

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Imunologie



Bc. Veronika Vilímková

Role HIF-2alfa v erythropoéze

Diplomová práce

Vedoucí závěrečné práce/školitel: Ing. Lucie Láníková, Ph.D.

Praha, 2018

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze 3. 1. 2018

Podpis:

Poděkování

Chtěla bych upřímně poděkovat především mé školitelce Ing. Lucii Láníkové, Ph.D. za její trpělivost, rady a velkou pomoc jak při psaní této diplomové práce, tak i při práci v laboratoři. Můj dík patří také celé laboratoři Buněčné a vývojové biologie ÚMG za možnost vypracování této práce. Ráda bych poděkovala i své rodině a přátelům za podporu v průběhu celého studia.

Obsah

Seznam použitých zkratk.....	6
Abstrakt.....	9
1. Úvod.....	11
1.1 Cíle práce.....	11
2. Teoretický úvod	12
2.1 Struktura HIF.....	12
2.1.1 HIF α	12
2.1.2 HIF β	13
2.2 Izoformy HIF	14
2.2.1 HIF1.....	14
2.2.2 HIF2.....	14
2.2.3 HIF3.....	14
2.3 Regulace HIF	15
2.4 Funkce proteinů HIF – cílové geny.....	17
2.5 Erythropoéza	18
2.5.1 Eukleace.....	19
2.5.2 Struktura a funkce erytrocytů.....	19
2.5.3 Faktory ovlivňující erythropoézu.....	20
2.5.4 Systémy a organismy vhodné pro studium erythropoézy.....	21
2.6 HIF, erythropoéza a lidská onemocnění.....	22
3. Materiál a metody	24
3.1 Seznam použitých přístrojů	24
3.2 Buněčná linie HEL (human erythroleukemia cell line)	24
3.3 Kultivace HEL buněk	24
3.4 Další použité buněčné linie.....	25
3.5 Inhibitor HIF2 α	25
3.6 Kvantitativní polymerázová řetězová reakce v reálném čase (qRT-PCR).....	25
3.6.1 Izolace RNA.....	25
3.6.2 Příprava komplementární DNA (cDNA).....	25
3.6.3 Kvantitativní polymerázová řetězová reakce v reálném čase (qRT-PCR).....	26
3.6.4 Zpracování výsledků qRT-PCR.....	26
3.7 Colony assay	27
3.8 Spektrofotometrické měření hemoglobinu.....	27
3.8.1 Vyhodnocení výsledků.....	28
3.9 Měření apoptózy	28

3.10 Příprava buněčné linie HEL s knock-outem <i>HIF2α</i> genu pomocí CRICPR/Cas9 technologie	36
3.10.1 Příprava CRISPR plasmidu (pXPR) a reportérového (pART) plasmidu.....	29
3.10.2 Transformace bakterií připravenou plasmidovou DNA.....	30
3.10.3 Genotypování bakteriálních kolonií (colony PCR).....	30
3.10.4 Mini prep a Midi prep (izolace plasmidové DNA).....	31
3.10.4.1 Mini prep.....	31
3.10.4.2 Midi prep.....	32
3.10.5 Transfekce pomocí Lipofectaminu 2000 a Lipofectaminu 3000.....	32
3.10.6 Fixace buněk na průtokový cytometr.....	33
3.10.7 AMAXA nukleofekce a sorting buněk.....	33
3.10.8 Výběr možných pozitivních klonů na základě PCR.....	34
3.10.9 Transformace a sekvenace.....	35
3.10.9.1 Purifikace DNA z agarózového gelu.....	35
3.10.9.2 Transformace.....	35
3.10.10 Zamrazení buněk.....	36
4. Výsledky	37
4.1 Experimenty s použitím alosterického inhibitoru <i>HIF2α</i>	37
4.1.1 Vliv inhibice <i>HIF2α</i> na erytroidní diferenciaci buněčné linie HEL (lidská erytroleukemická linie) ...	38
4.1.2 Hemoglobin Assay.....	40
4.1.3 Vliv inhibice na myší erytroidní progenitory (tzv. colony assay).....	42
4.2 Příprava buněčné linie HEL s knock-outem <i>HIF2α</i> genu pomocí CRISPR/Cas9 technologie.....	44
4.2.1 AMAXA nukleofekce a lipofekce pomocí Lipofectamine 2000 a Lipofectamine 3000.....	45
4.2.2 Sekvenování vybraných HEL klonů.....	49
4.2.3 Srovnání množství hemoglobinu původní buněčné linie HEL a vytvořené buněčné linie s knock-outem genu pro <i>HIF2α</i>	50
5. Diskuze	51
6. Shrnutí.....	54
7. Reference	55

Seznam použitých zkratek

ALD	Aldolase
AhR	Aryl hydrocarbon receptor
AMP	Ampicilin
ARNT	Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator
ATP	Adenosine triphosphate
BFU-E	Burst-forming unit erythroid
bHLH-PAS	Basic helix-loop-helix-Per-ARNT-Sim
Cas9	CRISPR associated protein 9
CBP	CREB-binding protein
cDNA	Complementary DNA
CFU-E	Colony-forming unit erythroid
CLP	Common lymphoid progenitor
CMP	Common myeloid progenitor
CRISPR	Clustered regulatory interspaced short palindromic repeats
Cul-2	Cullin 2
DEPC	Diethyl pyrocarbonate
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	Dimethyl sulfoxide
dNTP	Deoxynucleoside triphosphate
EPAS1	Endothelial PAS domain protein 1
EPO	Erythropoietin
EPOR	Erythropoietin receptor
FACS	Fluorescence-activated cell sorting

FBS	Fetal bovine serum
GFP	Green fluorescent protein
GLUT	Glucose transporter
Hb	Hemoglobin
HEK	Human embryonic kidney cell line
HEL	Human erythroleukemia cell line
HIF	Hypoxia inducible factor
HLF	HIF1 α -like factor
HRE	Hypoxia-response element
HRF	HIF-related factor
HSC	Hematopoietic stem cell
IGF	Insuline-like growth factor
IL	Interleukin
IPAS	Inhibitory PAS domain protein
LR	Low range
MEP	Megakaryocyte-erythroid progenitor
MOP2	Member of the PAS superfamily
NLS	Nuclear localization signal
ODDD	Oxygen-dependent degradation domain
PBS	Phosphate-buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PGK	Phosphoglycerate kinase
PHD	Prolyl hydroxylase domain
qRT-PCR	Quantitative real-time polymerase chain reaction

Rbx1	RING box protein 1
ROS	Reactive oxygen species
SCF	Stem cell factor
TAD	Transactivation domain
tRFP	Turbo red fluorescent protein
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VHL	Von Hippel-Lindau
WT	Wild type

Abstrakt

Základní funkcí erytrocytů je transport kyslíku z plic do tkání těla. Kvůli této důležité roli musí být množství erytrocytů přísně regulováno. Počet erytrocytů zvyšuje především glykoproteinový hormon erythropoetin, jehož expresi řídí HIF (hypoxií indukovaný faktor). Transkripční faktor HIF se skládá ze dvou podjednotek, HIF α a HIF β . Za normoxických podmínek je alfa podjednotka HIF hydroxylována proteinem PHD. Tato hydroxylace zajišťuje rozpoznávací motiv pro VHL protein, který je součástí E3 ubikvitin ligázového komplexu a směřuje hydroxylovaný HIF k proteazomální degradaci. V případě hypoxie je však tato degradace inhibována. Alfa podjednotka se translokuje do jádra, kde váže beta podjednotku a reguluje genovou expresi. HIF signální dráha ovlivňuje široké spektrum buněčných funkcí - metabolismus, angiogenezi, apoptózu a mnoho dalších. Tato diplomová práce se však zaměřuje na HIF2 α a jeho roli v erythropoéze. V této práci jsme použili CRISPR/Cas9 technologii a vytvořili HEL (human erythroleukemia) buněčnou linii s knock-outem genu pro HIF2 α (*EPAS*). K objasnění role HIF2 α jsme dále využili specifický HIF2 α inhibitor k zablokování jeho funkce u HEL buněčné linie. Pro srovnání jsme navíc tento inhibitor otestovali i na myších erytroidních progenitorech. Naše výsledky naznačují významnou roli HIF2 α v erytroidní diferenciaci.

Klíčová slova: HIF2alfa, erythropoéza, hypoxie, erytroidní diferenciaci

Abstract

The primary function of erythrocytes is transport of oxygen from lungs to various tissues of the body. Red blood cell mass, due to this important role, must be controlled at precise levels. The number of erythrocytes is primarily increased by the glycoprotein hormone erythropoietin, whose expression is controlled by HIF (hypoxia inducible factor). Transcriptional factor HIF consists of the two subunits, HIF α and HIF β . Under normoxic conditions, the α subunit of HIF is hydroxylated by PHD protein. This hydroxylation provides a recognition motif for the VHL protein, a part of an E3 ubiquitin ligase complex that targets hydroxylated HIF for proteasomal degradation. Under hypoxic conditions, the degradation is inhibited. The α subunit is translocated to the nucleus, where it binds the β subunit and regulates gene expression. HIF pathway regulates a broad spectrum of cellular functions - energy metabolism, angiogenesis, apoptosis and many others. This diploma thesis is focused on HIF2 α and its role in erythropoiesis. In this present study, we used CRISPR/Cas9 technology and created HEL (human erythroleukemia) cell line with knock-out of the gene for HIF2 α (*EPAS1*). To reveal the role of HIF2 α , we used specific HIF2 α inhibitor in order to block its function in HEL cell line. We also tested this inhibitor on mice erythroid progenitors for comparison. Our results suggest the important role of HIF2 α in erythroid differentiation.

Key words: HIF2alpha, erythropoiesis, hypoxia, erythroid differentiation

1. Úvod

Pro aerobní organismy je dostatečné množství molekulárního kyslíku (O_2) nezbytnou podmínkou pro život. V neustále se měnícím prostředí musí být organismy schopné udržet základní stálost vnitřního prostředí, homeostázu. Jedním z nejdůležitějších úkolů homeostázy je právě udržení dostatečného přísunu kyslíku pro buňku. K adaptaci na nízkou hladinu kyslíku, hypoxii, dokáží všechny savčí buňky provádět změny v genové expresi. Důležitou roli v této adaptaci hraje hypoxii indukovaný faktor (HIF; hypoxia inducible factor).

Za hypoxických podmínek alfa podjednotka HIF není degradována a dochází k její translokaci do jádra, kde vytváří funkční dimer se svou beta podjednotkou. Pomocí transkripčního faktoru HIF je v buňkách regulována řada důležitých genů. Ovlivňuje například energetický metabolismus, angiogenezi, buněčnou proliferaci a apoptózu. Jednou z jeho hlavních funkcí je také jeho vliv na erytropoézu. V erytropoéze se uplatňuje především HIF2 α izoforma, která je předmětem studia této diplomové práce.

1.1 Cíle práce

- Otestovat vliv specifického HIF2 α inhibitoru na lidskou buněčnou linii HEL
- Provést několik dalších experimentů s použitím tohoto HIF2 α inhibitoru: spektrofotometrické měření hemoglobinu a stanovení apoptózy
- Otestovat vliv specifického HIF2 α inhibitoru na myších hematopoetických buňkách
- Vytvořit buněčnou linii HEL s knock-outem genu pro HIF2 α (*EPAS1*)
- Pomocí dalších experimentů s vytvořenou buněčnou linií HEL s knock-outem genu pro HIF2 α porovnat rozdíly oproti původní buněčné linii HEL

2. Teoretický úvod

HIF byl poprvé objeven v roce 1991 při výzkumu regulace lidského genu pro erythropoetin jako transkripční faktor indukovaný hypoxií potřebný pro aktivaci transkripce tohoto genu (Semenza *et al.*, 1991). Byla identifikována přesná sekvence 3' enhanceru genu pro erythropoetin, na kterou se HIF váže (Semenza and Wang, 1992) a poté se ukázalo, že je HIF indukován hypoxií i u buněk, které schopnost produkovat erythropoetin nemají, což naznačovalo jeho obecnou úlohu v reakci na hypoxické prostředí (Wang and Semenza, 1993). Přítomnost transkripčního faktoru HIF byla později prokázána v mnoha různých tkáních u člověka i jiných savců (Wiener *et al.*, 1996).

2.1 Struktura HIF

HIF se skládá ze dvou podjednotek, alfa a beta, které vytváří funkční dimery pouze za hypoxických podmínek a fungují jako transkripční faktor (Wang and Semenza, 1995). Alfa podjednotka (HIF α) nacházející se v cytoplazmě je degradovatelná a její koncentrace je regulována v závislosti na hladině kyslíku (Huang *et al.*, 1998). Beta podjednotka (HIF β), původně objevená jako jaderný translokátor aryl hydrokarbonového receptoru (ARNT, aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator) je stabilní konstitutivně exprimovaný jaderný protein, který existuje ve třech izoformách (ARNT1, ARNT2, ARNT3). ARNT dimerizuje kromě HIF1 α i s jinými proteiny, např. s aryl hydrokarbonovým receptorem (AhR, dioxin), se kterým jako heterodimer vytváří funkční dioxinový receptor a účastní se metabolismu různých xenobiotik (Reyes *et al.*, 1992).

2.1.1 HIF α

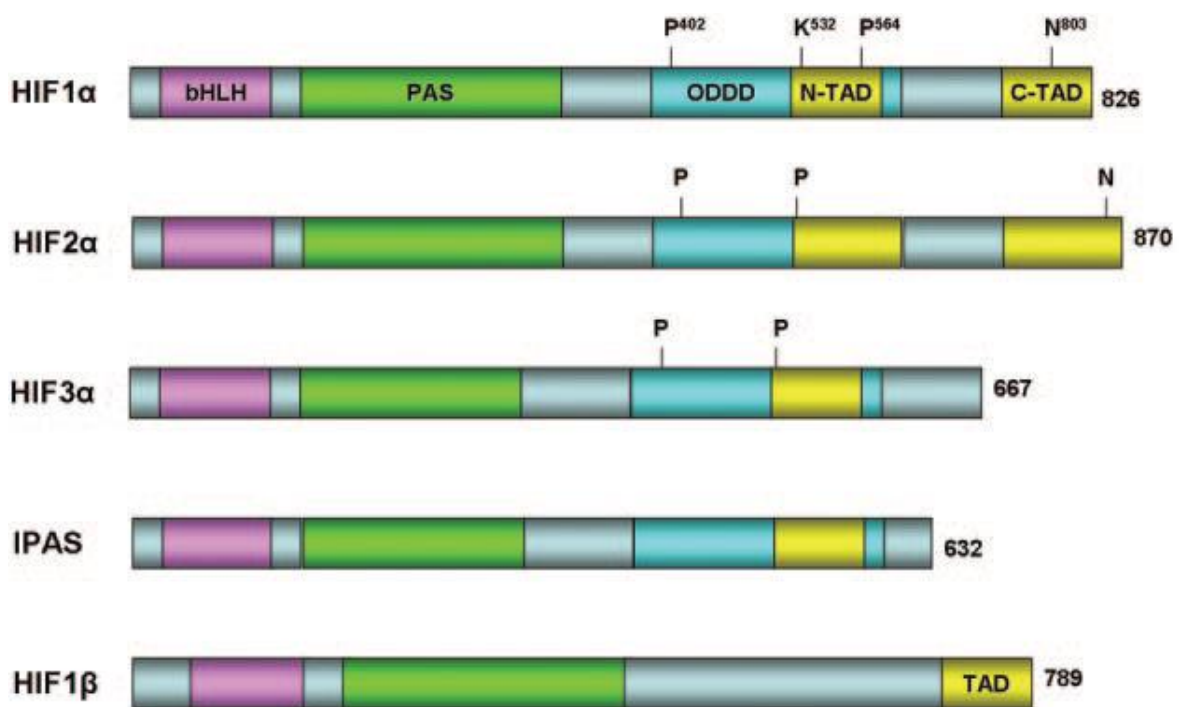
Alfa (HIF1 α) podjednotka je protein o velikosti 120 kDa složený z 826 aminokyselin (Wang and Semenza, 1995). Patří mezi proteiny z rodiny transkripčních faktorů basic helix-loop-helix-Per-ARNT-Sim (bHLH-PAS) (Wang *et al.*, 1995). Díky těmto doménám může alfa podjednotka vytvářet heterodimer s beta podjednotkou a specificky se vázat na DNA (Jiang *et al.*, 1996).

Dále každá alfa podjednotka obsahuje v centrální části ODDD (oxygen-dependent degradation domain), doménu zodpovědnou za stabilitu proteinu. Tato doména se skládá přibližně z 200 aminokyselin a zprostředkovává jeho degradaci regulovanou kyslíkem pomocí ubikvitin-proteazomového systému (Huang *et al.*, 1998).

Další součástí alfa podjednotky jsou dvě transaktivační domény v C-terminální části proteinu. První je N-TAD, která se nachází blíže N-konci a druhou je C-TAD ležící na C-konci (Ruas *et al.*, 2002).

2.1.2 HIF β

Beta podjednotka je o něco menší než alfa, skládá se ze 774 nebo 789 aminokyselin a vytváří protein o velikosti 91-94 kDa (Wang and Semenza, 1995). Stejně jako HIF α patří i HIF β mezi proteiny obsahující na N-konci bHLH-PAS motiv, díky kterému může vytvářet heterodimery s jinými proteiny obsahujícími stejný motiv (Hoffman *et al.*, 1991).



Obr. 2.1 Struktura podjednotek lidských izoform HIF – HIF1 α , HIF2 α , HIF3 α , IPAS a HIF1 β . Každá z izoform obsahuje na N-konci bHLH strukturu a PAS doménu. Dále všechny izoformy kromě HIF1 β obsahují doménu ODDD pro regulaci stability proteinu závislou na hladině kyslíku. Tato regulace probíhá přes hydroxylaci prolinových zbytků (P) a acetylaci lysinového zbytku (K). HIF1 α a HIF2 α mají ještě na C-konci dvě transaktivační domény (N-TAD a C-TAD), zatímco ostatní izoformy mají pouze jednu. Je zde také vyznačen počet aminokyselin každé podjednotky. Převzato a upraveno z (Ke and Costa, 2006).

2.2 Izoformy HIF

Do rodiny transkripčních faktorů indukovaných hypoxií řadíme HIF1, HIF2 a HIF3. Jako první byl objeven HIF1 skládající se z podjednotky HIF1 α a HIF1 β , a proto je také dosud nejvíce prozkoumanou izoformou, zatímco úloha HIF3 zatím moc zkoumána nebyla.

2.2.1 HIF1

Jak již bylo zmíněno, HIF1 je prvním objeveným proteinem ze skupiny hypoxií indukovaných faktorů a byl nalezen díky identifikaci HRE v 3' enhanceru lidského genu pro EPO (Semenza *et al.*, 1991). Tato izoforma je kódována genem *HIF1A* a je exprimována téměř ve všech tkáních lidského těla, kde plní svou úlohu v celkové adaptaci na hypoxii [shrnuté v (Semenza, 1998)].

2.2.2 HIF2

HIF2 α je známý také jako HLF (HIF1 α -like factor) (Ema *et al.*, 1997), HRF (HIF-related factor) (Flamme *et al.*, 1997), MOP2 (member of the PAS superfamily) (Hogenesch *et al.*, 1997) či EPAS1 (endothelial PAS domain protein 1) (Tian *et al.*, 1997).

HIF2 α je kódován genem s názvem *EPAS1*. HIF2 α také vytváří dimer s HIF1 β a je aktivován hypoxií. Jeho genová sekvence je dokonce velmi podobná sekvenci genu pro HIF1 α , ale exprese je omezená. Zatímco gen pro HIF1 α je exprimován téměř ve všech tkáních, exprese *EPAS1* je omezená a tkáňově specifická. *EPAS1* je exprimován převážně v plicích a endotelu (Flamme *et al.*, 1997; Tian *et al.*, 1997).

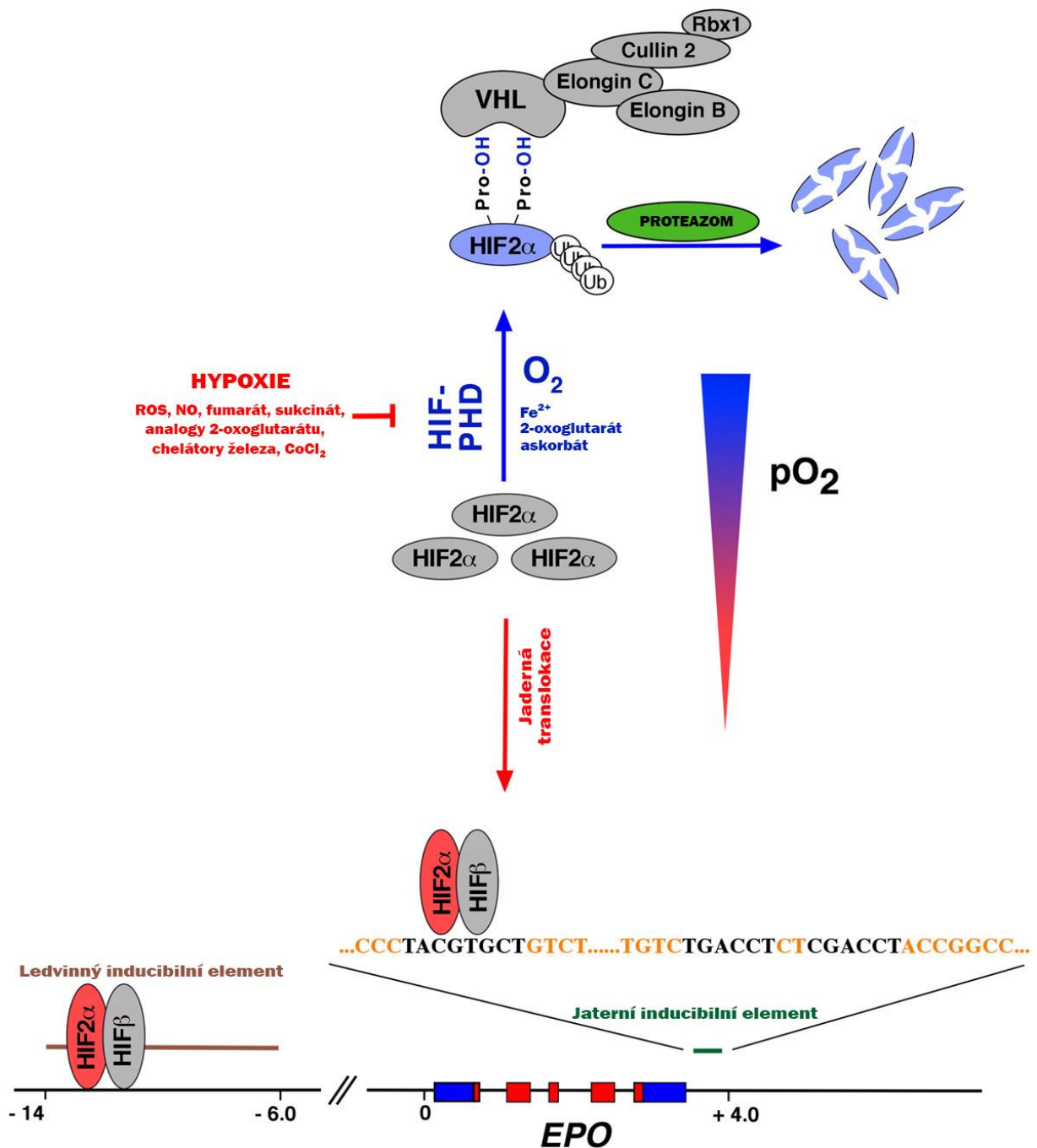
2.2.3 HIF3

HIF3 α je kódován genem *HIF3A* a také vytváří aktivní dimer s HIF1 β . Existuje ovšem více variant jeho sestřihu s různou funkcí. Varianta IPAS (inhibitory PAS domain protein) je exprimována především v Purkyňových buňkách mozečku a epitelu rohovky. Ukazuje se, že IPAS dokonce funguje jako negativní regulační faktor HIF1 (Mahon *et al.*, 2001; Makino *et al.*, 2002).

2.3 Regulace HIF

Za stavu normálního obsahu kyslíku v buňce (kolem 20 % O₂) je alfa podjednotka hydroxylována 2-oxoglutarát dependentní dioxygenázou z rodiny PHD (prolyl hydroxylase domain, PHD1, PHD2, PHD3), která hydroxyluje alespoň jeden z prolinových zbytků v ODDD. U lidského HIF1 α jsou hydroxylovány Pro402 a Pro564, u HIF2 α jsou to Pro405 a Pro531. PHD potřebuje pro svou katalytickou aktivitu kyslík jako substrát, a proto je její aktivita inhibována nízkou hladinou kyslíku, hypoxií (Ivan *et al.*, 2001; Jaakkola *et al.*, 2001; Masson *et al.*, 2001). Hydroxylované zbytky HIF α jsou poté specificky rozpoznávány β doménou tumor supresorového proteinu von Hippel-Lindau (VHL), který vytváří komplex s cullinem 2 (Cul-2), elonginem B a C. Tento komplex funguje jako E3 ubikvitin ligáza a zprostředkovává ubikvitinaci proteinu HIF α . VHL tak iniciuje 26S proteazomální degradaci HIF α (Maxwell *et al.*, 1999; Cockman *et al.*, 2000; Ohh *et al.*, 2000).

Za hypoxických podmínek (0-5 % O₂), ke kterým může dojít jak za fyziologických, tak za patologických okolností, je však hydroxylace alfa podjednotky inhibována. Protein je stabilizován a dochází k jeho akumulaci. Každá alfa podjednotka obsahuje na C-konci jaderný lokalizační signál (NLS, nuclear localization signal), díky kterému se přesouvá do jádra. V jádře dimerizuje s beta podjednotkou (Kallio *et al.*, 1998). Tyto aktivní dimery se váží na specifické DNA sekvence zvané HRE (hypoxia-response element) obsahující 5'-[A/G]CGTG-3' sekvenci (Mole *et al.*, 2009). Aby HIF mohl plnit svou funkci transkripčního faktoru, regulovat expresi erythropoetinu a mnoha dalších genů účastnících se odpovědi na hypoxii, potřebuje v jádře navázat CREB-binding (CBP)/p300 koaktivátorové proteiny (Kallio *et al.*, 1998). CBP/p300 interagují s transkripční doménou C-TAD a tím pomáhají aktivovat transkripci genu (Lando *et al.*, 2002). Aktivita HIF lze dosáhnout nejen hypoxií, ale také pomocí CoCl₂ nebo chelátoru železa deferoxaminu (Wang and Semenza, 1993).



Obr. 2.2 Schéma funkce a degradace proteinů HIF demonstrováné na HIF2 α . Gen pro erythropoetin je regulován faktorem HIF2. HIF2 α nacházející se v cytoplasmě je za normoxie hydroxylován proteinem PHD a následně ubikvitinován VHL-E3-ubikvitin ligázovým komplexem. Jsou zde uvedeny jednotlivé komponenty komplexu – cullin 2, elongin B a C, Rbx1 (RING box protein 1). Ubikvitinace HIF2 α předurčuje protein k jeho degradaci v proteazomu. Za hypoxie již nedochází k degradaci HIF2 α . HIF2 α se translokuje do jádra, kde vytváří heterodimerní komplex s HIF β . HIF komplex váže sekvenci 5'-RCGTG-3' a zvyšuje transkripci genu pro erythropoetin (EPO). Tento jaterní indukibilní element se nachází na 3'-konci genu pro EPO. V ledvinných buňkách je indukibilní element lokalizován 6-14 kb upstream od místa začátku transkripce. Jsou zde také znázorněny exony genu pro EPO, kde jsou kódující sekvence vyznačeny červeně a netranslatované sekvence modře. Ve schématu jsou navíc uvedeny faktory ovlivňující degradaci HIF – kyslíkové radikály ROS (reactive oxygen species), NO, fumarát, sukcinát, analogy 2-oxoglutarátu, chelátory železa, CoCl₂, Fe²⁺, 2-oxoglutarát, askorbát. Převzato a upraveno z (Haase, 2013).

2.4 Funkce proteinů HIF – cílové geny

Funkce proteinů HIF spočívá v ovlivnění exprese jejich cílových genů. Ačkoli HIF1 a HIF2 sdílejí mnoho svých cílových genů, určité geny jsou pod kontrolou jen jednoho z nich.

Důležitá úloha proteinu HIF v regulaci EPO již byla zmíněna, HIF však má vliv i na další faktory ovlivňující erytropoézu. HIF2 α je také primárním regulačním faktorem homeostázy železa, čímž je nepostradatelný pro proliferaci a maturaci erytroidních progenitorů v kostní dřeni. HIF2 α nejen přímo indukuje expresi ferroportinu, hlavního buněčného transportéru železa (Taylor *et al.*, 2011), ale má vliv i na hepcidin. Hepcidin je hormon syntetizovaný převážně v hepatocytech, který poté cirkuluje v plazmě a je důležitý pro negativní regulaci systémové homeostázy železa. Ovlivňuje absorpci železa a jeho distribuci do tkání. Jeho funkce je založena na inhibici ferroportinu [shrnutí v (Nemeth and Ganz, 2009)]. Mastrogiannaki *et al.* prokázali, že je to právě HIF2 α , a ne HIF1 α , který ovlivňuje absorpci železa (Mastrogiannaki *et al.*, 2009). Později se ukázalo, že HIF2 α nereguluje genovou expresi hepcidinu přímo, ale zvýšením erytropoézy přes produkci erythropoetinu (Liu *et al.*, 2012; Mastrogiannaki *et al.*, 2012). V metabolismu železa se však uplatňuje i HIF1 α , který zvyšuje hladinu transferrinu, transportéru železa v plazmě (Rolfs *et al.*, 1997).

HIF dále zastává důležitou funkci v energetickém metabolismu buňky. Ačkoli expresi membránového transportéru glukózy (GLUT) zvyšují obě izoformy (Raval *et al.*, 2005), geny glykolytických enzymů jsou řízeny jen HIF1 α (Hu *et al.*, 2003). V rámci adaptivní reakce na hypoxii tak dochází k aktivaci transkripce genů glykolýzy, jako jsou aldoláza (ALD), fosfoglycerát kináza (PGK) či pyruvát kináza (Semenza *et al.*, 1994).

Nenahraditelnou roli zastávají transkripční faktory HIF také v angiogenezi, buněčné proliferaci, apoptóze a mnoha dalších důležitých buněčných funkcích. Dosud byly identifikovány již stovky cílových genů HIF [shrnutí v (Majmundar *et al.*, 2010; Greer *et al.*, 2012; Semenza, 2012)]. Podrobnější popis však není úkolem této diplomové práce. Tato práce se zaměřuje pouze na roli HIF2 α v erytropoéze.

2.5 Erytropoéza

Erytropoéza je proces, během kterého se z pluripotentní hematopoetické kmenové buňky (HSC; hematopoietic stem cell) postupně vyvíjejí zralé červené krvinky (erytrocyty).

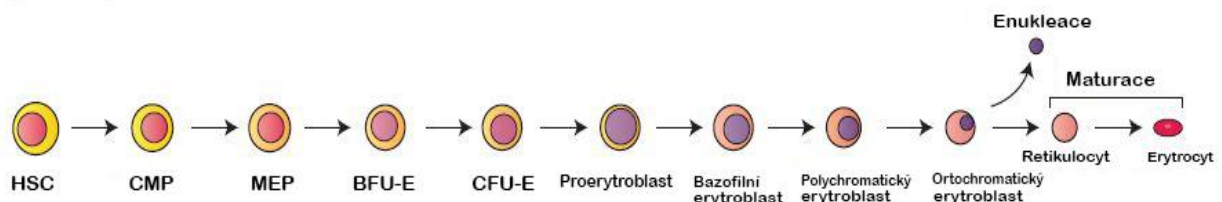
Hematopoéza, vznik buněk krevní řady, začíná již velmi brzy během embryonálního vývoje, ačkoliv jde o poněkud rozdílný proces než v postnatálním období života. Zatímco v prenatalním období probíhá hematopoéza i v játrech, slezině či lymfatických uzlinách, po narození se odehrává už jen v kostní dřeni, kde sídlí HSCs. Kostní dřeň zajišťuje kmenovým buňkám vhodné prostředí díky růstovým faktorům a cytokinům. Všechny buňky krevní řady jsou odvozeny z pluripotentních HSCs. Nejprve se oddělují dvě hlavní vývojové větve, myeloidní a lymfoidní. Z lymfoidních progenitorových buněk (CLP, common lymphoid progenitor) vznikají lymfocyty a NK buňky. Myeloidní progenitorové buňky (CMP, common myeloid progenitor) se dělí a diferencují v megakaryocyty, erytrocyty, žírné buňky, monocyty a tři druhy granulocytů. Po CMP následuje prekurzor společný erytrocytům i megakaryocytům (MEP, megakaryocyte-erythroid progenitor).

Prvními skutečně jen erytrocytárními progenitory jsou buňky zvané BFU-E (burst-forming unit erythroid), které získaly své jméno díky schopnosti vytvářet velké kolonie v metylcelulózových kulturách. Více maturovanými progenitory jsou CFU-E (colony-forming unit erythroid), které vytváří menší kolonie a na rozdíl od BFU-E se v krevním oběhu vyskytují pouze patologicky. Následující erytroidní prekurzor, proerythroblast, je už velmi dobře morfologicky identifikovatelný. Je charakteristický svou hustší strukturou jádra a tmavomodrým úzkým cytoplazmatickým lemem s projasněnou oblastí. Dělením proerythroblastů vznikají erythroblasty (někdy také zvané normoblasty), které procházejí třemi stádii – bazofilní, polychromatický a ortochromatický. V průběhu toho značně vzrůstá akumulace hemoglobinu a dochází ke zmenšování objemu buňky. Ortochromatický erythroblast již není schopný dělení. Jádro, které se během vývoje postupně zmenšovalo, se nakonec vyloučí ven z buňky. Tento děj se nazývá enukleace. V okamžiku vyloučení jádra se z erythroblastu stává retikulocyt. Retikulocyty vstupují do krevního oběhu a postupně se z nich vyvíjejí zralé erytrocyty. Vývoj každého erytrocytu trvá asi 7 dní. Erytrocyty žijí zpravidla 100 až 120 dní, denně se tedy musí vytvořit přibližně 1 % nových erytrocytů. Staré erytrocyty jsou odstraňovány makrofágy převážně ve slezině [shrnutí v (Dzierzak and Philipsen, 2013; Nandakumar *et al.*, 2016)].

2.5.1 E nukleace

Účelem enukleace je zvýšit krevní oběh a prevence ucpání malých kapilár. Díky bezjadernosti má erytrocyt větší schopnost deformace a více prostoru pro hemoglobin. To mu umožňuje vázat a transportovat větší množství kyslíkových molekul.

Aby mohlo dojít k enukleaci, musí mít jádro co nejmenší velikost. V průběhu vývoje erytrocytů proto musí dojít ke kondenzaci chromatinu. Během diferenciaci erytroblastů klesá počet acetylovaných histonů. Acetylace snižuje pozitivní náboj histonů a brání vazbě záporně nabitě DNA. Acetylaci provádějí acetyl transferázy, jejichž množství před enukleací významně klesá. Oproti tomu roste množství histon deacetyláz, které provádějí deacetylaci (Popova *et al.*, 2009; Ji *et al.*, 2010). E nukleace savčích erytroblastů je pro správnou funkci erytrocytů zásadní. Je to komplexní proces, který vyžaduje mnoho regulačních cytokinů, aktin a další cytoskeletární proteiny. Přestože ke kondenzaci chromatinu ve vývoji erytrocytů dochází u všech obratlovců, pouze u savců je jádro vyloučeno [shrnutí v (Ji *et al.*, 2011)]. Vyloučené jádro je nakonec pohlceno makrofágy. Jaderná membrána má jiné složení než retikulocyt, např. obsahuje ve vnějším listu fosfatidylserin, který slouží jako marker pro rozpoznávání apoptotických buněk (Yoshida *et al.*, 2005).



Obr. 2.3 Schéma erytroidní diferenciaci - erythropoéza. Převzato a upraveno z (Dzierzak and Philipsen, 2013).

2.5.2 Struktura a funkce erytrocytů

Erytrocyty jsou velmi malé buňky (asi 7,5 x 2,1 μm) ve tvaru bikonkávni (piškotovitě) destičky se ztlustěným okrajem. Tento tvar zajišťuje maximální povrch ve vztahu k objemu. Jak již bylo zmíněno, jsou charakteristické tím, že neobsahují jádro ani většinu organel jako např. endoplazmatické retikulum nebo mitochondrie.

Zralé erytrocyty musí být schopné reverzibilní deformace především ve chvílích, kdy procházejí úzkými kapilárami. Mají proto specializovanou membránu a unikátní cytoskelet,

který zajišťuje stabilitu a flexibilitu buněk. Plazmatická membrána erytrocytů je složena převážně z fosfolipidů a cholesterolu. Další důležitou složkou jsou sacharidy a proteiny, které zde mají několik rolí. Významnou funkci zastávají např. oligosacharidy zodpovědné za antigenní systém krevních skupin. Díky transmembránovým proteinům je také zajištěn transport mnoha látek, signalizace a adheze buněk. Elastická síť cytoskeletárních proteinů je přes transmembránové proteiny ukotvena v plazmatické membráně. Proteinů důležitých pro schopnost deformace erytrocytů je celá řada. Jsou to například spektrin, proužek 4.1, ankyrin, glykoforiny a mnoho dalších.

Erytrocyty jsou nejpočetnějšími buňkami krve. Ženy mají asi 4,8 milionů erytrocytů na 1 mm³ krve, muži přibližně 5,4 milionů. Hlavním úkolem erytrocytů je transport kyslíku do celého organismu. K tomu slouží tetramerní transportní metaloprotein hemoglobin (Hb). Cytoplazmatická viskozita díky intracelulární koncentraci hemoglobinu také přispívá ke schopnosti deformace erytrocytů [shrnutí v (Mohandas and Gallagher, 2008)].

2.5.3 Faktory ovlivňující erythropoézu

Klíčovým regulačním faktorem erythropoézy je erythropoetin (EPO), glykoproteinový růstový faktor o velikosti 34,4 kDa. EPO je pro erythropoézu naprosto nepostradatelný a v případě jeho nedostatku progenitorové buňky umírají apoptózou. Jeho syntéza probíhá během embryonálního vývoje především v jaterních hepatocytech, po narození primárně v peritubulárních buňkách kortexu ledvin. EPO je neustále sekretován na nízké úrovni a postupně uvolňován do krevního oběhu. Sérová koncentrace EPO je přísně regulována tak, aby byly staré erytrocyty průběžně nahrazovány novými k udržení konstantního množství erytrocytů. Jakékoli odchylky od normy mohou vést k anémii či polycytémii. Při hypoxii se však produkce EPO může až tisíckrát zvýšit. Během cirkulace v krevním oběhu se EPO váže na receptory (EPOR) specificky exprimované na erytroidních progenitorech. Vazbou na tyto receptory EPO podporuje viabilitu, proliferaci, diferenciaci a maturaci erytroidních progenitorových buněk [shrnutí v (Ebert and Franklin Bunn, 1999)].

V časných fázích erythropoézy je důležitý především SCF (stem cell factor). Dalšími faktory ovlivňujícími vývoj erytrocytů jsou například železo, vitamin B₁₂, kyselina listová, IL-3, IL-4, IGF (insuline-like growth factor) a mnoho dalších [shrnutí v (Koury and Ponka, 2004)].

2.5.4 Systémy a organismy vhodné pro studium erythropoézy

Pro studium erythropoézy je stejně jako pro výzkum v mnoha jiných oblastech vhodný myší model. Dalším dobrým modelem je ryba Dánio pruhované (*Danio rerio*). Ačkoli je od člověka velmi evolučně vzdálena, mnoho genů zapojených do hematopoézy je konzervováno. K enukleaci erytrocytů však dochází pouze u savců. Velkou výhodou je zde také vnější fertilizace, která umožňuje *in vivo* pozorování embryonálního vývoje.

Ve fyziologii lidské erythropoézy a zvířecích modelů jsou často velké rozdíly. Výzkum skutečně lidské erythropoézy je možný díky *in vitro* kulturám hematopoetických kmenových a progenitorových buněk. Výhodou je snadná manipulace a přístup k buňkám. Buněčné linie jsou v kulturách udržitelné po velmi dlouhou dobu. Vývoj erytrocytů ale není zasazen do kontextu celého organismu, a proto nemůže být ovlivňován jinými faktory, jako jsou např. hormony. Další možností pro studium erythropoézy jsou tzv. colony eseje, které jsou později popsány i v této diplomové práci [shrnuje v (Carroll and North, 2014; Nandakumar *et al.*, 2016)].

2.6 HIF, erytropoéza a lidská onemocnění

Základní funkce erytrocytů vázat kyslík na tetramerní metaloprotein hemoglobin a transportovat jej do tkání těla je nezbytnou podmínkou pro život. Kyslík totiž slouží jako finální akceptor elektronů v mitochondriálním elektrotransportním řetězci, díky kterému vzniká ATP. Kyslík je tedy nezbytnou součástí energetického metabolismu. Aby byl tento proces zajištěn, musí být počet erytrocytů přísně udržován. Pokud je erytrocytů nedostatek, mluvíme o erytopenii, která má za následek nedostatečný přísun kyslíku ke tkáním. Stejně tak i nadměrné množství erytrocytů, polycytemie, způsobuje vážné zdravotní potíže. Koncentrace kyslíku v prostředí není vždy stálá, a proto musí mít organismy schopnost se takovým podmínkám přizpůsobit. Obecná fyziologická adaptace na systémovou hypoxii je stimulace erytropoézy, která vede ke zvýšení počtu erytrocytů. Hlavním faktorem podporujícím tvorbu erytrocytů je hormon EPO produkovaný především v ledvinách a játrech. Produkce EPO je primárně stimulována právě hypoxií, v jejíž regulaci má zásadní roli HIF. Hladina EPO v séru se za hypoxického stavu zvyšuje více než stonásobně [shrnutí v (Ebert and Franklin Bunn, 1999)]. Ačkoli byl díky výzkumu EPO jako první objeven HIF1 α , zdá se, že hlavní roli v regulaci EPO zastává HIF2 α (Rosenberger *et al.*, 2002; Paliege *et al.*, 2010).

Mutace HIF2 α je navíc asociována s výskytem erytrocytóz. Erytrocytóza neboli polycytemie je vzácné onemocnění charakterizované zvýšeným hematokritem, který vzniká v důsledku zvýšeného množství erytrocytů a zvýšené koncentrace hemoglobinu [shrnutí v (Lee and Percy, 2011)]. Jednou z několika příčin erytrocytózy je právě právě mutace genu *EPAS1*, který kóduje HIF2 α protein. Dosud bylo identifikováno již několik mutací genu pro HIF2 α asociovaných s erytrocytózou (Gale *et al.*, 2008; Percy *et al.*, 2008; Furlow *et al.*, 2009).

Další příčinou vzniku erytrocytózy je mutace proteinů, které se účastní regulace a degradace faktorů HIF. Byla identifikována např. mutace genu, který kóduje PHD2. Tato mutace způsobuje defekt v aktivitě enzymu. PHD2 je jedním ze tří enzymů zodpovědných za prolyl hydroxylaci alfa podjednotky HIF proteinů, které jsou tímto označením vedeny k degradaci v proteazomu. V případě narušení aktivity PHD dochází ke zvýšení funkce HIF, což má za následek stimulaci produkce EPO a následně i stimulaci erytropoézy (Percy *et al.*, 2006).

Nejznámější a nejčastější typ erytrocytózy je tzv. Čuvašská polycytemie, pojmenovaná podle skupiny Čuvašského obyvatelstva v Rusku. Tento typ erytrocytózy je způsoben mutací genu

pro protein VHL, který není schopný rozpoznat hydroxylovaný HIF α a nevede tak k jeho degradaci (Ang *et al.*, 2002).

Ačkoli jsou erytrocytózy vzácným onemocněním, je důležité, aby byly dále zkoumány. Porozumění těmto onemocněním a identifikace molekulárních mechanismů jejich vzniku může pomoci ke zlepšení diagnostiky a objevení nových možností terapie.

3. Materiál a metody

3.1 Seznam použitých přístrojů

Inkubátor Sanyo (Thermo Fisher Scientific)

Mikroskop EVOSTM XL Core Imaging Systém (Thermo Fisher)

Mikroskop (IX 71 Olympus)

Centrifuga (Eppendorf 5804 R)

Centrifuga (Eppendorf 5702 R)

Pipety (Gilson, Sipoch)

Vortex (Benchmixer, Benchmark Scientific, Biotech)

Třepačka (ArgoLab, Verkon)

Nanodrop (ND 1000 Spectrophotometer, Thermo Scientific)

Termocyklér (Bio-Rad, T100)

LightCycler 480 II (Roche)

Elektroporační přístroj AMAXA Nucleofector (Lonza)

Přístroj pro elektroforézu (Hoefer Scientific Instruments, model He 33, VWR)

Průtokový cytometr (LSRII, BD Biosciences)

BD Influx vysokorychlostní sorter (BD Biosciences)

3.2 Buněčná linie HEL (human erythroleukemia cell line)

Pro experimenty byla použita buněčná linie HEL (human erythroleukemia cell line, linie byla zapůjčena z laboratoře prof. T. Stopky, Ústav patologické fyziologie, 1. LF UK). Tyto buňky byly izolovány z lidské kostní dřeně. Jedná se o buňky ve stádiu erytroblastů. Jsou to buňky suspenzní, které poskytují dobrý model pro studium diferenciaci buněk erytroidní linie.

3.3 Kultivace HEL buněk

Pro kultivaci buněk bylo použito kompletní médium Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Thermo Fisher). Buňky byly kultivovány při 37 °C v 5% CO₂ v inkubátoru Sanyo. PBS k promývání buněk byl získán z Přípravny médií ÚMG.

Kompletní médium pro kultivaci HEL buněk:

DMEM

10% FBS (Thermo Fisher)

1x penicilin, streptomycin (Thermo Fisher)

3.4 Další použité buněčné linie

buněčná linie 786-O izolovaná z lidského renálního karcinomu (ATCC® CRL-1932™)

HEK293 buňky z lidské embryonální ledviny (Oddělení buněčné a vývojové biologie, ÚMG)

3.5 Inhibitor HIF2 α

K některým experimentům byl použit HIF2 α inhibitor (compound 2, C2, Sigma). Tento inhibitor byl zředěn v DMSO (dimethylsulfoxid, 64 mM, Sigma-Aldrich).

3.6 Kvantitativní polymerázová řetězová reakce v reálném čase (qRT-PCR)

3.6.1 Izolace RNA

Buňky v suspenzi byly nejprve přeneseny do 1,5ml centrifugačních zkumavek (Eppendorf) a peletovány centrifugací (3000 rpm). Kultivační médium bylo odstraněno odsátím. K 5-10 x 10⁶ buněk byl přidán 1 ml Trizolu (Thermo Fisher). Následně byly buňky rozvolněny pipetováním. Buňky v Trizolu byly inkubovány po dobu 5 min při pokojové teplotě. Do zkumavek se suspenzí bylo přidáno 200 μ l chloroformu a vzorky byly jemně protřepány, inkubovány 5 min a centrifugovány při 10 000 rpm a 4 °C, 10 min. Po centrifugaci je vzorek rozdělen na tři fáze. Horní bezbarvá vodní fáze s RNA, se kterou se dále pracovalo, byla přenesena do nové zkumavky. K RNA bylo přidáno 500 μ l izopropylalkoholu. S izopropylalkoholem byla RNA inkubována 10 min při pokojové teplotě a centrifugována při 10 000 rpm a 4 °C, 10 min. Supernatant byl odstraněn a peleta promyta 200 μ l 75% etanolu (ve vodě ošetřené diethylpyrokarbonátem (DEPC)). RNA byla sedimentována centrifugací při 10 000 rpm a 4 °C, 5 min. Po odstranění supernatantu byla RNA vysušena na vzduchu 10 min a nakonec rozpuštěna ve 40 μ l PCR Ultra H₂O zahřátím na 60 °C 10 min. Koncentrace RNA byla změřena na přístroji Nanodrop (ND 1000 Spectrophotometer, Thermo Scientific).

3.6.2 Příprava komplementární DNA (cDNA)

Komplementární DNA k izolované RNA byla vytvořena reverzní transkripcí. Pro reverzní transkripci bylo použito 1 000 ng RNA a kit společnosti Roche (Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit). K RNA byl přidán 1 μ l oligo dT a 2 μ l náhodných hexamerů. Do reakce byla přidána PCR H₂O na doplnění do celkového objemu 13 μ l. Vzorky byly inkubovány 10 min při 65 °C a poté ihned přemístěny na led a krátce stočeny. K vzorkům bylo přidáno 4 μ l RT pufru, 0,5 μ l inhibitoru ribonukleáz, 2 μ l směsi dNTPs a 0,5 μ l reverzní

transkriptázy. Následně byly vzorky vloženy do termocykléru (Bio-Rad, T100). Na přístroji byl použit program s následujícím nastavením:

25 °C 10 min

55 °C 30 min

85 °C 5 min

Výsledná cDNA byla nakonec 10x zředěna pomocí PCR H₂O.

3.6.3 Kvantitativní polymerázová řetězová reakce v reálném čase (qRT-PCR)

Reakce byla provedena v triplicátech. Ke každému vzorku byla vytvořena i negativní kontrola. Pro qRT-PCR byla použita 384jamková destička (Roche). Do každé jamky bylo přidáno 2,5 µl 2x TaqManTM Gene Expression Master Mix (Thermo Fisher), 0,25 µl 20x probe (Thermo Fisher, viz. Tabulka) a 2,25 µl připravené cDNA. Destička byla krátce stočena pomocí centrifugy, přelepena fólií a umístěna do přístroje LightCycler 480 II (Roche), ve kterém probíhala reakce.

Použité proby (Thermo Fisher)

Proba	Kat. č.
GUSB	Hs00939627_m1
RPLP0	Hs00420895_gH
VEGF	Hs00900055_m1
EPAS1 (HIF2 α)	Hs01026149_m1

3.6.4 Zpracování výsledků qRT-PCR

Výsledky qRT-PCR byly zpracovány pomocí metody $\Delta\Delta C_q$:

$$\Delta C_q = C_q(\text{cílová}) - C_q(\text{referenční; housekeeping gen})$$

$$\Delta(\Delta C_q) = \Delta C_q(\text{stimulovaná}) - \Delta C_q(\text{kontrola})$$

$$\Delta C_q \text{ exprese} = 2^{-\Delta(\Delta C_q)}$$

3.7 Colony assay

Pro izolaci myších hematopoetických kmenových buněk z kostní dřeně byly použity 2 myši (C57/BL6). Myši byly chovány ve Zvěřinci ÚMG. Izolovány byly *femur* a *tibia*, které byly následně pomocí pinzety a skalpelu očištěny od svalů. Kosti byly zbaveny okrajových částí, pro experiment byla použita jen prostřední část. Do menší zkumavky byla vytvořena jehlou drobná dírka a následně vložena kost. Menší zkumavka byla následně vložena do větší zkumavky a centrifugována 5-10 min při 4000 rpm. Po centrifugaci zůstala kost v malé zkumavce, zatímco kostní dřeň ve větší zkumavce.

Ke spočítání buněk byla použita Bürkerova komůrka. K buňkám, které byly počítány, byla přidána 3% kyselina octová (Sigma-Aldrich), která lyzuje diferencované červené krvinky. Tímto způsobem ve zkumavce zůstaly pouze nediferencované kmenové buňky a progenitory, které mohly být spočítány. Buňky byly dále naředěny v médiu IMDM s 2% FBS (Thermo Fisher). Buňky byly rozděleny do šesti zkumavek, do kterých byl přidán inhibitor HIF2 α (C2) v následujících koncentracích: 0 μ M, 0,1 μ M, 1 μ M, 5 μ M, 10 μ M a 100 μ M. Odpovídající množství DMSO (Sigma-Aldrich) bylo přidáno do šesti kontrolních vzorků.

1x10⁵ buněk bylo nasazeno do komerčního metylcelulóзовého média Methocult M3534 (StemCell) s rekombinantními cytokiny pro myší myeloidní progenitorové buňky. K nasazení buněk byla použita speciální injekční stříkačka (StemCell), pomocí které byly buňky přeneseny na 12jamkovou destičku. Před přenesením na destičku byly buňky promíchány v médiu, aby došlo k jejich dostatečnému rozmístění. Pro každou jamku byl použit cca 1 ml metylcelulóзовého média. S médiem se pracovalo velice opatrně, aby se nevytvořily nežádoucí bubliny. Alespoň jedna jamka v destičce byla vždy ponechána pro vodu, aby médium nevysychalo. Buňky byly kultivovány při 37 °C v 5% CO₂ v inkubátoru Sanyo po dobu 14 dní a poté byl analyzován pomocí mikroskopu EVOS™ XL (objektiv 4x) celkový výsledek vytvořených kolonií a počet červených progenitorových kolonií, BFU-E.

3.8 Spektrofotometrické měření hemoglobinu

Před zahájením experimentu bylo vždy nutné buňky spočítat. Buňky byly počítány v Bürkerově komůrce s použitím mikroskopu (IX 71 Olympus). Pro počítání bylo vždy použito 100 μ l suspenze buněk.

Pro experimenty bylo použito několik buněčných linií HEL s knock-outem genu pro HIF2 α . Pro srovnání byla použita i původní buněčná linie HEL. Z každé buněčné linie bylo použito alespoň 200 000 buněk. Buňky byly přeneseny do 15ml falkonek (TPP) a peletovány

centrifugací při 2000 rpm po dobu 2 minut. Původní médium bylo odsáto. K buňkám bylo přidáno nové DMEM médium. Pro kultivaci buněk byla použita 6jamková destička (TPP). Do každé jamky bylo přeneseno 100 000 buněk a následně přidány 4 μ l heminu (Sigma-Aldrich). Jako kontrola byla použita ještě jedna stejná destička bez heminu, do které byly přidány 4 μ l DMSO. Buňky byly inkubovány při 37 °C v 5% CO₂ v normoxii v inkubátoru Sanyo po dobu 3 dnů. Po inkubaci byly buňky přeneseny do 15ml falkonek (TPP) a peletovány centrifugou při 2000 rpm 2 min. Peleta byla 3x promyta v 1 ml 1x PBS, poté resuspendována ve 120 μ l PBS. Pro měření hemoglobinu byl použit Hemoglobin Assay Kit (Sigma-Aldrich). Měření probíhalo na 96jamkové destičce (TPP). Vše bylo provedeno v duplikátech. Do první jamky bylo přidáno 50 μ l H₂O, do druhé 50 μ l kalibrátoru. Do obou jamek bylo přidáno ještě 200 μ l H₂O. Do dalších jamek byly přeneseny jednotlivé vzorky a ke každému vzorku bylo přidáno 200 μ l reagentu. Vzorky byly inkubovány při pokojové teplotě po dobu 5 min a poté změřeny. Spektrofotometrické měření bylo provedeno v přístroji Envision (Perkin-Elmer) při 400 nm.

3.8.1 Vyhodnocení výsledků

$$\text{koncentrace hemoglobinu} = \frac{(A_{400}\text{vzorek}) - (A_{400}\text{blank})}{(A_{400}\text{kalibrátor}) - A_{400}\text{blank}} \times 100 \text{ mg/dL} \times \text{df}$$

100 mg/dL = koncentrace zředěného kalibrátoru

df = dilution factor (např. 100 pro krevní vzorky)

conversion factors pro hemoglobin: 1 mg/dL = 0,156 μ M, 0,001 % nebo 10 ppm.

3.9 Měření apoptózy

K jednomu experimentu bylo použito 60 000 buněk (buněčná linie HEL), které byly spočítány pomocí Bürkerovy komůrky. Experiment byl prováděn vždy v triplicátech. Buňky byly kultivovány na dvou bílých 96jamkových destičkách (TPP), z nichž jedna byla následně inkubována v normoxii (20 % O₂) a druhá v hypoxii (5 % O₂). Do každé jamky bylo přeneseno 3000 buněk ve 100 μ l DMEM média. K buňkám byly přidány jednotlivě následující komponenty: HIF2 α inhibitor (C2, 2 μ M), hemin (40 μ M), erythropoietin (10 U/ml) a kombinace heminu/C2 a EPO/C2. Jako kontrolní sloužily buňky bez přidané komponenty a buňky ovlivněné DMSO (0,01 %). Takto byly buňky inkubovány po dobu 6 dnů. Poté byla apoptóza měřena pomocí kitu Caspase-Glo® 3/7 (Promega) v den experimentu, v den 3 a v den 6. Bylo postupováno podle návodu výrobce kitu. Do každé jamky bylo v den měření

přidáno 20 µl Caspase-Glo® 3/7 Reagentu, jemně promícháno a inkubováno 30 minut ve tmě při pokojové teplotě. Luminiscence byla změřena pomocí přístroje Envision.

3.10 Příprava buněčné linie HEL s knock-outem *HIF2α* genu pomocí CRISPR/Cas9 technologie

3.10.1 Příprava CRISPR plasmidu (pXPR) a reportérového (pART) plasmidu

Krátké oligonukleotidy byly navrženy pomocí softwaru Primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>).

Pro přípravu lentivirového CRISPR plasmidu bylo použito 5 µl (5 µg) pXPR (CRISPR) plasmidu, 1 µl FastDigest BsmBI (Fermentas), 20 µl ddH₂O, 3 µl FastDigest pufru a 1 µl FastAP (Fermentas).

Pro přípravu reportérového pART plasmidu bylo použito 5 µl (5 µg) pART plasmidu, 1 µl PstI, 20 µl ddH₂O, 3 µl FastDigest pufru a 1 µl FastAP (Fermentas).

Vzorky byly inkubovány při 37 °C po dobu 30 min, aby došlo k naštěpení plasmidů.

Sekvence oligonukleotidů

Název oligonukleotidů	Sekvence 5'-3'	Směr
hEPAS1_guide#1F	CACCGCAAGGCCTCCATCATGCGAC	Forward
hEPAS1_guide#1R	AAACGTCGCATGATGGAGGCCTTGC	Reverse
FhEPAS1_g1_pART	CAAGGCCTCCATCATGCGACTGGCGAT	Forward
RhEPAS1_g1_pART	CGCCAGTCGCATGATGGAGGCCTTG	Reverse

Tyto oligonukleotidy obsahující sekvenci gRNA byly fosforylovány a spojeny na principu komplementarity (annealing), tak aby vytvořily odpovídající úsek DNA. Pro každou z reakcí bylo použito 1 µl oligonukleotidů 1 (100 µM), 1 µl oligonukleotidů 2 (100 µM), 1 µl T4 PNK pufru, 0,5 µl T4 PNK. Reakce byly vždy doplněny vodou (ddH₂O) do celkového objemu 10 µl. Zkumavky byly vloženy do termocykléru (Bio-Rad, T100) s následujícím nastavením:

37 °C 30 min

95 °C 5 min a snižování teploty na 25 °C rychlostí 5 °C/min

Fosforylované a pospojované krátké oligonukleotidy byly před ligační reakcí zředěny vodou (ddH₂O) v poměru 1 : 20. Pro každou z ligačních reakcí bylo použito 1 µl naštěpeného plasmidu (pATR, pXPR), 1 µl oligonukleotidů, 1 µl Quick Ligase pufru, 7 µl ddH₂O a 1 µl Quick ligázy. Zkumavky byly poté inkubovány 10 min při pokojové teplotě.

3.10.2 Transformace bakterií připravenou plasmidovou DNA (pXPR, pART)

Pro transformaci DNA byly použity ENDURO (Lucigen) kompetentní bakteriální buňky přímo určené pro transformaci lentivirálních vektorů. Bylo postupováno dle protokolu popsaného dále v kapitole 3.10.9.2 Transformace.

3.10.3 Genotypování bakteriálních kolonií (colony PCR)

Jednotlivé vytvořené bakteriální kolonie byly genotypovány pomocí colony PCR. Pro každou z reakcí bylo použito 5 µl Elizyme Master Mix (Elisabeth Pharmacon), 4 µl betainu, 1 µl primerů a 1 µl DNA (přenesení bakteriální kolonie pomocí špičky pipety a jemné promíchání).

Jako pozitivní kontrola byla použita DNA z původní buněčné linie HEL. Jako negativní kontrola sloužila reakce se všemi reagensy bez přidané DNA. Vzorky byly vloženy do termocykléru a na přístroji byl nastaven program s následujícím nastavením:

- 1) 95 °C 3 min
- 2) 95 °C 30 s
- 3) 60 °C 30 s
- 4) 72 °C 10 s
- 5) 72 °C 3 min

Kroky 2) – 4) proběhly ve 30 opakováních.

Po proběhnutí PCR reakce byly vzorky nanášeny na 3% agarózový gel. Na jeden gel bylo použito 100 ml 1x SB pufru a 3 g agarózy (Thermo Fisher). Po povaření směsi byl ke gelu ještě přidán 1 µl barvičky „stain G“ (Biotech). Do první jamky byl napipetován LR (Low range) ladder (Thermo Fisher), do ostatních jamek postupně jednotlivé vzorky. Na elektroforetickém zdroji bylo nastaveno 120 V a 400 mA. Elektroforéza probíhala po dobu 30 min.

Primery použité pro PCR

Všechny použité primery byly navrženy v programu Primer3 (na webové stránce: <http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>)

Název genu	Sekvence 5'-3'	Směr
<i>EPAS1 (HIF2α)</i>	TCTATGAGCTGGCCCATGAG	Forward
<i>EPAS1 (HIF2α)</i>	GAGGAGAGGAGCTTGTGTG	Reverse

3.10.4 Mini prep a Midi prep (izolace plasmidové DNA)

Po výběru dvou pozitivních bakteriálních kolonií pro pXPR a pART byly bakterie kultivovány v LB médiu s ampicilinem (AMP, 100 μ g/ml) po dobu jednoho dne na třepačce (ArgoLab, Verkon) při 37 °C. Plasmidová DNA byla izolována pomocí High Pure Plasmid Isolation kitu (Roche) a kitu pro Midi prep (Thermo Fisher). Postupováno bylo dle návodu výrobce. Koncentrace izolované DNA byla měřena na přístroji Nanodrop.

3.10.4.1 Mini prep

Pro miniprep byl použit High Pure Plasmid Isolation Kit (Roche). 2 ml buněčné suspenze bylo nejprve přeneseno do 2ml zkumavky (Eppendorf) a centrifugováno při 10 000 rpm a 20 °C po dobu 5 min. Supernatant byl odsát a k buňkám bylo přidáno 250 μ l Suspension Buffer. Zkumavka byla vortexována, čímž došlo k resuspendování pelety a poté bylo přidáno ještě 250 μ l Lysis Buffer. Takto byla uzavřená zkumavka mírně protřepána a inkubována 5 min při 25 °C. Dále bylo přidáno 350 μ l Binding Buffer, který byl od začátku práce inkubován na ledu. Zkumavka byla opět mírně protřepána a inkubována v ledničce (4 °C) po dobu 5 min. Po inkubaci byl vzorek cetrifugován při 10 000 rpm a 20 °C po dobu 10 min. Vzniklý supernatant byl přenesen na kolonku a centrifugován 1 min při 10 000 rpm. Tekutina proteklá přes kolonku byla vylita a na kolonku bylo navíc přidáno 500 μ l Wash Buffer I. Znovu došlo k centrifugaci 1 min při 10 000 rpm, tekutina byla vylita, na kolonku přidáno 700 μ l Wash Buffer II a opět centrifugace 1 min při 10 000 rpm. Naposledy byla tekutina vylita a kolonka centrifugována stejným způsobem. V posledním kroku byla kolonka přenesena do nové 1,5ml centrifugační zkumavky (Eppendorf) a na kolonku bylo nanášeno 30 μ l Elution Buffer. Takto byla kolonka ponechána 1 min a nakonec centrifugována 1 min při 10 000 rpm.

3.10.4.2 Midi prep

Midiprep byl proveden pomocí kitu (Thermo Fisher). Nejprve bylo médium s buňkami přelito do speciální centrifugační nádoby a centrifugováno 10 min při 3000 rpm a pokojové teplotě. Supernatant byl odstraněn a k vytvořené peletě byly přidány 3 ml Cell Resuspending Buffer. Vzorek byl důkladně vortexován, aby byla peleta resuspendována a přenesen do 15ml falkonky. K tomu byly navíc přidány 4 ml Lysis Buffer. Falkonka byla uzavřena, protřepána a inkubována 5 min. Poté byly přidány 4 ml Precipitation Buffer, falkonka byla protřepána a centrifugována při 3000 rpm a pokojové teplotě po dobu 10 min. Během centrifugace byla připravena speciální kolonka s novou 15ml falkonkou a kolonka byla až po okraj naplněna pomocí Equilibration Buffer, který kolonkou postupně prokapal do falkonky. Z centrifugované falkonky byla opatrně odstraněna vzniklá bílá sraženina pomocí pipety a pečlivě byla odebrána jen tekutina bez sraženiny. Tato tekutina byla přenesena na kolonku, kterou pomalu prokapala. Po prokapání byla kolonka po okraj naplněna pomocí Wash Buffer a opět ponechána prokapat. Tento krok byl proveden znovu a následně byla pod kolonkou vyměněna 15ml falkonka za novou. Na kolonku bylo přidáno 5 ml Elution Buffer. Po prokapání kolonkou bylo do falkonky přidáno 3,5 ml izopropanolu a falkonka byla centrifugována 30 min při pokojové teplotě a 8000 rpm. Supernatant byl opatrně odstraněn a peleta promyta ve 200 μ l 70% ethanolu. Vzorek byl naposledy centrifugován 1 min při 3000 rpm. Peleta byla sušena 10 min při 60 °C a poté bylo přidáno 300 μ l vody (ddH₂O). Peleta byla znovu sušena stejným způsobem a ponechána v lednici po dobu 1 dne.

3.10.5 Transfekce pomocí Lipofectaminu 2000 a Lipofectaminu 3000

K transfekci buněk Lipofectaminem byla použita 6jamková destička. Transfekovány byly buňky z lidské embryonální ledviny HEK293. Ke každé transfekci bylo použito 500 000 buněk. Koncentrace DNA byla předem změřena na přístroji Nanodrop a přepočítána na hodnotu objemu v μ l. Celý experiment byl proveden v duplikátech a všechny buňky byly měřeny na průtokovém cytometru (LSRII, BD Biosciences) po 3 dnech inkubace při 37 °C.

Při transfekci Lipofectaminem 2000 bylo nejprve přeneseno 6 μ l transfekčního činidla do 100 μ l média Opti-MEM® (Thermo Fisher) – připraveno pro každou reakci, celkem tedy 3x. Zároveň byly připraveny tři jiné zkumavky:

- 1) 1,6 μ g DNA pXPR (CRISPR) ve 100 μ l média Opti-MEM®
- 2) 1,6 μ g DNA pART ve 100 μ l média Opti-MEM®

3) 0,8 µg pXPR a 0,8 µg pART ve 100 µl média Opti-MEM®

Připravená DNA v médiu byla následně přidána k transfekčnímu činidlu a inkubována po dobu 5 min při pokojové teplotě. Po inkubaci byla DNA s transfekčním činidlem přidána k buňkám na 6jamkovou destičku a inkubována 2-4 hod. Následně bylo buňkám vyměněno médium za nové DMEM médium.

Protokol transfekce Lipofectaminem 3000 je mírně rozdílný. Transfekční činidlo bylo ve dvou zkumavkách přidáno k médiu Opti-MEM®. V první zkumavce bylo smícháno 125 µl média Opti-MEM® a 3,75 µl transfekčního činidla. V druhé zkumavce bylo 7,5 µl média Opti-MEM® a 3,75 µl transfekčního činidla – připraveno celkem 3x. Zároveň byly opět připraveny tři zkumavky:

1) 5 µg DNA pXPR (CRISPR) v 250 µl média Opti-MEM® a 10 µl transfekčního činidla

2) 5 µg DNA pART v 250 µl média Opti-MEM® a 10 µl transfekčního činidla

3) 2,5 µg pXPR a 2,5 µg pART v 250 µl média Opti-MEM® a 10 µl transfekčního činidla

125 µl DNA s médiem a transfekčním činidlem bylo přidáno vždy do obou připravených zkumavek s médiem a transfekčním činidlem, následně inkubováno po dobu 15 min při pokojové teplotě. Nakonec bylo vše jednotlivě přidáno k buňkám na 6jamkové destičce.

3.10.6 Fixace buněk na průtokový cytometr

Nejprve byly buňky centrifugovány 5 min při 5000 rpm a staré médium bylo odsáto. Poté byly buňky resuspendovány v 1 ml PBS s 1% FBS a znovu centrifugovány při stejných podmínkách. PBS bylo odsáto a buňky resuspendovány ve 150 µl PBS bez FBS. Nakonec bylo k buňkám na velice mírném vortexu pomalu přikapáváno 350 µl 96% ethanolu vychlazeného na -20 °C. Před měřením na průtokovém cytometru byly buňky takto inkubovány alespoň 1 hod při 4 °C.

3.10.7 AMAXA nukleofekce a sorting buněk

Transfekce HEL buněk byla provedena pomocí tzv. AMAXA nukleofekce. K tomu byl použit Amaxa Cell Line Nucleofector Kit V (Lonza). Pro jednu reakci bylo použito 2×10^6 buněk, které byly přeneseny do 1,5ml centrifugační zkumavky (Eppendorf) a stočeny při 2100 rpm. Médium bylo odsáto a peleta resuspendována ve 100 µl předem připraveného Nucleofector Solution (dle protokolu výrobce). Poté byl k buňkám přidán 1 µg pXPR DNA a 1 µg pART DNA. Tato směs buněk a DNA byla přenesena do specifické kyvety a umístěna do

elektroporačního přístroje (vše součástí kitu výrobce). Byly použity dva elektroporační protokoly, které jsou předem nastaveny na přístroji výrobcem (Y013, X005). Po dokončení elektroporace byly buňky ihned přeneseny do 3 ml kultivačního média DMEM a kultivovány na 6jamkové destičce.

Po nukleofekci byl proveden tzv. single cell sorting pomocí průtokové cytometrie (FACS, fluorescence-activated cell sorting). K tomu byly použity dvě 96jamkové destičky. Do každé jamky bylo nejprve přeneseno 200 μ l média DMEM. Buňky použité na nukleofekci byly přeneseny do 15ml uzavíratelné centrifugační zkušavky a centrifugovány 2 min při 2100 rpm a 24 °C. Kultivační médium bylo odsáto, peleta promyta ve 3 ml PBS a poté resuspendována v 0,5 ml PBS. Single cell sorting byl proveden na průtokovém cytometru FACS - BD Influx vysokorychlostní sorter (BD Biosciences).

Přístroj do každé jamky z destičky umístil přesně jednu buňku. Buňky byly dále několik týdnů kultivovány v inkubátoru Sanyo a pravidelně sledovány. Po nárůstu buněk byly jednotlivé buněčné linie přemístěny na destičky s většími jamkami a do kultivačních lahví (Thermo Fisher).

3.10.8 Výběr možných pozitivních klonů na základě PCR

Na jednu PCR reakci bylo použito 5 μ l 2x Elizyme Master Mix (Elisabeth Pharmacon), 3 μ l betainu, 1 μ l primerů (Sigma) a 1 μ l DNA.

Použité primery

Název genu	Sekvence 5'-3'	Směr
<i>EPAS1</i>	TCTATGAGCTGGCCCATGAG	forward
<i>EPAS1</i>	GAGGAGAGGAGCTTGTGTG	reverse

Jako pozitivní kontrola byla použita DNA z původní buněčné linie HEL, u kterých nebyl proveden knock-out. Jako negativní kontrola sloužila reakce se všemi reagensy bez přidané DNA. Vzorky byly vloženy do termocykléru a na přístroji byl nastaven program s následujícím nastavením:

- 1) 95 °C 3 min
- 2) 95 °C 30 s
- 3) 60 °C 30 s

4) 72 °C 10 s

5) 72 °C 3 min

Kroky 2) – 4) proběhly ve 30 opakováních (stejný program jako u colony PCR). U elektroforézy bylo také postupováno stejně, jak již bylo popsáno v kapitole colony PCR.

3.10.9 Transformace a sekvenace

Na základě výsledků PCR bylo vybráno několik klonů, které se zdály být pozitivní na pXPR a pART. U DNA těchto klonů byla nejprve provedena PCR reakce stejným způsobem jako v předchozím kroku a vzorky byly nanесeny na 3% agarózový gel. Po dokončení elektroforézy byly vzorky za pomoci skalpelu opatrně vyříznuty z gelu a DNA byla purifikována. K přečištění (purifikaci) DNA fragmentů od agarózového gelu byl použit High Pure PCR Product Purification Kit (Roche). Postupováno bylo dle protokolu výrobce kitu.

3.10.9.1 Purifikace DNA z agarózového gelu

K purifikaci DNA z agarózového gelu byl použit High Pure PCR Product Purification Kit (Roche). Izolovaná DNA v agarózovém gelu byla přenesena do 1,5ml centrifugační zkumavky (Eppendorf), do které bylo přidáno 300 µl Binding Buffer (na každých 100 mg agarózy, vše součástí kitu). Zkumavka byla inkubována po dobu 10 min při 56 °C a v průběhu toho každé 2 min vortexována. Po dokonalém rozpuštění agarózového gelu bylo přidáno 150 µl isopropanolu (na každých 100 mg agarózy) a znovu silně vortexováno. Celý obsah byl přenesen na filtr v nové zkumavce. Zkumavka s filtrem byla centrifugována 1 min při pokojové teplotě a maximální rychlosti. Tekutina proteklá přes filtr byla odstraněna a na filtr, který byl přenesen do nové zkumavky, bylo přidáno 500 µl Wash Buffer. Zkumavka s filtrem byla znovu centrifugována při stejných parametrech, bylo přidáno ještě 200 µl Wash Buffer a ještě jednou centrifugováno. Proteklá tekutina byla vylita a zkumavka znovu centrifugována. Filtr byl přenesen do nové zkumavky a na filtr bylo přeneseno 20 µl Elution Buffer. Takto byl vzorek centrifugován 1 min při pokojové teplotě a maximální rychlosti. Po centrifugaci zkumavka obsahovala vyčištěnou DNA.

3.10.9.2 Transformace

Přečištěné DNA fragmenty byly použity pro ligační reakci, která byla provedena v 0,1ml zkumavkách (Eppendorf). Pro tuto ligaci a následně i transformaci byl použit pGEM®-T Easy Vector systém (Promega). Každá ligační reakce obsahovala 5 µl 2x Rapid ligačního pufru, 0,5 µl pGEM®-T Easy Vector (50ng), 5 µl PCR produktu a 1 µl T4 DNA ligázy (3 jednotky

Weiss/ μl). Reakce byla doplněna vodou (ddH_2O) do celkového objemu 11,5 μl . Takto byly vzorky inkubovány přes noc při pokojové teplotě.

Transformace proběhla v Top10 vysoce efektivních kompetentních buňkách (Thermo Fisher). Zamražené buňky byly nejprve ihned přeneseny na led. Po 5 minutách bylo 100 μl suspenze buněk přeneseno do předem vychlazené 1,5ml zkumavky (Eppendorf) a k tomu bylo přidáno 11,5 μl předem připravené ligační směsi. Zkumavka byla uzavřena víčkem, opatrně protřepána a ponechána na ledě po dobu 20 min. Poté byly buňky vystaveny teplotnímu šoku ve vodní lázni (42 °C) na 45-50 s a zkumavka byla ihned přenesena zpět na led na 2 min. Nakonec bylo k buňkám přidáno 200 μl LB média s AMP. Takto byly buňky inkubovány na třepačce při 37 °C po dobu 1 hod a následně přeneseny na Petriho misku s AMP.

Buňky byly kultivovány v LB médiu a DNA byla izolována pomocí mini prepu stejným způsobem, jak již bylo popsáno v předchozích kapitolách této práce. Izolovaná DNA byla poslána na sekvenaci společnosti SEQme.

3.10.10 Zamrazení buněk

Vytvořené buněčné linie HEL byly zamrazovány v médiu, které se skládalo z kompletního média DMEM a DMSO v poměru 9 : 1. Pro zamrazení byly použity speciální zamrazovací zkumavky (Thermo Fisher). Zkumavky byly umístěny do zamrazovací krabičky, ve které dochází k postupnému snižování teploty. Buňky byly zamrazeny na -80 °C.

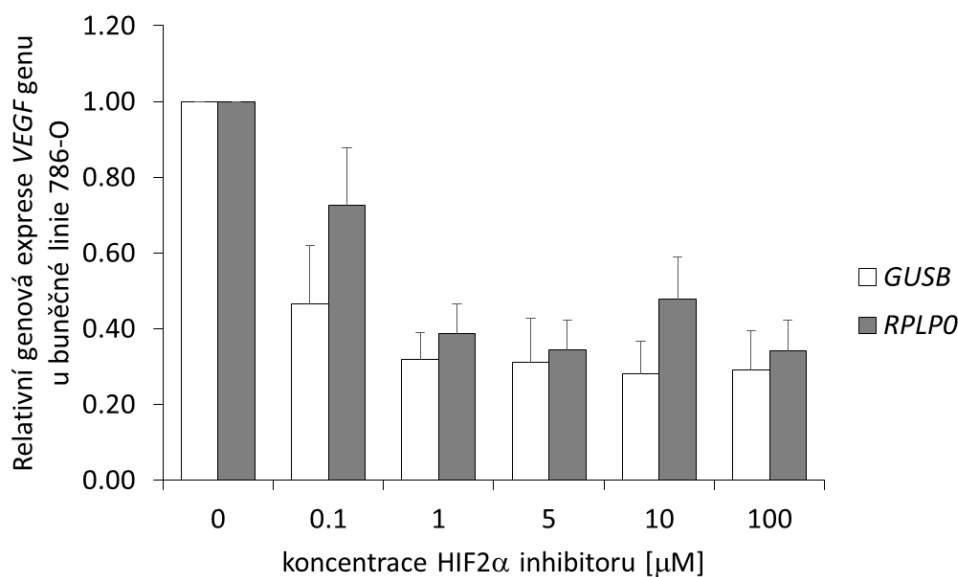
4. Výsledky

Tato diplomová práce se skládá ze dvou hlavních částí. V první fázi byly provedeny experimenty s použitím alosterického inhibitoru HIF2 α . K tomu byla využita lidská buněčná linie HEL, buněčná linie 786-O izolovaná z renálního karcinomu a primární myší erytroidní buňky izolované z kostní dřeně. Druhá fáze diplomové práce měla za úkol vytvořit buněčnou linii HEL s knock-outem genu pro HIF2 α (*EPAS1*).

4.1 Experimenty s použitím alosterického inhibitoru HIF2 α

K několika experimentům byl v této práci použit specifický HIF2 α inhibitor. Jedná se o alosterický inhibitor, který byl již dříve použit v jiných experimentech (Scheuermann et al., 2013). Tento inhibitor se váže do vnitřní dutiny HIF2 α PAS-B, čímž zabrání dimerizaci HIF2 α s jeho β podjednotkou, která je nutná pro funkci tohoto proteinu. Účelem použití tohoto inhibitoru bylo zjistit, k jakým změnám dojde při inhibici funkce HIF2 α .

K analýze genové exprese pomocí qRT-PCR byl použit Master Mix a proby od společnosti Thermo Fisher. Funkce této metody je založena na hydrolýze specifické fluorescenční sondy komplementární k amplifikované DNA. Při této metodě se detekuje fluorescence, která se uvolňuje v přímé úměře na množství amplifikované DNA v PCR reakci. Výsledky byly zpracovány metodou $\Delta\Delta C_q$ (popsáno v kapitole Metody).

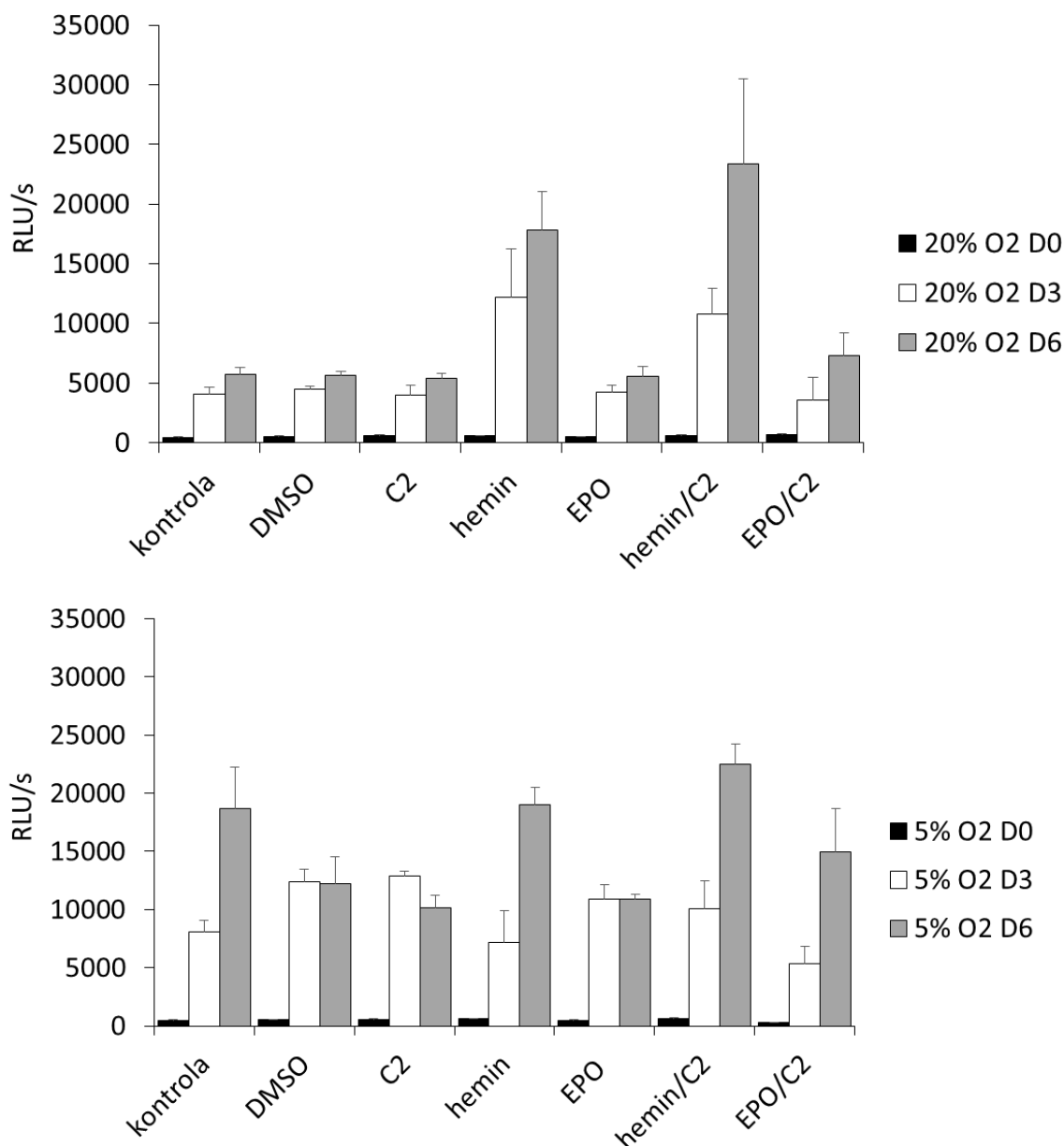


Obr. 4.1 Funkční test alosterického inhibitoru HIF2 α (compound 2, C2) – genová exprese VEGF (cílový gen HIF2) u buněčné linie 786-O izolované z renálního karcinomu. Buněčná linie byla inkubována s inhibítorem HIF2 α v různých koncentracích po dobu 3 dnů. Genová exprese byla analyzována pomocí qRT-PCR. K měření byly využity dva „housekeeping geny“ – GUSB a RPLP0. Experiment byl proveden v triplikátech.

K otestování účinku HIF2 α inhibitoru byla použita buněčná linie 786-O izolovaná z renálního karcinomu. Byla měřena exprese VEGF (vascular endothelial growth factor), který je jedním z cílových genů HIF2 (Ema *et al.*, 1997). Analýza pomocí qRT-PCR prokázala účinnost specifického HIF2 α inhibitoru. Na grafu lze pozorovat snižující expresi VEGF se zvyšující koncentrací HIF2 α inhibitoru. Při použití koncentrace vyšší než 5 μ M již však exprese více neklesá.

4.1.1 Vliv inhibice HIF2 α na erytroidní diferenciaci buněčné linie HEL (lidská erytroleukemická linie)

Ke stanovení míry apoptózy byl využit speciální kit od společnosti Promega, součástí kterého je Caspase-Glo® 3/7 Reagent přidávaný k analyzovaným buňkám. Tato technika spočívá v měření aktivity kaspázy 3 a 7, při které se uvolňuje substrát luciferázy zvaný aminoluciferin a při této reakci dochází k produkci světla. Díky tomu je po přidání reagentu měřitelná luminiscence buněk.



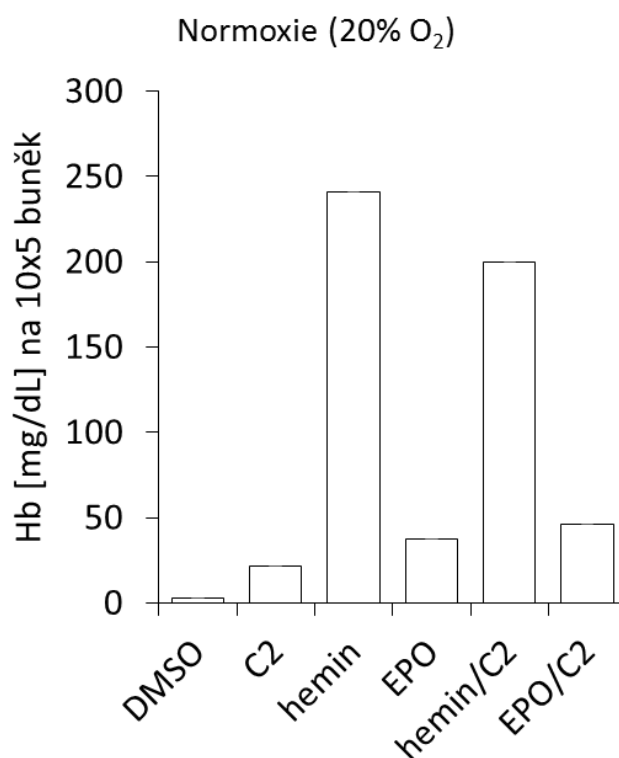
Obr. 4.2 Stanovení apoptózy u HEL buněčné linie. Erytroidní diferenciace byla indukována pomocí HIF2 α inhibitoru (C2, 2 μ M), heminu (40 μ M), erythropoietinu (EPO, 10 U/ml) a kombinací heminu/C2 a EPO/C2 po dobu 6 dnů. Buňky ovlivněné DMSO (0.01 %) byly použité jako kontrola. Apoptóza byla měřena pomocí kitu Caspase-Glo® 3/7 (Promega) na začátku experimentu (D0), v den 3 (D3) a v den 6 (D6). Buňky byly inkubovány v normoxii (20 % O₂) nebo hypoxii (5 % O₂). Výsledek je vyjádřen v relativních luminiscenčních jednotkách za sekundu (RLU/s).

Čím více se buňky diferencovaly, tím více i docházelo k apoptóze, kterou jsme měřili. Proliferace a erytroidní diferenciace byla indukována pomocí erythropoietinu a heminu. V prvním grafu je zobrazen výsledek měření apoptózy u buněk inkubovaných v normoxii, v druhém grafu je zaznamenán výsledek po inkubaci v hypoxii. Nejsilněji byla vyvolána diferenciace buněk heminem, proto byla u těchto buněk i naměřena nejvyšší míra apoptózy.

Buňky inkubované v hypoxii vykazovaly mírné rozdíly oproti buňkám inkubovaným v normoxii. U buněk inkubovaných v hypoxii byla hladina apoptózy mírně zvýšená.

4.1.2 Hemoglobin Assay

Množství hemoglobinu bylo měřeno pomocí tzv. Hemoglobin Assay. K tomu byl využit kit od společnosti Sigma, který je založen na technice Triton®/NaOH. Při této technice je hemoglobin konvertován na kolorimetrický produkt, který měříme při 400 nm.



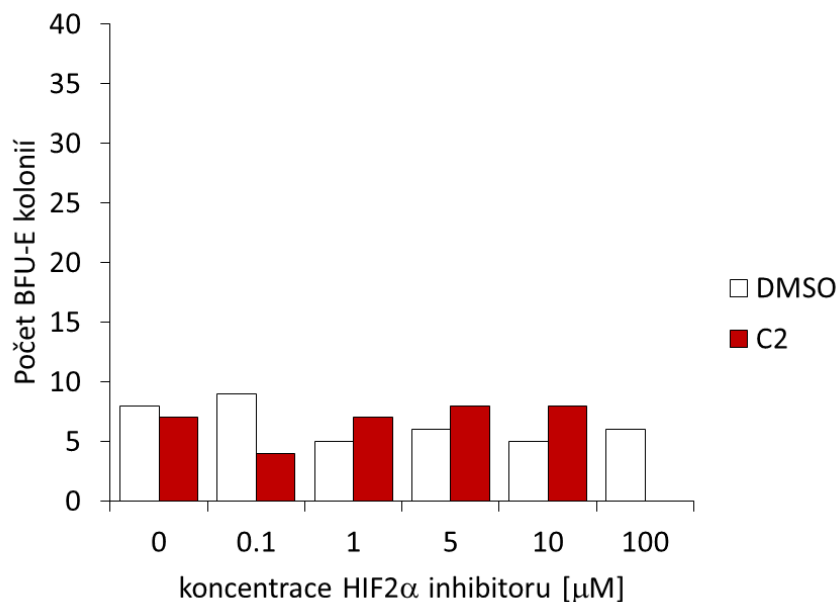
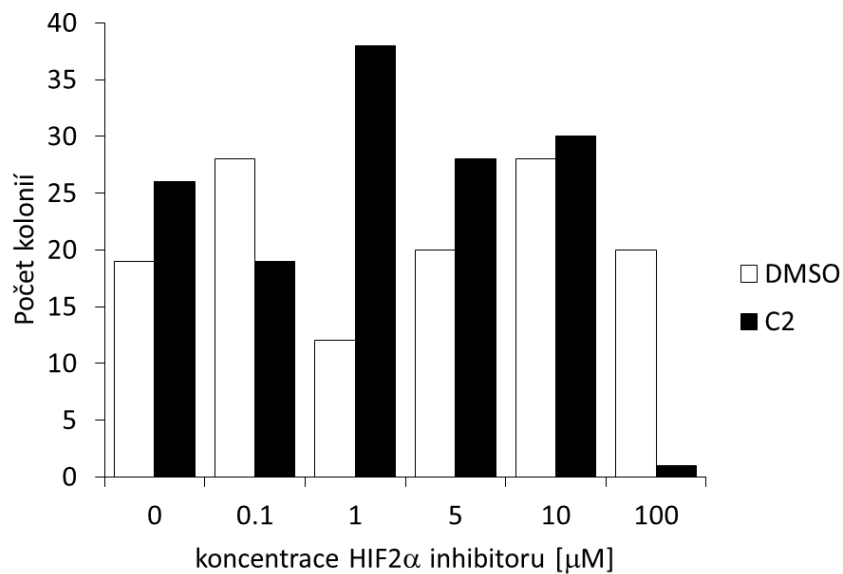
Obr. 4.3 Stanovení množství hemoglobinu u HEL buněčné linie. Erytroidní diferenciace byla indukována pomocí HIF2 α inhibitoru (C2, 2 μ M), heminu (40 μ M), erythropoietinu (EPO, 10 U/ml) a kombinací heminu/C2 a EPO/C2 po dobu 3 dnů v normoxii (20 % O₂). Jako kontrola byly použity buňky ovlivněné DMSO. Buňky byly 3x promyty PBS a množství hemoglobinu bylo změřeno spektrofotometricky pomocí přístroje Envision (Perkin-Elmer) a reagensů v kitu Hemoglobin Assay Kit (Sigma).

Množství hemoglobinu bylo prokazatelně nižší u buněk ovlivněných inhibitorem HIF2 α oproti buňkám, u nichž byla indukována diferenciace pomocí erythropoietinu. Hemin výrazně zvýšil erytroidní diferenciaci buněk, proto byly naměřeny vysoké hodnoty hemoglobinu. I přes použitý inhibitor byla u buněk ovlivněných heminem zaznamenána vysoká míra diferenciace buněk. Při použití kombinace erythropoietinu a inhibitoru nebyl pozorován žádný

významný rozdíl ve srovnání s použitím pouze erythropoetinu. Jako kontrola sloužily buňky s DMSO, jelikož i buňky s inhibitorem HIF2 α byly ovlivněné DMSO, ve kterém je inhibitor zředěn.

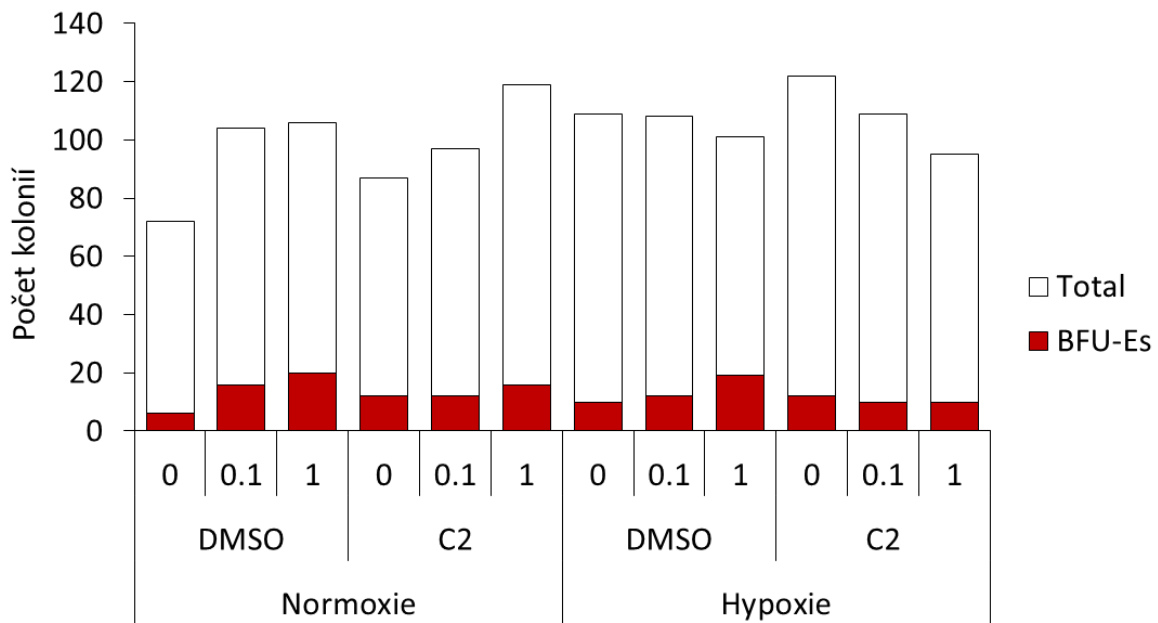
4.1.3 Vliv inhibice HIF2 α na myší erytroidní progenitory (tzv. colony assay)

Colony assay se používá ke kultivaci hematopoetických kmenových a prekurzorových buněk a jejich diferenciaci na terminálně diferencované buňky krevní řady. V tomto experimentu byla colony assay použita pro kultivaci myších hematopoetických buněk a otestování specifického HIF2 α inhibitoru (C2).



Obr. 4.4 Stanovení optimální koncentrace HIF2 α inhibitoru u primárních myších erytroidních buněk. Kostní dřeň byla izolována standardním způsobem (viz. kapitola Metody) a 1×10^5 buněk bylo nasazeno do komerčního metylcelulóзовého média M3534 (StemCell), do kterého jsme přidali 1 U/ml erythropoietinu a různé koncentrace HIF2 α inhibitoru C2 (0 – 100 μ M) a odpovídající množství DMSO do kontrolních vzorků. Buňky byly ponechány v inkubátoru při 37 °C, 5 % CO₂ v normoxii 14 dní, poté byl hodnocen celkový počet vytvořených kolonií a počet červených progenitorových kolonií, tzv. BFU-E (burst forming unit-erythroid).

Nebyl pozorován žádný významný rozdíl v počtu erytroidních progenitorových kolonií BFU-E ani v celkovém počtu všech buněčných kolonií při použití inhibitoru HIF2 α v koncentracích do 10 μ M. Teprve u 100 μ M koncentrace inhibitoru nevznikaly téměř žádné buněčné kolonie. Zdá se, že takto vysoká koncentrace je pro myši buňky letální.



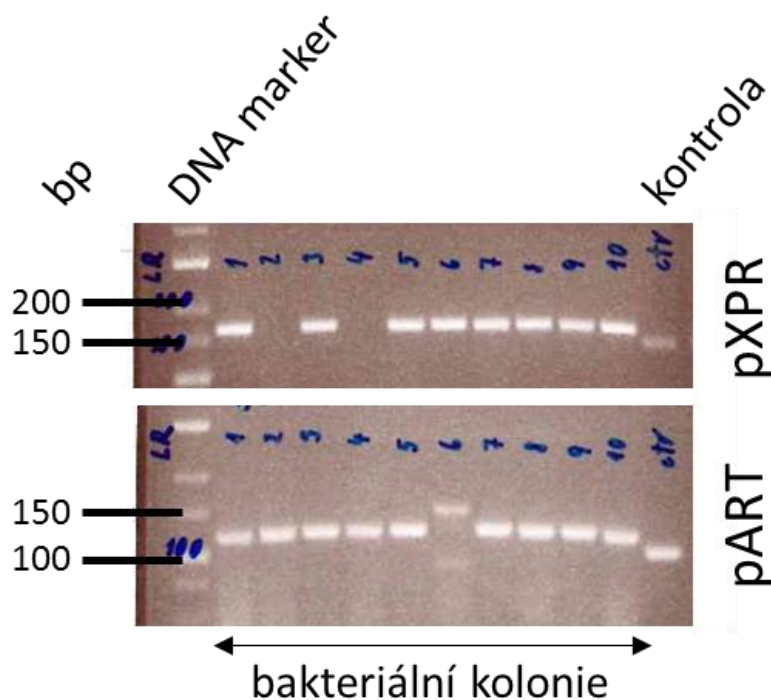
Obr. 4.5 Vliv inhibice HIF2 α na růst primárních myších erytroidních buněk. Kostní dřeň byla izolována standardním způsobem (viz. kapitola Metody) a 1×10^5 buněk bylo nasazeno do komerčního metylcelulózového média M3534 (StemCell), do kterého jsme přidali 10 μ M HIF2 α inhibitoru C2 (do kontrolních vzorků DMSO) a různé koncentrace erythropoietinu (0-1 U/ml). Buňky byly ponechány v inkubátoru při 37 $^{\circ}$ C, 5 % CO $_2$ v normoxii i hypoxii (5 % O $_2$) 14 dní, poté byl hodnocen celkový počet vytvořených kolonií a počet červených progenitorových kolonií, tzv. BFU-E (burst forming unit-erythroid).

Ačkoli celkový počet všech vytvořených kolonií buněk ponechaných v normoxii postupně mírně rostl se zvyšující koncentrací erythropoietinu, výsledek u buněk inkubovaných v hypoxii neměl tuto tendenci. Nebyly zjištěny ani žádné výrazné rozdíly v počtu červených progenitorových kolonií BFU-E inkubovaných v hypoxii i normoxii.

4.2 Příprava buněčné linie HEL s knock-outem *HIF2α* genu pomocí CRISPR/Cas9 technologie

Následující část experimentů byla věnována přípravě buněčné linie s knock-outem genu pro *HIF2α*. K provedení knock-outu byla využita CRISPR(Clustered regulatory interspaced short palindromic repeats)/Cas9 technologie. Tato technika umožňuje cílené zásahy do DNA, kdy krátká sekvencně specifická guide RNA přesně vyhledá místo v cílové DNA, které je následně štěpeno endonukleázou Cas9 (CRISPR associated protein 9).

Navržené krátké oligonukleotidy obsahující sekvenci gRNA byly nejprve fosforylovány a na základě komplementárních sekvencí spojeny (annealing), tak aby vytvořily odpovídající úsek dvouvláknové DNA, který je pak vnesen (ligace) do předem naštěpených plasmidů (pro pXPR BsmBI, pro pART PstI). Transformace probíhala v ENDURO (Lucigen) kompetentních buňkách, které jsou přímo určeny pro transformaci lentivirálních vektorů. Jednotlivé bakteriální kolonie pak byly genotypovány (colony PCR). Byly vybrány dvě pozitivní kolonie pro pXPR a pART, které byly kultivovány v bakteriálním mediu (mini prep, midi prep) a nakonec byla izolována plasmidová DNA o vysoké koncentraci.

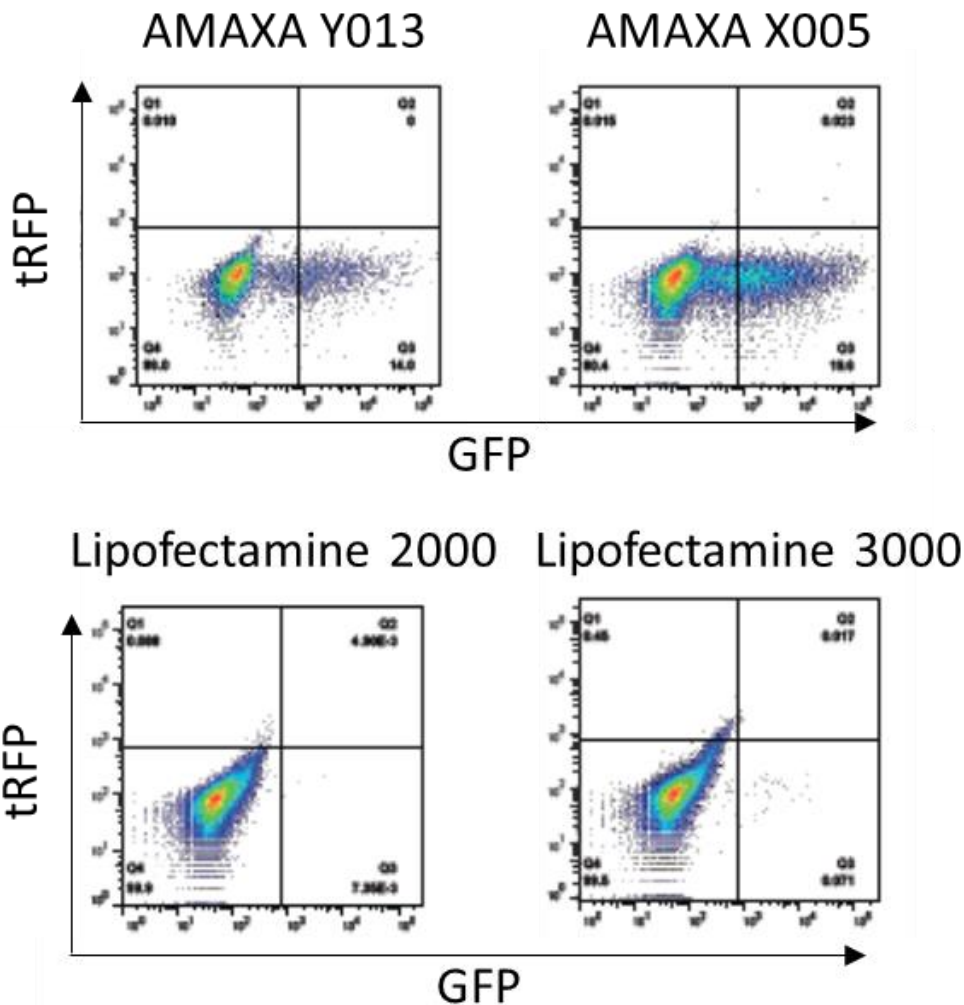


Obr. 4.6 Příprava CRISPR plasmidu (pXPR) a reportérového pART plasmidu. Hodnocení výsledku pomocí PCR.

4.2.1 AMAXA nukleofekce a lipofekce pomocí Lipofectamine 2000 a Lipofectamine 3000

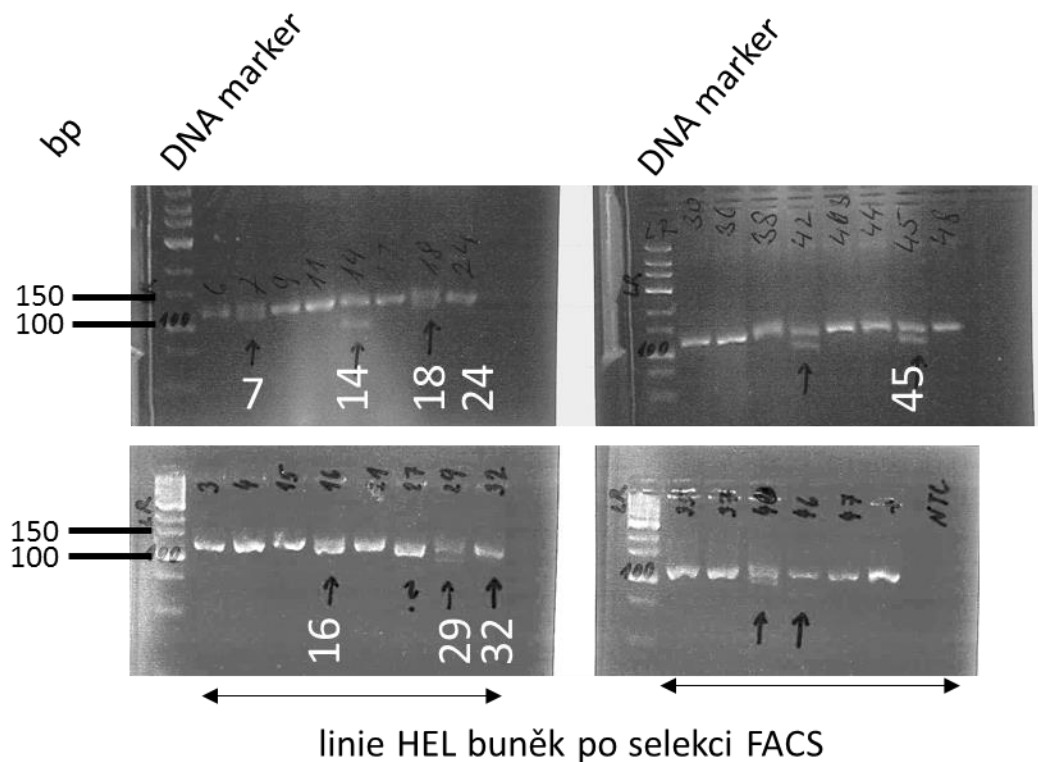
Pro transfekci byla vybrána tzv. AMAXA nukleofekce. Součástí tohoto kitu od společnosti Lonza je i elektroporační přístroj. Tato transfekční technologie využívá metodu elektroporace, při které jsou krátkým intenzivním elektrickým pulsem vytvořeny v membráně buněk póry. Těmito póry tak může do buňky proniknout DNA použitá pro transfekci.

Transfekční reagentie Lipofectamine se používá pro tzv. lipofekci. Při této metodě vytvoří lipidové molekuly ve vodném prostředí okolo plazmidové DNA použité pro transfekci uzavřené struktury – liposomy. Plazmidová DNA izolovaná od vodného prostředí a obklopená lipidovými molekulami může díky tomu proniknout do buňky. Liposomové váčky totiž mohou fúzovat s buněčnou membránou. Pro lipofekci byly testovány reagentie Lipofectamine 2000 a Lipofectamine 3000.



Obr. 4.8 AMAXA nukleofekce a lipofekce HEL buněk. K AMAXA nukleofekci byly využity reagentie a elektroporační přístroj z Amaxa Cell Line Nucleofector Kit V (Lonza). K lipofekci sloužil Lipofectamine 2000 a Lipofectamine 3000. pART plasmid obsahuje GFP (green fluorescent protein), který vytváří zelený signál pozorovatelný pod fluorescenčním mikroskopem nebo pomocí průtokové cytometrie. Pokud CRISPR/Cas9 systém v pXPR plasmidu rozštěpí příslušnou HIF2 α sekvenci, začne navíc produkovat i červený signál (tRFP, turbo Red Fluorescent Protein). Výsledek byl analyzován pomocí průtokového cytometru.

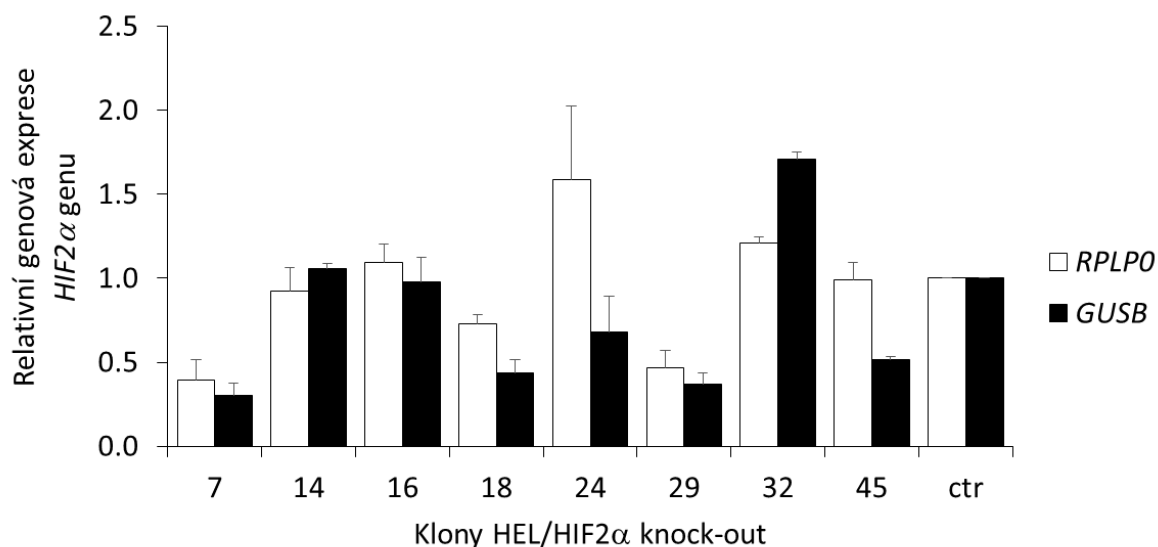
HEL buňky jsou v Laboratoři buněčné a vývojové biologie ÚMG používány v několika projektech a na základě testu, který byl proveden Olgou Babošovou, MSc. bylo zjištěno, že HEL buňky jsou resistantní vůči lipofekci (použité byly roztoky Lipofectamine 2000 a 3000, Thermo Fisher Scientific) a lze je transfekovat jen pomocí tzn. nukleofekce (AMAXA, Lonza). Byly vyzkoušeny dva elektroporační protokoly, které jsou předem nastaveny na přístroji výrobcem (Y013, X005) a jako nejvíce efektivní byl vyhodnocen program X005 - bylo transfekováno přibližně 20 % buněk.



Obr. 4.9 Genotypování získaných HEL klonů (colony PCR).

Po AMAXA nukleofekci následovalo provedení tzv. single cell sortingu pomocí průtokové cytometrie FACS: BD Influx vysokorychlostní sorter (BD Biosciences). Přístroj umístil do každé jamky 96jamkové destičky přesně jednu buňku. V každé jamce tak rostly jednotlivé HEL klony.

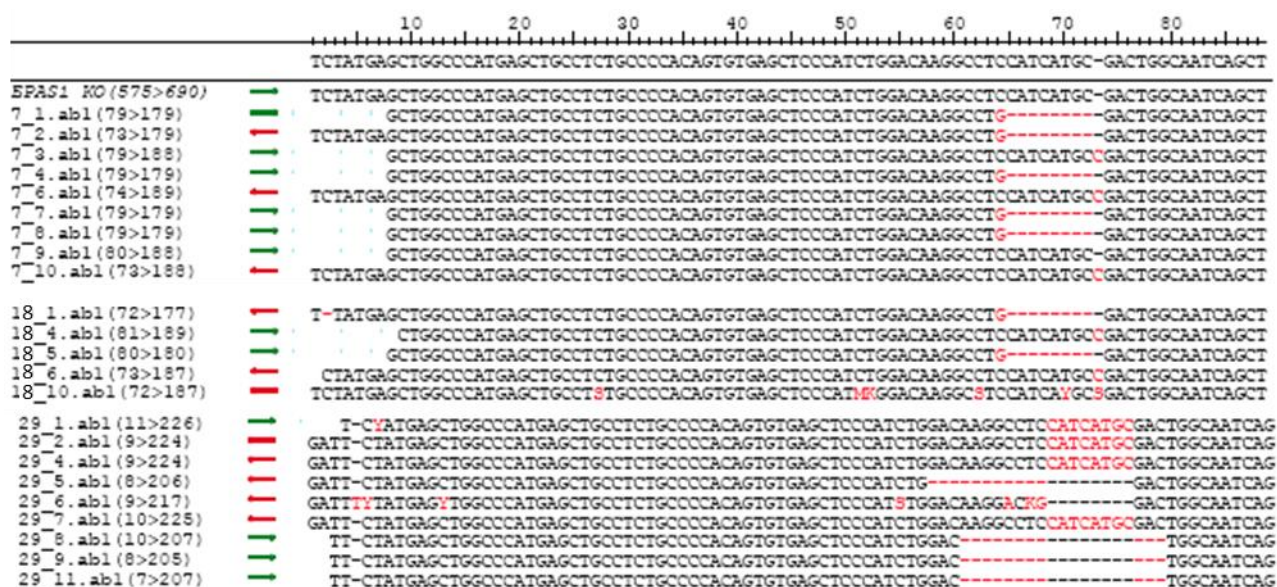
Vybrané HEL klony byly genotypovány pomocí colony PCR. Byly hledány klony, u kterých došlo k nějaké změně oproti původní buněčné linii. U některých klonů lze vidět několik kratších DNA fragmentů rozdělených pomocí elektroforézy. Pro další testování byly proto vybrány klony s označením 7, 14, 16, 18, 24, 29, 32, 45.



Obr. 4.10 Relativní genová exprese *HIF2α* genu u vybraných HEL klonů. Hladina exprese byla vyhodnocena pomocí qRT-PCR. K měření byly využity dva „housekeeping geny“ – *RPLP0* a *GUSB*. Měření pomocí qRT-PCR bylo provedeno v triplikátech.

Abychom zjistili, u kterých klonů buněčné linie HEL byl knock-out úspěšný, změřili jsme relativní genovou expresi *HIF2α* genu u několika vybraných klonů pomocí qRT-PCR. Analýza pomocí qRT-PCR potvrdila sníženou expresi *HIF2α* genu u některých HEL klonů, u kterých byl proveden knock-out. Jako kontrola byla použita původní buněčná linie HEL. Nejnižší exprese byla zaznamenána u klonů s označením 7, 18 a 29. Z toho důvodu byly tyto tři klony vybrány pro další experimenty a sekvenaci.

4.2.2 Sekvenování vybraných HEL klonů



Obr. 4.11 DNA sekvence.

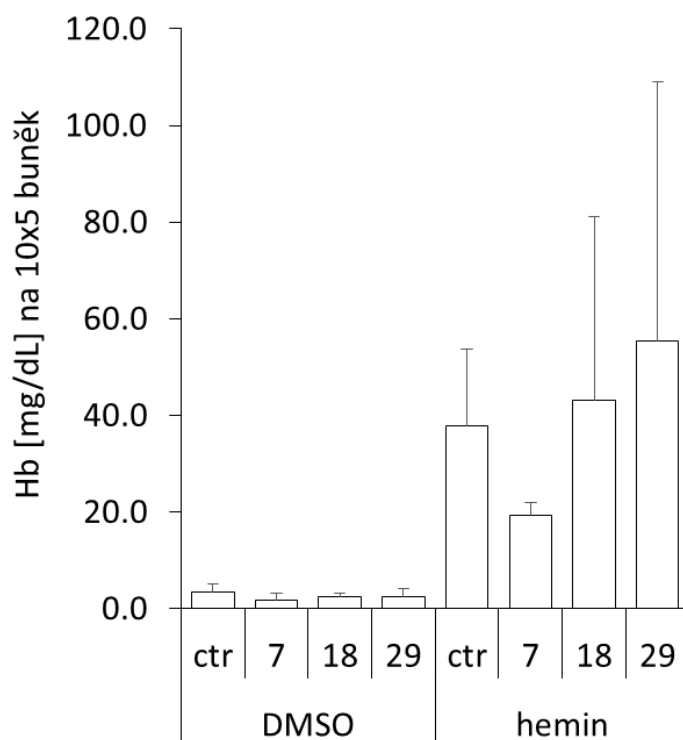
EPAS1_WT
 FYELAH~~EL~~PLPHSVSSHLDKASIMetRLAISFLRTHKLLSSVCSENESEAEADQQMetDNL~~YL~~LKA
 EPAS1_c17.1
 FYELAH~~EL~~PLPHSVSSHLDKAWTGNQLPANTQAPLLSLL**Stop**KRVRSRS**Stop**PADGQLVPESL
 EPAS1_c17.3
 FYELAH~~EL~~PLPHSVSSHLDKASIMetPTGNQLPANTQAPLLNQFALKTSPKPKLTSRWTTCT**Stop**K

EPAS1_WT
 FYELAH~~EL~~PLPHSVSSHLDKASIMetRLAISFLRTHKLLSSVCSENESEAEADQQMetDNL~~YL~~LKA
 EPAS1_c129.1
 FYELAH~~EL~~PLPHSVSSHLDKASIMetRLAISFLRTHKLLSSISLL**Stop**KRVRSRS**Stop**PADGQLVP
 EPAS1_c129.5
 FYELAH~~EL~~PLPHSVSSHLDWQASASCEHTSSSPQSVCSENESEAEADQQMetDNL~~YL~~LKA

Obr. 4.12 Proteinové sekvence.

Vybrané tři klony buněčné linie HEL s provedeným knock-outem genu pro HIF2 α (č. 7, 18, 29) byly osekvenovány. Z obrázku lze vidět, k jakým změnám v DNA sekvenci došlo. Je zde uvedena pro porovnání i DNA sekvence původní buněčné linie („WT, wild type“). Osekvenované DNA sekvence byly převedeny do sekvence proteinové. Můžeme zde pozorovat, že v sekvenci vzniklo několik stop kodónů, díky kterým nemůže být tento gen exprimován v původní podobě. Knock-out byl tedy proveden úspěšně.

4.2.3 Srovnání množství hemoglobinu původní buněčné linie HEL a vytvořené buněčné linie s knock-outem genu pro *HIF2α*



Obr. 4.13 Stanovení množství hemoglobinu u získaných HEL klonů s knock-outem *HIF2α* genu. Erytroidní diferenciace byla indukována pomocí heminu (40 μ M) po dobu 3 dnů. Pro srovnání byly použity buňky ovlivněné DMSO. Jako kontrola sloužila původní buněčná linie HEL. Buňky byly 3x promyty PBS a množství hemoglobinu bylo změřeno spektrofotometricky pomocí přístroje Envision (Perkin-Elmer). K měření byly využity reagentie v kitu Hemoglobin Assay Kit (Sigma). Hodnoty uvedené v grafu byly získány měřením ze čtyř nezávislých experimentů.

Analýza opět potvrdila výrazný vliv heminu na erytroidní buněčnou linii HEL. Hemin indukoval u buněk erytroidní diferenciaci, proto tyto buňky vykazovaly vyšší hodnoty měřeného hemoglobinu. Jak již bylo zmíněno v teoretickém úvodu, *HIF2α* je důležitý pro proliferaci, diferenciaci a viabilitu erytroidních buněk. Předpokládali jsme tedy, že bude stanovené množství hemoglobinu nižší u buněk s knock-outem *HIF2α* genu. Podle tohoto předpokladu však reagovala jen buněčná linie HEL s označením 7. U buněčných linií číslo 18 a 29 bylo naopak pozorováno mírně zvýšené množství hemoglobinu.

5. Diskuze

Základní funkcí erytrocytů je transport kyslíku do všech tkání těla. Hladina kyslíku však není vždy stálá a stav, kdy je kyslíku nedostatek, se nazývá hypoxie. K buněčné adaptaci na tento hypoxický stav slouží transkripční faktor HIF, který ovlivňuje expresi erythropoetinu a mnoha dalších genů regulujících erytropoézu. Pacienti s erytrocytózou, onemocněním vyznačujícím se zvýšeným množstvím erytrocytů a zvýšenou koncentrací hemoglobinu, mají mutace v genech, které kódují HIF2 α , PHD2 a VHL. Tato skutečnost naznačuje důležitou roli HIF2 α v regulaci erytropoézy [shrnutí v (Lee and Percy, 2011)].

Prvním úkolem mé diplomové práce byly experimenty s použitím inhibitoru HIF2 α . K tomu jsme využili specifický HIF2 α inhibitor s označením compound 2 (C2), který byl již dříve popsán v jiné práci (Scheuermann *et al.*, 2013). Jeho funkce je založena na alosterické inhibici proteinu. Jak již bylo řečeno v teoretickém úvodu, aby mohl HIF2 α plnit úlohu transkripčního faktoru a ovlivňovat expresi svých cílových genů, potřebuje nejprve navázat svou β podjednotku a tento aktivní dimer se vytváří pouze za hypoxických podmínek. Použitý inhibitor se váže do vnitřní dutiny HIF2 α PAS-B a tím zabraňuje dimerizaci obou podjednotek nutné pro funkci těchto proteinů. Abychom otestovali účinnost specifického inhibitoru HIF2 α , provedli jsme několik různých experimentů s jeho použitím. Nejdříve bylo nutné určit nejvhodnější koncentraci HIF2 α inhibitoru, abychom zjistili, v jakém množství bude inhibice nejúčinnější. Tohoto zjištění jsme později využili v následujících experimentech. Prokázali jsme účinnost inhibitoru na buňkách 786-0 izolovaných z renálního karcinomu. Účinnost inhibitoru rostla v přímé úměře s jeho zvyšující se koncentrací. Při použití koncentrací vyšších než 5 μ M se však účinnost inhibitoru dále nezvyšovala.

Nejvhodnější zvolenou koncentrací HIF2 α inhibitoru jsme použili k následujícím dvěma experimentům, ve kterých jsme pracovali s lidskou buněčnou linií HEL (human erythroleukemia cell line). HEL jsou prekurzory erytrocytů ve stádiu erytroblastů izolované z kostní dřeně a právě tato buněčná linie byla vybrána pro přípravu buněk s knock-outem genu pro HIF2 α (*EPAS1*). U těchto buněk jsme indukovali erytroidní diferenciaci pomocí heminu a erythropoetinu a poté jsme stanovili míru apoptózy a hemoglobinu. Analýza prokázala vysokou hladinu hemoglobinu u buněk ovlivněných heminem, a to i přes použitý inhibitor. Hemin výrazně stimuloval buňky k diferenciaci, tudíž i míra apoptózy byla vysoká.

K otestování HIF2 α inhibitoru na myších erytroidních progenitorech byla využita tzv. colony assay. Nejprve jsme izolovali kostní dřeň a tyto buňky byly následně kultivovány

v metylcelulóзовém médiu s různou koncentrací inhibitoru. Po 14 dnech inkubace jsme hodnotili celkový počet vytvořených kolonií a počet červených progenitorových kolonií, tzv. BFU-E. Nižší koncentrace inhibitoru neměly na buňky žádný významný vliv. Teprve při koncentraci 100 μ M nevznikaly téměř žádné buněčné kolonie. V budoucnu by bylo vhodné otestovat tento inhibitor i na primárních lidských erytroidních buňkách pro srovnání rozdílů s myšími erytroidními buňkami.

Hlavním cílem této diplomové práce bylo vytvořit HEL buňky s knock-outem genu *EPAS1*, který kóduje HIF2 α protein a na základě rozdílů s původní buněčnou linií HEL („wild type“) se pokusit popsat možnou roli HIF2 α v erythropoéze. K podrobnějšímu objasnění funkce HIF2 α v erythropoéze by však byla zapotřebí řada dalších experimentů, které nejsou předmětem studia této diplomové práce. Pro tuto práci byla vybrána buněčná linie HEL, která poskytuje vhodný model pro studium diferenciaci buněk erytroidní linie. Knock-out byl proveden pomocí CRISPR/Cas9 technologie. Nejprve byly navrženy krátké oligonukleotidy obsahující sekvenci gRNA. Oligonukleotidy byly fosforylovány, spojeny na základě komplementarity a vneseny ligací do předem naštěpených plasmidů. Touto plasmidovou DNA byly transformovány bakteriální buňky a jednotlivé bakteriální kolonie byly genotypovány pomocí colony PCR. Poté jsme z pozitivních kolonií izolovali DNA, kterou jsme transformovaly buněčnou linii HEL. Následovala dlouhá série testování vytvořených klonů HEL. Tyto klony byly opět genotypovány a poté jsme u několika vybraných změřili expresi *HIF2 α* pomocí qRT-PCR. Nakonec byly vybrány tři klony této buněčné linie, u kterých se zdálo být knock-out úspěšně proveden. Sekvence genomu těchto vybraných buněčných linií opravdu potvrdila změnu v sekvenci *HIF2 α* genu. A po převedení této nukleotidové sekvence do sekvence proteinové se ukázalo, že zde vzniklo několik stop kodonů, díky kterým nemůže být tento gen exprimován v původní podobě. I přes provedení knock-out byla buněčná linie HEL stále viabilní, ačkoli zde byly patrné rozdíly oproti původní buněčné linii. Úspěšně se nám tedy podařilo vytvořit HEL buněčnou linii s knock-outem genu pro HIF2 α . Tyto buňky byly uchovány a zamrazeny na -80 °C, proto je možné je v budoucnu využít pro další výzkumy.

Pomocí dalšího experimentu jsme prokázali rozdílné vlastnosti buněk s knock-outem genu pro HIF2 α oproti původním HEL buňkám. Znovu jsme pro porovnání provedli stanovení množství hemoglobinu. Erytroidní diferenciaci byla opět indukována pomocí heminu. Tento experiment byl založen na předpokladu, že čím diferencovanější je erytroidní buňka, tím více hemoglobinu obsahuje. A protože jsme předpokládali, že buňky s knock-outem *HIF2 α* by měly

mít horší schopnost diferenciaci, měla by u nich analýza prokázat nižší hodnoty hemoglobinu. Tato hypotéza se však potvrdila pouze u jednoho ze tří vybraných klonů. Není zcela jasné, proč tyto dva klony buněčné linie HEL reagovaly rozdílně. Příčinou výsledku nejspíš může být rozdílná sekvence *HIF2α* genu potvrzená sekvenací. Pro vysvětlení těchto výsledků by však bylo nutné provést další experimenty, které nebyly součástí této práce.

Ověření úspěšnosti provedeného knock-outu genu *HIF2α* bylo dále zjišťováno i detekcí proteinu pomocí metody Western Blot. To se však jeví jako problematické a velmi obtížně detekovatelné. Problémy mohly být způsobeny nestabilitou a rychlou degradací *HIF2α*, který byl již dříve popsán v jiných pracích (Salceda and Caro, 1997). Z tohoto důvodu nebyly výsledky z těchto experimentů do práce začleněny.

Faktor *HIF2α* zastává v erythropoéze nepostradatelnou roli a získané výsledky v této diplomové práci důležitou roli *HIF2α* jen potvrzují. V tomto směru je však jistě velký prostor pro další výzkum, ke kterému lze využít buňky s knock-outem *HIF2α* vytvořené v této práci.

6. Shrnutí

Tato práce se zabývá studiem funkce HIF2 α v erythropoéze. Ačkoli jsou v teoretické části popsány všechny tři izoformy HIF a jejich funkce, experimentální část diplomové práce se zaměřila pouze na HIF2 α , jelikož právě tato izoforma zastává hlavní roli v erythropoéze.

Ke zjištění možné role HIF2 α jsme použili dva hlavní postupy – zablokování funkce HIF2 α na úrovni proteinu i na úrovni genové. K prvnímu úkolu jsme využili specifický alosterický HIF2 α inhibitor, který se naváže na HIF2 α protein a znemožní dimerizaci s jeho beta podjednotkou. Protože se každý HIF protein skládá ze dvou částí, alfa a beta podjednotky, nemůže bez dimerizace plnit svou funkci, kterou je ovlivňování exprese mnoha cílových genů.

V několika experimentech, jako je spektrofotometrické měření hemoglobinu a stanovení apoptózy, jsme otestovali účinnost specifického inhibitoru HIF2 α a jeho vliv na lidskou buněčnou linii HEL. Dále jsme tento inhibitor pro srovnání otestovali i na myších hematopoetických buňkách.

Hlavním úkolem této práce bylo vytvoření HEL buněčné linie s knock-outem genu pro HIF2 α (*EPAS1*), ke kterému byla využita CRISPR/Cas9 technologie. U tří vybraných klonů byla osekvenována DNA, která potvrdila úspěšnost provedeného knock-outu. Tyto vytvořené buňky lze využít k dalšímu výzkumu. Výsledky z této diplomové práce potvrzují důležitou roli HIF2 α v erythropoéze.

7. Reference

- Ang, S. O. *et al.* (2002) 'Endemic polycythemia in Russia: Mutation in the VHL gene', *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 28(1), pp. 57–62. doi: 10.1006/bcmd.2002.0488.
- Carroll, K. J. and North, T. E. (2014) 'Oceans of opportunity: Exploring vertebrate hematopoiesis in zebrafish', *Experimental Hematology*. ISEH - International Society for Experimental Hematology, 42(8), pp. 684–696. doi: 10.1016/j.exphem.2014.05.002.
- Cockman, M. E. *et al.* (2000) 'Hypoxia inducible factor- α binding and ubiquitylation by the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein', *Journal of Biological Chemistry*, 275(33), pp. 25733–25741. doi: 10.1074/jbc.M002740200.
- Dzierzak, E. and Philipsen, S. (2013) 'Erythropoiesis: development and differentiation', *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 3(4), pp. 1–16. doi: 10.1101/cshperspect.a011601.
- Ebert, B. L. and Franklin Bunn, H. (1999) 'Regulation of the Erythropoietin Gene', *Blood*, 94(6), pp. 1864–1877.
- Ema, M. *et al.* (1997) 'A novel bHLH-PAS factor with close sequence similarity to hypoxia-inducible factor 1 regulates the VEGF expression and is potentially involved in lung and vascular development', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(9), pp. 4273–4278. doi: 10.1073/pnas.94.9.4273.
- Flamme, I. *et al.* (1997) 'HRF, a putative basic helix-loop-helix-PAS-domain transcription factor is closely related to hypoxia-inducible factor-1 α and developmentally expressed in blood vessels', *Mechanisms of Development*, 63(1), pp. 51–60. doi: 10.1016/S0925-4773(97)00674-6.
- Furrow, P. W. *et al.* (2009) 'Erythrocytosis-associated HIF-2 α mutations demonstrate a critical role for residues C-terminal to the hydroxylacceptor proline', *Journal of Biological Chemistry*, 284(14), pp. 9050–9058. doi: 10.1074/jbc.M808737200.
- Gale, D. P. *et al.* (2008) 'Autosomal dominant erythrocytosis and pulmonary arterial hypertension associated with an activating HIF2 α mutation', *Blood*, 112(3), pp. 919–921. doi: 10.1182/blood-2008-04-153718.
- Greer, S. N. *et al.* (2012) 'The updated biology of hypoxia-inducible factor', *The EMBO Journal*. Nature Publishing Group, 31(11), pp. 2448–2460. doi: 10.1038/emboj.2012.125.

- Haase, V. H. (2013) 'Regulation of erythropoiesis by hypoxia-inducible factors', *Blood Reviews*. Elsevier Ltd, 27(1), pp. 41–53. doi: 10.1016/j.blre.2012.12.003.
- Hoffman, E. C. *et al.* (1991) 'Cloning of a Factor Required for Activity of the Ah (Dioxin) Receptor', *Science*, 252(5008), pp. 954–958.
- Hogenesch, J. B. *et al.* (1997) 'Characterization of a subset of the basic-helix-loop-helix-PAS superfamily that interacts with components of the dioxin signaling pathway', *Journal of Biological Chemistry*, 272(13), pp. 8581–8593. doi: 10.1074/jbc.272.13.8581.
- Hu, C. *et al.* (2003) 'Differential Roles of Hypoxia-Inducible Factor 1 alpha (HIF-1 alpha) and HIF-2 alpha in Hypoxic Gene Regulation', *Molecular and Cellular Biology*, 23(24), pp. 9361–9374. doi: 10.1128/MCB.23.24.9361.
- Huang, L. E. *et al.* (1998) 'Regulation of hypoxia-inducible factor 1 is mediated by an O₂-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(14), pp. 7987–7992. doi: 10.1073/pnas.95.14.7987.
- Ivan, M. *et al.* (2001) 'HIFalpha Targeted for VHL-Mediated Destruction by Proline Hydroxylation: Implications for O₂ Sensing', *Science*, 292(5516), pp. 464–468. doi: 10.1126/science.1059817.
- Jaakkola, P. *et al.* (2001) 'Prolyl Hydroxylation Linked references are available on JSTOR for this article : Targeting of HIF-1α to the von Hippel-Lindau Ubiquitylation Complex by O₂-Regulated Prolyl Hydroxylation', *Science*, 292(5516), pp. 468–472.
- Ji, P. *et al.* (2010) 'Histone deacetylase 2 is required for chromatin condensation and subsequent enucleation of cultured mouse fetal erythroblasts', *Haematologica*, 95(12), pp. 2013–2021. doi: 10.3324/haematol.2010.029827.
- Ji, P., Murata-Hori, M. and Lodish, H. F. (2011) 'Formation of mammalian erythrocytes: Chromatin condensation and enucleation', *Trends in Cell Biology*, 21(7), pp. 409–415. doi: 10.1016/j.tcb.2011.04.003.
- Jiang, B. H. *et al.* (1996) 'Dimerization, DNA binding, and transactivation properties of hypoxia-inducible factor 1', *The Journal of biological chemistry*, 271(30), pp. 17771–17778. doi: 10.1074/JBC.271.30.17771.
- Kallio, P. J. *et al.* (1998) 'Signal transduction in hypoxic cells: inducible nuclear translocation

and recruitment of the CBP/p300 coactivator by the hypoxia-inducible factor-1 α ', *The EMBO journal*, 17(22), pp. 6573–6586. doi: 10.1093/emboj/17.22.6573.

Ke, Q. and Costa, M. (2006) 'Hypoxia-Inducible Factor-1 (HIF-1)', *Molecular Pharmacology*, 70(5), pp. 1469–1480. doi: 10.1124/mol.106.027029.ABBREVIATIONS.

Koury, M. J. and Ponka, P. (2004) 'NEW INSIGHTS INTO ERYTHROPOIESIS: The Roles of Folate, Vitamin B12 , and Iron', *Annual Review of Nutrition*, 24(1), pp. 105–131. doi: 10.1146/annurev.nutr.24.012003.132306.

Lando, D. *et al.* (2002) 'Asparagine hydroxylation of the HIF transactivation domain: A hypoxic switch', *Science*, 295(5556), pp. 858–861. doi: 10.1002/9780470114735.hawley00624.

Lee, F. S. and Percy, M. J. (2011) 'The HIF Pathway and Erythrocytosis', *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 6(1), pp. 165–192. doi: 10.1146/annurev-pathol-011110-130321.

Liu, Q. *et al.* (2012) 'Hypoxia-inducible factor regulates hepcidin via erythropoietin-induced erythropoiesis', *Journal of Clinical Investigation*, 122(12), pp. 4635–4644. doi: 10.1172/JCI63924.

Mahon, P. C., Hirota, K. and Semenza, G. L. (2001) 'FIH-1: A novel protein that interacts with HIF-1 α and VHL to mediate repression of HIF-1 transcriptional activity', *Genes and Development*, 15(20), pp. 2675–2686. doi: 10.1101/gad.924501.

Majmundar, A. J., Wong, W. J. and Simon, M. C. (2010) 'Hypoxia-Inducible Factors and the Response to Hypoxic Stress', *Molecular Cell*. Elsevier Inc., 40(2), pp. 294–309. doi: 10.1016/j.molcel.2010.09.022.

Makino, Y. *et al.* (2002) 'Inhibitory PAS domain protein (IPAS) is a hypoxia-inducible splicing variant of the hypoxia-inducible factor-3 α locus', *Journal of Biological Chemistry*, 277(36), pp. 32405–32408. doi: 10.1074/jbc.C200328200.

Masson, N. *et al.* (2001) 'Independent function of two destruction domains in hypoxia-inducible factor- α chains activated by prolyl hydroxylation', *EMBO Journal*, 20(18), pp. 5197–5206. doi: 10.1093/emboj/20.18.5197.

Mastrogiannaki, M. *et al.* (2009) 'HIF-2 α , but not HIF-1 α , promotes iron absorption in mice', *Journal of Clinical Investigation*, 119(5), pp. 1–8. doi: 10.1172/JCI38499.The.

- Mastrogiannaki, M. *et al.* (2012) ‘Hepatic hypoxia-inducible factor-2 down-regulates hepcidin expression in mice through an erythropoietin-mediated increase in erythropoiesis’, *Haematologica*, 97(6), pp. 827–834. doi: 10.3324/haematol.2011.056119.
- Maxwell, P. H. *et al.* (1999) ‘The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis’, *Nature*, 399(6733), pp. 271–275. doi: 10.1038/20459.
- Mohandas, N. and Gallagher, P. G. (2008) ‘Red cell membrane : past , present , and future’, *Blood*, 112(10), pp. 3939–3948. doi: 10.1182/blood-2008-07-161166.
- Mole, D. R. *et al.* (2009) ‘Genome-wide association of hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α and HIF-2 α DNA binding with expression profiling of hypoxia-inducible transcripts’, *Journal of Biological Chemistry*, 284(25), pp. 16767–16775. doi: 10.1074/jbc.M901790200.
- Nandakumar, S. K., Ulirsch, J. C. and Sankaran, V. G. (2016) ‘Advances in understanding erythropoiesis: Evolving perspectives’, *British Journal of Haematology*, 173(2), pp. 206–218. doi: 10.1111/bjh.13938.
- Nemeth, E. and Ganz, T. (2009) ‘The role of hepcidin in iron metabolism’, *Acta Haematologica*, 122(2–3), pp. 78–86. doi: 10.1159/000243791.
- Ohh, M. *et al.* (2000) ‘Ubiquitination of hypoxia-inducible factor requires direct binding to the beta-domain of the von Hippel-Lindau protein’, *Nature cell biology*, 2(7), pp. 423–427. doi: 10.1038/35017054.
- Paliege, A. *et al.* (2010) ‘Hypoxia-inducible factor-2 α expressing interstitial fibroblasts are the only renal cells that express erythropoietin under hypoxia-inducible factor stabilization’, *Kidney International*. Elsevier Masson SAS, 77(4), pp. 312–318. doi: 10.1038/ki.2009.460.
- Percy, M. J. *et al.* (2006) ‘A family with erythrocytosis establishes a role for prolyl hydroxylase domain protein 2 in oxygen homeostasis.’, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(3), pp. 654–9. doi: 10.1073/pnas.0508423103.
- Percy, M. J. *et al.* (2008) ‘A Gain-of-Function Mutation in the HIF2A Gene in Familial Erythrocytosis’, *The New England Journal of Medicine*. 358(2),pp.162-168
- Popova, E. Y. *et al.* (2009) ‘Chromatin condensation in terminally differentiating mouse erythroblasts does not involve special architectural proteins but depends on histone

deacetylation', *Chromosome Research*, 17(1), pp. 47–64. doi: 10.1007/s10577-008-9005-y.

Raval, R. R. *et al.* (2005) 'Contrasting properties of hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) and HIF-2 in von Hippel-Lindau-associated renal cell carcinoma', *Molecular and cellular biology*, 25(13), pp. 5675–86. doi: 10.1128/MCB.25.13.5675-5686.2005.

Reyes, H., Reisz-Porszasz, S. and Hankinson, O. (1992) 'Identification of the Ah Receptor Nuclear Translocator Protein (Arnt) as a Component of the DNA Binding Form of the Ah Receptor', *Science*, 256(5060), pp. 1193–1195.

Rolfs, A. *et al.* (1997) 'Oxygen-regulated transferrin expression is mediated by hypoxia inducible factor-1', *Journal of Biological Chemistry*, 272(32), pp. 20055–20062. doi: 10.1074/jbc.272.32.20055.

Rosenberger, C. *et al.* (2002) 'Expression of Hypoxia-Inducible Factor-1 and -2 in Hypoxic and Ischemic Rat Kidneys', *Journal of the American Society of Nephrology*, 13(7), pp. 1721–1732. doi: 10.1097/01.ASN.0000017223.49823.2A.

Ruas, J. L., Poellinger, L. and Periera, T. (2002) 'Functional Analysis of Hypoxia-inducible Factor-1alpha -mediated Transactivation. IDENTIFICATION OF AMINO ACID RESIDUES CRITICAL FOR TRANSCRIPTIONAL ACTIVATION AND/OR INTERACTION WITH CREB-BINDING PROTEIN', *Journal of Biological Chemistry*, 277(41), pp. 38723–38730. doi: 10.1074/jbc.M205051200.

Salceda, S. and Caro, J. (1997) 'Hypoxia-inducible Factor 1a (HIF-1a) Protein Is Rapidly Degraded by the Ubiquitin-Proteasome System under Normoxic Conditions', *Journal of Biological Chemistry*, 272(36), pp. 22642–22647. doi: 10.1091/mbc.E02.

Semenza, G. L. *et al.* (1991) 'Hypoxia-inducible nuclear factors bind to an enhancer element located 3' to the human erythropoietin gene', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(13), pp. 5680–5684. doi: 10.1073/pnas.88.13.5680.

Semenza, G. L. *et al.* (1994) 'Transcriptional regulation of genes encoding glycolytic enzymes by hypoxia-inducible factor 1.', *The Journal of biological chemistry*, 269(38), pp. 23757–23763.

Semenza, G. L. (1998) 'Hypoxia-inducible factor 1 and the molecular physiology of oxygen homeostasis', *The Journal of laboratory and clinical medicine*, 131(3), pp. 207–214.

Semenza, G. L. (2012) 'Hypoxia-inducible factors in physiology and medicine', *Cell*. Elsevier Inc., 148(3), pp. 399–408. doi: 10.1016/j.cell.2012.01.021.

Semenza, G. L. and Wang, G. L. (1992) 'A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation', *Molecular and Cellular Biology*, 12(12), pp. 5447–5454. doi: 10.1128/MCB.12.12.5447.

Scheuermann, T. H. *et al.* (2013) 'Allosteric inhibition of hypoxia inducible factor-2 with small molecules', *Nature Chemical Biology*, 9(4), pp. 271–276. doi: 10.1021/acsnano.5b07425.Molecular.

Taylor, M. *et al.* (2011) 'Hypoxia-inducible factor-2 α mediates the adaptive increase of intestinal ferroportin during iron deficiency in mice', *Gastroenterology*, 140(7), pp. 2044–2055. doi: 10.1053/j.gastro.2011.03.007.

Tian, H., Mcknight, S. L. and Russell, D. W. (1997) 'Endothelial PAS domain protein 1 (EPAS1), a transcription factor selectively expressed in endothelial cells', *Genes and Development*, 11(1), pp. 72–82. doi: 10.1101/gad.11.1.72.

Wang, G. L. *et al.* (1995) 'Hypoxia-Inducible Factor 1 is a Basic-Helix-Loop-Helix-PAS Heterodimer Regulated by Cellular O₂ Tension', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(12), pp. 5510–5514.

Wang, G. L. and Semenza, G. L. (1993) 'Desferrioxamine induces erythropoietin gene expression and hypoxia-inducible factor 1 DNA-binding activity: implications for models of hypoxia signal transduction', *Blood*, 82(12), pp. 3610–3615.

Wang, G. L. and Semenza, G. L. (1993) 'General involvement of hypoxia-inducible factor 1 in transcriptional response to hypoxia', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(9), pp. 4304–4308. doi: 10.1073/pnas.90.9.4304.

Wang, G. L. and Semenza, G. L. (1995) 'Purification and characterization of Hypoxia-inducible Factor 1', *The Journal of biological chemistry*, pp. 1230–1237. doi: 7836384.

Wiener, C. M., Booth, G. and Semenza, G. L. (1996) 'In vivo expression of mRNAs encoding hypoxia-inducible factor 1', *Biochemical and biophysical research communications*, 225(2), pp. 485–488. doi: 10.1006/bbrc.1996.1199.

Yoshida, H. *et al.* (2005) 'Phosphatidylserine-dependent engulfment by macrophages of

nuclei from erythroid precursor cells', *Nature*, 437(September), pp. 754–758. doi:
10.1038/nature03964.