

Univerzita Karlova v Praze
Charles University in Prague

Přírodovědecká fakulta
Faculty of Science



Autoreferát disertační práce
Summary of PhD Thesis

**Elucidating the interactions of interleukin-1 α with components of
the eukaryotic transcription machinery**

Mgr. Blanka Zámotná

Praha, květen 2013
Prague, May 2013

Doktorské studijní programy v biomedicině

*Univerzita Karlova v Praze
a Akademie věd České republiky*

Program: Molekulární a buněčná biologie, genetik a virologie

Předseda oborové rady: Prof. RNDr. Stanislav Zadražil, DrSc.

Školící pracoviště: Laboratoř biochemie RNA, Katedra genetiky a mikrobiologie PŘF UK

Autor: Mgr. Blanka Zámotná

Školitel: RNDr. Martin Pospíšek, Ph.D.

S disertací je možno se seznámit v příslušných knihovnách Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze.

Obsah

1	Česká část.....	7
1.1	Úvod	7
1.1.1	Interleukin-1 α	7
1.1.2	Histonacetyltransferázy	8
1.1.3	Akutní lymfoblastická leukemie.....	8
1.2	Hypotézy a cíle práce.....	9
1.2.1	Část I - studium jaderné funkce IL-1 α v savčích buňkách.....	9
1.2.2	Část II - studium jaderné funkce IL-1 α v heterologním kvasinkovém modelu..	9
1.2.3	Část III - studium role <i>HOX</i> genů u dětské akutní lymfoblastické leukemie.....	9
1.3	Materiál a metodika.....	10
1.4	Výsledky a diskuse	11
1.4.1	Část I - studium jaderné funkce IL-1 α v savčích buňkách.....	11
1.4.2	Část II- studium jaderné funkce IL-1 α v heterologním kvasinkovém modelu..	12
1.4.3	Část III - studium role <i>HOX</i> genů u dětské akutní lymfoblastické leukemie....	13
1.5	Závěry.....	13
2	Anglická část	14
2.1	Introduction	14
2.1.1	Interleukin-1 α	14
2.1.2	Histone acetyltransferases	15
2.1.3	Acute lymphoblastic leukaemia	16
2.2	Aims of the work	16
2.2.1	Part I - study of the IL-1 α nuclear function in mammalian cells	16
2.2.2	Part II - study of the IL-1 α nuclear function in the heterologous yeast model .	16
2.2.3	Part III - study of the role of <i>HOX</i> genes in paediatric acute lymphoblastic leukaemia.....	17
2.3	Overview of used methods.....	17
2.4	Results and Discussion.....	18
2.4.1	Part I - study of the IL-1 α nuclear function in mammalian cells	18

2.4.2	Part II - study of the IL-1 α nuclear function in the heterologous yeast model .	19
2.4.3	Part III - study of the role of HOX genes in paediatric acute lymphoblastic leukaemia.....	19
2.5	Conclusions	20
3	Použitá literatura / References	21
4	Seznam publikací / List of publications	23
4.1	Publikace <i>in extenso</i> , které jsou podkladem disertace	23
4.2	Publikace <i>in extenso</i> bez vztahu k tématu disertace	24
5	Curriculum vitae	24

ABSTRAKT

Interleukin-1 α (IL-1 α) je pleiotropní cytokin, který hraje klíčovou roli v imunitní odpovědi organismu. Je produkován jako prekursor o molekulové hmotnosti 31 kDa, který je štěpen cysteinovou proteázou calpainem za vzniku maturovaného IL-1 α (17 kDa) a tzv. N-terminálního peptidu IL-1 α (IL-1 α NTP; 16 kDa). Ačkoliv IL-1 α může být sekretován a spouštět dráhu signální transdukce skrze povrchové receptory cílových buněk, bylo zjištěno, že IL-1 α se účastní také některých procesů v buněčném jádře. IL-1 α NTP je u vyšších eukaryot vysoce konzervován a obsahuje jaderný lokalizační signál, díky kterému prekursor i samotný IL-1 α NTP vstupují do buněčného jádra. Při předchozím výzkumu byla popsána genetická interakce IL-1 α s jadernými histonacetyltransferázovými (HAT) komplexy v savčích buňkách a překvapivě také v heterologním kvasinkovém modelu.

Tato disertační práce se dále věnuje výzkumu jaderné funkce IL-1 α a přináší důkazy o fyzické interakci IL-1 α s „HAT/Core“ modulem kvasinkových histonacetyltransferáz SAGA a ADA. Výsledky pokusů zahrnujících knock-out jednotlivých podjednotek kvasinkových HAT komplexů a následné koimunoprecipitace poukazují na nový model skládání SAGA komplexu, ve kterém ADA představuje pravděpodobně jen částečně aktivní HAT komplex.

V savčích buňkách jakožto přirozeném modelu pro studium IL-1 α pak byla prokázána kolokalizace tohoto cytokinu s tumorsupresorovým proteinem p53. Tuto interakci potvrzuje také následná koimunoprecipitace obou proteinů. Také bylo zjištěno, že subcelulární lokalizaci IL-1 α NTP lze modulovat pomocí rozdílných kultivačních podmínek.

Poslední část této práce popisuje analýzu exprese *HOX* genů u imunofenotypově a genotypově definovaných podskupin pacientů s dětskou akutní lymfoblastickou leukémií (ALL). Exprese 23 vybraných *HOX* genů byla studována u 61 pacientů a výsledky byly porovnány s úrovní transkripce *HOX* genů v populacích B a T lymfocytů získaných od zdravých dárců. Bylo zjištěno, že v leukemických buňkách dochází k aberantní expresi *HOX* genů v porovnání se zdravými buňkami.

ABSTRACT

Interleukin-1 α (IL-1 α) is a pleiotropic cytokine and a key mediator of host immune response. It is synthesised as a 31-kDa precursor, that is cleaved by the cysteine protease calpain into the 17-kDa mature IL-1 α and the 16-kDa N-terminal peptide of IL-1 α (IL-1 α NTP). Although IL-1 α can be secreted, act on target cells through the surface receptor IL-1RI and trigger the signal transduction pathway, increasing evidence points toward the involvement of IL-1 α in certain nuclear processes. IL-1 α NTP is highly conserved among higher eukaryotes and contains a nuclear localisation sequence; indeed, both the precursor and IL-1 α NTP are found in the cell nucleus. Previously, a genetic interaction of IL-1 α with nuclear histone acetyltransferase (HAT) complexes has been reported from mammalian cells and, interestingly, also from the heterologous yeast model.

This thesis extends the research of the nuclear function of IL-1 α and demonstrates that IL-1 α physically associates with the HAT/Core module of yeast SAGA and ADA HAT complexes. Results of the HAT subunit gene knock-out experiments followed by a set of co-immunoprecipitations also suggest a novel model of the yeast SAGA complex assembly, in which ADA appears to represent only a partly functional HAT complex.

In its natural milieu of mammalian cells, IL-1 α is demonstrated to co-localise with the tumour suppressor protein p53 within the cell nucleus. This interaction is further supported with a co-immunoprecipitation experiment where the IL-1 α precursor binds p53. Moreover, it is shown that the subcellular localisation of IL-1 α NTP can be modulated under different culturing conditions.

Finally, this thesis presents an analysis of *HOX* gene expression in immunophenotypically and genotypically defined subsets of paediatric patients with acute lymphoblastic leukaemia (ALL). The expression of 23 selected *HOX* genes in 61 ALL patients is studied and the results are compared with the levels of *HOX* gene transcription in sorted cell populations of B and T lymphocytes from healthy donors. Aberrant *HOX* gene expression patterns have been identified in the leukaemic cells compared to their closest physiological counterparts

1 Česká část

1.1 Úvod

1.1.1 Interleukin-1 α

Interleukin-1 α (IL-1 α) je prozánětlivý cytokin a jedna z klíčových molekul imunitního systému, zajišťující regulaci a koordinaci různých složek obrany organismu v případě infekce, poranění nebo stresu. Jeho působení však zdaleka není omezeno jen na imunitní systém; interleukin-1 má vliv rovněž na normální růst a morfogenezi mnoha typů buněk i na celkový metabolismus.

Protein se v organismu vyskytuje ve dvou variantách, nazvaných interleukin-1 α a β . Obě tyto formy jsou produkovány jako 31 kDa prekursor, které jsou štěpeny specifickými buněčnými proteázami za vzniku maturovaných proteinů o molekulové hmotnosti 17 kDa. Jen prekursor interleukinu-1 α je však plně biologicky funkční a schopný vazby na membránové receptory (Mosley *et al.* 1987), ačkoliv po štěpení je IL-1 α cca 50x aktivnější (Zheng *et al.* 2013). Oba příbuzné proteiny představují produkt dvou různých genů, které se u člověka nacházejí na chromozomu 2. Nukleotidové sekvence vykazují 45% podobnost a aminokyselinové sekvence se shodují přibližně z 26 %. Ukazuje se, že obě formy interleukinu-1 se ve svých fyziologických funkcích dramaticky liší. Zatímco syntéza interleukinu-1 β je podmíněna vnějším signálem v podobě prozánětlivých faktorů, interleukin-1 α je produkován mnoha buněčnými typy konstitutivně. Interleukin-1 β je aktivní výhradně v sekretované podobě, interleukin-1 α se uplatňuje především intracelulárně a jeho sekrece je stále předmětem diskusí. Pouze u interleukinu-1 α byla nalezena forma asociovaná s cytoplazmatickou membránou, která může hrát roli v protinádorové imunitě (Apte *et al.* 2006).

IL-1 α je syntetizován především v monocytech, makrofázích, epiteliálních a endoteliálních buňkách nebo v keratinocytech. Transkripce je zvýšená zvláště během zánětu a infekce, mezi faktory stimulující produkci IL-1 α patří například bakteriální lipopolysacharid. Produktem translace je prekursor proteolyticky štěpený proteázou calpainem za vzniku C-terminálního maturovaného proteinu a tzv. N-terminálního peptidu interleukinu-1 α (IL-1 α NTP; 16 kDa) (Kobayashi *et al.* 1990). Tento peptid je u vyšších organismů překvapivě vysoce konzervovaný, je tedy pravděpodobné, že nejde pouze o meziproduct syntézy maturovaného IL-1 α (Buryskova *et al.* 2004).

IL-1 α jakožto prozánětlivý cytokin působí na cílové buňky skrze membránové receptory a spouští dráhu signální transdukce, vedoucí k NF- κ B a AP-1. Bylo však také zjištěno, že IL-1 α NTP obsahuje jaderný lokalizační signál, díky kterému prekursor i IL-1 α NTP vstupují do buněčného jádra (Wessendorf *et al.* 1993). Díky své extracelulárnímu funkci spočívající v aktivaci membránových receptorů a zároveň působení v buněčném jádře bývá IL-1 α nazýván „cytokin duální funkce“ (Carriere *et al.* 2007) a tvoří skupinu podobně fungujících proteinů spolu s HMGB-1, IL-16, IL-33 a IL-37 (Berman *et al.* 1985; Wang *et al.* 1999; Wilson *et al.* 2002; Agresti and Bianchi 2003; Gadina and Jefferies 2007; Sharma *et al.* 2008; Boraschi *et al.* 2011; Smith 2011).

Jadernému IL-1 α jsou připisovány rozličné biologické vlastnosti, jako například regulace buněčné motility (McMahon *et al.* 1997) nebo interakce s růstovým supresorem necdinem (Hu *et al.* 2003). Samotný N-terminální peptid IL-1 α se pak účastní transformace mesangiálních buněk (Stevenson *et al.* 1997) nebo indukce apoptózy v nádorových buňkách (Pollock *et al.* 2003). V naší laboratoři jsme již dříve prokázali, že IL-1 α NTP interaguje s enzymatickými komplexy histonacetyltransferáz a to jak v savčích buňkách, tak i v heterologním modelu *Saccharomyces cerevisiae* (Buryskova *et al.* 2004).

1.1.2 Histonacetyltransferázy

DNA je v buněčném jádře sbalena v chromatinové vlákno a asociována s bazickými proteiny histony a jinými proteiny. Toto kompaktní uspořádání je však spojeno s transkripčně neaktivním stavem. Histonacetyltransferázy (HAT) jsou enzymatické komplexy, které acetylují N-konce histonů, rozvolňují tak chromatinové vlákno a činí jej přístupnější transkripčnímu aparátu. První histonacetyltransferáza Gcn5 byla objevena u *Tetrahymena* (Brownell and Allis 1995; Brownell *et al.* 1996) a následně přibylo mnoho dalších vykazujících různou specificitu ohledně acetylovaných substrátů. U vyšších organismů jsou histonacetyltransferázy přítomny ve vícepodjednotkových komplexech, přičemž jejich funkce často závisí na konkrétním podjednotkovém složení celého komplexu. Kromě histonů mohou histonacetyltransferázy rovněž katalyzovat acetylaci nehistonových proteinů, jako například tumorsupresorového proteinu p53 (Gu and Roeder 1997; Gu *et al.* 1997).

Modelovým histonacetyltransferázovým komplexem je kvasinkový SAGA komplex, složený z nejméně dvaceti podjednotek. Tento komplex vykazuje modulární strukturu, přičemž modul „HAT/Core“ je zodpovědný za acetylaci, modul „DUB“ se účastní deubiquitylace, dále jsou přítomny moduly „SA_SPT“ a „SA_TAF“ (Lee *et al.* 2011). Další histonacetyltransferázou v *Saccharomyces cerevisiae* je například výrazně menší ADA komplex, u něhož není zcela jasné, zda tvoří *bona fide* HAT komplex, nebo jde jen o částečně aktivní subkomplex (Eberharter *et al.* 1999; Grant *et al.* 1999). U člověka je dobře prozkoumána například histonacetyltransferáza p300, působící jako transkripční koaktivátor. Histonacetyltransferázy jsou obecně velmi konzervovány v rámci eukaryot a jejich zdánlivá částečná redundance odráží komplexitu jejich funkcí a velký transkripčně regulační potenciál.

1.1.3 Akutní lymfoblastická leukemie

Akutní lymfoblastická leukemie (ALL) je zhoubné onemocnění charakterizované množением nezralých lymfoidních buněk, lymfoblastů, které se nekontrolovatelně dělí a prostupují prakticky všechny tkáně a orgány. V důsledku toho je potlačena normální krvetvorba, pacienti trpí anémií, únavou, opakovanými infekcemi či častým krvácením. Okamžitá léčba kombinací chemoterapeutik je nutností.

ALL se nejčastěji vyskytuje u dětí mezi 2. a 5. rokem a u dospělých po 50. roku života. Naštěstí se dnes již podaří až 85% dětských pacientů vyléčit (Starý 2010).

ALL představuje heterogenní onemocnění a je klasifikována podle několika kritérií dle morfologie lymfoblastů (tzv. FAB schéma), imunofenotypu (B- a T-lymfoblastické leukemie) nebo karyotypových změn, které bývají často přítomny. Mohou se vyskytovat fúzní geny, jako například *TEL-AML1*, *BCR-ABL1* nebo *MLL/AF4*. Je známo, že některých chromozomálních přestaveb se účastní rovněž *HOX* geny, evolučně velmi konzervované transkripční faktory, hrající významnou úlohu při určení předo-zadní osy během vývoje jedince.

1.2 Hypotézy a cíle práce

Tato disertační práce je členěna do tří částí, z nichž část první se zabývá studiem IL-1 α v savčích buňkách, ve druhé části je IL-1 α studován s využitím heterologního modelu *Saccharomyces cerevisiae* a třetí část pojednává o analýze exprese *HOX* genů u vybraných genotypově a fenotypově definovaných podskupin dětské akutní lymfoblastické leukemie.

1.2.1 Část I - studium jaderné funkce IL-1 α v savčích buňkách

V této části disertační práce jsem se zaměřila na studium jaderné funkce IL-1 α s využitím přirozeného modelu savčích buněk. Protože naše pilotní pokusy naznačily možnou jadernou interakci prekursoru IL-1 α a tumorsupresorového proteinu p53, zamýšlela jsem pomocí fluorescenční mikroskopie a imunoprecipitace tuto interakci potvrdit. Také jsem se pokusila o ovlivnění subcelulární lokalizace N-terminálního peptidu IL-1 α , který v savčích buňkách vykazuje nejednotnou lokalizaci s rozdílnou distribucí mezi jádrem a cytoplasmou.

1.2.2 Část II - studium jaderné funkce IL-1 α v heterologním kvasinkovém modelu

Zde bylo mým záměrem studovat jadernou funkci IL-1 α v heterologním kvasinkovém modelu a zaměřit se na interakci IL-1 α s enzymatickými komplexy histonacetyltransferáz. Předchozí výzkum prokázal, že lidský IL-1 α produkovaný v kvasinkách tvoří součást HAT komplexu SAGA, avšak nevykazuje genetickou interakci s ADA HAT komplexem (Buryskova et al. 2004). S využitím sady kvasinkových kmenů nesoucích disrupce genů kódujících vybrané podjednotky histonacetyltransferázových komplexů SAGA a ADA jsem zamýšlela přesněji specifikovat místo vazby IL-1 α v rámci SAGA komplexu a objasnit mechanismus této pozoruhodné interakce.

1.2.3 Část III - studium role *HOX* genů u dětské akutní lymfoblastické leukemie

V rámci projektu zabývajícího se úlohou *HOX* genů u dětské akutní lymfoblastické leukemie jsem se zaměřila na analýzu exprese vybraných *HOX* genů u jednotlivých genotypově a fenotypově definovaných podskupin dětské ALL pomocí kvantitativní PCR v reálném čase. Zajímalo mě, zda existuje souvislost určitého vzorce exprese *HOX* genů a prognózy pacientů s ALL. Porovnáním výsledků této analýzy s úrovní

transkripce *HOX* genů v buněčných subpopulacích normálních lymfoidních progenitorů jsem zamýšlela zjistit, zda exprese *HOX* genů ve vybraných podskupinách ALL odráží vývojové stádium leukemických buněk, nebo zda ke změnám v expresi *HOX* genů dochází během leukemogeneze.

1.3 Materiál a metodika

Pro studium jaderné funkce IL-1 α jsem využívala savčí buňky, konkrétně myší embryonální fibroblasty NIH 3T3, netransformované buňky Mrc-5, buňky osteosarkomu Saos-2, buňky lidského melanomu A375 a rovněž buňky H1299-R273H, produkující mutovaný protein p53 se sníženou schopností vazby na DNA. Také jsem však využívala heterologní expresi IL-1 α v buňkách *Saccharomyces cerevisiae* kmene W303-1A a BY4741 za účelem zjednodušení experimentální práce a možnosti přípravy geneticky definovaných mutantních kmenů.

V této práci jsem využívala zejména tyto metody:

Produkce fluorescenčních variant IL-1 α

- konstrukce rekombinantních plasmidů s využitím standardních klonovacích technik
- transformace kvasinkových kmenů pomocí LiAc nebo transientní transfekce savčích buněk
- fluorescenční mikroskopie kvasinkových i savčích buněk

Koimunoprecipitace

- izolace proteinových komplexů ze savčích i kvasinkových buněčných lyzátů za pomoci specifické protilátky a protein G agarózy
- analýza navázaných proteinů metodou western blotting

Disrupce vybraných genů v buňkách *S. cerevisiae*

- delece genů za použití *kanMX* disrupční kazety (Gueldener *et al.* 1996)
- selekce pozitivních kmenů pomocí antibiotika G418
- ověření pomocí PCR a western blottingu

Kvantitativní PCR v reálném čase (qRT-PCR)

- optimalizace systémů pro amplifikaci vybraných *HOX* genů
- analýza exprese vybraných *HOX* genů u genotypově a fenotypově definovaných podskupin dětských pacientů s akutní lymfoblastickou leukémií
- porovnání exprese *HOX* genů v leukemických buňkách a u fyziologických buněk odpovídajícího stádia diferenciací

Ostatní molekulárně-biologické metody

- izolace DNA, RNA a proteinů
- elektroforéza DNA, RNA a proteinů
- western blotting, chemiluminiscenční detekce, barvení polyakrylamidových gelů stříbrem
- PCR, restriční štěpení, ligace a další

1.4 Výsledky a diskuse

1.4.1 Část I - studium jaderné funkce IL-1 α v savčích buňkách

Při zkoumání transientně produkovaných fluorescenčních variant prekursoru IL-1 α a tumorsupresorového proteinu p53 v buňkách NIH 3T3 pomocí fluorescenční mikroskopie jsem pozorovala kolokalizaci IL-1 α a p53 v buněčném jádře. To naznačuje, že oba proteiny mohou být přítomné v jednom molekulárním komplexu. Pokusila jsem se tedy tuto interakci ověřit pomocí koimunoprecipitace IL-1 α a endogenního proteinu p53. Experiment jsem provedla v buňkách linie A375 a pro dosažení vyšší úrovně exprese endogenního p53 jsem využila indukci a stabilizaci p53 pomocí roscovitinu. Paralelně jsem pracovala s buňkami linie H1299-R273H, produkující mutovaný protein p53 s podstatně sníženou vazbou na chromatin (Cho *et al.* 1994). Zatímco v buňkách A375 jsem potvrdila koprecipitaci IL-1 α a p53, v buňkách H1299-R273H jsem tuto interakci nepozorovala. Vzhledem k tomu, že p53 i IL-1 α jsou schopny asociace s chromatinem (Cohen *et al.* 2010), může být důvodem tohoto výsledku právě snížená schopnost vazby mutovaného p53 na chromatin v těchto buňkách. Jiným možným proteinovým partnerem propojujícím IL-1 α s p53 může být například histonacetyltransferáza p300, které rovněž může s oběma proteiny interagovat (Lill *et al.* 1997; Dornan *et al.* 2003; Buryskova *et al.* 2004). Možnost, že by docházelo k přímé fyzické asociaci obou proteinů, není podle mého názoru příliš pravděpodobná.

Během pozorování N-terminálního peptidu IL-1 α označeného EGFP v buňkách Mrc-5 jsem zaznamenala jeho nejednotnou subcelulární lokalizaci s rozdílnou distribucí mezi jádrem a cytoplasmou. Bylo patrné, že u vzorků s vyšší koncentrací buněk dochází častěji k jaderné lokalizaci IL-1 α NTP, zatímco u vzorků s nižší densitou buněčné kultury je tento protein s vyšší frekvencí lokalizován současně v jádře a cytoplasmě. Pokusila jsem se tedy o ovlivnění subcelulární lokalizace IL-1 α NTP pomocí rozdílné konfluency buněk (cca 50% a cca 100%) a pozorovala jsem, že výhradně jaderná lokalizace IL-1 α NTP souvisí s vyšší buněčnou densitou. Tento výsledek se poněkud liší od výsledku Luheshi *et al.*, popisujících inhibici jaderné lokalizace prekursoru IL-1 α v mikroglialních buňkách za vyšší konfluency (Luheshi *et al.* 2009). Dále jsem pozorovala, že efektu četnější výhradně jaderné lokalizace IL-1 α NTP může být dosaženo kultivací buněk Mrc-5 v kondicionovaném médiu či v médiu s přísadkou 15 ng/ml rekombinantního IL-1 α . U buněk Mrc-5 bylo již dříve prokázáno, že extracelulární IL-1 α spouští syntézu interleukinu-6 (Economides *et al.* 2003); mají tedy na svém povrchu receptor pro IL-1 a tudíž je možné, že IL-1 α v médiu spouští dráhu signální transdukce, vedoucí k transkripci cílových genů. Hledáním konkrétních změn v expresi genů jsem se však již v rámci tohoto projektu nezabývala.

1.4.2 Část II- studium jaderné funkce IL-1 α v heterologním kvasinkovém modelu

Již dříve jsme v naší laboratoři prokázali, že IL-1 α lze studovat v heterologním kvasinovém modelu a potvrdili jsme, že IL-1 α NTP je schopen interakce s kvasinkovým HAT komplexem SAGA (Buryskova *et al.* 2004). Nebylo však jasné, proč k této interakci dochází a kam konkrétně se v rámci SAGA komplexu IL-1 α váže. Při nadprodukcí prekursoru IL-1 α v kvasinkách jsem pozorovala možný toxický efekt, projevující se eliminací rekombinantních plasmidů nesoucích funkční gen pro prekursor IL-1 α . Dle mého názoru může být důvodem interference IL-1 α s transkripčním systémem a deregulace exprese některých genů. Následně jsem ověřila subcelulární lokalizaci prekursoru IL-1 α i maturovaného proteinu v kvasinkových buňkách a zjistila, že zatímco prekursor IL-1 α se nachází v jádře kvasinkových buněk, maturovaný IL-1 α vykazuje cytoplasmatickou lokalizaci. Subcelulární lokalizace je tedy analogická jako v savčích buňkách a odpovídá přítomnosti jaderného lokalizačního signálu v prekursoru IL-1 α . Mechanismy jaderného transportu jsou v rámci eukaryot obecně velmi konzervované (Malik *et al.* 1997; Quan *et al.* 2008), což mi umožnilo studovat jadernou funkci prozánětlivého cytokinu IL-1 α v tomto kvasinkovém modelu.

Pomocí koimunoprecipitace z kvasinkových kmenů s vybranými podjednotkami SAGA a ADA komplexu TAP tagem jsem potvrdila, že prekursor IL-1 α se na rozdíl od maturovaného IL-1 α váže na kvasinkové HAT komplexy a mezi proteiny zde přítomné patří Gcn5, Spt7, Spt8, Ada1, Ada2, Ada3 a překvapivě také Ahc1. Tato podjednotka je charakteristická pro HAT komplex ADA, o kterém jsme se domnívali, že s IL-1 α neinteraguje (Buryskova *et al.* 2004). Pro důkladnější objasnění asociace IL-1 α s kvasinkovými HAT komplexy jsem využila relativní snadnosti přípravy delečních mutantních kvasinkových kmenů a provedla cílené disrupce genů kódujících jednotlivé podjednotky SAGA. Takto jsem v jednotlivých kvasinkových kmenech provedla delecí genů kódujících Gcn5, katalytickou podjednotku SAGA, Spt7 jakožto podjednotku zajišťující integritu SAGA komplexu, Ahc1, protein klíčový pro integritu ADA HAT a rovněž jsem využila kmeny s delecí Ahc2, nově objevené podjednotky ADA komplexu. Výsledky koimunoprecipitací IL-1 α s proteiny HAT komplexů kvasinek naznačují, že IL-1 α se váže k „HAT/Core“ modulu SAGA komplexu. Také jsme navrhli nový model skládání SAGA komplexu, ve kterém protein Ahc1 usnadňuje vazbu Spt7 k částečně aktivnímu ADA komplexu za vzniku plně funkčního SAGA komplexu. Nakonec jsme prokázali, že interakce IL-1 α s kvasinkovými HAT komplexy pravděpodobně probíhá na základě podobnosti struktury IL-1 α NTP s C-terminální částí katalytické podjednotky AMP-aktivované proteinkinázy Snf1, která byla nalezena v oblasti stejného promotoru jako SAGA (Liu *et al.* 2005; Liu *et al.* 2010). Tyto výsledky byly v loňském roce publikovány (Zamostna *et al.* 2012).

1.4.3 Část III - studium role *HOX* genů u dětské akutní lymfoblastické leukemie

V souvislosti s již dříve prokázanou rolí exprese *HOX* genů u různých typů leukemií (Bach *et al.* 2010) byla v roce 2002 publikována studie, popisující korelaci určitého vzorce exprese *HOX* genů s prognózou pacientů s akutní myeloidní leukemií (Drabkin *et al.* 2002). Díky spolupráci s prof. Drabkinem jsme převzali vybrané systémy pro analýzu exprese *HOX* genů metodou qRT-PCR a provedli analogickou analýzu u pediatrických pacientů s ALL. Po nezbytné optimalizaci jsem provedla kvantifikaci transkripce 23 *HOX* genů u 61 pacientů rozdělených do imunofenotypově a genotypově definovaných podskupin (BCR/ABL, hyperdiploidní ALL, TEL/AML1, MLL/AF4, T-ALL a skupiny PGR a PPR rozdělené dle odpovědávosti na indukční léčbu prednisonem) a také v 19 vzorcích sortovaných buněčných populací B a T buněk od zdravých dárců v různém stádiu zralosti. Výsledky ukázaly, že zejména skupiny T-ALL a MLL/AF4 vykazují nápadně vysoké hladiny exprese *HOX* genů zejména z clusteru A. Naopak u BCR/ABL-pozitivních pacientů je transkripce *HOX* genů velice nízká. Nepodařilo se ovšem souvislost určitého vzorce exprese *HOX* genů s prognózou. Porovnáním exprese *HOX* genů u leukemických buněk s jejich zdravými protějšky lze konstatovat, že úroveň transkripce *HOX* genů neodpovídá stádiu zralosti leukemických buněk, ale že k aberantní expresi *HOX* genů dochází pravděpodobně v důsledku maligní transformace. Rovněž tyto výsledky byly nedávno publikovány (Starkova *et al.* 2010).

1.5 Závěry

- subcelulární lokalizace prekursoru IL-1 α a maturovaného IL-1 α je analogická v savčích i kvasinkových buňkách a odpovídá přítomnosti nebo absenci jaderného lokalizačního signálu u obou forem IL-1 α
- subcelulární lokalizace IL-1 α NTP v savčích buňkách může být ovlivněna konfluencí buněčné kultury, kondicionovaným médiem nebo přítomností rekombinantního IL-1 α v kultivačním médiu
- v kvasinových buňkách funkční gen pro prekursor IL-1 α negativně ovlivňuje stabilitu rekombinantních plasmidů nesoucích tento gen a produkce IL-1 α v kvasinkových buňkách má toxický efekt
- prekursor IL-1 α se váže na kvasinkové HAT komplexy; mezi podjednotky tohoto komplexu patří Gcn5, Spt7, Spt8, Ada1, Ada2, Ada3 a překvapivě také Ahc1. Maturovaný IL-1 α neváže žádný z těchto proteinů
- vazba prekursoru IL-1 α na kvasinkové HAT komplexy je lokalizována do oblastí části „HAT/Core“ modulu tvořeného proteiny Ada2, Ada3, Sgf29 a možná též dalšími proteiny. Interakce IL-1 α s kvasinkovými HAT komplexy pravděpodobně probíhá na základě podobnosti struktury IL-1 α NTP s C-terminální částí katalytické podjednotky AMP-aktivované proteinkinázy Snf1

- byl navržen nový model skládání SAGA komplexu , ve kterém ADA představuje intermediární subkomplex a Ahc1 usnadňuje vazbu Spt7 k tomuto subkomplexu
- prekursor IL-1 α a tumorsupresorový protein p53 vykazují podobnou distribuci v buněčném jádře, mohou tvořit část stejného jaderného molekulárního komplexu a tato interakce byla potvrzena metodou koimunoprecipitace
- aberantní exprese *HOX* genů v leukemických buňkách pediatrických pacientů s ALL rozdělených do genotypově a imunofenotypově definovaných podskupin (BCR/ABL, hyperdiploidní ALL, TEL/AML1, MLL/AF4 a T-ALL) v porovnání s expresí *HOX* genů u jejich zdravých buněčných protějšků pravděpodobně odráží změny exprese *HOX* genů v důsledku maligní transformace

2 Anglická část

2.1 Introduction

2.1.1 Interleukin-1 α

Interleukin-1 α (IL-1 α) is a proinflammatory cytokine and one of the key molecules of the immune system, orchestrating the host defence reactions to infection, inflammation, injury or stress. However, its activities are not restricted only to the immune system, IL-1 α is also involved in the regulation of normal growth and morphogenesis of various cell types.

Within the organism, IL-1 α is present in two forms, interleukin-1 α and β . Both are synthesized as 31-kDa precursors, cleaved by specific proteases to 17-kDa mature proteins. Only the IL-1 α precursor is biologically active and able to bind membrane receptors (Mosley *et al.* 1987), although the cleaved form is ~50x more active (Zheng *et al.* 2013). The nucleotide sequences of IL-1 α and β share a similarity of 45%, the similarity between the amino acid sequences is roughly 26 %. However, both IL-1 forms differ dramatically in their physiological functions. IL-1 β is not produced unless the cell receives an inflammatory signal while IL-1 α is synthesized constitutively in many cell types. IL-1 β acts exclusively as a secreted molecule, IL-1 α acts intracellularly and its secretion has been a matter of discussion. Only IL-1 α exists in its membrane form, associated with anti-tumour immunity (Apte *et al.* 2006).

The major IL-1 α -producing cells are macrophages, but many other cells, including neutrophils, keratinocytes, epithelial or endothelial cells, have been shown to synthesise IL-1 α . Transcription of IL-1 α is stimulated during inflammation and infection and bacterial endotoxin is one of the IL-1 α -inducing agents. The precursor of IL-1 α is proteolytically cleaved by calpain into C-terminal mature IL-1 α and the so-called N-terminal peptide of IL-1 α (IL-1 α NTP; 16 kDa) (Kobayashi *et al.* 1990). This peptide is highly conserved among higher organisms so it most probably doesn't represent only a byproduct of IL-1 α maturation (Buryskova *et al.* 2004).

Being a proinflammatory cytokine, IL-1 α acts on target cells via membrane receptors and triggers the signal transduction pathway leading to NF- κ B and AP-1. However, IL-1 α NTP contains a nuclear localization signal that allows the precursor as well as IL-1 α NTP to enter the cell nucleus (Wessendorf *et al.* 1993). Due to this duality of functions, IL-1 α has been termed a „dual-function cytokine“ (Carriere *et al.* 2007) and shares this property with HMGB-1, IL-16, IL-33 and IL-37 (Berman *et al.* 1985; Wang *et al.* 1999; Wilson *et al.* 2002; Agresti and Bianchi 2003; Gadina and Jefferies 2007; Sharma *et al.* 2008; Boraschi *et al.* 2011; Smith 2011).

Various biological functions have been attributed to the nuclearly localized IL-1 α , including the regulation of cell motility (McMahon *et al.* 1997) or interaction with the growth suppressor necdin (Hu *et al.* 2003). The N-terminal peptide of IL-1 α contributes to the mesangial cell transformation (Stevenson *et al.* 1997) or to induction of apoptosis in tumour cells (Pollock *et al.* 2003). In our laboratory, we have previously shown that IL-1 α NTP interacts with histone acetyltransferase complexes both in mammalian cells and in the heterologous yeast model (Buryškova *et al.* 2004).

2.1.2 Histone acetyltransferases

In the nucleus of the eukaryotic cell, DNA is highly compacted and organised into the chromatin fiber, being associated with both histone and non-histone proteins. In this compact, tightly coiled form, DNA is inaccessible to the transcription machinery. Histone acetyltransferases (HAT) are enzymatic complexes, catalyzing the acetylation of the amino-terminal histone tails and making thus the chromatin fiber accessible to the transcription apparatus. Gcn5 was the first histone acetyltransferase isolated from *Tetrahymena* (Brownell and Allis 1995; Brownell *et al.* 1996) and until today, many HATs of distinct specificities have been identified. Histone acetyltransferases often form multimeric complexes in higher organisms and the activity of the catalytic subunit depends considerably on the context of the other subunits in the complex. Certain histone acetyltransferase complexes acetylate not only histones, but also other, non-histone substrates, such as the tumor suppressor protein p53 (Gu and Roeder 1997; Gu *et al.* 1997).

Yeast SAGA represents an archetype of the histone acetyltransferase complexes and is composed from at least 20 subunits. This complex exhibits a modular structure, with the „HAT/Core“ module is responsible for acetylation, the „DUB“ module is involved in deubiquitination and the „SA_SPT“ and „SA_TAF“ modules are also present (Lee *et al.* 2011). Another HAT complex in *Saccharomyces cerevisiae* is the ADA complex, regarded both as a *bona fide* HAT complex and only a partially active subcomplex (Eberharther *et al.* 1999; Grant *et al.* 1999). Human p300 HAT has been studied extensively, that acts as a transcriptional coactivator. Histone acetyltransferases are generally highly conserved among eukaryotes and seem to have redundant and overlapping functions, but this probably only reflects the complexity and combinatorial potential of the involvement of these enzymatic complexes in mammalian transcription control.

2.1.3 Acute lymphoblastic leukaemia

Acute lymphoblastic leukaemia (ALL) is a malignant neoplasm characterised by excess of immature lymphoid cells, lymphoblasts, that proliferate uncontrollably and can infiltrate virtually any organ and tissue in the body. Consequently, normal haematopoiesis is suppressed and patients experience anaemia, fatigue, frequent and repeated infections, increased or unexpected bleeding. Generally, a multi-drug treatment regimen is required immediately.

Most commonly, ALL affects children aged 2-5 years and another peak of incidence is observed after 50 years of age. Fortunately, the rate of success in the treatment of paediatric ALL has reached 85 % (Starý 2010).

ALL is a heterogeneous disease and can be classified into subtypes according to the cell morphology (FAB classification), immunophenotype (B- and T-cell leukaemias) or to the cytogenetic alterations. Fusion genes such as *TEL-AML1*, *BCR-ABL1* or *MLL/AF4* are commonly found in ALL. Certain chromosomal translocations also involve *HOX* genes, evolutionary highly conserved transcription factors, essential for the correct morphogenesis of the anteroposterior axis in the developing embryo.

2.2 Aims of the work

This PhD thesis is subdivided into three parts; in the first part, IL-1 α was studied in its natural milieu of mammalian cells, in the second part, I was using the heterologous expression of IL-1 α in the yeast model and the third part describes the analysis of *HOX* gene expression in genotypically and immunophenotypically defined subgroups of paediatric acute lymphoblastic leukaemia.

2.2.1 Part I - study of the IL-1 α nuclear function in mammalian cells

In this part of my thesis, I focused on the study of the nuclear interaction of IL-1 α with the tumour suppressor p53, that was shown by our pilot experiments. I intended to confirm this interaction by fluorescence microscopy and co-immunoprecipitation techniques. I also investigated the modulation of the subcellular localization of IL-1 α NTP in mammalian cells since IL-1 α NTP appeared to be distributed unevenly among the nucleus and cytoplasm in mammalian cells.

2.2.2 Part II - study of the IL-1 α nuclear function in the heterologous yeast model

Here I intended to study the IL-1 α nuclear function in *Saccharomyces cerevisiae* and to focus on the interaction of IL-1 α with yeast histone acetyltransferase complexes. Our previous research showed that human IL-1 α produced in the yeast cells integrates to the SAGA HAT complex, but does not interact with the ADA complex (Buryskova *et al.* 2004). Using a set of yeast strains harbouring various TAP-tagged SAGA and ADA subunits, I intended to specify the site of IL-1 α binding and elucidate the mechanism of this interaction.

2.2.3 Part III - study of the role of HOX genes in paediatric acute lymphoblastic leukaemia

In this part of my thesis I focused on the analysis of *HOX* gene expression in genotypically and immunophenotypically defined subgroups of paediatric ALL by qRT-PCR. I was interested in finding whether a specific *HOX* gene expression pattern can be associated with the specific subgroup or can be predictive of prognosis of the patients. I also intended to determine the expression of selected *HOX* genes in sorted cell populations of B and T lymphocytes from healthy donors and to compare the results with the data obtained from leukaemic patients.

2.3 Overview of used methods

To study the nuclear function of IL-1 α , I was using various mammalian cell lines, i.e. murine embryonal fibroblasts NIH 3T3, non-transformed cells Mrc-5, human osteosarcoma cells Saos-2, human melanoma cells A375 as well as the H1299-R273H cell line, harbouring mutated p53 with decreased DNA binding. I was also using heterologous IL-1 α expression in *Saccharomyces cerevisiae* strains W303-1A and BY4741.

I was using mainly these methods during my experimental work:

Production of fluorescent IL-1 α variants

- construction of recombinant plasmids using standard cloning techniques
- yeast transformation using the LiAc method or transient transfection of mammalian cells
- fluorescent microscopy of yeast and mammalian cells

Co-immunoprecipitation

- isolation of protein complexes from yeast and mammalian cell lysates using a specific antibody and protein G agarose
- analysis of bound proteins by western blotting

Disruption of selected genes in *S. cerevisiae* cells

- gene deletion using the *kanMX* disruption cassette (Gueldener *et al.* 1996)
- selection of positive strains using the antibiotic G418
- control by PCR and western blotting

Quantitative real-time PCR (qRT-PCR)

- optimizing of the systems for the expression analysis of selected *HOX* genes
- expression analysis of selected *HOX* genes in genotypically and immunophenotypically defined subgroups of paediatric ALL patients
- comparison of *HOX* gene expression in leukaemic cells with their physiological counterparts of the same maturation stage

Other molecular biology methods

- DNA, RNA and protein isolation

- DNA, RNA and protein electrophoresis
- western blotting, chemiluminescence detection, silver staining of polyacrylamide gels
- PCR, restriction cleavage, ligation and others

2.4 Results and Discussion

2.4.1 Part I - study of the IL-1 α nuclear function in mammalian cells

During the fluorescence microscopy experiments involving the fluorescent IL-1 α precursor and tumor suppressor protein p53 variants, I observed the co-localization of these molecules in the cell nucleus. This suggests that both proteins can be present within the same molecular complex. Therefore I intended to confirm this interaction by co-immunoprecipitation of IL-1 α and endogenous p53, induced by roscovitine in the A375 melanoma cells. I was also using the H1299-R273H cells that harbour mutated p53 with decreased sequence-specific binding to target DNA. While co-immunoprecipitation from A375 cells revealed the interaction of p53 and IL-1 α , I did not observe this effect in the H1299-R273H cells. Given that both p53 and IL-1 α can associate with the chromatin fiber (Cohen *et al.* 2010), the unsuccessful co-precipitation of these molecules from these cells could be the consequence of the p53 mutation, preventing it from binding to chromatin. Another possibility could represent the histonacetyltransferase p300 that can interact with both proteins as well (Lill *et al.* 1997; Dornan *et al.* 2003; Buryskova *et al.* 2004) and could tether them to one protein complex. In my opinion, the direct association of these molecules is very unlikely.

When observed under the fluorescence microscope, the IL-1 α NTP/EGFP fusion protein exhibited uneven distribution among the nucleus and cytoplasm in Mrc-5 cells. Obviously, in samples with higher cell densities, the exclusively nuclear IL-1 α NTP localization was more frequent when compared to cells of lower confluency. Therefore I intended to modulate the IL-1 α NTP subcellular localization by a different cell confluency (~50% and ~100%) and confirmed that the exclusively nuclear localization of IL-1 α NTP is associated with higher cell densities. Interestingly, Luheshi *et al.* previously described the inhibition of the IL-1 α precursor nuclear localization in microglial cells cultivated at higher densities (Luheshi *et al.* 2009). I also observed that the frequency of the exclusively nuclear localization of IL-1 α NTP increases with the use of conditioned medium or by treatment of the Mrc-5 cells with recombinant IL-1 α (5 ng/ml). Mrc-5 cells have been previously shown to synthesize IL-6 following IL-1 treatment (Economides *et al.* 2003); therefore they express the IL-1 receptor and possibly use the signal transduction pathway triggered by this receptor. However, I did not focus on studying the changes in the gene expression changes during this project.

2.4.2 Part II - study of the IL-1 α nuclear function in the heterologous yeast model

In our laboratory, we have previously proved that yeast can serve as a model for the study of the IL-1 α function and have shown that IL-1 α NTP interacts with the yeast SAGA HAT complex (Buryskova *et al.* 2004). However, the mechanism and the site of this interaction was not known. I observed a toxic effect of the IL-1 α overexpression in the yeast cells, manifested by the elimination of recombinant plasmids bearing a functional gene encoding IL-1 α . In my opinion, this could be a result of the interference of IL-1 α with the yeast transcriptional machinery and dysregulation of certain genes. Having studied the subcellular localization of the IL-1 α precursor and mature IL-1 α , I found that the precursor was localized in the cell nucleus while mature IL-1 α remained in the cytoplasm. The subcellular localization is therefore analogous to the mammalian cells and corresponds to the presence or absence of the nuclear localization sequence within the IL-1 α precursor N-terminal domain. The mechanisms of the nuclear transport are generally highly conserved among eukaryotes (Malik *et al.* 1997; Quan *et al.* 2008) and this enabled me to study the nuclear function of the IL-1 α precursor in the heterologous yeast model.

Using co-immunoprecipitation from the yeast cells with TAP-tagged SAGA and ADA subunits, I verified the association of the IL-1 α precursor with yeast HAT complexes. Contrarily, mature IL-1 α did not co-precipitate with any of the HAT subunits. The protein complex(es) binding the IL-1 α precursor in yeast comprise Gcn5, Spt7, Spt8, Ada1, Ada2, Ada3 and surprisingly also Ahc1 that was not supposed to interact with IL-1 α (Buryskova *et al.* 2004). To further elucidate the mechanism of the association of IL-1 α with the yeast HAT complexes, I took advantage of the relative ease of creation of deletional mutants in yeast and performed disruptions of genes encoding Gcn5, the catalytic subunit of SAGA, Spt7 as a subunit required for the SAGA complex integrity, Ahc1, important for ADA HAT integrity and I also used strains with the deletion of Ahc2, a recently discovered ADA subunit. Results of my co-immunoprecipitation experiments from yeast suggest that IL-1 α binds to the „HAT/Core“ module of the SAGA complex. We also suggested a novel model of the SAGA complex assembly in which ADA represents an intermediate subcomplex and Ahc1 facilitates the binding of Spt7 to this partly functional HAT complex. Furthermore, we proved that the interaction of IL-1 α with yeast HAT complexes is most probably a consequence of the structural similarity of IL-1 α NTP with the C-terminal part of the Snf1 catalytic domain, that has been found to be associated with the same promotor region as SAGA (Liu *et al.* 2005; Liu *et al.* 2010) These results were published last year (Zamostna *et al.* 2012).

2.4.3 Part III - study of the role of HOX genes in paediatric acute lymphoblastic leukaemia

The role of many *HOX* genes in various types of leukaemia has been postulated (Bach *et al.* 2010) and in 2002, a study correlating the specific *HOX* gene expression patterns with prognosis of patients with acute myeloid leukaemia has been published (Drabkin *et al.* 2002). In cooperation with Prof. Drabkin we used the same *HOX* gene primer systems to analyze the *HOX* gene expression patterns in patients with ALL by qRT-PCR. Having optimized the qRT-PCR conditions, I analyzed the transcription of 23 *HOX* genes in 61 paediatric ALL patients classified according to the genotype and immunophenotype (BCR/ABL, hyperdiploid ALL, TEL/AML1, MLL/AF4, T-ALL and

PGR vs. PPR according to the prednisone response) as well as in 19 sorted cell populations of B and T cells of various maturation stages. The results indicated that especially the T-ALL and MLL/AF4 patients showed high expression levels especially of the *HOXA* cluster genes. Conversely, *HOX* gene expression in the BCR/ABL-positive patients was very low. We did not prove the correlation of a specific *HOX* gene expression pattern with prognosis in ALL patients. Aberrant *HOX* gene expression patterns identified in the leukaemic cells of paediatric ALL patients compared to the *HOX* expression in their closest physiological counterparts suggest the establishment of a novel *HOX* expression pattern subsequent to malignant transformation. These results were published (Starkova *et al.* 2010).

2.5 Conclusions

- the subcellular distribution of the IL-1 α proteins has been studied both in yeast and mammalian cells and is analogous in both eukaryotic cell models
- the subcellular localisation of IL-1 α NTP/EGFP in human cells can be modulated by the cell culture density, use of the conditioned medium or addition of recombinant IL-1 α into the growth medium
- when introduced to the yeast cells, human IL-1 α precursor gene affects the stability of the recombinant plasmid bearing this gene; IL-1 α overexpression possibly has a toxic effect on yeast cells
- the IL-1 α precursor physically associates with yeast histone acetyltransferase complexes; the protein complex(es) binding the IL-1 α precursor in yeast comprise Gcn5, Spt7, Spt8, Ada1, Ada2, Ada3 and surprisingly also Ahc1 protein while none of these HAT subunits binds mature IL-1 α
- part of the HAT/Core module, composed of Ada2, Ada3, Sgf29 and perhaps some other proteins, is the site of the IL-1 α precursor binding to the yeast SAGA complex. The binding of the IL-1 α precursor to yeast HAT complexes can be explained by the structural similarity of IL-1 α NTP with the C-terminal regulatory domain of yeast Snf1
- a novel model of the SAGA complex assembly has been suggested in which ADA represents an intermediate subcomplex and Ahc1 facilitates the binding of Spt7 to this partly functional HAT complex
- the IL-1 α precursor and tumour suppressor p53 show similar distribution patterns, possibly co-localise within the same molecular complex in the nucleus and can be coimmunoprecipitated from mammalian cells
- aberrant *HOX* gene expression patterns identified in the leukaemic cells of paediatric patients subdivided into genotypically and immunophenotypically defined subgroups, i.e. ALL with *BCR/ABL*, *TEL/AML1* and *MLL/AF4* gene rearrangements, hyperdiploid ALL and ALL without a known gene rearrangement, compared to the *HOX* expression in their closest physiological counterparts suggest the establishment of a novel *HOX* expression pattern subsequent to malignant transformation

3 Použitá literatura / References

1. Agresti A, Bianchi ME: HMGB proteins and gene expression. *Curr Opin Genet Dev* **13**: 170-178, 2003.
2. Apte RN, Krelin Y, Song X, Dotan S, Recih E, Elkabets M, Carmi Y, Dvorkin T, White RM, Gayvoronsky L, Segal S, Voronov E: Effects of micro-environment- and malignant cell-derived interleukin-1 in carcinogenesis, tumour invasiveness and tumour-host interactions. *Eur J Cancer* **42**: 751-759, 2006.
3. Bach C, Buhl S, Mueller D, Garcia-Cuellar MP, Maethner E, Slany RK: Leukemogenic transformation by HOXA cluster genes. *Blood* **115**: 2910-2918, 2010.
4. Berman JS, Cruikshank WW, Center DM, Theodore AC, Beer DJ: Chemoattractant lymphokines specific for the helper/inducer T-lymphocyte subset. *Cell Immunol* **95**: 105-112, 1985.
5. Boraschi D, Lucchesi D, Hainzl S, Leitner M, Maier E, Mangelberger D, Oostingh GJ, Pfaller T, Pixner C, Posselt G, Italiani P, Nold MF, Nold-Petry CA, Bufler P, Dinarello CA: IL-37: a new anti-inflammatory cytokine of the IL-1 family. *Eur Cytokine Netw* **22**: 127-147, 2011.
6. Brownell JE, Allis CD: An activity gel assay detects a single, catalytically active histone acetyltransferase subunit in *Tetrahymena* macronuclei. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 6364-6368, 1995.
7. Brownell JE, Zhou J, Ranalli T, Kobayashi R, Edmondson DG, Roth SY, Allis CD: *Tetrahymena* histone acetyltransferase A: a homolog to yeast Gcn5p linking histone acetylation to gene activation. *Cell* **84**: 843-851, 1996.
8. Buryskova M, Pospisek M, Grothey A, Simmet T, Burysek L: Intracellular interleukin-1alpha functionally interacts with histone acetyltransferase complexes. *J Biol Chem* **279**: 4017-4026, 2004.
9. Carriere V, Roussel L, Ortega N, Lacorre DA, Americh L, Aguilar L, Bouche G, Girard JP: IL-33, the IL-1-like cytokine ligand for ST2 receptor, is a chromatin-associated nuclear factor in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 282-287, 2007.
10. Cohen I, Rider P, Carmi Y, Braiman A, Dotan S, White MR, Voronov E, Martin MU, Dinarello CA, Apte RN: Differential release of chromatin-bound IL-1alpha discriminates between necrotic and apoptotic cell death by the ability to induce sterile inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**: 2574-2579, 2010.
11. Dornan D, Shimizu H, Burch L, Smith AJ, Hupp TR: The proline repeat domain of p53 binds directly to the transcriptional coactivator p300 and allosterically controls DNA-dependent acetylation of p53. *Mol Cell Biol* **23**: 8846-8861, 2003.
12. Drabkin HA, Parsy C, Ferguson K, Guilhot F, Lacotte L, Roy L, Zeng C, Baron A, Hunger SP, Varella-Garcia M, Gemmill R, Brizard F, Brizard A, Roche J: Quantitative HOX expression in chromosomally defined subsets of acute myelogenous leukemia. *Leukemia* **16**: 186-195, 2002.
13. Eberharter A, Sterner DE, Schieltz D, Hassan A, Yates JR, 3rd, Berger SL, Workman JL: The ADA complex is a distinct histone acetyltransferase complex in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **19**: 6621-6631, 1999.
14. Economides AN, Carpenter LR, Rudge JS, Wong V, Koehler-Stec EM, Hartnett C, Pyles EA, Xu X, Daly TJ, Young MR, Fandl JP, Lee F, Carver S, McNay J, Bailey K, Ramakanth S, Hutabarat R, Huang TT, Radziejewski C, Yancopoulos GD, Stahl N: Cytokine traps: multi-component, high-affinity blockers of cytokine action. *Nat Med* **9**: 47-52, 2003.
15. Gadina M, Jefferies CA: IL-33: a sheep in wolf's clothing? *Sci STKE* **2007**: pe31, 2007.
16. Grant PA, Eberharter A, John S, Cook RG, Turner BM, Workman JL: Expanded lysine acetylation specificity of Gcn5 in native complexes. *J Biol Chem* **274**: 5895-5900, 1999.
17. Gu W, Roeder RG: Activation of p53 sequence-specific DNA binding by acetylation of the p53 C-terminal domain. *Cell* **90**: 595-606, 1997.
18. Gu W, Shi XL, Roeder RG: Synergistic activation of transcription by CBP and p53. *Nature* **387**: 819-823, 1997.
19. Gueldener U, Heck S, Fielder T, Beinbauer J, Hegemann JH: A new efficient gene disruption cassette for repeated use in budding yeast. *Nucleic Acids Res* **24**: 2519-2524, 1996.

20. Hu B, Wang S, Zhang Y, Feghali CA, Dingman JR, Wright TM: A nuclear target for interleukin-1alpha: interaction with the growth suppressor necdin modulates proliferation and collagen expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 10008-10013, 2003.
21. Cho Y, Gorina S, Jeffrey PD, Pavletich NP: Crystal structure of a p53 tumor suppressor-DNA complex: understanding tumorigenic mutations. *Science* **265**: 346-355, 1994.
22. Kobayashi Y, Yamamoto K, Saido T, Kawasaki H, Oppenheim JJ, Matsushima K: Identification of calcium-activated neutral protease as a processing enzyme of human interleukin 1 alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**: 5548-5552, 1990.
23. Lee KK, Sardiou ME, Swanson SK, Gilmore JM, Torok M, Grant PA, Florens L, Workman JL, Washburn MP: Combinatorial depletion analysis to assemble the network architecture of the SAGA and ADA chromatin remodeling complexes. *Mol Syst Biol* **7**: 503, 2011.
24. Lill NL, Grossman SR, Ginsberg D, DeCaprio J, Livingston DM: Binding and modulation of p53 by p300/CBP coactivators. *Nature* **387**: 823-827, 1997.
25. Liu Y, Xu X, Kuo MH: Snf1p regulates Gcn5p transcriptional activity by antagonizing Spt3p. *Genetics* **184**: 91-105, 2010.
26. Liu Y, Xu X, Singh-Rodriguez S, Zhao Y, Kuo MH: Histone H3 Ser10 phosphorylation-independent function of Snf1 and Reg1 proteins rescues a gcn5- mutant in HIS3 expression. *Mol Cell Biol* **25**: 10566-10579, 2005.
27. Luheshi NM, McColl BW, Brough D: Nuclear retention of IL-1 alpha by necrotic cells: a mechanism to dampen sterile inflammation. *Eur J Immunol* **39**: 2973-2980, 2009.
28. Malik HS, Eickbush TH, Goldfarb DS: Evolutionary specialization of the nuclear targeting apparatus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 13738-13742, 1997.
29. McMahan GA, Garfinkel S, Prudovsky I, Hu X, Maciag T: Intracellular precursor interleukin (IL)-1alpha, but not mature IL-1alpha, is able to regulate human endothelial cell migration in vitro. *J Biol Chem* **272**: 28202-28205, 1997.
30. Mosley B, Urdal DL, Prickett KS, Larsen A, Cosman D, Conlon PJ, Gillis S, Dower SK: The interleukin-1 receptor binds the human interleukin-1 alpha precursor but not the interleukin-1 beta precursor. *J Biol Chem* **262**: 2941-2944, 1987.
31. Pollock AS, Turck J, Lovett DH: The prodomain of interleukin 1alpha interacts with elements of the RNA processing apparatus and induces apoptosis in malignant cells. *Faseb J* **17**: 203-213, 2003.
32. Quan Y, Ji ZL, Wang X, Tartakoff AM, Tao T: Evolutionary and transcriptional analysis of karyopherin beta superfamily proteins. *Mol Cell Proteomics* **7**: 1254-1269, 2008.
33. Sharma S, Kulk N, Nold MF, Graf R, Kim SH, Reinhardt D, Dinarello CA, Bufler P: The IL-1 family member 7b translocates to the nucleus and down-regulates proinflammatory cytokines. *J Immunol* **180**: 5477-5482, 2008.
34. Smith DE: The biological paths of IL-1 family members IL-18 and IL-33. *J Leukoc Biol* **89**: 383-392, 2011.
35. Starkova J, Zamostna B, Mejstrikova E, Krejci R, Drabkin HA, Trka J: HOX gene expression in phenotypic and genotypic subgroups and low HOXA gene expression as an adverse prognostic factor in pediatric ALL. *Pediatr Blood Cancer* **55**: 1072-1082, 2010.
36. Starý J: Akutní leukemie u dětí. *Onkologie* **4**: 120-124, 2010.
37. Stevenson FT, Turck J, Locksley RM, Lovett DH: The N-terminal propeptide of interleukin 1 alpha is a transforming nuclear oncoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 508-513, 1997.
38. Wang H, Bloom O, Zhang M, Vishnubhakat JM, Ombrellino M, Che J, Frazier A, Yang H, Ivanova S, Borovikova L, Manogue KR, Faist E, Abraham E, Andersson J, Andersson U, Molina PE, Abumrad NN, Sama A, Tracey KJ: HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice. *Science* **285**: 248-251, 1999.
39. Wessendorf JH, Garfinkel S, Zhan X, Brown S, Maciag T: Identification of a nuclear localization sequence within the structure of the human interleukin-1 alpha precursor. *J Biol Chem* **268**: 22100-22104, 1993.
40. Wilson KC, Cruikshank WW, Center DM, Zhang Y: Prointerleukin-16 contains a functional CcN motif that regulates nuclear localization. *Biochemistry* **41**: 14306-14312, 2002.

41. Zamostna B, Novak J, Vopalensky V, Masek T, Burysek L, Pospisek M: N-Terminal Domain of Nuclear IL-1alpha Shows Structural Similarity to the C-Terminal Domain of Snf1 and Binds to the HAT/Core Module of the SAGA Complex. *PLoS One* 7: e41801, 2012.
42. Zheng Y, Humphry M, Maguire JJ, Bennett MR, Clarke MC: Intracellular interleukin-1 receptor 2 binding prevents cleavage and activity of interleukin-1alpha, controlling necrosis-induced sterile inflammation. *Immunity* 38: 285-295, 2013.

4 Seznam publikací / List of publications

4.1 Publikace *in extenso*, které jsou podkladem disertace

Zamostna B, Novak J, Vopalensky V, Masek T, Burysek L, Pospisek M.: N-terminal domain of nuclear IL-1 α shows structural similarity to the C-terminal domain of Snf1 and binds to the HAT/Core module of the SAGA complex. *PLoS ONE* 2012;7(8):e41801

(IF₂₀₁₁: 4.092)

Starkova J*, **Zamostna B***, Mejistrikova E, Krejci R, Drabkin H, Trka J.: HOX Gene Expression in Phenotypic and Genotypic Subgroups and Low HOXA Gene Expression as an Adverse Prognostic Factor in Pediatric ALL. *Pediatric Blood & Cancer* 2010, 55(6):1072-82

*Oba autoři přispěli rovným dílem

(IF₂₀₁₀: 1.948)

Vicenová B, Vopálenský V, Burýšek L, Pospíšek M.: Emerging role of interleukin-1 in cardiovascular diseases. *Physiological Research* 2009, 58(4):481-498

(IF₂₀₀₉: 1.43)

Zámostná B, Vopálenský V, Burýšková M, Novák J, Burýšek L, Pospíšek M: Evidence of the nuclear interaction of the tumour suppressor p53 and the intracellular cytokine interleukin-1alpha. Manuscript.

4.2 Publikace in extenso bez vztahu k tématu disertace

Vopálenský V, Masek T, Horváth O, **Vicenová B**, Mokrejs M, Pospíšek M.: Firefly luciferase gene contains a cryptic promoter. RNA 2008 14(9):1720-1729

(IF₂₀₀₈: 5.018)

5 Curriculum vitae

Blanka Zámotná

born 03/01/1981 in Česká Lípa

Education

September 2005 - present: PhD student at the Faculty of Science, Charles University in Prague

Subject-area: Molecular and Cellular Biology, Genetics and Virology

Topic: Study of the nuclear function of IL-1 α

Supervisor: RNDr. Martin Pospíšek, Ph.D.

2000-2005: M.Sc. in Molecular Biology; Faculty of Science, Charles University in Prague

M.Sc. thesis: Po stopách interleukinu-1 α

Supervisor: RNDr. Martin Pospíšek, Ph.D.

Laboratory experience

05/2002 - present Laboratory of RNA Biochemistry
head: RNDr. Martin Pospíšek, Ph.D.

09/2004 - 02/2005: Laboratory at Institut für Naturheilkunde and klinische Pharmakologie, Universität Ulm
head: RNDr. Ladislav Burýšek, Ph.D.

2007: short study visit at the Department of Oncological and Experimental Pathology, Masaryk Memorial Cancer Institute, Brno
head: RNDr. Bořivoj Vojtěšek, DrSc.