

Univerzita Karlova v Praze

1. lékařská fakulta

studijní program: Biomedicína

studijní obor: Fyziologie a patofyziologie člověka



Mgr. Nikola Čuřík

**TRANSKRIPČNÍ FAKTOR PU.1 JAKO CÍL DIFERENCIAČNÍ
TERAPIE MYELOYDYSPLASTICKÉHO SYNDROMU
5-AZACYTIDINEM**

**TRANSCRIPTION FACTOR PU.1 IS A TARGET OF 5-AZACITIDINE DURING
DIFFERENTIATION THERAPY OF MYELOYDYSPLASTIC SYNDROME**

Dizertační práce

Školitel: Doc. MUDr. Tomáš Stopka, PhD

Praha 2012

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem dizertační práci zpracoval samostatně a že jsem řádně uvedl a citoval všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že tato práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 12.03.2012

Mgr. Nikola Čuřík

Podpis:

Identifikační záznam:

ČUŘÍK, Nikola. *Transkripční faktor PU.1 jako cíl diferenciační terapie myelodysplastického syndromu 5-azacytidinem [TRANSCRIPTION FACTOR PU.1 IS A TARGET OF 5-AZACITIDINE DURING DIFFERENTIATION THERAPY OF MYELODYSPLASTIC SYNDROME]*. Praha, 2012, 111 s., 3 přílohy, Dizertační práce (PhD), Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta, Ústav patologické fyziologie. Školitel: Doc. MUDr. Tomáš Stopka, PhD

Tato práce je věnovaná mým rodičům

Poděkování:

Rád bych na tomto místě poděkoval svému školiteli, Doc. Tomášovi Stopkovi za pomoc s formulováním hypotézy, designem experimentů, za systematické rozšiřování mých vědeckých obzorů a veškerou podporu, které se mi od něj po celou dobu doktorského studia dostávalo. V neposlední řadě bych mu také rád poděkoval za vytvoření přátelské pracovní atmosféry, která v našem kolektivu panuje.

Rád bych poděkoval přednostovi Ústavu patologické fyziologie 1. LF UK, Prof. Emanuelovi Nečasovi za cenné rady, diskuzi a podporu vedoucí ke vzniku této práce.

Rád bych poděkoval všem kolegům a kolegyním z naší laboratoře a ústavu za pomoc, přátelské pracovní prostředí a stimulující vědeckou diskuzi. Jmenovitě bych rád poděkoval: Dr. Pavlovi Burdovi, Mgr. Karině Vargové, Dr. Vítovi Pospíšilovi, Mgr. Petře Vlčkové, Bc. Filippu Savvulidimu, Mgr. Martině Kapalové, Mgr. Tomášovi Zikmundovi, Mgr. Vojtovi Kulvaitovi, Dr. Jarmile Vargové, Dr. Erice Kužmové a Bc. Haně Huškové.

Rád bych poděkoval Dr. Anně Jonášové, Prof. Markovi Trněnému a Dr. Peterovi Laslovi za cennou odbornou spolupráci při výzkumu, který je předmětem této práce.

Rád bych poděkoval svým rodičům a bratrovi, své partnerce a svým přátelům za podporu v mém životě, které si velice vážím.

OBSAH:

	Strana
Prohlášení	2
Identifikační záznam	3
Poděkování	4
Obsah	5
Seznam použitých zkratk	7
Abstrakt (česká verze)	9
Abstract (anglická verze)	10
1. Všeobecný úvod	11
1.1 Řízení krvetvorby transkripčními faktory	11
1.1.1 Transkripční faktory a jejich obecná role v krvetvorbě	11
1.1.2 Transkripční faktory jako prvotní a druhotné determinanty krvetvorby	12
1.2 Transkripční faktor PU.1 v krvetvorbě	14
1.2.1 Transkripční faktor PU.1 – základní charakteristika	14
1.2.2 Regulace genové exprese PU.1	15
1.2.3 Role PU.1 v liniové determinaci a specifikaci	19
1.2.4 Role PU.1 v potlačování leukemogeneze	21
1.3 Terapie MDS pomocí AZA	23
1.3.1 Obecný úvod k DNA metylaci	23
1.3.2 DNA metylace u MDS	24
1.3.3 Klinické výsledky AZA při léčbě MDS/AML pacientů	29
2 Hypotéza a cíle dizertační práce	33
2.1 Podklady pro zformulování hypotézy	33
2.2 Hypotéza a specifické cíle	35
3 Materiál a metody	36
3.1 Materiál	36
3.1.1 Bakteriální kmeny	36
3.1.2 DNA plasmidy	36
3.1.3 Buněčné linie – modely MDS	37
3.1.4 Vzorky pacientů s MDS/AML a kontroly	38
3.1.5 Myší model AML (PU.1 ^{URE^{-/-}})	40
3.1.6 Primery a hydrolyzační sondy	40
3.1.7 Protilátky	46
3.1.8 Použité cytokiny	46
3.1.9 Chemikálie, enzymy a standardy molekulových hmotností	46

3.1.10 Roztoky, pufrý	47
3.1.11 Média, buněčná a bakteriální kultivace	48
3.1.12 Komerčně dodávané sady	49
3.1.13 Speciální přístroje a jiné vybavení	49
3.1.14 Speciální počítačové programy	50
3.2 Metody	50
3.2.1 Pracovní postup při nakládání se vzorky pacientů s MDS, myšími c-Kit+ buňkami a modelovými buněčnými liniemi pro MDS	50
3.2.2 Pracovní postup při testování AZA na modelových buněčných liniích pro MDS, myších c-kit+ buňkách z kostní dřene a CD34+ progenitorech z pacientů MDS	51
3.2.3 Izolace RNA a přepis na cDNA	52
3.2.4 Kvantitativní PCR v reálném čase (qPCR) a vyhodnocení RNA exprese	53
3.2.5 Přenos proteinu a inkubace s protilátkou (Western Blott)	54
3.2.6 Chromatinová imunoprecipitace	55
3.2.7 Průtoková cytometrie	57
3.2.8 Analýza metylace DNA	58
4. Výsledky	60
4.1 Exprese genu PU.1 v progenitorech získaných z pacientů s MDS. Vztah exprese PU.1 k odpovědi pacientů na léčbu AZA a k metylaci DNA v oblasti URE	60
4.2 Vliv AZA na expresi PU.1 v modelových buňkách pro MDS. Vliv AZA na buněčnou diferenciaci, apoptózu a proliferaci	65
4.3 Vliv cytokinů stimulujících růst myeloidních buněk na účinek AZA v modelových buněčných liniích pro MDS a mechanismy působení cytokinů na úrovni chromatinu v regulačních oblastech genu PU.1	69
4.4 Odpověď CD34+ progenitorů získaných od pacientů s MDS na AZA a stimulaci cytokinem G-CSF	74
4.5 Význam oblasti URE pro působení AZA na hladinu exprese PU.1	79
4.6 Doplnující výsledkové obrázky	81
5. Diskuze	88
6. Shrnutí závěrů dizertační práce	95
7. Odkazy	97
Dodatek	111

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK:

AML	Akutní myeloidní leukémie
APL	Akutní promyelocytární leukémie
AZA	5-azacytidin
CMML	Chronická myelomonocytární leukémie
CR	Kompletní odpověď (remise)
CRi	Kompletní odpověď (ne ve všech parametrech)
DMSO	Dimetylsulfoxid
EDTA	Kys. etylendiamintetraoctová
EGTA	Kys. etylenglykoltetraoctová
FAB	Francouzsko-americko-britský systém
FACS	Fluorescenčně-aktivované třídění buněk
FBS	Fetální bovinní (hovězí) sérum
FITC	Fluorescein isothiokyanát
G-CSF	Faktor stimulující růst granulocytárních kolonií
GM-CSF	Faktor stimulující růst gran. a makr. kolonií
HI	Hematologické zlepšení
ChIP	Chromatinová imunoprecipitace
IMDM	Iscove's Modified Dulbecco Medium
IPSS	Mezinárodní bodovací systém prognózy (MDS)
IPTG	Isopropyl β -D-1-thiogalaktopyranoside
M-CSF	Faktor stimulující růst makrofágových kolonií
MDS	Myelodysplastický syndrom
NEAA	Ne-esenciální aminokyseliny
OS	Celkové přežití (Overall Survival)
PCR	Polymerázová řetězová reakce
PE	Fykoerytrin
PR	Částečná odpověď (remise)
RAEB	Refrakterní anémie s nadbytkem blastů
qPCR	Kvantitativní polymerázová řetězová reakce
SDS	Sodium docecyl sulfát
SFFV	Spleen focus forming virus
URE	Upstream regulatory element (5'-reg. oblast)

WB	Western Blott
WHO	Světová zdravotnická organizace
WPSS	Bodovací systém prognózy na bázi WHO-klasif.
X-GAL	5-bromo-4-chloro-indolyl- β -D-galaktopyranozid

ABSTRAKT

Transkripční faktor PU.1 je klíčovou molekulou řídící proces krvetvorby. Ztráta jeho funkce má za následek různé stupně poruchy diferenciacie prakticky všech krevních buněčných linií. S funkcí PU.1 v zajištění správného průběhu diferenciacie krevních buněk úzce souvisí také jeho role v potlačování procesu leukemogeneze. Snížená hladina PU.1 a poruchy schopnosti regulovat hladinu tohoto transkripčního faktoru v buňce jsou asociovány s různými formami akutní myeloidní leukémie (AML), ale také s dalšími hematologickými malignitami.

Myelodysplastický syndrom (MDS) je klonální onemocnění krvetvorby s výrazně variabilním projevem a průběhem, pro jehož patogenezi je typická porucha diferenciacie krevních buněk. Ta se projevuje ztrátou jejich funkce, vznikem elementů s morfologickými defekty (dysplasií) a hromaděním poškozených, nezralých buněk – blastů v kostní dřeni. Onemocnění MDS se často transformuje do AML. Charakteristickým rysem MDS je na molekulární úrovni potlačení exprese řady genů v důsledku aberantní zvýšené metylace DNA v jejich regulačních oblastech. Použití látek potlačujících metylaci DNA a obnovujících genovou expresi, jako je například 5-azacytidin (AZA), přináší v posledních letech klinicky významné výsledky při léčbě pacientů s MDS s vyšším rizikem (IPSS) a stalo se v podstatě již standardem. Navzdory řadě dílčích poznatků o působení AZA v MDS zůstává v porozumění mechanismům tohoto účinku mnoho nejasného. Komplikujícím faktorem poznání těchto mechanismů je především variabilita MDS na molekulární úrovni.

Podstatou této dizertační práce jsou nové poznatky o tom, že PU.1 patří mezi geny, jehož exprese je u významné části pacientů s MDS s vyšším rizikem potlačena vlivem metylace DNA v jeho regulační oblasti URE. Zjistili jsme, že hladina PU.1 v progenitorech pacientů s MDS významně souvisí s odpovědí těchto pacientů na léčbu AZA. AZA je schopen účinně demetylovat DNA v oblasti URE a iniciovat další epigenetické procesy na úrovni chromatinu. Tyto procesy ve svém souhrnu vedou ke zvýšení exprese PU.1 a k projevům iniciace myeloidní diferenciacie jak u modelových buněčných linií pro MDS tak u progenitorů izolovaných *ex-vivo* z kostní dřene z pacientů s MDS. Účinek AZA na expresi PU.1 a navození myeloidní diferenciacie lze dále ovlivňovat – zeslabovat i zesilovat – cytokiny včetně G-CSF, který je dnes intenzivně využíván v klinické praxi. AZA rovněž v modelových buněčných liniích pro MDS zastavuje buněčnou proliferaci a vyvolává v menší míře apoptózu.

Tato práce souhrnně přináší důležitá pozorování, která jsou v současnosti dále studována pro zjištění účinnosti AZA *in vitro*.

ABSTRACT

PU.1 is a key hematopoietic transcription factor. Knock-out of PU.1 in mouse is embryonic lethal due to complete depletion or several disruption of differentiation of multiple blood cell lineages. Low level of PU.1 and the disruption of its regulation are associated *in vivo* with acute myeloid leukemia and other hematologic malignancies.

Myelodysplastic syndrome (MDS) is hematopoietic stem cell disorder with extremely heterogeneous features and outcome. It is characterized by improper differentiation of blood cells resulting in loss of function, dysplasia and blasts accumulation in bone marrow. About one third of MDS cases transforms into AML. MDS is also characterized by silencing of gene expression caused by aberrant DNA hypermethylation. Using DNA Methyltransferase inhibitors (DNMTi) such as 5-azacitidine (AZA) has good clinical results for the MDS patients with higher risk of disease. Indeed, AZA became standard therapy of high risk MDS in recent years. Nonetheless, our understanding of molecular mechanisms of AZA remains incomplete.

This PhD thesis reports about the role of transcription factor PU.1 in MDS. We found that significant subset of high risk MDS patients express low level of PU.1 due to DNA hypermethylation of PU.1 upstream regulatory element (URE). We also found significant relationship between levels of PU.1 expression and response of patients to AZA treatment. AZA is capable to significantly demethylate DNA of URE and may also initiate other epigenetic changes on its chromatin such as histone modifications pattern. These changes result in upregulation of PU.1 expression and triggers myeloid differentiation of transformed MDS cell lines and CD34+ progenitors isolated *ex vivo* from a patient bone marrow. Effects of AZA on PU.1 expression and myeloid differentiation can be modified – attenuated or enhanced – by pre-stimulation with the cytokines including Granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF). AZA also inhibits cell proliferation and cause mild apoptosis in MDS cell lines.

This work collectively provides important observations, that are currently further studied to be used in the future for *in vitro* assessment of AZA efficiency.

1. VŠEOBECNÝ ÚVOD

1.1 Řízení krvetvorby transkripčními faktory

1.1.1 Transkripční faktory a jejich obecná role v krvetvorbě

Krvetvorba představuje proces, v němž původně pluripotentní krvetvorná kmenová buňka opustí svůj konzervovaný stav, začíná se aktivně dělit a prochází následným vývojem. Během tohoto vývoje u ní dochází k diferenciaci – buňka nabývá svých specifických funkcí a morfologických znaků. Zároveň s tím se u ní postupně ztrácí pluripotence (potenciál k vývoji do vícero buněčných typů): následný vývoj buňky se již stává liniově determinovaný a od určitého okamžiku se specifikuje tak, že buňka směřuje k dosažení jednoho konkrétního konečného stavu, zatímco dosažení všech ostatních původně možných stavů je již vyloučeno. Po ukončení diferenciaci dochází u buňky k zastavení buněčného cyklu a buňka jako plně diferenciovaný krevní element plní své přesně vymezené fyziologické funkce (například: přenos plynů v krvi červenými krvinkami, zajištění srážlivosti krve krevními destičkami, či různé funkce bílých krvinek v imunitním systému.)

Zásadní roli v řízení procesu krvetvorby a buněčné diferenciaci sehrávají na molekulární úrovni transkripční faktory. Transkripční faktory jsou proteiny, v jejichž struktuře se nacházejí DNA vazebné domény (jedna nebo více), a které jsou tudíž schopné interakce s DNA. DNA je v buňce složena společně s komplexy proteinů - histonů do struktury označované jako chromatin. Transkripční faktory neváží chromatin náhodně, ale interagují s DNA na specifických úsecích, které označujeme jako jejich DNA vazebná místa (motivy). Tato interakce vede k iniciaci přepisu genů (DNA) pomocí enzymu RNA polymerázy (vedoucí k uskutečnění aktivace transkripce). Některé transkripční faktory naopak váží DNA v blízkosti genů za účelem potlačení tohoto přepisu (vedoucí k represí transkripce).

Transkripční faktory, buď přímo, interakcí s DNA, či nepřímo, vazbou na další transkripční faktory, se v průběhu liniové determinace a specifikace krevní buňky uplatňují při regulaci genové transkripce ve funkci aktivátorů nebo ve funkci represorů, přičemž určitý transkripční

faktor se může podle kontextu uplatňovat i v rámci jednoho typu buňky v obou těchto funkcích. Aktivační i represivní funkce transkripčních faktorů při přepisu genů jsou zprostředkovávány skrze protein-proteinové interakce transkripčních faktorů s histony, histon-vazebnými proteiny a enzymy schopnými různým způsobem modifikovat strukturu chromatinového vlákna. Na základě těchto vazeb a modifikací se chromatinová struktura stává buď přístupnou nebo naopak nepřístupnou pro nasednutí RNA polymerázy. RNA transkripty vznikající přepisem DNA následně dávají vzniknout v procesu translace proteinům či drobným peptidům, které již bezprostředně určují fenotyp a fyziologickou funkci každé buňky.

Transkripční faktory lze v jistém určitém zjednodušení klasifikovat podle sekundární struktury jejich DNA vazebné domény do čtyř hlavních skupin - 1) proteiny se základní strukturou DNA vazebné domény typu „šroubovice-smyčka-šroubovice“ (helix-loop-helix); 2) proteiny se zinkem koordinovanou DNA vazebnou doménou; 3) proteiny s DNA vazebnou doménou struktury „šroubovice-otáčka-šroubovice“ (helix-turn-helix) a 4) proteiny s DNA vazebnou doménou ve tvaru β -skládaného listu a kontaktem s DNA v malém žlábků.

1.1.2 Transkripční faktory jako prvotní a druhotné determinanty řízení krvetvorby

Transkripční faktory regulují a tím řídí proces krvetvorby na základě strukturální specificity v různé časové či prostorové posloupnosti. Transkripční faktory označované jako tzv. prvotní determinanty iniciují proces liniové determinace. Hladiny těchto prvotních determinant regulují expresi sekundárních determinant řídících proces specifikace buněčného typu.

Mezi tyto sekundární determinanty patří transkripční faktory, které jsou buď nezbytné pro transkripční aktivaci exprese přesně definovaných genových programů typických pro každý jednotlivý druh krevních buněk (erytrocytů, megakaryocytů, monocytů, granulocytů, B a T lymfocytů), nebo naopak zajišťují aktivní represi transkripce těch genů, které se uplatňují ve vývoji linií odlišných a tím pro danou linii nepotřebných. Druhotné determinanty v průběhu liniové specifikace zároveň mechanismem zpětných vazeb kooperují nebo molekulárně antagonistují prvotní determinanty, takže celý proces je pod kontrolou komplexních sítí vzájemně interagujících transkripčních faktorů (Bottardi et al., 2007).

Pro diferenciaci erytrocytů a megakaryocytů je nejdůležitějším determinačním faktorem protein GATA-1. Faktor GATA-1 je nezbytný pro vývoj zralých červených krvinek (Pevny et

al., 1991; Fujiwara et al., 1996). Faktor GATA-1 a především regulace jeho exprese je dále nezbytný pro zajištění proliferace a maturace megakaryocytů a produkci krevních destiček (Shivdasahi et al., 1997). GATA-1 je schopen transkripčně inhibovat monocytární a granulocytární geny tím, že přímo fyzicky interaguje s DNA vazebnou doménou monocytárně-granulocytárního regulátoru, transkripčního faktoru PU.1 a inhibuje její funkci (Nerlov et al., 2000). Liniová specifikace vstupu do progenitorů erytroidního a megakaryocytárního vývoje je kontrolována dvojicí vzájemně antagonistických sekundárních determinant – transkripčních faktorů FLI-1 (Friend leukemia virus integration 1) a EKLF (Kruppel-like factor 1 erythroid). Faktor FLI-1 synergicky kooperuje pomocí protein-proteinové interakce s GATA-1 při aktivaci exprese na promotorech genů specifických pro megakaryocytární vývoj (Eisbacher et al., 2003). FLI-1 zároveň skrze alternativní protein-proteinovou interakci inhibuje činnost transkripčního faktoru EKLF na jeho vazebných místech v promotorech genů specifických pro erytroidní vývoj (Starck et al., 2003). A naopak EKLF zase recipročně inhibuje činnost transkripčního faktoru FLI-1 na jeho vazebných místech v promotorech megakaryocytárních genů (Starck et al., 2003).

Vývoj lymfocytů a liniová determinace lymfocytů jsou regulovány transkripčním faktorem Ikaros. Ikaros je nezbytný pro následný vývoj T a B lymfocytů (Georgopoulos et al., 1994; Ng et al., 2009). Za následnou aktivaci genového transkripčního programu typického pro B buňky zodpovídají transkripční faktory EBF (Pongubala et al., 2008) a PAX5 (BSAP) (Urbanek et al., 1994; Nutt et al., 1997;). Tyto faktory zároveň inhibicí Notch signální dráhy vypínají liniově specifický transkripční program T-lymfocytů (Souabni et al., 2002). Transkripční faktor EBF aktivuje genový program B lymfocytů nezávisle na PAX5 a je důležitý pro omezení pluripotence lymfoidních progenitorů tím, že brání expresi transkripčních faktorů CEBP α a PU.1, čímž vypíná alternativní monocyto-granulocytární genový program (Pongubala et al., 2008).

Pro specifikaci makrofágů a granulocytů hraje důležitou roli protein CEBP α , který v koordinaci s PU.1 zapíná smíšený monocyto-granulocytární genový program a inhibuje expresi B-lymfocytárních genů (Xie et al., 2004). Vedle této funkce CEBP α inhibuje expresi také erytroidních genů, včetně genu pro erythropoetinový receptor důležitý pro signalizaci řídící vývoj červené krvinky (Suh et al., 2006). Jako sekundární determinanty rozhodující o vývoji společných myeloidních progenitorů buď směrem monocytárním nebo směrem granulocytární diferenciaci se uplatňují transkripční faktory EGR1, EGR2 a GFI-1 (Laslo et

al., 2006). EGR-1 a EGR-2 zároveň společně s korepresorem NAB2 inhibují granulocytární genový program skrze blokádu transkripčního faktoru GFI-1 (Laslo et al., 2006). Protein GFI-1 naopak recipročně zapíná granulocytární genový program a reprimuje expresi monocytárních genů (Karsunky et al., 2002; Hock et al., 2003).

V předchozích třech odstavcích jsem ve stručnosti zmínil roli několika transkripčních faktorů jako prvotních a druhotných determinantů řídicích na základě vzájemných interakcí procesů liniové determinace a specifikace krvetvorné kmenové/progenitorové buňky. Avšak i činnost výše zmíněných transkripčních faktorů v roli prvotních determinantů je kontrolována několika dalšími transkripčními faktory, které můžeme považovat za „super-regulátory“ celého procesu krvetvorby. Mezi tyto klíčové transkripční faktory ovlivňující proces diferenciaci krvetvorné kmenové buňky a její výsledný osud patří transkripční faktor PU.1.

1.2 Transkripční faktor PU.1 v krvetvorbě

1.2.1 Transkripční faktor PU.1 – základní charakteristika

Gen pro transkripční faktor PU.1 (SPI-1, SFPI-1) se nachází na lidském chromozomu 11 v oblasti 11q22 (resp. na 2. chromozomu u myši) a je strukturován do 5 exonů. Lidský PU.1 protein je tvořen 264 aminokyselinami. Myší protein je v závislosti na výchozím iniciačním kodónu exprimován ve dvou transkripčních variantách tvořených 266 resp. 272 aminokyselinami (přehledně: Gupta et al., 2009).

Transkripční faktor PU.1 patří do ETS rodiny transkripčních faktorů (Klemsz et al., 1990). Pro členy ETS rodiny transkripčních faktorů je typické, že obvykle na svém C-koncovém úseku obsahují evolučně konzervovanou ETS doménu schopnou vázat DNA. ETS doména proteinu PU.1 se skládá z 87 aminokyselinových zbytků (168-255). Skládá se ze tří α -šroubovic a čtyř β -listů, které dohromady vytvářejí konfiguraci typu šroubovice-otáčka-šroubovice (Kodandapani et al., 1996). ETS doména rozpoznává a váže sekvence DNA s vysokým obsahem purinových bází obsahující specifický vazebný motiv GGA(A/T) (Graves et Petersen, 1998). PU.1 přináší na DNA v těchto vazebných místech různé transkripční faktory stejně jako enzymy modifikující molekuly histonů a DNA (Yamamoto et al., 1999). Na N-koncové části PU.1 se nalézá transaktivační doména tvořená třemi oblastmi

charakteristickými vysokým obsahem kyselých aminokyselin a jednou oblastí bohatou na glutamin. Prostřední úsek molekuly PU.1 (aminokyseliny 118-160) zabírá PEST doména, bohatá na přítomnost prolinu, glutamátu, serinu a threoninu (Klemsz et Maki, 1996). Všechny zmíněné domény PU.1 jsou schopné fyzicky se účastnit protein-proteinových interakcí. Vzhledem k tomu, že PU.1 je sám o sobě poměrně slabý aktivátor (Tenen et al., 1997), panuje předpoklad, že tyto protein-proteinové interakce hrají klíčovou roli při zprostředkování funkce PU.1

Ve fetální krvetvorbě je role PU.1 demonstrována tím, že delece pátého exonu genu PU.1, který kóduje DNA vazebnou doménu, vede k pozdní embryonální resp. neonatální letalitě – den E18.5. Homozygoti s delecí genu *PU.1* trpěli vážným poškozením krvetvorby zasahující více linií. Byla u nich pozorována řada morfologických a funkčních defektů nebo vymizení prekurzorů monocytů, granulocytů, B a T lymfocytů a v některých případech i porucha zrání červených krvinek (Scott et al., 1994). PU.1 je společně s transkripčním faktorem GATA-2 nezbytný také pro produkci žírných buněk (Walsh et al., 2002). Delece genu *PU.1* rovněž vede k významné redukci tvorby produkce erytroidních progenitorů (Kim et al., 2004). Také N-koncová trans-aktivační doména PU.1 je nezbytná pro zajištění normální myeloidní diference a její delece vede dokonce k zpětné de-diferenciaci myeloidních buněk (Klemsz et Maki, 1996; Nerlov et Graf, 1998).

1.2.2 Regulace genové exprese PU.1

Expese genu *PU.1* je řízena ve vztahu k promotoru z blízkého a několika vzdálených regulačních elementů, z nichž se jako nejdůležitější jeví oblast URE (Upstream Regulatory Element) (Obrázek 1). Řízení exprese se odehrává jednak skrze vazbu různých transkripčních faktorů, včetně autoregulačního působení samotného PU.1, pomocí epigenetických mechanismů na úrovni chromatinu a rovněž i post-transkripčně.

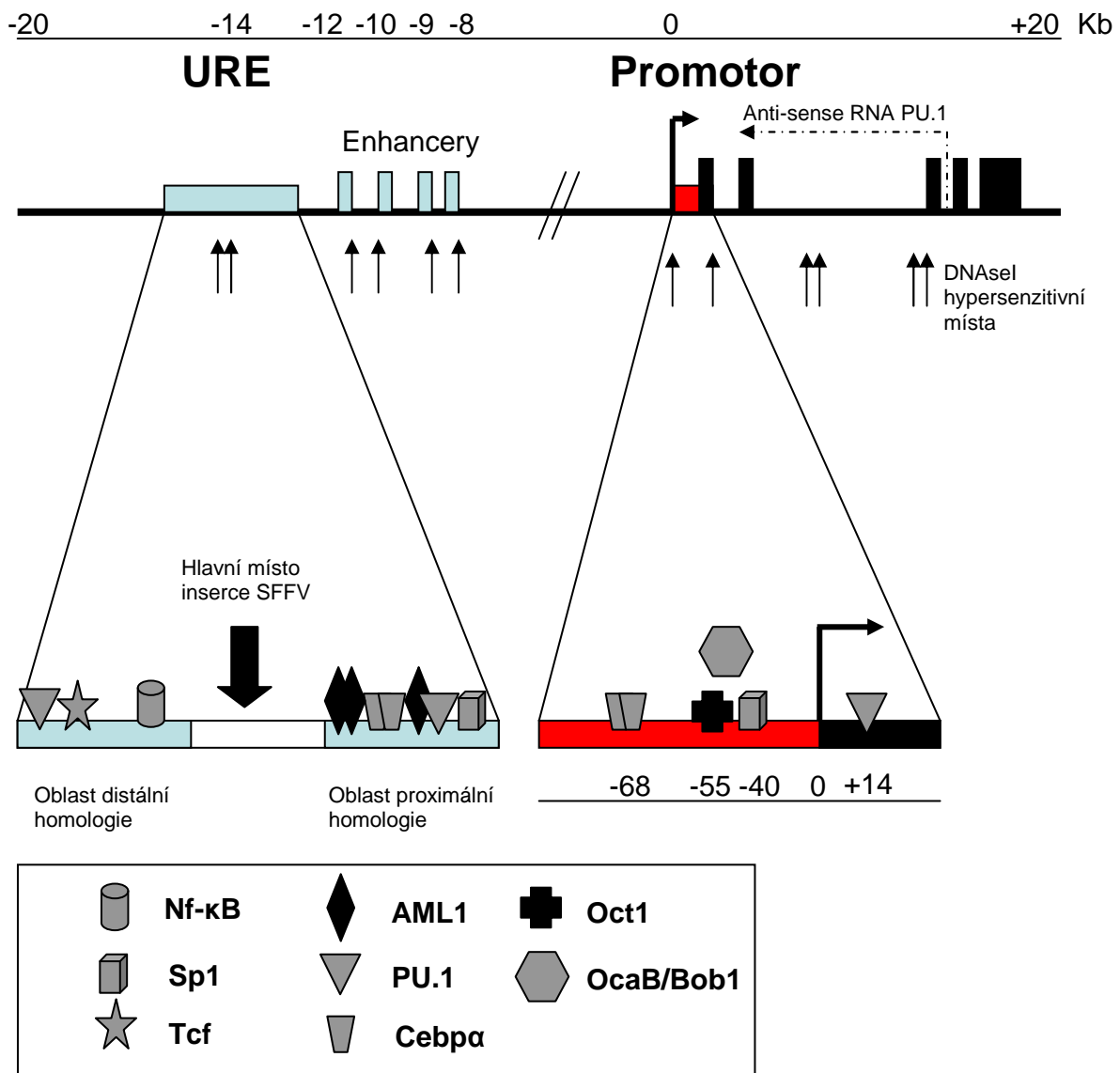
Blízkou regulační oblast genu PU.1 představuje sekvence promotoru a přilehlé oblasti. Promotor myšského genu *PU.1* je tvořen 334 páry bazí (lidský 290) a obsahuje vazebná místa pro řadu transkripčních faktorů, které se podílejí na regulaci transkripce genu *PU.1*. Vazebná místa pro protein PU.1, které hraje roli v pozitivní autoregulační smyčce zapínání exprese PU.1, se nacházejí v několika oblastech včetně promotoru a URE (Chen et al., 1995). Tato pozitivní autoregulace představuje společně s vazbou transkripčního faktoru Sp1 do

vazebného místa v oblasti -40 bp promotoru *PU.1* hlavní mechanismus promotorem-řízené exprese *PU.1* v myeloidních buňkách (Chen et al., 1996). Do oktamerové sekvence ATGCAAAT v oblasti -55 bp proximálního promotoru se dále váže transkripční faktor Oct-1, jehož spolupráce s liniově specifickým koaktivátorem OcaB/Bob1/Obf1 hraje klíčovou roli v zajištění promotorem řízené exprese *PU.1* v B lymfocytech (Chen et al., 1996). Později bylo v oblasti -68 bp nalezeno rovněž vazebné místo pro Cebp α . O vazbě Cebp α do promotorové oblasti *PU.1* se soudí, že se podílí na zvýšení hladiny *PU.1* při navození monocytárně-granulocytárního genového programu oproti nízké hladině *PU.1* potřebné pro liniovou specifikaci do B-lymfocytů (Kummalu et al., 2003).

Vzdálenou regulační oblast genu kódujícího protein *PU.1* představuje v první řadě regulační element URE. Tato regulační oblast se nachází v pozici 5' k místu transkripčního startu ve vzdálenosti cca -14 kb u myšího a -17,3 kb u lidského genu (Li et al., 2001). Oblast URE zabezpečuje nasednutí RNA polymerasy II na promotor genu a zodpovídá za regulaci zhruba 80% exprese *PU.1* (Rosenbauer et al., 2004). Oblast (myšího) URE se skládá ze dvou vysoce konzervovaných homologních oblastí – proximální (3'; 236 bp) a distální (5'; 296 bp) oddělených cca 450 bp evolučně nekonzervovaných sekvencí. V oblasti těchto nekonzervovaných sekvencí se nachází hlavní integrační místo viru SFFV (Okuno et al., 2005), jež hraje roli při vzniku myší erythroleukemie.

Obě konzervované podoblasti URE obsahují řadu vazebných míst různých transkripčních faktorů. V oblasti proximální URE se nalézá vazebné místo pro *PU.1*, který je schopný i skrze něj autoregulačně řídit svoji vlastní expresi (Okuno et al., 2005). Dále se zde nacházejí vazebná místa transkripčních faktorů Elf-1, Cebp α , Sp1 a Runx-1/AML1 (Okuno et al., 2005). Vazby transkripčních faktorů do regulační oblasti URE je liniově specifická. V B buňkách se do oblasti URE váže jiná skupina transkripčních faktorů než v myeloidních buňkách (Hoogenkamp et al., 2007). Faktor Cebp α má v proximální oblasti URE dvě silná vazebná místa a jeho vazba indukuje monocytární vývoj (Yeaman et al., 2007). Vazba AML1 do třech vazebných míst poblíž vazebného místa pro *PU.1* v URE má zásadní význam pro celkovou regulaci exprese *PU.1* a mutace všech těchto vazebných míst se na úrovni fenotypu projevuje stejně jako ztráta celého URE – poklesem exprese *PU.1* o 80% (Huang et al., 2008). AML1 se přitom do svých vazebných míst v URE váže především v prekurzorových buňkách, zatímco s maturací buněk jeho vazba klesá (Hoogenkamp et al., 2007). V distální podoblasti URE se nacházejí vazebná místa pro *PU.1*, Tcf a Nf- κ b (Okuno

et al., 2005; Bonadies et al., 2010 [*Oncogene*]). Vazba Tcf faktoru spojeného s Wnt signální dráhou do oblasti URE vede k inhibici exprese PU.1, která je potřebná při vývoji a diferenciaci T-lymfocytů. Delece oblasti URE má proto za následek poruchu této diferenciaci v přechodu mezi stádii DN2 a DN3 (Rosenbauer et al., 2006).



Obrázek 1. Schéma struktury myšského genu *PU.1*. Obrázek znázorňuje genový lokus *PU.1* včetně distálních cis-regulačních oblastí (modré obdélníky), promotoru (červený obdélník), exonů (černé obdélníky), hypersenzitivních míst k DNase I (šipky) a místa počátků transkripce sense a anti-sense transkriptů *PU.1*. Oblasti URE (-14 kb) a promotoru jsou znázorněny v detailu včetně vazebných míst pro transkripční faktory a hlavního místa inserce viru SFFV (Adaptováno podle Hoogenkamp et al., 2007).

Aktivaci transkripce genu *PU.1* vazbou PU.1 a dalších faktorů na jejich vazebné sekvence předchází epigenetické změny na úrovni chromatinu. Tyto procesy se odehrávají na histonových molekulách v oblasti URE, kde dochází například k acetylaci (Ac) na devátém a trimetylaci (Me3) na čtvrtém lysinu (K) histonu H3 (Hoogenkamp et al., 2007). Tyto epigenetické změny jsou asociovány s aktivací genové exprese v místě jejich působení (Barski et al., 2007; přehledně Kouzarides, 2007). Mechanismy, kterými k této aktivaci dochází, zahrnují přinesení chromatin-remodelačních enzymů (ATPasy a další) na DNA a přímé přerušení kontaktu mezi histony v sousedních nukleosomech nebo mezi histony a DNA (acetylace neutralizuje záporný náboj lysinu), což vede k rozvolnění chromatinových struktur vyššího řádu a zpřístupnění DNA pro transkripční faktory a RNA polymerázu (přehledně Kouzarides, 2007). Epigenetický stav chromatinu v regulačních úsecích genu *PU.1* je přitom liniově specifický. Při vývoji B a T lymfocytů získává chromatin regulačních oblastí genu *PU.1* alternativní strukturu než při vývoji monocytů a granulocytů (Hoogenkamp et al., 2007). Jiným epigenetickým mechanismem ovlivňujícím expresi PU.1 je metylace DNA. Oblast prvního exonu genu *PU.1* je v B lymfocytech, makrofázích a pre-T buňkách částečně metylovaná. Diferencovanější stádia vývoje T-buněk mají DNA v této oblasti metylovanou, což koreluje se snížením exprese PU.1 (Amaravadi et Klemsz, 1999).

K přítomnosti PU.1 na jeho vazebných sekvencích stejně jako k aktivujícím histonovým modifikacím v URE dochází na poměrně velké oblasti zabírající více než 1 kb úsek molekuly DNA (Okuno et al., 2005). Nové výzkumy ukazují, že úroveň hladiny PU.1 je kromě výše popsaných procesů a vazeb odehrávajících se v URE (-14 kb před transkripčním startem) a v promotorové oblasti *PU.1* regulována také elementy lokalizovanými ve čtyřech nově objevených DNase hypersenzitivních místech v oblastech -12, -10, -9 a -8 kb vzhledem ke transkripčnímu startu (Leddin et al., 2011). Monocytárně specifické cis-regulační elementy, zejména nejsilnější z nich v místě -12 kb, odpovídají aktivaci URE zprostředkovanou s Cebpα tak, že samy stimulují URE k dalšímu zvýšení exprese PU.1 (Leddin et al., 2011). Tato vzájemná kooperace se odráží na úrovni chromatinu. V závislosti na vazbě Cebpα v oblasti URE dochází k přímé vazbě dostupných molekul PU.1 na regulační oblast v místě -12 kb, což má samo za následek zvýšení acetylace H3K9 tohoto regulačního elementu (Leddin et al., 2011).

Výčet mechanismů regulujících expresi PU.1 zahrnuje také mechanismy účinkující post-transkripčně. Význam oblasti URE pro regulaci exprese PU.1 je v této souvislosti podpořen

jeho rolí v řízení syntézy anti-sense RNA transkriptu PU.1, jehož transkripční start se nachází v oblasti třetího intronu genu *PU.1*. Tento anti-sense RNA transkript moduluje hladinu PU.1 v buňce tím, že interferuje s translací mRNA kódující PU.1 protein (Ebraldze et al., 2008). Jiným post-transkripčním mechanismem regulace hladiny PU.1 je inhibice translace PU.1 vazbou mikroRNA miR-155 na 3'koncový nepřekládaný úsek mRNA transkriptu PU.1 (Vigorito et al., 2007, Vargova et al. 2011).

Předchozí text ve stručnosti shrnul zásadní význam krvevorných transkripčních faktorů, epigenetických modifikací a post-transkripčních mechanismů v regulaci exprese PU.1 skrze promotor a vzdálené cis-regulační elementy, mezi něž patří URE a čtyři recentně objevené vzdálené regulační oblasti. Zmíněné mechanismy se uplatňují jak při regulaci bazální hladiny myšího genu *PU.1* tak i při zvýšení jeho exprese, která je spojena s monocytární diferenciací.

1.2.3 Role PU.1 v liniové determinaci a specifikaci

Transkripční faktor PU.1 řídí proces liniové determinace a specifikace krvevorné buňky selektivní kooperací s dalšími transkripčními faktory na promotorech svých cílových genů. Tato kooperace se odvíjí od výše hladiny exprese PU.1 v buňce, o jejíchž regulačních mechanismech jsem se zmínil v předchozí kapitole.

PU.1 je ve vyšších hladinách produkován v krvevorných kmenových buňkách, multipotentních progenitorech, společných myeloidních progenitorech, společných lymfocytárních progenitorech a granulocytárně-makrofágových progenitorech (Akashi et al., 2000; Nutt et al., 2005). Vyšší hladinu PU.1 mají rovněž erythrocině-megakaryocytární progenitory z fetálních jater, přičemž vysoká hladina PU.1 je důležitá pro jejich sebe-obnovování (Back et al., 2004).

Dosažení určité, přísně regulované výše hladiny exprese PU.1 je klíčové pro vývoj určitých buněčných linií. Při diferenciaci a maturaci monocytů a granulocytů se hladina PU.1 v buňkách dále zvyšuje, při vývoji B-lymfocytů klesá a u zralých B buněk je PU.1 exprimován jen slabě (Back et al., 2005; DeKoter et al., 2007). Nízká hladina PU.1 v buňce aktivuje transkripční program B lymfocytů, zatímco vyšší hladina PU.1 tento program inhibuje a naopak zapíná program myeloidní diferenciaci (DeKoter et Singh, 2000).

Zvýšení hladiny PU.1 je důležité při vzniku granulocytárně-makrofágových progenitorů (DeKoter et al., 2007). Hladina PU.1 přitom dále určuje specifikaci těchto progenitorů do konečných buněčných typů. Střední hladina PU.1 vede ke smíšené produkci granulocytů a monocytů, zatímco dalším zvýšením hladiny PU.1 dochází přednostně k monocytární diferenciaci (Laslo et al., 2006). Při specifikaci osudu krevní buňky mezi monocytárním a granulocytárním vývojem hraje důležitou roli regulační vztah mezi hladinami PU.1 a CEBP α (Dahl et al., 2003). Oba tyto transkripční faktory řídí expresi sekundární determinant EGR-1, EBR-2 a GFI-1 (Laslo et al., 2006). Pro indukci granulocytární diferenciaci je nutná represe aktivity PU.1 transkripčním faktorem GFI-1, jehož exprese je řízena vysokou hladinou CEBP α v buňce (Dahl et al., 2007; Laslo et al., 2008).

Během vývoje T lymfocytů dochází k silné inhibici exprese PU.1 ve stádiu DN3 a ve zralých T buňkách se PU.1 netvoří (Anderson et al., 2002). PU.1 v závislosti na své hladině v buňce vypíná geny specifické pro T a NK buňky (Kamath et al., 2008). NK buňky a NK-T buňky rovněž nevykazují žádnou detekovatelnou aktivitu PU.1 (Back et al., 2005).

Hladina PU.1 z počáteční vyšší úrovně silně klesá také při erythroidně-megakaryocytární diferenciaci a ve zralých erythrocytech je jen velmi nízká (Galson et al., 1993). Ke snížení hladiny PU.1 dochází již na úrovni erythroidně-megakaryocytárně předurčené subpopulace společných myeloidních progenitorů (Nutt et al., 2005). Zvýšená hladina PU.1 nicméně nebrání dalšímu vývoji červené krve *in vivo*, který může pokračovat až do stádia proerythroblastu, kde je zablokovan (Moreau-Gachelin et al., 1996). PU.1 inhibuje erytroidní transkripční program tím, že váže GATA-1 na jeho cílových genech, kde indukuje vznik represivní chromatinové struktury (Stopka et al., 2005).

Změna hladiny PU.1 může v kooperaci s působením dalších transkripčních faktorů indukovat přeprogramování buněčných linií. V pre-T-buňkách navozuje zvýšení exprese PU.1 a CEBP α trans-diferenciaci na makrofágy a myeloidní dendritické buňky (Laiosa et al., 2006). Ve fibroblastech došlo po zvýšení hladiny těchto transkripčních faktorů k zapnutí monocytárního genového programu a trans-diferenciaci na buňky podobné makrofágům (Feng et al., 2008). V buňkách myší erytroleukemie (MEL) vedlo zvýšení hladiny PU.1 k trans-diferenciaci těchto buněk do monocytům-podobných atypických buněk (Burda et al., 2009).

Závěrem této části je třeba zdůraznit, že role PU.1 se neomezuje na manipulaci exprese několika dalších transkripčních faktorů řídicích linií specifickými krevními buňkami. PU.1 v kooperaci s dalšími transkripčními faktory přímo řídí expresi řady genů asociovaných s diferencovanými buňkami. Patří k nim například geny CD11b (Pahl et al., 1993), CSF1R (Ross et al., 1994), FcγRIII (Feinman et al., 1994), CSF2RA (Zhang et al., 1996), CSF3R (Smith et al., 1996), c-fes (Heydemann et al., 1996), IL7R (DeKoter et al., 2002), CHI3L1 (Rehli et al., 2003) a další.

Předchozí text ve stručnosti shrnul význam PU.1 v liniové determinaci a specifikaci daných transkripčních aktivit či inhibicí určitých diferenciačních programů na základě různé úrovně exprese PU.1 v buňce. Hladiny PU.1 jsou tedy obecně velmi důležité pro řízení buněčného vývoje a kromě jiného též pro tvorbu zcela specifických typů buněk, jako jsou makrofágy, granulocyty, nebo lymfocyty.

1.2.4 Role PU.1 v potlačování leukemogeneze

Vedle své role v buněčné diferenciaci (liniové determinaci a specifikaci) funguje transkripční faktor PU.1 také jako inhibitor vzniku leukémie. Tomu odpovídá fenotyp získaný v průběhu krvetvorby při ztrátě funkce PU.1. Delece oblasti URE u obou alel myšského genu *PU.1* vede ke snížení exprese PU.1 v kostní dřeni o 80% a k vzniku AML u myši (Rosenbauer et al., 2004). U některých myší s deletovaným URE se společně s AML rozvinuly také T-buněčné lymfomy a B-lymfoproliferativní syndrom podobný lidské chronické lymfocytární leukémii (Rosenbauer et al., 2006). Je zajímavé, že heterozygotní myši s expresí PU.1 okolo 50% vypadají normálně (Rosenbauer et al., 2004). Mutace či ztráty genu *PU.1* jsou dále často přítomné v radiačně vyvolané akutní leukémii u myši. V případě těchto leukémií je delece jedné z alel PU.1 doprovázena v 87% případů bodovou mutací druhé alely (Cook et al., 2004). Tato situace se však nevyskytuje u člověka (Suraweera et al., 2005). Úplná inaktivace *PU.1* v dospělé myši vede rovněž ke vzniku AML (Metcalf et al., 2006).

U člověka byly mutace genu *PU.1* v oblasti kódující jeho DNA vazebnou, transaktivační i PEST doménu objeveny asi v 7% případů AML podtypů M4 a M5 ve vzorku 126 pacientů japonské populace (Mueller et al., 2002). Tyto mutace mají za následek jak narušení vazby PU.1 na DNA, tak i ztrátu schopnosti PU.1 proteinu synergizovat s dalšími transkripčními faktory a koaktivátory při aktivaci svých cílových genů (Mueller et al., 2002). U zhruba 3%

pacientů s AML byl objeven polymorfismus ve vazebném místě pro NF- κ B v oblasti URE, který vedl k neschopnosti NF- κ B aktivovat expresi PU.1 (Bonadies et al., 2010 [*Oncogene*]). Rovněž heterozygotní delece v oblasti URE vedoucí ke snížení exprese PU.1 mohou být asociovány se vznikem AML-M2. (Bonadies et al., 2010 [*Blood*]) Bodová mutace v oblasti URE, která brání nasednutí chromatin remodelujícího regulátoru SATB1 na DNA, je u člověka spojována s agresivními formami AML (Steidl et al., 2007). Hladina PU.1 je výrazně snížena v buněčných liniích i primárních buňkách AML charakterizované translokací t(8;21) (Vangala et al., 2003) a buňkách promyelocytické leukémie s translokací t(15;17) (Mueller et al., 2006).

Řada onkogenních mechanismů, jakým je například interference mRNA *PU.1* s microRNA-155, vede k poklesu proteinové syntézy PU.1 a tedy i ke bloku terminální fáze vývoje myeloidních buněk (O'Connell et al., 2008). Hladina MicroRNA-155, negativního regulátoru exprese řady genů, včetně právě *PU.1*, je přitom zvýšená u řady hematologických malignit, jako jsou chronická lymfocytární leukémie (Calin et al., 2005; Vargova et al., 2011), Hodgkinův lymfom (van den Berg et al., 2003; Kluiver et al., 2005), velký difúzní lymfom B-buněk (Eis et al., 2005; Kluiver et al., 2005) a Burkittův lymfom u dětí (Metzler et al., 2004).

Porucha regulace hladiny PU.1 je rovněž příčinou vzniku myší erytroileukémie (MEL). Integrace DNA viru SFFV do oblasti URE má za následek neregulovanou, trvalou expresi PU.1 ve středně nízké hladině. Ta vede k transformaci prekurzorových erytrodiních buněk a jejich zablokování ve stádiu proerytoblastu, kdy buňka není schopná projít cestou pozdějších fází erytrodiní diferenciaci (Moreau-Gachelin et al., 1988). Role trvalé neregulované exprese PU.1 při vzniku erytroleukemií byla popsána také na modelu PU.1-transgenní myši (Moreau-Gachelin et al., 1996). Mechanismus těchto onemocnění zahrnuje potlačení funkce erytroidního transkripčního faktoru Gata-1 zprostředkované PU.1 (Rekhtman et al., 1999; Zhang et al., 2000).

Zvýšení hladiny PU.1 obecně vede k diferenciaci blastů u AML a jiných hematologických malignit a k zastavení buněčného cyklu (Mueller et al., 2006, Durual et al., 2007), případně k trans-diferenciaci do jiné krevní vývojové řady (Burda et al., 2009).

1.3 Terapie MDS pomocí AZA

1.3.1 Obecný úvod k DNA metylaci

Metylace DNA na páte pozici cytosinu patří k nejrozšířenějším epigenetickým procesům regulujícím genovou expresi. Savčí genom obsahuje zhruba 3×10^7 metyl-cytosinových zbytků (m^5C), a to především na 5'- m^5CG -3' dinukleotidech, tzv. CpG ostrůvků (Bestor, 2000). Ze všech CpG ostrůvků v savčím genomu je metylováno v průměru mezi 60-90% (Ehrlich et al., 1982). Mezi procesy, jejichž základem je metylace DNA, nebo které jsou DNA metylací ovlivněny, patří inaktivace chromozómu X u samic savců, genový imprinting, buněčná diferenciace a další (Holliday et Pugh, 1975; přehledně: Bestor, 2000). Metylová skupina na cytosinech inhibuje v místě svého výskytu transkripci tím, že zasahuje do oblasti velkého žlábků DNA, čímž překáží nasednutí RNA polymerasy (přehledně: Bird 2002; Herman et Baylin 2003). Velká většina metylace DNA se u člověka odehrává v oblastech transpozomů a předpokládá se, že DNA metylace se evolučně vyvinula jako obranný mechanismus sexuálně se rozmnožujících organismů před škodlivým projevem těchto „parazitujících“ sekvencí DNA (Yoder et al., 1997 [*Trends Genet*]). CpG ostrůvky se rovněž často nachází v oblasti genových promotorů a regulačních elementů řídících genovou expresi (přehledně: Bestor, 2000).

Metylace DNA je zprostředkována DNA metyltransferázami DNMT1, DNMT3a a DNMT3b. Metyltransferáza DNMT1 je považována za klíčovou pro udržování existujícího metylačního vzorce DNA v dceřiných buňkách po buněčném dělení, ačkoliv je patrně rovněž schopna metylovat DNA *de novo* (Yoder et al., 1997 [*J. Mol. Biol.*]). Nefunkčnost genu pro DNMT1 vede k rozpadu celogenomového metylačního vzorce resp. demetylaci celého genomu a smrti během embryonálního vývoje (Li et al., 1992). DNA metyltransferázy DNMT3a a DNMT3b metylují DNA *de novo* (Okano et al., 1998; Okano et al., 1999). Rovněž delece genů pro DNMT3 metyltransferázy není v homozygotním stavu slučitelná se životem (Okano et al., 1999). Mutace v genu pro DNMT3b způsobuje vznik syndromu ICF (imunodeficience, nestabilita centromer, poruchy vývoje obličeje) s nemetylovanou DNA ve specifických úsecích chromozómů 1, 9 a 16 (Xu et al., 1999).

DNA metylaci si nelze představit jako proces, který by epigeneticky ovlivňoval genovou expresi sám o sobě. Bylo prokázáno, že metylace DNA resp. činnost DNA metyltransferáz je

úzce propojena s dalšími epiegentickými procesy na molekulách histonů, jejichž souhrnným výsledkem je pak vytvoření transkripčně represivní chromatinové struktury (přehledně: Cedar et Bergman, 2009).

DNA metyltransferáza DNMT1 je například nutná pro složení represivní chromatinové struktury složené z proteinů skupiny Polycomb a ubiquitin ligázy histonů H2 – PRC1/BMI1 (Hernandez-Muñoz et al., 2005). Na vzniku této represivní struktury se podílí také protein Dmap1 asociující právě s DNMT1 (Negishi et al., 2006). DNMT1 rovněž funkčně kooperuje s heterochromatinovým proteinem HP1 a metyltransferázou histonů G9a, která metyluje lysin 9 na histonu H3 (Smallwood et al., 2007). Interakce s DNA metyltransferázami byla prokázána u metyltransferázy histonů EZH2, která v rámci represivního komplexu Polycomb metyluje lysin 27 na histonu H3 (Vire et al., 2007). DNMT1 je rovněž schopna tvořit represivní komplex za účasti jak Dmap1 tak deacetylázy histonů HDAC2 (Rountree et al., 2000). DNA metyltransferáza DNMT3b asociuje a kooperuje při vytvoření transkripčně represivní struktury chromatinu s metyltransferázou histonů Suv39h1, deacetylázami histonů HDAC1 a HDAC2, s heterochromatinovými proteiny HP1 a s chromatin-remodelační ATPázou SNF2H (Geiman et al., 2004). DNMT3a je schopna přímo interagovat s metyltransferázou histonů SETDB1 a společně s ní se přemístit do oblasti promotoru genů, jejichž exprese je potlačena v maligních buňkách HeLa (Li et al., 2006).

1.3.2 DNA metylace u MDS

MDS je klonálním onemocněním krvetvorby, které se vyznačuje neobyčejnou heterogenitou jak na úrovni molekulární patofyziologie onemocnění, tak na úrovni svého klinického projevu a prognózy. Je charakterizován poruchou diferenciace krevních buněk, která se projevuje cypopeniemi červených krvinek, granulocytů a krevních destiček v periferní krvi a postupným hromaděním nezralých krevních buněk v kostní dřeni. Ve zhruba třetině případů onemocnění MDS transformuje do sekundární AML se špatnou prognózou (přehledně: Silverman, 2001).

Pro svojí vysokou heterogenitu je MDS rozdělován na základě několika klasifikačních systémů do řady podtypů onemocnění definovaných na základě parametrů jako je buněčná morfologie, cytogenetický nálezn a kombinace „rizikových faktorů“ určujících prognózu (přehledně: Silverman, 2001). Nejstarší klasifikační systém MDS je označován jako FAB (francouzsko-americko-britský) a jeho členění MDS na pět různých podtypů se opíralo

především o podíl blastů v kostní dřeni a periferní krvi pacientů (Bennet et al., 1982). Novější klasifikační systém MDS, označovaný jako WHO, z této morfologické klasifikace onemocnění vychází (Tabulka 1), avšak zpřesňuje ji a částečně bere při klasifikaci onemocnění v potaz existenci specifických cytogenetických aberací jako je delece dlouhých ramének chromozómu 5 (Harris et al., 1999). Mezinárodní bodovací systém pro hodnocení prognózy MDS, označovaný jako IPSS, klasifikuje MDS pacienty do čtyř skupin na základě vypočteného „rizika“ prognózy vývoje onemocnění s odlišitelnou dobou mediánu celkového přežití pacientů a dobou progresu onemocnění do AML (Tabulka 2). „Riziko“ je vypočítáno jako kombinace hodnot třech uvažovaných rizikových faktorů, mezi které patří cytogeneticky aberantní nálezy v buňkách kostní dřene, procento blastů v kostní dřeni a počet krevních řad zasažených cytopenií (Tabulka 3) (Greenberg et al., 1997). Méně používaným bodovacím systémem pro hodnocení prognózy pacientů s MDS je systém WPSS, vycházející z WHO klasifikace, který rozděluje pacienty podle vypočteného „rizika“ do pěti skupin. Za faktory vstupující do hodnocení prognózy bere tento systém podtyp MDS podle WHO klasifikace, závislost pacienta na transfúzích a cytogenetický nález (Tabulka 4) (Malcovati et al., 2007).

FAB klasifikace	WHO klasifikace
Refrakterní anémie (RA) < 5 % blastů	Refrakterní anémie (RA) Refrakterní cytopenie s multilineární dysplazií (RCMD) MDS-neklasifikovatelný (MDS-U) MDS s izolovanou del(5q)
Refrakterní anémie s prsténčitými sideroblasty (RARS) < 5 % blastů + > 15 % prsténčitých sideroblastů	Refrakterní anémie s prsténčitými sideroblasty (RARS) Refrakterní cytopenie s multilineární dysplazií a prsténčitými sideroblasty (RCMD-RS)
Refrakterní anémie s nadbytkem blastů (RAEB) 5–20 % blastů	Refrakterní anémie s nadbytkem blastů I. (RAEB I.) 5–9 % blastů Refrakterní anémie s nadbytkem blastů II. (RAEB II.) 10–19 % blastů
RAEB v transformaci (RAEB-t) 21–30 % blastů	Akutní myeloidní leukemie (AML) > 20 % blastů

Tabulka 1. Srovnání klasifikačních systémů MDS – FAB a WHO s uvedením názvů podskupin onemocnění a definujícím procentem blastů v kostní dřeni (z FAB klasifikace byla odstraněna kategorie chronické myelomonocytární leukémie – CMML) (S laskavým svolením Dr. Jonášové převzato z Čermák et Jonášová, 2010).

riziko	skóre	medián přežití roky	AML transformace roky
nízké	0	5,7	9,4
střední I	0,5–1,0	3,5	3,3
střední II	1,5–2,0	1,2	1,1
vysoké	≥ 2,5	0,4	0,2

Tabulka 2. Mezinárodní bodovací systém pro hodnocení prognózy MDS (IPSS) s uvedením kategorií MDS dle hodnoty „rizikového skóre“, jejich mediány přežití a mediány transformace onemocnění do AML (S laskavým svolením Dr. Jonášové převzato z Čermák et Jonášová, 2010).

Body	0	0,5	1	1,5	2
% blastů ve dřeni	<5	5–10	–	11–20	21–30
Počet cytopenií	0/1	2/3			
Karyotyp	příznivý	intermediární	nepříznivý		

Tabulka 3. Mezinárodní bodovací systém pro hodnocení prognózy MDS (IPSS) s uvedením způsobu bodování prognostických faktorů „rizika“ na základě procenta blastů v kostní dřeni pacientů, počtu cytopenií zasahujících jednotlivé krevní řady a cytogenetického nálezu. Za příznivý karyotyp se považuje delece dlouhých ramének chr.5, delece dlouhých ramének chr. 20 a nepřítomnost abnormalit za současné nepřítomnosti chromozómu Y. Za nepříznivý karyotyp se považuje současná přítomnost více než tří cytogenetických abnormalit, nebo abnormality chromozómu 7. Ostatní cytogenetický nálezy se považují za intermediární z hlediska rizika (S laskavým svolením Dr. Jonášové převzato z Čermák et Jonášová, 2010).

WHO-Based Prognostic Scoring System (WPSS)				
Skupiny	Počet bodů	1	2	3
WHO podtypy	0	1	2	3
Závislost na transfuzích	RA, RARS, 5q-	RCMD, RCMD-RS	RAEB I	RAEB II
Karyotyp (IPSS)	ne	ano		
	příznivý	intermediární	nepříznivý	
WPSS rizikové skupiny		Skóre		
Velmi nízké		0		
Nízké		1		
Střední		2		
Vysoké		3–4		
Velmi vysoké		5–6		

Tabulka 4. Bodovací systém pro hodnocení prognózy MDS postavený na bázi klasifikace podle WHO (WPSS). V horní části tabulky je uveden způsob bodování prognostických faktorů „rizika“ na základě podtypu onemocnění podle WHO klasifikace (Harris et. al., 1999), závislosti pacienta na transfuzích a cytogenetického nálezu, který je hodnocen stejným způsobem jako u IPSS. V dolní části tabulky jsou uvedeny rizikové skupiny pro pacienty s MDS na základě dosaženého součtu bodů „rizika“ (S laskavým svolením Dr. Jonášové převzato z Čermák et Jonášová, 2010).

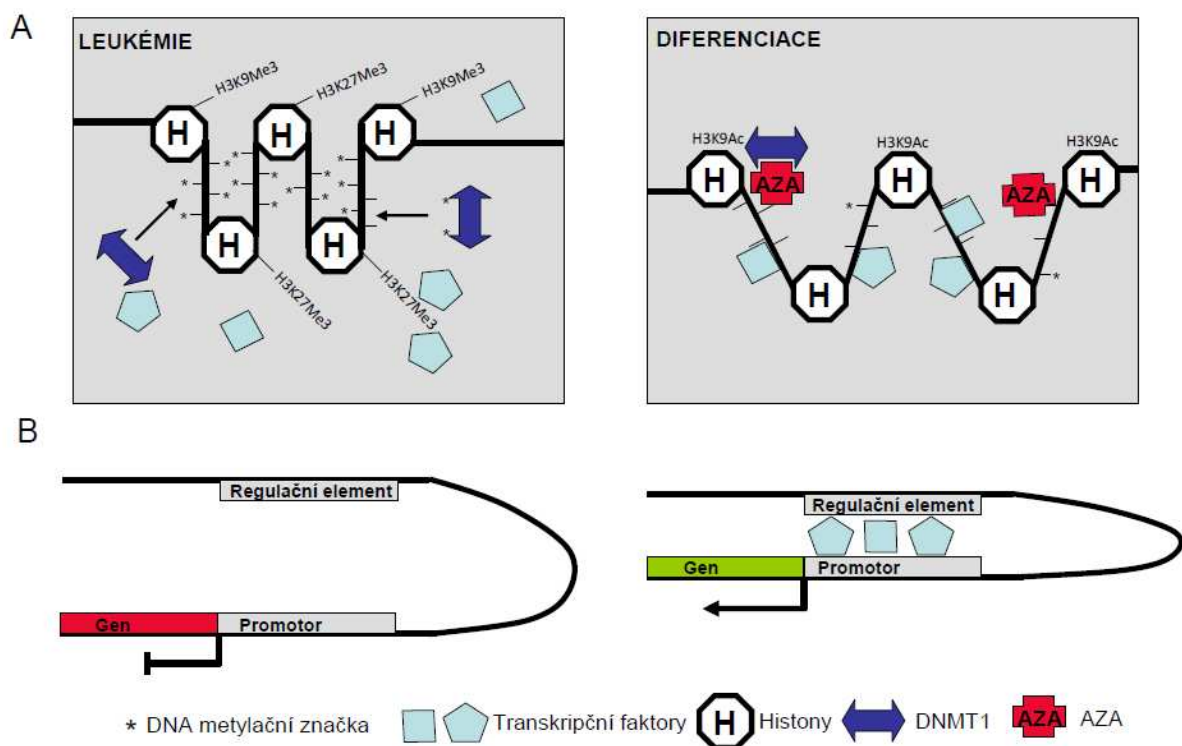
Jedním z charakteristických rysů MDS je aberantní zvýšená metylace DNA v řadě oblastí regulujících genovou expresi. Aberantní metylace DNA v regulačních oblastech genů byla asociována s AML již v roce 1987 (Baylin et al, 1987). U MDS se na význam metylace DNA začalo více poukazovat až v posledním desetiletí. U CMML, dnes již nepoužívaného podtypu v klasifikaci MDS, byla na vzorku 33 pacientů zjištěna v 58% případů zvýšená metylace genu pro regulační molekulu buněčného cyklu p15/INK4b (Tassema et al., 2003). Další studie na 47 dětských pacientech s MDS ukázala, že ve 32% případů byl aberantně metylován gen *p15/INK4B* a v 8% aberantně metylován další gen pro protein účastnící se kontroly buňčného cyklu, p16/INK4A. V obou případech zvýšená metylace genu asociovala s progresí onemocnění (Rodrigues et al., 2010). U MDS byla na vzorcích 86 pacientů v 31% případů prokázána pro MDS specifická zvýšená metylace v regulační oblasti genu pro SOCS-1, negativně působící regulační molekulu cytokinové signální dráhy. Použití inhibitorů DNA

metyltransferáz (DNMTi) ukázalo, že tato aberantní metylace tlumí transkripci genu *SOCS-1* (Brakensiek et al., 2005 [*Br J Haematol*]). Zvýšená metylace byla rovněž zjištěna ve 32% z 37 vzorků pacientů MDS na promotoru tumor-potačujícího genu *HIC1* a ve 27% na promotoru genu *CDHI* hrajícího roli v mezibuněčné komunikaci (Aggerholm et al., 2006).

Výše zmíněné práce přinesly doklady o aberantní zvýšené metylaci DNA jednotlivých genů u MDS, která ovlivňuje jejich expresi. Studie na 184 pacientech s AML a MDS testující metylaci na 1505 různých CpG ostrůvcích prokázala široký rozsah metylace DNA na promotorech genů u MDS a korelaci celkové úrovně této aberantní metylace s progresí onemocnění a transformací MDS do AML (Jiang et al., 2009). Zvýšená metylace byla zaznamenána na promotorech tumor-potlačujících genů (*DCC*, *HIC1*), genů zajišťujících opravu DNA (*OGG1*), nebo genů hrajících roli ve vývoji a diferenciaci (*MYOD1*, *HOXA5*, *FGF2* a další) (Jiang et al., 2009). Aberantní metylace v promotoru genu *FZD9*, kódujícího receptor pro Wnt v rámci Wnt-signalizační dráhy, vysoce korelovala s progresí onemocnění a s celkovým přežitím pacientů a naopak negativně korelovala s expresí genu (Jiang et al., 2009). Zvýšená metylace DNA v regulačních oblastech genů u MDS/AML pacientů ve srovnání se zdravými jedinci, nebo pacienty s *de novo* AML byla prokázána i v celogenomové studii na 14 tisících různých promotorech (Figueroa et al., 2009).

Inhibitory DNA metyltransferázy DNMT1, jako je AZA a 5-aza-2'-deoxycytidin (Decitabin) jsou klinicky úspěšné při léčbě MDS, ale o mechanismech jejich působení na úroveň genové exprese v buňce se až donedávna mnoho nevědělo a dodnes zůstávají předmětem jisté kontroverze. Obecně se dnes předpokládá, že AZA se inkorporuje do DNA a jako DNMTi vytváří kovalentní vazbu k DNMT1, která brání v její funkci a vede k její postupné depleci v buňce. AZA snižuje v různé míře a na různou dobu hladinu DNMT1 v modelových buněčných liniích pro lidské myeloidní leukémie (K562, HL-60, HEL) a je schopen snižovat úroveň metylace na CpG ostrůvcích v buněčných liniích HL-60, K562 a (u některých) pacientů s MDS (Stresemann et al., 2008). Bylo prokázáno, že AZA je schopen snížit metylaci genů *ESR1* (regulace transkripce, signální transdukce), *CDKN2B* (regulace buněčného cyklu), *IGSF4* (buněčná adheze) a *FHIT* (regulace buněčného cyklu) ve smíšené populaci mononukleárních buněk z periferní krve pacientů s MDS, přičemž tlumení metylace pozitivně koreluje s dobrou klinickou odpovědí na AZA a naopak perzistence zvýšené metylace výše uvedených genů je spojena se špatnou prognózou (Tran et al., 2011). Hladina exprese metylovaných genů u pacientů MDS byla snižena oproti zdravým kontrolám a AZA

byl schopen tuto hladinu po 3-5 cyklech působení zvýšit (Tran et al., 2011). Nedávná studie využívající globální přístupy na druhou stranu ukázala, že většina promotorů genů, jejichž exprese je stimulována AZA, nemá před začátkem léčby metylovanou DNA a že AZA na řadě genů způsobuje změny vzorců histonových modifikací v rámci zachování existence represivní chromatinové struktury (Komashko et Farnham, 2010). AZA v maligních blastech MDS indukuje defosforylaci transkripčního faktoru FOXO3A, která vede k jeho přesunu z cytoplasmy do buněčného jádra (a k iniciaci transkripce) (Thépot et al., 2011). Vzhledem k řadě prokázaných funkčních interakcí mezi DNMT1 a dalšími proteiny schopnými modifikovat histony (metyltransferázy histonů, deacetylázy histonů), nebo vytvářet a stabilizovat represivní chromatinovou strukturu, lze předpokládat, že působení AZA bude vyvolávat komplexní změny na epigenetické úrovni (Obrázek 2).



Obrázek 2. Schéma předpokládaného působení AZA v MDS. **(A)** Chromatin v regulační oblasti některých genů vytváří represivní strukturu: zvýšená metylace DNA vlivem DNMT1 a tri-metylace histonu H3 na lysinech 9 a 27 se podílí na vzniku kondenzovaného heterochromatinu, který neumožňuje nasazení transkripčních faktorů. AZA se inkorporuje do DNA a kovalentně váže DNMT1, čímž inhibuje její aktivitu. To vede k postupné ztrátě abnormálně zvýšené metylace, rozpadu represivních komplexů, v nichž figuruje DNMT1, změnám profilu modifikací na histonech a rozvolnění chromatinové struktury umožňující vazbu transkripčních faktorů. **(B)** Rozvolnění chromatinu a vazba transkripčních faktorů do regulační oblasti spolu s účastí enzymů remodelujících organizaci chromatinového vlákna vede k navození funkční interakce mezi vzdálenou regulační oblastí a oblastí promotoru určitého genu. V jejím důsledku dochází k obnovení původně potlačované genové exprese (a leukemické diferenciaci).

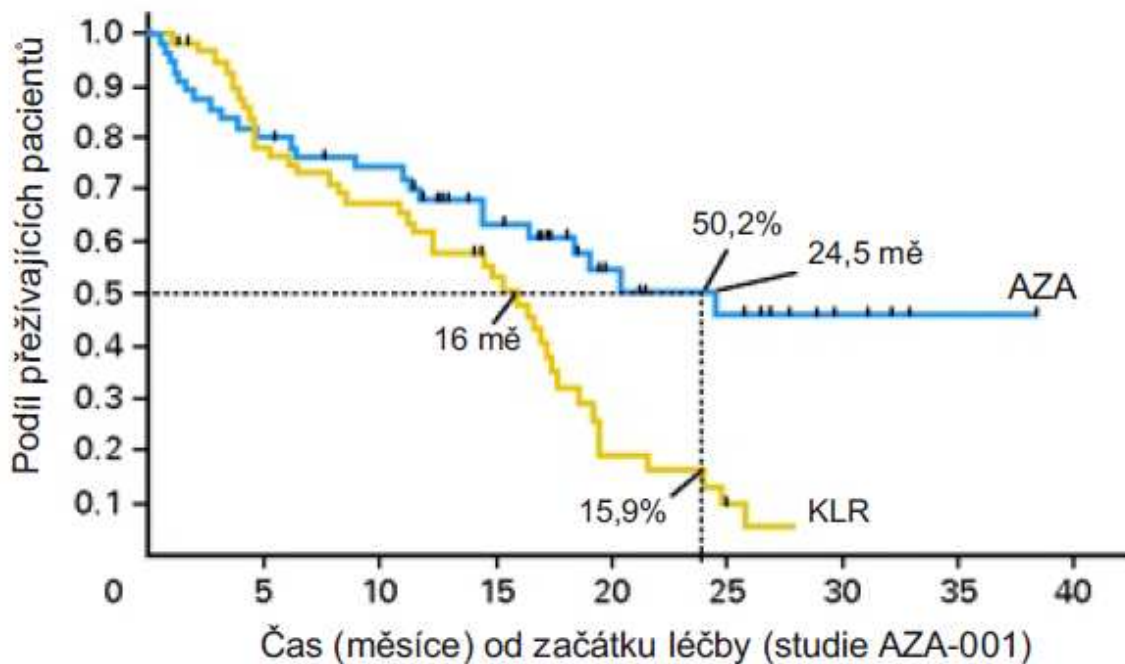
1.3.3 Klinické výsledky AZA při léčbě MDS/AML pacientů

AZA byl původně syntetizován československými vědci v 60. letech jako analog DNA baze cytidinu s očekávanými cytotoxickými účinky (Čihák, 1974). V roce 1984 začal být používán v klinických testech řízených Cancer and Leukemia Group B (CALGB) jako potenciální terapeutikum MDS (Silverman et al., 1993). V 90. letech a v první dekádě 21. století se AZA, používaný pod komerčním názvem Vidaza (Celgene) stal součástí klinických pilotních studií na pacientech s MDS se středním-2/vysokým rizikem a některých pacientech s AML (přehledně: Quintas-Cardama et al., 2010).

Jako první proběhly na pacientech s MDS/AML studie 8421, 8921 a 9221. Studie 8421 zahrnovala 48 pacientů, kterým byl AZA podáván intravenózně (Silverman et al., 1993). Studie 8921 zahrnovala 70 pacientů, kterým byl AZA podáván subkutánně (Silverman et al., 1994). Studie 9221 (fáze III) zahrnovala celkem 191 pacientů. Z nich 99 bylo náhodně zařazeno do ramene léčby s AZA podávaného subkutánně a 92 náhodně do ramene pozorování (resp. nejlepší podpůrné péče). V rameni pozorování bylo pak 41 pacientů, kteří vůbec nedostávali AZA a 51 pacientů, kteří po prvotním pozorování dostali léčbu AZA tj. byli přeřazeni do ramene léčby s AZA (Silverman et al., 2002). Ve všech třech studiích byl AZA pacientům podáván v dávce 75 mg/m^2 kontinuálně po dobu 7 dní. Cyklus podávání AZA byl opakován po každých 28 dnech. Z celkového souboru 309 pacientů bylo 68% mužů, 94% bělochů a věkový medián přesáhl 65 let (přehledně: Silverman et al., 2006). Výsledky těchto studií ukázaly, že 7-17% pacientů na AZA dosáhlo kompletní remise (CI), nepatrný počet 1-3% dosáhl částečné remise (PI) a 23-37% pacientů dosáhlo hematologického zlepšení (HI). Ve studii 9221 dosáhlo v rameni léčby AZA 7% pacientů s AML (podle WHO) CI nebo PI ve srovnání s 0% pacientů v rameni pozorování. Medián odpovědi pacientů na léčbu (CI, PI a HI) byl ve všech třech studiích 3 cykly (Silverman et al., 2006). Studie 9221 prokázala delší přežívání pacientů léčených AZA bez nutnosti krevních transfúzí a transfúzí krevních destiček, což demonstrovalo potenciál AZA ke zkvalitnění života pacientů s MDS/AML (Silverman et al., 2002).

Mezinárodní studie AZA-001 fáze III se zaměřila na celkové přežití (OS) pacientů s MDS ve vyšším riziku na léčbě AZA. Šlo o randomizovanou studii na 358 pacientech, z nichž bylo 179 náhodně zařazeno do režimu léčby s AZA a 179 do konvenčních léčebných režimů. Tyto

režimy zahrnovaly buď léčbu cytarabinem v nízkých dávkách (n=49), nebo intenzivní chemoterapii s cytarabinem v kombinaci s daunorubicinem nebo mitoxantronem (n=25), nebo nejlepší podpůrnou péčí včetně krevních infuzí, antibiotik a podávání G-CSF (n=105). AZA byl podáván subkutánně v dávce 75 mg/m² kontinuálně po dobu 7 dní. Cyklus podávání AZA byl opakován po každých 28 dnech (Fenaux et al., 2009). Počet pacientů, kteří dosáhli CR a PR v režimu léčby s AZA byl 29% versus 12% pro pacienty léčené v konvenčních léčebných režimech. Medián progresse MDS do AML byl u pacientů léčených AZA 17,8 měsíců, zatímco u pacientů léčených v konvenčních léčebných režimech dosáhl 11,5 měsíců. Nejdůležitějším zjištěním studie bylo, že léčba AZA prodlužuje OS pacientů. Dvou let se na léčbě s AZA dožilo 50,8% pacientů léčených AZA, ale pouze 26,2% pacientů léčených konvenčně (Fenaux et al., 2009). U pacientů klasifikovaných jako pacienti s AML (n=113; 32% pacientů ve studii AZA-001; věkový medián 70 let) se dvou let na léčbě s AZA dožilo 50% pacientů ve srovnání s 16% pacientů na konvenční léčbě (Obrázek 3) (Fenaux et al., 2010). Pacienti ve studii AZA-001 byli dále sledováni z hlediska možného prospěchu pokračujícího podávání AZA po dosažení první odpovědi. Ze 179 pacientů léčených AZA jich odpovědi na léčbu dosáhlo 91 (51%). Pokračování léčby s AZA po dosažení první odpovědi vedlo k zlepšení stavu u 48% pacientů (Silverman et al., 2011). Naopak pacienti, u kterých dojde k selhání léčby s AZA, mají následně velmi špatnou prognózu. Medián doby OS pacientů s MDS s vyšším rizikem po neúspěchu léčby s AZA byl 5,6 měsíců a pravděpodobnost dožití dvou let 15% (Prébet et al., 2011). Ještě horší prognóza po selhání léčby s AZA se týkala přežití pacientů s AML. Medián doby OS těchto pacientů po neúspěšné léčbě s AZA byl 3,4 měsíců a pravděpodobnost dožití jednoho roku 8% (Prébet et al., 2012).



Obrázek 3. Kaplan-Meierova analýza OS pacientů s AML léčených AZA a v rámci konvenčního léčebného režimu (KLR). AZA při léčbě pacientů s AML (podle WHO klasifikace) dosahuje více než trojnásobného počtu pacientů dožívajících se dvou let ve srovnání s léčbou v konvenčních léčebných režimech (Adaptováno podle Fenaux et al., 2010).

Na základě výsledků studií 9221 a AZA-001 (fáze III) byl AZA schválen v USA k léčbě všech pacientů s MDS podle FAB klasifikace a v EU byl schválen k léčbě vybraných skupin pacientů s MDS – pacientů s vyšším rizikem MDS a s AML podle WHO klasifikace (přehledně: Fenaux et Ades, 2009).

AZA byl dále použit ve studiích na pacientech s MDS s nízkým rizikem (IPSS). Při zpětném zhodnocení léčby těchto pacientů s MDS v rámci italské studie bylo zjištěno, že pacienti s MDS s nízkým rizikem léčení AZA dosáhli odpovědi na léčbu v 46% případů (CR 10,8%; PR 9,5%; HI 20,3% a CR v kostní dřeni 5,4%). Po dosažení mediánu postupu léčby 15 měsíců zůstalo na živu 71% pacientů (Musto et al., 2010).

AZA je rovněž testován jako součást kombinanční terapie MDS/AML pomocí DNMTi a inhibitorů histonových deacetyláz (HDACi). V rámci těchto studií na pacientech bylo dosaženo při kombinaci AZA s kyselinou valproovou (HDACi) odpovědi na léčbu u 41% pacientů (z toho 22% pacientů dosáhlo CR) (Soriano et. al., 2007). Při kombinaci AZA s fenylbutyrátem (HDACi) se míra odpovědi pacientů na léčbu pohybovala mezi 30-40%

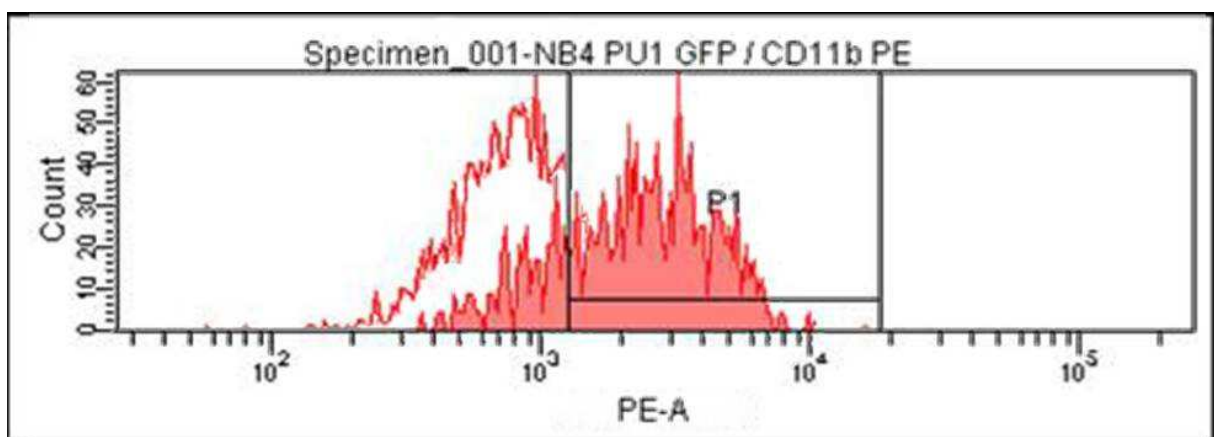
(přehledně: Stintzing et al., 2011). Tyto studie však zahrnovaly pouze malý počet pacientů, což neumožňuje přesnější stanovení míry odpovědi na tuto kombinovanou terapii.

Klinické výsledky použití AZA u pacientů s MDS/AML ukazují, že jde o účinnou terapii, která prodlužuje dobu OS pacientů, prodlužuje dobu progresse onemocnění do AML, vyvolává různé druhy odpovědi na léčbu (CR, PR, HI) a snižuje nutnost transfúzí krve a krevních destiček.

2. HYPOTÉZA A CÍLE DIZERTAČNÍ PRÁCE

2.1 Podklady pro zformulování hypotézy

Hladina PU.1 v krevních buňkách může vzhledem k pro-diferenční a tumor-potlačující roli tohoto transkripčního faktoru představovat důležitý terapeutický cíl u řady hematologických malignit. Regulační oblast URE odpovídá zhruba za 80% exprese genu PU.1 (Rosenbauer et al., 2004). Nízká exprese PU.1 byla v řadě studií asociovaná s AML. Naopak zvýšení hladiny PU.1 se ukázalo být jedním z molekulárních efektů terapeutického působení kyseliny trans-retinové (ATRA, Vesanoid) při léčbě akutní promyelocytární leukémie (AML M3). Obnova potlačené hladiny PU.1 jednak přímo indukuje diferenciaci leukemických buněk do granulocytární krevní řady (Mueller et al., 2006), tak zároveň v leukemických buňkách zapíná geny potlačující buněčné dělení, konkrétně gen RIG-G (Gu et al., 2011). Údaje z literatury dokládající, že zvýšení hladiny PU.1 v buňkách akutní promyelocytární leukémie má diferenciací účinky, jsme potvrdili vlastním experimentem využívajícím lentivirus obsahující cDNA genu PU.1. Zvýšení exprese PU.1 v buňkách NB-4 (akutní promyelocytární leukémie) po infekci tímto lentivirem vedlo k projevům diferenciaci buněk na fenotypové úrovni (Obrázek 4).



Obrázek 4. Vliv zvýšení exprese PU.1 na myeloidní diferenciaci buněk NB-4 akutní promyelocytární leukémie. Buňky NB-4 byly (s multiplicitou infekce = 3) infikovány lentivirem kódujícím proteiny PU.1 a GFP a dále lentivirem, který nám posloužil jako kontrola kódující pouze protein GFP. 3 dny po infekci byla z kultury pomocí průtokového cytometru vytříděna populace infikovaných buněk exprimujících GFP. Tato populace byla ponechána 2 dny v optimálních růstových podmínkách

v kultuře a následně inkubována s protilátkou proti CD11b (monocytárně-granulocytární povrchový antigen) konjugovanou s fykoerythrinem (PE). Na průtokovém cytometru bylo změřena intenzita signálu PE u buněk infikovaných lentivirem kódujícím PU.1 (červená výplň) a kontrolním lentivirem (bez výplně). Populace buněk produkujících CD11b byla zastoupena 19,5% pro buňky NB-4 infikované kontrolním lentivirem a 76,2% pro buňky NB-4 infikované lentivirem exprimujícím PU.1, což dokládá pro-diferenční účinek zvýšení exprese PU.1.

Další práce ukazují, že velmi nízká hladina PU.1 v primárních buňkách z kostní dřeně pacientů s mnohočetným myelomem je statisticky významně asociovaná se špatnou prognózou tohoto onemocnění. Expresi PU.1 je v primárních buňkách a buněčných liniích mnohočetného myelomu snížena v důsledku aberantně vysoké metylace DNA v regulačních úsecích genu PU.1 (v oblasti URE a promotoru). Inhibitory DNA metyltransferázy 1, jakým je AZA nebo Decitabin, zvyšují expresi PU.1 v buňkách mnohočetného myelomu *in vitro*, navozují zastavení buněčného dělení a apoptózu (Tatetsu et al., 2007).

Na základě výše uvedeného lze předpokládat, že AZA může představovat účinnou látku schopnou znovu obnovit expresi PU.1 tam, kde je potlačena v důsledku metylace DNA. Obnovení exprese PU.1 pak povede k diferenciaci leukemických buněk a/nebo k inhibici buněčné proliferace, eventuálně k navození apoptózy.

Myelodysplastický syndrom je heterogenní onemocnění, u nějž byla na molekulární úrovni prokázána aberantní zvýšená metylace regulačních oblastí řady tumor-potlačujících genů, která vede k utlumení jejich exprese (Tessema et al., 2003; Brakensiek et al., 2005 [*Br J Haematol*]). Zároveň jde o onemocnění projevující se poruchou diferenciací krevních buněk, včetně buněk myeloidní krevní řady, a u rizikových případů (střední-2 a vysoké riziko podle IPSS) častou transformací do AML, onemocnění asociovaného v některých případech s mutacemi PU.1.

Terapie AZA u nemocných se středním-2 nebo vysokým rizikem MDS (podle IPSS) zdvojnásobila délku celkového přežití a představuje v současné době terapii první volby pro pacienty této skupiny, kteří nejsou kandidáti alogenní transplantace kmenových buněk. Mechanismus terapeutického působení AZA v MDS nicméně nebyl ještě plně objasněn, stejně jako nebyl doposud zkoumán případný vztah AZA terapie k expresi PU.1 v MDS. Právě na tyto oblasti byl proto položen důraz při formulaci hypotézy mojí vědecké práce.

2.2 Hypotéza a specifické cíle

Na základě souhrnu výše uvedených zjištění jsem vytvořil pracovní hypotézu studie zpracované v této dizertační práci:

Podstatou dysplázie kostní dřeně v MDS je nedostatečná exprese transkripčního faktoru PU.1 v progenitorových buňkách. Tyto buňky nejsou schopné indukovat krvetvornou diferenciaci. Exprese PU.1 v progenitorových buňkách je inhibována na úrovni transkripce. Předpokládáme, že v potlačení transkripce PU.1 v MDS hraje roli aberantní zvýšená metylace DNA v oblasti URE, jež je klíčovou regulační oblastí pro expresi PU.1. Exprese PU.1, případně míra její inhibice, bude pravděpodobně ovlivňovat efektivitu léčby AZA a eventuálně s tím i přežívání pacientů s MDS.

Stanovil jsem si konkrétní cíle, jejichž naplnění je obsahem této dizertační práce:

1. Určit hladinu PU.1 v modelových buněčných liniích pro MDS a v progenitorech pacientů s MDS se středním-II nebo vysokým rizikem (IPSS) a potvrdit její případný vztah k prognóze onemocnění MDS při léčbě AZA. Určit, zda je DNA regulační oblastí URE genu PU.1 v těchto buňkách zvýšeně metylovaná a zda má AZA vliv na rozsah této metylace.
2. Určit, zda AZA zvyšuje expresi PU.1 v modelových buněčných liniích pro MDS a zda je tato exprese provázena buněčnou myeloidní (monocytárně-granulocytární) diferenciací, případně inhibicí proliferace a navozením apoptózy.
3. Určit, zda lze případný efekt AZA na expresi PU.1 a navození myeloidní diferenciaci v modelových buněčných liniích pro MDS ovlivňovat cytokiny podporujícími růst monocytárních a granulocytárních buněk. Určit, jak se tato manipulace bude promítat do epigenetické struktury oblasti URE.
4. Určit, zda lze případný efekt AZA na expresi PU.1 a navození myeloidní diferenciaci a případné ovlivnění tohoto efektu cytokiny podporujícími růst monocytárních a granulocytárních buněk pozorovat také v progenitorech pacientů s MDS.
5. Určit, zda je přítomnost URE nepostradatelná pro případné působení AZA na hladinu PU.1

3. MATERIÁL A METODY

3.1 Materiál

Následující podkapitola obsahuje seznam biologického materiálu, chemikálií, speciálních komerčně dodávaných sad, přístrojů a počítačových programů použitých pro vyhotovení této dizertační práce.

3.1.1 Bakteriální kmeny

Escherichia Coli One Shot TOP 10

genotyp bakteriálního kmene

*F^{mcrA} Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZ
ΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(ara-
leu)7697 galU galK rpsL (Str^R) endA1 nupG*

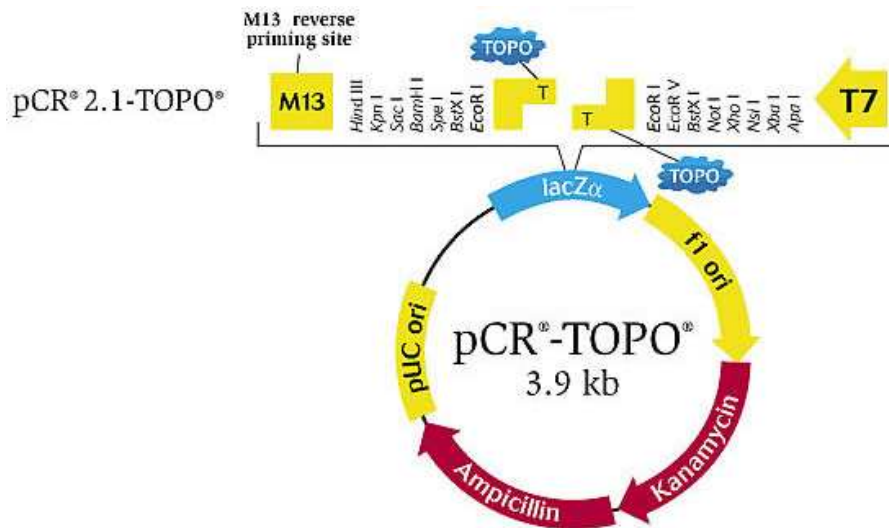
Escherichia Coli One Shot TOP 10 jsou chemicky kompetentní buňky použitelné pro klonování a následnou selekci na základě barvy kolonií (bíle zbarvená kolonie nese klonovaný DNA produkt, modře zbarvená jej neobsahuje). *Escherichia Coli* One Shot TOP 10 je komerčně dodávaný společností Life Technologies (kat. číslo C4040-03).

3.1.2 DNA plasmidy

pCR 2.1[®]-TOPO[®] vector

Vektor pCR 2.1-TOPO slouží k přímému, rychlému klonování PCR produktů namnožených *Taq* polymerázou. Plasmid dodávaný v rozvolněné formě obsahuje na obou svých koncích sekvence 5'-(C/T)CCTT-3' s nepárovým, „přečnivajícím“ deoxythymidiem (T). Na tyto deoxythymidiny na 3' koncích jsou kovalentně navázány molekuly enzymu topoizomerázy (původem z *Vaccinia* viru). Systém využívá biologických vlastností *Taq* polymerázy přidávající při PCR na 3'- konce namnožených úseků DNA jednu molekulu deoxyadeninu (A). Po přidání produktu PCR k pCR2.1-TOPO se tyto „přečnivající“ deoxyadeniny za účasti

topoizomerázy vážou s „přečnívajícími“ deoxythymidiny na 3'-koncích molekuly plasmidové DNA a dochází tak k zaklonování namnožené DNA (Shuman 1994). Plasmid disponuje ampicilinovou i kanamycinovou rezistencí. Níže je uvedeno schéma vektoru a uspořádání jeho klonovacího místa (Obrázek 5).



Obrázek 5. Schéma DNA vektoru pCR[®]2.1-TOPO[®] a uspořádání jeho klonovacího místa. Schéma zahrnuje pořadí míst pro restriční endonukleázy v klonovacím místě, naznačené „přečnívající“ 3'-deoxythymidiny s kovalentně vázanými molekulami topoizomerázy, geny kódující rezistenci na ampicilin a kanamycin a další vlastnosti plasmidu. Plasmid pCR[®]2.1-TOPO[®] má velikost 3931 nukleotidů. (Obrázek byl v pozměněné podobě převzat z webových stránek: <http://products.invitrogen.com/ivgn/product/K451020>).

3.1.3 Buněčné linie – modely MDS

OCI-M2

Lidské buňky AML. MDS buněčná linie transformovaná do erytroleukemie (AML M6). Byla vytvořena v roce 1984 z leukemických buněk 56-letého pacienta. (DSMZ, Braunschweig, Německo; ACC 635)

SKM-1

Lidské buňky AML. MDS buněčná linie transformovaná do akutní monoblastické leukémie (AML M5). Byla vytvořena v roce 1989 z periferní krve 76-letého japonského pacienta. (DSMZ, Braunschweig, Německo; ACC 547)

3.1.4 Vzorky pacientů s MDS/AML a kontroly

Od roku 2006 se na našem pracovišti zásluhou MUDr. Anny Jonášové z I. interní kliniky – kliniky hematologie Všeobecné fakultní nemocnice v Praze shromáždily vzorky kostní dřeně (a periferní krve) od 44 pacientů v 54 nezávislých vzorcích. Tato práce proběhla s podporou vedení kliniky, jmenovitě Prof. MUDr. Marka Trněného, CSc. Vzorky byly od pacientů získány na základě informovaného souhlasu (v souladu s požadavky Helsinské deklarace). Jde o pacienty s MDS ve vyšším riziku (střední-2/vysoké riziko podle IPSS) a AML. Soubor pacientů se skládá ze 32 mužů a 12 žen. Medián pacientů je 67 let (v rozmezí od 57 do 83 let). Diagnostické a prognostické zhodnocení bylo provedeno v souladu s postupem WHO (<http://www.nccn.com>): RAEB 1 (5 pacientů), RAEB 2 (17 pacientů), AML (s dysplázií ve třech liniích) s 20-30% blastů v kostní dřeni (12 pacientů), AML s dysplázií ve třech liniích a více než 30% blastů v kostní dřeni (9 pacientů) a erytroleukemií (1 pacient). Všechny patientské vzorky byly odebrány v době diagnózy onemocnění a před započítím léčby AZA. Klinické údaje a parametry pacientů jsou popsány níže (Tabulka 5 a Tabulka 6). Jako kontroly bylo použito pět komerčně připravených a dodaných vzorků CD34+ progenitorů z normální lidské kostní dřeně od společnosti Lonza (kat. číslo 2M-101C).

Pacienti na léčbě AZA, kteří již umřeli													
Datum diagnózy	Datum 1.AZA	Označení	PU.1 mRNA	Věk	AZA	Vzorek	Diagnóza	Cytogenetika	#AZA cyklů	Odpověď	OS	OS na AZA (měsíce)	OS/Dg (měsíce)
27.11.2008	16.8.2010	V140	0,21	65	ANO		RAEB 1-2		5		zemřel	5	26
29.5.2009	17.6.2009	V197	0,85	78	ANO		RAEB 2		3		zemřel	3	4
4.4.2008	15.6.2009	V172	0,38	82	ANO	před AZA	RAEB 2	dobrá	2	NA	zemřel	3	16
20.10.2010	21.2.2011	V371	0,44	59	ANO		RAEB 2		2		zemřel	4	8
6.5.2010	18.5.2010	V291	0,44	78	ANO	před AZA	RAEB 2		2	HI	zemřel	3	3
31.05.11	6.6.2011	V469	0,49	73	ANO	před AZA	T-AML/MDS do 30%		1	NA	zemřel	1	1
2004	5.11.2010	V344	0,49	65	ANO		progradovalo do MDS-RAEB 2		3		zemřel	3	84
4.8.2005	11.5.2009	V210	0,53	61	ANO	před AZA	RAEB 1	dobrá	11	Cri	zemřel	4	60
16.9.2010	22.3.2011	V332	0,70	69	ANO	před AZA	MPD/AML	špatná	3	PD	zemřel	3	6
12.3.2009	11.5.2009	V170	0,70	78	ANO		RAEB-2	46 XY, IPSS 2,0.	9		zemřel	10	12
4.6.2008	26.5.2010	V249	0,92	75	ANO	před AZA	RAEB 2/NHL	dobrá	3	HI	zemřel	6	27
19.4.2010	26.4.2010	V282	1,83	62	ANO	před AZA	AML/MDS<30%	špatná	1	PD	zemřel	10	11
14.10.2009	18.12.2008	V186	2,39	62	Ano	po 4.cyklu/Cri	RAEB 2	špatná	13	Cri	zemřel	13	17
4.8.2005	11.5.2009	V210	2,47	60	Ano	před AZA	RAEB 1	dobrá	11	Cri	zemřel	11	60
11.3.2010	28.4.2010	V259	2,48	82	Ano	před AZA	AML/MDS<30%	špatná	2	NA	zemřel	2	2
27.4.2010	4.6.2010	V286	3,36	64	Ano	před AZA	RAEB 1	špatná	2	NA	zemřel	3	4
29.7.2010	28.8.2010	V394	5,50	75	Ano	po 4.cyklu/PR	RAEB 2	špatná	7	PR	zemřel	10	11

Tabulka 5. Klinické údaje pacientů s vyšším rizikem MDS (střední-2/vysoké riziko podle IPSS) a MDS/AML léčených AZA, kteří již zemřeli (17 vzorků použitých ve Výsledkovém obrázku 1B). V tabulce jsou zleva doprava uvedeny následující parametry: datum diagnózy, datum nasazení prvního cyklu léčby AZA, kódové označení vzorku, hladina PU.1 mRNA exprese v CD34+ progenitorech, věk pacienta, léčba AZA (ANO/NE), diagnóza, prognóza onemocnění vycházející z cytogenetického nálezu, počet cyklů léčby pomocí AZA, odpověď na AZA (PD – rozvíjející se onemocnění; PR – částečná remise; HI – hematologické zlepšení; Cri – kompletní remise (ne ve všech parametrech); SD

– stabilní průběh nemoci; NA – odpověď není známa), status přežití pacienta (žije/zemřel); doba celkového přežití (OS) na AZA (v měsících) a doba celkového přežití od data diagnózy (v měsících).

Všichni pacienti													
Datum diagnózy	Datum 1.AZA	Označení	PU.1 mRNA	Věk	AZA	Vzorek	Diagnóza	Cytogenetika	#AZA cyklů	Odpověď	OS	OS na AZA (měsíce)	OS/Dg (měsíce)
29.7.2010	28.8.2010	V394	5,50	75	Ano	po 4.cyklu/PR	RAEB 2	špatná	7	PR	zemřel	10	11
27.4.2010	4.6.2010	V286	3,36	64	Ano	před AZA	RAEB 1	špatná	2	NA	zemřel	3	4
11.3.2010	28.4.2010	V259	2,94	82	Ano	před AZA	AML/MDS<30%	špatná	2	NA	zemřel	2	2
11.3.2010	28.4.2010	V259	2,48	82	Ano	před AZA	AML/MDS<30%	špatná	2	NA	zemřel	2	2
4.8.2005	11.5.2009	V210	2,47	60	Ano	před AZA	RAEB 1	dobrá	11	Cri	zemřel	11	60
18.10.2010		V367	2,43	69	Ano	před AZA	RAEB 2	špatná	NA	NA	NA	NA	NA
14.10.2009	18.12.2008	V186	2,39	62	Ano	po 4.cyklu/CRI	RAEB 2	špatná	13	CRI	zemřel	13	17
27.7.2010	23.11.2010	V333	1,97	58	Ano		AML/MDS		2		zemřel	2	4
19.4.2010	26.4.2010	V282	1,83	62	Ano	před AZA	AML/MDS<30%	špatná	1	PD	zemřel	10	11
14.10.2009	18.12.2008	V216	1,21	62	Ano	v relapsu	RAEB 2	špatná	13	CRI	zemřel	13	17
2002.7.6.2007 alloSCT	17.12.2008	V021	1,00	59	Ano	před AZA	RAEB 2	špatná	1	NA	zemřel	NA	84
2.12.2008	12.1.2009	V147	0,93	69	Ano		AML po terapii		1		zemřel	1	6
4.6.2008	26.5.2010	V249	0,92	75	Ano	před AZA	RAEB 2/NHL	dobrá	3	HI	zemřel	6	27
12.3.2009	11.5.2009	V170	0,70	78	Ano		RAEB-2	46 XY, IPSS 2,0.	9		zemřel	10	12
16.9.2010	22.3.2011	V332	0,70	69	Ano	před AZA	MPD/AML	špatná	3	PD	zemřel	3	6
4.8.2005	11.5.2009	V210	0,55	61	Ano	před AZA	RAEB I	dobrá	11	Cri	zemřel	4	60
2004 MDS deSeq	5.11.2010	V344	0,49	65	Ano		progradovalo do MDS-RAEB 2		3		zemřel	3	84
31.05.11	6.6.2011	V469	0,49	73	Ano	před AZA	T-AML/MDS < 30%		1	NA	zemřel	1	1
6.5.2010	18.5.2010	V291	0,44	78	Ano	před AZA	RAEB 2		2	HI	zemřel	3	3
20.10.2010	21.2.2011	V371	0,44	59	Ano		RAEB 2		2		zemřel	4	8
4.4.2008	15.6.2009	V172	0,39	82	Ano	před AZA	RAEB 2	dobrá	2	NA	zemřel	3	16
14.10.2009	18.12.2008	V010	0,37	60	Ano	před AZA	RAEB 2	dobrá	4	NA	zemřel	4	
29.5.2009	17.6.2009	V197	0,35	78	Ano		RAEB 2		3		zemřel	3	4
27.11.2008	16.8.2010	V140	0,21	65	Ano		RAEB 1-2		5		zemřel	5	26
18.3.2010	12.4.2010	V265	0,27	83	Ano	před AZA	RAEB2/NHL		13	PR	žije	20	21
27.7.2010	28.6.2010	V285	2,99	67	Ano	před AZA	RAEB 1	střední	14	HI	žije	17	17
5.8.2010	16.9.2010	V335	0,39	67	Ano		AML M6		15		žije	15	16
1.1.2009	26.8.2010	V339	1,60	65	Ano	před AZA	AML/MDS<30%	střední	12	PR	žije	16	36
11.10.2010	8.11.2010	V361	3,37	69	Ano	před AZA	AML/MDS<30%	dobrá	9	PR	žije	13	14
27.7.2010	28.6.2010	P302	2,09	67	Ano	před AZA	RAEB 1	dobrá	14	HI	žije	17	17
21.12.2010	7.3.2011	V397	8,59	67	Ano	před AZA	AML/MDS<30%	špatná	10	Cri	žije	9	12
20.8.2010	1.2.2011	V406	3,96	66	Ano	před AZA	RAEB 2	střední	10	Cri	žije	10	16
31.1.2011	14.3.2011	V413	0,25	77	Ano	před AZA	MDS/AML do 30% MB		9	SD/HI	žije	9	11
20.1.2011	3.3.2011	V465	0,86	66	Ano		RAEB1 - RAEB II	střední	11		žije	9	11
12.7.2006		V002	2,08	66	NE	v diagnóze	AML/MLD	střední	NA	NA	zemřel	NA	1
26.5.2006		V003	0,69	65	NE	v diagnóze	RAEB 1	střední	NA	NA	zemřel	NA	27
5.6.2006		V005	1,99	57	NE	v diagnóze	RAEB 2	špatná	NA	NA	zemřel	NA	3
12.4.2007		V029	0,77	61	NE	v diagnóze	RAEB 2	dobrá	NA	NA	zemřel	NA	17
3.4.2007		V048	0,74	68	NE	v diagnóze	RAEB 2	dobrá	NA	NA	zemřel	NA	49
23.8.2007		V051	1,54	63	NE	v diagnóze	RAEB 2	střední	NA	NA	zemřel	NA	9
7.6.2007		V052	0,75	67	NE	v diagnóze	RAEB 2	špatná	NA	NA	zemřel	NA	9
2.10.2007		V053	0,43	59	NE	v diagnóze	RAEB 2	špatná	NA	NA	zemřel	NA	2
14.9.2007		V069	0,44	70	NE	v diagnóze	AML/MLD	dobrá	NA	NA	zemřel	NA	33
21.6.2006		V118	0,44	57	NE	v diagnóze	AML/MDS<30%	dobrá	NA	NA	zemřel	NA	30
15.11.2010		V133	0,69	71	NE	bez AZA	MDS RAEB I		NA	NA	zemřel	NA	NA
8.8.2008		V158	1,47	68	NE	v diagnóze	AML/MLD	dobrá	NA	NA	zemřel	NA	9
12.3.2010		V171	0,89	79	NE	v diagnóze	AML/MDS<30%	špatná	NA	NA	zemřel	NA	NA
19.3.2009		V174	0,85	71	NE	v diagnóze	AML/MLD	střední	NA	NA	zemřel	NA	12
1.7.2008	2009 aloSCT	V182	2,74	60	NE	v diagnóze	AML/MLD	dobrá	NA	NA	žije	NA	41
31.5.2006		V183	0,87	72	NE		AML s MLD				zemřel		50
18.10.2010		P301	2,13	69	NE	v diagnóze	RAEB 2	špatná	NA	NA	NA	NA	2
18.10.2010		V367	2,43	69	NE	v diagnóze	RAEB 2	špatná	NA	NA	NA	NA	NA
18.10.2010		P301	2,13	69	NE	před AZA	RAEB 2	špatná	NA	NA	NA	NA	NA
7.6.2011		V476	0,50	65	NE	bez AZA	RAEB II	špatná		NA	žije	NA	NA

Tabulka 6. Klinické údaje pacientů s vyšším rizikem MDS (střední-2/vysoké riziko podle IPSS) a MDS/AML pro všech 44 pacientů s MDS (v 54 nezávislých vzorcích) zahrnutých do této dizertační práce. V tabulce jsou zleva doprava uvedeny následující parametry: datum diagnózy, datum nasazení prvního cyklu léčby AZA, kódové označení vzorku, hladina PU.1 mRNA exprese v CD34+ progenitorech, věk pacienta, léčba AZA (ANO/NE), diagnóza, prognóza onemocnění vycházející z cytogenetického nálezu, počet cyklů léčby pomocí AZA, odpověď na AZA (PD – rozvíjející se onemocnění; PR – částečná remise; HI – hematologické zlepšení; Cri – kompletní remise (ne ve všech parametrech); SD – stabilní průběh nemoci; NA – odpověď není známa), status přežití pacienta (žije/zemřel); doba celkového přežití (OS) na AZA (v měsících) a doba celkového přežití od data diagnózy (v měsících).

3.1.5 Myší model AML (PU.1^{URE -/-})

Transgenní myš byla vytvořena na běžném pozadí 129Sv *Mus musculus*. Vytvoření transgenní myši je popsáno v odborné literatuře (Rosenbauer et al., 2004). Transgenní zvíře nese delecii v rozsahu 3,4kb v oblasti URE lokalizovaného 14 kb nad místem transkripčního počátku genu PU.1. Homozygotní myši jsou živé a fertlní pokud jsou mladé, umírají ve věku 3-8 měsíců na následek AML a s tím souvisejícími zdravotními komplikacemi. Homozygoti mají expresi PU.1 sniženou o 80%. Heterozygotní mutantní myši jsou živé, fertlní a zcela normální na vzhled a chování. Myší model AML PU.1^{URE-/-} byl laskavě poskytnut Dr. Ulrichem Steidlem a Dr. Danielem G. Tenenem z Harvard Stem Cell Institute, Boston, MA, USA.

3.1.6 Primery a hydrolyzační sondy

Primery na PCR ke studiu DNA metylace v oblasti URE

PU.1-URE-F GAGAAATGGTTTTTTTTGTGATTT

PU.1-URE-R ACAACTACCCCTATTTCCACAT

Primery byly navrženy tak, aby PCR pokryla úsek DNA o velikosti 404 bp v regulační oblasti URE lidského genu PU.1. V této oblasti se nachází 19 CpG ostrůvků, kde může na cytosinu docházet k metylaci DNA (Obrázek 6). Podoba primerů vychází ze skutečnosti, že DNA prošla bisulfitickou konverzí. Jeden z dvojice primerů je označen jako F (forwad, vpřed) a druhý jako R (reverse, zpět).

AGATCTGGGTACTGGCCAGGGAGGCAGGAGGAAGGAGGGAAGGCCGGGG
 GCACCCGGGGGCTGCTGCCTGGCAGGTCCCATGCCAGGCAAGGGAAGTT
 TGTATTCTCTTGGCTTCGACTTCCCCCTTTGATTATTATAGCCATGAAATG
 CTCGTGCTCTTCTCTTTTCTTGGCTGTCCTGGGGCTGGAGGACACGGGC
 CTCGCCGGGAGTGGGCTTCAGCCTCCCTAGACTCCTGTCTCCTTCAAGGGC
 TAGGCTGGGGACCAGAAGCAAGAGGTGAGTACGGCCCGGGGGTGTGG
 CAGGTGTGGACGTGGCAACAGGCGGCCTCCGGGGGTCTCGGGGGATGGCC
 GGCTCTGGGCAATGGCTCAGTGAAGACTGCCAGGGTCTGAAGTTGGGC
 ACAGAGTCCCGGACGCCAAACTAGGTCA**GAGAAATGGCTTTTCTGTGAC**

CCTGACCCACATTCTGATTTAAGGGTGGCCAAAGTAGGCTGGCCCTGG
 1
 TG**CC**CTGGGGATTGAGCTGAGAGCCCCAGAAGAAGGCTGAGGCCTGAGGC
 2 3
 CTGGGGGACTCTGGGCTCCTCCAGGC**CGGC**CCTGGACATCCCCCTGAGGCC
 4 5 6 7
 TGGCCAGGCTGG**CC**AGGGC**CG**GAGGCTGTGT**CG**CTCCT**CG**GCAGGCCT
 8 9 10 11
 GGTGGC**CG**GAG**CG**TTTCTCTGGGC**CG**CTGTG**CG**GTGCTGTGTAATGGCC
 12 13 14 15
 TGTGGC**CG**TTTTGCAATGGGC**CG**GGGTGGGGAGG**CG**CC**CG**CACACATGCTT
 16 17 18
 CCTGTGGTACTGGC**CG**CTTCCTGTTTTCTCAGC**CG**C**CG**GCCTTGCTGCTGC
 19
CGATGTGGAACAGGGGCAGCTGCAGCCCCGGGGCTCCAGGCTGGGGCGCT
 GTGACCTGCCAGAGGGGCTACGTGGGCCAGCAGCCCTAGGCCCCAGA
 CCCCAGACCAAGCAGTGGTGGCCCCGAGTTTTCCCCACAGCAGGCCACCA
 TCCTCCTTCCCTAACAGCTTCCGCCAAGAGGAAGGGGCCAGGCAGGTGG
 TCTCAGAGGTCCGAGGTCAGAGGTCAGGGGTGAGAGCGTAGGAGGGGA
 GTCAGGGCACGTGGCTCTGGTCTCAACTCTGGCTCGCCAGGCGCCACCGC
 CATCTCTCCCGCTCCAGGCCCGCTTCTCTTTCTGCTGAGTACCTCGGCATC
 CATGGTCTAAAACCCCTCGCCCATTCCTCATCCGGTCTCACATTCGTTGGG
 CTTTGCATTCCTCAAGGCCAAAGCTTTGGGGACAGCACTGAGGCTGGGGCC
 TTGGAGGTGGAACCTGGTGT

Obrázek 6. Sekvence lidského URE genu PU.1 s vyznačenými, očíslovanými CpG ostrůvky (na nichž dochází k metylaci DNA) a vyznačenými sekvencemi primerů na PCR.

Primery normalizačních (host-keeping) genů pro qPCR

Označení primeru	Sekvence primeru	Roche hydrolyz. sonda
hGAPDH(mRNA) F	GCCCAATACGACCAAATCC	#60
hGAPDH(mRNA) R	AGCCACATCGCTCAGACAC	#60
hHPRT1(mRNA) F	TGACCTTGATTTATTTGCATACC	#73
hHPRT1(mRNA) R	CGAGCAAGACGTTCAAGTCCCT	#73
mGapdh (mRNA) F	ACTTTGTCAAGCTCATTTCCTGGTAT	#77
mGapdh (mRNA) R	TTTCTTACTCCTTGGAGGCCATGTAG	#77

Tabulka 7. Primery normalizačních (host-keeping) genů pro qPCR Primery, jejichž označení začíná písmenem h (human; lidské), byly použity jako normalizační kontroly pro stanovení exprese mRNA vybraných genů v MDS CD34+ progenitorech a MDS buněčných liniích. Primery, jejichž označení začíná písmenem m (murine; myší), byly použity jako normalizační kontroly pro stanovení exprese mRNA vybraných genů v CD117+ pozitivních buňkách z kostní dřeně AML a wt myší. V každé dvojici primerů je jeden označen jako F (forwad, vpřed) a druhý jako R (reverse, zpět). Primery byly navrženy s pomocí programu ProbeFinder Version 2.45.

Primery pro stanovení exprese mRNA vybraných genů metodou qPCR

Označení primeru	Sekvence primeru	Roche hydrolyzační sonda
hPU.1(mRNA) F	CCACTGGAGGTGTCTGACG	#27
hPU.1 (mRNA) R	CTGGTACAGGCGGATCTTCT	#27
hCSF1R (mRNA) F	TCTGGTCCTATGGCATCCTC	#14
hCSF1R (mRNA) R	TGCCAGGGTAGGGATTCA	#14
hCSF3R (mRNA) F	GTCCAAGATCACAAAGCTGGT	#18
hCSF3R (mRNA) R	CCGCACTCCTCCAGACTTC	#18
hMPO (mRNA) F	CGTCAACTGCGAGACCAG	#38
hMPO (mRNA) R	GTCATTGGGCGGGATCTT	#38
hGELB(mRNA) F	GAACCAATCTCACCGAGG	#6
hGELB (mRNA) R	GCCACCCGAGTGTAACCATA	#6
hEGR2 (mRNA) F	AACGGAGTGGCCGGAGATGGCATG	#3
hEGR2 (mRNA) R	TGCAGAGACGGGAGCAAAGCTGCTG	#3
hCEBPA (mRNA) F	GGAGCTGAGATCCCGACA	#28
hCEBPA (mRNA) R	TTCTAAGGACAGGCGTGGAG	#28
hKIT (mRNA) F	CGTGGAAAAGAGAAAACAGTCA	#2
hKIT (mRNA) R	CACCGTGATGCCAGCTATTA	#2
hFOS (mRNA) F	CTACCACTCACCCGCAGACT	#67
hFOS (mRNA) R	AGGTCCGTGCAGAAGTCCT	#67
hp21 (mRNA) F	CGAAGTCAGTTCCTTGTGGAG	#82
hp21 (mRNA) R	CATGGGTTCTGACGGACAT	#82
mPU.1 (mRNA) F	GGGATCTGACCAACCTGGA	#42
mPU.1 (mRNA) R	AACCAAGTCATCCGATGGAG	#42
mEgr2 (mRNA) F	GCTCCAGCTGCCTGACAGCCTC	nemá (SYBR)
mEgr2 (mRNA) R	ATCATGCCATCTCCCGCCACTC	nemá (SYBR)
mGfi-1 (mRNA) F	ATGCAGCAAGGTGTTCTCCACACC	nemá (SYBR)
mGfi-1 (mRNA) R	GAAGGTCTTGCCGCACATCTCGC	nemá (SYBR)

Tabulka 8. Primery pro stanovení exprese mRNA vybraných genů metodou qPCR Primery, jejichž označení začíná písmenem h (human; lidské), byly použity pro stanovení exprese mRNA vybraných genů v MDS CD34+ progenitorech a MDS buněčných liniích. Primery, jejichž označení začíná písmenem m (murine; myší), byly použity pro stanovení exprese mRNA vybraných genů v CD117+ pozitivních buňkách z kostní dřeně AML a wt myší. V každé dvojici primerů je jeden označen jako F (forward, vpřed) a druhý jako R (reverse, zpět). Primery používající Roche hydrolyzační sondy byly navrženy s pomocí programu ProbeFinder Version 2.45

Hydrolyzační sondy Roche (TaqMan) použité pro kvantifikaci exprese mRNA vybraných genů

Princip hydrolyzačních sond TaqMan spočívá na 5'→3' exonukleázové aktivitě *Taq* polymerázy. Hydrolyzační sonda je v kompaktní podobě tvořena krátkou sekvencí, která má

na svém 5'-konci navázanou fluorescenční značku a na 3'-konci látku, která potlačuje fluorescenci (tzv. zhášec). *Taq* polymeráza po hybridizaci sondy na komplementární cílovou sekvenci DNA v oblasti pokryté primery odštěpuje ve fázi PCR-extenze od značené sondy fluorescenční značku. Ta se dostává mimo dosah působnosti zhášec a její fluorescence je měřena přístrojem. Předností sond systému TaqMan je jejich vysoká specificita. Fluorescenční signál vzniká pouze v případě hybridizace sondy s její specifickou cílovou sekvencí, takže se eliminuje možnost zachycení signálu z nespecificky namnožených produktů PCR. Těto vlastnosti jsme využili při měření genové exprese, kde je důležitá co nejpřesnější kvantifikace vznikajícího produktu bez zkreslení daného falešně pozitivním signálem.

Označení sondy	Sekvence sondy	Kat. číslo
#2	TTCTCCTG	# 04684982001
#3	CCCAGCAG	# 04685008001
#6	TTCCTCTG	# 04685024001
#14	CTGGGAGA	# 04685130001
#18	TCCTGCTG	# 04686918001
#27	CAGGCAGC	# 04687582001
#28	CCAGCCGC	# 04687604001
#38	CTGCTTCC	# 04687965001
#42	CCAGCAGC	# 04688015001
#60	CTTCCCA	# 04688589001
#67	TGCTGGAG	# 04688660001
#73	TCCTCAGC	# 04688961001
#77	CCACCACC	# 04689003001
#82	CAGAGGAG	# 04689054001

Tabulka 9. Hydrolyzační sondy Roche použité pro kvantifikaci exprese mRNA vybraných genů.

Primery na ChIP zajišťující namnožení úseků DNA v oblasti URE a dalších oblastech v pozici 5' k místu transkripčního počátku genu *PU.1*

Pro detekci histonových modifikací metodou ChIP jsme využili Fast SYBR Green master Mix. SYBR Green je cyaninové barvivo interkalačně nespecificky vázající dvojřetězcovou DNA. Výhodou tohoto systému je, že je levný, jednoduchý a nevyžaduje použití sondy (pro každou unikátní namnoženou sekvenci). Zároveň se vyznačuje vysokou senzitivitou, což je pro detekci přítomnosti určitých histonových modifikací výhodné.

Označení primeru	Sekvence primeru
hPU.1 (-17,5kb)-F	GGATGGCTGAGGTTGATGGTTGA
hPU.1 (-17,5kb)-R	CAGCAGACAGGGATGAAGACAGAAGA
hPU.1 (-16,6kb)-F	CCTGACCCACATTCTGATT
hPU.1 (-16,6kb)-R	CTTCTTCTGGGCTCTCAGC
hPU.1 (-15,9kb)-F	ACGTGGCTCTGGTCTCAACTCTGC
hPU.1 (-15,9kb)-R	AGCCCAACGAATGTGAGAACCG
hPU.1 (-15,62)-F	ATCTGGGAGGACTAGGCTTT
hPU.1 (-15,62)-R	AATGACCGCGTCTTCTTTCT
hPU.1 (-15,28)-F	GCTTCTGGTCAAGTTTGCTG
hPU.1 (-15,28)-R	GGACTTGGGTTTTAGGGGAG
hPU.1 (-14,36)-F	TCATGCTTGGAAACACTCCA
hPU.1 (-14,36)-R	TGTCTGCTTGAAGGTCAAGG
hPU.1 (-13,4kb)-F	TGTGACCAGGGCAGGAGCAGG
hPU.1 (-13,4kb)-R	GCCAGCCAGGGAAGGTAACAGG
hPU.1 (-11,0kb)-F	TGGCAGCCTGGAGGAGGCAAG
hPU.1 (-11,0kb)-R	GGACACCGCTCAGCATTCTGG
hPU.1 (-9,7kb)-F	AGCCTCTCCCAGTGTCTCAACCAT
hPU.1 (-9,7kb)-R	TAGCAACCTGTCCCCATAGGGTGT

Tabulka 10. Primery použité v metodě ChIP na mapování histonových modifikací ve vzdálených regulačních oblastech lidského genu PU.1. V každé dvojici primerů pokrývajících určitou oblast (její lokalizace uvedená v závorce je vztažena k místu počátku transkripce genu PU.1) je jeden označen jako F (forwad, vpřed) a druhý jako R (reverse, zpět).

Primery na ChIP	Rovnice popisující standardní křivky
hPU.1 ...-17,5	$y = -3,8146x + 46,954$
hPU.1 ...-16,6	$y = -3,1672x + 43,418$
hPU.1 ...-15,9	$y = -2,7257x + 40,939$
hPU.1 ...-15,62	$y = -3,0448x + 42,101$
hPU.1 ...-15,28	$y = -3,3268x + 43,899$
hPU.1 ...-14,36	$y = -3,4276x + 44,034$
hPU.1 ...-13,4	$y = -3,6099x + 46,113$
hPU.1 ...-11,0	$y = -3,3017x + 43,927$
hPU.1 ...-9,7	$y = -2,7164x + 40,839$

Tabulka 11. Rovnice popisující standardní křivky dvojic primerů použitých v metodě ChIP. Dvojice primerů je označena číslem vyjadřujícím lokalizaci úseku namnožených PCR vztaženou k místu počátku transkripce genu PU.1 (v kb).

Výše uvedené primery použité v metodách PCR, qPCR a ChIP byly připraveny spojením alikvotů odebraných ze zásobních 200 mM roztoků primeru F a primeru R příslušné dvojice primerů tak, že výsledný roztok měl koncentraci 20 mM. Primery byly rozpuštěny ve sterilní destilované vodě.

3.1.7 Protilátky

Označení protilátky	Klon	Použití	Výrobce	Kat.číslo
PE-anti-human CD34	581	FACS	BD Biosciences	CAT343506
FITC-anti-mouse CD11b	M1/70	FACS	Biologend	101205
APC-anti-human CD11b	ICRF44	FACS	Biologend	301310
FITC-anti-mouse CD117	2B8	MACS	Biologend	105806
Anti-FITC MicroBeads		MACS	Miltenyi Biotech	130-048-701
Anti-Actin –HRP konj.	I-19	WB	Santa Cruz Biotech.	sc-1616HRP
Anti-PU.1 rabbit polyk.	T-21	WB	Santa Cruz Biotech.	sc-352
Anti-Rabbit IgG-HRP konj.		WB	Jackson Immu.Lab.	Lot80919
Anti-H3K9acetyl		ChIP	Upstate	07-352
Anti-Histone H3K9trimethyl		ChIP	Abcam	ab8898
Anti-Histone H3 trimethyl K4		ChIP	Diagenode	pAb003-050
Normal Rabbit IgG		ChIP	EMD Biosciences	NI01

3.1.8 Použité cytokiny

Cytokin	Výrobce	Kat.číslo
G-CSF (Neupogen)	Amgen	(z lékárny)
Humanikine- GM-CSF	Sigma Aldrich	H5666-5UG
M-CSF (human recombinant)	Sigma Aldrich	SRP4237-10UG
Human Stem cell factor	Cell Signaling Technologies	8925

3.1.9 Chemikálie, enzymy a standardy molekulových hmotností

Chemikálie	Výrobce	Kat.číslo
Agarose I	Amresco	0710

Albumin, from bovine serum (BSA)	Sigma-Aldrich	A2153
Annexin V-FITC	Miltenyi Biotech	120-002-355
Azacitininum/Vidaza	Celgene Europe, Ltd.	(z lékárny)
Biocoll Separating Solution	Biochrom AG	L6115
Bradford Reagent	Amresco	E530
Briliant Blau R 250	Carl Roth GmbH	Art.3862.2
Deoxycholic acid, sodium salt	Amresco	0613
Dimethylsulfoxid	Carl Roth GmbH	A994.2
DL-Dithiotherotol (DTT)	Amresco	0281
dNTPs Mix (nukleotidy)	Takara Bio	(samostatně neprodáván)
EDTA	Riedel-deHaën	27270
EGTA	Amresco	0732
Ethanol 99% p.a.	Petr Švec – Penta	02862 1
Fast SYBR Green master Mix	Life Technologies	4385612
Formaldehyde 37% solution	Electron Micro. Scienc.	15680
Glycine	Amresco	0167
Glycerol	Amresco	0854
HEPES	Amresco	0485
Chloroform p.a.	Petr Švec – Penta	25692 1
Igepal CA-630	Sigma-Aldrich	I8896
Isopropylalkohol p.a.	Petr Švec – Penta	59300 1
Kyselina octová 99% p.a.	Petr Švec – Penta	45731 1
LA PCR Buffer II (Mg ²⁺ plus) (10x)	Takara Bio	(samostatně neprodáván)
Linear acrylamide	Life Technologies	AM9520
Methanol HPLC	Carl Roth GmbH	P717.1
Nuclease eliminator	Amresco	E891
Ponceau S	Sigma-Aldrich	P3504
Precision Protein Dual Color Standards	BIO-RAD	161-0374
Propidium jodid	Sigma-Aldrich	P4170
Protease Inhibitor Cocktail (P8340)	Sigma-Aldrich	P8340
Protein-A-agarose	Sigma-Aldrich	P7786
Protein-G-Agarose	Sigma-Aldrich	P4691
Proteinase K	Sigma-Aldrich	P4850
Ribonuclease A	Sigma-Aldrich	R4642

RiboZol	Amresco	N580
Sodium dodecyl sulfate	Amresco	M107
Sodium chloride	Amresco	0241
TaKaRa LA Taq™ Hot Start Version	Takara Bio	RR042A
TaqMan Universal master Mix II	Life Technologies	4427788
Tris-Hcl Ultrapure grade	Amresco	0234
Triton X-100	Amresco	0694
Tween 20	Amresco	077

3.1.10 Roztoky, pufry

Komerčně dodávané pufry	Výrobce	Kat.číslo
Annexin V vazebný pufr (10x)	Apronex s.r.o.	(samostatně neprodáván)
NuPAGE LDS Sample Buffer (4x)	Life Technologies	NP0007
NuPAGE MOPS SDS Running Buffer (20x)	Life Technologies	NP0001
PBS – Dulbecco (10x)	Biochrom AG	L1835

Pufry a roztoky vlastní výroby

Složení (konečná koncentrace)

RIPA lyzační pufr (WB)	50 mM Tris-Hcl; pH 8,0; 137 mM NaCl; 1% Igepal CA-630; 0,5% Deoxycholic acid sodium salt; 0,1% SDS; Protease Inhibitor Cocktail (ředění 1:1000)
11% formaldehydový roztok (ChIP)	11% formaldehyd; 0,1M NaCl; EDTA(pH 8,0); 1mM EDTA; 0,5mM EGTA; 50mM HEPES (pH 8,0)
Lyzační pufr I (ChIP)	50 mM HEPES-KOH (pH 7,5); 140 mM NaCl; 1mM EDTA; 10% glycerol; 0,5% Igepal CA-630; 0,25% Triton X-100

Lyzační pufr II (ChIP)	1 mM EDTA (pH 8,0); 0,5 mM EGTA (pH 8,0); 10 mM Tris-Hcl (pH 8,0); 200 mM NaCl
Lyzační pufr III (ChIP)	1 mM EDTA (pH 8,0); 0,5 mM EGTA (pH 8,0); 10 mM Tris-Hcl (pH 8,0)
Paro's IP pufr (ChIP)	0,02% SDS; 2% Triton X-100; 4 mM EDTA (pH 8,0); 40 mM Tris-Hcl (pH 8,0); 300 mM NaCl
Paro's promývací pufr I (ChIP)	0,1% SDS; 1% Triton X-100; 2 mM EDTA (pH 8,0); 20 mM Tris-Hcl (pH 8,0); 50 mM NaCl
Paro's promývací pufr II (ChIP)	0,1% SDS; 1% Triton X-100; 1% EDTA (pH 8,0); 20 mM Tris-Hcl (pH 8,0); 500 mM NaCl
Pufr pro Proteinasu K (ChIP)	0,5% SDS; 25 mM EDTA (pH 8,0); 10 mM Tris-HCl (pH 8,0); 100 mM NaCl
MACS pufr	0,5% albumin z bovinního séra; 2 mM EDTA v PBS (pH 7,2)

3.1.11 Média, buněčná a bakteriální kultivace

Médium, kultivační substrát	Výrobce	Kat. číslo
FBS	Biochrom AG	S0115
IMDM	Sigma-Aldrich	I3390
LB Agar	Sigma-Aldrich	L2897
LB Broth, Miller (Luria-Bertani)	Amresco	J106
NEAA (100x)	Sigma-Aldrich	M7145
Penicillin-Streptomycin solution	Amresco	K952
RPMI -1640	Sigma-Aldrich	R7388
S.O.C. Medium	Life Technologies	15544-034

3.1.12 Komerčně dodávané sady

Komerčně dodávaná sada	Výrobce	Kat. číslo
DNeasy Blood and Tissue Kit	Qiagen	69504
ECL Plus Western Blotting Detection System	GE Healthcare	RPN2132
EpiTect Bisulfite Kit	Qiagen	59104
High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems	4368814
iBlot Gel Transfer Stacks, PVDF, Mini	Life Technologies	IB4010-02
iScript cDNA Synthesis Kit	BIO-RAD	170-8891
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen	28704
Zyppy Plasmid Miniprep Kit	ZymoResearch	D4020

3.1.13 Speciální přístroje a jiné vybavení

Přístroj	Výrobce
7900HT Fast Real-time PCR System	Life Technologies
AutoMACS	Milteny Biotec
Biophotometr	Eppendorf
BD FACS Aria IIu	BD Biosciences
BD FACS CantoII	BD Biosciences
Bioanalyzer 2100	Agilent Technol.
CL-XPosure Film (Clear Blue X-ray Film)	Thermo Scientific
Genetic Analyzer 3500	Life Technologies
iBlot Gel Transfer System	Life Technologies
Mastercycler Gradient	Eppendorf
Spectrophotometer ND-1000	NanoDrop Technol.
NuPAGE 10% Bis-Tris Gel 1.5mm X 10 well	Life Technologies
Digital sonifier M500	Branson

3.1.14 Speciální počítačové programy

Program

FACSDiva software v.6.1

Chromas 2.33

TIGR MultiExperimentViewer 4.0.01

Výrobce

BD Biosciences

Technelysium Pty Ltd

TM4 Microarray Software

3.2 Metody

Následující podkapitola obsahuje výčet hlavních metod a pracovních postupů využitých při vypracování této dizertační práce.

3.2.1 Pracovní postup při nakládání se vzorky pacientů s MDS, myšími c-Kit+ buňkami a modelovými buněčnými liniemi pro MDS

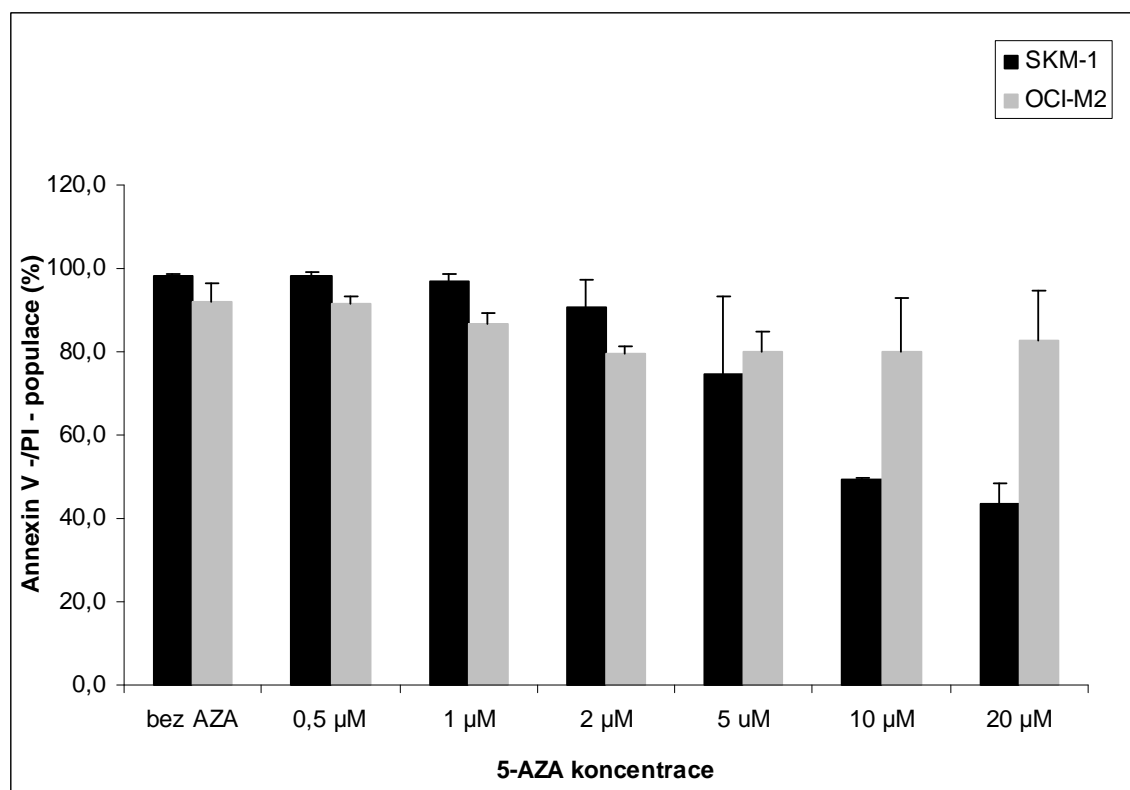
Vzorek odebrané kostní dřeně pacientů byl naředěn sterilním PBS v poměru 1:1. Naředěný vzorek byl v poměru 1:1 opatrně navrstven na separační roztok hydrofilního polymeru Biocoll v 50 ml centrifugační zkumavce. Takto nanesený vzorek byl centrifugován ve výkyvném rotoru za pokojové teploty 20 minut na 2000 otáč./min. Ze vzniklého hustotního gradientu na rozhraní dvou fází byla separována frakce mononukleárních buněk. Tato frakce byla promyta 10 ml PBS centrifugací 5 minut při 4°C na 1250 otáč./min. Tato přečištěná frakce byla 24 hodin kultivována při 37°C a 5% atmosféře CO₂ v médiu IMDM s 10% FBS, 1% roztokem NEAA, 1% roztokem antibiotik (penicilin-streptomycin) a stem cell factorem (20 ng/ml). Za 24 hodin se metodou průtokové cytometrie na BD FACSAria Ilu separovaly a vytřídily progenitorové buňky CD34+. Použita byla protilátka PE-anti-human CD34 [581].

Myší c-Kit+ (CD117+) buňky byly připraveny z vypreparovaných stehenních a holenních kostí myší PU.1^{URE-/-} a normálních wt myší. Kostí byly propláchnuty injekční stříkačkou s PBS. Z buněčné suspenze 1x10⁸ buněk byla následně vytříděna pomocí metody magnetického sortování na přístroji AutoMACS populace c-Kit+ buněk. Byla použita protilátka FITC-anti-mouse CD117 [2B8] a následně byly buňky vytříděny pomocí magnetických anti-FITC MicroBeads dle návodu výrobce.

Buňky buněčných linií OCI-M2 a SKM-1 byly kultivovány při 37°C a 5% atmosféře CO₂ v médiu podle doporučení dodavatele. Počet buněk v kultuře byl stanoven jejich spočítáním v Bürkreově komůrce.

3.2.2 Pracovní postup při testování AZA na modelových buněčných liniích pro MDS, myších c-kit+ buňkách z kostní dřeně a CD34+ progenitorech z pacientů MDS.

Na buněčných kulturách linií OCI-M2 a SKM-1 byl proveden metodický experiment s ovlivněním buněk různými koncentracemi AZA po dobu 24 hodin a následným změřením buněčné životnosti na průtokovém cytometru (viz kapitola 3.2.8). AZA byl připraven jako čerstvý roztok rozpuštěním 25 mg prášku v 10 ml sterilní destilované vody a následně přidán v příslušném objemu do 10 ml buněčné kultury tak, aby jeho výsledná koncentrace v kultuře dosáhla hodnot 0,5 μM, 1 μM, 2 μM, 5 μM, 10 μM nebo 20 μM (Obrázek 7). Na základě experimentu byly stanoveny tři subletální výsledné koncentrace AZA - 1 μM, 2 μM a 5 μM, které byly dále používány pro působení na buněčné linie, myší c-Kit+ buňky izolované z kostní dřeně a CD34+ progenitory ze vzorků kostní dřeně pacientů s MDS. Buňky byly ovlivňovány AZA po dobu tří dnů, každých 24 hodin ve třech stejných dávkách (1 μM, 2 μM nebo 5 μM). Roztok AZA byl před každým přidáním připraven jako čerstvý výše uvedeným způsobem. Při studiu vlivu cytokinů na buňky MDS se vždy 6 hodin před přidáním každé dávky AZA přidal k buňkám příslušný cytokin (G-SCF, GM-CSF a M-CSF) v takovém objemu, aby jeho výsledná koncentrace v kultuře byla 50 ng/ml.



Obrázek 7. Metodický experiment stanovení subletálních koncentrací AZA na modelových buněčných liniích SKM-1 a OCI-M2. AZA působil na buněčné linie v různých koncentracích 24 hodin. Po uplynutí této doby byla změřena apoptóza a životnost buněk způsobem popsaným v kapitole 3.2.8. Jako vhodné subletální koncentrace AZA byly vybrány 1 µM, 2 µM a 5 µM, kde buněčná životnost u obou linií po 24 hodinách inkubace s AZA přesáhla 60%.

3.2.3 Izolace RNA a přepis na cDNA

Z buněčné kultury bylo odebráno 2×10^5 - 1×10^6 buněk do 1,5 ml centrifugační zkumavky a centrifugováno při pokojové teplotě 5 minut na 2200 otáč./min. Peleta buněk byla resuspendována v 500 µl PBS a opět centrifugována při pokojové teplotě 5 minut na 2200 otáč./min. Peleta buněk byla lyzována v 400 µl RiboZolu a ponechána 10 minut na pokojové teplotě. K buněčnému lyzátu bylo přidáno 60 µl předchlazeného chloroformu, promícháno na míchačce vortex po dobu 15 sekund a centrifugováno při pokojové teplotě 10 minut na 14000 otáč./min. Po centrifugaci byla horní vodná fáze přenesena do nové 1,5 ml centrifugační zkumavky, spojena s chloroformem v objemu 1:1 a promíchána a centrifugována stejně jako v předchozím kroku. Svrchní vodná fáze byla přenesena do nové 1,5 ml centrifugační zkumavky a byl k ní přidán 1 µl linear acrylamide a isopropylalkohol v objemu 1:1. RNA byla uchována v izopropylalkoholu přes noc při teplotě -20°C a druhý den vyprecipitována centrifugací při 4°C 40 minut při maximálních otáčkách. RNA peleta byla promyta 500 µl

75% ethanolu, centrifugována při 4°C 10 minut při maximálních otáčkách a následně zbavena zbytků ethanolu (jeho odpařením) a rozpuštěna ve 30 µl destilované vody. Kvalita (integrita) RNA byla ověřena na přístroji Bioanalyzer 2100 podle návodu udávaného výrobcem. Koncentrace a čistota RNA byla stanovena na přístroji Spectrophotometer ND-1000.

Z RNA izolované z modelových buněčných linií pro MDS byl odebrán 1 µg do 20 µL celkového objemu jedné reakce na přepis do cDNA pomocí iScript cDNA Synthesis Kit. Reverzní transkripce proběhla na přístroji Mastercycler Gradient v těchto krocích: 1) T=25°C, 5 minut; 2) T=42°C, 30 minut; 3) T=85°C, 5 minut; 4) T=4°C, 5 minut. Přepsaná cDNA byla naředěna vodou do konečného objemu 50 µl a uchována na -20°C k dalšímu použití.

Z RNA izolované ze vzorků získaných od pacientů s MDS a z myších c-Kit⁺ buněk kostní dřeně byl odebrán 1 µg do 20 µl celkové reakce na přepis do cDNA pomocí High Capacity cDNA Reverse Transcription Kitu se specifickými primery. Reverzní transkripce proběhla na přístroji Mastercycler Gradient v těchto krocích: 1) T=25°C, 10 minut; 2) T=37°C, 120 minut; 3) T=85°C, 5 minut; 4) T=4°C, 5 minut. Přepsaná cDNA byla naředěna vodou do konečného objemu 50 µl a uchována na -20°C k dalšímu použití.

3.2.4 Kvantitativní PCR v reálném čase (qPCR) a vyhodnocení RNA exprese

PCR reakce byla nejprve připravena odděleně ve dvou druzích směsí: v cDNA-směsích pro každý jednotlivý vorek a primer-směsích pro každý jednotlivý gen, jehož exprese byla studována. Následně byly tyto reakční směsi postupně napipetovány opakovací pipetou na destičku o 384 jamkách tak, aby do každé jamky byla napipetována kombinace z jedné cDNA směsi (á 4 µl) a z jedné primer směsi (á 4 µl). Celkový objem PCR reakce na jednu jamku byl 8 µl. Každá PCR reakce (unikátní kombinace cDNA směsi a primer směsi) byla v daném experimentu napipetována jako duplikát.

Složení PCR reakce s hydrolyzačními sondami (pro jednu jamku):

- 1) cDNA směs: TaqMan Universal master Mix II 2 µl; voda 1,5 µl; cDNA 0,5 µl
- 2) primer směs: TaqMan Universal master Mix II 2 µl; voda 1,7 µl; primer 0,2 µl; hydrolyzační sonda Roche 0,1 µl

Složení PCR reakce s barvivem SYBR (pro jednu jamku):

- 1) cDNA směs: Fast SYBR Green master Mix 2 µl; voda 1,5 µl; cDNA 0,5 µl
- 2) primer směs: Fast SYBR Green master Mix 2 µl; voda 1,7 µl; primer 0,3 µl

qPCR proběhla na přístroji 7900HT Fast Real-time PCR System. Přístroj četl fluorescenční signál ve fázi polymerizace i při nasedání primerů na templát.

Pro PCR reakci (TaqMan) jsme vytvořili následující program: Počáteční denaturace; 40 cyklů (T=95°C, 15 sekund; T=60°C; 1 minuta).

Pro PCR reakci (SYBR) jsme vytvořili následující program: Počáteční denaturace; 40 cyklů (T=95°C, 10 sekund; T=60°C, 20 sekund; T=72°C; 30 sekund).

PCR byla vyhodnocena tak, že C_T hodnoty (hodnota PCR cyklu, kdy amplifikační křivka překročí prahovou hodnotu fluorescenčního signálu umístěnou do fáze exponenciálního růstu kopií PCR produktu) pro specifický PCR produkt/gen (C_{Tspec}) byly odečteny od C_T hodnot pro příslušný normalizační gen (C_{Tnorm}). Relativní hodnota exprese mRNA byla vypočtena jako průměr hodnot $2^{-(C_{Tnorm} - C_{Tspec})}$ v duplikátu pro každý vzorek s určením standardní chyby měření. Hodnoty byly vyneseny do grafů a statisticky analyzovány. Pro analýzu byl použit také Studentův t-test. V programu TIGR MultiExperimentViewer 4.0.01 byly vytvořeny „tepelné mapy“ ilustrující změny genové exprese, spočítány K-průměry a provedena hierarchická shluková analýza expresních profilů vybraných genů podle algoritmu: 1) shluky genů; 2) počet shluků = 1; 3) maximální počet opakování = 50; 4) genový strom; 5) vzdálenost shluků daná Pearsonovou korelací/absolutní vzdálenost.

3.2.5 Přenos proteinu a inkubace s protilátkou (Western Blott)

Z buněčné kultury bylo odebráno 3×10^6 buněk do 1,5 ml centrifugační zkumavky a centrifugováno při pokojové teplotě 5 minut na 2200 otáč./min. Peleta buněk byla promyta v 500 μ l PBS a opět centrifugována při pokojové teplotě 5 minut na 2200 otáč./min. Peleta buněk byla lyzována ve 200 μ l RIPA lyzačním pufru na ledu po dobu 12 minut. V čase 3, 6, 9 a 12 minut lyzace byl lyzát promíchán 15 vteřin na míchačce vortex. Lyzát byl dále sonikován na přístroji Digital sonifier M500 umístěném v místnosti s teplotou 4-6°C. Celá sonikační procedura zahrnovala 3 cykly po 1 sekundě sonikace se dvěma pětisekundovými přestávkami. Amplituda sonikačního ostnu byla 50%. Ihned po skončení sonikace byl lyzát umístěn na 10 minut na led. Pomocí Bradford Reagent byla stanovena proteinová absorbance v buněčném lyzátu. Jako normalizační kontrola byl použit 1 μ l RIPA lyzačního pufru + 99 μ l Bradfordu, vzorek byl měřen jako 1 μ l lyzátu + 99 μ l Bradfordu. Absorbance byla měřena v 8,5 mm

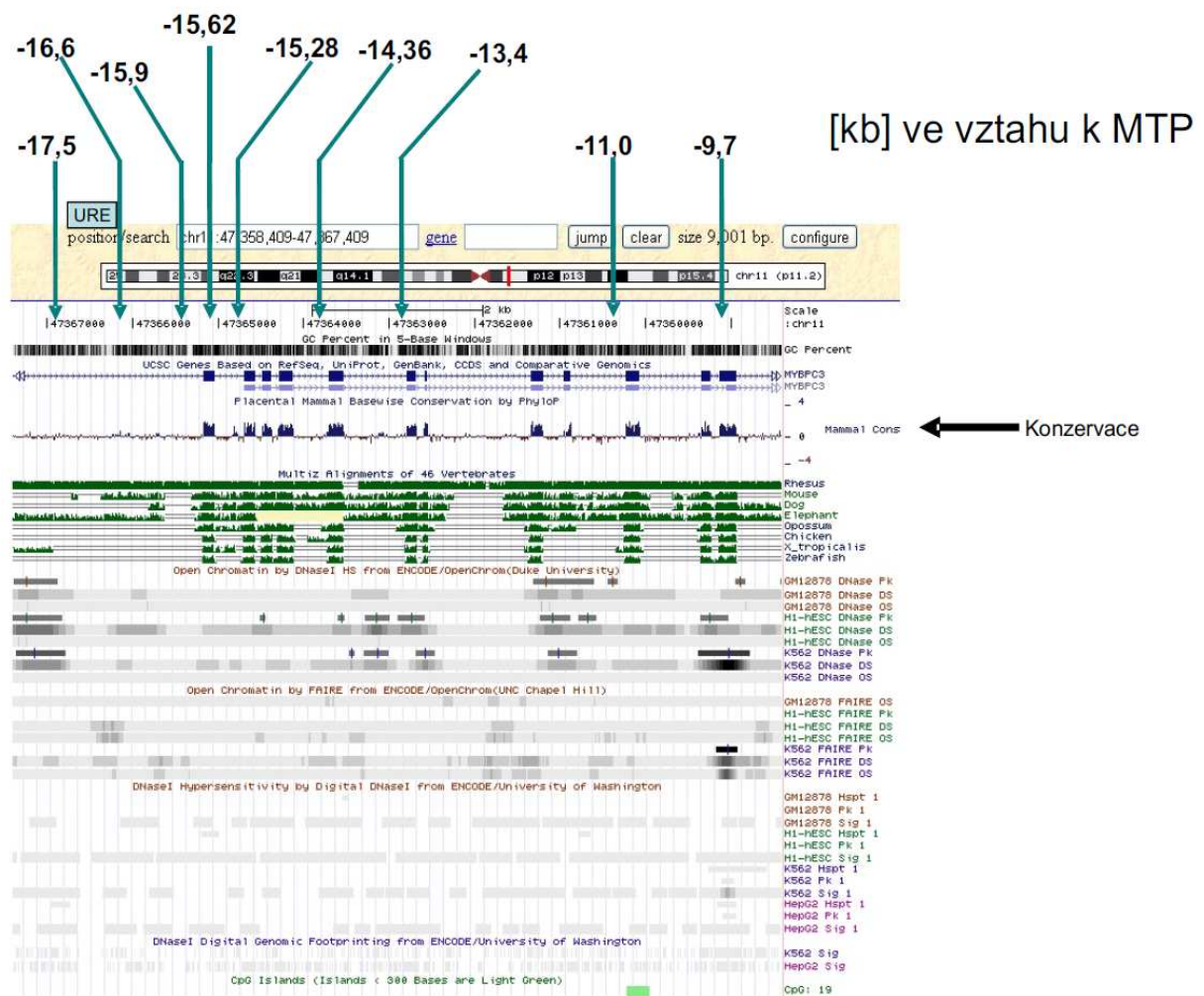
kyvetách na přístroji Biophotometr. Pomocí kalibrační křivky sestrojené na základě ředící řady BSA byla vypočítána koncentrace proteinů ve vzorcích.

RIPA lyzát v objemu odpovídající 20 ng proteinu byl přidán k 6 μ l NuPAGE LDS Sample Buffer (4x), 2 μ l denaturačního činidla DTT a doplněn do 24 μ l pomocí NuPAGE MOPS SDS Running Buffer (1x). Protein byl denurován na 70°C po dobu 10 minut a následně nanesen na NuPAGE 10% Bis-Tris Gel umístěný do elektroforetické aparatury naplněné NuPAGE MOPS SDS Running Bufferem. Vzorky byla naneseny do jamek a analyzovány elektroforeticky (150 V, 125 mA, 90 minut). Gel byl vynadán z pouzdra, umístěn do aparatury předem připravených elektrod iBlot Gel Transfer Stacks a překryt membránou z materiálu PVDF. Aparatura byla umístěna v přenosovém přístroji iBlot Gel Transfer System. Přenos proběhl podle programu P2 suchým způsobem 7 minut. Membrána s přenesenými proteiny byla před inkubací s primární protilátkou blokována 45 minut v 7,5% odtučněném mléku v PBS s přídavkem 0,1% Tween 20. Inkubace membrány s primární protilátkou Anti-PU.1 rabbit polyk. [T-21] (ředěná 1:600 v 7,5% odtučněném mléku v PBS s přídavkem 0,1% Tween 20) proběhla přes noc při 4°C na výkyvné platformě a pokračovala 45 minut na téže platformě při pokojové teplotě. Po inkubaci byla membrána promyta 3x20 minut v nadbytku PBS + 0,1% Tween 20. Inkubace se sekundární protilátkou Anti-Rabbit IgG konjugovanou s HRP (ředěná 1:4000) proběhla 60 minut na výkyvné platformě při pokojové teplotě. Po inkubaci byla membrána promyta 3x20 minut v nadbytku PBS + 0,1% Tween 20. Po promytí bylo na membránu působeno luminolem podle návodu výrobce ECL Plus Western Blotting Detection System. Specifické proteinové proužky PU.1 byly v různých expozičních dobách zobrazeny na filmy CL-XPosure Film. Ke kontrole nanesení stejného množství proteinu ve všech vzorcích posloužila protilátka Anti-Actin –HRP konj. [I-19] (ředěná 1:2000).

3.2.6 Chromatinová imunoprecipitace

Z buněčné kultury bylo odebráno 5×10^6 buněk a zpracováno způsobem popsáným v odborné literatuře (Burda et al., 2009). Při imunoprecipitaci byly použity protilátky Anti-H3K9acetyl (1 μ l na jeden vzorek IP), Anti-Histone H3K9trimethyl, Anti-Histone H3 trimethyl K4 a kontrolní protilátka Normal Rabbit IgG (5 μ l na jeden vzorek IP). DNA z imunoprecipitátů byla změřena pomocí PCR v namnožených úsecích nacházejících se nad místem transkripčního počátku genu PU.1 (-17,5 až -9,7 kb nad transkripčním počátkem). Tyto

namnožené úseky odpovídají oblastem -14/-15kb myšního URE a jeho okolí (h -17,5 kb, -16,6 kb a -15,9 kb); -12 kb pozitivní regulační oblasti (h -13,4 kb); -10 kb pozitivní regulační oblasti (h -11,0 kb) a -8 kb pozitivní regulační oblasti (h -9,7 kb). Byly použity i primery namnožující DNA dalších evolučně konzervativních úseků (-15,62 kb, -15,28 kb a -14,36 kb). Úseky amplikonů pro PCR jsou anotovány v UCSC (Obrázek 8). Primery použité v PCR a standardní křivky pro PCR reakce s těmito primery jsou uvedeny výše (Tabulka 10 a Tabulka 11). Přítomnost epigeneticky významných modifikací histonů v chromatinu („procento inputu“) je definována jako počet kopií specifického úseku DNA v každém imunoprecipitátu vztažená k počtu kopií téhož úseku v inputu použitým pro imunoprecipitaci v ředění 1:100 (1% input DNA). Od hodnot „nabohacení“ (procenta inputu) získaných imunoprecipitací se specifickou protilátkou byla odečtena hodnota „nabohacení“ (procenta inputu) pro kontrolní, nespecifickou protilátku.



Obrázek 8. Genový lokus PU.1 (nad místem transkripčního počátku) jako snímek programu UCSC browser. Obrázek ukazuje míru evolučního zakonzervování určitých úseků DNA naznačující jejich

význam pro regulaci genové exprese. Zakonzervování je zjišťováno srovnáním sekvencí DNA různých savců (makak, myš, pes, slon, vačice). Šípkami jsou naznačeny pozice úseků namnožených PCR udávané v kb před místem transkripčního počátku PU.1, modrozelený box nad schématem udává přibližnou pozici oblasti URE.

3.2.7 Průtoková cytometrie

Z buněčné kultury bylo odebráno 5×10^5 buněk do kyvety určené pro průtokový cytometr BD FACS Aria Ilu (umožňuje třídění buněk podle antigenu), nebo BD FACS Canto II, doplněno do objemu 4 ml sterilním PBS a centrifugováno při 4°C 5 minut na 1490 otáč./min. Peleta buněk byla promyta ve 2 ml PBS a opět centrifugována při 4°C 5 minut na 1490 otáč./min. Po centrifugaci byla peleta ponechána ve zbytkovém objemu PBS cca 100 µl. Alternativně byly buňky určené na měření apoptózy/životnosti promyty ve 2 ml (1x) Annexin V vazebného pufru.

Ve zbytkovém objemu 100 µl PBS byly buňky progenitorů získaných od pacientů s MDS inkubovány s protilátkami PE-anti-human CD34 [581] (20 µl protilátky/vzorek) a/nebo FITC-anti-mouse CD11b [M1/70] (0,5 µl protilátky/vzorek) a buňky modelových buněčných linií MDS s protilátkou APC-anti-human CD11b [ICRF44] (5 µl na vzorek) po dobu 30 minut na ledu a ve tmě. Následně byly buňky promyty ve 2 ml PBS centrifugací při 4°C 5 minut na 1490 otáč./min. K peletě buněk bylo napipetováno 300 µl PBS a buňky byly změřeny na expresi povrchových antigenů na průtokovém cytometru BD FACS Canto II nebo BD FACS Aria Ilu. Na BD FACS Aria Ilu byla alternativně pozitivní populace vytříděna do zvlášť k tomu určené kyvety s PBS. Experiment byl připraven na základě změření autofluorescence neznačených buněk. Před měřením oběma protilátkami zároveň v jedné kyvetě byla na základě měření exprese každého flouroforu (PE, FITC) samostatně v jednotlivých kyvetách provedena kompenzace signálů. Vyhodnocení měření bylo provedeno v rámci prostředí programu FACSDiva Software v.6.1.3. Použity byly funkce „Biexponential display“ pro zobrazení exprese povrchových antigenů uvnitř bodového grafu a funkce „Polygon gate“ pro separaci buněčných populací určitého fenotypu.

Při měření apoptózy a životnosti buněk se buňky po promytí ve 2 ml Annexin V vazebného pufru ponechaly ve zbytkovém objemu cca 100 µl. K peletě byl přidán Annexin V-FITC (0,6 µl/vzorek) a buňky byly inkubovány po dobu 20 minut na ledu a ve tmě. Následně bylo k buňkám napipetováno 300 µl PBS a bezprostředně před započítáním měření každého

jednotlivého vzorku na průtokovém cytometru BD FACS Canto II se k němu přidalo 0,5 μ l z alikvotů naředěného zásobního roztoku Propidium jodidu (1 mg/ml). Vyhodnocení měření bylo provedeno v rámci prostředí programu FACSDiva software v.6.1.3. Použity byly funkce „Biexponential display“ pro zobrazení exprese fosfatidylserinu (známky časné apoptózy, na který se anexin specificky váže) a signál Propidium jodidu vázaného na DNA mrtvých buněk uvnitř bodového grafu. Pro separaci buněčných populací určitého fenotypu byly použity funkce „Polygon gate“ a „Quadrant gate“.

3.2.8 Analýza metylace DNA

Z modelových buněčných linií pro MDS a CD34+ progenitorových buněk získaných od pacientů s MDS byla pomocí komerčního kitu DNEasy Blood and Tissue Kit izolována genomická DNA. DNA (250 ng rozpuštěných ve 20 μ l vody v jedné reakci) byla ošetřena tzv. bisulfitickou konverzí (deaminací nemetylovaných cytosinů na uracily bisulfitem sodným) podle návodu výrobce EpiTect Bisulfite Kit. Specifický produkt DNA pokrývající CpG ostrůvky oblasti URE o velikosti 404 bp (Obrázek 6) byl namnožen pomocí PCR.

Složení PCR reakce: DNA 3 μ l; LA PCR Buffer II (Mg^{2+} plus) (1x) 4 μ l; dNTPs 4 μ l; DMSO 0,5 μ l; 1,2 μ l 20 mM směs primerů PU.1-URE-F a PU.1-URE-R; 0,25 μ l polymerázy TaKaRa LA TaqTM HS; 27 μ l H₂O.

Pro PCR reakci jsme vytvořili následující program: 1) T=98°C, 1 minuta; 2) T=95°C, 3 minuty; 3) 35 cyklů - (T=95°C, 40 sekund; T=60°C, 40 sekund; T=72°C, 45 sekund); 4) T=72°C, 10 sekund; 5) T=4°C, 5 minut. Namnožený PCR produkt byl velikostně ověřen pomocí DNA elektroforézy na 1,5% agarosovém gelu. DNA byla izolována z gelu pomocí QIAquick Gel Extraction Kit dle návodu výrobce. Koncentrace a čistota DNA byla stanovena na přístroji Spectrophotometer ND-1000. 200 ng DNA bylo ligováno do 1 μ l vektoru pCR[®]2.1-TOPO[®] podle návodu výrobce. Ligace proběhla při 25°C 1 hodinu. Následně došlo k transformaci do bakterií One Shot TOP 10 (použita celá ligační směs v objemu 6 μ l). Bakterie zůstala stát 30 minut na ledu, proběhl tepelný šok 42°C 30 sekund, buňky byly opět umístěny 5 minut na ledu a následně inkubovány ve 250 μ l SOC média 2 hodiny při 37 °C ve třepačce při 180 otáčkách/minutu. Bakterie byla vyseta na agarové plotny napuštěné ampicilinem (1:1000); X-GAL (40 μ l na plotnu) a IPTG (20 μ l na plotnu) – vše čerstvě připraveno. Plotny byly inkubovány přes noc při 37°C. V průměru 10 bíle zbarvených kolonií

bylo přepíchnuto špičkami o objemu 200 μ l na novou plotnu a zbytek bakterie ze špičky byl ponořen do PCR reakcí na ověření správnosti klonovaného úseku DNA (404 bp). Z pozitivních, PCR-ověřených kolonií byla izolována DNA pomocí Zyppy Plasmid Miniprep Kitu dle návodu výrobce. DNA (100 ng DNA rozpuštěné ve vodě; 0,4 μ l primeru PU.1-URE-F a doplněno vodou do 15 μ l) byla následně osekvenována na přístroji Genetic Analyzer 3500. Ověření sekvence a výpočet procenta metylovaných CpG ostrůvků na DNA proběhlo pomocí programu Chromas 2.33.

4. VÝSLEDKY

4.1 Exprese genu PU.1 v progenitorech získaných z pacientů s MDS. Vztah exprese PU.1 k odpovědi pacientů na léčbu AZA a k metylaci DNA v oblasti URE

Hladina transkripčního faktoru PU.1 je u řady hematologických malignit snížena. Úplné či výrazné (o 80%) potlačení exprese tohoto genu v dospělé krevetvorbě je asociované s AML. Položil jsem si proto otázku, zda se rovněž progenitory získané z pacientů MDS budou oproti buňkám se zdravých kontrol vyznačovat sníženou expresí PU.1. MDS je onemocnění vyznačující se mimořádně vysokou variabilitou svého průběhu, prognózy a odpovědi na léčbu. Soustředili jsme se proto na soubor pacientů s MDS s vyšším rizikem (střední-2/vysoké riziko podle IPSS), případně s transformací MDS do AML. U souboru těchto 44 pacientů (buňky byly získány v 54 nezávislých vzorcích) jsme stanovili řadu klinických údajů včetně reakce pacientů na léčbu AZA (Tabulka 6). Průtokovou cytometrií jsme izolovali populaci progenitorových, CD34+ buněk z kostní dřeně pacientů, změřili v nich expresi PU.1 na úrovni mRNA a srovnali ji s expresí v CD34+ buňkách od zdravých dárců. Zjistili jsme, že průměrná exprese PU.1 v souboru pacientů s MDS (N=54) byla prakticky shodná s průměrnou expresí PU.1 v souboru kontrol (N=5). Ve srovnání se zdravými dárci je však úroveň exprese transkriptu PU.1 mRNA u MDS pacientů distribuována výrazně heterogenně (Výsledkový obrázek 1A). Hladiny genů, na které byla exprese PU.1 normalizována (HPRT1 a GAPDH), takovou fluktuaci nevykazovaly. Dále jsme změřili hladinu exprese mRNA transkriptu PU.1 v modelových buněčných systémech pro MDS – buňkách OCI-M2 a SKM-1 a zjistili jsme, že hladina PU.1 v těchto buňkách je nižší než hodnota průměru pro kontrolní CD34+ buňky (Výsledkový obrázek 1A).

Zajímalo nás, zda hladina PU.1 u pacientů s vyšším rizikem MDS má nějaký vztah k odpovědi těchto pacientů na léčbu AZA. Proto jsme ze souboru patientských vzorků vybrali 17 vzorků pacientů s vyšším rizikem MDS (střední-2/vysoké riziko podle IPSS) a MDS/AML léčených AZA, kteří již zemřeli (Tabulka 5). Podle výše exprese PU.1 v *ex vivo* izolovaných CD34+ progenitorech pacientů s MDS jsme pacienty rozdělili do dvou odlišných skupin – na

skupinu s nízkou expresí PU.1 (hodnota exprese byla nižší než průměr mínus standardní chyba pro kontrolní CD34+ buňky; N=9) a skupinu zbývajících pacientů vykazujících podle tohoto rozdělení střední/vysokou expresí PU.1 (N=8). Přestože celkový počet pacientů v obou skupinách byl poměrně nízký, zaznamenali jsme významný trend směrem k delšímu přežití při léčbě AZA ve skupině pacientů se střední nebo vysokou úrovní exprese PU.1. Medián přežití při léčbě AZA činil ve skupině pacientů s nízkou hladinou PU.1 necelé 4 měsíce, zatímco ve skupině pacientů se střední a vysokou hladinou PU.1 dosáhl zhruba 10 měsíců (Výsledkový obrázek 1B). Významný pozitivně korelační trend mezi expresí PU.1 ve vzorcích pacientů s MDS a délkou jejich přežití na AZA byl zaznamenán nejen pro celé skupiny vzorků ale i pro jednotlivé vzorky (Výsledkový obrázek 1B).

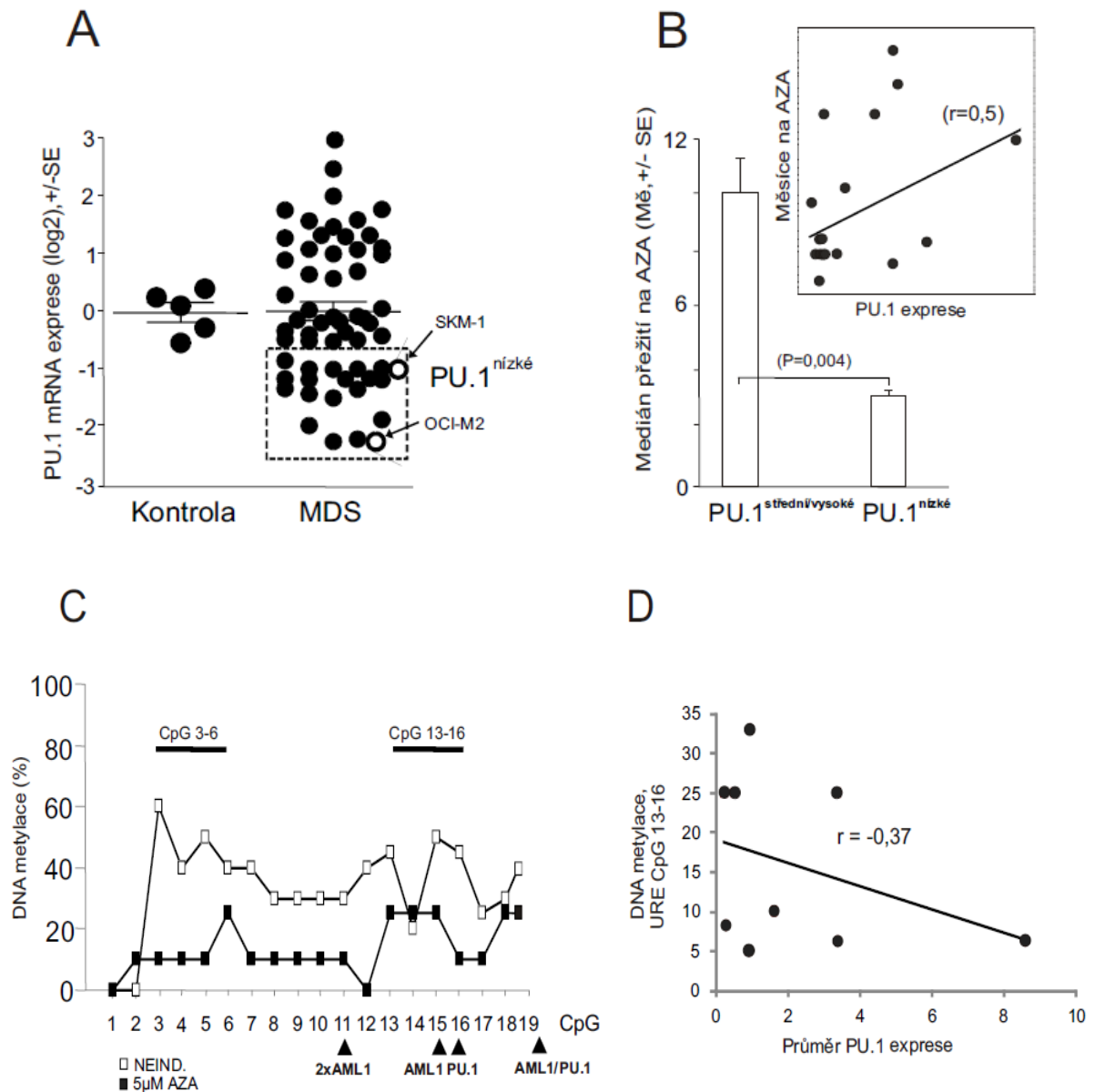
Mechanismus rozhodující o snížení exprese PU.1 v MDS progenitorech byl dále studován ve smyslu zjištění míry DNA metylace v oblasti URE (19 CpG ostrůvků ~ 17 kb oblast, Obrázek 6) v buňkách OCI-M2. Tato buněčná linie představuje transformaci MDS s vysokým rizikem do AML M6. Hladina exprese mRNA transkriptu PU.1 v buňkách OCI-M2 se pohybuje na spodní úrovni v rámci námi definované skupiny buněk pacientů s MDS s nízkou hladinou PU.1 (Výsledkový obrázek 1A). Oblast URE v buňkách OCI-M2 je silně metylovaná s maximem metylace na CpG ostrůvcích 3-5 a 13-16 (Doplňující výsledkový obrázek 2). Tyto CpG ostrůvky sousedí s vazebnými místy pro PU.1 a AML1, která jsou nezbytná pro regulační (auto)stimulaci exprese PU.1.

Položili jsme si otázku, zda lze úroveň metylace DNA v URE snížit pomocí DNMTi. Působili jsme proto na buňky OCI-M2 AZA v koncentraci 5 μ M (viz Materiál a metody, kapitola 3.2.2). AZA způsobil pokles DNA metylace v oblasti URE (Výsledkový obrázek 1C). V oblasti AML1 a PU.1 vazebných míst mělo působení AZA v některých případech na demetylaci pouze částečný účinek (CpG ostrůvek 14 a 18), zatímco jiné CpG ostrůvky (12, 13, 15, 16 a 19) těchto vazebných regionů jsou po působení AZA významně demetylované.

Na základě výsledků získaných experimentem na buňkách OCI-M2 jsme si položili otázku, zda úroveň exprese PU.1 v buňkách CD34+ progenitorů získaných od pacientů s MDS odpovídají úrovni metylace DNA v oblasti URE (u těch samých pacientů). Analýza vzorků progenitorů pacientů s MDS, kde se podařilo změřit úroveň metylace DNA (N=9; z toho 5 ze skupiny s nízkou expresí PU.1 a 4 ze skupiny se střední/vysokou expresí PU.1), neukázala žádnou korelaci mezi úrovní metylace všech 19-ti CpG ostrůvků a expresí PU.1 (Doplňující

výsledkový obrázek 1). Ukázala však signifikantní trend negativní korelace ($r = -0,37$) mezi expresí PU.1 a metylací DNA na CpG ostrůvcích 13-16 tj. v oblasti vazebných míst transkripčních faktorů PU.1 a AML (Výsledkový obrázek 1D).

Naše výsledky ukazují, že pacienti s MDS s vyšším rizikem, kteří vykazují nízkou expresí PU.1, mají významně kratší medián přežití na léčbě AZA. Výsledky rovněž ukazují, že nízké hladiny PU.1 transkriptu v modelu buněk OCI-M2 jsou asociovány s vysokým stupněm DNA metylace v oblasti URE, jež je působením AZA významně potlačena. Mezi metylací DNA na určitých CpG ostrůvcích v oblasti URE a expresí PU.1 existuje trend negativní korelace.



Výsledkový obrázek 1. (A) Expres mRNA transkriptu PU.1 ve vyříděných CD34+ progenitorech ze vzorků pacientů s MDS. Tmavá kolečka představují změřené hodnoty PU.1 exprese v buňkách zdravých dárců (kontroly) – panel vpravo, a pacientů s vyšším rizikem (střední-2/vysoké riziko podle IPSS) MDS. Údaje jsou normalizovány na průměr exprese genů HPRT1 a GAPDH a vztaženy k průměru exprese v buňkách kontrol. Šipky ukazují na bílá kolečka ozančující expresi PU.1 v modelových buněčných liniích pro MDS – OCI-M2 a SKM-1. Osa y je zobrazena v log2 měřítku. Vzorky pacientů s nízkou hladinou PU.1 jsou zahrnuty do rámečku z přerušovaných čar. (B) Medián přežití pacientů s MDS (v měsících) na léčbě AZA. Mediány byly stanoveny pro dvě skupiny pacientů: se střední/vysokou expresí PU.1 (N=8) a s nízkou expresí PU.1 (N=9). V rámečku je zobrazen vztah mezi délkou přežití

pacienta při léčbě AZA a hladinou PU.1 exprese. **(C)** Analýza DNA metylace v regulační oblasti URE genu PU.1 v buňkách OCI-M2. Analýza zachycuje stav metylace na 19 CpG ostrůvcích před (bílé čtverce) a po působení AZA (5 μ M po 72 hodin, tmavé čtverce). Trojúhelníky pod osou X jsou vyznačena vazebná místa transkripčních faktorů PU.1 a AML1. Zvýrazněny jsou CpG ostrůvky 3-6 a 13-16, kde byla původní úroveň DNA metylace nejvyšší. **(D)** Korelační analýza mezi průměrnou DNA metylací na CpG ostrůvcích 13-16 v oblasti URE a průměrnou expresí PU.1 v souboru pacientů s MDS s vyšším rizikem (N=9). Průměrná PU.1 exprese je vyznačena na ose X, metylace DNA na CpG 13-16 na ose Y, jednotlivé vzorky jsou vyznačeny jako tmavá kolečka.

4.2 Vliv AZA na expresi PU.1 v modelových buňkách pro MDS. Vliv AZA na buněčnou diferenciaci, apoptózu a proliferaci

Zjistili jsme, že existuje negativní korelace mezi úrovní metylace CpG ostrůvků 13-16 v oblasti URE a hladinou exprese PU.1 a že působení AZA snižuje metylaci v oblasti URE v modelové buněčné linii OCI-M2. Položil jsem si otázku, zda má působení AZA na modelové buněčné linie nějaký přímý efekt na expresi PU.1. Zjistili jsme, že působení AZA vede ke zvýšení exprese PU.1 v buňkách OCI-M2 a SKM-1 na úrovni mRNA transkriptů v závislosti na dávce (Výsledkový obrázek 2A). Dále jsme zjistili, že působení AZA vede ke zvýšení exprese PU.1 v buňkách OCI-M2 a SKM-1 i na úrovni proteinu (Výsledkový obrázek 2B). Působení AZA navíc vede k zapnutí transkripčního programu cílových genů PU.1 s viditelným zvýšením exprese CSF1R (Colony stimulating factor 1 receptor), CSF3R (Colony stimulating factor 3 receptor - granulocyte), EGR2 (Early growth response 2), FOS (FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog), MMP9 (Matrix metalloproteinase 9), CEBPA (CCAAT/enhancer binding protein alpha) a v buněčné linii OCI-M2 i genu MPO (Myeloperoxidase) na úrovni mRNA (Výsledkový obrázek 2C).

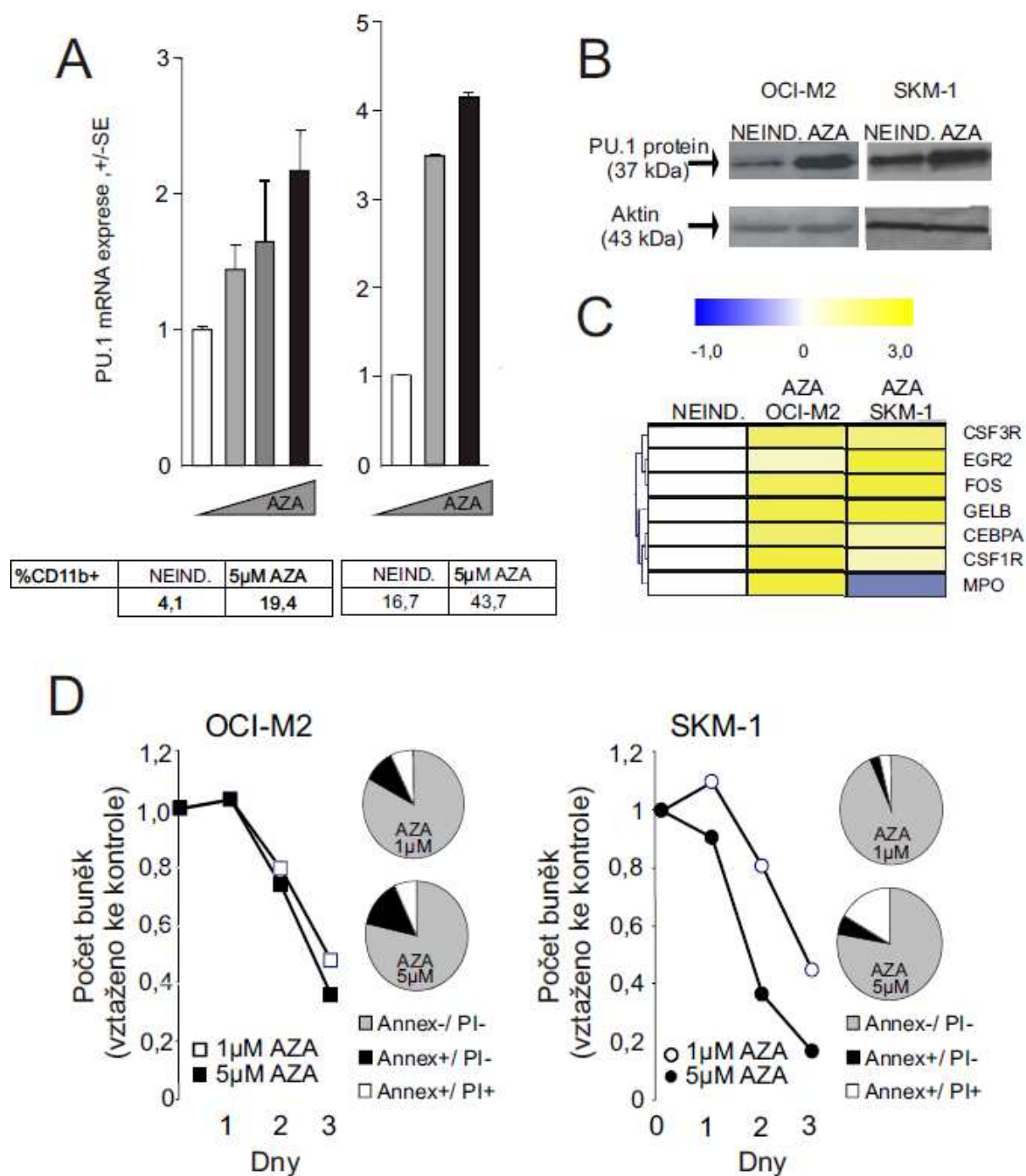
Zajímalo nás dále, zda je indukce transkripčního programu PU.1 způsobená AZA dostačující pro navození diferenciaci na úrovni buněčného fenotypu. Využili jsme proto analýzu metodou průtokové cytometrie s protilátkou proti antigenu myeloidní (monocytárně-granulocytární) diferenciaci CD11b. Zjistili jsme, že AZA významným způsobem indukuje proteinovou expresi CD11b v buňkách OCI-M2 i SKM-1 (tabulka ve Výsledkovém obrázku 2A).

U buněk OCI-M2 a SKM-1 jsme dále provedli analýzu vlivu AZA na proliferaci podle změny parametru počtu buněk v kultuře v čase působení AZA. Zjistili jsme, že nejpozději po druhém dni působení AZA na modelové buněčné linie pro MDS dochází k absolutnímu snížení počtu buněk v kultuře. U linie OCI-M2 dosáhlo toto snížení počtu buněk v kultuře po 3 dnech působení AZA zhruba 50-60%. U linie SKM-1 dosáhlo toto snížení počtu buněk v kultuře po 3 dnech působení AZA v závislosti na dávce zhruba 60 (1 μ M AZA) - 80% (5 μ M AZA) (Výsledkový obrázek 2D).

Rozhodli jsme se rovněž stanovit pomocí průtokové cytometrie na liniích OCI-M2 a SKM-1 případnou indukci apoptózy vlivem AZA. Zjistili jsme, že působení AZA (viz Materiál a metody, kapitola 3.2.2) navozuje určitou apoptózu v buňkách OCI-M2 i SKM-1 v rozsahu maximálně 25% buněk v kultuře. Zatímco u buněk SKM-1 byl rozsah indukce apoptózy závislý na použité koncentraci AZA, u buněk OCI-M2 se působením AZA v různých koncentracích rozsah apoptózy nemění. Celkově však AZA v použitých koncentracích 1 a 5 μM nezpůsobuje ani u jedné z modelových linií významnější indukci apoptózy (Výsledkový obrázek 2D).

Zjistili jsme, že vlivem AZA dochází k významné inhibici buněčné proliferace a poměrně nízké indukci apoptózy. Položili jsme si otázku, jakým potenciálním molekulárním mechanismem může AZA resp. zvýšení exprese PU.1 vést k zastavení buněčného dělení. Změřili jsme expresi mRNA transkriptu CDKN1A (Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A; p21), který funguje jako tumor-potlačující gen schopný v různých fázích zastavit buněčný cyklus. Zjistili jsme, že exprese p21 se po působení AZA zvýší v buňkách OCI-M2 více než šestkrát a v buňkách SKM-1 bezmála o 100% (Doplňující výsledkový obrázek 7).

Naše výsledky ukazují, že AZA indukuje expresi PU.1 v modelových buněčných liniích pro MDS (OCI-M2 a SKM-1) a zapíná PU.1 cílové geny myeloidní diference. Působení AZA rovněž v buňkách OCI-M2 a SKM-1 vyvolává zastavení proliferace a v menší míře i apoptózu.



Výsledkový obrázek 2.(A) Expres mRNA transkriptu PU.1 v buňkách OCI-M2 (vlevo) a SKM-1 (vpravo) v odpovědi na různé koncentrace AZA (neindukované buňky, 1 μ M, 2 μ M a 5 μ M AZA v konečné koncentraci pro buňky OCI-M2; neindukované buňky, 1 μ M a 5 μ M AZA v konečné koncentraci pro buňky SKM-1; AZA působil ve třech dávkách po dobu 72 hodin). Výsledky jsou normalizovány na průměr exprese genů HPRT1 a GAPDH. Procento buněk exprimujících pan-myeloidní znak CD11b (v tabulce pod grafy) bylo změřeno průtokovou cytometrií 120 hodin po přidání první dávky AZA. Chybové úsečky u

jednotlivých sloupců zobrazují velikost standardní chyby pro dva nezávislé experimenty. **(B)** Přenos proteinu a inkubace s protilátkou proti PU.1 (detekující specifický proužek proteinu o velikosti 37 kDa) v neindukovaných buňkách linií OCI-M2 a SKM-1 a v buňkách stejných linií ovlivněných působením 5 μ M AZA. (AZA působil ve třech dávkách po dobu 72 hodin). **(C)** Exprese mRNA transkriptů cílových genů PU.1 v modelových buněčných liniích pro MDS – OCI-M2 a SKM-1 – zobrazena v podobě tzv. tepelné mapy. Exprese je normalizována na hodnotu 0 pro neindukované buňky a její změna po působení AZA je vyjádřena jako ln takto normalizovaných hodnot (AZA v koncentraci 1 μ M působil ve třech dávkách 72 hodin). **(D)** Počet buněk v kultuře buněk OCI-M2 (vlevo) a SKM-1 (vpravo) v čase působení AZA v koncentracích 1 a 5 μ M (počet buněk je zobrazen na ose y jako poměr počtu buněk ovlivněných a neovlivněných AZA v daném čase). Koláčové grafy zobrazují velikost neapoptizujících (šedá barva), časně apoptotických (černá barva) a pozdně apoptotických (bílá barva) populací buněk OCI-M2 a SKM-1 (zobrazeno po působení AZA v koncentracích 1 a 5 μ M).

4.3 Vliv cytokinů stimulujících růst myeloidních buněk na účinek AZA v modelových buněčných liniích pro MDS a mechanismy působení cytokinů na úrovni chromatinu v regulačních oblastech genu PU.1

Předchozí studie ukázala, že G-CSF, cytokin stimulující růst granulocytů, potencuje zvýšení hladiny PU.1 a myeloidní diferenciaci v normálních lidských CD34+ progenitorech (Hu et al., 2010). Položil jsem si proto otázku, zda tato situace platí i v modelových buněčných liniích pro MDS. Použili jsme buňky OCI-M2, přičemž kromě G-CSF jsme testovali také případný pro-diferenční účinek cytokinů M-CSF a GM-CSF (Materiál a metody, kapitola 3.2.2). Cílem experimentu bylo určit, zda specifické stádium buněčného cyklu MDS progenitorů může vykazovat různou citlivost k účinkům vyvolaným různými cytokiny.

Zjistili jsme, že všechny cytokiny (G-CSF, M-CSF a GM-CSF) výrazně zvyšují demetylační účinek AZA (v koncentraci 5 μ M) v oblasti URE buněk OCI-M2 (Doplňující výsledkový obrázek 2). Dále jsme zjistili, že cytokiny M-CSF a GM-CSF potencují v buňkách OCI-M2 účinek AZA při zvýšení exprese mRNA transkriptů pro PU.1 a jeho cílový gen EGR2 (Výsledkový obrázek 3A).

Ačkoliv cytokiny M-CSF a GM-CSF zvyšovaly efekt působení AZA na expresi PU.1 u buněk OCI-M2, k navození efektivní diferenciaci na buněčné úrovni (demonstované změřením exprese CD11b průtokovou cytometrií) došlo pouze v buňkách ovlivněných působením GM-CSF společně s AZA (Výsledkový obrázek 3B).

Překvapivé bylo naše zjištění, že působení G-CSF v kombinaci s AZA v buněčné linii OCI-M2 spíše inhibuje indukci exprese PU.1 a EGR2 vyvolanou samotným AZA (Výsledkový obrázek 3A). Kombinace působení G-CSF a AZA rovněž vede u buněk OCI-M2 k inhibici exprese povrchové molekuly Cd11b, která představuje znak myeloidní diferenciaci.

Vliv cytokinu G-CSF na expresi PU.1, EGR2 (na úrovni mRNA) a na expresi CD11b (na úrovni proteinu) jsme obdobně testovali i na buňkách SKM-1, nicméně dosažené výsledky nebyly s to poskytnout jasnou odpověď na otázku, zda G-CSF v tomto buněčném modelu

potencuje nebo naopak inhibuje buněčnou diferenciaci (Výsledkový obrázek 3A; Výsledkový obrázek 3B).

U buněk OCI-M2 a SKM-1 jsme dále provedli analýzu vlivu cytokinů G-CSF, M-CSF a GM-CSF v kombinaci s AZA na proliferaci podle změny parametru počtu buněk v kultuře v čase působení cytokinu + AZA. Zjistili jsme, že působení jednotlivých cytokinů v kombinaci s AZA má na vývoj parametru počtu buněk v kultuře prakticky totožný efekt, resp. že působení cytokinů prakticky nijak neovlivňuje účinek AZA při zastavení buněčného dělení (Výsledkový obrázek 3C). Rovněž úroveň apoptózy se při srovnání mezi buňkami OCI-M2 a SKM-1 ovlivněnými působením AZA nebo působením AZA v kombinaci s jednotlivými, výše uvedenými cytokiny významně nelišila (Výsledkový obrázek 3C).

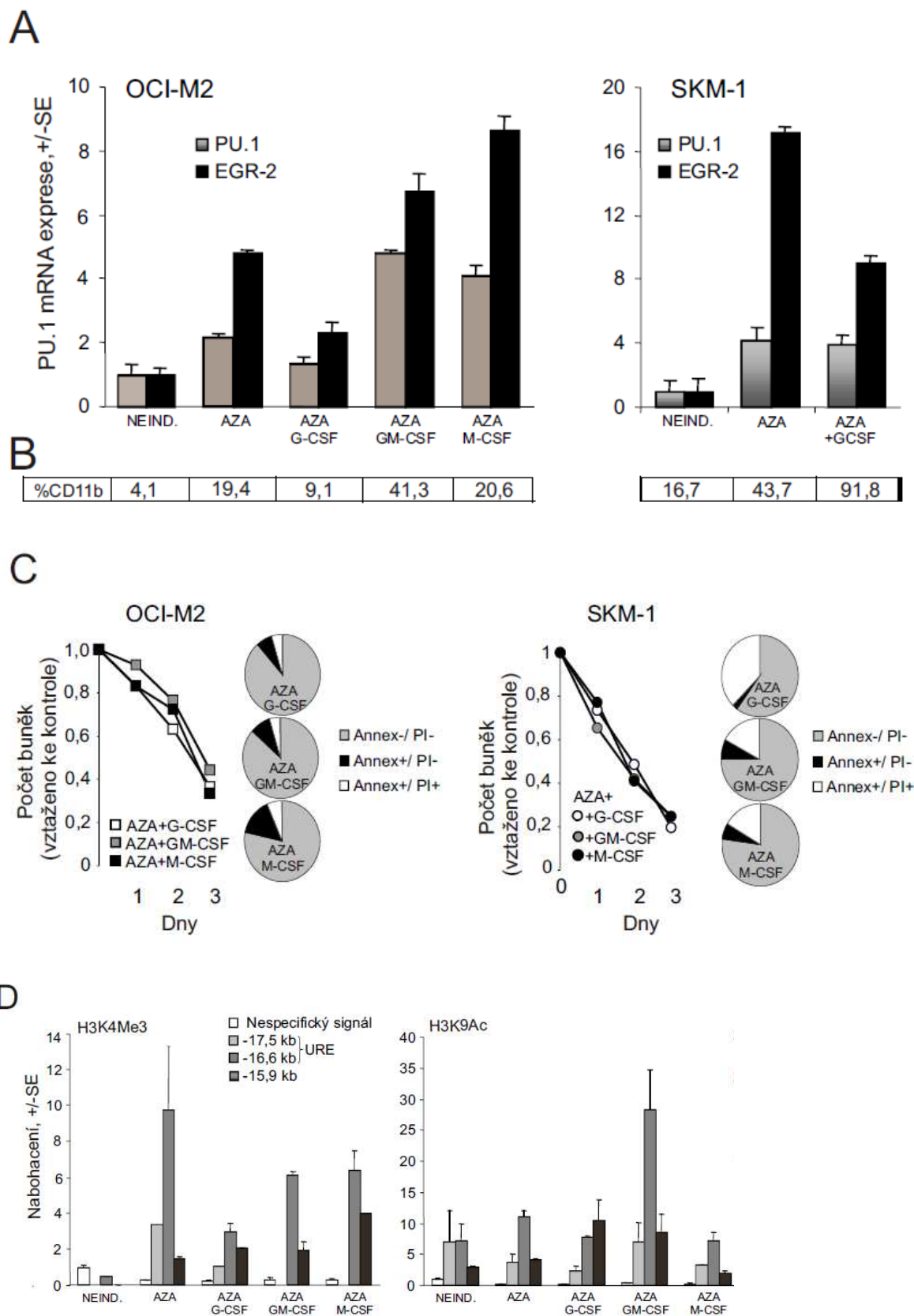
Abychom pochopili komplexní dopady, které má působení AZA v kombinaci s cytokiny na epigenetický stav chromatinu v oblasti URE, provedli jsme metodou chromatinové imunoprecipitace detailní analýzu zaměřenou na histonové modifikace v této oblasti. Jako model jsme nyní použili pouze buňky OCI-M2. Důvodem bylo to, že výsledky na nich dosažené nás vedly k jasnější představě o potencujícím či naopak inhibičním účinku působení jednotlivých cytokinů v kombinaci s AZA na expresi PU.1 a jeho cílových genů.

Použili jsme amplikony pokrývající URE a další pozitivní regulační oblasti genu PU.1 nacházející se před místem jeho transkripčního počátku (Obrázek 8). ChIP analýzou zaměřenou na aktivní chromatinovou značku – trimetylaci lysinu K4 na histonu H3 (H3K4Me3), jsme zjistili, že tato značka je po působení AZA nabohacena v oblasti URE. Kombinace působení AZA s GM-CSF a M-CSF přítomnost histonové modifikace H3K4Me3 v oblasti URE nijak zásadněji nezměnila, zatímco kombinace působení AZA s G-CSF výskyt této značky v oblasti URE oproti samotnému působení AZA snížila (Výsledkový obrázek 3D, levý panel) [Pro jasnější prezentaci výsledků je zobrazena přítomnost histonových modifikací pouze na třech namnožených úsecích DNA v oblastech -17,5; -16,6 a -15,9 kb před transkripčním počátkem genu PU.1. Přítomnost histonových modifikací na všech testovaných úsecích DNA je zobrazena v Doplňujícím obrázku 3].

Dále jsme se zaměřili na aktivační značku stavu chromatinu ve vztahu k transkripci – acetylaci lysinu 9 histonu H3 (H3K9Ac), na regulačních úsecích genu PU.1. Pouze

kombinace působení AZA a GM-CSF zvyšovala přítomnost H3K9Ac přímo v URE (-16,6 kb) (Výsledkový obrázek 3D, pravý panel).

Naše výsledky ukazují, že působení cytokinů stimulujících růst myeloidních kolonií na kulturu buněk OCI-M2 ovlivněnou působením AZA podtrhuje změny, které AZA vyvolává na úrovni demethylace DNA a histonových modifikací v regulačních oblastech genu PU.1 a ovlivňuje expresi PU.1 i diferenciaci na úrovni buněčného fenotypu.



Výsledkový obrázek 3. (A) Expresa mRNA transkriptů PU.1 a EGR2 v buňkách OCI-M2 (vlevo) a SKM-1 (vpravo) v odpověď na AZA v koncentraci 5 μ M působícího na buňky buď

samostatně nebo v kombinaci s určitým cytokinem (G-CSF; GM-CSF a M-CSF) (AZA resp. AZA v kombinaci s cytokinem působil ve třech dávkách po dobu 72 hodin). Výsledky jsou normalizovány na průměr exprese genů HPRT1 a GAPDH. Chybové úsečky u jednotlivých sloupců zobrazují velikost standardní chyby pro dva nezávislé experimenty. **(B)** Procento buněk exprimujících pan-myelodinií znak CD11b (v tabulce pod grafy) bylo změřeno průtokovou cytometrií 120 hodin po přidání první dávky AZA. **(C)** Počet buněk v kultuře buněk OCI-M2 (vlevo) a SKM-1 (vpravo) v čase působení AZA v koncentraci 5 μ M v kombinaci s určitým cytokinem (počet buněk je zobrazen na ose y jako poměr počtu buněk ovlivněných a neovlivněných AZA v daném čase). Koláčové grafy zobrazují velikost neapoptizujících (šedá barva), časně apoptotických (černá barva) a pozdně apoptotických (bílá barva) populací buněk OCI-M2 a SKM-1 (zobrazeno po působení AZA v koncentraci 5 μ M v kombinaci s určitým cytokinem). **(D)** Analýza přítomnosti určitých modifikací histonu H3 asociujících s transkripčně aktivním chromatinem (H3K4Me3; H3K9Ac) v buňkách OCI-M2. Analýza byla provedena metodou chromatinové imunoprecipitace na třech nezávislých úsecích DNA nad místem transkripčního počátku genu PU.1 (Kapitola 3.2.6). Na ose x je charakterizován určitý druh působení na buňky OCI-M2 (žádné působení, působení AZA v koncentraci 5 μ M a působení AZA v koncentraci 5 μ M v kombinaci s určitým cytokinem). Údaj „nabohacení“ zobrazený na ose y ukazuje relativní přítomnost příslušných modifikací histonu H3 se zobrazenou standardní chybou vypočítanou pro dva nezávislé experimenty. Nespecifický signál imunoprecipitace pro každou buněčnou kulturu je zobrazen v podobě prázdných sloupců.

4.4 Odpověď CD34+ progenitorů získaných od pacientů s MDS na AZA a stimulaci cytokinem G-CSF

Z údajů získaných na buněčném modelu OCI-M2 (a SKM-1) vyplývá, že AZA působí jako silný prostředek obnovující myeloidní diferenciační potenciál těchto buněk a že jeho účinek může být dále ovlivněn působením cytokinů.

Na základě těchto výsledků jsem se rozhodl studovat působení AZA a cytokinů (G-CSF) přímo na vzorcích CD34+ progenitorů získaných od pacientů s MDS se středním-II/vysokým rizikem. Náš zájem o práci na těchto vzorcích se soustředil na objasnění detailních procesů účinku AZA na úrovni chromatinové struktury a genové exprese. Dále nás zajímalo určení *in vitro* odpovědi na působení AZA v kombinaci se stimulačním cytokinem G-CSF (jeho výběr pro tyto experimenty je rozebrán v Diskuzi).

Použili jsme pro tyto studie progenitorové buňky izolované *ex vivo* z kostní dřeně pacienta P302, 67-letého muže s MDS RAEB II (WHO), IPSS-střední-2 riziko. Pacient měl anemii se závislostí na transfuzích (4 TU/měsíc), neutropenií a nález 10% blastů v kostní dřeni (fenotypově charakterizovaných jako CD33+ CD34+ CD117+ HLADR+ CD45+). Blasty byly detekovatelné pomocí průtokové cytometrie také v periferní krvi. Vedle vzorku P302 jsme rovněž použili vzorek buněk pacienta P301 (69-letý muž s RAEB II) (Klinické údaje obou pacientů viz Tabulka 6).

Pacienti resp. vzorky P302 i P301 se podle exprese PU.1 v CD34+ progenitorech řadili do skupiny se střední/vysokou hladinou PU.1. Ačkoliv exprese PU.1 nebyla výrazně potlačena, CD34+ progenitory vykazovaly určité známky DNA metylace v oblasti URE. Pacient P302 vykazoval metylaci DNA na CpG ostrůvcích 2, 5, 7 a 10 (Výsledkový obrázek 4A). Důležitým zjištěním bylo, že exprese mRNA transkriptu PU.1 v buňkách ze vzorku P302 se působením AZA zvýšila zhruba o 30%, přičemž tento efekt jsme pozorovali jak v populaci všech izolovaných mononukleárních buněk z kostní dřeně, tak na průtokovým cytometrem vyříděných populacích CD34+ progenitorů (Výsledkový obrázek 4B). Exprese PU.1 v buňkách ze vzorku P301 se ve vyříděné CD34+ populaci působením AZA zvýšila zhruba o 10% (Doplňující výsledkový obrázek 4). Ke zvýšení exprese PU.1 působením AZA o zhruba

30% došlo rovněž ve vytríděných CD11b+ buňkách pacienta P301 (nikoliv však P302), které vykazují vyšší stupeň myeloidní diferenciaci (Doplňující výsledkový obrázek 4).

Zjistili jsme, že účinek AZA na zvýšení exprese PU.1 na úrovni mRNA byl zesílen působením G-CSF. I tento potencující efekt G-CSF jsme pozorovali jak v populaci všech izolovaných mononukleárních buněk z kostní dřeně, tak na průtokovým cytometrem vytríděných populacích CD34+ progenitorů a CD11b+ buněk vykazujících vyšší stupeň myeloidní diferenciaci (Výsledkový obrázek 4B; Doplňující výsledkový obrázek 4). Také exprese CSF1R, cílového genu PU.1, byla v progenitorech ze vzorku pacienta P302 po působení AZA resp. AZA + G-CSF zvýšena zhruba o 60% (Výsledkový obrázek 4C vlevo).

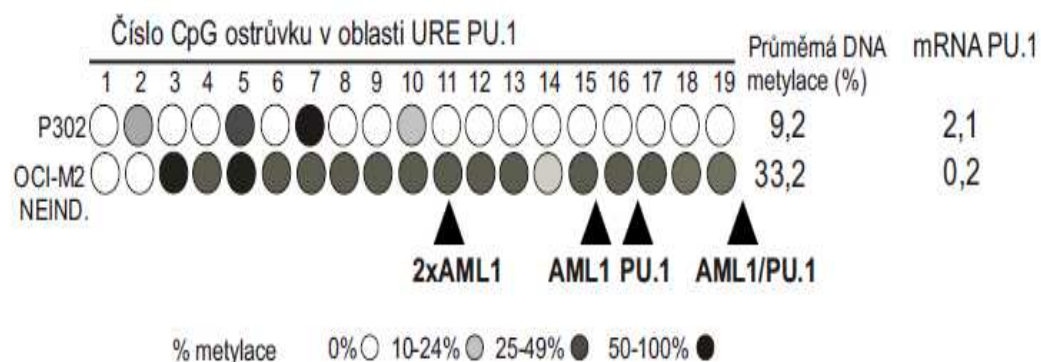
Zatímco působením samotného AZA se v buňkách progenitorů zvýšila exprese KIT, což je známý znak kmenových buněk, inkubace progenitorů s AZA v kombinaci G-CSF naopak expresi KIT významně snižuje (Výsledkový obrázek 4C vpravo). Tento jev jsme pozorovali rovněž u buněk OCI-M2 (Výsledkový obrázek 4D). Experimenty s využitím průtokové cytometrie ukázaly, že po působení AZA v kombinaci s G-CSF došlo u vzorku mononukleárních buněk kostní dřeně pocházejících od pacienta P302 k poklesu populace CD34+ buněk a nárůstu populace CD11b+ buněk (Výsledkový obrázek 4E). Zvýšenou expresi CD11b po působení AZA v kombinaci s G-CSF jsme pozorovali rovněž u buněk z kostní dřeně pacienta P301 (Doplňující výsledkový obrázek 6).

Analýza procesů na úrovni chromatinu (pomocí metody chromatinové imunoprecipitace) naznačuje, že v oblasti URE se v CD11b+ buňkách izolovaných z kostní dřeně pacientů P302 a P301 po působení AZA významným způsobem mění uspořádání histonových modifikací: dochází k nabohacení známky transkripčně aktivního chromatinu H3K9Ac (Výsledkový obrázek 4F vlevo, Doplňující výsledkový obrázek 6) a k poklesu známky transkripčně utlumeného chromatinu H3K9Me3 (Výsledkový obrázek 4F vpravo). K těmto změnám dochází simultánně s derepresí genu PU.1 a rozsah těchto změn na úrovni chromatinu po působení AZA je dále zesílen působením G-CSF (Výsledkový obrázek 4F, Doplňující výsledkový obrázek 6).

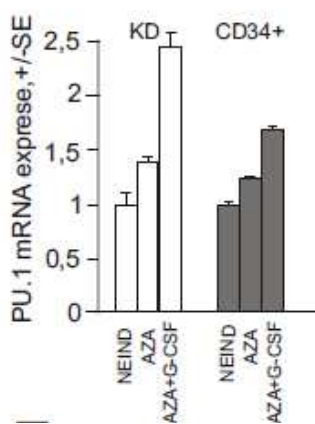
Naše výsledky získané v primárních CD34+ progenitorech z kostní dřeně pacientů s MDS ukazují, že AZA navozuje v těchto buňkách zvýšení exprese PU.1 a jeho cílových genů. Účinek působení AZA může být dále potencován působením cytokinu G-CSF, který vedle

zesílení pro-diferenciačních efektů AZA zároveň potlačuje spouštění „kmenových“, pluripotentních genů (KIT) vyvolané AZA.

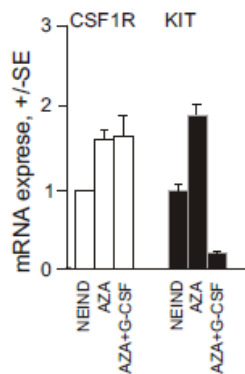
A



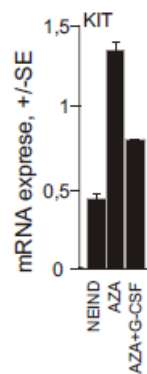
B



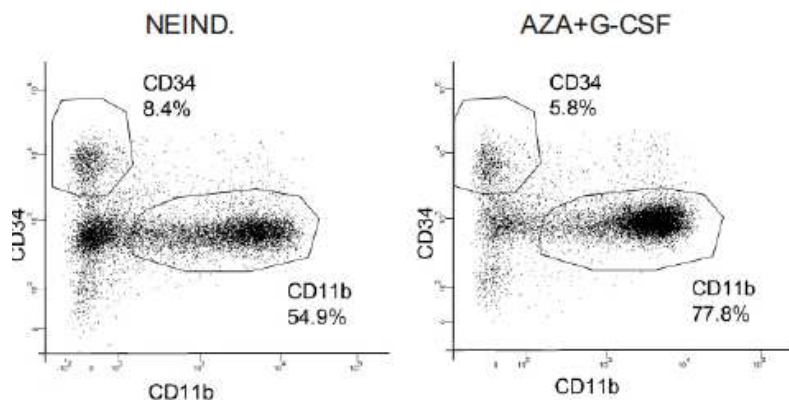
C



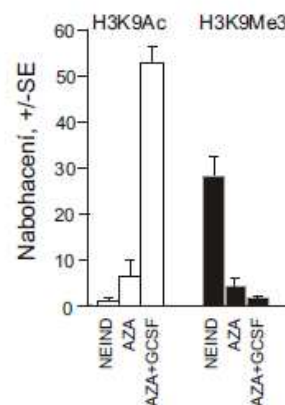
D



E



F



Výsledkový obrázek 4. (A) Analýza DNA metylace v oblasti URE a exprese mRNA transkriptu PU.1 v CD34⁺ buňkách získaných z pacienta s MDS (vzorek P302, klinické údaje

viz Tabulka 6) a v buňkách OCI-M2. **(B)** Primární buňky pacienta s MDS (P302) izolované *ex vivo* na které působil AZA v koncentraci 1 μ M nebo AZA ve stejné koncentraci v kombinaci s cytokinem G-CSF. Exprese mRNA transkriptu PU.1 byla změřena jednak ve všech primárních mononukleárních buňkách izolovaných z kostní dřeně (bílé sloupce), tak rovněž v populaci vytříděných CD34+ progenitorů z této kostní dřeně (šedé sloupce). Chybové úsečky u jednotlivých sloupců zobrazují velikost standardní chyby pro dva nezávislé experimenty. **(C)** Exprese mRNA transkriptů pro CSF1R (bílé sloupce) a KIT (tmavé sloupce) po působení AZA nebo AZA v kombinaci s cytokinem G-CSF na CD34+ progenitory izolované ze vzorku odebrané kostní dřeně pacienta P302. Chybové úsečky u jednotlivých sloupců zobrazují velikost standardní chyby pro dva nezávislé experimenty. **(D)** Exprese mRNA transkriptu KIT v buňkách OCI-M2, které byly nebo nebyly ovlivněny působením AZA v koncentraci 1 μ M případně působením AZA ve stejné koncentraci v kombinaci s G-CSF. Chybové úsečky u jednotlivých sloupců zobrazují velikost standardní chyby pro dva nezávislé experimenty. **(E)** Analýza zastoupení populací buněk exprimujících povrchové molekuly CD34 a CD11b ve vzorku mononukleárních buněk izolovaných z kostní dřeně pacienta s MDS (P302). Analýza byla provedena na průtokovém cytometru s využitím protilátek proti CD34 a CD11b na buňkách, které buď nebyly ovlivněny působením AZA, nebo byly ovlivněny působením AZA v koncentraci 1 μ M v kombinaci s G-CSF. **(F)** Analýza změny přítomnosti modifikací histonu H3 asociujících s transkripčně aktivním chromatinem (H3K9Ac – světlé sloupce) nebo naopak transkripčně represivní strukturou chromatinu (H3K9Me3 – tmavé sloupce) v závislosti na působení AZA resp. AZA v kombinaci s G-CSF. Analýza byla provedena metodou chromatinové imunoprecipitace na oblasti URE (lokalizované -16,6 kb před místem transkripčního počátku genu PU.1) v CD11b+ buňkách izolovaných ze vzorku buněk kostní dřeně pacienta P302. Chybové úsečky u jednotlivých sloupců zobrazují velikost standardní chyby pro dva nezávislé experimenty.

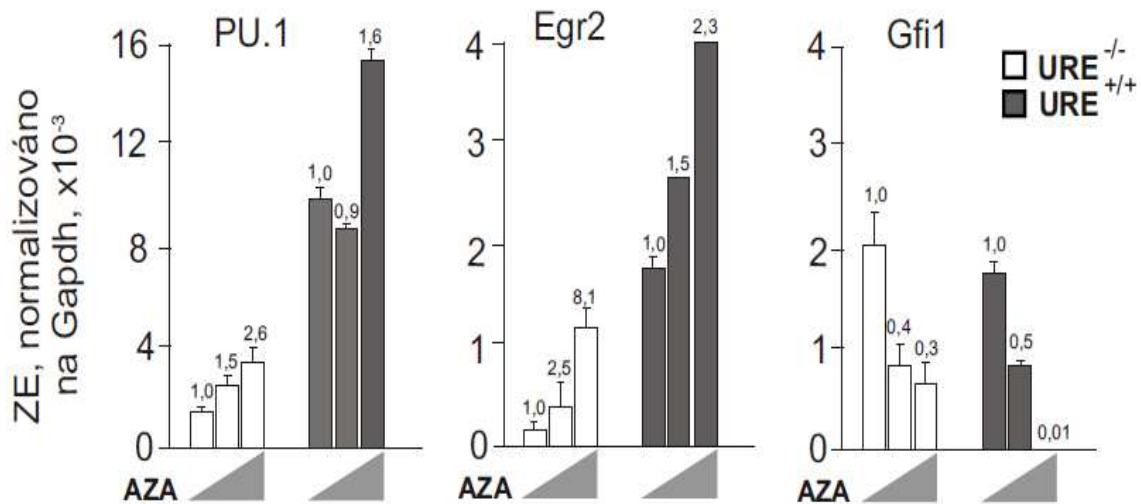
4.5 Význam oblasti URE pro působení AZA na hladinu exprese PU.1

Výše uvedené výsledky ve svém souhrnu ukazují na zásadní význam regulační oblasti URE jako místa děje řady vzájemně provázaných epigenetických procesů, v jejichž důsledku AZA zvyšuje expresi genu PU.1. Položil jsem otázku, zda je tato oblast pro zvýšení exprese PU.1 působením AZA nepostradatelná, respektive zda k zvýšení exprese PU.1 vlivem AZA dochází výhradně skrze působení AZA na chromatinovou strukturu v oblasti URE.

Odpověď na položenou otázku jsme hledali za využití modelu mutantních myší s deletovanou oblastí URE ($URE^{-/-}$) (Materiál a metody, kapitola 3.1.15). Jak bylo již dříve popsáno, u těchto myší se kvůli snížení exprese mRNA transkriptu PU.1 o 80% vyvíjí AML. Progenitory pocházející z kostní dřeně myší s AML byly magneticky selektovány na c-kit+ populaci tak, jak bylo již dříve popsáno (Rosenbauer et al., 2004). Buňky progenitorů byly *in vitro* stimulovány AZA a následně jsme v nich změřili hladinu mRNA genu PU.1, stejně jako hladinu mRNA genů Egr2 a Gfi1 (Výsledkový obrázek 5).

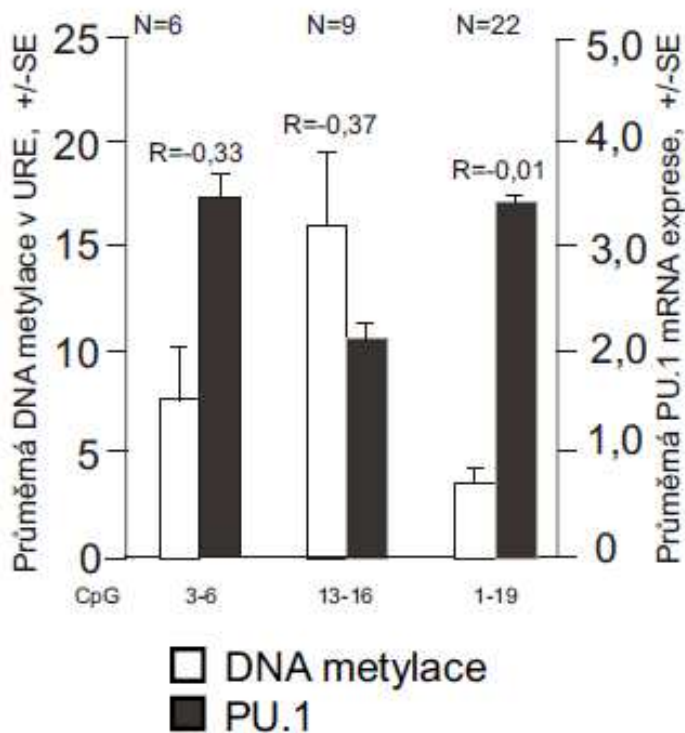
Získané údaje potvrzují, že hladina PU.1 v blastech AML v myši $URE^{-/-}$ je zhruba pětikrát nižší ve srovnání s hladinou PU.1 v c-kit+ progenitorech získaných z kostní dřeně zdravé, kontrolní myši (bez delece URE). Překvapivé nicméně bylo, že v nepřítomnosti URE došlo po stimulaci buněk AZA k indukci exprese PU.1 v závislosti na dávce v relativně podobném poměru jako u progenitorů ze zdravého zvířete. Různé hladiny PU.1 se promítaly také do změny exprese genů Egr2 a Gfi1 ve stejných vzorcích (Výsledkový obrázek 5).

Naše výsledky ukazují, že ačkoliv je funkční oblast URE nezbytně nutná pro zajištění „normální“ hladiny PU.1 v buňce a pro manipulaci s touto „normální“ hladinou působením AZA, není už nepostradatelná pro dosažení jakéhokoliv efektu zvýšení hladiny PU.1 působením AZA na buňky AML. Účinek působení AZA při zvýšení exprese PU.1 je tedy kromě URE pravděpodobně závislý i na jiných regulačních oblastech genu PU.1, případně na dalších mechanismech.

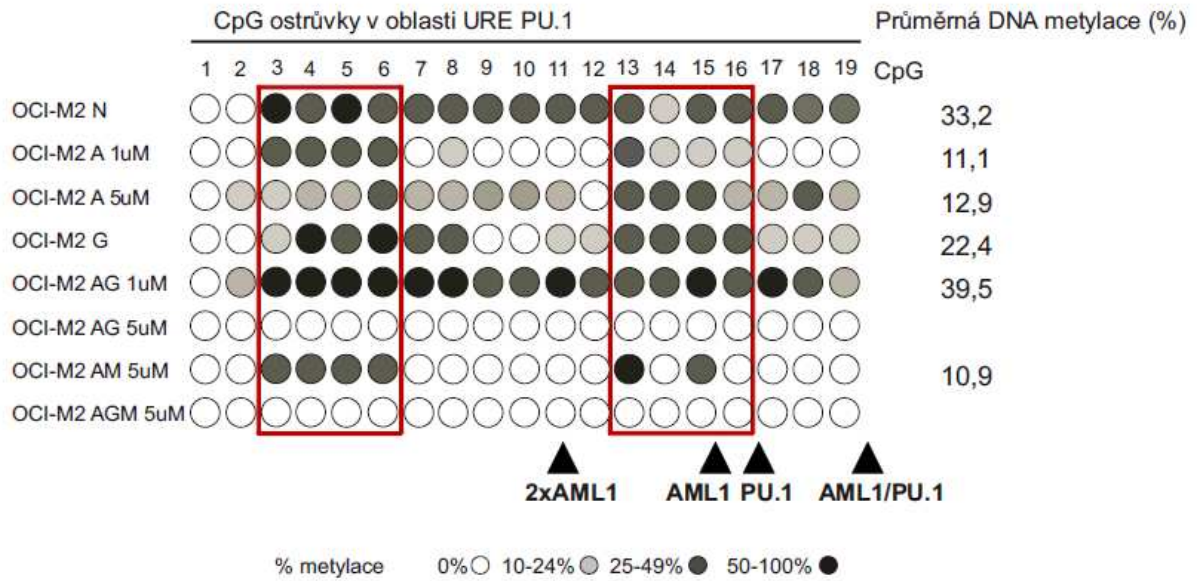


Výsledkový obrázek 5. Expres mRNA transkriptů PU.1, Egr2 a Gfi1 v c-kit+ buňkách izolovaných ex-vivo z myši s deletovanou regulační oblasti URE (^{URE-/-}; světlé sloupce) popsanou v odborné literatuře (Rosenbauer et al., 2004) nebo z normální, kontrolní myši (tmavé sloupce). Expres byla měřena v buňkách neovlivněných AZA, nebo v buňkách ovlivněných působením AZA v koncentracích 1 a 5 μM (ve třech dávkách po dobu 72 hodin). Na ose y je zobrazena změna exprese (ZE) jako násobek hodnoty exprese dosažené v buňkách neovlivněných působením AZA (jejich exprese byla normalizována na hodnotu = 1). Expres byla normalizována na hodnotu exprese myšního genu Gapdh. Hodnota exprese mRNA transkriptů vyjádřená jako násobek exprese v buňkách neovlivněných AZA je vyznačena nad každým sloupcem.

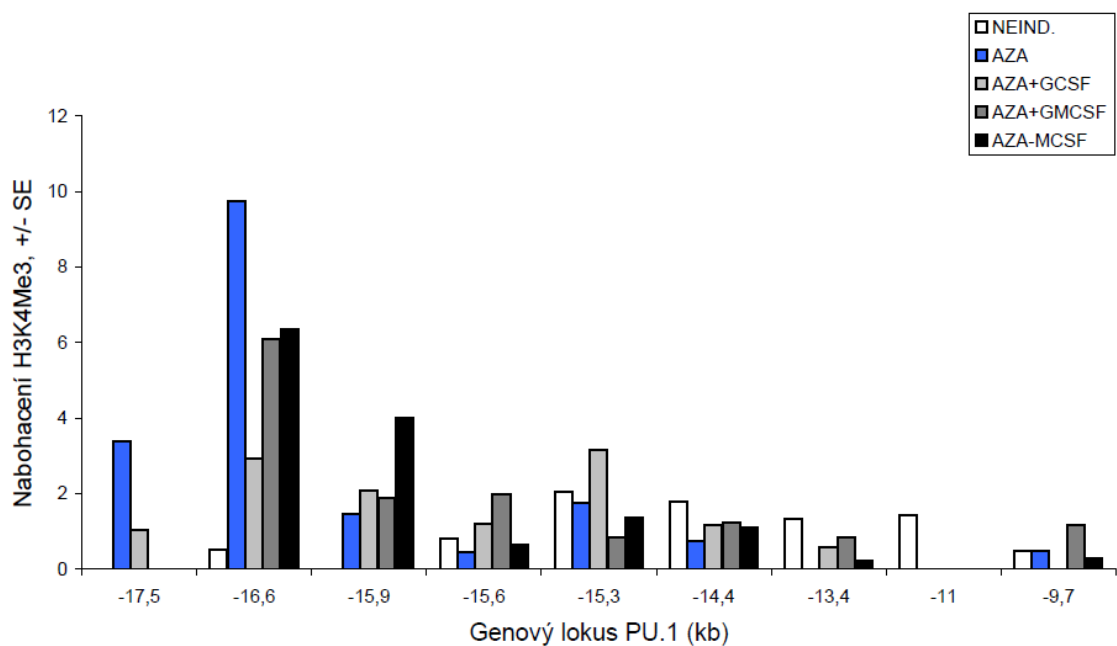
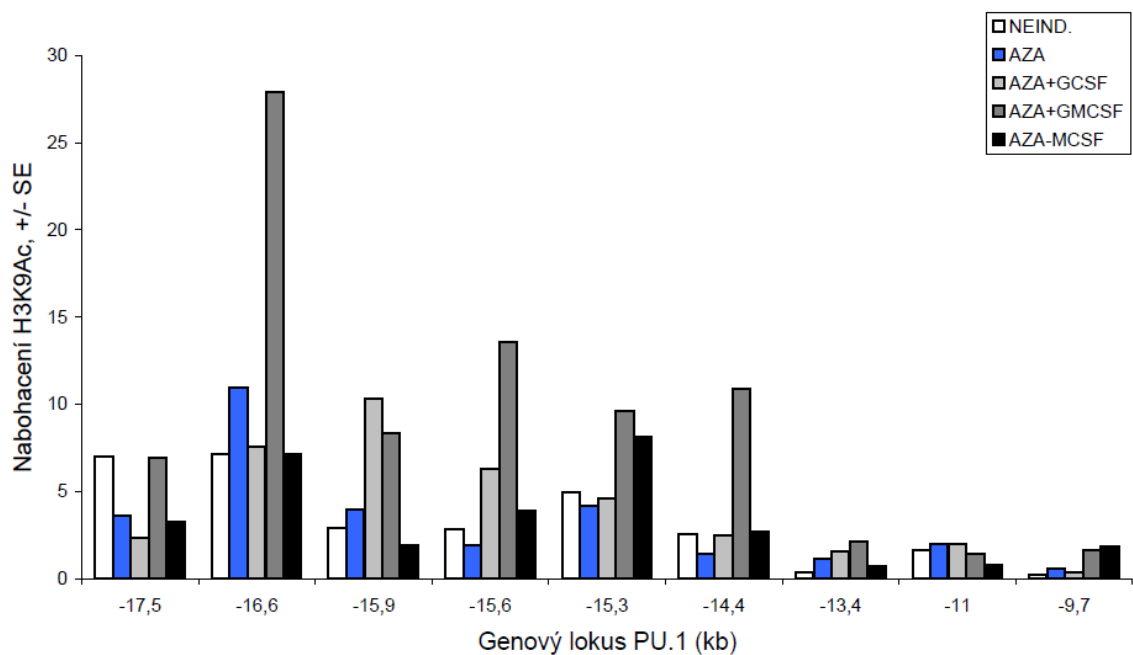
4.6 Dopňující výsledkové obrázky



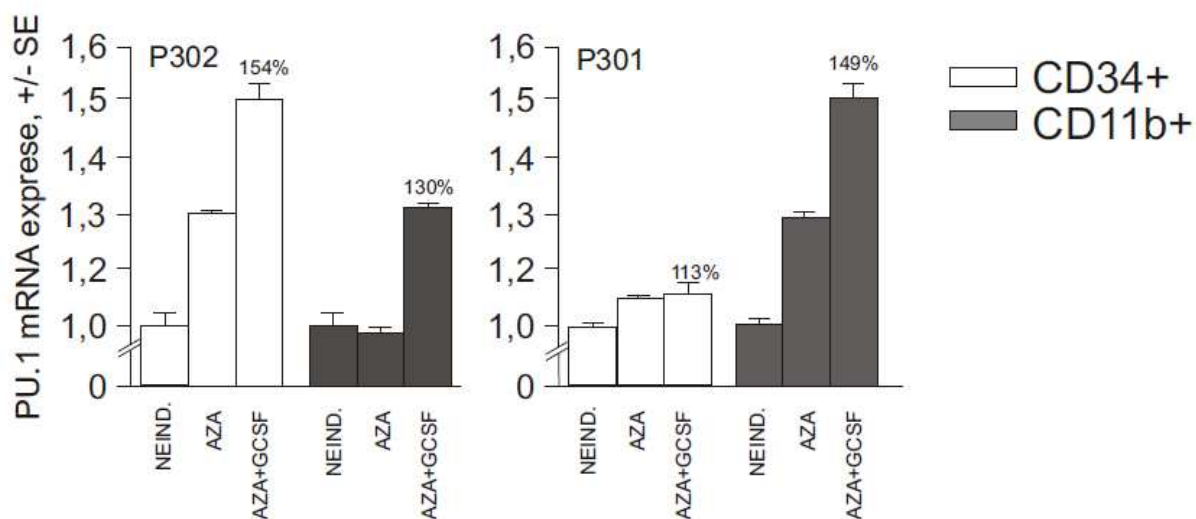
Doplňující výsledkový obrázek 1. Korelační analýza mezi průměrnou DNA metylací na různých skupinách CpG ostrůvků v oblasti URE (zobrazena jako světlé sloupce s hodnotami vyznačenými na ose y vlevo) a průměrnou expresí mRNA transkriptu PU.1 (zobrazena jako tmavé sloupce s hodnotami vyznačenými na ose y vpravo) v souboru pacientů s MDS s vyšším rizikem. Na ose X je vyznačena skupina CpG ostrůvků, ke které se dané údaje vztahují. Faktor korelace nad sloupci je uveden ke každému testovanému vztahu.



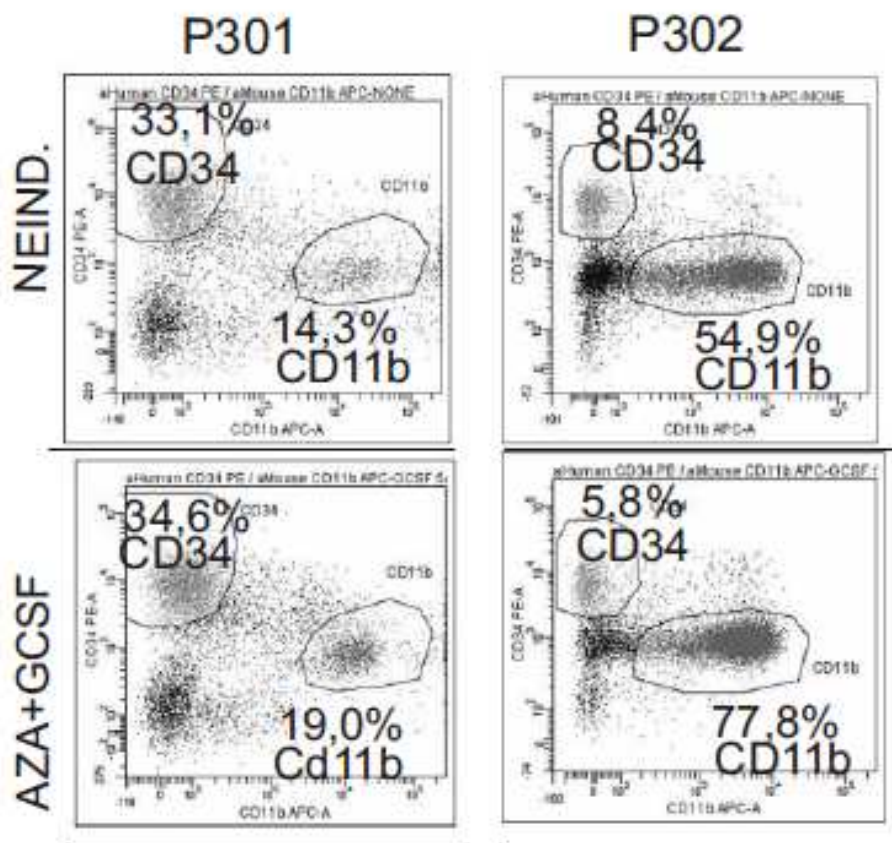
Doplňující výsledkový obrázek 2. Průměrná metylace DNA na CpG ostrůvcích (1-19) v oblasti URE buněk OCI-M2. Oblasti CpG 3-6 a 13-16 jsou vyznačeny z toho důvodu, že úroveň metylace v těchto oblastech je nejvyšší. Buňky OCI-M2 byly vystaveny působení AZA v koncentracích 1 a 5 μM , působení samotného G-CSF, působení AZA v koncentracích 1 a 5 μM v kombinaci s G-CSF, působení AZA v koncentraci 5 μM v kombinaci s M-CSF a působení AZA v koncentraci 5 μM v kombinaci s působením GM-CSF. Černé trojúhelníky pod osou x představují vazebná místa pro transkripční faktory PU.1 a AML1 v oblasti URE.



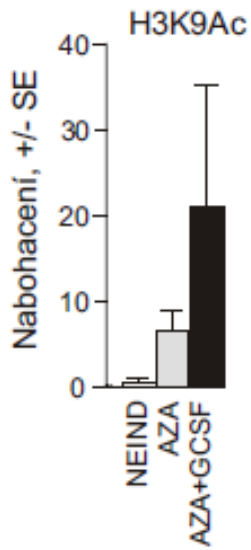
Doplňující výsledkový obrázek 3. Analýza přítomnosti modifikací histonu H3 asociujících s transkripčně aktivním chromatinem (H3K4Me3; H3K9Ac) v buňkách OCI-M2. Analýza byla provedena metodou chromatinové imunoprecipitace na devíti nezávislých úsecích DNA nad místem transkripčního počátku genu PU.1 (Kapitola 3.2.6), které jsou popsány na ose X. Jednotlivé sloupce charakterizují určitý druh působení na buňky OCI-M2 (žádné působení, působení AZA v koncentraci 5 μ M a působení AZA v koncentraci 5 μ M v kombinaci s určitým cytokinem). Údaj „nabohacení“ zobrazený na ose Y ukazuje relativní přítomnost příslušných modifikací histonu H3.



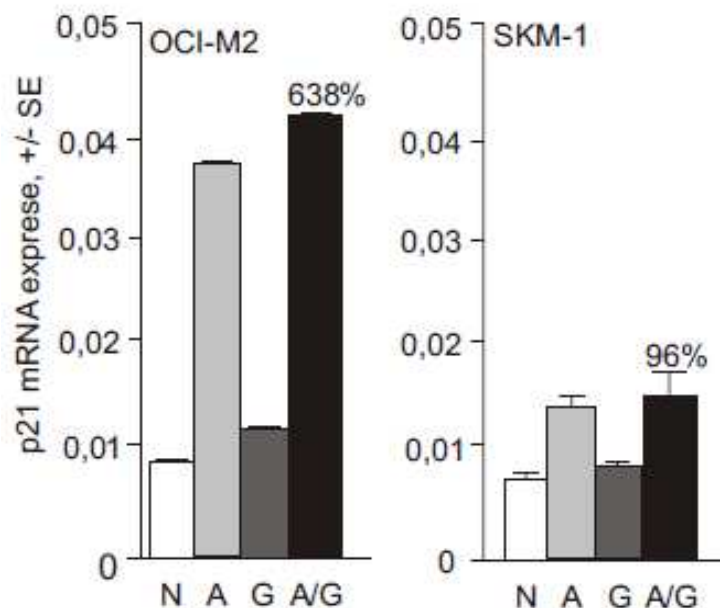
Doplňující výsledkový obrázek 4. Primární buňky pacientů s MDS (P302 a P301) izolované *ex vivo* na které působil AZA v koncentraci 1 μ M nebo AZA ve stejné koncentraci v kombinaci s cytokinem G-CSF. Expresce mRNA transkriptu PU.1 byla změřena jednak v populaci vytřídněných CD34+ progenitorů z kostní dřeně pacientů (vlevo, bílé sloupce), tak i v populaci vytřídněných CD11b+ buněk z téže kostní dřeně (vpravo, tmavé sloupce). Chybové úsečky u jednotlivých sloupců zobrazují velikost standardní chyby pro dva nezávislé experimenty. Číselný údaj ukazuje změnu exprese mRNA transkriptu PU.1 v buňkách ovlivněných působením AZA v kombinaci s G-CSF oproti buňkám, které nebyly nijak ovlivněny (v procentech).



Doplňující výsledkový obrázek 5. Analýza zastoupení populací buněk exprimujících povrchové molekuly CD34 a CD11b ve vzorku mononukleárních buněk izolovaných z kostní dřeně pacientů s MDS (P301 vlevo; P302 vpravo). Analýza byla provedena na průtokovém cytometru s využitím protilátek proti CD34 a CD11b na buňkách, které buď nebyly ovlivněny působením AZA, nebo byly ovlivněny působením AZA v koncentraci 1 μ M v kombinaci s G-CSF.



Doplňující výsledkový obrázek 6. Analýza změny přítomnosti acetylace lysinu 9 histonu H3 asociujících s transkripčně aktivním chromatinem v závislosti na působení AZA resp. AZA v kombinaci s G-CSF. Analýza byla provedena metodou chromatinové imunoprecipitace na oblasti URE (lokalizované -16,6 kb před místem transkripčního počátku genu PU.1) v CD11b+ buňkách izolovaných ze vzorku kostní dřeně pacienta P301. Chybové úsečky u jednotlivých sloupců zobrazují velikost standardní chyby pro dva nezávislé experimenty.



Doplňující výsledkový obrázek 7. Expres mRNA transkriptu p21 (CDKN1A) normalizovaná na gen GAPDH v modelových buněčných liniích pro MDS (OCI-M2, SKM-1) Popis pod osou x se vztahuje ke způsobu, jakým byly buňky ovlivněny: nebylo na ně působeno (N); bylo na ně působeno AZA v koncentraci 1 μ M (A); bylo na ně působeno G-CSF (G); bylo na ně působeno AZA v koncentraci 1 μ M v kombinaci s G-CSF (A/G). Chybové úsečky představují standardní chybu pro průměry ze dvou nezávislých experimentů. Číslo nad sloupcem A/G představuje zvýšení exprese mRNA transkriptu p21 proti stavu v ned indukovaných buňkách (udávané v procentech).

5. DISKUZE

MDS je onemocnění, které se vyznačuje vysokou rozmanitostí svého patofyziologického projevu a průběhu. Tato skutečnost má nepochybně svůj molekulárně biologický základ. V současnosti používané systémy klasifikace MDS a hodnocení rizika jeho prognózy nepochybně představovaly a stále představují velice cenný nástroj pro klinickou praxi léčby a prognostiky MDS. Tyto systémy jsou nicméně koncepčně postaveny převážně na hodnocení různých morfologických aspektů nemoci, systematicky utříděných v 80. letech, s postupným zvyšováním významu cytogenetického nálezu pro hodnocení vývoje prognózy MDS. Jejich slabinou je, že plně neodráží molekulární a epigenetickou heterogenitu u jednotlivých pacientů, třebaže výzkum v posledních deseti letech odhalil právě na této rovině řadu významných, nezávisle působících faktorů asociovaných jak s prognózou onemocnění tak s odpovědí na léčbu (Kosmider et al., 2009; Tran et al., 2011). V klinické praxi se tato slabina projevuje v tom, že i v rámci skupin vytvořených na základě hodnocení rizika prognózy v systému IPSS přetrvávají signifikantní rozdíly v průběhu onemocnění u jednotlivých pacientů (Valent et al., 2007). Existují samozřejmě relevantní snahy zdokonalit hodnotící systém IPSS zpřesněním prognostického významu konkrétních stavů popsatelných v rámci jeho stávajících kategorií, jako je např. cytogenetický nálezu (Schanz et al., 2012). Ani případné úspěchy těchto snah však podle mého názoru nezpochybnují nutnost budoucí integrace takových faktorů, jako je hladina exprese určitých genů, jejich mutace a metylace DNA v jejich regulačních oblastech, do systému hodnocení prognostického rizika MDS, neboť tato potřeba se v rámci klinické praxe ukazuje stále naléhavěji již dnes (Mittelman et al., 2010).

Tato práce z tohoto způsobu uvažování vychází a studuje roli transkripčního faktoru PU.1 v MDS a jeho případné vztahy ke klinické praxi. Důvody zaměření na studium PU.1 byly již podrobněji popsány a souvisí s faktem, že PU.1 je klíčový pro-diferenční faktor v krvetvorbě a podstatou MDS je právě porucha diferenciace krevních buněk. Nízká hladina exprese PU.1 je navíc asociována se vznikem AML (Mueller et al., 2002; Mueller et al., 2006; Metcalf et al., 2006), přičemž MDS zhruba ve třetině případů progreduje právě do AML (viz Hypotéza a cíle dizertační práce; kapitola 2). Zjistili jsme, že exprese mRNA transkriptu genu

PU.1 u pacientů s MDS s vyšším rizikem vykazuje známky značné variability, což opět dokládá skutečnost, že MDS je i na molekulární úrovni vysoce heterogenní onemocnění (Jiang et al., 2009; Huh et al., 2009). Průměrná exprese PU.1 u pacientů s MDS a u zdravých kontrol však přitom byla téměř totožná. Zjistili jsme, že pacienti léčení AZA, jejichž hladina exprese PU.1 vykazovala před začátkem léčby velmi nízkou úroveň, měli ve srovnání s pacienty se střední a vyšší hladinou PU.1 v buňkách progenitorů z kostní dřeně výrazně kratší dobu přežití (Výsledkový obrázek 1B). Výsledky jiné skupiny ukázaly, že hladiny PU.1 v buňkách z kostní dřeně pacientů s MDS s nízkým a s vysokým rizikem podle IPSS se statisticky významně neliší (jsou však signifikantně nižší u pacientů s MDS s nízkým počtem blastů v kostní dřeni ve srovnání s pacienty s benigním onemocněním krvetvorby) (Huh et al., 2009). To by naznačovalo, že hladina exprese PU.1 představuje významný prognostický faktor (ve vztahu k léčbě MDS pomocí AZA), který přitom není asociován s kategoriemi „rizika“ prognózy MDS vytvořenými v rámci IPSS.

Hladina PU.1 je spojována s pro-diferenčiací a apoptotickým účinkem Decitabinu, což je deoxy-analog AZA, v buňkách K562 představujících model lidské myeloidní leukémie. Výše hladiny PU.1 v buňkách K562 pozitivně koreluje se schopností Decitabinu navodit v těchto buňkách apoptosu a/nebo buněčnou diferenciaci (Aoyama et al., 2012). To by mohlo představovat analogickou situaci k námi pozorovanému vlivu hladiny PU.1 na působení AZA v buňkách progenitorů pacientů s MDS, kde by případná indukce diferenciaci/apoptózy asociovala s dobrou prognózou resp. s delší dobou přežití při léčbě s AZA. Je ovšem třeba brát v úvahu, že působení AZA a působení Decitabinu v modelových buněčných liniích pro AML se neukázalo být zcela identické (Hollenbach et al., 2010).

Hladina PU.1 v progenitorech izolovaných z pacientů s MDS s vyšším rizikem jeví trend negativní korelace k metylaci DNA v určitém úseku regulační oblasti URE. Metylaci DNA inhibující genovou expresi byla v MDS zjištěna u několika genů hrajících roli ve Wnt signalizaci (*FZD9*) a v kontrole buněčného cyklu (*p15*, *p16*) (Jiang et al., 2009; Rodrigues et al., 2010). Stupeň metylace koreloval s progresí onemocnění a v případě genu *FZD9* zároveň negativně koreloval s hladinou genové exprese (Jiang et al., 2009). Co je ještě zajímavější, úroveň metylace genu *p15* má prediktivní hodnotu ve vztahu k reakci pacientů s MDS/AML na léčbu AZA, kdy pacienti dosahující odpovědi na léčbu mají méně metylovanou DNA ve srovnání s pacienty, kteří na léčbu AZA neodpovídají (Raj et al., 2007). Naše výsledky ukazující aberantní zvýšenou metylaci v oblasti URE u (některých) pacientů s MDS s vyšším

rizikem a v modelové buněčné linii pro MDS, OCI-M2, lze srovnat s pozorováním aberantně zvýšené metylace URE u pacientů s mnohočetným myelomem, kde nízká hladina exprese PU.1 rovněž asociuje se špatnou prognózou onemocnění (Tatetsu et al., 2007).

Expese PU.1 nebyla v žádné korelaci s celkovou metylací všech námi testovaných 19 CpG ostrůvků v oblasti URE, ale pouze s metylací CpG ostrůvků ve dvou oblastech, kde dosahovala nejvyšších hodnot: CpG ostrůvků 3-6 a zejména CpG ostrůvků 13-16 (Doplňující výsledkový obrázek 1). V oblasti CpG ostrůvků 13-16 se nacházejí vazebná místa pro transkripční faktory PU.1 (auto-regulativní) a AML. Oblast URE byla původně popsána jako klíčový pozitivní regulační element, jehož delece vede ke ztrátě 80% exprese PU.1 (Rosenbauer et al., 2004). Další práce nicméně ukázaly, že stejného efektu jako delecí URE lze docílit kombinovanou mutací vazebných míst pro AML včetně vazebného místa v oblasti CpG ostrůvků 13-16 (Huang et al., 2008), zatímco jiné části funkční oblasti URE se naopak účastní fyziologického snižování hladiny PU.1 (Rosenbauer et al., 2006). Skutečnost, že nikoliv metylace dlouhých úseků DNA, ale metylace pouze několika málo „klíčových“ CpG ostrůvků může hrát zásadní roli pro stanovení hladiny genové exprese, ukázal také vztah metylace na jediném CpG ostrůvku v promotoru genu *FZD9* k vyšší hladiny jeho mRNA v buňce (a k progresi onemocnění MDS) (Jiang et al., 2009).

Na základě námi zjištěných údajů o vztahu exprese mRNA transkriptu PU.1 k odpovědi pacientů na léčbu AZA, vztahu metylace v oblasti URE k expresi PU.1 v buňce a na základě zjištěného vztahu mezi metylací genu *p15* a odpovědi pacientů na léčbu AZA (Raj et al., 2007) lze vyslovit předpoklad, že pacienti s MDS ve vyšším riziku, jejichž progenitory se vyznačují silně transkripčně utlumeným chromatinem v oblasti URE, budou pro navození odpovědi vyžadovat vyšší dávky AZA, zatímco pacienti, jejichž progenitory v oblasti URE chromatin s relativně otevřenou strukturou, mohou vyžadovat dávky nižší.

Ukázali jsme, že působení AZA skutečně snižuje metylaci v oblasti URE v modelové buněčné linii OCI-M2, což je doprovázeno obnovením exprese PU.1 (na úrovni mRNA i proteinu) a jeho cílových genů. Obnovení exprese PU.1 a jeho cílových genů jsme prokázali rovněž u modelové buněčné linie SKM-1 a v progenitorech izolovaných z pacientů s MDS. To je v souladu se závěry dalších studií, které ukázaly, že AZA (nebo jeho analog Decitabin) svým působením zvyšuje hladinu PU.1 v buňkách, kde je DNA v oblasti regulačních úseků genu PU.1 metylována (Amaravadi et Klemsz, 1999; Tatetsu et al., 2007). Obdobný efekt působení

AZA byl popsán u řady dalších aberantně metylovaných genů se sníženou expresí u MDS (Tran et al, 2011). Studie vlivu AZA na neleukemických buňkách nicméně došla k závěru, že pouze malá část genů, jejichž exprese se mění v důsledku působení AZA, má ve svých regulačních úsecích metylovanou DNA (Komashko et Farnham, 2010). Tato skutečnost nemusí být s našim závěrem o vlivu demetylace URE na obnovení exprese PU.1 v rozporu, neboť je možné, že AZA obnovuje expresi několika klíčových genů – transkripčních faktorů, signalizačních molekul a regulátorů buněčného cyklu, které pak řídí expresi mnoha dalších genů, jejichž regulační oblasti nejsou metylovány na úrovni DNA. Jiní autoři nicméně popsali DNA metylaci genů v MDS/AML jako rozsáhlou (Figuroa et al., 2009). Je proto možné, že závěry získané studiem neleukemických buněk jednoduše nelze vztáhnout na stav v hematologických či jiných malignitách. V neposlední řadě je třeba brát v úvahu, že působení AZA v buňkách se neomezuje na snižování metylace DNA, ale zahrnuje například fosforylaci a defosforylaci proteinů, která následně ovlivňuje transkripci v buňce (Thépot et al., 2011). Důležitým zjištěním je, že kromě svého efektu na chromatin v oblasti URE působí AZA při aktivaci exprese PU.1 pravděpodobně i na dalších regulačních oblastech genu PU.1, jiných než je URE (Výsledkový obrázek 5). Tento závěr je v souladu s již popsáním pozorováním vlivu AZA na metylaci DNA v oblasti promotoru genu PU.1 (Amaravadi et Klemsz, 1999; Tatetsu et al., 2007). Z tohoto důvodu je k plnému objasnění vztahu mezi epigenetickým stavem DNA genu *PU.1* a klinickou odpovědí na léčbu AZA zapotřebí také analýza dalších regulačních úseků genu PU.1.

V naší práci jsme dále zkoumali vliv cytokinů v kombinaci s AZA na obnovu genové exprese PU.1 a buněčnou diferenciaci u modelové buněčné linie OCI-M2 (resp. SKM-1). Dále jsme se zaměřili na změny v oblasti URE a dalších regulačních oblastech genu *PU.1* probíhající na epigenetické úrovni modifikací histonů. Ukázali jsme, že AZA signifikantně zvyšuje přítomnost histonové modifikace H3K4Me3, asociované s transkripčně aktivní strukturou v oblasti URE v buňkách OCI-M2, zatímco působení AZA v kombinaci s G-CSF vznik této histonové modifikace spíše potlačuje. AZA v kombinaci s GM-CSF naopak významně zvyšuje přítomnost jiné modifikace histonu H3, H3K9Ac, která je rovněž spojována s transkripčně aktivním chromatinem (Barsi et al., 2007). Tyto výsledky jsou v souladu se závěry řady prací, které poukazují na to, že metylace DNA v důsledku působení DNMT1 představuje součást komplexních funkčních vazeb za účasti dalších proteinů, jejichž souhrou vzniká a stabilizuje se na chromatinu transkripčně represivní struktura. Nabohacení přítomnosti H3K4Me3 po působení AZA je možné dát do souvislosti s inhibicí působení

demethylázy KDM1A/LSD1 (demetylující specificky lysin 4 na histonu H3), u níž bylo popsáno, že je aktivně rekrutována DNMT1 na regulační oblasti genů při vzniku transkripčně represivního komplexu (Clements et al., 2012). Zvýšení přítomnosti histonové modifikace H3K9Ac po působení AZA v kombinaci s GM-CSF je možné dát do souvislosti s inhibicí působení deacetyláz histonů, jejichž asociace s DNMT1 byla rovněž popsána v odborné literatuře (Fuks et al., 2000; Rountree et al., 2000). Studie zkoumající působení Decitabinu, analogu AZA, ukázala, že pro účinné obnovení genové exprese v buňkách je podmínkou nejen snížení aberantní metylace na DNA, ale i zvýšení acetylace lysinu 9 na histonu H3 a další změny modifikací na molekulách histonů asociujících s rozvolněným, transkripčně aktivním chromatinem (Si et al., 2010). Naše výsledky skutečně ukazují, že maximální indukce acetylace na lysinu 9 histonu H3 v oblasti URE vyvolaná působením AZA v kombinaci s GM-CSF koreluje s největším zvýšením exprese PU.1 a jeho cílového genu CD11b v buňkách OCI-M2 (Výsledkový obrázek 3).

Vliv působení AZA v kombinaci s cytokinem G-CSF na epigenetické procesy v oblasti URE jsme intenzivně studovali také na CD34+ progenitorech získaných z pacienta P302 s MDS (jehož DNA v oblasti URE byla slabě metylována). Cytokin G-CSF jsme zvolili proto, že byly prokázány jeho pro-diferenční účinky v normálních progenitorech (Hu et al., 2010), je rutinně využíván v terapii MDS/AML k prevenci neutropenie (Dotti et al., 1995) a navíc bylo zjištěno, že mutace receptoru pro tento cytokin predisponuje ke vzniku MDS s vysokým rizikem (Wölfler et al., 2005). I při působení AZA v kombinaci s G-CSF na CD34+ progenitory z pacienta s MDS jsme detekovali nárůst acetylace H3K9 a rovněž pokles přítomnosti modifikace H3K9Me3 spojované s represivní chromatinovou strukturou. Tento pokles H3K9Me3 může být důsledkem deplece metyltransferázy histonů G9a, asociované s DNMT1 (Smallwood et al., 2007). Je třeba poukázat na skutečnost, že zatímco v buňkách OCI-M2 působení AZA v kombinaci s G-CSF nevedlo k rozšíření vzorce acetylace H3K9 ani k obnovení exprese PU.1, výsledky na progenitorech získaných z pacientů s MDS byly právě opačné. To upozorňuje na objektivní limity modelování patofyziologických mechanismů hematologických malignit na buněčných liniích. Buněčná linie OCI-M2 představuje případ transformace MDS do erytroleukémie, zatímco vzorek CD34+ progenitorů, na kterém byl testován vliv AZA v kombinaci s G-CSF, pocházel z pacienta s MDS s podtypem RAEB 2, což by mohlo vysvětlit rozdílné působení G-CSF v kombinaci s AZA na vznik transkripčně aktivní chromatinové struktury v oblasti URE, obnovení exprese PU.1 a buněčnou diferenciaci.

AZA v modelových buněčných liniích OCI-M2 a SKM-1 indukuje inhibici proliferace a do určité míry i navozuje apoptózu. AZA v buněčných liniích OCI-M2 a SKM-1 indukuje zvýšení exprese p21/CDKN1A, který reguluje buněčný cyklus a inhibuje proliferaci. Tento efekt AZA byl v odborné literatuře již popsán (Jiemjit et al., 2008). Nelze vyloučit, že je vyvolán přímo působením AZA na regulační oblasti genu *p21*. Studie zvýšení hladiny PU.1 v modelových buněčných liniích pro mnohočetný myelom nicméně naznačuje, že zvýšení exprese p21 vlivem AZA je zprostředkováno nepřímo přes obnovenou transkripci PU.1 (Ueno et al., 2009). Tomu by nasvědčovala i skutečnost, že DNA genu p21 není v MDS/AML metylována (Brakensiek et al., 2005 [*Leuk Res*]). AZA indukuje expresi KIT v buňkách OCI-M2 i v progenitorech z pacienta s MDS, zatímco působení AZA v kombinaci s G-CSF tuto indukci KIT tlumí. Toto zjištění je v souladu s pozorováním vlivu Decitabinu v kombinaci s G-CSF na expresi KIT v normálních progenitorech (Hu et al., 2010). Tyto výsledky, společně s pozorovaným zesilujícím účinkem G-CSF na expresi PU.1 vyvolanou AZA, naznačují, že G-CSF, jehož stávající používání v terapii MDS není spojeno se zvýšenou frekvencí rozvoje AML (Estey et al., 1994), může představovat potenciálně slibného kandidáta kombinované léčby pacientů s MDS s vyšším rizikem schopného zesilovat pro-diferenční účinky AZA.

Moje práce poukázala na roli hladiny PU.1 a epigenetických mechanismů účastnících se její regulace v patofyziologii MDS, především pak na jejich účast v poruše diferenciaci krevních buněk typické pro toto onemocnění. Zároveň jsme ukázali, že porozumění těmto mechanismům může být významné i pro terapeutickou praxi a prognostiku. Současný převažující experimentální/terapeutický přístup k řadě maligních onemocnění si klade za cíl navodit u populace leukemických buněk zastavení buněčného cyklu případně apoptózu. Schopnost obnovit a následně udržet v leukemických progenitorech proces buněčné diferenciaci představuje alternativní strategii, která by mohla být velmi užitečná i pro léčbu onemocnění jako je MDS/AML. Další práce týkající se pochopení role PU.1 v MDS by se podle mého názoru měla zaměřit na prokázání možného přímého vztahu mezi úrovní aberantní metylace DNA v oblasti URE (a v dalších regulačních oblastech genu PU.1) a odpovědí pacientů na léčbu AZA resp. na působení AZA v různě vysokých dávkách. Měla by otestovat další možné vztahy mezi hladinou exprese PU.1/metylací DNA v URE a klinicky relevantními kritérii, zejména dobou progresu onemocnění do AML. Je rovněž třeba blíže objasnit vztah metylace DNA a existence represivní chromatinové struktury v oblasti URE

k vlivu působení cytokinu G-CSF (nebo dalších cytokinů) na obnovení buněčné diferenciace. To, že otázky a cíle kladené mojí prací souzní s nejnovějšími trendy výzkumu v oblasti MDS, ukazuje fakt, že byly vyvinuty metody analýzy DNA metylace u pacientů s MDS z volně cirkulující DNA v jejich séru/plazmě (Iriyama et al., 2012). Konečným, optimistickým výsledkem našeho porozumění epigenetickým a molekulárním mechanismům patofyziologie MDS ve spojení s poznatky o prognostické hodnotě určitých morfologických a cytogenetických nálezů by mělo být vytvoření terapie MDS „šité na míru“ jednotlivým pacientům na základě jednoduché a levné metody jejich vyšetření lékařem.

6. SHRnutí ZÁVĚRŮ DIZERTAČNÍ PRÁCE

Na počátku své práce jsem vytvořil hypotézu předpokládající, že porucha diferenciacce krevních buněk v MDS je způsobena potlačenou expresí PU.1 v progenitorových buňkách v důsledku aberantní zvýšené metylace DNA v regulační oblasti URE a že exprese PU.1 a míra její inhibice v progenitorových buňkách skupiny pacientů s MDS bude ovlivňovat efektivitu jejich léčby hypometylačním činidlem AZA.

Pro hladinu exprese PU.1 v progenitorech získaných z MDS pacientů platí, že MDS je i na úrovni exprese PU.1 vysoce variabilní onemocnění (což platí i v rámci jednotlivých podskupin dnes využívaných MDS klasifikací, které vznikly na základě morfologických charakteristik onemocnění nebo identifikovaných rizikových prognostických faktorů). Ačkoliv průměrná hladina PU.1 pro soubor vzorku pacientů byla prakticky totožná s hladinou PU.1 pro soubor vzorků CD34+ buněk od zdravých kontrol, její distribuce byla daleko nerovnoměrnější. Na základě těchto výsledků tedy nelze vyvodit závěr, že nízká hladina PU.1 je určujícím podkladem, nebo i jen sekundárním jevem celého komplexu patofyziologických stavů zahrnutých pod diagnózu MDS.

S přihlédnutím k této skutečnosti jsem podpořil pracovní hypotézu, že aberantní zvýšená metylace v oblasti URE má za následek potlačení exprese PU.1 a v závislosti na tom i potlačení buněčné myeloidní diferenciacce. Ukázal jsem, že AZA (samotný nebo v kombinaci s cytokiny) potlačuje metylaci v oblasti URE a potvrdil jsem svoji hypotézu, že hladina exprese PU.1 ovlivňuje efektivitu léčebného účinku AZA u pacientů s MDS (nízká hladina asociuje se špatnou prognózou pacientů při léčbě AZA).

Na konkrétně stanovené cíle popsané v kapitole 2 jsem odpověděl takto:

1. Exprese PU.1 v progenitorech získaných od pacientů s MDS se středním-II nebo vysokým rizikem (IPSS) je oproti zdravým kontrolám mnohem více heterogenní. Existují skupiny pacientů s vysokou i nízkou expresí PU.1 oproti zdravým kontrolám. Pacienti s nízkou hladinou exprese PU.1 mají významně horší prognózu při léčbě AZA pokud jde o dobu

celkového přežití, než pacienti se střední a vysokou expresí PU.1. Exprese PU.1 v modelových buněčných liniích pro MDS (OCI-M2, SKM-1) je oproti zdravým kontrolám nižší. Oblast URE je v buněčné linii OCI-M2 a v progenitorech z pacientů s MDS aberantně zvýšeně metylovaná. Mezi mírou metylace na CpG ostrůvcích při vazebných místech PU.1 a AML-1 v oblasti URE a mezi hladinou exprese PU.1 v progenitorech z pacientů s MDS existuje zřetelný trend nepřímé korelace. Působení AZA na MDS buňky OCI-M2 vede k výraznému potlačení metylace v oblasti URE.

2. AZA aktivita potlačenu expresi PU.1 a jeho cílových genů v modelových buněčných liniích MDS. Zvýšení exprese PU.1 na úrovni mRNA i proteinu je provázeno myeloidní diferenciací leukemických buněk. AZA rovněž inhibuje buněčné dělení a do jisté míry navozuje apoptózu. Nicméně u buněk OCI-M2 nebyla vysledována závislost mezi dávkou AZA a mírou apoptózy.

3. Účinek AZA na zvýšení exprese PU.1 a navození myeloidní diferenciaci v modelových buněčných liniích pro MDS lze ovlivňovat cytokiny podporujícími růst myeloidních kolonií. Předchozí stimulace buněk OCI-M2 ovlivněných AZA cytokiny M-CSF a GM-CSF dále zvyšuje expresi PU.1 a jeho cílových genů, ačkoliv k epigenetickým změnám histonových modifikací v oblasti URE, které by signalizovaly rozvolnění chromatinové struktury, dochází pouze v případě vlivu GM-CSF. Stimulace buněk cytokiny nemá významný vliv na rychlost buněčného dělení a apoptózu buněk.

4. AZA aktivuje potlačenu expresi PU.1 a jeho cílových genů v progenitorech z MDS pacientů. Tento účinek AZA na zvýšení exprese PU.1 a navození myeloidní diferenciaci lze ovlivňovat cytokiny podporujícími růst myeloidních kolonií. Předchozí stimulace progenitorů získaných od pacientů s MDS cytokinem G-CSF vede k snížení exprese genu KIT, která je indukována AZA, k dalšímu zvýšení exprese PU.1 a k epigenetickým změnám histonových modifikací v oblasti URE, signalizujícím otevření chromatinu. Posledně zmíněný efekt G-CSF nebyl pozorován u buněk OCI-M2.

5. Oblast URE je zásadní pro zajištění fyziologické hladiny exprese PU.1 a manipulování s touto „normální“ hladinou působením AZA. AZA nicméně ovlivňuje hladinu exprese PU.1 také skrze jiné mechanismy, pravděpodobně další regulační elementy genu PU.1.

7. ODKAZY

Aggerholm A, Holm M S, Guldberg P, Olesen L H, Hokland P. Promoter hypermethylation of p15INK4B, HIC1, CDH1, and ER is frequent in myelodysplastic syndrome and predicts poor prognosis in early-stage patients. *Eur J Haematol.* **76** (2006): 23-32

Akashi K, Traver D, Miyamoto T and Weissman I L. A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature* **404** (2000): 193-197

Amaravadi L and Klemsz M J. DNA methylation and chromatin structure regulate PU.1 expression. *DNA Cell Biol.* **18** (1999): 875-884

Anderson M K, Weiss A H, Hernandez-Hoyos G, Dionne C J and Rothenberg E V. Constitutive expression of PU.1 in fetal hematopoietic progenitors blocks T cell development at the pro-T cell stage. *Immunity* **16** (2002): 285-296

Aoyama S, Nakano H, Danbara M, Higashihara M, Harigae H, Takahashi S. The differentiating and apoptotic effects of 2-aza-5'-deoxycytidine are dependent on the PU.1 expression level in PU.1 transgenic K562 cells. *Biochem Biophys Res Commun.* (2012) [Epub ahead of print]

Back J, Allman D, Chan S and Kastner P. Visualizing PU.1 activity during hematopoiesis. *Exp. Hematol.* **33** (2005): 395-402

Back J, Dierich A, Bronn C, Kastner P, Chan S. PU.1 determines the self-renewal capacity of erythroid progenitor cells. *Blood* **103** (2004): 3615-3623

Barski A, Cuddapah S, Cui K, Tae-Young R, Schonnes D, Wang Z, Wei G, Chepelev I and Zhao K. High-Resolution Profiling of Histone Methylations in the Human Genome. *Cell* **129** (2007): 823-837

Baylin S B, Fearon E R, Vogelstein B, de Bustros A, Sharkis S J, Burke P J, Staal S P, Nelkin B D. Hypermethylation of the 5' region of the calcitonin gene is a property of human lymphoid and acute myeloid malignancies. *Blood* **70** (1987): 412-417

Bennett J M, Catovsky D, Daniel M T, Flandrin G, Galton D A, Gralnick H R, Sultan C. Proposals for the classification of the myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol* **51** (1982): 189-199

Bestor T H. The DNA methyltransferases of mammals. *Hum Mol Genet* **16** (2000): 2395-2402

Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev* **16** (2002): 6-21

- Bonadies N, Neururer Ch, Steege A, Vallabhapurapu S, Pabst T and Mueller B U. PU.1 is regulated by NF- κ B through a novel binding site in a 17 kb upstream enhancer element. *Oncogene* **18** (2010): 1062-1072
- Bonadies N, Pabst T, Mueller B U. Heterozygous deletion of the PU.1 locus in human AML. *Blood* **115** (2010): 331-334
- Bottardi S, Ghiam A F, Bergeron F, Milot E. Lineage-Specific Transcription Factors in Multipotent Hematopoietic Progenitors. *Cell Cycle* **6** (2007): 1035-1039
- Brakensiek K, Länger F, Schlegelberger B, Kreipe H, Lehmann U. Hypermethylation of the suppressor of cytokine signalling-1 (SOCS-1) in myelodysplastic syndrome. *Br J Haematol.* **130** (2005): 209-217
- Brakensiek K, Länger F, Kreipe H, Lehmann U. Absence of p21(CIP 1), p27(KIP 1) and p57(KIP 2) methylation in MDS and AML. *Leuk Res.* **29** (2005): 1357-1360
- Burda P, Curik N, Kokavec J, Basova P, Mikulenková D, Skoultchi A I, Zavadil J and Stopka T. PU.1 activation relieves GATA-1-mediated repression of Cebpa and Cbfb during leukemia differentiation. *Mol Cancer Res* **7** (2009): 1693-1703
- Calin G A, Liu C G, Sevignani C, Ferracin M, Felli N, Dumitru C D, Shimizu M, Cimmino A, Zupo S, Dono M, Dell'Aquila M L, Alder H, Rassenti L, Kipps T J, Bullrich F, Negrini M, Croce C M. MicroRNA profiling reveals distinct signatures in B cell chronic lymphocytic leukemias. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101** (2004): 11755-11760
- Cedar H, Bergman Y. Linking DNA methylation and histone modification: patterns and paradigms. *Nat Rev Genet* **10** (2009): 295-304
- Chen H, Ray-Gallet D, Zhang P, Hetherington C J, Gonzalez D A, Zhang D E, Morreau-Gachelin F, Tenen D G. PU.1 (Spi-1) autoregulates its expression in myeloid cells. *Oncogene* **11** (1995): 1549-1560
- Chen H, Zhang P, Radomska H S, Hetherington C J, Zhang D E, Tenen D G. Octamer binding factors and their coactivator can activate the murine PU.1 (spi-1) promoter. *J Biol. Chem.* **271** (1996): 15743-15752
- Clements E G, Mohammad H P, Leadem B R, Easwaran H, Cai Y, Van Neste L, Baylin S B. DNMT1 modulates gene expression without its catalytic activity partially through its interactions with histone-modifying enzymes. *Nucleic Acids Res.* (2012): [Epub ahead of print]
- Cook W D, McCaw B J, Herring C, John D L, Foote S J, Nutt S L, Adams J M. PU.1 is a suppressor of myeloid leukemia, inactivated in mice by gene deletion and mutation of its DNA binding domain. *Blood* **104** (2004): 3437-3444
- Čihák A. Biological effects of 5-azacytidine in eukaryotes. *Oncology* **30** (1974): 405-422
- Čermák J, Jonášová A. *Transfuze Hematol. dnes* **16** (2010): 38-44

- Dahl R, Iyer S R, Owens K S, Cuylear D D, Simon M C. The transcriptional repressor GFI-1 antagonizes PU.1 activity through protein-protein interaction. *J. Biol. Chem.* **282** (2007): 6473-6483
- Dahl R and Simon M C. The importance of PU.1 concentration in hematopoietic lineage commitment and maturation. *Blood Cells Mol Dis* **31** (2003): 229-233
- DeKoter R P, Singh H. Regulation of B lymphocyte and macrophage development by graded expression of PU.1. *Science* **288** (2000): 1439-1441
- DeKoter R P, Kamath M B, Houston I B. Analysis of concentration dependent functions of PU.1 in hematopoiesis using mouse models. *Blood Cells Mol Dis* **39** (2007): 316-320
- DeKoter R P, Lee H, Singh H. PU.1 regulates expression of the interleukin-7 receptor in lymphoid progenitors. *Immunity* **16** (2002): 297-309
- Dotti G, Stella C C, Mangoni L, Cottafavi L, Caramatti C, Almici C, Rizzoli V. Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) prevents dose-limiting neutropenia in lymphoma patients receiving standard dose chemotherapy. *Haematologica* **80** (1995): 142-145
- Durual S, Rideau A, Ruault-Jungblut S, Cossali D, Beris P, Piguet V, Matthes T. Lentiviral PU.1 overexpression restores differentiation in myeloid leukemic blasts. *Leukemia* **21** (2007): 1050-1059.
- Ebralidze A K, Guibal F C, Steidl U, Zhang P, Lee S, Bartholdy B, Jorda M A, Petkova V, Rosenbauer F, Huang G, Dayaram T, Klupp J, O'Brien K B, Will B, Hoogenkamp M, Borden K L, Bonifer C and Tenen D G. PU.1 expression is modulated by the balance of functional sense and antisense RNAs regulated by a shared cis-regulatory element. *Genes Dev* **22** (2008): 2085-2092
- Ehrlich M, Gama-Sosa M A, Huang L H, Midgett R M, Kuo K C, McCune R A and Gehrke C. Amount and distribution of 5-methylcytosine in human DNA from different types of tissues of cells. *Nucleic Acids Res.* **10** (1982): 2709-2721
- Eis P S, Tam W, Sun L, Chadburn A, Li Z, Gomez M F, Lund E, Dahlberg J E. Accumulation of miR-155 and BIC RNA in human B cell lymphomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102** (2005): 3627-3632
- Eisbacher M, Holmes M L, Newton A, Hogg P J, Khachigian L M, Crossley M, Chong B H. Protein-protein interaction between Fli-1 and GATA-1 mediates synergistic expression of megakaryocyte-specific genes through cooperative DNA binding. *Mol cell Biol* **23** (2003): 3427-3441
- Estey E, Thall P, Andreeff M, Beran M, Kantarjian H, O'Brien S, Escudier S, Robertson L E, Koller C, Kornblau S, et al. Use of granulocyte colony-stimulating factor before, during, and after fludarabine plus cytarabine induction therapy of newly diagnosed acute myelogenous leukemia or myelodysplastic syndromes: comparison with fludarabine plus cytarabine without granulocyte colony-stimulating factor. *J Clin Oncol* **12** (1994): 671-678

- Feinman R, Qiu W Q, Pearse R N, Nikolajczyk B S, Sen R, Sheffery M, Ravetch J V. PU.1 and an HLH family member contribute to the myeloid-specific transcription of the Fc gamma RIIIA promoter. *EMBO J* **13** (1994): 3852-3860
- Fenaux P and Ades L. Review of azacitidine trials in intermediate-2- and high-risk myelodysplastic syndromes. *Leukemia Research* **33** (2009): S7-S11
- Fenaux P, Mufti G J, Hellstrom-Lindberg E, Santini V, Finelli C, Giagounidis A, Schoch R, Gattermann N, Sanz G, List A, Gore S D, Seymour J F, Bennett J M, Byrd J, Backstrom J, Zimmerman L, McKenzie D, Beach C, Silverman L R. International Vidaza High-Risk MDS Survival Study Group. Efficacy of azacitidine compared with that of conventional care regimens in the treatment of higher-risk myelodysplastic syndromes: a randomised, open-label, phase III study. *Lancet Oncol* **10** (2009): 223-232
- Fenaux P, Mufti G J, Hellstrom-Lindberg E, Santini V, Gattermann N, Germing U, Sanz G, List A F, Gore S, Seymour J F, Dombert H, Backstrom J, Zimmermann L, McKenzie D, Beach C L, Silverman L R. Azacitidine prolongs overall survival compared with conventional care regimens in elderly patients with low bone marrow blast count acute myeloid leukemia. *J Clin Onco* **28** (2010): 562-569
- Feng R, Desbordes S C, Xie H, Tillo E S, Pixley F, Stanley E R and Graf T. PU.1 and C/EBPalpha/beta convert fibroblasts into macrophage-like cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105** (2008): 6057-6062
- Figuroa M E, Skrabanek L, Li Y, Jiemjit A, Fandy T E, Paietta E, Fernandez H, Tallman M S, Grealley J M, Carraway H, Licht J D, Gore S D, Melnick A. MDS and secondary AML display unique patterns and abundance of aberrant DNA methylation. *Blood* **144** (2009): 3448-3458
- Fujiwara Y, Browne C P, Cunniff K, Goff S C and Orkin S H. Arrested development of embryonic red cell precursors in mouse embryos lacking transcription factor GATA-1. *Proc Natl Acad Sci USA* **93** (1996): 12355-12358
- Fuks F, Burgers W A, Brehm A, Hughes-Davies L, Kouzarides T. DNA methyltransferase Dnmt1 associates with histone deacetylase activity. *Nat Genet.* **24** (2000): 88-91
- Galson D L, Hensold J O, Bishop T R, Schalling M, D'Andrea A D, Jones C, Auron P E, Housman D E. Mouse beta-globin DNA-binding protein B1 is identical to a proto-oncogene, the transcription factor Spi-1/PU.1, and is restricted in expression to hematopoietic cells and the testis. *Mol Cell Biol.* **13** (1993):2929-2941
- Geiman T M, Sankpal U T, Robertson A K, Zhao Y, Zhao Y, Robertson K D. DNMT3B interacts with hSNF2H chromatin remodeling enzyme, HDACs 1 and 2, and components of the histone methylation system. *Biochem Biophys Res Commun.* **28** (2004): 544-555
- Georgopoulos K, Bigby M, Wang J H, Molnar A, Wu P, Winandy S and Sharpe A. The Ikaros Gene Is Required for the Development of All Lymphoid Lineages. *Cell* **79** (1994): 143-156

- Graves B J and Petersen J M. Specificity within the ets family of transcription factors. *Adv. Cancer Res.* **75** (1998): 1–55
- Greenberg P, Cox C, LeBeau M M, Fenaux P, Morel P, Sanz G, Sanz M, Vallespi T, Hamblin T, Oscier D, Ohyashiki K, Toyama K, Aul C, Mufti G and Bennett J. International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. *Blood* **89** (1997): 2079-2088
- Gu Z M, Liu C X, Wu S F, Zhao M, Xu H Z, Liu W, Zhou H C, Chen G Q, Wu Y L. PU.1 directly regulates retinoic acid-induced expression of RIG-G in leukemia cells. *FEBS Lett* **585** (2011): 375-380
- Gupta P, Gurudutta G U, Saluja D, Tripathi R P. PU.1 and partners: regulation of hematopoietic stem cell fate in normal and malignant hematopoiesis. *J Cell Mol Med* **13** (2009): 4349-4363
- Harris N L, Jaffe E S, Diebold J, Flandrin G, Muller-Hermelink H K, Vardiman J, Lister T A, Bloomfield C D. The World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues. Report of the Clinical Advisory Committee meeting, Airlie House, Virginia, November, 1997. *Ann Oncol.* **10** (1999): 1419-1432
- Herman J G and Baylin S B. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N Engl J Med* **349** (2003): 2042-2054
- Hernandez-Muñoz I, Taghavi P, Kuijl C, Neefjes J, van Lohuizen M. Association of BMI1 with polycomb bodies is dynamic and requires PRC2/EZH2 and the maintenance DNA methyltransferase DNMT1. *Mol Cell Biol* **25** (2005): 11047-11058
- Heydemann A, Juang G, Hennessy K, Parmacek M S, Simon M C. The myeloid-cell-specific c-fes promoter is regulated by Sp1, PU.1, and a novel transcription factor. *Mol Cell Biol* **16** (1996): 1676-1686
- Hock H, Hamblen M, Rooke H, Traver D, Bronson R T, Cameron S, Orkin S H. Intrinsic Requirement for Zinc Finger Transcription Factor Gfi-1 in Neutrophil Differentiation. *Immunity* **18** (2003): 109-120
- Hollenbach P W, Nguyen A N, Brady H, Williams M, Ning Y, Richard N, Krushel L, Aukerman S L, Heise C, MacBeth K J. A comparison of azacitidine and decitabine activities in acute myeloid cell lines. *PLoS ONE* **5** (2010): e9001
- Holliday R and Pugh J E. DNA modification mechanisms and gene activity during development. *Science* **187** (1975): 226-232
- Hoogenkamp M, Kryszynska H, Ingram R, Huang G, Barlow R, Clarke D, Ebralidze A, Zhang P, Tagoh H, Cockerill P N, Tenen D G, Bonifer C. The Pu.1 locus is differentially regulated at the level of chromatin structure and noncoding transcription by alternate mechanisms at distinct developmental stages of hematopoiesis. *Mol Cell Biol* **27** (2007): 7425-7438
- Hu Z, Negrotto S, Gu X, Mahfouz R, Ng K P, Ebrahim Q, Copelan E, Singh H, Maciejewski J P, Sauntharajah Y. Decitabine maintains hematopoietic precursor self-renewal by

preventing repression of stem cell genes by a differentiation-inducing stimulus. *Mol Cancer Ther* **9** (2010): 1536-1543

Huang G, Zhang P, Hirai H, Elf S, Yan X, Chen Z, Koschmieder S, Okuno Y, Dayaram T, Gowney J D, Shivdasani R A, Gilliland D G, Speck N A, Nimer S D and Tenen D G. PU.1 is a major downstream target of AML1 (RUNX1) in adult mouse hematopoiesis. *Nat Genet* **40** (2008): 51-60

Huh H J, Chae S L, Lee M, Hong K S, Mun Y C, Seong C M, Chung W S, Huh J W. CD34, RAB20, PU.1 and GF11 mRNA expression in myelodysplastic syndrome. *Int Jnl Lab Hem* **31** (2009): 344-351

Iriyama C, Tomita A, Hoshino H, Shirahata M, Furukawa-Hibi Y, Yamada K, Kiyoi H, Naoe T. Using peripheral blood circulating DNAs to detect CpG global methylation status and genetic mutations in patients with myelodysplastic syndrome. *Biochem Biophys Res Commun* (2012): [Epub ahead of print]

Jiang Y, Dunbar A, Gondek L P, Mohan S, Rataul M, O'Keefe C, Sekers M, Sauntharajah Y and Maciejewski J P. Abberant DNA methylation is a dominant mechanism in MDS progression to AML. *Blood* **113** (2009): 1315-1325

Jiemjit A, Fandy T E, Carraway H, Bailey K A, Baylin S, Herman J G, Gore S D. p21(WAF1/CIP1) induction by 5-azacytosine nucleosides requires DNA damage. *Oncogene* **27** (2008): 3615-3623

Kamath M B, Houston I B, Janovski A J, Zhu X, Gowrisankar S, Jegga A G, DeKoter R P. Dose-dependent repression of T-cell and natural killer cell genes by PU.1 enforces myeloid and B-cell identity. *Leukemia* **22** (2008): 1214-1225

Karsunky H, Zeng H, Schmidt T, Zevnik B, Kluge R, Schmid K W, Dührsen U and Möröy T. Inflammatory reactions and severe neutropenia in mice lacking the transcriptional repressor Gfi1. *Nature gen.* **30** (2002): 295-300

Kim H G, de Guzman C G, Swindle C S, Cotta C V, Gartland L, Scott E W and Klug Ch A. The ETS family transcription factor PU.1 is necessary for the maintenance of fetal liver hematopoietic stem cells. *Blood* **104** (2004): 3894-3900

Klemsz M J and Maki R A. Activation of transcription by PU.1 requires both acidic and glutamine domains. *Mol Cell Biol.* **16** (1996): 390-397

Klemsz M J, McKercher S R, Celada A, Van Beveren C, and Maki R A, The macrophage and B cell-specific transcription factor PU.1 is related to the ets oncogene. *Cell* **61** (1990): 113-124

Kluiver J, Poppema S, de Jong D, Blokzijl T, Harms G, Jacobs S, Kroesen BJ, van den Berg A. BIC and miR-155 are highly expressed in Hodgkin, primary mediastinal and diffuse large B cell lymphomas. *The Journal of pathology* **207** (2005): 243-249

- Kodandapani R, Pio F, Ni C Z, Piccialli G, Klemsz M, McKercher S, Maki R A and Ely K R. A new pattern for helix-turn-helix recognition revealed by the PU.1 ETS-domain-DNA complex. *Nature* **380** (1996): 456-460. Erratum in: *Nature* **392** (1998): 630
- Komashko V M, Farnham P J. 5-azacytidine treatment reorganizes genomic histone modification patterns. *Epigenetics* **5** (2010): 229-240
- Kosmider O, Gelsi-Boyer V, Cheok M, Grabar S, Della-Valle V, Picard F, Viguié F, Quesnel B, Beyne-Rauzy O, Solary E, Vey N, Hunault-Berger M, Fenaux P, Mansat-De Mas V, Delabesse E, Guardiola P, Lacombe C, Vainchenker W, Preudhomme C, Dreyfus F, Bernard O A, Birnbaum D, Fontenay M and on behalf of the GFDM. TET2 mutation is an independent favorable prognostic factor in myelodysplastic syndromes (MDSs). *Blood* **114** (2009): 3285-3291
- Kouzarides T. Chromatin Modifications and Their Function. *Cell* **128** (2007): 693-705
- Kummalu T, Friedman A D. Cross-talk between regulators of myeloid development: C/EBPalpha binds and activates the promoter of PU.1 gene. *J Leukoc Biol.* **74** (2003): 464-470
- Laios C V, Stadtfeld M, Xie H, de Andres-Aguayo L, and Graf T. Reprogramming of committed T cell progenitors to macrophages and dendritic cells by C/EBP alpha and PU.1 transcription factors. *Immunity* **25** (2006): 731-744
- Laslo P, Spooner C J, Warmflash A, Lancki D W, Lee H J, Sciammas R, Gantner B N, Dinner A R and Singh H. Multilineage transcriptional priming and determination of alternate hematopoietic cell fates. *Cell* **126** (2006): 755-766
- Laslo P, Pongubala J M, Lancki D W, Singh H. Gene regulatory networks directing myeloid and lymphoid cell fates within the immune system. *Semin Immunol.* **20** (2008): 228-235
- Leddin M, Perrod C, Hoogenkamp M, Ghani S, Assi S, Heinz S, Wilson N K, Follows G, Schönheit J, Vockentanz L, Mosammam A M, Chen W, Tenen D G, Westhead D R, Göttgens B, Bonifer C, Rosenbauer F. Two distinct auto-regulatory loops operate at the PU.1 locus in B cells and myeloid cells. *Blood* **117** (2011): 2827-2838
- Li E., Bestor T.H. and Jaenisch R. Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell* **69** (1992): 915-926
- Li H, Rauch T, Chen Z X, Szabo P E, Riggs A D, Pfeifer G P. The histone methyltransferase SETDB1 and the DNA methyltransferase DNMT3A interact directly and localize to promoters silenced in cancer cells. *J Biol Chem* **281** (2006): 19489-19500
- Li Y, Okuno Y, Zhang P, Radomska H S, Chen H, Iwasaki H, Akashi K, Klemsz M J, McKercher S R, Maki R A and Tenen D G. Regulation of the PU.1 gene by distal elements. *Blood* **98** (2001): 2958-2965
- Malcovati L, Germing U, Kuendgen A, Della Porta M G, Pascutto C, Invernizzi R, Giagounidis A, Hildebrandt B, Bernasconi P, Knipp S, Strupp C, Lazzarino M, Aul C,

- Cazzola M. Time-dependent prognostic scoring system for predicting survival and leukemic evolution in myelodysplastic syndromes. *J Clin Oncol.* **25** (2007): 3503-3510
- Metcalf D, Dakic A, Mifsud S, Di Rago L, Wu L, Nutt S. Inactivation of PU.1 in adult mice leads to the development of myeloid leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* **103** (2006): 1486-1491
- Metzler M, Wilda M, Busch K, Viehmann S and Borkhardt A. High expression of precursor microRNA-155/BIC RNA in children with Burkitt lymphoma. *Genes, Chromosomes and Cancer* **39** (2004): 167-169
- Mittelman M, Oster H S, Hoffman M and Neumann D. The lower risk MDS patient at risk of rapid progression. *Leukemia Research* **34** (2010): 1551-1555
- Moreau-Gachelin F, Tavitian A, Tambourin P. Spi-1 is a putative oncogene in virally induced murine erythroleukaemias. *Nature* **331** (1988): 277-280
- Moreau-Gachelin F, Wendling F, Molina T, Denis N, Titeux M, Grimber G, Briand P, Vainchenker W, Tavitian A. Spi-1/PU.1 transgenic mice develop multistep erythroleukemias. *Mol Cell Biol* **16** (1996): 2453-2463
- Mueller B U, Pabst T, Osato M, Asou N, Johansen L M, Minden M D, Behre G, Hiddemann W, Ito Y, Tenen D G. Heterozygous PU.1 mutations are associated with acute myeloid leukemia. *Blood* **100** (2002): 998-1007
- Mueller B U, Pabst T, Fos J, Petkovic V, Fey M F, Asou N, Buergi U and Tenen D G. ATRA resolves the differentiation block in t(15;17) acute myeloid leukemia by restoring PU.1 expression. *Blood* **107** (2006): 3330-3338
- Musto P, Maurillo L, Spagnoli A, Gozzini A, Rivellini F, Lunghi M, Villani O, Aleo-Spiriti M A, Venditti A, Santini V, ICSG on azacytidine in myelodysplastic syndromes acute leukemias. Azacitidine for treatment of lower risk myelodysplastic syndromes. *Cancer* **116** (2010): 1485-1494
- Negishi M, Saraya A, Miyagi S, Nagao K, Inagaki Y, Nishikawa M, Tajima S, Koseki H, Tsuda H, Takasaki Y, Nakauchi H, Iwama A. Bmi1 cooperates with Dnmt1-associated protein 1 in gene silencing. *Biochem Biophys Res Commun* **353** (2007): 992-1008
- Nerlov C and Graf T. PU.1 induces myeloid lineage commitment in multipotent hematopoietic progenitors. *Genes Dev.* **12** (1998): 1398-1411
- Nerlov C, Querfurth E, Kulesa H, Graf T. GATA-1 interacts with the myeloid PU.1 transcription factor and represses PU.1-dependent transcription. *Blood* **95** (2000): 2543-2551
- Ng S Y, Yoshida T, Zhang J, Georgopoulos K. Genome-wide lineage-specific transcriptional networks underscore Ikaros-dependent lymphoid priming in hematopoietic stem cells. *Immunity* **30** (2009): 493-507
- Nutt S L, Metcalf D, D'Amico A, Polli M and Wu L. Dynamic regulation of PU.1 expression in multipotent hematopoietic progenitors. *J. Exp. Med.* **201** (2005): 221-231

- Nutt S L, Urbanek P, Rollink A, Busslinger M. Essential functions of Pax5 (BSAP) in the pro-B cell development: difference between fetal and adult B Lymphopoiesis and reduced V-to-DJ recombination at IgH locus. *Genes Dev.* **11** (1997): 476-491
- O'Connell R M, Rao D S, Chaudhuri A A, Boldin M P, Taganov K D, Nicoll J, Paquette R L, Baltimore D. Sustained expression of microRNA-155 in hematopoietic stem cells causes a myeloproliferative disorder. *J Exp Med* **205** (2008): 585-594
- Okano M, Xie S, Li E. Cloning and characterization of a family of novel mammalian DNA (cytosine-5) methyltransferases. *Nat Genet* **19** (1998): 219-220
- Okano M, Bell D W, Haber D A, Li E. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell* **99** (1999): 247-257
- Okuno Y, Huang G, Rosenbauer F, Evans E K, Radomska H S, Iwasaki H, Akashi K, Moreau-Gachelin F, Li Y, Zhang P, Gottgens B, and Tenen D G, Potential autoregulation of transcription factor PU.1 by an upstream regulatory element. *Mol Cell Biol* **25** (2005): 2832-2845
- Pahl H L, Scheibe R J, Zhang D E, Chen H M, Galson D L, Maki R A, Tenen D G. The proto-oncogene PU.1 regulates expression of the myeloid-specific CD11b promoter. *J Biol Chem.* **268** (1993): 5014-5020
- Pevny L, Simon M C, Robertson E, Klein W H, Tsai S F, D'Agati V, Orkin S H and Costantini F. Erythroid differentiation in chimaeric mice blocked by a targeted mutation in the gene for transcription factor GATA-1. *Nature* **349** (1991): 257-260
- Pongubala J M, Northrup D L, Lancki D W, Medina K L, Treiber T, Bertolino E, Thomas M, Grosschedl R, Allman D, Singh H. Transcription factor EBF restricts alternative lineage options and promotes B cell fate commitment independently of Pax5. *Nat Immunol* **9** (2008): 203-215
- Prébet T, Gore S D, Esterni B, Gardin C, Itzykson R, Thepot S, Dreyfus F, Rauzy O B, Recher C, Adés L, Quesnel B, Beach C L, Fenaux P, Vey N. Outcome of high-risk myelodysplastic syndrome after azacitidine treatment failure. *J Clin Oncol.* **29** (2011): 3322-3327
- Prébet T, Gore S D, Thepot S, Esterni B, Quesnel B, Rauzy O B, Dreyfus F, Gardin C, Fenaux P, Vey N. Outcome of acute myeloid leukaemia following myelodysplastic syndrome after azacitidine treatment failure. *Br J Haematol* **10** (2012): [epub ahead of print]
- Quintas-Cardama A, Santos F P, Garcia-Manero G. Therapy with azanucleosides for myelodysplastic syndromes. *Nat Rev Clin Oncol* **7** (2010): 433-444
- Raj K, John A, Ho A, Chronis C, Khan S, Samuel J, Pomplun S, Thomas N S, Mufti G J. CDKN2B methylation status and isolated chromosome 7 abnormalities predict responses to treatment with 5-azacytidine. *Leukemia* **21** (2007): 1937-1944

- Rehli M, Niller H, Ammon C, Langmann S, Schwarzfischer L, Andreesen R and Krause S W. Transcriptional regulation of CHI3L1, a marker gene for late stages of macrophage differentiation. *J Biol Chem* **278** (2003): 44058-44067
- Rekhtman N, Radparvar F, Evans T, Skoultchi A I. Direct interaction of hematopoietic transcription factors PU.1 and GATA-1: functional antagonism in erythroid cells. *Genes Dev* **13** (1999): 1398-1411
- Rodrigues E F, Santos-Rebouças C B, Gonçalves Pimentel M M, Mencialha A L, Dobbin J, Da Costa E S, Fernandez Cde S, Bouzas L F, Abdelhay E, De Souza Fernandez T. Epigenetic alterations of p15(INK4B) and p16(INK4A) genes in pediatric primary myelodysplastic syndrome. *Leuk Lymphoma*. **51** (2010): 1887-1894
- Rosenbauer F, Wagner K, Kutok J L, Iwasaki H, Le Beau M M, Okuno Y, Akashi K, Fiering S and Tenen D G. Acute myeloid leukemia induced by graded reduction of a lineage-specific transcription factor, PU.1. *Nat Genet* **36** (2004): 624-630
- Rosenbauer F, Owens B M, Yu L, Tumang J R, Steidl U, Kutok J L, Clayton L K, Wagner K, Scheller M, Iwasaki H, Liu C, Hackanson B, Akashi K, Leutz A, Rothstein T L, Plass C, and Tenen D G, Lymphoid cell growth and transformation are suppressed by a key regulatory element of the gene encoding PU.1. *Nat Genet* **38** (2006): 27-37
- Ross I L, Dunn T L, Yue X, Roy S, Barnett C J, Hume D A. Comparison of the expression and function of the transcription factor PU.1 (Spi-1 proto-oncogene) between murine macrophages and B lymphocytes. *Oncogene* **9** (1994): 121-132
- Rountree M R, Bachman K E, Baylin S B. DNMT1 binds HDAC2 and a new co-repressor, DMAP1, to form a complex at replication foci. *Nat Genet.***25** (2000): 269-277
- Schanz J, Tüchler H, Solé F, Mallo M, Luno E, Cerveda J, Granada I, Hildebrandt B, Slovak M L, Ohyashiki K, Steidl C, Fonatsch C, Pfeilstöcker M, Nösslinger T, Valent P, Giagounidis A, Aul C, Lübbert M, Stauder R et al. New comprehensive cytogenetic scoring system for primary myelodysplastic syndromes (MDS) and oligoblastic acute myeloid leukemia after MDS derived from an international database merge. *J Clin Oncol* **30** (2012): 820-829
- Scott E W, Simon M C, Anastasi J, and Singh H, Requirement of transcription factor PU.1 in the development of multiple hematopoietic lineages. *Science* **265** (1994): 1573-1577
- Shivdasani R A, Fujiwara Y, McDevitt M A and Orkin S H. A lineage-selective knockout establishes the critical role of transcriptional factor GATA-1 in megakaryocyte growth and platelet development. *EMBO J*. **16** (1997): 3965-3973
- Shuman S. Novel approach to molecular cloning and polynucleotide synthesis using Vaccinia DNA topoisomerase. *J. Biol. Chem.* **269** (1994): 32678-32684
- Si J, Boumber Y A, Shu J, Qin T, Ahmed S, He R, Jelinek J, Issa J P. Chromatin remodeling is required for gene reactivation after decitabine-mediated DNA hypomethylation. *Cancer Res.* **70** (2010): 6968-6977

Silverman L. Targeting hypomethylation of DNA to achieve cellular differentiation in myelodysplastic syndromes (MDS). *The Oncologist* **6** (2001): 8-14

Silverman L R, Demakos E P, Peterson B L, Kornblith A B, Holland J C, Odchimar-Reissig R, Stone R M, Nelson D, Powell B L, DeCastro C M, Ellerton J, Larson R A, Schiffer C A, Holland J F. Randomized controlled trial of azacitidine in patients with the myelodysplastic syndrome: a study of the cancer and leukemia group B. *J Clin Oncol* **20** (2002): 2429-2440

Silverman L R, Fenaux P, Mufti G J, Santini V, Hellstrom-Lindberg E, Gattermann N, Sanz G, List A F, Gore S D, Seymour J F. Continued azacitidine therapy beyond time of first response improves quality of response in patients with higher-risk myelodysplastic syndromes. *Cancer* **117** (2011): 2697-2702

Silverman L R, Holland J F, Demakos E P, et al. Azacitidine (Aza C) in myelodysplastic syndromes (MDS), CALGB studies 8421 and 8921. *AnnHematol* **68** (1994): abstr 46

Silverman L R, Holland J F, Weinberg R S, Alter B P, Davis R B, Ellison R R, Demakos E P, Cornell C J Jr, Carey R W, Schiffer C, et al. Effects of treatment with 5-azacytidine on the in vivo and in vitro hematopoiesis in patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia* **7** (1993): 21-29

Silverman L R, McKenzie D R, Peterson B L, Holland J F, Backstrom J T, Beach C L, Larson R A; Cancer and Leukemia Group B. Further analysis of trials with azacitidine in patients with myelodysplastic syndrome: studies 8421, 8921, and 9221 by the Cancer and Leukemia Group B. *J Clin Oncol* **24** (2006): 3895-3903

Smallwood A, Esteve P O, Pradhan S, Carey M. Functional cooperation between HP1 and DNMT1 mediates gene silencing. *Genes Dev* **21** (2007): 1169-1178

Smith L T, Hohaus S, Gonzales D A, Dziennis S E, Tenen D G. PU.1 (Spi-1) and C/EBP alpha regulate the granulocyte colony-stimulating factor receptor promoter in myeloid cells. *Blood* **88** (1996): 1234-1247

Soriano A O, Yang H, Faderl S, Estrov Z, Giles F, Ravandi F, Cortes J, Wierda W G, Ouzounian S, Quezada A, Pierce S, Estey E H, Issa J P, Kantarjian H M, Garcia-Manero G. Safety and clinical activity of the combination of 5-azacytidine, valproic acid, and all-trans retinoic acid in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome. *Blood* **110** (2007): 2302-2308

Souabni A, Cobaleda C, Schebesta M, Busslinger M. Pax5 promotes B lymphopoiesis and block T cell development by repressing Notch1. *Immunity* **17** (2002): 781-793

Starck J, Cohet N, Gonnet C, Sarrazin S, Doubeikovskaia Z, Doubeikovski A, Verger A, Duterque-Coquillaud M and Morle F. Functional cross-antagonism between transcription factors FLI-1 and EKLf. *Mol Cell Biol.* **23** (2003): 1390-1402

Steidl U, Steidl C, Ebraldize A, Chapuy B, Han H J, Will B, Rosenbauer F, Becker A, Wagner K, Koschmieder S, Kobayashi S, Costa D B, Schulz T, O'Brien K B, Verhaak R G, Delwel R, Haase D, Trumper L, Krauter J, Kohwi-Shigematsu T, Griesinger F and Tenen D

G. A distal single nucleotide polymorphism alters long-range regulation of the PU.1 gene in acute myeloid leukemia. *J Clin Invest* **117** (2007): 2611-2620

Stintzig S, Kammerling R, Kiesslich T, Alinger B, Ocker M, Neureiter D. Myelodysplastic syndrome and histone deacetylase inhibitors: „To be or not to be acetylated“? *J Biomed Biotechnol.* **2011** (2011): 214143

Stopka T, Amanatullah D F, Papetti M, Skoultchi A I. PU.1 inhibits the erythroid program by binding to GATA-1 on DNA and creating a repressive chromatin structure. *EMBO J* **24** (2005): 3712-3723

Stresemann C, Bokelmann I, Mahlknecht U, Lyko F. Azacytidine causes complex DNA methylation responses in myeloid leukemia. *Mol Cancer Ther.* **7** (2008): 2998-3005

Suh H C, Gooya J, Renn K, Friedman A D, Johnson P F, Keller J R. C/EBP(alpha) determines hematopoietic cell fate in multipotential progenitor cells by inhibiting erythroid differentiation and inducing myeloid differentiation. *Blood* **107** (2006): 4308-4319

Suraweera N, Meijne E, Moody J, Carvajal-Carmona L G, Yoshida K, Pollard P, Fitzgibbon J, Riches A, van Laar T, Huiskamp R, Rowan A, Tomlinson I P, Silver A. Mutations of the PU.1 Ets domain are specifically associated with murine radiation-induced, but not human therapy-related, acute myeloid leukaemia. *Oncogene* **24** (2005): 3678-3683

Tatetsu H, Ueno S, Hata H, Yamada Y, Takeya M, Mitsuya H, Tenen G H, Okuno Y. Down-regulation of PU.1 by methylation of distal regulatory elements and the promoter is required for myeloma cell growth. *Cancer Res* **67** (2007): 5328-5336

Tenen D G, Hromas R, Licht J D, Zhang D E. Transcription factors, normal myeloid development, and leukemia. *Blood* **20** (1997): 489-519

Tessema M, Länger F, Dingemann J, Ganser A, Kreipe H, Lehmann U. Aberrant methylation and impaired expression of the p15(INK4b) cell cycle regulatory gene in chronic myelomonocytic leukemia (CMML). *Leukemia* **17** (2003): 910-918

Thépot S, Lainey E, Cluzeau T, Sébert M, Leroy C, Adès L, Tailler M, Galluzzi L, Baran-Marszak F, Roudot H, Eclache V, Gardin C, de Botton S, Auberger P, Fenaux P, Kroemer G, Boehrer S. Hypomethylating agents reactivate FOXO3A in acute myeloid leukemia. *Cell Cycle* **10** (2011): 2323-2330

Tran H T, Kim H N, Lee I, Kim Y, Ahn J, Yang D, Lee J, Kim H. DNA methylation changes following 5-azacytidine treatment in patients with myelodysplastic syndrome. *Oncoogy & Hematology* **26** (2011): 207-213

Ueno S, Tatetsu H, Hata H, Iino T, Niino H, Akashi K, Tenen D G, Mitsuya H, Okuno Y. PU.1 induces apoptosis in myeloma cells through direct transactivation of TRAIL. *Oncogene* **28** (2009): 4116-4125

Urbanek P, Wang Z Q, Fetka I, Wagner E F, Busslinger M. Complete block of early B cell differentiation and altered patterning of the posterior midbrain in mice lacking Pax5/BSAP. *Cell* **79** (1994): 901-912

Valent P, Horny HP, Bennett JM, Fonatsch C, Germing U, Greenberg P, Haferlach T, Haase D, Kolb HJ, Krieger O, Loken M, van de Loosdrecht A, Ogata K, Orfao A, Pfeilstöcker M, Rüter B, Sperr WR, Stauder R, Wells DA. Definitions and standards in the diagnosis and treatment of the myelodysplastic syndromes: Consensus statements and report from a working conference. *Leukemia Research* **31** (2007): 727-736

van den Berg A, Kroesen B J, Kooistra K, de Jong D, Briggs J, Blokzijl T, Jacobs S, Kluiver J, Diepstra A, Maggio E, Poppema S. High expression of B-cell receptor inducible gene BIC in all subtypes of Hodgkin lymphoma. *Genes, chromosomes & cancer* **37** (2003): 20-28

Vangala R K, Heiss-Neumann M S, Rangatia J S, Singh S M, Schoch C, Tenen D G, Hiddemann W, Behre G. The myeloid master regulator transcription factor PU.1 is inactivated by AML1-ETO in t(8;21) myeloid leukemia. *Blood* **101** (2003): 270-277

Vargova K, Curik N, Burda P, Basova P, Kulvait V, Pospisil V, Savvulidi F, Kokavec J, Necas E, Berkova A, Obrtlíkova P, Karban J, Mraz M, Pospisilova S, Mayer J, Trneny M, Zavadil J, Stopka T. MYB transcriptionally regulates the miR-155 host gene in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **117** (2011): 3816-3825

Vigorito E, Perks K L, Abreu-Goodger C, Bunting S, Xiang Z, Kohlhaas S, Das P P, Miska E A, Rodriguez A, Bradley A, Smith K G, Rada C, Enright A J, Toellner K M, MacLennan I C and Turner M. microRNA-155 regulates the generation of immunoglobulin class-switched plasma cells. *Immunity* **27** (2007): 847-859

Vire E, Brenner C, Deplus R, Blanchon L, Fraga M, Didelot C, Morey C, Van Eynde A, Bernard D, Vanderwinden J M, Bollen M, Esteller M, Di Croce L, de Launoit Y, Fuks F. The Polycomb group protein EZH2 directly controls DNA methylation. *Nature* **439** (2006): 871-874

Walsh J C, DeKoter R P, Lee H J, Smith E D, Lancki D W, Gurish M F, Friend D S, Stevens R L, Anastasi J and Singh H. Cooperative and antagonistic interplay between PU.1 and GATA-2 in the specification of myeloid cell fates. *Immunity* **17** (2002): 665-676

Wölfler A, Erkeland S J, Bodner C, Valkhof M, Renner M, Leitner C, Olipitz W, Pfeilstöcker M, Tinchon C, Emberger W, Linkesch W, Touw I P and Sill H. A functional single-nucleotide polymorphism of the G-CSF receptor gene predisposes individuals to high-risk myelodysplastic syndrome. *Blood* **105** (2005): 3731-3736

Xie H, Ye M, Feng R and Graf T. Stepwise reprogramming of B cells into macrophages. *Cell* **117** (2004): 663-676

Xu G L, Bestor T H, Bourc'his D, Hsieh C L, Tommerup N, Bugge M, Hulten M, Qu X, Russo J J, Viegas-Péquignot E. Chromosome instability and immunodeficiency syndrome caused by mutations in a DNA methyltransferase gene. *Nature* **402** (1999): 187-191

Yamamoto H, Kihara-Negishi F, Yamada T, Hashimoto Y, Oikawa T. Physical and functional interactions between the transcription factor PU.1 and the coactivator CBP. *Oncogene* **18** (1999): 1495-1501

Yeaman C, Wang D, Paz-Priel I, Torbett B E, Tenen D G, Friedman A D. C/EBPalpha binds and activates the PU.1 distal enhancer to induce monocyte lineage commitment. *Blood* **110** (2007): 3136-3142

Yoder J A, Soman N, Verdine G V and Bestor T H. DNA methyltransferases in mouse tissue and cells. Studies with a mechanism-based probe. *J. Mol. Biol.* **270** (1997): 385-395

Yoder J A, Walsh C P and Bestor T H. cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites. *Trends Genet.* **13** (1997): 335-340

Zhang D E, Hohaus S, Voso M T, Chen H M, Smith L T, Hetherington C J, Tenen D G. Function of PU.1 (Spi-1), C/EBP, and AML1 in early myelopoiesis: regulation of multiple myeloid CSF receptor promoters. *Curr Top Microbiol Immunol.* **211** (1996): 137-147

Zhang P, Zhang X, Iwama A, Yu C, Smith K A, Mueller B U, Narravula S, Torbett B E, Orkin S H, Tenen D G. PU.1 inhibits GATA-1 function and erythroid differentiation by blocking GATA-1 DNA binding. *Blood* **96** (2000): 2641-2648

<http://www.nccn.com>

<http://products.invitrogen.com/ivgn/product/K451020>

DODATEK:

Publikace autora (s případným uvedením impakt faktoru časopisu):

Curik N, Burda P, Vargova K, Pospisil V, Belickova M, Vlckova P, Savvulidi F, Necas E, Hajkova H, Haskovec C, Cermak J, Krivjanska M, Trneny M, Laslo P, Jonasova A, Stopka T. 5-Azacidine in aggressive myelodysplastic syndromes regulates chromatin structure at PU.1 gene and cell differentiation capacity. *Leukemia* (2012): doi: 10.1038/leu.2012.47. [Epub ahead of print] **IF = 8,99**

Nikola Čuřík, Pavel Burda, Karin Vargová, Vít Pospíšil, Mária Krivjanská, Marek Trněný, Anna Jonášová a Tomáš Stopka. Nové technologie v medicíně pomáhají pacientům s MDS. *Medical Tribune VIII* (2012): číslo 6, 2. dubna 2012

Vargova K, **Curik N**, Burda P, Basova P, Kulvait V, Pospisil V, Savvulidi F, Kokavec J, Necas E, Berkova A, Obrtlíkova P, Karban J, Mraz M, Pospisilova S, Mayer J, Trneny M, Zavadil J, Stopka T. MYB transcriptionally regulates the miR-155 host gene in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **117** (2011): 3816-3825. **IF = 10,432**

Burda P, **Curik N**, Kokavec J, Basova P, Mikulenkova D, Skoultchi AI, Zavadil J and Stopka T. PU.1 activation relieves GATA-1-mediated repression of Cebpa and Cbfb during leukemia differentiation. *Mol. Cancer Res.* **7** (2009): 1693-1703. **IF = 4,533**

Tomáš Stopka, Karin Vargová, **Nikola Čuřík**, Pavel Burda, Jiří Zavadil, Marek Trněný. Pokročíme v terapii CLL? *Medical tribune.VII* (2011): číslo 3, sešit B, 21. února 2011