,5 h inkubovali na třepačce v 37°C při 225 rpm. Směs jsem vyseli na pevné selekční médium obsahující 100 μ g/ml ampicilinu a inkubovali v 37°C přes noc.

Z pozitivních kolonií, které vyrostly na agarózové plotně, jsme 5 vypíchlí a přenesli do kultury v 5 ml LB média v 37°C při 225 rpm. Po 5-ti h jsme plazmidovou DNA izolovali pomocí Plasmid miniprep spin kitu od firmy Genomed.

Odebrali jsme 1 ml média s napěstovanými bakteriemi a 12 min centrifugovali na 6 000 x g. Poté jsme odsáli supernatant a peletu jsme resuspendovali v 250 μ l roztoku G1. Ke směsi jsme přidali 250 μ l roztoku G2, lehce promíchali a 5 min inkubovali na pokojové teplotě. Přidali jsme 350 μ l roztoku G3, lehce promíchali a 10 min centrifugovali na 21 000 x g. Supernatant jsme přenesli na kolonku vloženou do 2 ml sběrné tuby a 1 min centrifugovali na 17 000 x g. Kolonku jsme poté promyli 500 μ l roztoku G4 a 1 min centrifugovali na 17 000 x g. Kolonku jsme vložili do nové sběrné tuby a 1 min centrifugovali na maximální zrychlení. Eluci jsme provedli pomocí 40 μ l TE pufru ohřátého na 70°C.

Koncentraci plazmidové DNA jsme změřili na spektrofotometru. Přítomnost vytvořených luciferázových konstruktů jsme ověřili gelovou elektroforézou na 0,8 % agarózovém gelu s pomocí ethidium bromidu sloužícího k vizualizaci DNA.

3.2.2.6 Restrikční ověření luciferázových konstruktů

Restrikční ověření luciferázových konstruktů, jejich namnožení a izolace

Materiál, chemikálie, přístroje:

- izolované luciferázové konstrukty
- pufr R, restrikční enzymy XhoI a HindIII (Fermentas)
- 1,5 ml eppendorfky, LB médium
- aparatura pro gelovou elektroforézu, zdroj napětí, transiluminátor
- agaróza, marker, ethidium bromid, TBE

Postup:

Abychom ověřili správnost vložených fragmentů do pGL3-basic vektoru, štěpili jsme DNA z izolovaných luciferázových konstruktů restrikčními enzymy XhoI a HindIII podle návodu od firmy Fermentas, která nám enzymy dodala. Štěpení probíhalo 2 h při 37°C v inkubátoru.

Reakční směs byla doplněna do 20 μ l vodou

Pufr R	2 μ l
Enzym XhoI + HindIII	0,25 μ l + 0,25 μ l
Luciferázový konstrukt	1 μ g

Správnost vložených fragmentů jsme ověřili pomocí gelové elektroforézy na 0,8 % agarózovém gelu s využitím ethidium bromidu sloužícího k vizualizaci DNA. Vybrané luciferázové konstrukty jsme poslali na osekvenování.

Na základě výsledků sekvenace jsme vybrali transformované bakteriální kultury nesoucí správné luciferázové konstrukty. Z bakteriální kultury jsme odebrali 400 μ l a nechali kultivovat ve 100 ml LB média v 37°C při 225 rpm. Po 16-ti h jsme plazmidovou DNA izolovali pomocí HiPurePlasmid DNA Purification Kit od firmy Invitrogen.

Odebrali jsme 50 ml média s napěstovanými bakteriemi a 15 min centrifugovali na 6 000 x g při 4°C . Poté jsme odlili supernatant a peletu jsme resuspendovali ve 4ml resuspenzačního pufru. Ke směsi jsme přidali 4 ml lyzačního pufru, lehce promíchali a 5 min inkubovali na pokojové teplotě. Přidali jsme 4 ml precipitačního pufru a ihned promíchali. Směs jsme centrifugovali na 16 000 x g. Nyní jsme si sestavili kolonku, kterou jsme nejprve ekvilibrovali 10 ml EQ1 pufrem, který jsme nanесли na kolonku a nechali jí pufr protéct. Poté jsme na kolonku přenesli supernatant a nechali ho kolonkou volně protéct. Kolonku jsem dále 2x promyli 10 ml promývacího pufru. Nyní jsme kolonku přendali na novou sběrnou tubu a nanесли na ni 5 ml elučního pufru a opět nechali kolonkou protéct. K proteklému roztoku, obsahujícímu naši DNA, jsme přidali 3,5 ml isopropanolu a vortexovali. Směs jsme centrifugovali na 15 000 x g po dobu 30 min na 4°C. Odlili jsme supernatant a peletu jsme resuspendovali ve 3 ml 70 % etanolu. Směs jsme opět centrifugovali na 15 000 x g na 5 min při 4°C. Odlili jsme supernatant a nechali peletu vysušit na vzduchu. Poté jsme peletu resuspendovali ve 200 µl TE pufru.

Koncentraci plazmidové DNA jsme změřili na spektrofotometru.

3.2.3 Metody použité k místně specifické mutagenезi vektoru pGL3-Egr2-3'UTRwt

Vnesení místně specifické mutace do vektoru pGL3-Egr2-3'UTRwt

Materiál, chemikálie, přístroje:

- AccuTaq polymeráza, AccuTaq polymerační pufr (Sigma)
- mutagenní primery, vektor pGL3-Egr2-3'UTRwt jako templátová DNA, mix dNTP
- 0,2 ml a 1,5 ml eppendorfky
- cyklér (Master-cycler gradient; Eppendorf)
- aparatura pro gelovou elektroforézu, zdroj napětí, transiluminátor
- agaróza, marker, ethidium bromid, TBE

Postup:

K získání vektoru s požadovanou mutací jsme využili metody PCR. Pro vnesení specifické mutace do vektoru pGL3-Egr2-3'UTRwt bylo nejprve nutné navrhnout primery v obou směrech nesoucí danou mutaci. K tomu jsme využili programu pro navrhování

mutagenních primerů od firmy Stratagene. Primery byly designovány tak, že námi navržená mutace se nacházela uprostřed a po stranách byla lemována ~20 nukleotidy (viz. Obr. 10).

```

Egr2UTR1mutF   ttaaagcaaaactgatgtggcaGAttaatggcttgggactgacttg
Egr2UTR1mutR   caagtcagtcccaagccattaaTCtgccacatcagttttgctttaa

Egr2UTR2mutF   actcaagagaatggaagtgGGatgtcgggcaggacaaaagc
Egr2UTR2mutR   gctttgtcctgcccgacatCCcacttccattctcttgagt
  
```

Obr. 10 Sekvence mutagenních primerů. Tučná písmena znázorňují mutovanou sekvenci.

Reakční směs byla doplněna do 50 μ l vodou

AccuTaq Polymeráza	1 μ l
AccuTaq polymerační Pufir	5 μ l
Templátová DNA	40 ng
20 μ M mix primerů	1,25 μ l
10 mM mix dNTP	1 μ l

Program

	<i>počet cyklů</i>	<i>teplota</i>	<i>čas</i>
počáteční denaturace	1	95°C	3 min
denaturace	16	95°C	30 s
annealing		55°C	1 min
elongace		68°C	6 min

Přítomnost PCR produktů jsme ověřili pomocí gelové elektroforézy na 0,8% agarózovém gelu s využitím ethidium bromidu pro vizualizaci DNA.

Purifikace mutovaného vektoru pGL3-Egr2-3'UTRwt a štěpení templátové DNA DpnI restriktázou

Materiál, chemikálie, přístroje:

- mutovaný vektor pGL3-Egr2-3'UTRwt
- MinElute PCR Purification Kit (Qiagene)
- Pufir TangoTM, enzym DpnI (Fermentas)
- spektrofotometr

Postup:

Produkt PCR (vektor pGL3-Egr2-3'UTRmut) jsme nejprve purifikovali pomocí MinElute PCR Purification Kit od firmy Qiagen. Přesný postup purifikace je popsán v kapitole 3.2.1.1. Purifikovaný PCR produkt jsme štěpili restriktázou DpnI, štěpící pouze metylovanou DNA, čímž jsme odstranili nemutovanou templátovou DNA.

Reakční směs byla doplněna do 40 μ l vodou

Pufir Tango TM	4 μ l
Enzym DpnI	2 μ l
PCR produkt	700ng

Transformace pGL3-Egr2-3'UTRmut, jeho namnožení a izolace

Materiál, chemikálie, přístroje:

- DH5 α bakterie (Invitrogen)
- purifikovaný a štěpený produkt PCR
- vodní lázeň, inkubátor s integrovanou třepačkou, inkubátor, centrifuga
- 1,5 ml eppendorfky
- S.O.C médium, LB médium
- agarózové plotny s ampicilinovou rezistencí
- Plasmid Miniprep Spin kit (Genomed)
- aparatura pro gelovou elektroforézu, zdroj napětí, transiluminátor
- agaróza, marker, ethidium bromid, TBE

Postup:

Purifikovaný a štěpený produkt PCR jsme pomocí teplotního šoku transformovali do bakterií *Escherichia coli* kmene DH5 α , podrobný popis transformace je uveden v kapitole 3.2.1.4. Transformované bakterie jsme vyseli na pevné selekční médium obsahující 100 $\mu\text{g/ml}$ ampicilinu a inkubovali v 37°C přes noc. Pozitivní kolonie, které vyrostly na agarózové plotně, byly kultivovány v 5 ml LB média v 37°C při 225 rpm. Po 5-ti h jsme plazmidovou DNA izolovali pomocí Plasmid miniprep spin kitu od firmy Genomed. Podrobný popis izolace plazmidové DNA je uveden v kapitole 3.2.1.4.

Izolovanou plazmidovou DNA jsme ověřili pomocí gelové elektroforézy na 0,8% agarózovém gelu s využitím ethyidium bromidu sloužícího k vizualizaci DNA a nechali osekvenovat.

3.2.4 Transfekce DNA do savčích buněčných linií

3.2.4.1. DNA transfekce pomocí jetPEI

Materiál, chemikálie, přístroje:

- NIH3T3 buňky
- JetPEI, roztok NaCl (Polyplus transfection)¹⁾
- směs plazmidové DNA
- 24-jamková destička, 1,5 ml eppendorfky
- kompletní médium DMEM+GlutaMAXTM (Gibco)
- laminární box, CO₂ inkubátor, centrifuga, vortex, odsávačka

Postup:

Den před samotnou transfekcí jsme si vyseli buňky na 24-jamkovou destičku. Na každou jamku bylo použito 0,5 ml kompletního kultivačního média (DMEM+GlutaMAXTM). Konfluence buněk se pohybovala kolem 30-40% na jamku.

Transfekční směs na jednu jamku 24-jamkového platu

150mM NaCl	90 μl
směs plazmidové DNA	0,5-1 μg
jetPEI	1,5 μl

Nejprve jsme si namíchali roztok NaCl s plazmidovou DNA pro danou transfekci v celkovém objemu 45 μ l a lehce jsme ho vortexovali. V další zkumavce (ependorfce) jsme smíchali roztok NaCl a jetPEI opět v celkovém objemu 45 μ l a lehce ho vortexovali. Nyní jsme přepipetovali roztok NaCl + jetPEI do roztoku NaCl + plazmidová DNA. Směs o objemu 90-ti μ l jsme ihned vortexovali a nechali 25 min inkubovat na pokojové teplotě. Po uplynutí vymezené doby jsme ke směsi přidali 0,5 ml předem ohřátého kompletního média (DMEM+GlutaMAXTM). Z předem vyšetých buněk jsme odsáli médium a na každou jamku jsme napipetovali příslušnou 90-ti μ l směs plazmidové DNA+jetPEI+NaCl. Pro zvýšení efektivity transfekce jsme buňky 5 min centrifugovali na 280 x g. Buňky byly kultivovány 48 h v inkubátoru, a poté byly sklizeny.

3.2.4.2 DNA transfekce pomocí lipofectaminu

Materiál, chemikálie, přístroje:

- buňky NIH3T3 nebo HeLa
- lipofectamine (Invitrogen), médium Opti-MEM® I Reduced-Serum (Gibco)
- směs plazmidové DNA
- 24-jamková destička
- 1,5 ml ependorfky
- médium DMEM, FBS, antibiotika (penicilin/streptavidin) (Gibco)
- laminární box, CO₂ inkubátor, vortex, odsávačka

Postup:

Den před samotnou transfekcí jsme si vyseli buňky na 24-jamkovou destičku. Na každou jamku bylo použito 0,5 ml kompletního kultivačního média (DMEM). Konflunce buněk se pohybovala kolem 90-95% na jamku. Kompletní kultivační médium jsme před samotnou transfekcí vyměnili za médium (DMEM) obsahující 10% FBS bez antibiotik.

Transfekční směs na jednu jamku 24-jamkového platu

médium Opti-MEM	90 μ l
směs plazmidové DNA	0,5-1 μ g
lipofectamin	2 μ l

Nejprve jsme smíchali médium (Opti-MEM) s plazmidovou DNA pro danou transfekci v celkovém objemu 45 μ l, směs jsme lehce vortexovali. V další eppendorfci jsme smíchali médium (Opti-MEM) a lipofectamin opět v celkovém objemu 45 μ l, směs jsme jemně promíchali a 5 min inkubovali na pokojové teplotě. Nyní jsme směs média s lipofectaminem přenesli ke směsi média s plazmidovou DNA. Celkový mix o objemu 90-ti μ l jsme ihned lehce protřepali a nechali 25 min inkubovat na pokojové teplotě. Po 25 min jsme ke směsi přidali 0,5 ml předem ohřátého média (DMEM) obsahujícího 10% FBS, bez antibiotik. Z předem vyšetých buněk jsme odsáli médium a na každou jamku jsme napipetovali příslušnou 90-ti μ l směs plazmidové DNA, média (Opti-MEM) a lipofectainu. Po 5-ti hodinách inkubace jsme buňkám kompletně vyměnili médium za nové (DMEM) obsahující 20% FBS a antibiotika. Buňky byly inkubovány 48 h v inkubátoru, a poté byly sklizeny

3.2.4.3 Sklizení buněk

Materiál, chemikálie, přístroje:

- buňky NIH3T3 nebo HeLa vyšeté na 24-jamková destička
- 1,5 ml eppendorfky, PBS
- pasivní lyzační roztok (DLRA, Promega) , stěrka
- centrifuga

Postup:

Buňky jsme sklídili pomocí pasivního lyzačního pufru. Z buněk jsme nejprve odsáli veškeré médium a 2x promyli 0,5 ml PBS. Na každou jamku jsme napipetovali 60 μ l lyzačního roztoku, který jsme nechali 1,5 min působit. Poté jsme buňky setřeli stěrkou a lyzát jsme přepipetovali do 1,5 ml eppendorfky. Pro dosažení kompletní lýze buněk jsme získaný lyzát 2x zamrazili a rozmrzli a nakonec jsme ho 2 min centrifugovali na 11 000 x g.

3.2.4.4 Stanovení luciferázové aktivity

Materiál, chemikálie, přístroje:

- lyzát transfekovaných buněk
- luminometr Sirius (Berthold)
- Dual-Luciferase® Reporter Assay systém (Promega)
- centrifuga

Postup:

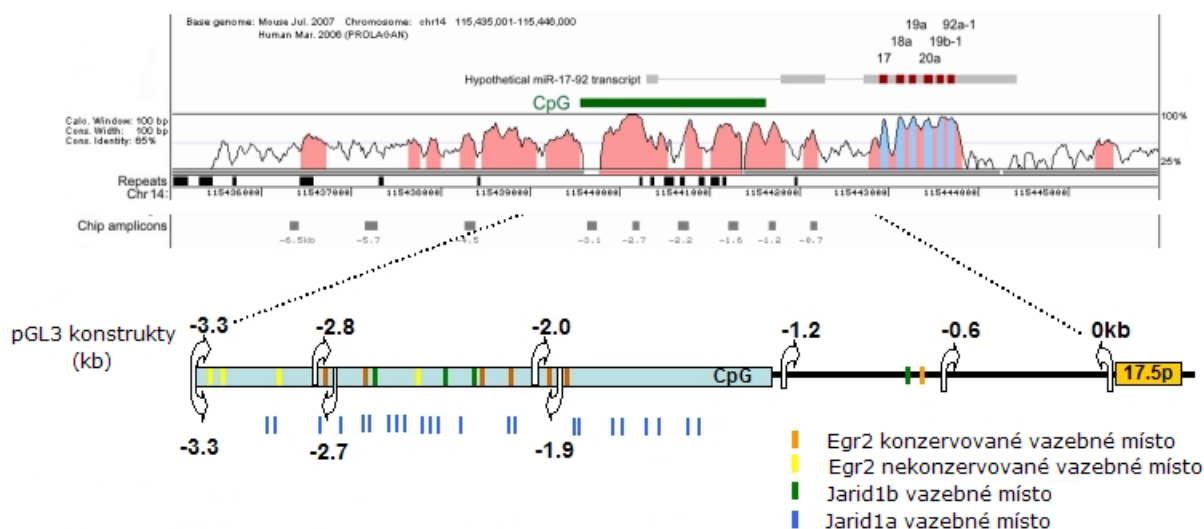
Pro měření luciferázové aktivity jsme použili Dual-Luciferase® Reporter Assay systém od firmy Promega. Z každého lyzovaného vzorku jsme odebrali 11 μ l lyzátu, přidali jsme k němu 50 μ l luciferázového substrátu a na luminometru jsme změřili aktivitu luciferázy. Poté jsme znovu odebrali 11 μ l z každého lyzátu, k němu jsme přidali substrát pro renillu a Stop & Glo pufr inhibující aktivitu luciferázy a pomocí luminometru jsme změřili aktivitu renilly, kterou jsme použili k normalizaci luciferázové aktivity.

4 Výsledky

4.1 Strategie pro vytvoření systému vhodného ke studiu regulace transkripce miR-17-92 klastru

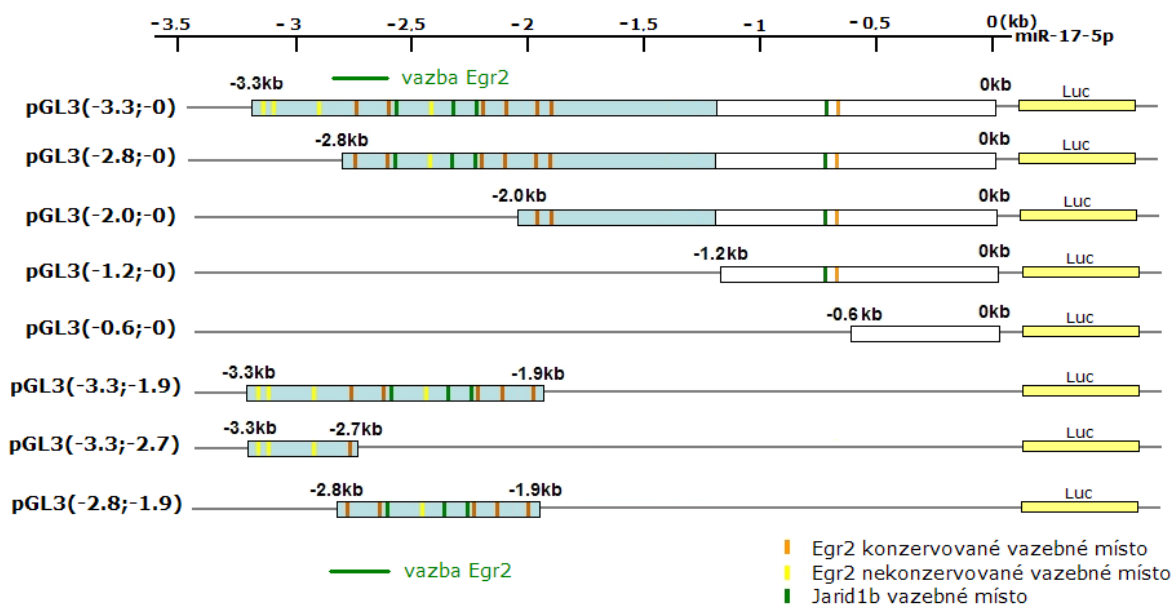
V naší laboratoři byl popsán nový represní mechanismus inhibice transkripce miR-17-92 klastru transkripčním faktorem Early growth response 2 (Egr2) v průběhu diferenciacce myeloidních PUER progenitorů indukovaných transkripčním faktorem PU.1. Dále bylo prokázáno, že represe miR-17-92 klastru je zprostředkována demethylací lysinu 4 histonu 3 histon demethylázou Jarid1b (Pospíšil et al., připraveno pro publikaci).

Abychom mohli *in vitro* podrobně studovat regulaci miR-17-92 klastru, rozhodli jsme se vytvořit sérii reportérových vektorů nesoucích fragmenty putativního promotoru miR-17-92 klastru. Nejprve byla provedena *in silico* analýza 10 kb dlouhého úseku DNA nacházejícího se před kódující oblastí miR-17-92 klastru. V úseku -3.3 až -1.2 kb vzhledem k počátku miR-17-5p sekvence se nachází CpG ostrůvek s CG obsahem ~80 %. Sekvenční analýzou byla identifikována přítomnost vazebných míst pro transkripční faktor Egr2. Sedm z těchto míst je konzervovaných u člověka, myši a potkana. Kromě jednoho místa, které leží -0.7 kb vzhledem k počátku miR-17-5p sekvence, se všechna nacházejí v CpG ostrůvku mezi -2.8 až -1.8 kb. Další čtyři Egr2 vazebná místa nejsou konzervovaná a leží v úseku mezi -3.3 až -2.4 kb (viz *Obr. 11*). Analýza putativního promotoru miR-17-92 klastru dále odhalila přítomnost vazebných míst pro demethylázy Jarid1a a Jarid1b. Kromě vazebného místa ležícího -0.75 kb vzhledem k počátku miR-17-5p sekvence, leží zbylá místa pro Jarid1b v distální části CpG ostrůvku. Vazebná místa Jarid1a jsou v CpG ostrůvku více rozptýlena (viz *Obr. 11*)



Obr. 11 Schéma vazebných míst miR-17-92 promotorové oblasti. Schéma promotorové oblasti miR-17-92 klastru (<http://genome.lbl.gov/vista/>). Šipky vyznačují místa primerů použité pro amplifikaci fragmentů regulační oblasti miR-17-92 klastru. Barevné boxy označují vazebná místa transkripčního faktoru Egr2 a demetyláz Jarid1a a Jarid1b (Pospíšil et al., připraveno pro publikaci).

Na základě umístění vazebných míst pro Egr2 transkripční faktor a demetylázy Jarid1a a Jarid1b a na základě dřívějších dat z naší laboratoře identifikujících vazbu uvedených faktorů do promotorové oblasti miR-17-92 klastru (~ -2.7kb) byly navrženy deleční fragmenty putativního promotoru miR-17-92 klastru. Nejdelší konstrukt ponese fragment pokrývající oblast -3.3 až 0 kb vzhledem k začátku miR-17-5p sekvence. Tento fragment obsahuje celý CpG ostrůvek a všechna identifikovaná vazebná místa (viz Obr. 12). Další čtyři konstrukty vzniknou postupných zkracováním fragmentu -3.3;-0kb z 5' konce. Zkrácením o 500 bp a 1 300 bp získáme pGL3(-2.8;-0) a pGL3(-2.0;-0) nesoucí zmenšující se distální část CpG ostrůvku. Zkrácením 5' konce o 2 100 bp a 2 700 bp získáme konstrukty pGL3(-1.2;-0) a pGL3(-0.6;-0) zcela postrádající CG bohatou oblast. Poslední tři konstrukty pGL3(-3.3;-1.9); pGL3(-3.3;-2.7); pGL3(-2.8;-1.9) získáme zkracováním oblasti CpG ostrůvku (viz Obr. 12).



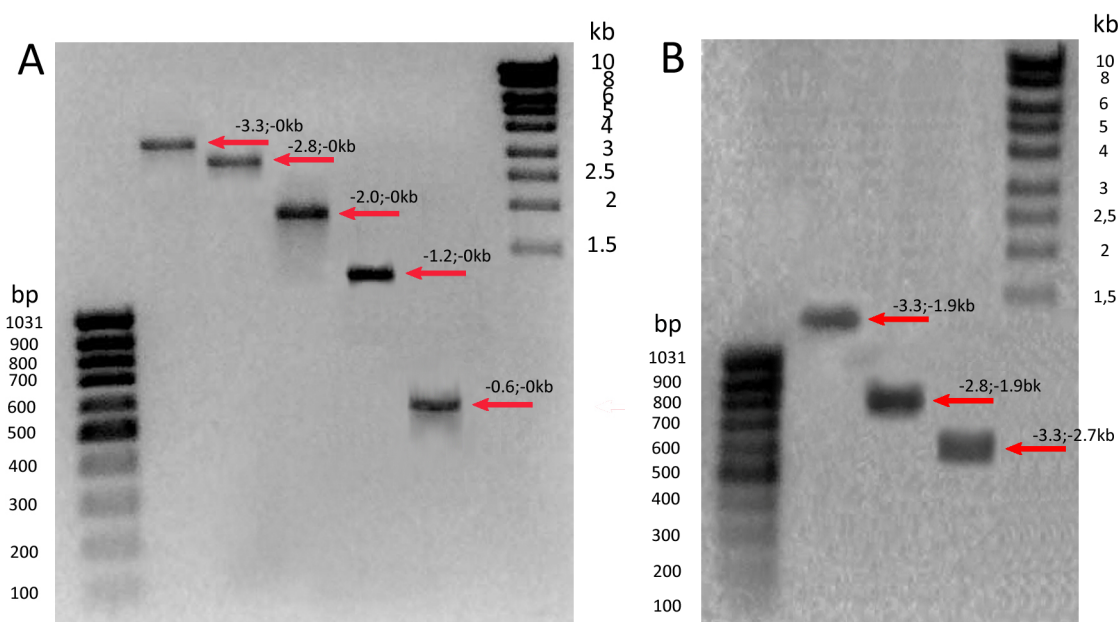
Obr. 12 Schéma reportérových konstruktů nesoucích regulační oblast miR-17-92 klastru. Fragменты miR-17-92 promotorové oblasti vložené před luciferázovou kazetu pGL3 vektoru, která je znázorněna žlutě. Jednotlivé fragmenty jsou znázorněny boxy, světle modrá část boxu znázorňuje CpG ostrůvek. Barevné proužky (oranžový, žlutý a zelený) znázorňují vazebná místa transkripčního faktoru Egr2 a histon demetylázy Jarid1b. Tmavě zelenou čarou je znázorněna vazba transkripčního faktoru Egr2 do promotorové oblasti miR-17-92 klastru identifikovaná v naší laboratoři chromatinovou imunoprecipitací.

4.1.1 Tvorba reportérových konstruktů nesoucích fragmenty regulační oblasti miR-17-92 klastru

4.1.1.1 Příprava fragmentů obsahujících regulační oblasti miR-17-92 klastru

Pomocí programu Primer3 jsme nejprve pro každý fragment nesoucí část regulační oblasti miR-17-92 klastru navrhli primery v obou směrech (viz Obr.9) s restrikčními místy na 5' konci pro restrikční enzym XhoI (specifická sekvence štěpení 5'-C[^]TCGAG-3') a na 3' konci pro restrikční enzym HindIII (specifická sekvence štěpení 5'-A[^]AGCTT-3'). Jednotlivé fragmenty jsme amplifikovali metodou PCR z myší genomické DNA, která byla izolována z PUER buněk pomocí DNasy Blood & Tissue kit od firmy Qiagen. Amplifikace byla ztížena přítomností úseku s vysokým CG obsahem, což je důvodem, proč se zatím žádné publikaci

popisující miR-17-92 klastr nepodařilo tuto oblast amplifikovat (O'Donnell *et al.*, 2005). PCR reakce byla proto modifikována přidáváním různých koncentrací a kombinací aditiv (DMSO, betain, formamid), změnou polymeráz, T_m a pro každý fragment bylo vytvořeno několik dvojic primerů. Amplifikace fragmentů jsme nakonec dosáhli pomocí CG-Rich PCR systému od firmy Roche speciálně navrženého pro amplifikace CG bohatých úseků a za použití primerů s vysokou hodnotou T_m . Přítomnost amplifikovaných fragmentů -3.3;-0kb, -2.8;-0kb, -2.0;-0kb, -1.2;-0kb, -0.6;-0kb, -3.3;-1.9kb, -2.8;-1.9kb a -3.3;-2.7kb jsme ověřili pomocí gelové elektroforézy (viz *Obr. 13*).



Obr. 13 Amplifikované fragmenty regulační oblasti miR-17-92 klastru. Jednotlivé fragmenty miR-17-92 promotorové oblasti zobrazené pomocí gelové elektroforézy na 0,8 % agarózovém gelu. Šipky vyznačují amplifikované fragmenty A) -3.3;-0kb, -2.8;-0kb, -2.0;-0kb, -1.2;-0kb, -0.6;-0kb B) -3.3;-1.9kb, -2.8;-1.9kb a -3.3;-2.7kb.

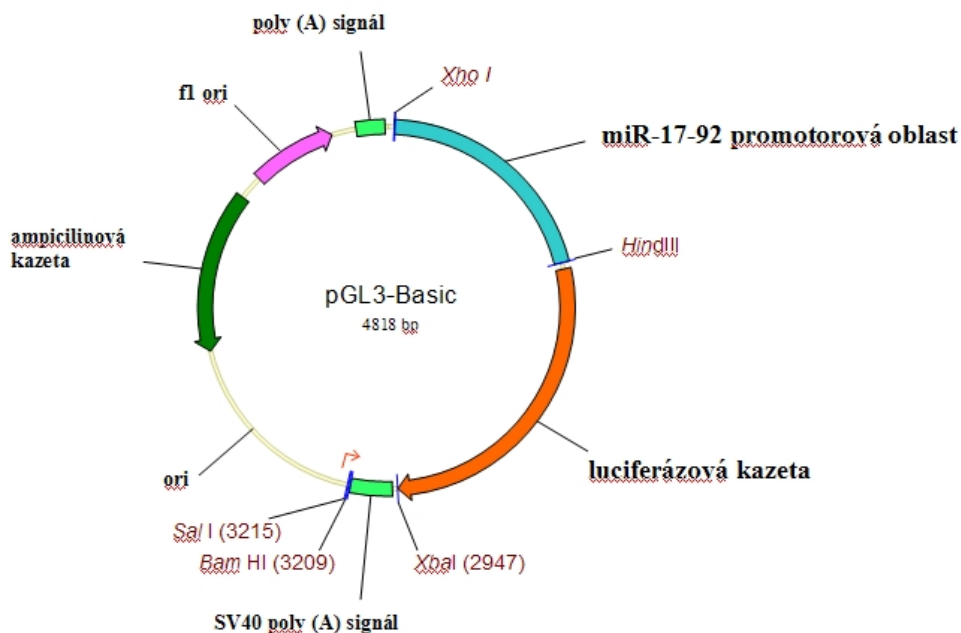
4.1.1.2 Restrikční štěpení, purifikace z gelu a ligace fragmentů regulační oblasti miR-17-92 klastru do pGL3 reporterového vektoru a transformace do bakterií DH5α

Získané fragmenty regulační oblasti miR-17-92 klastru jsme purifikovali pomocí MinElute PCR purifikačního kitu od firmy Qiagen a následně štěpili restrikázami HindIII a

XhoI po dobu 2 hodin při 37°C. Stejně restriční enzymy jsme použili k linearizaci reporterového vektoru pGL3 (viz Obr. 14). Tento vektor nesoucí luciferázovou kazetu postrádá eukaryotický promotor a zesilující sekvence. Expres luciferázové aktivity v buňkách transfekovaných tímto plazmidem je závislá pouze na vloženém a správně orientovaném funkčním promotoru.

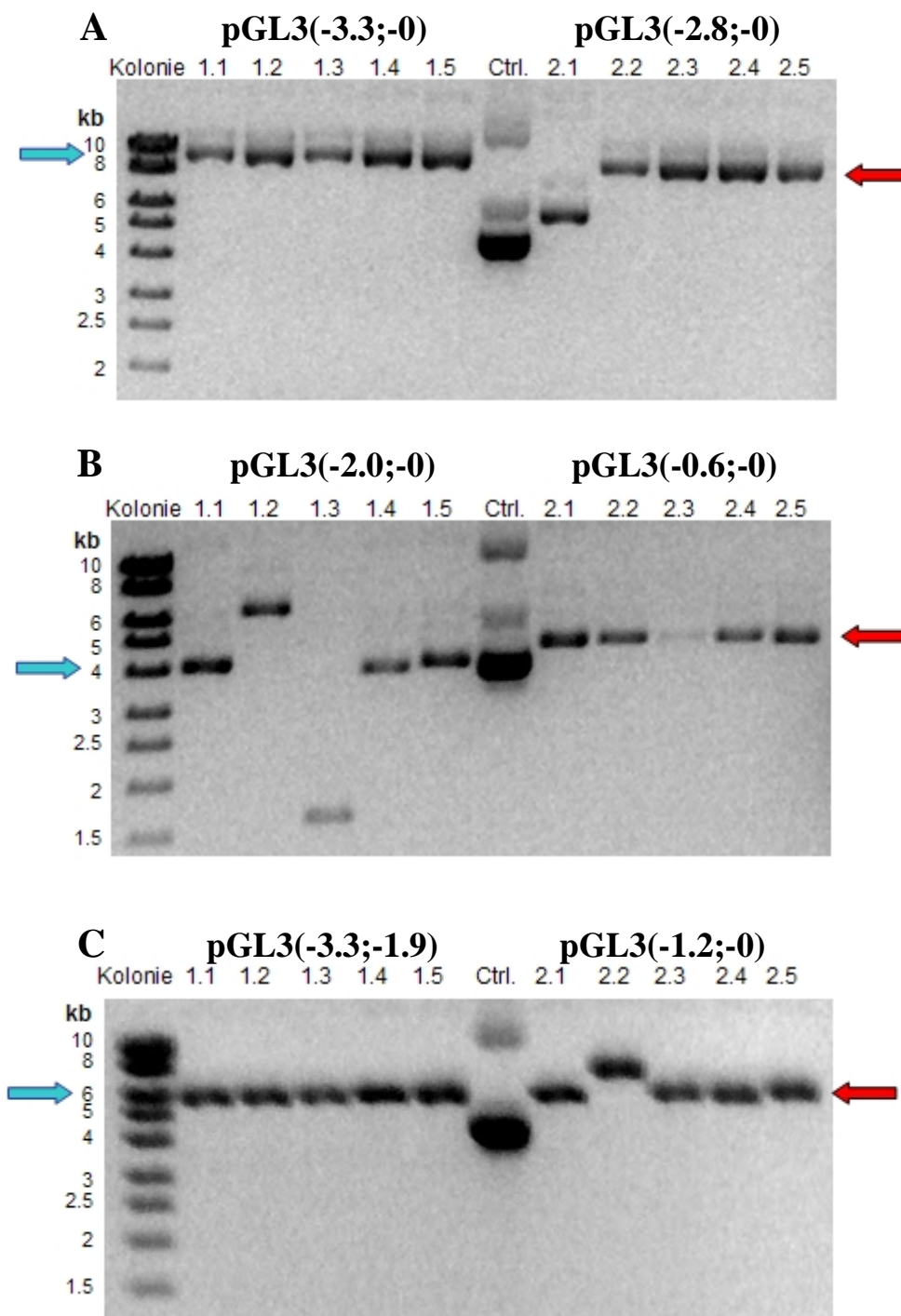
Štěpené fragmenty a linearizovaný vektor jsme následně purifikovali na agarózovém gelu, abychom tak odstranili odštěpené konce a zabránili jejich zpětnému spojení. Na 0,8 % izolační gel jsme na jamku nanášeli maximální objem jednotlivých vzorků (50 µl) nepřesahující však množství 5 µg. Elektroforéza probíhala za nízké voltáže tak dlouho, dokud nedošlo k bezpečnému rozdělení linearizovaného a zbytku neštěpeného vektoru. Štěpený vektor a fragmenty byly následně vyříznuty, zváženy a purifikovány pomocí gel extraction kitu od firmy Qiagen.

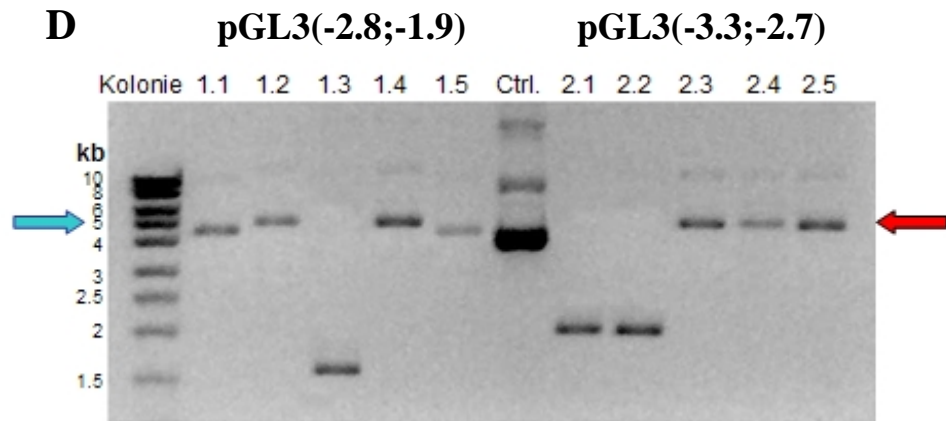
Štěpené fragmenty regulační oblasti miR-17-92 kladru byly následně ligovány do linearizovaného pGL3-basic vektoru. Použité množství fragmentů a vektorů bylo v poměru 5 : 1 s ohledem na délku jednotlivých fragmentů. Ligace probíhala pomocí T4 DNA ligázy po dobu 1,5 h na 16°C.



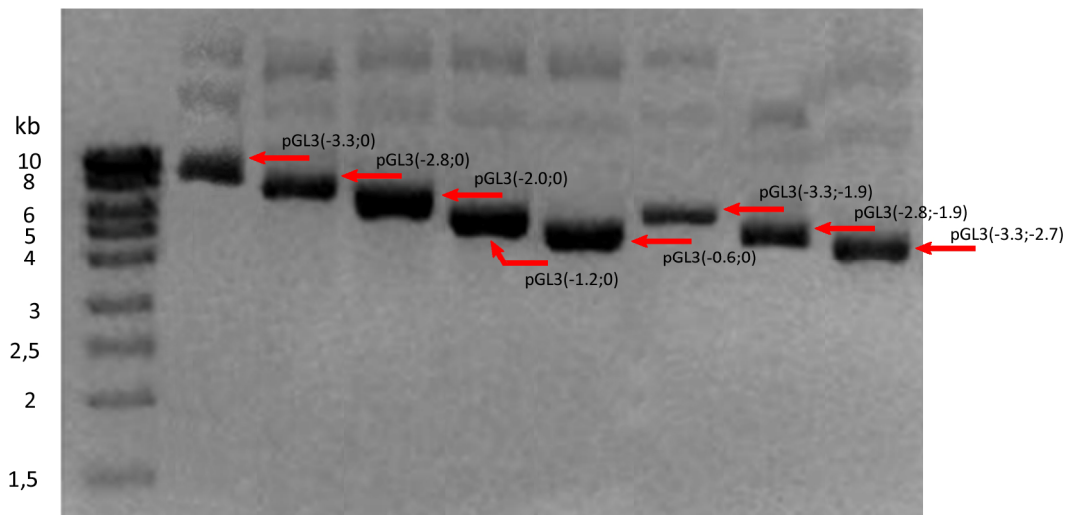
Obr. 14 Schéma pGL3-basic vektoru s vloženým úsekem miR-17-92 promotorové oblasti. Promotorová oblast miR-17-92 kladru (vyznačena světle modře) vložena před luciferázovou kazetu (vyznačena červeně) mezi restričními místy XhoI a HindIII.

Vzniklé konstrukty jsme pomocí teplotního šoku transformovali do bakterií DH5 α . Z každé transformace jsme vypíchlí 10 kolonií, které byly kultivovány a následně z nich byla izolována plazmidová DNA. Přítomnost pGL3(-3.3;-0), pGL3(-2.8;-0), pGL3(-2.0;-0), pGL3(-1.2;-0), pGL3(-0.6;-0), pGL3(-3.3;-1.9), pGL3(-3.3;-2.7), pGL3(-2.8;-1.9) konstruktů jsme ověřili pomocí gelové elektroforézy (viz *Obr. 15*). Všechny vytvořené reportérové konstrukty jsou zobrazeny na reprezentativním gelu (viz *Obr. 16*).





Obr. 15 **Reporterové konstrukty nesoucí úseky miR-17-92 promotorové oblasti.** Reporterové konstrukty izolované z pěti kolonií po transformaci ligační reakce jednotlivých konstruktů, zobrazené pomocí gelové elektroforézy na 0,8 % agarózovém gelu. Šipky vyznačují reportérové konstrukty o správné velikosti. Uprostřed gelu je puštěný prázdný pGL3 vektor sloužící jako kontrola (Ctrl.). **A)** pGL3(-3.3;-0) a pGL3(-2.8;-0) **B)** pGL3(-2.0;-0) a pGL3(-0.6;-0) **C)** pGL3(-3.3;-1.9) a pGL3(-1.2;-0) **D)** pGL3(-2.8;-1.9) a pGL3(-3.3;-2.7).

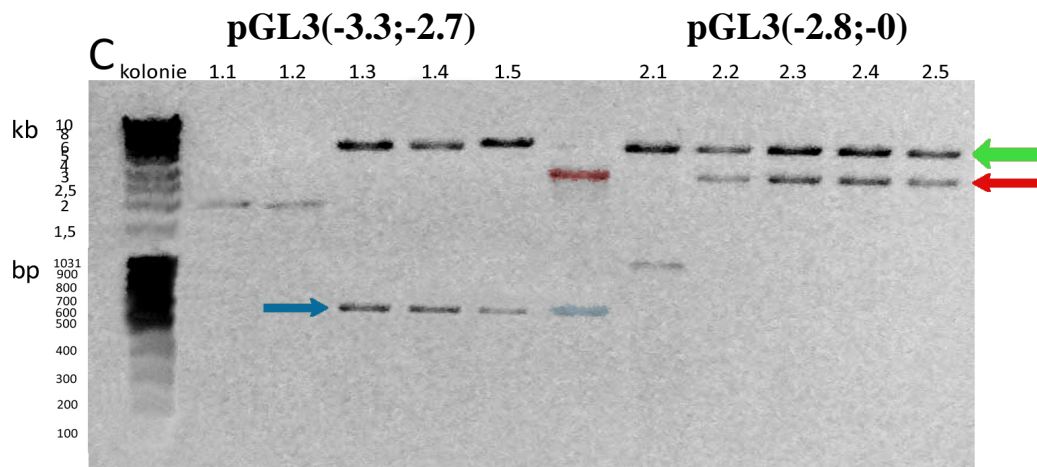
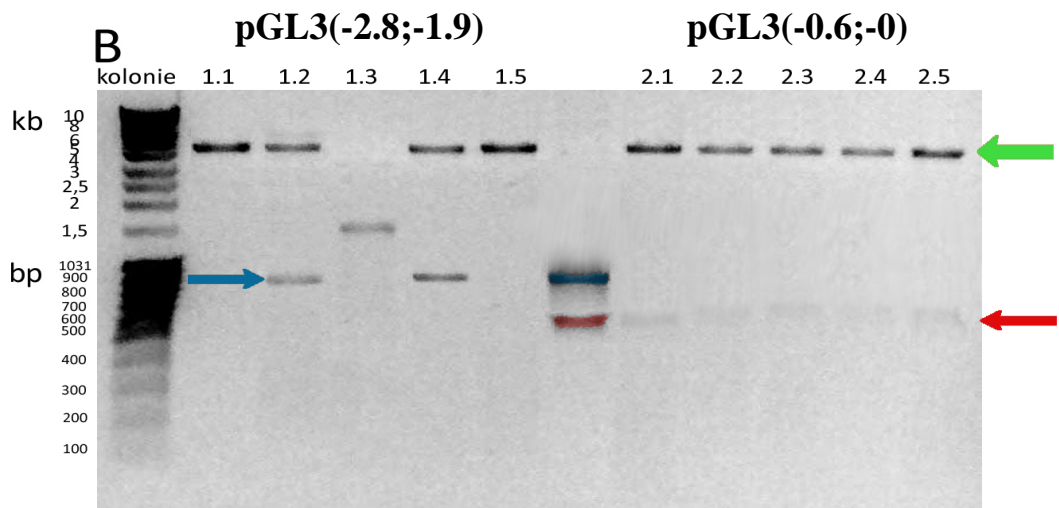
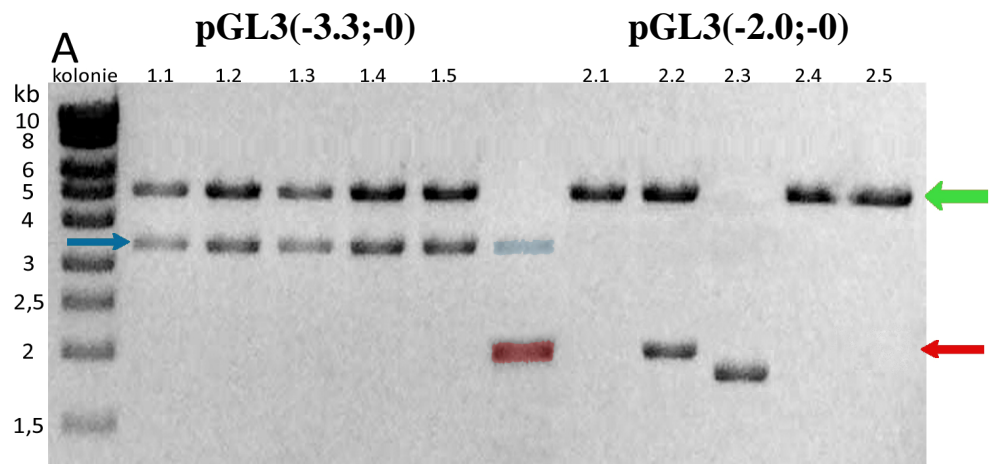


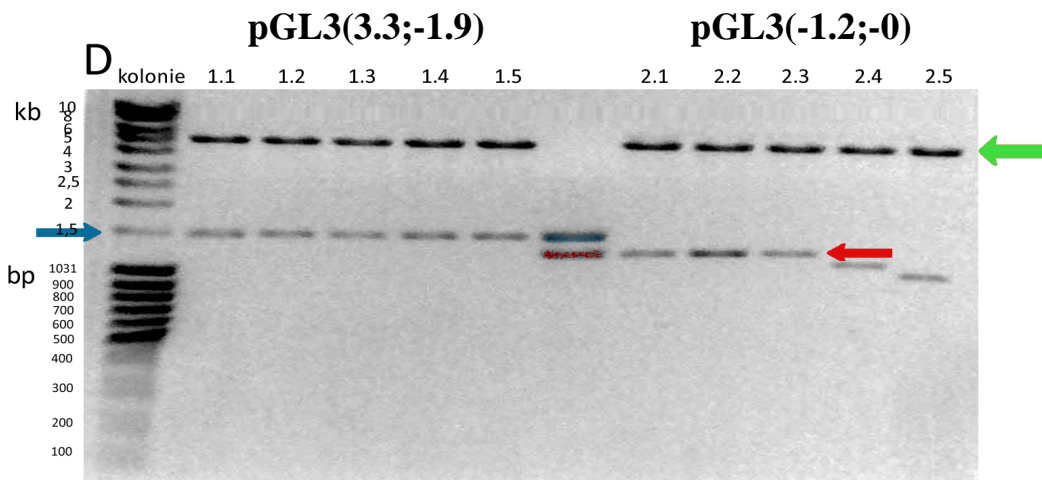
Obr. 16 **Srovnání jednotlivých pGL3 konstruktů nesoucích úseky miR-17-92 promotorové oblasti.** Jednotlivé reportérové konstrukty zobrazené pomocí gelové elektroforézy na 0,8 % agarózovém gelu. Šipky vyznačují luciferázové konstrukty pGL3(-3.3;-0), pGL3(-2.8;-0), pGL3(-2.0;-0), pGL3(-1.2;-0), pGL3(-0.6;-0), pGL3(-3.3;-1.9), pGL3(-3.3;-2.7), pGL3(-2.8;-1.9).

4.1.1.3 Restrikční ověření reportérových konstruktů nesoucích regulační oblasti miR-17-92 klastru

Správnost vložených fragmentů regulační oblasti miR-17-92 klastru do pGL3-basic vektoru jsme následně restrikčně ověřili. Reportérové konstrukty (zobrazen každý jednotlivý konstrukt izolovaný z pěti kolonií) jsme štěpili pomocí restrikčních enzymů HindIII a XhoI a štěpený produkt jsme ověřili pomocí gelové elektroforézy (viz *Obr. 17*). Pokud byly fragmenty do vektoru správně vloženy, restrikčním štěpením jsme získali dva proužky, první proužek znázorňující prázdný pGL3-basic vektor a druhý proužek znázorňující vnesený fragment miR-17-92 promotoru. DNA klonů jednotlivých pGL3 konstruktů byly na gel řazeny tak, aby se kontrolní PCR fragmenty puštěné na jednom gelu nepřekrývaly. Restrikční štěpení reportérových konstruktů porovnané s gely s neštěpenými konstrukty ukázalo, že u vektoru pGL3(-3.3;-0) došlo ke správnému vložení inzertů -3.3;-0kb ve všech pěti koloniích. Vektor pGL3(-2.0;-0) má správně vložený fragment -2.0;-0kb ve 2. kolonii, kolonie 1., 4. a 5. jsou prázdné vektory a kolonie 3. obsahuje fragment prázdného pGL3 vektoru (viz *Obr. 17A*). Vektor pGL3(-2.8;-1.9) má pozitivní 2. a 4. kolonii, u ostatních kolonií došlo k vložení prázdného vektoru. Všech pět pozitivních kolonií můžeme vidět u pGL3(-0.6;-0) (viz *Obr. 17B*). Porovnání restrikčního štěpení s gely s neštěpenými konstrukty dále ukázalo, že u vektoru pGL3(-3.3;-2.7) byly správně vložené fragmenty -3.3;-2.7kb v koloniích 3., 4. a 5.. Vektor pGL3(-2.8;-0) má kromě první kolonie, kde byl do vektoru vložen fragment o jiné délce, čtyři pozitivní kolonie s inzertem o správné délce (viz *Obr. 17C*). Vektor pGL3(-3.3;-1.9) má pozitivních všech pět kolonií a pGL3(-1.2;-0) má správně vložený fragment -1.2;-0kb v 1. a 3. kolonii, ve 2. kolonii se do vektoru vložily fragmenty -1.2;-0kb dva (viz *Obr. 15*) a v kolonii 4. a 5. se do vektoru vložily fragmenty jiné délky (viz *Obr. 17D*).

Konstrukty, u kterých restrikční analýza prokázala přítomnost specifického fragmentu odpovídající velikostí PCR fragmentu použitého pro klonování, jsme poslali na osekvenování. Správné luciferázové konstrukty potvrzené sekvencí jsme namnožili a izolovali pomocí HiPurePlasmid DNA Purification kitu od firmy Invitrogen.





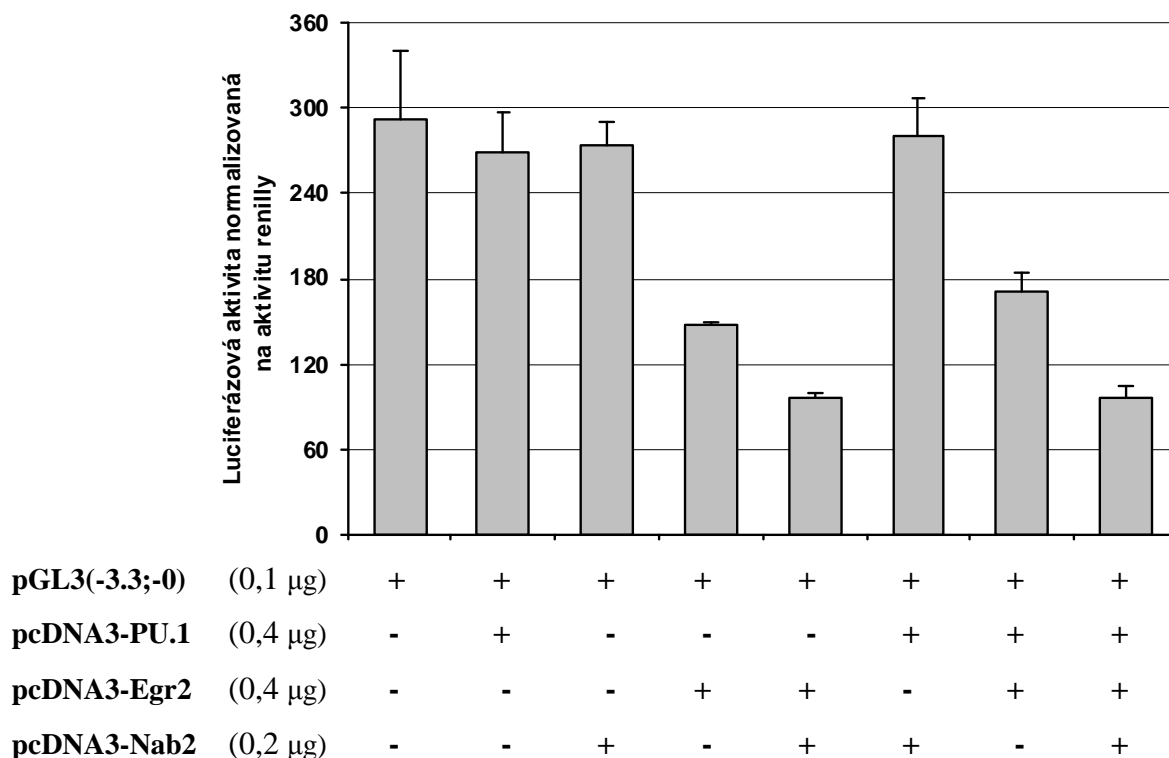
Obr. 17 Restrikční ověření reportérových konstruktů nesoucích úseky miR-17-92 promotorové oblasti. Restrikční ověření reportérových konstruktů izolovaných z pěti kolonií **A)** pGL3(-3.3;-0) a pGL3(-2.0;-0) **B)** pGL3(-2.8;-1.9) a pGL3(-0.6;-0) **C)** pGL3(-3.3;-2.7) a pGL3(-2.8;-0) **D)** pGL3(-3.3;-1.9) a pGL3(-1.2;-0). Zelená šipka vyznačuje prázdný pGL3-basic vektor. Modrá a červená šipka vyznačují vyštěpený fragment o správné velikosti. Červeně a modře podbarvené proužky označují PCR produkty použité pro klonování.

4.2 Funkční ověření regulace transkripce miR-17-92 klastru transkripčními faktory Egr2 a PU.1

Vytvořené reportérové konstrukty nesoucí různé úseky regulační oblasti miR-17-92 klastru byly použity pro studium regulace transkripce tohoto klastru v diferencujících myeloidních PUER progenitorech. Mým úkolem bylo ověřit funkčnost represe miR-17-92 klastru transkripčním faktorem Egr2 v nehematologických buněčných liniích myších NIH3T3 a lidských HeLa, za použití reportérového vektoru pGL3(-3.3;-0). Dalším úkolem bylo ověřit případnou závislost Egr2 zprostředkované represe na transkripčním faktoru PU.1 a dříve popsaném Egr2 korepresoru faktoru Nab2 (Svaren et al., 1996). Uvedené linie byly zvoleny jako vhodný model pro studium regulace miR-17-92 klastru, protože faktory PU.1 a Egr2 nejsou v těchto buněčných liniích za fyziologických podmínek exprimovány.

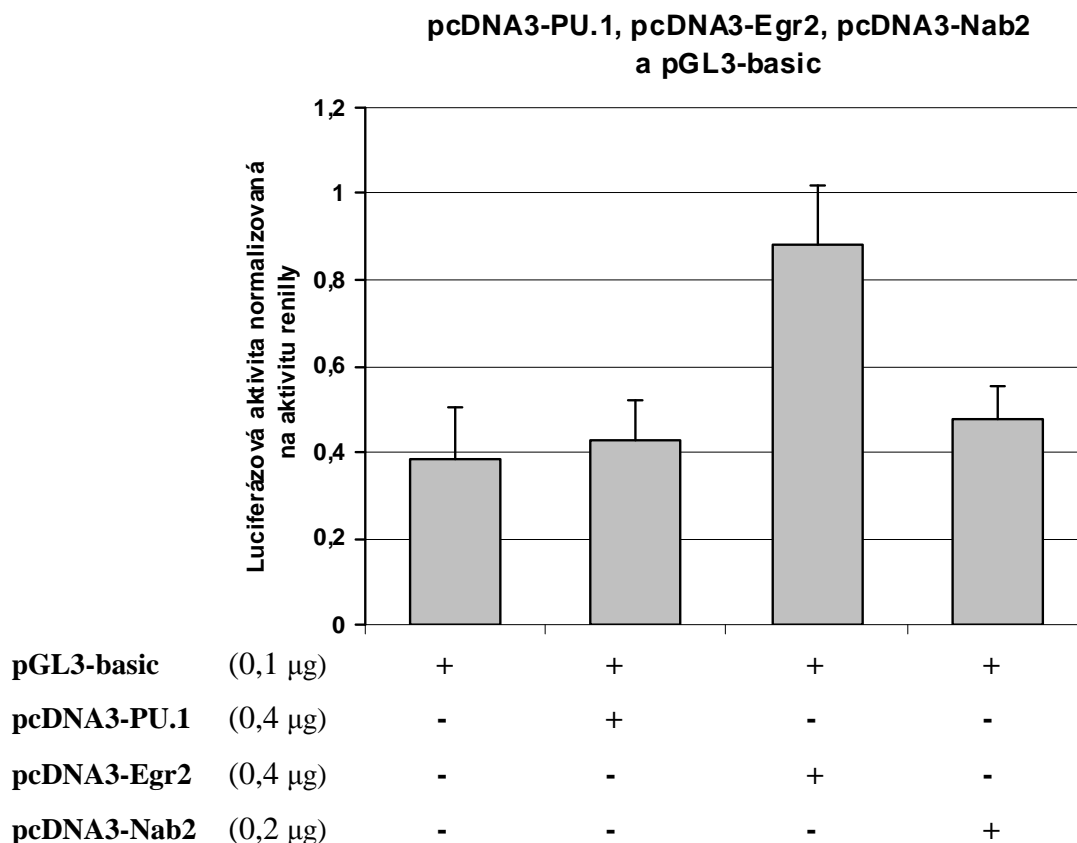
NIH3T3 buňky jsme kotransfekovali pGL3(-3.3;-0) reportérovým vektorem spolu s expresními vektory pcDNA3-Egr2, pcDNA3-PU.1 a pcDNA3-Nab2 (viz *Obr. 18*). Transfekce Egr2 faktoru vedla ke snížení luciferázové aktivity reportérového vektoru pGL3(-3.3;-0) přibližně o 50 %. Kotransfekce Nab2 korepresoru současně s Egr2 faktorem represí miR-17-92 klastru dále prohloubila. Naproti tomu transfekce transkripčního faktoru PU.1 a Nab2, transfekovaných samostatně nebo v kombinaci, neměla na luciferázovou aktivitu téměř žádný vliv. Uvedená data dále ukazují, že kotransfekce faktoru Egr2 a PU.1 měla obdobný efekt jako transfekce samotného transkripčního faktoru Egr2. Vzhledem k tomu, že PU.1 samotné nereprimuje miR-17-92 klastr a ani nezvyšuje represí způsobenou Egr2 transkripčním faktorem, lze usuzovat, že represe miR-17-92 klastru probíhá nezávisle na transkripčním faktoru PU.1. Uvedená data dále ukazují, že korepresor Nab2 zesiluje represí miR-17-92 klastru transkripčním faktorem Egr2.

**pcDNA3-PU.1, pcDNA3-Egr2, pcDNA3-Nab2
a pGL3(-3.3;-0)**



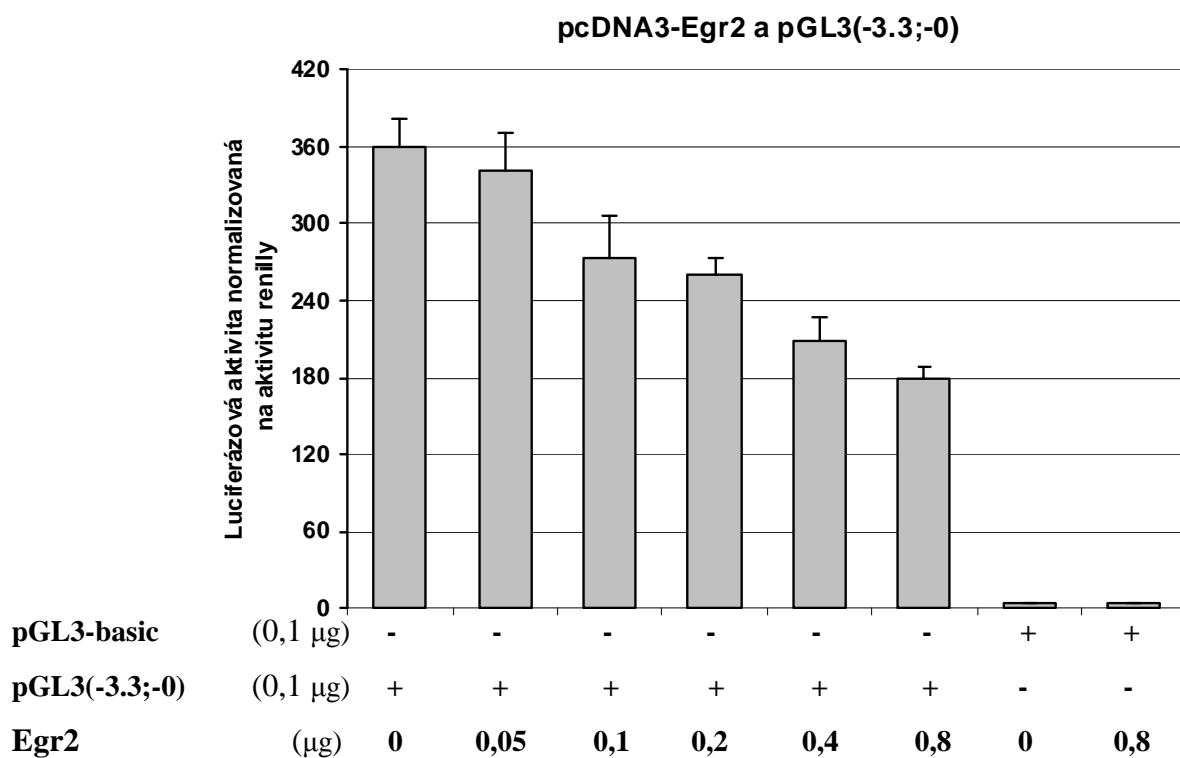
Obr. 18 Kotransfekce expresními vektory pcDNA-PU.1, pcDNA-Egr2 a pcDNA3-Nab2 a reporterového vektoru pGL3(-3.3;-0) do NIH3T3 buněk. Luciferázová aktivita je normalizovaná na aktivitu Renilly.

Abychom ověřili, že použité expresní vektory pcDNA3-PU.1, pcDNA3-Egr2 a pcDNA3-Nab2 neovlivňují bazální expresi vektoru pGL3, kotransfekovali jsme tyto expresní vektory s prázdným pGL3-basic plazmidem do NIH3T3 buněk (viz *Obr. 19*). Zatímco pcDNA3-PU.1 a pcDNA3-Nab2 vektory neaktivovaly prázdný pGL3-basic vektor, pcDNAEgr2 zvyšoval expresi tohoto vektoru dvojnásobně. Příčinou toho je zřejmě schopnost transkripčního faktoru Egr2 vázat CG bohaté oblasti jež jsou zastoupeny i v pGL3 vektoru. Ze stejného důvodu nebylo možné použít modernější vektor pGL4, který jsme též testovali, jelikož transkripční faktor Egr2 aktivoval samotný vektor v koncentrační závislosti 2-15x (data nezobrazena). Je možné předpokládat, že pokud bychom odečetli aktivaci prázdného pGL3 vektoru Egr2 faktorem od reporterového konstruktu pGL3(-3.3;-0), byla by jeho represe ještě větší.

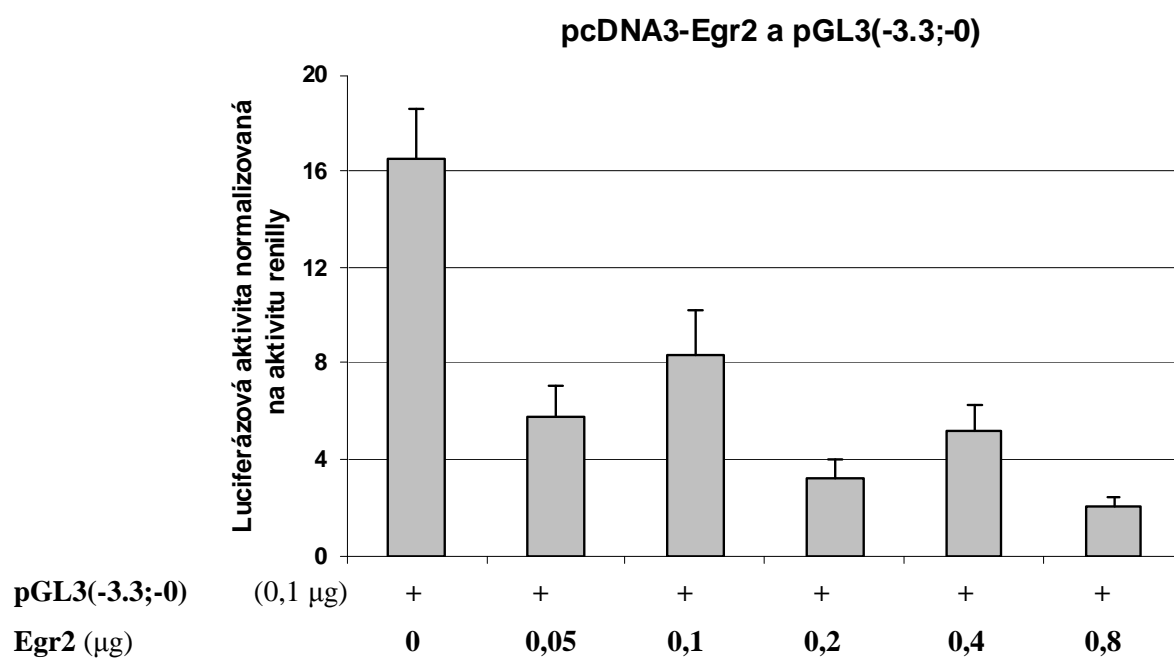


Obr. 19 Ověření vlivu expresních vektorů pcDNA3-PU.1, pcDNA3-Egr2 a pcDNA3-Nab2 na bazální expresi prázdného pGL3-basic vektoru v NIH3T3 buňkách. Luciferázová aktivita byla normalizovaná na aktivitu Renilly.

Následně byla testována koncentrační závislost represe miR-17-92 klastru na Egr2 transkripčním faktoru. Reportérový vektor pGL3(-3.3;-0) byl kotransfekován současně se vzrůstající koncentrací pcDNA3-Egr2 vektoru do NIH3T3 buněk (viz *Obr. 20*). Zvyšující se hladina Egr2 faktoru se projevila postupně se snižující luciferázovou aktivitou. Represivní mechanismus Egr2 faktoru na miR-17-92 klastr jsme dále testovali v HeLa buňkách, které jsme obdobně kotransfekovali reportérovým vektorem pGL3(-3.3;-0) a vzrůstající koncentrací vektoru pcDNA3-Egr2 (viz *Obr. 21*). Stejně jako v případě NIH3T3 buněčné linie se vzrůstající koncentrace Egr2 faktoru projevila snižující se luciferázovou aktivitou. Z výsledků můžeme předpokládat, že transkripční faktor Egr2 reprimuje miR-17-92 klastr v koncentrační závislosti a dále, že represivní mechanismus transkripčního faktoru Egr2 na miR-17-92 klastr není omezen na jeden typ buněk, ale je zřejmě univerzální.



Obr. 20 Kontransfekce reporterového vektoru pGL3(-3.3;-0) s expresním vektorem pcDNA3-Egr2 do NIH3T3 buněk. Luciferázová aktivita byla normalizovaná na aktivitu Renilly.



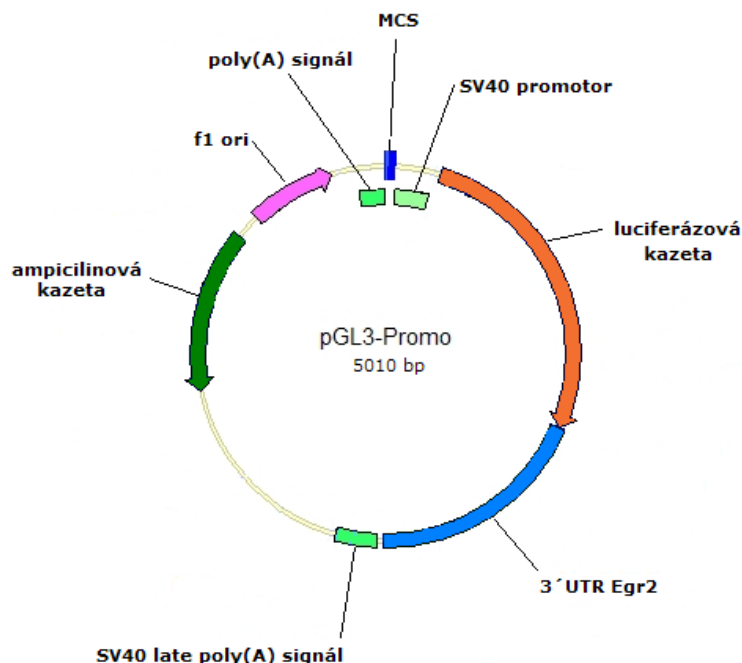
Obr. 21 Kontransfekce reporterového vektoru pGL3(-3.3;-0) s expresním vektorem pcDNA-Egr2 do HeLa buněk. Luciferázová aktivita byla normalizovaná na aktivitu Renilly.

4.3 Identifikace vzájemné regulace mezi Egr2 a miRNA miR-17-92 klastrem

MikroRNA a jejich cílové mRNA mezi sebou mohou vytvářet vzájemné regulační okruhy. Pomocí algoritmu TargetScan (<http://www.targetscan.org>) jsme analyzovali přibližně 1 kb 3'UTR transkripčního faktoru Egr2. Bylo predikováno, že miR-17-5p, miR-20a a miR-92-1 kódované miR-17-92 klastrem jsou schopny vázat se do dvou míst 3'UTR Egr2 transkripčního faktoru, v pozicích 419 - 425 bp a 612 - 618 bp. Výsledky analýzy nás vedou k otázce, zda by miRNA miR-17-92 klastru mohly negativně regulovat Egr2 transkripční faktor.

4.3.1 Místně specifická mutagenese 3'UTR Egr2 transkripčního faktoru

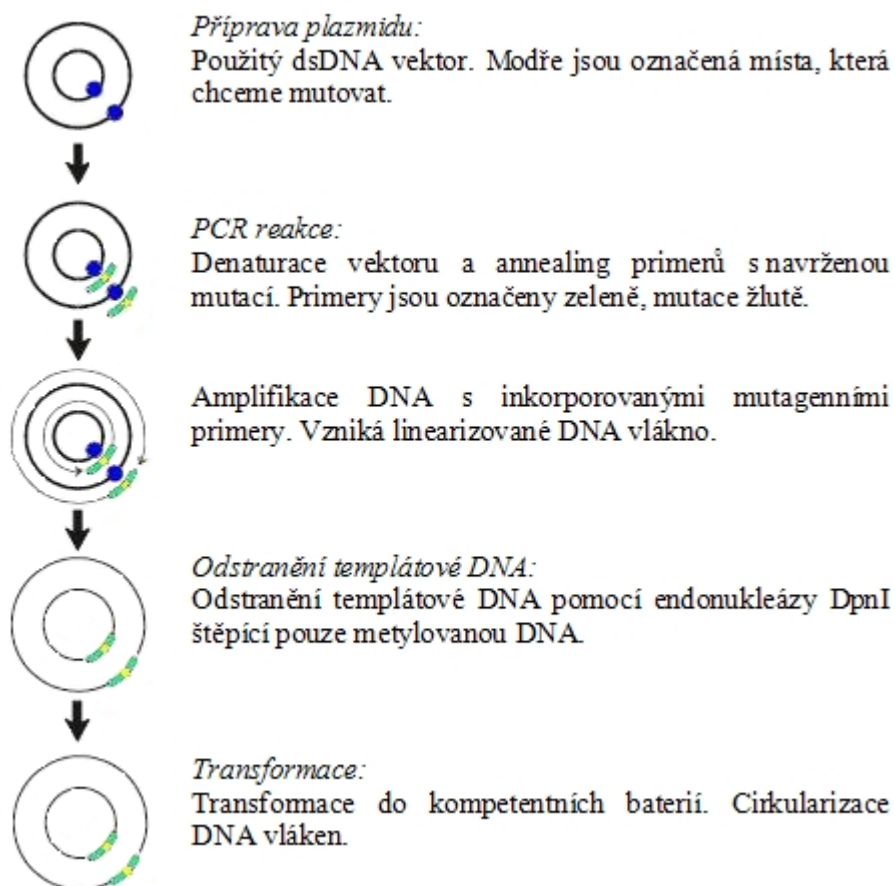
Abychom mohli ověřit výše uvedenou domněnku, t.j. mikroRNA kódované miR-17-92 klastrem negativně regulují transkripční faktor Egr2 vazbou do jeho 3'UTR, rozhodli jsme se vytvořit reportérové konstrukty nesoucí nemutovanou a mutovanou 3'UTR Egr2 faktoru. Reportérový konstrukt nesoucí nemutovaný úsek 3'UTR Egr2 transkripčního faktoru byl již dříve vytvořen v naší laboratoři. Přibližně 1 kb dlouhý úsek 3'UTR byl vložen do pGL3 promotorového vektoru za oblast luciferázového genu za vzniku pGL3-Egr2-3'UTRwt vektoru (viz *Obr. 22*)



Obr.22 Schéma pGL3-Egr2-3'UTRwt vektoru. pGL3 promotorový vektor obsahující SV40 promotor nacházející se před luciferázovou kazetou (vyznačena červeně). Přibližně 1 kb dlouhá 3'UTR Egr2 transkripčního faktoru (vyznačena světle modře) vložena za luciferázovým genem.

Pro tvorbu reporterového konstruktů s mutovanou 3'UTR transkripčního faktoru Egr2 jsme využili modifikované strategie vytvořené Stratagene (viz Obr. 23). Rozhodli jsme se mutovat obě predikovaná místa rozpoznávaná miRNA miR-17-92 klastrem v 3'UTR transkripčního faktoru Egr2 vložené do pGL3-Egr2-3'UTRwt vektoru. Mutace byly do vektoru vneseny metodou PCR. Nejprve jsme navrhli dva páry oligonukleotidových primerů nesoucích mutace v pozici 419 - 425 bp a 612 - 618 bp. Každý pár hybridizoval se stejnou sekvencí opačných vláken dsDNA vektoru. Navržené mutace se nacházely uprostřed primerů a byly obklopeny 15 - 20 nukleotidy. Jako templátovou DNA jsme využili nemutovaného vektoru pGL3-Egr2-3'UTRwt, který byl izolován z *dam*⁺ bakterií kmene *E. coli* vytvářejících metylovanou DNA. Během PCR reakce došlo k amplifikaci vektorové DNA s inkorporovanými mutagenními primery. Templátovou DNA, která nenesla požadovanou mutaci, jsme následně odstranili pomocí enzymu DpnI rozpoznávající pouze metylovanou DNA.

Mutovanou DNA jsme pomocí teplotního šoku transformovali do DH5 α bakterií. Od každé transformace jsme vypíchlí 4 kolonie, které byly kultivovány a následně z nich byla izolována plazmidová DNA, kterou jsme nechali osekvenovat.



Obr. 23 **Modifikovaná strategie místně-specifické mutagenese.** Převzato a upraveno z protokolu pro QuikChange site-directed mutagenesis kit firmy Stratagene.

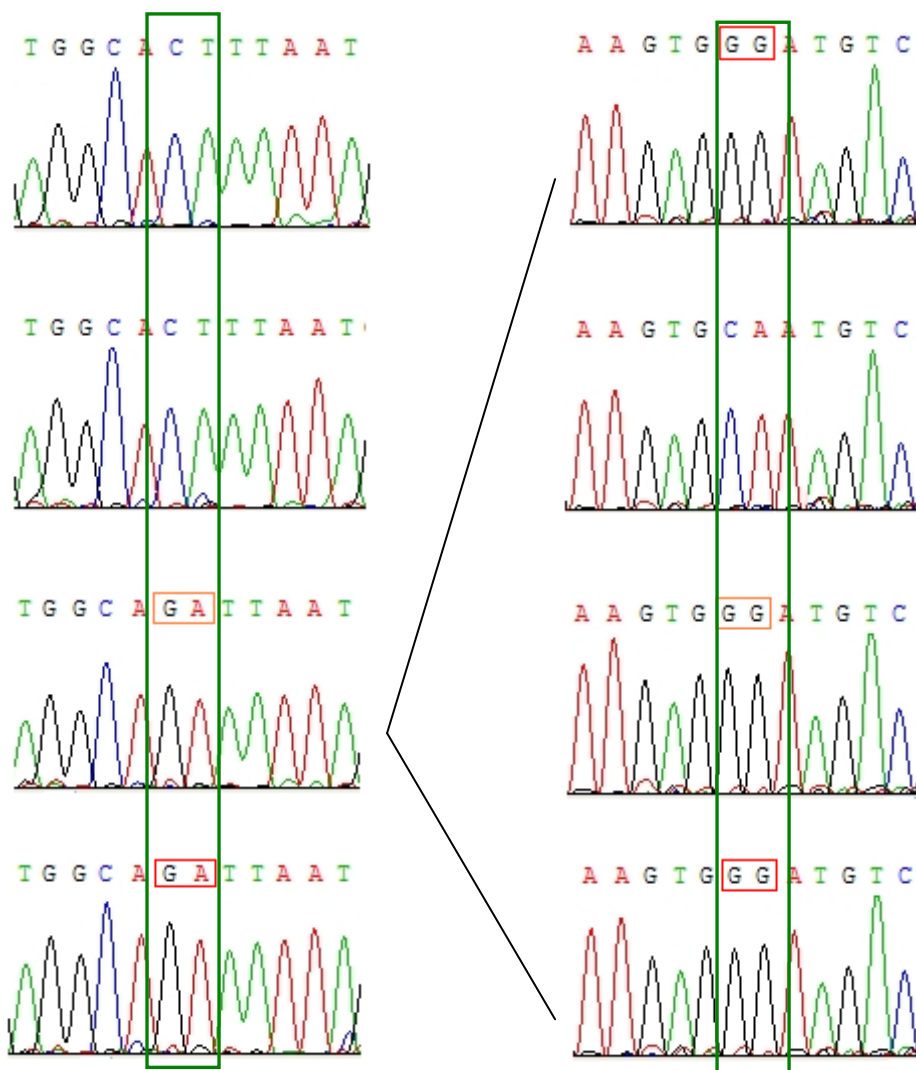
Celá mutagenese probíhala ve dvou částech. V první části jsme pro PCR reakci využili pouze jedné dvojice primerů. Do vektoru byla vnesena bodová mutace prvního vazebného místa miRNA miR-17-92 klastru v pozici 419 – 425 bp, jejíž správnost jsme nechali ověřit sekvenací. Vektor nesoucí první mutaci jsme následně použili k druhému kolu mutagenese, ve kterém do něho byla vnesena mutace druhého vazebného místa miRNA miR-17-92 klastru v pozici 612 – 618 bp pomocí druhé sady primerů. Sekvence potvrdila přítomnost obou mutací (viz *Obr. 24*). Získali jsem reportérový vektor pGL3-Egr2-3'UTRmut.

**Mutace 1. vazebného místa
v pozici 419 - 425 bp**

**Mutace 2. vazebného místa
v pozici 612 - 618 bp**

Původní sekvence ATGTGGCACTTTAATGGC
Mutovaná sekvence ATGTGGCAGATTAATGGC

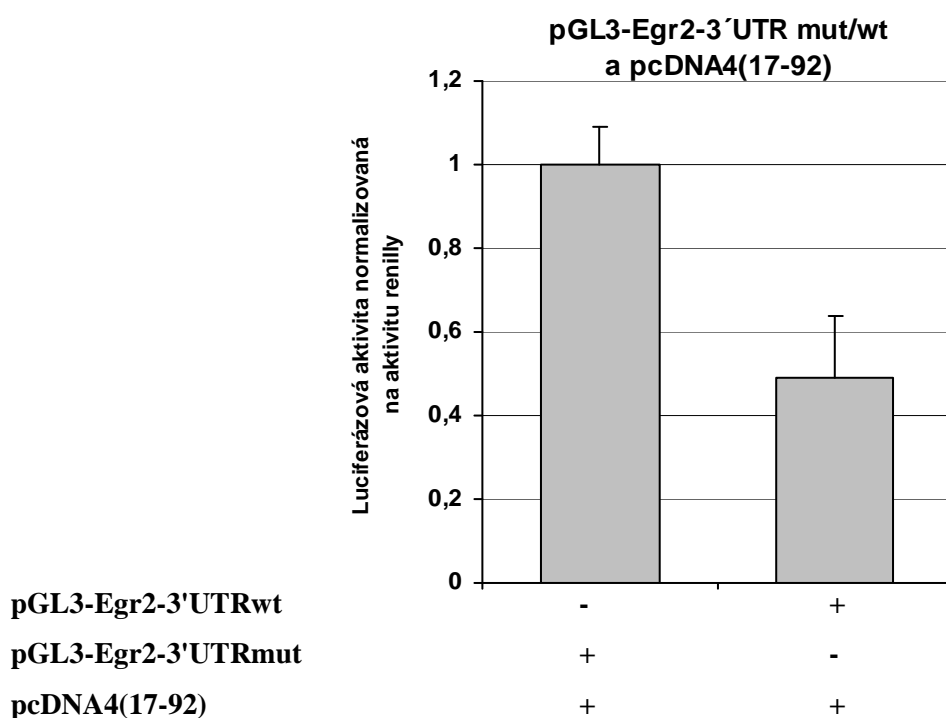
TGGAAGTGCAATGTCGGG
 TGGAAGTGGGATGTCGGG



Obr. 24 Sekvence vektoru pGL3Egr2-3'UTR. Výsledky sekvenace vektoru pGL3Egr2-3'UTR izolovaných ze čtyř kolonií zobrazené programem Chromas Lite. Horní řádek znázorňuje původní sekvenci 3'UTR Egr2 faktoru, dolní řádek znázorňuje sekvenci mutovanou, mutace je označena červeně. První sloupec znázorňuje 1. kolo mutagenese. Ze čtyř kolonií ve dvou byla vnesena bodová mutace v pozici 419 – 425 bp. Třetí konstrukt byl použit pro 2. kolo metagenese, jehož výsledky jsou znázorněny ve druhém sloupci. Ze čtyř kolonií ve třech byla vnesena bodová mutace v pozici 612 - 618 bp. Zelený rámeček označuje oblast podléhající mutaci. Mutované sekvence jsou označeny červeným rámečkem.

4.3.2 Funkční ověření vztahu mezi miRNA miR-17-92 klastrem a transkripčním faktorem Egr2

Vytvořené konstrukty nesoucí nemutovanou a mutovanou 3'UTR transkripčního faktoru Egr2 byly v naší laboratoři použity k transfekci do diferencovaných nebo nediferencovaných PUER buněk, v přítomnosti nebo nepřítomnosti inhibitorů miR-17-92 klastru. Mým úkolem bylo ověřit schopnost mikroRNA miR-17-92 klastru reprimovat 3'UTR transkripčního faktoru Egr2 v HeLa buňkách. Kotransfekce pcDNA4(17-92) s pGL3-Egr2-3'UTRwt se projevila snížením luciferázové aktivity přibližně o 50 % v porovnání s pGL3-Egr2-3'UTRmut (viz Obr. 25). Tyto výsledky podporují náš předpoklad, že miRNA kódované miR-17-92 klastrem posttranskripčně inhibují transkripční faktor Egr2.



Obr. 25 Kotransfekce reportérových vektorů pGL3-Egr2-3'UTRwt/mut a expresního vektoru pcDNA4(17-92) do HeLa buněk. Luciferázová aktivita byla normalizovaná na aktivitu Renilly.

5 Diskuze

Naše týmová vědecká práce, jejíž součástí je tato diplomová práce, popisuje nové mechanismy biologických regulací klíčových molekul účastnících se myeloidní diferenciace. V průběhu diferenciace myeloidních PUER progenitorů indukovaných PU.1 transkripčním faktorem dochází k inhibici miR-17-92 klastru. Tato inhibice je zprostředkována transkripčním faktorem Egr2, který se váže do promotorové oblasti miR-17-92 klastru (~ -2.7kb) a umožní navázání histon demetylázy Jarid1b, která demetyluje histon 3 lyzin 4, což se projeví změnou chromatinové struktury (Pospíšil et al., připraveno pro publikaci).

Hlavním úkolem této diplomové práce bylo vytvořit molekulární systém studia transkripční regulace obsahující reportérové konstrukty nesoucí různé úseky putativní promotorové oblasti miR-17-92 klastru, které by umožnily další studium mechanismů regulace transkripce miR-17-92 klastru. V promotorové oblasti miR-17-92 klastru v úseku -3.3 až -1.2 kb vzhledem k začátku kódující sekvence miR-17-5p se nachází CpG bohatá oblast s ~ 80 % CG obsahem. Až 40 % tkáňově specifických genů obsahuje v 5' promotorové oblasti CpG bohaté úseky (Larsen et al., 1992). Obecně jsou takovéto úseky velmi těžce amplifikovatelné (Hube et al., 2005). Doposud se v literatuře zabývající se regulací miR-17-92 klastru zatím nepodařilo tuto oblast amplifikovat a použít pro transkripční eseje (O'Donnell et al., 2005; Woods et al., 2007). Po velké řadě modifikací ve složení PCR reakce (viz kapitola 4.1.1.1) a za použití řady variant primerů se nám úspěšně podařilo amplifikovat 8 fragmentů regulační oblasti miR-17-92 klastru, z toho 6 fragmentů přímo nese některou z částí CpG ostrůvku. Všechny vytvořené fragmenty nesoucí různé úseky promotorové oblasti miR-17-92 klastru byly vloženy do pGL3-basic vektoru (viz *Obr. 16*).

Jak již bylo řečeno, v průběhu makrofágové diferenciace dochází k represí miR-17-92 klastru, která je zprostředkována transkripčním faktorem Egr2 (Pospíšil et al., připraveno pro publikaci). V této diplomové práci jsme se zaměřili na studium a následné popsání mechanismu represe miR-17-92 klastru transkripčním faktorem Egr2 v nehematologických buněčných liniích NIH3T3 a HeLa. Pokusili jsme se zjistit, zda popsaný represivní mechanismus není omezen pouze na hematologické linie a zda je závislý na dalších transkripčních faktorech PU.1 a Nab2 účastnících se makrofágové diferenciace.

Z transfekčních pokusů a následné luciferázové eseje jsme zjistili, že v NIH3T3 a HeLa buňkách je transkripční faktor Egr2 schopen reprimovat miR-17-92 klastr a tato represe je koncentračně závislá (viz *Obr. 18, 20 a 21*). Z těchto výsledků jsme vyvodili předpoklad, že mechanismus represe miR-17-92 klastru transkripčním faktorem Egr2 není

omezen pouze na buňky krvetvorby, ale může fungovat i v liniích derivovaných z jiných než hematologických tkání a dále že uvedená represe je pravděpodobně nezávislá na transkripčním faktoru PU.1, který není v použitých liniích exprimován. Pro makrofágovou diferenciaci je nezbytná vysoká hladina transkripčního faktoru PU.1 (Dahl et al., 2003; DeKoter and Singh, 2000). PU.1 aktivuje expresi transkripčního faktoru Egr2, který dále podporuje vývoj makrofágů a aktivně reprimuje alternativní granulocytární program (Laslo et al., 2006). Pokusili jsme se zjistit, zda je represe miR-17-92 klastru transkripčním faktorem Egr2 závislá v NIH3T3 buňkách na transkripčním faktoru PU.1. Z transfekčních pokusu jsme zjistili, že samotný transkripční faktor PU.1 nemá vliv na represi miR-17-92 klastru a ani nezvyšuje schopnost transkripčního faktoru Egr2 reprimovat transkripci tohoto klastru (viz *Obr. 18*). Tomu odpovídá i skutečnost, že se nepodařilo identifikovat vazbu PU.1 v rozmezí -10kb až +10kb regulačních oblastí miR-17-92 klastru pomocí chromatinové imunoprecipitace (Pospíšil et al., připraveno pro publikaci). Zároveň volně dostupná data celogenomových analýz vazby PU.1 uložená ve veřejné databázi GEO (Gene Expression Omnibus) (www.ncbi.nlm.nih.gov/geo) neidentifikují vazbu PU.1 do putativních regulačních oblastí miR-17-92 klastru. Tyto výsledky nás vedou k domněnce, že samotný mechanismus represe miR-17-92 klastru transkripčním faktorem Egr2 je nezávislý na transkripčním faktoru PU.1. Posledním transkripčním faktorem, jehož vliv na represi miR-17-92 klastru v nehematologických liniích jsme sledovali je Nab2. Tento transkripční faktor je znám jako korepresor Egr proteinů (Svaren et al., 1996). Naše pokusy ukázaly, že samotný Nab2 nereprimuje miR-17-92 klastr, ale potencuje v NIH3T3 a HeLa buňkách represi miR-17-92 klastru transkripčním faktorem Egr2 (viz *Obr. 18*).

Během transfekčních pokusů jsme zjistili, že používaný expresní vektor pcDNA-Egr2 zvyšuje bazální expresi samotného pGL3 vektoru (viz *Obr. 19*). Příčinou toho je zřejmě schopnost vazby tohoto expresního vektoru do CG bohatých oblastí (Gillian and Svaren, 2004), či přítomnost kryptického vazebného místa v sekvenci reporterového vektoru (Vopalensky et al., 2008). Z tohoto důvodu jsme také nemohli využít modernějšího luciferázového vektoru pGL4, který jsme též testovali a do kterého byly fragmenty regulační oblasti miR-17-92 klastru původně vloženy, jelikož Egr2 aktivovalo samotný vektor v koncentrační závislosti 2-15x (data nezobrazena).

MikroRNA a cílové geny jež inhibují, se mohou navzájem regulovat a vytvářet tak mezi sebou vzájemné regulační okruhy (Bracken et al., 2008; Martinez et al., 2008). Bylo prokázáno, že E2F transkripční faktory jsou inhibovány miR-20a kódovanou miR-17-92

klastrem a zároveň se vážou do promotorové oblasti tohoto klastru a transkripčně ho aktivují, čímž se mezi nimi vytváří autoregulační zpětná vazba (Sylvestre et al., 2007). Vzájemná negativní regulace mikroRNA miR-17-92 klastru byla také zjištěna u faktoru AML1, který je schopen transkripčně reprimovat miR-17-92 klastr vazbou do jeho promotorové oblasti a sám je inhibován mikroRNA miR-17-92 klastru miR-17-5p a miR-20a (Fontana et al., 2007). Uvedená zjištění odpovídají předpokladu, že transkripční faktory jsou miRNA inhibovány častěji, než jiné typy genů (Shalgi et al., 2007).

Z toho důvodu jsme se rozhodli otestovat, zda mikroRNA miR-17-92 klastru mohou posttranskripčně inhibovat transkripční faktor Egr2. Byla provedena analýza *in silico* 3'UTR transkripčního faktoru Egr2 (<http://www.targetscan.org>), která predikovala dvě vazebná místa rozpoznávaná mikroRNA miR-17-92 klastru miR-17-5p a miR-20a v pozici 419 - 425 bp a miR-92-1 v pozici 612 - 618 bp, a na jejímž základě jsme dospěli k předpokladu, že mikroRNA miR-17-92 klastru mohou posttranskripčně inhibovat transkripční faktor Egr2. Abychom mohli studovat regulační vliv miRNA miR-17-92 klastru na transkripční faktor Egr2, bylo nutné vytvořit reportérové konstrukty nesoucí nemutovanou a mutovanou 3'UTR tohoto faktoru a pomocí těchto vektorů náš předpoklad otestovat.

Další část této diplomové práce je zaměřena na tvorbu vektoru s mutovanou 3'UTR transkripčního faktoru Egr2. Nemutovaný vektor pGL3-Egr2-3'UTRwt byl dříve vytvořen v naší laboratoři a kotransfekce tohoto vektoru do nediferencovaných a diferencovaných PUER myeloidních progenitorů v přítomnosti nebo nepřítomnosti inhibitorů miR-17-92 klastru validovala EGR2 3'UTR jako cíl uvedených miR miR-17-92 klastru. Výsledně se nám podařilo mutovat obě predikovaná vazebná místa miR-17-92 klastru v 3'UTR transkripčního faktoru Egr2 a vytvořit pGL3-Egr2-3'UTRmut reporter. Kotransfekcí pGL3-Egr2-3'UTRmut nebo pGL3-Egr2-3'UTRwt s expresním vektorem nesoucím kódující oblast miR-17-92 klastru do HeLa buněk se nám podařilo ověřit inhibiční vliv miRNA miR-17-92 klastru na transkripční faktor Egr2 (viz Obr. 25). Uvedená data ukazují, že mezi transkripčním faktorem Egr2 a mikroRNA miR-17-92 klastru existuje pravděpodobně dvojitá negativní regulace (zpětná vazba). Bylo popsáno, že takováto vzájemná regulace, kdy miRNA inhibuje cílový gen a zároveň je produktem tohoto cílového genu sama inhibována, vede ke stavu, kdy podle fyziologických podmínek převládne jeden nebo druhý faktor účastníci se dvojitě negativní zpětné vazby (tzv. bistable state) (Martinez et al., 2008).

Na základě uvedených výsledků je vysoce pravděpodobné, že mezi mikroRNA miR-17-92 klastru a Egr2 transkripčním faktorem existuje během makrofágové diferenciace

homeostatická rovnováha, kdy transkripční faktor Egr2 reprimuje miR-17-92 klastr v diferencujících se buňkách, zatímco v prolifерujících progenitorech je transkripční faktor Egr2 inhibován mikroRNA miR-17-92.

6 Shrnutí výsledků

Tato diplomová práce byla zaměřena na studium regulace transkripce miR-17-92 klastru v závislosti na transkripčních faktorech Egr2 a PU.1 a s tím spojenou tvorbou systému toto studium umožňujícího.

1. Vytvořili jsme osm pGL3 reportérových konstruktů nesoucích odlišné úseky regulační oblasti miR-17-92 klastru v rozmezí -3.3 až 0 kb vzhledem k začátku kódující sekvence miR-17-5p, které byly využity pro studium regulace transkripce miR-17-92 klastru.
2. Podařilo se nám ověřit represi miR-17-92 klastru na transkripčním faktoru Egr2 v nehematologických buněčných liniích NIH3T3 a HeLa.
3. Potvrdili jsme, že represe miR-17-92 klastru zprostředkovaná transkripčním faktorem Egr2 není závislá na transkripčním faktoru PU.1.
4. Podařilo se nám mutovat dvě vazebná místa rozpoznávaná mikroRNA miR-17-92 klastru v pozicích 419 – 425 bp a 612 – 618 bp 3' nepřekládané oblasti transkripčního faktoru Egr2 vložené do pGL3 vektoru za vzniku pGL3-Egr2-3'UTRmut vektoru.
5. S využitím pGL3-Egr2-3'UTRmut vektoru se nám podařilo ověřit v HeLa buňkách inhibiční vliv mikroRNA miR-17-92 klastru na transkripční faktor Egr2.

7 Seznam použité literatury

- Adolfsson, J., O.J. Borge, D. Bryder, K. Theilgaard-Monch, I. Astrand-Grundstrom, E. Sitnicka, Y. Sasaki, and S.E. Jacobsen. 2001. Upregulation of Flt3 expression within the bone marrow Lin(-)Sca1(+)c-kit(+) stem cell compartment is accompanied by loss of self-renewal capacity. *Immunity*. 15:659-69.
- Adolfsson, J., R. Mansson, N. Buza-Vidas, A. Hultquist, K. Liuba, C.T. Jensen, D. Bryder, L. Yang, O.J. Borge, L.A. Thoren, K. Anderson, E. Sitnicka, Y. Sasaki, M. Sigvardsson, and S.E. Jacobsen. 2005. Identification of Flt3+ lympho-myeloid stem cells lacking erythro-megakaryocytic potential a revised road map for adult blood lineage commitment. *Cell*. 121:295-306.
- Akashi, K., D. Traver, T. Miyamoto, and I.L. Weissman. 2000. A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature*. 404:193-7.
- Alberts, B., D. Bray, A. Johnson, J. Lewis, P. Walter, K. Roberts, and M. Raff. 1998. Základy buněčné biologie.
- Bartel, D.P. 2004. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*. 116:281-97.
- Behre, G., A.J. Whitmarsh, M.P. Coghlan, T. Hoang, C.L. Carpenter, D.E. Zhang, R.J. Davis, and D.G. Tenen. 1999. c-Jun is a JNK-independent coactivator of the PU.1 transcription factor. *J Biol Chem*. 274:4939-46.
- Bestor, T.H. 2000. The DNA methyltransferases of mammals. *Hum Mol Genet*. 9:2395-402.
- Bird, A.P., and A.P. Wolffe. 1999. Methylation-induced repression--belts, braces, and chromatin. *Cell*. 99:451-4.
- Bonauer, A., and S. Dimmeler. 2009. The microRNA-17-92 cluster: still a miRacle? *Cell Cycle*. 8:3866-73.
- Bracken, C.P., P.A. Gregory, N. Kolesnikoff, A.G. Bert, J. Wang, M.F. Shannon, and G.J. Goodall. 2008. A double-negative feedback loop between ZEB1-SIP1 and the microRNA-200 family regulates epithelial-mesenchymal transition. *Cancer Res*. 68:7846-54.
- Buratowski, S., S. Hahn, L. Guarente, and P.A. Sharp. 1989. Five intermediate complexes in transcription initiation by RNA polymerase II. *Cell*. 56:549-61.
- Burke, T.W., and J.T. Kadonaga. 1996. Drosophila TFIID binds to a conserved downstream basal promoter element that is present in many TATA-box-deficient promoters. *Genes Dev*. 10:711-24.
- Cramer, P., D.A. Bushnell, J. Fu, A.L. Gnatt, B. Maier-Davis, N.E. Thompson, R.R. Burgess, A.M. Edwards, P.R. David, and R.D. Kornberg. 2000. Architecture of RNA polymerase II and implications for the transcription mechanism. *Science*. 288:640-9.
- Cui, J.W., Y.J. Li, A. Sarkar, J. Brown, Y.H. Tan, M. Premyslova, C. Michaud, N. Iscove, G.J. Wang, and Y. Ben-David. 2007. Retroviral insertional activation of the Fli-3 locus in erythroleukemias encoding a cluster of microRNAs that convert Epo-induced differentiation to proliferation. *Blood*. 110:2631-40.
- Dahl, R., J.C. Walsh, D. Lancki, P. Laslo, S.R. Iyer, H. Singh, and M.C. Simon. 2003. Regulation of macrophage and neutrophil cell fates by the PU.1:C/EBPalpha ratio and granulocyte colony-stimulating factor. *Nat Immunol*. 4:1029-36.
- Dai, X.M., G.R. Ryan, A.J. Hapel, M.G. Dominguez, R.G. Russell, S. Kapp, V. Sylvestre, and E.R. Stanley. 2002. Targeted disruption of the mouse colony-stimulating factor 1 receptor gene results in osteopetrosis, mononuclear phagocyte deficiency, increased primitive progenitor cell frequencies, and reproductive defects. *Blood*. 99:111-20.

- DeKoter, R.P., and H. Singh. 2000. Regulation of B lymphocyte and macrophage development by graded expression of PU.1. *Science*. 288:1439-41.
- Delgado, M.D., and J. Leon. 2006. Gene expression regulation and cancer. *Clin Transl Oncol*. 8:780-7.
- Dews, M., A. Homayouni, D. Yu, D. Murphy, C. Seignani, E. Wentzel, E.E. Furth, W.M. Lee, G.H. Enders, J.T. Mendell, and A. Thomas-Tikhonenko. 2006. Augmentation of tumor angiogenesis by a Myc-activated microRNA cluster. *Nat Genet*. 38:1060-5.
- Dixon-McIver, A., P. East, C.A. Mein, J.B. Cazier, G. Molloy, T. Chaplin, T. Andrew Lister, B.D. Young, and S. Debernardi. 2008. Distinctive patterns of microRNA expression associated with karyotype in acute myeloid leukaemia. *PLoS One*. 3:e2141.
- Esquela-Kerscher, A., and F.J. Slack. 2006. Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer*. 6:259-69.
- Fazi, F., A. Rosa, A. Fatica, V. Gelmetti, M.L. De Marchis, C. Nervi, and I. Bozzoni. 2005. A minicircuitry comprised of microRNA-223 and transcription factors NFI-A and C/EBPalpha regulates human granulopoiesis. *Cell*. 123:819-31.
- Felli, N., L. Fontana, E. Pelosi, R. Botta, D. Bonci, F. Facchiano, F. Liuzzi, V. Lulli, O. Morsilli, S. Santoro, M. Valtieri, G.A. Calin, C.G. Liu, A. Sorrentino, C.M. Croce, and C. Peschle. 2005. MicroRNAs 221 and 222 inhibit normal erythropoiesis and erythroleukemic cell growth via kit receptor down-modulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 102:18081-6.
- Feng, J., A. Iwama, M. Satake, and K. Kohu. 2009. MicroRNA-27 enhances differentiation of myeloblasts into granulocytes by post-transcriptionally downregulating Runx1. *Br J Haematol*. 145:412-23.
- Fontana, L., M.E. Fiori, S. Albin, L. Cifaldi, S. Giovinazzi, M. Forloni, R. Boldrini, A. Donfrancesco, V. Federici, P. Giacomini, C. Peschle, and D. Fruci. 2008. Antagomir-17-5p abolishes the growth of therapy-resistant neuroblastoma through p21 and BIM. *PLoS One*. 3:e2236.
- Fontana, L., E. Pelosi, P. Greco, S. Racanicchi, U. Testa, F. Liuzzi, C.M. Croce, E. Brunetti, F. Grignani, and C. Peschle. 2007. MicroRNAs 17-5p-20a-106a control monocytopoiesis through AML1 targeting and M-CSF receptor upregulation. *Nat Cell Biol*. 9:775-87.
- Gangenahalli, G.U., P. Gupta, D. Saluja, Y.K. Verma, V. Kishore, R. Chandra, R.K. Sharma, and T. Ravindranath. 2005. Stem cell fate specification: role of master regulatory switch transcription factor PU.1 in differential hematopoiesis. *Stem Cells Dev*. 14:140-52.
- Gillian, A.L., and J. Svaren. 2004. The Ddx20/DP103 dead box protein represses transcriptional activation by Egr2/Krox-20. *J Biol Chem*. 279:9056-63.
- Gillies, S.D., S.L. Morrison, V.T. Oi, and S. Tonegawa. 1983. A tissue-specific transcription enhancer element is located in the major intron of a rearranged immunoglobulin heavy chain gene. *Cell*. 33:717-28.
- Grimson, A., K.K. Farh, W.K. Johnston, P. Garrett-Engele, L.P. Lim, and D.P. Bartel. 2007. MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing. *Mol Cell*. 27:91-105.
- Hayashita, Y., H. Osada, Y. Tatematsu, H. Yamada, K. Yanagisawa, S. Tomida, Y. Yatabe, K. Kawahara, Y. Sekido, and T. Takahashi. 2005. A polycistronic microRNA cluster, miR-17-92, is overexpressed in human lung cancers and enhances cell proliferation. *Cancer Res*. 65:9628-32.
- He, L., J.M. Thomson, M.T. Hemann, E. Hernando-Monge, D. Mu, S. Goodson, S. Powers, C. Cordon-Cardo, S.W. Lowe, G.J. Hannon, and S.M. Hammond. 2005. A microRNA polycistron as a potential human oncogene. *Nature*. 435:828-33.

- Hebbes, T.R., A.W. Thorne, and C. Crane-Robinson. 1988. A direct link between core histone acetylation and transcriptionally active chromatin. *EMBO J.* 7:1395-402.
- Hizume, K., S.H. Yoshimura, and K. Takeyasu. 2005. Linker histone H1 per se can induce three-dimensional folding of chromatin fiber. *Biochemistry.* 44:12978-89.
- Hock, H., M.J. Hamblen, H.M. Rooke, D. Traver, R.T. Bronson, S. Cameron, and S.H. Orkin. 2003. Intrinsic requirement for zinc finger transcription factor Gfi-1 in neutrophil differentiation. *Immunity.* 18:109-20.
- Hohaus, S., M.S. Petrovick, M.T. Voso, Z. Sun, D.E. Zhang, and D.G. Tenen. 1995. PU.1 (Spi-1) and C/EBP alpha regulate expression of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor alpha gene. *Mol Cell Biol.* 15:5830-45.
- Hu, M., D. Krause, M. Greaves, S. Sharkis, M. Dexter, C. Heyworth, and T. Enver. 1997. Multilineage gene expression precedes commitment in the hemopoietic system. *Genes Dev.* 11:774-85.
- Hube, F., P. Reverdiau, S. Iochmann, and Y. Gruel. 2005. Improved PCR method for amplification of GC-rich DNA sequences. *Mol Biotechnol.* 31:81-4.
- Hutvagner, G., J. McLachlan, A.E. Pasquinelli, E. Balint, T. Tuschl, and P.D. Zamore. 2001. A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. *Science.* 293:834-8.
- Chalkley, G.E., and C.P. Verrijzer. 1999. DNA binding site selection by RNA polymerase II TAFs: a TAF(II)250-TAF(II)150 complex recognizes the initiator. *EMBO J.* 18:4835-45.
- Chao, D.M., E.L. Gadbois, P.J. Murray, S.F. Anderson, M.S. Sonu, J.D. Parvin, and R.A. Young. 1996. A mammalian SRB protein associated with an RNA polymerase II holoenzyme. *Nature.* 380:82-5.
- Chen, C.Z., L. Li, H.F. Lodish, and D.P. Bartel. 2004. MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. *Science.* 303:83-6.
- Christensen, J.L., and I.L. Weissman. 2001. Flk-2 is a marker in hematopoietic stem cell differentiation: a simple method to isolate long-term stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98:14541-6.
- Ikuta, K., and I.L. Weissman. 1992. Evidence that hematopoietic stem cells express mouse c-kit but do not depend on steel factor for their generation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89:1502-6.
- Jenuwein, T. 2001. Re-SET-ting heterochromatin by histone methyltransferases. *Trends Cell Biol.* 11:266-73.
- Kafri, T., M. Ariel, M. Brandeis, R. Shemer, L. Urven, J. McCarrey, H. Cedar, and A. Razin. 1992. Developmental pattern of gene-specific DNA methylation in the mouse embryo and germ line. *Genes Dev.* 6:705-14.
- Karim, F.D., L.D. Urness, C.S. Thummel, M.J. Klemsz, S.R. McKercher, A. Celada, C. Van Beveren, R.A. Maki, C.V. Gunther, J.A. Nye, and et al. 1990. The ETS-domain: a new DNA-binding motif that recognizes a purine-rich core DNA sequence. *Genes Dev.* 4:1451-3.
- Ketting, R.F., S.E. Fischer, E. Bernstein, T. Sijen, G.J. Hannon, and R.H. Plasterk. 2001. Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. elegans*. *Genes Dev.* 15:2654-9.
- Klemsz, M.J., and R.A. Maki. 1996. Activation of transcription by PU.1 requires both acidic and glutamine domains. *Mol Cell Biol.* 16:390-7.
- Kondo, M., D.C. Scherer, A.G. King, M.G. Manz, and I.L. Weissman. 2001. Lymphocyte development from hematopoietic stem cells. *Curr Opin Genet Dev.* 11:520-6.
- Kondo, M., I.L. Weissman, and K. Akashi. 1997. Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. *Cell.* 91:661-72.

- Korbling, M., and P. Anderlini. 2001. Peripheral blood stem cell versus bone marrow allotransplantation: does the source of hematopoietic stem cells matter? *Blood*. 98:2900-8.
- Kouzarides, T. 2007. Chromatin modifications and their function. *Cell*. 128:693-705.
- Krause, D.S., M.J. Fackler, C.I. Civin, and W.S. May. 1996. CD34: structure, biology, and clinical utility. *Blood*. 87:1-13.
- Krishnaraju, K., H.Q. Nguyen, D.A. Liebermann, and B. Hoffman. 1995. The zinc finger transcription factor Egr-1 potentiates macrophage differentiation of hematopoietic cells. *Mol Cell Biol*. 15:5499-507.
- Krysinska, H., M. Hoogenkamp, R. Ingram, N. Wilson, H. Tagoh, P. Laslo, H. Singh, and C. Bonifer. 2007. A two-step, PU.1-dependent mechanism for developmentally regulated chromatin remodeling and transcription of the c-fms gene. *Mol Cell Biol*. 27:878-87.
- Kumar, K.P., S. Akoulitchev, and D. Reinberg. 1998. Promoter-proximal stalling results from the inability to recruit transcription factor IIIH to the transcription complex and is a regulated event. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95:9767-72.
- Lai, A.Y., and M. Kondo. 2006. Asymmetrical lymphoid and myeloid lineage commitment in multipotent hematopoietic progenitors. *J Exp Med*. 203:1867-73.
- Lai, A.Y., S.M. Lin, and M. Kondo. 2005. Heterogeneity of Flt3-expressing multipotent progenitors in mouse bone marrow. *J Immunol*. 175:5016-23.
- Larsen, F., G. Gundersen, R. Lopez, and H. Prydz. 1992. CpG islands as gene markers in the human genome. *Genomics*. 13:1095-107.
- Laslo, P., C.J. Spooner, A. Warmflash, D.W. Lancki, H.J. Lee, R. Sciammas, B.N. Gantner, A.R. Dinner, and H. Singh. 2006. Multilineage transcriptional priming and determination of alternate hematopoietic cell fates. *Cell*. 126:755-66.
- Lee, D.Y., J.J. Hayes, D. Pruss, and A.P. Wolffe. 1993a. A positive role for histone acetylation in transcription factor access to nucleosomal DNA. *Cell*. 72:73-84.
- Lee, R.C., R.L. Feinbaum, and V. Ambros. 1993b. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*. 75:843-54.
- Lee, Y., K. Jeon, J.T. Lee, S. Kim, and V.N. Kim. 2002. MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *EMBO J*. 21:4663-70.
- Lettice, L.A., S.J. Heaney, L.A. Purdie, L. Li, P. de Beer, B.A. Oostra, D. Goode, G. Elgar, R.E. Hill, and E. de Graaff. 2003. A long-range Shh enhancer regulates expression in the developing limb and fin and is associated with preaxial polydactyly. *Hum Mol Genet*. 12:1725-35.
- Lewis, B.P., C.B. Burge, and D.P. Bartel. 2005. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell*. 120:15-20.
- Lewis, B.P., I.H. Shih, M.W. Jones-Rhoades, D.P. Bartel, and C.B. Burge. 2003. Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell*. 115:787-98.
- Li, Z., J. Lu, M. Sun, S. Mi, H. Zhang, R.T. Luo, P. Chen, Y. Wang, M. Yan, Z. Qian, M.B. Neilly, J. Jin, Y. Zhang, S.K. Bohlander, D.E. Zhang, R.A. Larson, M.M. Le Beau, M.J. Thirman, T.R. Golub, J.D. Rowley, and J. Chen. 2008. Distinct microRNA expression profiles in acute myeloid leukemia with common translocations. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 105:15535-40.
- Lim, L.P., N.C. Lau, P. Garrett-Engele, A. Grimson, J.M. Schelter, J. Castle, D.P. Bartel, P.S. Linsley, and J.M. Johnson. 2005. Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature*. 433:769-73.
- Lu, Y., J.M. Thomson, H.Y. Wong, S.M. Hammond, and B.L. Hogan. 2007. Transgenic over-expression of the microRNA miR-17-92 cluster promotes proliferation and inhibits differentiation of lung epithelial progenitor cells. *Dev Biol*. 310:442-53.

- Luger, K., A.W. Mader, R.K. Richmond, D.F. Sargent, and T.J. Richmond. 1997. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature*. 389:251-60.
- Lund, E., S. Guttinger, A. Calado, J.E. Dahlberg, and U. Kutay. 2004. Nuclear export of microRNA precursors. *Science*. 303:95-8.
- Ma, H., C.T. Baumann, H. Li, B.D. Strahl, R. Rice, M.A. Jelinek, D.W. Aswad, C.D. Allis, G.L. Hager, and M.R. Stallcup. 2001. Hormone-dependent, CARM1-directed, arginine-specific methylation of histone H3 on a steroid-regulated promoter. *Curr Biol*. 11:1981-5.
- Martinez, E. 2002. Multi-protein complexes in eukaryotic gene transcription. *Plant Mol Biol*. 50:925-47.
- Martinez, J., A. Patkaniowska, H. Urlaub, R. Luhrmann, and T. Tuschl. 2002. Single-stranded antisense siRNAs guide target RNA cleavage in RNAi. *Cell*. 110:563-74.
- Martinez, N.J., M.C. Ow, M.I. Barrasa, M. Hammell, R. Sequerra, L. Doucette-Stamm, F.P. Roth, V.R. Ambros, and A.J. Walhout. 2008. A *C. elegans* genome-scale microRNA network contains composite feedback motifs with high flux capacity. *Genes Dev*. 22:2535-49.
- Matsui, T., J. Segall, P.A. Weil, and R.G. Roeder. 1980. Multiple factors required for accurate initiation of transcription by purified RNA polymerase II. *J Biol Chem*. 255:11992-6.
- Maxon, M.E., J.A. Goodrich, and R. Tjian. 1994. Transcription factor IIE binds preferentially to RNA polymerase IIa and recruits TFIID: a model for promoter clearance. *Genes Dev*. 8:515-24.
- McKercher, S.R., B.E. Torbett, K.L. Anderson, G.W. Henkel, D.J. Vestal, H. Baribault, M. Klemsz, A.J. Feeney, G.E. Wu, C.J. Paige, and R.A. Maki. 1996. Targeted disruption of the PU.1 gene results in multiple hematopoietic abnormalities. *EMBO J*. 15:5647-58.
- Miyamoto, T., H. Iwasaki, B. Reizis, M. Ye, T. Graf, I.L. Weissman, and K. Akashi. 2002. Myeloid or lymphoid promiscuity as a critical step in hematopoietic lineage commitment. *Dev Cell*. 3:137-47.
- Molnar, A., F. Schwach, D.J. Studholme, E.C. Thuenemann, and D.C. Baulcombe. 2007. miRNAs control gene expression in the single-cell alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Nature*. 447:1126-9.
- Monticelli, S., K.M. Ansel, C. Xiao, N.D. Socci, A.M. Krichevsky, T.H. Thai, N. Rajewsky, D.S. Marks, C. Sander, K. Rajewsky, A. Rao, and K.S. Kosik. 2005. MicroRNA profiling of the murine hematopoietic system. *Genome Biol*. 6:R71.
- Mu, P., Y.C. Han, D. Betel, E. Yao, M. Squatrito, P. Ogradowski, E. de Stanchina, A. D'Andrea, C. Sander, and A. Ventura. 2009. Genetic dissection of the miR-17~92 cluster of microRNAs in Myc-induced B-cell lymphomas. *Genes Dev*. 23:2806-11.
- Nakajima, N., M. Horikoshi, and R.G. Roeder. 1988. Factors involved in specific transcription by mammalian RNA polymerase II: purification, genetic specificity, and TATA box-promoter interactions of TFIID. *Mol Cell Biol*. 8:4028-40.
- Nguyen, H.Q., B. Hoffman-Liebermann, and D.A. Liebermann. 1993. The zinc finger transcription factor Egr-1 is essential for and restricts differentiation along the macrophage lineage. *Cell*. 72:197-209.
- Nikolov, D.B., H. Chen, E.D. Halay, A.A. Usheva, K. Hisatake, D.K. Lee, R.G. Roeder, and S.K. Burley. 1995. Crystal structure of a TFIIB-TBP-TATA-element ternary complex. *Nature*. 377:119-28.
- Novina, C.D., and A.L. Roy. 1996. Core promoters and transcriptional control. *Trends Genet*. 12:351-5.
- Nutt, S.L., D. Metcalf, A. D'Amico, M. Polli, and L. Wu. 2005. Dynamic regulation of PU.1 expression in multipotent hematopoietic progenitors. *J Exp Med*. 201:221-31.

- O'Connell, R.M., D.S. Rao, A.A. Chaudhuri, M.P. Boldin, K.D. Taganov, J. Nicoll, R.L. Paquette, and D. Baltimore. 2008. Sustained expression of microRNA-155 in hematopoietic stem cells causes a myeloproliferative disorder. *J Exp Med.* 205:585-94.
- O'Donnell, K.A., E.A. Wentzel, K.I. Zeller, C.V. Dang, and J.T. Mendell. 2005. c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression. *Nature.* 435:839-43.
- Okano, M., D.W. Bell, D.A. Haber, and E. Li. 1999. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell.* 99:247-57.
- Okuda, T., J. van Deursen, S.W. Hiebert, G. Grosveld, and J.R. Downing. 1996. AML1, the target of multiple chromosomal translocations in human leukemia, is essential for normal fetal liver hematopoiesis. *Cell.* 84:321-30.
- Olive, V., M.J. Bennett, J.C. Walker, C. Ma, I. Jiang, C. Cordon-Cardo, Q.J. Li, S.W. Lowe, G.J. Hannon, and L. He. 2009. miR-19 is a key oncogenic component of mir-17-92. *Genes Dev.* 23:2839-49.
- Ossipow, V., J.P. Tassan, E.A. Nigg, and U. Schibler. 1995. A mammalian RNA polymerase II holoenzyme containing all components required for promoter-specific transcription initiation. *Cell.* 83:137-46.
- Ota, A., H. Tagawa, S. Karnan, S. Tsuzuki, A. Karpas, S. Kira, Y. Yoshida, and M. Seto. 2004. Identification and characterization of a novel gene, C13orf25, as a target for 13q31-q32 amplification in malignant lymphoma. *Cancer Res.* 64:3087-95.
- Pahl, H.L., R.J. Scheibe, D.E. Zhang, H.M. Chen, D.L. Galson, R.A. Maki, and D.G. Tenen. 1993. The proto-oncogene PU.1 regulates expression of the myeloid-specific CD11b promoter. *J Biol Chem.* 268:5014-20.
- Petrasccheck, M., D. Escher, T. Mahmoudi, C.P. Verrijzer, W. Schaffner, and A. Barberis. 2005. DNA looping induced by a transcriptional enhancer in vivo. *Nucleic Acids Res.* 33:3743-50.
- Petrocca, F., R. Visone, M.R. Onelli, M.H. Shah, M.S. Nicoloso, I. de Martino, D. Iliopoulos, E. Pilozzi, C.G. Liu, M. Negrini, L. Cavazzini, S. Volinia, H. Alder, L.P. Ruco, G. Baldassarre, C.M. Croce, and A. Vecchione. 2008. E2F1-regulated microRNAs impair TGFbeta-dependent cell-cycle arrest and apoptosis in gastric cancer. *Cancer Cell.* 13:272-86.
- Petrovick, M.S., S.W. Hiebert, A.D. Friedman, C.J. Hetherington, D.G. Tenen, and D.E. Zhang. 1998. Multiple functional domains of AML1: PU.1 and C/EBPalpha synergize with different regions of AML1. *Mol Cell Biol.* 18:3915-25.
- Reddy, V.A., A. Iwama, G. Iotzova, M. Schulz, A. Elsassner, R.K. Vangala, D.G. Tenen, W. Hiddemann, and G. Behre. 2002. Granulocyte inducer C/EBPalpha inactivates the myeloid master regulator PU.1: possible role in lineage commitment decisions. *Blood.* 100:483-90.
- Rekhtman, N., F. Radparvar, T. Evans, and A.I. Skoultschi. 1999. Direct interaction of hematopoietic transcription factors PU.1 and GATA-1: functional antagonism in erythroid cells. *Genes Dev.* 13:1398-411.
- Reya, T., S.J. Morrison, M.F. Clarke, and I.L. Weissman. 2001. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature.* 414:105-11.
- Rodriguez, A., S. Griffiths-Jones, J.L. Ashurst, and A. Bradley. 2004. Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome Res.* 14:1902-10.
- Rodriguez, A., E. Vigorito, S. Clare, M.V. Warren, P. Couttet, D.R. Soond, S. van Dongen, R.J. Grocock, P.P. Das, E.A. Miska, D. Vetrie, K. Okkenhaug, A.J. Enright, G. Dougan, M. Turner, and A. Bradley. 2007. Requirement of bic/microRNA-155 for normal immune function. *Science.* 316:608-11.

- Rosa, A., M. Ballarino, A. Sorrentino, O. Sthandier, F.G. De Angelis, M. Marchioni, B. Masella, A. Guarini, A. Fatica, C. Peschle, and I. Bozzoni. 2007. The interplay between the master transcription factor PU.1 and miR-424 regulates human monocyte/macrophage differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 104:19849-54.
- Rosenbauer, F., and D.G. Tenen. 2007. Transcription factors in myeloid development: balancing differentiation with transformation. *Nat Rev Immunol*. 7:105-17.
- Rosypal, S. 2000. Úvod do molekulární biologie.
- Santos-Rosa, H., R. Schneider, A.J. Bannister, J. Sherriff, B.E. Bernstein, N.C. Emre, S.L. Schreiber, J. Mellor, and T. Kouzarides. 2002. Active genes are tri-methylated at K4 of histone H3. *Nature*. 419:407-11.
- Scott, E.W., M.C. Simon, J. Anastasi, and H. Singh. 1994. Requirement of transcription factor PU.1 in the development of multiple hematopoietic lineages. *Science*. 265:1573-7.
- Secombe, J., and R.N. Eisenman. 2007. The function and regulation of the JARID1 family of histone H3 lysine 4 demethylases: the Myc connection. *Cell Cycle*. 6:1324-8.
- Shalgi, R., D. Lieber, M. Oren, and Y. Pilpel. 2007. Global and local architecture of the mammalian microRNA-transcription factor regulatory network. *PLoS Comput Biol*. 3:e131.
- Shi, Y., F. Lan, C. Matson, P. Mulligan, J.R. Whetstine, P.A. Cole, and R.A. Casero. 2004. Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. *Cell*. 119:941-53.
- Schwarz, D.S., G. Hutvagner, T. Du, Z. Xu, N. Aronin, and P.D. Zamore. 2003. Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell*. 115:199-208.
- Smale, S.T., and D. Baltimore. 1989. The "initiator" as a transcription control element. *Cell*. 57:103-13.
- Smith, L.T., S. Hohaus, D.A. Gonzalez, S.E. Dziennis, and D.G. Tenen. 1996. PU.1 (Spi-1) and C/EBP alpha regulate the granulocyte colony-stimulating factor receptor promoter in myeloid cells. *Blood*. 88:1234-47.
- Spangrude, G.J., S. Heimfeld, and I.L. Weissman. 1988. Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. *Science*. 241:58-62.
- Stopka, T., D.F. Amanatullah, M. Papetti, and A.I. Skoultchi. 2005. PU.1 inhibits the erythroid program by binding to GATA-1 on DNA and creating a repressive chromatin structure. *EMBO J*. 24:3712-23.
- Suzuki, Y., T. Tsunoda, J. Sese, H. Taira, J. Mizushima-Sugano, H. Hata, T. Ota, T. Isogai, T. Tanaka, Y. Nakamura, A. Suyama, Y. Sakaki, S. Morishita, K. Okubo, and S. Sugano. 2001. Identification and characterization of the potential promoter regions of 1031 kinds of human genes. *Genome Res*. 11:677-84.
- Svaren, J., B.R. Sevetson, E.D. Apel, D.B. Zimonjic, N.C. Popescu, and J. Milbrandt. 1996. NAB2, a corepressor of NGFI-A (Egr-1) and Krox20, is induced by proliferative and differentiative stimuli. *Mol Cell Biol*. 16:3545-53.
- Sylvestre, Y., V. De Guire, E. Querido, U.K. Mukhopadhyay, V. Bourdeau, F. Major, G. Ferbeyre, and P. Chartrand. 2007. An E2F/miR-20a autoregulatory feedback loop. *J Biol Chem*. 282:2135-43.
- Tagawa, H., S. Karnan, R. Suzuki, K. Matsuo, X. Zhang, A. Ota, Y. Morishima, S. Nakamura, and M. Seto. 2005. Genome-wide array-based CGH for mantle cell lymphoma: identification of homozygous deletions of the proapoptotic gene BIM. *Oncogene*. 24:1348-58.
- Tagawa, H., K. Karube, S. Tsuzuki, K. Ohshima, and M. Seto. 2007. Synergistic action of the microRNA-17 polycistron and Myc in aggressive cancer development. *Cancer Sci*. 98:1482-90.

- Tagawa, H., S. Tsuzuki, R. Suzuki, S. Karnan, A. Ota, Y. Kameoka, M. Suguro, K. Matsuo, M. Yamaguchi, M. Okamoto, Y. Morishima, S. Nakamura, and M. Seto. 2004. Genome-wide array-based comparative genomic hybridization of diffuse large B-cell lymphoma: comparison between CD5-positive and CD5-negative cases. *Cancer Res.* 64:5948-55.
- Tamura, T., T. Nagamura-Inoue, Z. Shmeltzer, T. Kuwata, and K. Ozato. 2000. ICSBP directs bipotential myeloid progenitor cells to differentiate into mature macrophages. *Immunity.* 13:155-65.
- Tan, S., Y. Hunziker, D.F. Sargent, and T.J. Richmond. 1996. Crystal structure of a yeast TFIIA/TBP/DNA complex. *Nature.* 381:127-51.
- Tanzer, A., and P.F. Stadler. 2004. Molecular evolution of a microRNA cluster. *J Mol Biol.* 339:327-35.
- Terstappen, L.W., S. Huang, M. Safford, P.M. Lansdorp, and M.R. Loken. 1991. Sequential generations of hematopoietic colonies derived from single nonlineage-committed CD34+CD38- progenitor cells. *Blood.* 77:1218-27.
- Uchida, N., and I.L. Weissman. 1992. Searching for hematopoietic stem cells: evidence that Thy-1.1lo Lin- Sca-1+ cells are the only stem cells in C57BL/Ka-Thy-1.1 bone marrow. *J Exp Med.* 175:175-84.
- van Haften, G., and R. Agami. 2010. Tumorigenicity of the miR-17-92 cluster distilled. *Genes Dev.* 24:1-4.
- Ventura, A., A.G. Young, M.M. Winslow, L. Lintault, A. Meissner, S.J. Erkeland, J. Newman, R.T. Bronson, D. Crowley, J.R. Stone, R. Jaenisch, P.A. Sharp, and T. Jacks. 2008. Targeted deletion reveals essential and overlapping functions of the miR-17 through 92 family of miRNA clusters. *Cell.* 132:875-86.
- Venturini, L., K. Battmer, M. Castoldi, B. Schultheis, A. Hochhaus, M.U. Muckenthaler, A. Ganser, M. Eder, and M. Scherr. 2007. Expression of the miR-17-92 polycistron in chronic myeloid leukemia (CML) CD34+ cells. *Blood.* 109:4399-405.
- Vigorito, E., K.L. Perks, C. Abreu-Goodger, S. Bunting, Z. Xiang, S. Kohlhaas, P.P. Das, E.A. Miska, A. Rodriguez, A. Bradley, K.G. Smith, C. Rada, A.J. Enright, K.M. Toellner, I.C. MacLennan, and M. Turner. 2007. microRNA-155 regulates the generation of immunoglobulin class-switched plasma cells. *Immunity.* 27:847-59.
- Volinia, S., G.A. Calin, C.G. Liu, S. Ambs, A. Cimmino, F. Petrocca, R. Visone, M. Iorio, C. Roldo, M. Ferracin, R.L. Prueitt, N. Yanaihara, G. Lanza, A. Scarpa, A. Vecchione, M. Negrini, C.C. Harris, and C.M. Croce. 2006. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103:2257-61.
- Vopalensky, V., T. Masek, O. Horvath, B. Vicenova, M. Mokrejs, and M. Pospisek. 2008. Firefly luciferase gene contains a cryptic promoter. *RNA.* 14:1720-9.
- Wang, C.L., B.B. Wang, G. Bartha, L. Li, N. Channa, M. Klinger, N. Killeen, and M. Wabl. 2006. Activation of an oncogenic microRNA cistron by provirus integration. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103:18680-4.
- Wang, H., Z.Q. Huang, L. Xia, Q. Feng, H. Erdjument-Bromage, B.D. Strahl, S.D. Briggs, C.D. Allis, J. Wong, P. Tempst, and Y. Zhang. 2001. Methylation of histone H4 at arginine 3 facilitating transcriptional activation by nuclear hormone receptor. *Science.* 293:853-7.
- Wolffe, A.P. 2001. Transcriptional regulation in the context of chromatin structure. *Essays Biochem.* 37:45-57.
- Woods, K., J.M. Thomson, and S.M. Hammond. 2007. Direct regulation of an oncogenic micro-RNA cluster by E2F transcription factors. *J Biol Chem.* 282:2130-4.

- Xiao, C., L. Srinivasan, D.P. Calado, H.C. Patterson, B. Zhang, J. Wang, J.M. Henderson, J.L. Kutok, and K. Rajewsky. 2008. Lymphoproliferative disease and autoimmunity in mice with increased miR-17-92 expression in lymphocytes. *Nat Immunol.* 9:405-14.
- Yamanaka, R., C. Barlow, J. Lekstrom-Himes, L.H. Castilla, P.P. Liu, M. Eckhaus, T. Decker, A. Wynshaw-Boris, and K.G. Xanthopoulos. 1997. Impaired granulopoiesis, myelodysplasia, and early lethality in CCAAT/enhancer binding protein epsilon-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94:13187-92.
- Yan, H.L., G. Xue, Q. Mei, Y.Z. Wang, F.X. Ding, M.F. Liu, M.H. Lu, Y. Tang, H.Y. Yu, and S.H. Sun. 2009. Repression of the miR-17-92 cluster by p53 has an important function in hypoxia-induced apoptosis. *EMBO J.* 28:2719-32.
- Zhang, D.E., C.J. Hetherington, H.M. Chen, and D.G. Tenen. 1994. The macrophage transcription factor PU.1 directs tissue-specific expression of the macrophage colony-stimulating factor receptor. *Mol Cell Biol.* 14:373-81.
- Zhang, D.E., C.J. Hetherington, S. Meyers, K.L. Rhoades, C.J. Larson, H.M. Chen, S.W. Hiebert, and D.G. Tenen. 1996. CCAAT enhancer-binding protein (C/EBP) and AML1 (CBF alpha2) synergistically activate the macrophage colony-stimulating factor receptor promoter. *Mol Cell Biol.* 16:1231-40.
- Zhang, D.E., P. Zhang, N.D. Wang, C.J. Hetherington, G.J. Darlington, and D.G. Tenen. 1997. Absence of granulocyte colony-stimulating factor signaling and neutrophil development in CCAAT enhancer binding protein alpha-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94:569-74.
- Zhang, P., G. Behre, J. Pan, A. Iwama, N. Wara-Aswapati, H.S. Radomska, P.E. Auron, D.G. Tenen, and Z. Sun. 1999. Negative cross-talk between hematopoietic regulators: GATA proteins repress PU.1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96:8705-10.
- Zhang, P., J. Iwasaki-Arai, H. Iwasaki, M.L. Fenyus, T. Dayaram, B.M. Owens, H. Shigematsu, E. Levantini, C.S. Huettner, J.A. Lekstrom-Himes, K. Akashi, and D.G. Tenen. 2004. Enhancement of hematopoietic stem cell repopulating capacity and self-renewal in the absence of the transcription factor C/EBP alpha. *Immunity.* 21:853-63.