

Univerzita Karlova v Praze  
1. lékařská fakulta  
Ústav patologické fyziologie



**Autoreferát disertační práce**

**Role onkogenních mikroRNA  
miR-17-92 a miR-155 v krvetvorbě  
a leukémii.**

**Role of the oncogenic microRNAs  
miR-17-92 and miR-155 in the regulation  
of hematopoietic differentiation and  
leukemogenesis.**

Mgr. Vít Pospíšil

Školitel: Doc. MUDr. Tomáš Stopka Phd.

Praha 2011

**Doktorské studijní programy v biomedicině**  
Univerzita Karlova v Praze a Akademie věd České republiky

Obor: **Fyziologie a patofyziologie člověka**

Předseda oborové rady: **Prof. MUDr. Jaroslav Pokorný, DrSc.**

Školící pracoviště: **Ústav patologické fyziologie**

U Nemocnice 5 , 128 53 Praha 2

Školitel: **Doc. MUDr. Tomáš Stopka Phd.**

Autor: **Mgr. Vít Pospíšil**

Disertační práce bude nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněna k nahlížení veřejnosti v tištěné podobě na Oddělení pro vědeckou činnost a zahraniční styky Děkanátu 1. lékařské fakulty.

## Obsah:

Abstrakt-----	2
Abstract (English version)-----	4
1. Úvod-----	5
2. Cíle práce-----	9
3. Materiál a metody-----	10
4. Výsledky-----	13
5. Diskuse-----	17
6. Závěr-----	19
7. Seznam použité literatury-----	21
8. Seznam publikací-----	21
Poděkování-----	23

## Abstrakt:

Krvetvorba je vysoce uspořádaný hierarchický proces, ve kterém je diferenciace specializovaných krevních buněk závislá na koordinované regulaci genové exprese dvěma klíčovými regulátory: transkripčními faktory a mikroRNA.

PU.1 je základní transkripční faktor nezbytný pro vývoj a diferenciaci kmenových a progenitorových buněk do myeloidní a lymfoidní krevní řady.

MikroRNA jsou nekódující ~22 nukleotidů dlouhé RNA, jež regulují posttranskripčně genovou expresi vazbou do nepřekládané oblasti mRNA a tím způsobují umlčení translace.

Předložená disertační práce popisuje nové mechanismy vzájemné regulace a funkce onkogenních mikroRNA, miR-17-92 klastru a miR-155 a transkripčních faktorů PU.1 a Egr2, účastnících se makrofágové diferenciace myeloidních progenitorů.

MiR-17-92 (Onkomir1) kóduje sedm příbuzných mikroRNA, které regulují buněčnou proliferaci, apoptózu a vývoj, které jsou nadprodukovány v nádorových buňkách myeloidních leukemií a dalších malignit. Tato práce popisuje nový mechanismus regulace miR-17-92 klastru v myeloidních progenitorech. V průběhu makrofágové diferenciace transkripční faktor PU.1 indukuje expresi sekundárního transkripčního faktoru Egr2. Ten se váže do CpG ostrůvku v promotorové oblasti miR-17-92 klastru a současně přináší protein Jarid1b, histon demetylázu, jež demetyluje trimetylouvou skupinu na histonu 3 lysinu 4 (H3K4) a tato změna chromatinové struktury má za následek represi transkripce miR-17-92 klastru.

Nadprodukce miR-17-92 klastru v myeloidních progenitorech prokázala, že vypnutí exprese miR-17-92 klastru je nezbytným předpokladem makrofágové diferenciace.

Tato disertační práce dále prokazuje, že naopak transkripční faktor Egr2 je cílem miR-17-92 klastru, který ho posttranskripčně inhibuje. Tyto výsledky ukazují, že Egr2 a miR-17-92 jsou součástí negativního zpětnovazebného mechanismu, kde Egr2 reprimuje miR-17-92 v diferencujících se buňkách a naopak miR-17-92 inhibuje Egr2 v proliferujících progenitorech.

V této disertační práci je dále ukázáno, že PU.1 indukuje expresi miR-155 v časných fázích makrofágové diferenciace progenitorů mechanismem zahrnujícím histonovou acetylaci.

Identifikované mechanismy regulace miR-17-92 klastru a miR-155 jsou narušeny v průběhu leukemogeneze pacientů s akutní myeloidní leukémií (AML), jejichž leukemické blasty mají významně zvýšenou hladinu miR-17-92 klastru a miR-155 a zároveň sníženou hladinu transkripčních faktorů EGR2 a PU.1.

Tato disertační práce popisuje nové mechanismy regulace onkogenních mikroRNA miR-17-92 a miR-155. Tyto mechanismy jsou nezbytné pro diferenciaci makrofágů a jsou narušeny v průběhu leukemogeneze AML a potenciálně dalších malignit.

## **Abstract (English version):**

Hematopoietic differentiation is highly ordered multistep process, where generation of terminal blood cells is dependent upon coordinated regulation of gene expression by key regulators: transcription factors and mikroRNAs.

PU.1 (Sfpi1) is a versatile hematopoietic transcription factor required for the proper generation of both myeloid and lymphoid lineages.

MikroRNAs represent a novel class of ~22 nucleotide long non-coding posttranscriptional regulators that inhibit expression of genes by blocking protein translation or by mRNA degradation.

In this PhD thesis I present research data documenting novel mechanisms of regulation and function of two oncogenic mikroRNAs, miR-17-92 cluster and miR-155 and myeloid transcriptional factors PU.1 upon macrophage differentiation of myeloid progenitors.

The miR-17-92 cluster (Oncomir1) encodes seven related mikroRNAs that regulate cell proliferation, apoptosis and development and is overexpressed in number of malignancies including myeloid leukemia. Presented PhD thesis documents novel macrophage specific regulatory mechanisms involving the oncogenic cluster miR-17-92. Using transgenic PU.1-/myeloid progenitors we show that upon macrophage differentiation, the transcription factor PU.1 induces the secondary determinant, the transcription factor Egr2 which, in turn, directly represses miR-17-92 expression by causing substantial chromatin changes in miR-17-92 gene. These chromatin changes include the recruitment of the histone demethylase Jarid1b leading to histone H3 lysine K4 demethylation within the CpG island at the miR-17-92 promoter, leading to repression of miR-17-92 cluster expression. The downregulation step appears very important as the ectopic expression of miR-17-92 prevents macrophage differentiation.

Conversely this PhD thesis shows that Egr2 itself is targeted and inhibited by miR-17-92, indicating existence of a double negative feedback regulation between miR-17-92 and Egr2, where Egr2 negatively regulates miR-17-92 cluster in differentiating cells and, in turn, miR-17-92 cluster negatively regulates Egr2 in highly proliferating progenitor cells.

In addition to miR-17-92, we identified that PU.1 upregulate another oncogenic mikroRNA - miR-155 that is temporary induced in early stages of macrophage differentiation by mechanism involving histone acetylation.

The identified regulatory mechanisms of miR-17-92 cluster and miR-155 were found deregulated in acute myeloid leukemia (AML) patients that express elevated levels

of miR-17-92 or miR-155 and simultaneously exhibited significantly downregulated levels of PU.1 and EGR2, compare to healthy controls.

This PhD thesis states collectively a novel view on miR-17-92 role in leukemia and differentiation exemplified by the PU.1-mediated repression of the miR-17-92 cluster by an Egr2/Jarid1b mediated H3K4 demethylation upon macrophage differentiation, mechanism whose deregulation may contribute to pathogenesis of acute myeloid leukemia and possibly other malignancies.

## 1. Úvod:

Krvetvorná diferenciace je přesně regulovaný hierarchický proces, kde z pluripotentní hematopoetické kmenové buňky vznikají přes řadu mezistupňů terminálně diferenciované krevní elementy erytroidní (červené krvinky), lymfoidní (T a B lymfocyty), myeloidní (monocytární makrofágy, neutrofilové, eozinofily a bazofily) nebo megakaryocytální řady (krevní destičky). Kostní dřeň byla první a po dlouhou dobu jedinou tkání, kde byly popsány kmenové buňky umožňující sebeobnovu dané tkáně.

Monocytární makrofágy představují důležitou populaci přisedlých fagocytujících bílých krvinek účastnících se nespecifické imunity. Makrofágy jednak fagocytují patogeny, cizorodé substance či apoptotické buňky a buněčné zbytky. Další důležitá funkce makrofágů je, že spolu s příbuznými dendritickými buňkami představují hlavní antigen prezentující buňky, jež zprostředkují prezentaci cizorodých antigenů T pomocným lymfocytům a tím zprostředkují vývoj specifické imunitní odpovědi.

PU.1 (Sfpi1) je esenciální transkripční faktor nezbytný pro vývoj a liniové určení myeloidní a lymfoidní řady. Transkripční faktory jsou proteiny, jež se sekvenčně specificky váží do regulačních oblastí genů a tím umožňují nasednutí polymerázy II a dalších akcesorních faktorů zprostředkujících iniciaci genové transkripce. Transgení myš s delecí PU.1 postrádá monocytární, granulocytární a B lymfoidní řadu a umírá krátce po narození (1-3). Delece regulační oblasti v oblasti 14kb před transkripčním začátkem PU.1 snižuje hladinu PU.1 na 20% a vede k vývoji akutní myeloidní leukémie (AML) (4).

AML je nejčastější akutní leukémie postihující dospělé. AML je klonální onemocnění hematopoetických progenitorů, charakteristické blokem myeloidní diferenciace. Výsledkem je hromadění nezralých myeloidních buněk, jež mají zachovanou schopnost dělení, ale ztratily schopnost diferenciace (5).

Genová exprese představuje komplexní proces transformace genetické informace zakódované ve struktuře DNA do genových produktů - proteinů. První základy genetiky položil na základě křížení luštěnin již na konci 19. století brněnský kněz Johan Gregor Mendel. Od objevu struktury DNA Jamesem Watsonem a Francisem Crickem roku 1953 stovky vědeckých pracovišť popisují funkci a regulaci genů zakódovaných ve struktuře DNA. Prvním krokem bylo osekvenování modelových organizmů. V roce 2001 byl dokončen projekt HUGO a celý lidský genom, čítající 3,2 gigabází byl osekvenován. Od té doby se směřování výzkumu zaměřilo na identifikaci genů a identifikaci jejich funkce a regulace. Prvním a limitujícím procesem genové exprese je transkripce DNA do mediátorové RNA. Hlavním regulačním mechanismem genové exprese je regulace transkripčními faktory na úrovni iniciace transkripce. V nedávné době byly však objeveny zcela nové regulátory genové exprese - krátké nekódující ribonukleové kyseliny nazývané mikroRNA, které regulují genovou expresi na posttranskripční úrovni.

MikroRNA představují 19-22 nukleotidů dlouhé nekódující jednořetězcové RNA, jež negativně regulují expresi genů vazbou do 3' nepřekládaných oblastí mRNA (3' UTR, Untranslated Regions), což způsobí následnou inhibici translace, nebo degradaci mRNA a tím umlčení exprese daného genu (6, 7).

MikroRNA se účastní regulace základních biologických procesů (na úrovni buňky) jako je metabolismus, proliferace, apoptóza, nebo na úrovni celého organismu jako je růst, diferenciace a vývoj. Na důležitost regulace genové exprese mikroRNA ukazuje fakt že mikroRNA jsou disregulovány v řadě nádorů a onemocnění (8, 9). Roli mikroRNA při iniciaci nádorů podporuje fakt, že řada mikroRNA je kódována v genových lokusech často amplifikovaných v nádorech (10), nebo podléhajícím mutacím, zlomům a delecím (Zhang et al., 2006). MikroRNA jsou také často cílem integrace onkogenních retrovirů, vedoucí k deregulaci jejich exprese (11).

První mikroRNA byla popsána v háďátku *Caenorhabditis elegans* již v roce 1993, nicméně přesná biologická funkce v té době nebyla známa a mikroRNA vzhledem k své malé velikosti byly obtížně identifikovatelné technikami molekulární biologie a dlouho unikaly pozornosti. Na přelomu tisíciletí byl popsán mechanismus „siRNA silencing“ (small interfering RNA, umlčení genové exprese exogenně vnesenými krátkými interferujícími RNA), využívající stejný metabolický aparát jako endogenní mikroRNA. siRNA jsou v dnešní době rutinně využívány v experimentální biologii k umlčení exprese genů za jejich objev byla v roce 2006 udělena Nobelova cena v medicíně (Andrew Fire a Craig Mello).

Analýza genomu mnohobuněčných organismů prokázala, že mikroRNA mohou být kódovány jednak jako nezávislé transkripční jednotky, se strukturou obdobnou protein-kódujícím genům. Asi 30% mikroRNA je kódováno v intronech protein-kódujících genů (12). MikroRNA mohou být organizované v genomu do klastrů, jež se přepisují do polycistronní mRNA. MikroRNA sdružené v jednom klastru mají pravděpodobně společnou regulaci exprese (Bartel, 2004). V lidském genomu bylo doposud nalezeno 36 klastrů, kódujících dohromady 90 mikroRNA.

MikroRNA byly identifikovány ve všech dosud studovaných mnohobuněčných organismech a jsou vysoce konzervované v průběhu evoluce mezi různými skupinami organismů. U člověka je v současné době popsáno dle databáze Mirbase ([www.mirbase.org](http://www.mirbase.org)) 14420 mikroRNA a odhaduje se že savčí genom kóduje až 2000 mikroRNA.

Systém regulace genové exprese pomocí mikroRNA je vysoce robustní a zároveň značně redundantní: jediná mikroRNA může inhibovat mRNA až stovky genů, zatímco mRNA jediného genu může být současně reprimován desítkami mikroRNA. Jeden druh mikroRNA může negativně regulovat zároveň více komponent jedné regulační dráhy. Experimenty využívající globální analýzu genomové exprese v různých tkáních ukázali, že vedle univerzálně exprimovaných mikroRNA je exprese řady mikroRNA tkáňově specifická (13).

**miR-17-92 klastr**, známým též jako Oncomir1 je prototypický příklad polycistronního mikroRNA genu. miR-17-92 klastr kóduje šest mikroRNA: miR-17-5p, miR-18a, miR-19a, miR-20a, miR-19b, a miR-92a, lokalizovaných na lidském chromosomu 13 (Obr.1).

Zvýšené hladiny miR-17-92 klastru byly potvrzeny u řady malignit včetně AML a akutní lymfoblastické leukémie (14, 15), chronické myeloidní leukémie (16), různých typů B-buněčných lymfomů (17-19) a dalších nádorů z prsu, ledvin, slinivky a prostaty (8, 9, 20). Lokus *13q31.3* kódující miR-17-92 klastr je také častým inzerčním místem retroviru indukovaných myších leukémií (21), (22).

Série duplikací, mutací a delecí (23) dala vzniknout v evoluci u savců dvou paralogům miR-17-92 klastru, kódujícím příbuzné mikroRNA: klastrům miR-106b-25 a miR-106a-363. MiR-106a-363 klastr se nachází na X chromosomu a kóduje 6 mikroRNA (miR-106a, miR-18b, miR-20b, miR-19b-2, miR-19a-2 a miR-363). MiR-106b-25 klastru se nachází na 5. chromosomu v 13. intronu genu *MCM7* a kóduje 3 mikroRNA (miR-106b, miR-93, miR-25). Samostatně se nalézá na chromozomu 3 jedna kopie miR-92b. O významu miR-17-92 a jeho paralogů svědčí fakt, že jejich genové uspořádání a sekvence jsou vysoce konzervovány ve všech obratlovcích a podobné uspořádání můžeme najít i u řady bezobratlých (24).



Dohromady miR-17-92 a jeho paralogy kódují 16 příbuzných mikroRNA, jež je možné rozdělit podle identické vazebné sekvence do čtyř rodin. MikroRNA s identickou vazebnou sekvencí patřící do jedné rodiny inhibují často stejné mRNA. Některé geny, mimo jiné pro transkripční faktor EGR2 mají v 3'UTR nepřekládané oblasti cílová místa pro mikroRNA více rodin miR-17-92 klastru a jeho paralogů (TargetScan). Dá se předpokládat, že biologický význam takového uspořádání je výrazná amplifikace efektu miR-17-92 na expresi jeho cílových genů.

Hlavní biologickou funkcí miR-17-92 je stimulace proliferace a přežití buněk. To je zajištěno na úrovni inhibice genů klíčových regulátorů buněčného cyklu a tumor supresorových proteinů. Mezi cíle miR-17-92 patří například inhibitor cyklin-dependentní kinázy p21(CDKN1A) (25, 26), blokující přechod buněčného cyklu z G1 do S fáze a dále E2F1-3 transkripční faktory účastnící se progresu buněčného cyklu (27, 28), významný proapoptotický faktor BIM (Bcl2 interacting mediator of cell death) (29, 30) a dále nádorové supresory PTEN (31) a retinoblastoma like protein RBL2 (32).

**miR-155** se účastní imunoglobulinového přesmyku v B buňkách (33, 34) a je často deregulována v B buněčném lymfomu (53) a chronické lymfatické leukémii (52). Dále bylo prokázáno, že se miR-155 účastní zánětlivé odpovědi makrofágů (35) a zvýšená hladina miR-155 v myším modelu vedla k lymfoproliferaci (36). Mezi prokázané cíle miR-155 patří i transkripční faktor PU.1 (34).

## 2. Cíle práce:

1. Studium aspektů makrofágové diferenciaci myeloidních progenitorů v závislosti na kondiční aktivaci transkripčním faktorem PU.1.
2. Identifikace mikroRNA účastnících se makrofágové diferenciaci.
3. Studium molekulárních mechanismů regulace vybraných mikroRNA na úrovni transkripční regulace a chromatinových modifikací.
4. Studium možné vzájemné regulace transkripčních faktorů a mikroRNA a studium jejich funkce během myeloidní diferenciaci.
5. Ověření účasti či deregulace vybraných mikroRNA v procesu leukemogeneze.

## Hypotéza:

Transkripční faktory regulují hladiny mikroRNA a současně mikroRNA regulují hladiny transkripčních faktorů a dohromady tyto regulační mechanismy vytvářejí komplexní regulační genové sítě nezbytné pro dosažení myeloidní diferenciaci. Narušení těchto mechanismů vede k bloku diferenciaci a může iniciovat vznik nádorů nebo leukémie.

### **3. Materiál a metody:**

#### ***Buněčné kultury:***

PUER (Walsh et al., 2002), shEgr2 a shNab2 PUER buňky (Laslo et al., 2006) byly kultivovány v IMDM mediu (Gibco) obsahujícím 10% sérum, 50 IU/ml penicilin, 50 $\mu$ g/ml streptomycin a 5ng/ml IL3 (Chemikon). Diferenciace PUER buněk byla indukována 2.5 $\mu$ M Tamoxifenem (Sigma) po dobu 96h, pokud není uvedeno jinak. Při inhibici histon deacetyláz (HDAC) byly buňky kultivovány v přítomnosti HDAC inhibitoru Trichostatinu TSA (30nM). Primární vzorky pacientů (27) a kontrolní vorky zdravých dárců (6) byly obdrženy po získání informovaného souhlasu. Periferní mononukleární buňky byly izolovány pomocí polysacharidového hustotního gradientu (Ficoll-Paque, Sigma).

Pro morfologickou analýzu byly buňky kultivovány na krycích sklech, fixovány ledovým metanolem, obarveny pomocí Wright-Giemsa metody a pozorovány v 400x zvětšení ve světelném mikroskopu.

#### ***DNA konstrukty***

1.1 kb dlouhý BamHI/XhoI fragment amplifikovaný z genomické DNA byl použit na vytvoření expresního plasmidu obsahujícího miR-17-92: pCDNA3(17-92).

Sedm promotorových fragmentů amplifikovaných z genomické DNA pomocí GC-RICH PCR systému (Roche) bylo vloženo do BglIII and HindIII míst v pGL3 basic vektoru (Promega) za vzniku následujících konstruktů: pGL3(-3.3;-0)17-92, pGL3(-2.8;-0)17-92, pGL3(-2.0;-0)17-92, pGL3(-1.2;-0)17-92, pGL3(-0.6;-0)17-92, pGL3(-3.3;-1.9)17-92, pGL3(-3.3;-2.7)17-92.

872nt dlouhý XbaI fragment Egr2 3'UTR, obsahující dvě miR-17-92 vazebné sekvence byl vnesen do pGL3 promo vektoru (Promega) za vzniku pGL3-Egr2-3'UTRwt vektoru. Tento vektor byl mutován pomocí inverzní PCR za použití primerů, obsahujících mutované miR-17-92 sekvence. Vektory pCB6-Egr2, pXM-PU.1 byly popsány (51).

Sekvence primerů a další detaily jsou uvedeny v disertační práci v sekci Materials and methods.

#### ***Transfekce a reporterové eseje:***

PUER a primární patientské buňky byly transfekovány pomocí nukleofekce AMAXA (LONZA) za použití Mouse stem cell kitu. Byly použity 2 $\mu$ g pCDNA3(17-92) nebo 4 $\mu$ g pCB6-Egr2 a 1 $\mu$ g pGFP vektoru. V siRNA experimentech byl do buněk transferován mix čtyř siRNA inhibujících Egr2, Jarid1a and Jarid1b (Smart Pool siRNA, Dharmacon) v 800nM koncentraci.

V reportérových experimentech využívajících exprese genu luciferázy byly PUER buňky transfekovány 1 µg pGL3(17-92) promotorových nebo pGL3-Egr2-3'UTR reporterových vektorů spolu s 0.3 µg pRL-TK (Promega) kontrolního vektoru, alternativně dohromady s 300 nM mikroRNA inhibitorů (Dharmacon). Lyzáty buněk byly analyzovány pomocí Dual Luciferase Assay (Promega) luminometrem Sírius (Berthold). Světlušková aktivita luciferázy pGL3 konstruktů byla normalizována na aktivitu kotransfekované luciferázy z Renilla reniformis (pRL).

#### ***RNA izolace a kvantitativní PCR:***

Celková RNA byla izolována pomocí TRIzol (Invitrogen) s použitím zesílené precipitace v přítomnosti 20ng/ml lineárního polyakrylamidu při teplotě -20°C přes noc. Exprese maturovaných mikroRNAs byla stanovena pomocí TaqMan qRT-PCR (Applied Biosystems), data byla zpracována pomocí  $2^{-dCt}$  metody. Úroveň mikroRNA exprese byla normalizována na expresi Sno202 (myší) nebo RNU44 (lidské vzorky).

#### ***Expresní čipy a analýzy dat:***

Celogenomová analýza mRNA exprese v PUER buňkách stimulovaných 2.5 µM Tamoxifenem po dobu 0, 2, 4, 8, 12, 16, 20, 24, 48 a 96 hodin byla stanovena v 100 ng celkové RNA mikročipem: 3'-IVT Express kit and GeneChip MG-430A 2.0 (Affymetrix). Data byly analyzovány za použití Robust Multichip Average algorithm (RMA) v programu GeneSpring GX software (Agilent) za použití Significance Analysis of Microarrays (SAM) při nastavení FDR na 1%.

MikroRNAs byly izolovány pomocí mirVana miRNA Isolation Kit (Ambion) a analyzovány na čipu TaqMan MikroRNA Array (Rodent A and B v2.0, Applied Biosystems) pomocí 7900HT systému. Data byly analyzovány SDS 2.1 softwaru (Applied Biosystems) pomocí RQ analýzy a komparativní Ct metody. Tamoxifen stimulované vzorky byly porovnány k Tamoxifen nestimulovaným, Sno202 byla použita pro normalizaci.

#### ***Chromatinová Imunoprecipitace:***

Pro chromatinovou Imunoprecipitaci (ChIP) bylo použito  $2 \times 10^7$  buněk. Byly použity následující protilátky: PU.1 (sc-352, Santa Cruz Biotech), Egr-2 (Covance, PRB-236P), Jarid1a (ab26049), Jarid1b (ab50958), H3K9Ac (Upstate, 07-353), H3K4me3 (ab8580) a H3 (ab1791) (Abcam). Hodnota nebohacení je zobrazena jako poměr Tamoxifen stimulovaných a Tamoxifen

nestimulovaných buněk. Hodnoty H3K9Ac a H3K4me3 byly ekvalizovány na hodnotu histonu H3. Metoda včetně použitých primerů je podrobně popsána v disertační práci a (51).

#### ***Western blot analysis:***

Buňky byly lyzovány RIPA pufrem za přítomnosti proteázových inhibitorů. Lyzáty byly následně sonikovány Branson Sonic Dismembrator (model 500) (25% amplituda, 3 cykly 1/5 sekund). 60µg celobuněčného proteinového extraktu bylo separováno na 7-10% SDS-polyacrylamidovém gelu a následně přeneseno na nitrocellulózovou membránu (Whatmann, England). Imobilizované proteiny byly blokovány 5% odtučněným mlékem v PBS fosfátovém pufru (0,1% Tween 20). Membrány byly inkubovány přes noc při teplotě 4°C s následujícími protilátkami: anti-Krox20 Ab (Covance, PRB-236P) 1:500, anti-PU.1 (Santa Cruz, sc-352), anti-HA (Santa Cruz) a anti-Aktin (Santa Cruz, sc-1616) 1:2 000 v 1 % odtučněném mléku v PBS (0,1% Tween 20) a po promytí následně se sekundární protilátkou s konjugovanou peroxidázou. Komplexy byly vizualizovány pomocí zesílené chemiluminescence (ECL Plus, GE Healthcare).

#### ***Průtoková cytometrie:***

Průtoková cytometrie a třídění buněk byly provedeny pomocí přístrojem FACS Aria (BD Biosciences). Použité protilátky (F4/80, CD14, CD11b) byly od firmy PharMingen.

#### ***Statistická analýza:***

Hodnoty jsou uvedeny jako průměr, chybové úsečky indikují standardní odchylku (s.d.) nebo standardní chybu střední hodnoty (s.e.m.). Soubory hodnot byly porovnány pomocí Mann-Whitney testu a Kruskal-Wallis testu, popřípadě pomocí Spearmanovy korelace.

## 4. Výsledky:

Buněčný systém, který byl využit pro studium myeloidní diferenciace je tvořen krevními progenitory izolovanými z fetálních jater PU.1 deficientní myši. Do těchto progenitorů je vnesen fúzní transgen nesoucí kódující sekvenci PU.1 a sekvenci ligand vázající domény estrogenního receptoru (PUER) umožňující kontrolovanou expresi a aktivaci transkripčního faktoru PU.1 (37). Stimulace PUER buněk chemickou látkou Tamoxifenem (2.5  $\mu\text{M}$ ) vede během 4 dnů k diferenciaci progenitorů do přisedlých makrofágů charakteristických velkou vakuolizovanou cytoplasmou a expresí specifických genů včetně Cd14, Cd68, F4/80 a Csf1R na mRNA i proteinové úrovni.

Abychom identifikovali mikroRNA účastnící se makrofágové diferenciace byly PUER progenitorové buňky stimulovány Tamoxifenem (2.5 $\mu\text{M}$ , 4dny) a diferencovány do makrofágů. Následně byla analyzována exprese maturovaných mikroRNA pomocí TaqMan mikroRNA čipu. Z 570 testovaných mikroRNA bylo 308 exprimováno v PUER progenitorech. Makrofágová diferenciace vedla ke změně exprese 168 mikroRNA ( $>9\sigma = \text{FC } 1.1$ ), 91 mikroRNA mělo zvýšenou expresi a 77 sníženou expresi. Mezi mikroRNA s nejvíce sníženou expresí byla skupina mikroRNA náležící do miR-17-92 klastru a jeho paralogu miR-106b-25, přičemž tyto mikroRNA náležely mezi nejvíce exprimované mikroRNA v nestimulovaných PUER progenitorech. Tyto výsledky byly potvrzeny pomocí qRT-PCR pro maturované mikroRNA a zároveň pro pri-miRNA transkript za použití zvyšující se koncentrace Tamoxifenu. Zvyšující se koncentrace aktivního PU.1 vedla v opačné úměře k výrazné inhibici exprese maturovaných mikroRNA: miR-17-5p, miR-18a, miR-20a and miR-92a, reprezentujících miR-17-92 klastr. Expese primárního transkriptu pri-miR-17-92 byla snížena obdobným způsobem, což indikuje, že miR-17-92 klastr je regulován v diferencujících se makrofázích na transkripční úrovni.

Ke zjištění, zda uvedené snížení exprese miR-17-92 klastru je důležité pro makrofágovou diferenciaci, jsme využili experiment ve kterém jsme nadprodukovali miR-17-92 klastr v diferencujících se PUER buňkách z vektoru nesoucího kódující sekvenci miR-17-92 klastru. Exogenně vnesený miR-17-92 způsobil výraznou inhibici makrofágové diferenciace a většina buněk zůstala ve stadiu blastů s velkým jádrem a malou cytoplasmou. Tento experiment prokázal, že vypnutí exprese miR-17-92 klastru je nezbytným předpokladem pro to, aby mohla proběhnout diferenciace progenitorových buněk do makrofágů.

Jelikož exprese miR-17-92 klastru je snížena během indukce PU.1, bylo logické otestovat, zda je miR-17-92 klastr transkripčně přímo regulován faktorem PU.1. Protože se

nepodařilo prokázat přímou vazbu PU.1 do miR-17-92 promotoru pomocí chromatinové imunoprecipitace a zároveň jsme neprokázali přímou regulaci pomocí funkčních esejů, zaměřili jsme se na možnost nepřímé regulace miR-17-92 klastru. Pomocí celogenomové analýzy jsme zjistili, že mezi transkripčními faktory s největší stimulací exprese během diferenciaci PUER buněk je transkripční faktor Egr2. Jelikož tento faktor je znám jako promotér makrofágového transkripčního programu a represor alternativních transkripčních faktorů a jelikož jsme identifikovali několik vazebných míst Egr2 v promotoru miR-17-92, rozhodli jsme se otestovat hypotézu, že Egr2 je tím faktorem, který zprostředkuje PU.1 závislou represi miR-17-92 klastru. Nestimulované PUER buňky, jež neexprimují ani Egr2 ani aktivní PU.1 byly transfekovány expresním vektorem nesoucím Egr2 sekvenci. Transfekce Egr2 vektoru do PUER buněk vedla k výrazně zvýšené expresi Egr2 a výrazně snížené expresi jak maturovaných miR-17-5p, miR-18a, miR-20a a miR-92a, tak primárního transkriptu pri-miR-17-92, což indikuje že Egr2 je faktorem, který zprostředkuje PU.1-dependentní represi klastru miR-17-92.

Jelikož transkripční faktor Egr2 efektivně reprimoval miR-17-92 klastr bez přítomnosti PU.1, další otázka byla, zda se Egr2 fyzicky váže do regulačních oblastí miR-17-92 klastru. Použili jsme jednak původní PUER buněčnou linii a zároveň PUER linii stabilně transfekovanou inhibičním shRNA (small hairpin RNA) konstruktem, tlumícím expresi Egr2 (shEgr2 buňky). Chromatinová imunoprecipitace za použití Egr2 protilátky prokázala, že se Egr2 specificky váže do promotorové oblasti miR-17-92 klastru v pozici -3.3 to -1.6 kb (vzhledem k prvnímu nukleotidu miR-17-5p sekvence) v diferencované parentální PUER linii, ale nikoliv v shEgr2 linii s inhibovaným Egr2 (shEgr2 buňky). Tato oblast se překrývá s dlouhým CpG ostrůvkem v promotorové oblasti miR-17-92 klastru. Dále jsme otestovali, zda vazba Egr2 ovlivňuje chromatinové modifikace a tím i strukturu chromatinu. Překvapivě úroveň histonu 3 lysinu 4 (H3K9) acetylace nebyla během makrofágové diferenciaci změněna a ani kultivace PUER buněk s inhibitorem histon deacetyláz Trichostatinem (TSA, 30nm) neměla vliv na expresi miR-17-92. Histon 3 lysin 4 (H3K4) trimetylace, další známka transkripčně aktivního chromatinu byla však výrazně snížena v pozici -2.7 kb během makrofágové diferenciaci, to znamená ve stejném místě, kde byla identifikována maximální vazba Egr2. Tento experiment prokázal, že Egr2 reguluje miR-17-92 klastr přímou vazbou do jeho promotorové oblasti mechanismem H3K4 demetylace.

Demetylace histonu H3K4 je aktivní proces transkripční represe. Egr2 protein ale nemá žádnou demetylační schopnost a z toho důvodu jsme předpokládali, že Egr2 přináší určitou H3K4 demetylázu aby reprimoval miR-17-92 lokus. Celogenomová analýza diferencujících

PUER buněk prokázala, že dvě demetylázy z rodiny Jarid1, Jarid1a (Rbp2, Kdm5a) a Jarid1b (Plu1, Kdm5b) jsou expresně zvýšeny během makrofágové diferenciaci. Navíc CpG ostrůvek miR-17-92 klastru obsahuje současně vazebné sekvence obou demetyláz. Chromatinová imunoprecipitace v PUER diferenciovaných versus nediferenciovaných buňkách prokázala specifickou vazbu Jarid1b demetylázy do oblasti -3.1 až -2.2 kb s maximum -2.7 kb, to znamená do oblasti kde byla prokázána vazba Egr2 a snížená H3K4 metylace.

V další části výzkumu jsme se soustředili na identifikaci minimální oblasti miR-17-92 promotoru zodpovědného za represi miR-17-92 klastru. Za tímto účelem bylo vytvořeno sedm pGL3 luciferázových konstruktů nesoucích různé části miR-17-92 regulačních oblastí. pGL3 vektor nese gen pro enzym luciferázu, který pokud je aktivován vnesenou studovanou DNA sekvencí produkuje za přítomnosti substrátu měřitelné světlo a umožňuje tak studovat aktivační/represivní vlastnosti vneseného DNA fragmentu. Transfekční experimenty prokázaly, že oblast zodpovědná za represi se nachází v oblasti -2.7 až -2.0 kb a že pro represi dané oblasti je nezbytná současná přítomnost transkripčního faktoru Egr2 a Jarid1b demetylázy. To bylo v souladu s předešlými experimenty, jež identifikovaly vazbu uvedených faktorů do stejné DNA oblasti.

Jelikož mikroRNA mohou inhibovat hladinu transkripčních faktorů a vytvářet tak zpětnovazebné regulace, zajímali jsme se o to, zda miR-17-92 klastr inhibuje PU.1 nebo Egr2, které miR-17-92 v průběhu makrofágové diferenciaci reprimují. Překvapivě mikroRNA databáze ([www.targetscan.org](http://www.targetscan.org)) předpověděly vazbu celkem 8 mikroRNA z 16 mikroRNA kódovaných miR-17-92 klastrem a jeho paralogy do dvou míst v 3' nepřekládané oblasti Egr2 mRNA. Abychom funkčně ověřili, zda mikroRNA miR-17-92 klastru inhibují Egr2 expresi vytvořili jsme dva pGL3 reporterové luciferázové konstrukty nesoucí 800 nukleotidů dlouhou 3' nepřekládanou oblast Egr2, nesoucí miR-17-92 vazebná místa a kontrolní mutovanou variantu. Transfekce uvedených konstruktů do nediferencovaných PUER progenitorů, exprimujících endogenní miR-17-92 klastr vedla ke snížení aktivity nemutovaného konstruktu o 60%. Tento experiment funkčně prokázal schopnost miR-17-92 klastru posttranskripčně inhibovat Egr2 protein. Na základě uvedených výsledků je pravděpodobné, že mezi mikroRNA z miR-17-92 klastru a transkripčním faktorem Egr2 existuje během makrofágové diferenciaci homeostatická rovnováha, kdy transkripční faktor Egr2 reprimuje miR-17-92 v diferencujících se buňkách, zatímco v proliferujících nezralých progenitorech je transkripční faktor Egr2 inhibován miR-17-92 klastrem.

V předešlém textu byl popsán mechanismus vzájemné regulace (kompozitní zpětnovazebný mechanismus regulace) zahrnující PU.1, Egr2 a miR-17-92 klastr, účastníci se



fyziologického procesu makrofágové diferenciaci. Další otázkou bylo, zda tento mechanismus může být deregulován v nemoci nebo nádoru. Jak bylo uvedeno výše, ektopická exprese miR-17-92 klastru blokuje makrofágovou diferenciaci. Mezi malignity charakteristické blokem myeloidní diferenciaci patří AML. Bylo studováno 29 pacientů s AML. Podle našeho předpokladu až 14 pacientů mělo výrazně sníženu expresi faktorů PU.1 a EGR2 a současně tito pacienti vykazovali zároveň zvýšenou hladinu miR-17-92 klastru. Tento výsledek naznačuje, že mechanismus represe miR-17-92 klastru zprostředkovaný faktory PU.1 a EGR2 je narušen a homeostatická rovnováha vzájemné regulace těchto faktorů je posunuta ve prospěch exprese miR-17-92 klastru. Abychom prokázali, že EGR2 je schopen reprimovat miR-17-92 i v blastech leukemických pacientů, nadprodukovali jsme v leukemických blastech hladinu EGR2. Vnesení expresního vektoru nesoucího EGR2 do leukemických buněk vedlo ke snížení hladiny miR-17-92 a zvýšení exprese cílů miR-17-92 klastru: proapoptotického faktoru BIM a regulátoru buněčného cyklu p21, které vykazovaly v netransferovaných buňkách pacientů sníženou expresi. Tato data dokazují, že mechanismus represe miR-17-92 klastru je v AML narušen a dále že Egr2 má potenciál reprimovat miR-17-92 klastr i v primárních leukemických buňkách.

Tato disertační práce popisuje též regulaci další onkogenní mikroRNA, **miR-155**, u níž byla dříve popsána role během zánětlivé odpovědi makrofágů a vývoje B a T lymfocytů (38, 39). Abychom otestovali, zda exprese miR-155 je ovlivněna v průběhu makrofágové diferenciaci, stimulovali jsme PUER buňky zvyšující se koncentrací Tamoxifenu (96 hod). Zvyšující se koncentrace aktivního PU.1 vedla ke graduální indukci exprese miR-155, s maximem 2.5 krát v nejvyšší koncentraci Tamoxifenu. Dále jsme se zaměřili na časovou dynamiku indukce miR-155. PUER buňky byly stimulovány nejvyšší koncentrací Tamoxifenu ve čtyřech časových intervalech (0, 24, 48 a 96 hodin). Překvapivě, nejvyšší stimulace exprese miR-155 byla dosažena v nejkratším, 24 hodinovém intervalu, a následně exprese miR-155 výrazně klesala v navazujících časových bodech. Tento výsledek naznačuje že exprese miR-155 je důležitá pro počáteční stádia makrofágové diferenciaci.

K otestování, zda indukce exprese miR-155 je regulována na úrovni chromatinu změnou histonové acetylace, byl využit inhibitor histon deacetyláz Trichostatin. Kultivace diferencujících se PUER buněk v přítomnosti Trichostatinu (30nM) vedla k výraznému zvýšení exprese miR-155 v porovnání s kontrolními buňkami. Tento experiment naznačuje že miR-155 je regulován v průběhu makrofágové diferenciaci na úrovni chromatinu histon deacetylázami a tudíž exprese miR-155 je v nediferencovaných buňkách udržována na nízké úrovni mechanismem histonové deacetylace. Expresní analýza miR-155 v diferencovaných PUER

buňkách popsaná výše prokázala, že miR-155 se účastní makrofágové diferenciaci. Jak bylo uvedeno výše AML je malignita charakterizována defektem makrofágové diferenciaci. Z toho důvodu jsme otestovali expresi miR-155v periferních mononukleárních buňkách AML pacientů. 8 z 18 pacientů mělo zvýšenou hladinu miR-155. Zajímavá je skutečnost, že stejní pacienti s AML měli současně sníženou expresi transkripčního faktoru PU.1 a mezi hladinou miR-155 a PU.1 byla zjištěna negativní korelace.

## 5. Diskuse:

Tato disertační práce prokazuje úlohu dvou onkogenních mikroRNA miR-17-92 a miR-155 v průběhu makrofágové diferenciaci myeloidních progenitorů.

Tato práce dokazuje, že pro myeloidní diferenciaci je nezbytné snížení exprese onkogenního **miR-17-92** klastru. Bylo prokázáno že miR -17-92 klastr je vysoce exprimován v dělicích se buňkách, progenitorech a také v kmenových buňkách (29, 31, 40). V souladu s výsledky této disertační práce několik dalších prací ukazuje snížení exprese miR-17-92 klastru v jiných buněčných modelech během diferenciaci, včetně diferenciaci promyelocytární buněčné linie HL60, lymfocytů a monocytárních makrofágů pupečnickové krve (29, 31, 40, 41). Z uvedených prací a našich výsledků vyplývá, že snížení exprese miR-17-92 klastru je pravděpodobně nezbytný předpoklad krvetvorné a potenciálně i dalších diferenciaci.

Bylo prokázáno, že trimetylace histonu H3K4 je znakem aktivně přepisovaného chromatinu a umožňuje nasednutí RNA polymerázy II a iniciaci transkripce (42, 43). Demetylace H3K4 naopak vede k represi a umlčení transkripce (44). V souladu s těmito výsledky demetylace promotorové oblasti miR-17-92 klastru popsaná v této práci představuje epigenetický mechanismus represe miR-17-92 klastru.

Celogenomové analýzy H3K4 metylace ukázaly, že H3K4 metylace je neobohacena v těsné blízkosti transkripčních startů přepisovaných genů (43, 45). V této Phd. práci ukazujeme, že H3K4 trimetyl je nabohacený v pozici -2.7 kb. Z důvodu vysokého obsahu cytosinových a guanidinových bází není možné technikami založenými na PCR identifikovat transkripční start miR-17-92 klastru. Námi identifikovaná změna metylace v oblasti -2.7kb nepřímo dokazuje, že transkripční start miR-17-92 klastru je lokalizován do uvedené oblasti -2.7kb. To podporuje i skutečnost že v této vysoce konzervované oblasti se nalézají TATA box, zpravidla předcházející transkripční start.

Tato disertační práce přináší nové poznatky vzájemné regulace dvou klíčových skupin regulačních molekul – transkripčních faktorů a mikroRNA, kontrolujících genovou expresi

během myeloidní diferenciaci. V této práci přinášíme důkazy, že miR-17-92 klastr a EGR2 se vzájemně inhibují. To znamená, že vytvářejí dvojité negativní zpětnou vazbu, jejíž regulace doprovází makrofágovou diferenciaci. Je známo, že dvojité negativní zpětná vazba je typ regulace charakteristický pro takzvané bistabilní stavy (46), jejichž příkladem je i diferenciaci myeloidních progenitorů do makrofágů. Uvedený typ vztahu dvou regulačních faktorů zajišťuje exkluzivní expresi jednoho ze dvou zúčastněných faktorů. V případě myeloidních progenitorů, dvojité negativní zpětnovazebný typ regulace zajišťuje, že se buňky exkluzivně vyskytují buď v diferencovaném stavu makrofágů nebo v nediferencovaném stavu progenitorů (47). Uvedený typ regulace ale zároveň umožňuje dediferenciaci a teoreticky tak umožňuje plasticitu hematopoetického systému.

Výsledky této disertační práce dále ukazují, že miR-17-92 klastr má zvýšenou expresi ve významné frakci testovaných vzorků AML. Tento jev je logicky podporován dalšími výsledky této práce, ukazujícími, že zatímco během diferenciaci je snížena exprese miR-17-92 klastru, ektopická exprese miR-17-92 klastru blokuje diferenciaci myeloidních progenitorů. Tato skutečnost naznačuje, že blok diferenciaci, charakteristický pro AML může být způsoben vysokou expresí miR-17-92 klastru v krevních blastech. Jelikož stejní pacienti, kteří mají vysokou expresi miR-17-92 klastru, mají zároveň sníženu expresi jeho represorů, faktorů PU.1 a EGR2, je pravděpodobné, že vysoká hladina miR-17-92 v AML je způsobena nedostatečným represivním mechanismem zprostředkovaným EGR2. Dále je možné předpokládat, že nízká hladina EGR2 může být způsobena jednak nedostatečnou stimulací faktorem PU.1 a jednak zvýšenou inhibicí nadprodukováným miR-17-92 klastrem. Na obrázku 2. je zobrazen model regulace miR-17-92 klastru v průběhu diferenciaci, proliferace a leukémie.

Několik prací prokázalo, že **miR-155**, účastní se vývoje a funkce zralých lymfoidních buněk (38, 39), hraje roli také v makrofázích, konkrétně v zánětlivé odpovědi zprostředkované makrofágy (35). V PU.1 dependentním buněčném systému, jež byl využit v této práci, je miR-155 aktivováno faktorem PU.1 v časných fázích makrofágové diferenciaci. Tato data byla potvrzena současnou publikací, detekující vazbu PU.1 v oblasti -15kb před transkripčním startem miR-155 (BIC) genu (48). Další publikace prokazuje, že PU.1 je inhibováno miR-155 (36). To spolu s expresními daty uvedenými v této práci naznačuje, že PU.1 a miR-155 vytváří negativní zpětnou vazbu. To podporuje také skutečnost, že hladiny PU.1 a miR-155 negativně korelují v studovaných AML blastech. Jelikož určité koncentrace PU.1 jsou nezbytné pro diferenciaci různých krevních populací (49, 50) a jelikož snížená hladina PU.1 může iniciovat AML (4), je pravděpodobné, že vzájemná regulace miR-155 a PU.1 představuje

homeostatický mechanismus kontroly přesné exprese PU.1 během makrofágové diferenciaci, který pokud je narušen může mít za následek AML.

## **6. Závěr:**

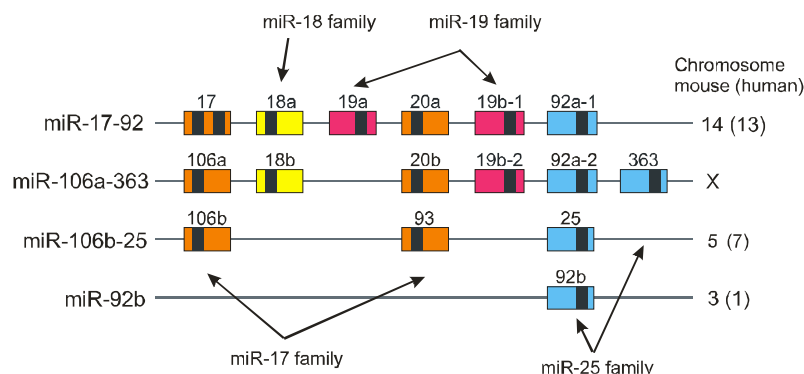
Tato disertační práce přináší nové poznatky o vzájemné regulaci transkripčních faktorů a mikroRNA v procesu regulace genové exprese během PU.1 indukované myeloidní diferenciaci. Předložená práce ukazuje, že makrofágová diferenciaci je řízena regulačním mechanismem skládajícím se z transkripčních faktorů PU.1, EGR2 a histon demetylázy Jarid1b, jež reprimuje pro-proliferační a onkogenní miR-17-92 klastr. V průběhu diferenciaci myeloidních progenitorů do makrofágové linie, transkripční faktor PU.1 aktivuje sekundární transkripční faktor EGR2, který se váže do promotoru miR-17-92 klastru a přináší histon demetylázu Jarid1b, jež demetyluje miR-17-92 regulační oblast a tato změna chromatinu způsobí represi a miR-17-92 klastru. Důležitost snížení exprese miR-17-92 klastru potvrzuje skutečnost, že umělá nadprodukce miR-17-92 v myeloidních progenitorech blokuje makrofágovou diferenciaci.

MiR-17-92 klastr na druhou stranu posttranskripčně inhibuje EGR2, což potvrzuje existenci dvojitě negativní zpětné regulační vazby účastníci se makrofágového vývoje, kde Egr2 reprimuje miR-17-92 klastr v diferencujících se buňkách a naopak miR-17-92 klastr negativně reguluje faktor Egr2 v proliferujících progenitorech.

Tato práce současně ukazuje, že exprese další onkogenní mikroRNA, miR-155 je indukována transkripčním faktorem PU.1 v časných fázích makrofágové diferenciaci mechanismem zahrnujícím histonovou acetylaci.

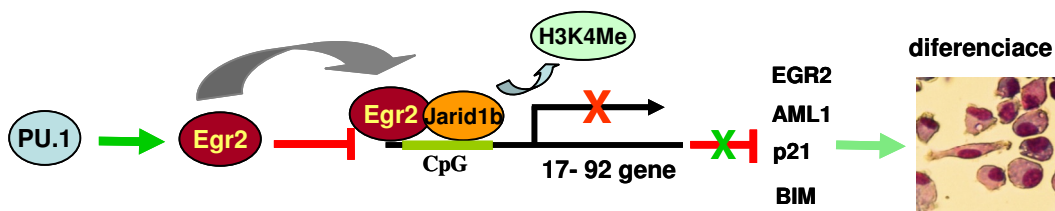
Uvedené výsledky podporují současné koncepty genové regulace, které postulují, že regulace genové exprese na molekulární úrovni není závislá pouze na transkripčních faktorech, zprostředkujících iniciaci transkripce, jak předpokládala dřívější paradigmat, ale je regulována též na posttranskripční úrovni pomocí nové třídy regulačních RNA - mikroRNA. Obě uvedené skupiny regulátorů - transkripční faktory i mikroRNA se regulují navzájem a mohou vytvářet složité genově regulační sítě, účastníci se regulace cílových genů.

Tato disertační práce dále přináší nové poznatky s možnou aplikací do medicíny tím, že dokumentuje potenciální roli mikroRNA miR-17-92 a miR-155 a jejich deregulaci v patogenezi AML a definuje PU.1/EGR2/miR-17-92 regulační dráhu jako potenciální cíl terapie AML.

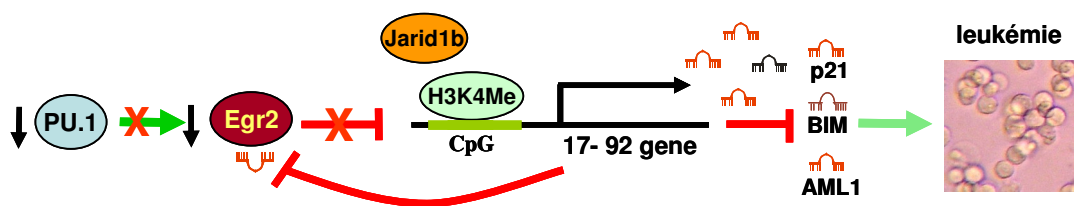


**Obrázek 1. Shéma miR-17-92 klastru a jeho paralogů.** Barevné boxy představují pre-miR, černé boxy maturované mikroRNA. Šipky označují příslušnost mikroRNA do čtyř rodin na základě identické sekvenční vazebného místa.

**A Normální krvetvorba**



**B Proliferace a leukémie**



**Obrázek 2. Model regulace miR-17-92 klastru (A)** Během makrofágové diferenciace PU.1 stimuluje expresi transkripčního faktoru Egr2, který přináší histon demetylázu Jarid1b. Ta způsobí demetylaci H3K4 v miR-17-92 promotoru, a tato změna chromatinové struktury vede k inhibici miR-17-92 a následnému uvolnění bloku faktorů nezbytných pro diferenciaci. **(B)** V proliferujících progenitorech nebo v AML nízké hladiny PU.1 nejsou schopné stimulovat Egr2. Nízké hladiny Egr2 nejsou schopné inhibovat expresi miR-17-92. Zvýšené hladiny miR-17-92 stimulují proliferaci a přežití buněk tím, že umlčují faktory nezbytné pro diferenciaci, zástavu buněčného cyklu a apoptózu.

## 7. Seznam použité literatury (formát Science):

1. E. W. Scott, M. C. Simon, J. Anastasi, H. Singh, *Science* **265**, 1573 (Sep 9, 1994).
2. S. R. McKercher *et al.*, *Embo J* **15**, 5647 (Oct 15, 1996).
3. J. Back, A. Dierich, C. Bronn, P. Kastner, S. Chan, *Blood* **103**, 3615 (May 15, 2004).
4. F. Rosenbauer *et al.*, *Nat Genet* **36**, 624 (Jun, 2004).
5. E. Estey, H. Dohner, *Lancet* **368**, 1894 (Nov 25, 2006).
6. D. P. Bartel, *Cell* **116**, 281 (2004).
7. L. P. Lim *et al.*, *Nature* **433**, 769 (2005).
8. F. Petrocca, A. Vecchione, C. M. Croce, *Cancer Research* **68**, 8191 (2008).
9. S. Volinia *et al.*, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 2257 (2006).
10. L. He *et al.*, *Nature* **435**, 828 (2005).
11. S. Landais, S. Landry, P. Legault, E. Rassart, *Cancer Research* **67**, 5699 (2007).
12. A. Rodriguez, S. Griffiths-Jones, J. L. Ashurst, A. Bradley, *Genome Research* **14**, 1902 (2004).
13. F. Fazi, C. Nervi, *Cardiovascular Research* **79**, 553 (2008).
14. Z. Li *et al.*, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 15535 (2008).
15. A. Dixon-McIver *et al.*, *PLoS ONE [Electronic Resource]* **3**, e2141 (2008).
16. L. Venturini *et al.*, *Blood* **109**, 4399 (May 15, 2007).
17. L. He *et al.*, *Nature* **435**, 828 (Jun 9, 2005).
18. A. Ota *et al.*, *Cancer Research* **64**, 3087 (2004).
19. H. Tagawa, M. Seto, *Leukemia* **19**, 2013 (Nov, 2005).
20. Y. Hayashita *et al.*, *Cancer Res* **65**, 9628 (Nov 1, 2005).
21. J. W. Cui *et al.*, *Blood* **110**, 2631 (2007).
22. C. L. Wang *et al.*, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 18680 (2006).
23. A. Tanzer, P. F. Stadler, *Journal of Molecular Biology* **339**, 327 (2004).
24. A. Tanzer, P. F. Stadler, *J Mol Biol* **339**, 327 (May 28, 2004).
25. I. Ivanovska *et al.*, *Mol Cell Biol* **28**, 2167 (Apr, 2008).
26. F. Petrocca *et al.*, *Cancer Cell* **13**, 272 (Mar, 2008).
27. K. A. O'Donnell, E. A. Wentzel, K. I. Zeller, C. V. Dang, J. T. Mendell, *Nature* **435**, 839 (2005).
28. Y. Sylvestre *et al.*, *J Biol Chem* **282**, 2135 (Jan 26, 2007).
29. A. Ventura *et al.*, *Cell* **132**, 875 (Mar 7, 2008).
30. S. B. Koralov *et al.*, *Cell* **132**, 860 (2008).
31. C. Xiao *et al.*, *Nat Immunol* **9**, 405 (Apr, 2008).
32. Y. Lu, J. M. Thomson, H. Y. Wong, S. M. Hammond, B. L. Hogan, *Dev Biol* **310**, 442 (Oct 15, 2007).
33. A. Rodriguez *et al.*, *Science* **316**, 608 (2007).
34. E. Vigorito *et al.*, *Immunity* **27**, 847 (2007).
35. R. M. O'Connell, K. D. Taganov, M. P. Boldin, G. Cheng, D. Baltimore, *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 1604 (Jan 30, 2007).
36. R. M. O'Connell *et al.*, *J Exp Med* **205**, 585 (Mar 17, 2008).
37. J. C. Walsh *et al.*, *Immunity* **17**, 665 (Nov, 2002).
38. G. Teng *et al.*, *Immunity* **28**, 621 (May, 2008).
39. Y. Dorsett *et al.*, *Immunity* **28**, 630 (May, 2008).
40. A. Marson *et al.*, *Cell* **134**, 521 (Aug 8, 2008).
41. L. Fontana *et al.*, *Nat Cell Biol* **9**, 775 (Jul, 2007).

42. B. E. Bernstein *et al.*, *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 8695 (Jun 25, 2002).
43. B. E. Bernstein *et al.*, *Cell* **120**, 169 (Jan 28, 2005).
44. R. J. Sims, 3rd *et al.*, *Mol Cell* **28**, 665 (Nov 30, 2007).
45. A. Barski *et al.*, *Cell* **129**, 823 (May 18, 2007).
46. N. J. Martinez *et al.*, *Genes Dev* **22**, 2535 (Sep 15, 2008).
47. J. Tsang, J. Zhu, A. van Oudenaarden, *Mol Cell* **26**, 753 (Jun 8, 2007).
48. S. Ghani *et al.*, *Blood* **118**, 2275 (Aug 25, 2011).
49. R. Dahl *et al.*, *Nat Immunol* **4**, 1029 (Oct, 2003).
50. C. Nerlov, T. Graf, *Genes Dev* **12**, 2403 (Aug 1, 1998).
51. T. Stopka, D. F. Amanatullah, M. Papetti, A. I. Skoultchi, *Embo J* **24**, 3712 (Nov 2, 2005).
52. V. Fulci *et al.*, *Blood* **109**, 4944 (Jun 1, 2007).
53. P. S. Eis *et al.*, *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 3627 (Mar 8, 2005).

## 8. Seznam publikací:

### 1. Publikace in extenso, které jsou podkladem disertace:

**Epigenetic silencing of the oncogenic miR-17-92 cluster during PU.1-directed macrophage differentiation.**

Pospisil V, Vargova K, Kokavec J, Rybarova J, Savvulidi F, Jonasova A, Necas E, Zavadil J, Laslo P, Stopka T. *EMBO J*. 2011 Sep 6; **30**, 4450-4464. **IF 10.124**

**MYB transcriptionally regulates the miR-155 host gene in chronic lymphocytic leukemia.**

Vargova K, Curik N, Burda P, Basova P, Kulvait V, Pospisil V, Savvulidi F, Kokavec J, Necas E, Berkova A, Obrtlíkova P, Karban J, Mraz M, Pospisilova S, Mayer J, Trnecny M, Zavadil J, Stopka T. *Blood*. 2011 Apr 7;117(14):3816-25. Epub 2011 Feb 4.

**IF 10.558**

### 2. Publikace in extenso bez vztahu k tématu disertace:

**Cdc25A localisation and shuttling: characterisation of sequences mediating nuclear export and import.**

Källström H, Lindqvist A, Pospisil V, Lundgren A, Rosenthal CK.

*Exp Cell Res*. 2005,303(1):89-100. **IF 4.148**

## **Poděkování:**

V první řadě bych chtěl co nejsrdečněji poděkovat mému školiteli docentu MUDr. Tomáši Stopkovi Phd. za jeho příkladné vedení, nikdy nekončící podporu, vědecké nadšení a podnětné vědecké diskuse.

Speciální poděkování patří profesoru Emanuelu Nečasovi, přednostovi Ústavu patologické fyziologie za jeho podporu a zejména přátelský a lidský přístup.

Dále bych chtěl poděkovat členům naší laboratoře za skvělou spolupráci, zejména Karin Vargové, Juraji Kokavcovi, Pavlovi Burdovi, Nikolovi Čuříkovi, Vojtěchu Kulvaitovi, Petře Bašové a Martině Kapalové.

Poděkování patří též pracovníkům Ústavu patologické fyziologie Pavlovi Klenerovi, Janu Živnému, Jiřímu Petrákovi, Jan Krijtovi, Martinu Vokurkovi, Filippu Savuildi, Sergiu Leahomschi, Magdě Klánové, Janě Frýdlové, Bokangu Maswabi a Luďkovi Ševcovi za jejich spolupráci, rady a podnětné vědecké diskuse.

Děkuji dále Dr. Jiřímu Zavadilovi z Langone Medical Center, New York, USA a Dr. Peterovi Laslovi z Institute of Molecular Medicine, Leeds, UK za příkladnou vědeckou spolupráci.

V neposlední řadě vřelé díky patří mým rodičům a partnerce za trpělivost a podporu v průběhu mých postgraduálních studií.

Tato práce byla podporována následujícími granty: Ministerstvo zdravotnictví (NS10310-3/2009), MŠMT (NPVII 2B06077, MSM 0021620806, LC 06044, SVV-2011-262507), Ministerstvo průmyslu a obchodu (FR-TI2/509) a Grantová agentura České republiky (301/06/1093).