

Svoluji k zapůjčení své diplomové práce ke studijním účelům a prosím, aby byla vedena přesná evidence vypůjčovateli. Převzaté údaje je vypůjčovatel povinen řádně ocitovat.

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Genetika, molekulární biologie a virologie



Bc. Martina Slavková

Reportérový expresní systém pro studium umlčování integrovaného proviru v transkribované oblasti genu

Reporter expression system for study of silencing of provirus integrated inside transcriptionally active gene

Diplomová práce

Školitel: RNDr. Jiří Hejnar, CSc.

Praha, 2015

Prohlášení:

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

V Praze, 14. 8. 2015

Bc. Martina Slavková

Poděkování:

Ráda bych tímto poděkovala svému školiteli Dr. Jiřímu Hejnarovi za odborné vedení této práce, Dr. Filipu Šeniglovi za jeho pomoc s experimenty a celé laboratoři za přátelské pracovní prostředí.

Zvláštní poděkování pak přísluší celé mé rodině, která mě vždy velmi podporovala.

Abstrakt

Retrovirové vektory jsou používány jako nástroj vkládání rekombinantních genů do genomu příjemce genové terapie. Při konstrukci takových vektorů je kladen důraz na bezpečnost a účinnost. I přes velké pokroky v konstrukci retrovirových resp. lentivirových vektorů pro genovou terapii za účelem stabilizace jejich exprese, jako vkládání ochranných elementů do virových regulačních sekvencí, nejsou dosavadní přístupy stále dostatečně účinné a většina integrovaných provirů je transkripčně umlčována. Pochopení mechanismu umlčování provirů je tedy kritické pro efektivní manipulaci s retrovirovými vektory a pro optimalizaci jejich struktury. V předkládané magisterské práci navrhuji a vytvářím expresní systém sloužící ke studiu umlčování provirů integrovaných do transkribovaných oblastí genů. Tento arteficiální systém bude později využit k testování hypotézy, že proviry integrované do transkribovaných oblastí genů jsou umlčovány při transkripčním pročtení z hostitelského genomu do provirů mechanismem závislým na aktivitě *de novo* DNA metyltransferáz. Mnou získané předběžné výsledky naznačují na platnost této hypotézy, ale potvrzení její obecné platnosti bude součástí dalšího studia v laboratoři.

Klíčová slova: transkripční umlčování, integrace, retroviry, ASLV, HIV

Abstract

Retroviral vectors are used as mighty tools for an introduction of recombinant genes into the recipient genome in gene therapy trials. In the vector design, great emphasis is put on safety and efficiency. In spite of a great progress in retroviral vector design with the purpose to stabilize its expression, e.g. introduction of protective elements into the viral regulatory sequences, the current approaches are still not sufficiently effective and the majority of proviruses is transcriptionally silenced. The understanding of the silencing mechanism is of special importance to the optimization of the vector design and handling. In this master thesis, I have designed and constructed an expression system for study of the mechanism involved in the silencing of retroviruses integrated inside gene bodies. This artificial system will be utilized for testing of hypothesis that retroviruses integrated into gene bodies are silenced by DNMT-dependent mechanism and this process is triggered by transcriptional read-through of the provirus from nearby host promoter. I have obtained preliminary results suggesting the validity of the suggested hypothesis; however the verification of general validity of this hypothesis for various retroviruses and elements will be a matter of further studies in our laboratory.

Keywords: transcriptional silencing, integration, retroviruses, ASLV, HIV

1. Úvod.....	7
1.1. Integrace retrovirů a jejich integrační preference.....	7
1.2. Epigenetické mechanismy umlčování retrovirů.....	13
1.3. Ochrana vektorů před umlčováním.....	18
1.4. Epigenomika.....	20
1.4.1. Epigenomika integračních míst provirů.....	24
2. Cíle práce.....	27
3. Materiál a metody.....	29
3.1. Materiál.....	29
3.1.1. Buněčné linie a jejich kultivace.....	29
3.1.2. Bakteriální kmeny.....	30
3.1.3. Zdrojové plazmidy.....	31
3.2. Metody molekulárního klonování.....	31
3.2.1. Štěpení restrikčními endonukleázami.....	31
3.2.2. Elektroforetické metody.....	31
3.2.3. Izolace fragmentů plazmidové DNA z gelu.....	33
3.2.4. Polymerázová řetězová reakce.....	33
3.2.5. Koloniová PCR.....	36
3.2.6. Rekombinační klonování.....	36
3.2.7. Transformace bakterií.....	37
3.2.8. Izolace plazmidové DNA.....	37
3.2.9. Práce s bakteriálními konzervami.....	38
3.3. Testování genové exprese a průtoková cytometrie.....	39
3.3.1. Transfekce buněk plazmidy.....	39
3.3.2. Analýza exprese GFP a tdTomato na průtokovém cytometru.....	39
3.3.3. Sortování buněk.....	40
3.4. Analýza integračních míst v buněčných klonech.....	41

3.4.1. Fenol-chloroformová extrakce DNA.....	41
3.4.2. Vysolovací metoda izolace DNA.....	41
3.4.3. Splinkerette PCR.....	42
3.5. Použitý software.....	43
4. Výsledky.....	44
4.1. Reportérový expresní systém pro studium umlčování integrovaného proviru v transkribované oblasti genu.....	44
4.2. Konstrukce expresních vektorů.....	49
4.3. Průkaz účinnosti expresního systému.....	55
4.4. Předběžná pozorování provirového umlčování v buněčných klonech.....	59
5. Diskuze.....	64
6. Závěr.....	70
7. Seznam použitých zkratk.....	71
7.1. Seznam zkratk histonových modifikací.....	72
8. Seznam použitých informačních zdrojů.....	73

1. Úvod

Retroviry jsou hojně studovány. Ačkoliv je mnoho z nich významnými patogeny, jsou retroviry využívány jako vektory pro přenos genů při genové terapii. Součástí životního cyklu retrovirů je integrace provirové DNA do hostitelského genomu. Od toho se odvíjí potíže související s léčbou.

Pro úspěšnou genovou terapii je důležitý výběr integračního místa, tedy bezpečnost integrace a stabilní exprese proviru. Je potřeba zkonstruovat retrovirový vektor, který by se neintegroval do blízkosti protoonkogenu a aktivační tumorogenezi nezvyšoval jeho expresi. Důležitost tohoto studia potvrzují komplikace genové terapie, při které byl pomocí vektoru odvozeného od gamaretroviru vnášen gen do CD34+ hematopoietických buněk pacientů s těžkou kombinovanou deficiencí (Severe Combined Immunodeficiency Disease, SCID), X-vázanou SCID (Hacein-Bey-Abina et al, 2008). Zároveň musí být dostatečně stabilní exprese integrovaného vektoru, aby byla léčba účinná. Různé retroviry upřednostňují různá integrační místa, což má vliv na jejich expresi. Např. většina integrovaných provirů viru lidské imunodeficience (Human Immunodeficiency Virus, HIV) je umlčována (Mok et al, 2007).

1.1. Integrace retrovirů a jejich integrační preference

Reverzní transkripcí jednořetězcové virové RNA vzniká dvouřetězcová provirová DNA s dlouhými terminálními repeticemi (Long Terminal Repeats, LTR) na obou koncích. Integráza váže LTR a katalyzuje dvě chemické reakce. První je úprava 3' konců obou LTR za vzniku OH-skupin. Upravená DNA je připravena k transportu. Při druhé reakci integráza štěpí chromozomální DNA a připojí 3'-OH konce k 5' fosfátům cílové DNA. Místo integrace je pak opraveno buněčnými reparačními enzymy. Integrací se provirus stává stálou součástí genomu buňky. (Krishnan a Engelman, 2012)

Integrace retroviru je provázena duplikací krátké sekvence v hostitelském genomu o velikosti 4-6 bp na obou koncích provirové DNA. U lentivirů je duplikováno 5 bp, u viru myši leukémie (Murine Leukemia Virus, MLV) a viru kočičí imunodeficience (Feline

Immunodeficiency Virus, FIV) dochází k duplikaci 4 bp a ptačí sarkomové a leukózní viry (Avian Sarcoma/Leukosis Virus, ASLV) a virus lidské T leukémie 1 (Human T-Leukemia virus 1, HTLV-1) mají duplikováno 6 bp, ačkoliv v 25% případů ASLV generuje také 5 bp duplikace. (Derse et al, 2007)

Sekvence rozeznávané integrázou jsou nepříbuzné, ale přesto je konzervován dinukleotid CA, který se téměř vždy nachází dvě báze od konce neintegrovaneho proviru. Výměna báze má za následek oslabení aktivity integrázy. Jako nejúčinnější sekvence pro integraci ASLV byly stanoveny 5'-AAGACTACA-3' na U3 konci a 5'-AAGGCTTCA-3' na U5 konci. Nejúčinnější pro HIV byly stanoveny sekvence 5'TCTCTAGCA-3' na U5 konci a 5'-GCCCTTCCA-3' na U3 konci. ASLV U3 konec je mnohem účinnější substrát při integraci než U5, u HIV je tomu naopak. Nebyla pozorována žádná silná preference pro žádnou specifickou bázi v rozeznávané sekvenci, každý nukleotid sekvence přispívá k integraci nezávisle. Nicméně nukleotidy blíže k volným koncům hrají mnohem důležitější roli v rozeznání integrázou a připojení k hostitelské DNA. Při substituci U3 koncové sekvence není ovlivněna virová replikace, ale substituce U5 sekvence ovlivňuje reverzní transkripci díky narušení sekundární struktury. (Zhou et al, 2001)

Rozdílné retroviry mají rozdílné preference pro integrační místa. Hlavními virovými komponentami zodpovědných za výběr místa integrace jsou integrázy. Při záměně integrázy přebírá virus integrační preference toho viru, ze kterého integráza pochází. (Lewinski et al, 2006) Retroviry a z nich odvozené vektory mají tedy stejné integrační vzory, protože integráza se váže na LTR. Není rozeznávána primární sekvence hostitelské DNA, ale svou roli hraje ohýbání DNA po navázání proteinů, omotání DNA kolem nukleozomů a DNáza I hypersenzitivní místa (Müller a Varmus, 1994; Roth et al, 2011). Tyto preference vyplývají z dostupnosti cukr-fosfátové kostry pro integrázu a její aktivitu. Buněčné kofaktory vázající se na integrázu mohou mít roli v řízení integrace selekcí místa integrace (Mitchell et al, 2004; Derse et al, 2007).

V následujících odstavcích budou popsány preference vybraných retrovirů. Po sekvenování celého lidského genomu bylo možné provádět studie zabývající se celogenomovými integračními preferencemi. Roku 2002 byla publikována první práce, ve které byly mapovány integrační místa HIV-1 uveřejněná v publikacích. Integrační místa se

nacházela v genech, oblastech bohatých na G/C a oblastech se zvýšenou genovou hustotou. (Elleder et al, 2002) O několik měsíců později byla publikována druhá práce, která se opět věnovala celogenomovým preferencím integrace HIV-1 a potvrdila předcházející výsledky (Schröder et al, 2002).

HIV se preferenčně integruje do tkáňově specifických, aktivních genů. Geny s extrémně vysokou expresí preferovány nejsou. S 75-80% frekvencí se HIV integruje do transkripčních jednotek (Transcriptional Unit, TU). Vyhýbá se CpG ostrovům (Mitchell et al, 2004), HIV upřednostňuje oblasti s vysokou hustotou genů v kontextu míst bohatých na A/T. (Berry et al, 2006).

Transportu do jádra a navádění preintegračního komplexu HIV k chromatinu je napomáháno růstovým faktorem odvozeným z epitelu čočky/p75 (Lens Epithelium-Derived Growth Factor/p75, LEDGF/p75) (Llano et al, 2004). Preintegrační komplex se váže na C-konec proteinu LEDGF/p75, který obsahuje tzv. integrázu vázající doménu. Buňkou je také kódován protein HRP-2 (Hepatoma-Derived Growth Factor-Related Protein 2), který má rovněž integrázu vázající doménu, ale chybí mu již doménu k vazbě na chromatin. Při depleci LEDGF/p75 není integrace HIV směřována, je snížena frekvence integrace do TU. (Venegas et al, 2005) Pokud je integrázu vázající doména substituována doménou vázající histonové modifikace H3K9me2 (zkratky histonových modifikací vysvětleny v kap. 7.1.) nebo H3K9me3, dochází ke změně integračních preferencí a preintegrační komplex je směřován do intergenových oblastí. (Gijssbers et al, 2010). Jedná se o další způsob, vedle záměny integrázy, jak změnit preferenci integrovaných provirů.

MLV se preferenčně integruje blízko 5' konce genů v místě transkripčního startu (Transcription Start Site, TSS) (Mitchell et al, 2004). Konkrétněji preferují oblasti s vysokým podílem G/C bází, blízkost CpG ostrovů, místa hypersenzitivní k DNáze I značící oblasti vazby transkripčních faktorů, regulační oblasti genů. (Berry et al, 2006)

15% integračních míst MLV bylo nalezeno +/- 1 kb od TSS, což výrazně převyšuje náhodnou integraci s 1,3% integrací +/- 1 kb od TSS. Nejvyšší frekvence integrace je dosaženo +500 bp a -500 bp od TSS a naopak v oblasti -80 a +20 od TSS je výrazný propad preference integrace. Aktivní promotory označené histonovou modifikací H3K4me3 jsou 15krát preferovanější než inaktivní promotory. Pokud je v analýze zohledňována větší oblast

obklopující TSS (+/- 2,5 kbp), potom je kolem TSS 25% všech integrovaných MLV. Nejsilnější jsou asociace MLV a histonových modifikací H3K4me1 a H3K27ac. H3K4me1 značí enhancery a H3K27ac označuje aktivní enhancery. Největší preferenci tedy MLV vykazuje pro aktivní enhancery. (Ravin et al, 2014)

MLV je značně genotoxický, což potvrzuje následující klinická studie. Devět z deseti pacientů s X-vázaným onemocněním SCID bylo úspěšně vyléčeno genovou terapií vektorem odvozeného od gamaretrovirů, ale u čtyř pacientů z těchto devíti se rozvinula T buněčná leukémie v průběhu třiceti jednoho až šedesáti osmi měsíců po provedení terapie. Dva případy leukémie byly popsány již v roce 2003, další dva pak v roce 2008. U dvou pacientů došlo k rozvoji leukémie, protože se provirus integroval do blízkosti protoonkogenu *LMO2* (z anglického LIM domain-only 2), čímž došlo k zvýšení transkripce protoonkogenu a následné klonální T buněčné proliferaci. Dále byly zaznamenány chromozomální translokace, jak odpovídá představě, že rakovina je proces sestávající z několika po sobě jdoucích událostí vedoucích k transformaci. V souladu s jinými studiemi (Mitchell et al, 2004; Derse et al, 2007; Berry et al, 2006) se gamaretroviry preferenčně integrovaly do blízkosti TSS. U jednoho pacienta se provirus v leukemických buňkách integroval 2 440 bp upstream od TSS pro gen *CCND2*, který kóduje cyklin D2. U druhého pacienta se jeden provirus integroval do druhého intronu genu *LMO2*, 10,6 kb od TSS, a další provirus se integroval do intronu genu *SPAG6* (z anglického Sperm Associated Antigen 6), 49 497 bp od TSS protoonkogenu *BMI1*. U tří z těchto čtyř zvláště zmíněných pacientů se pomocí chemoterapie podařilo leukémii vyléčit a pacienti mohli dále profitovat z genové terapie. (Hacein-Bey-Abina et al, 2008)

Proteiny s bromodoménou a extraterminální doménou (Bromodomain and Extraterminal Domain, BET), Brd2, Brd3 a Brd4, jsou hlavními buněčnými proteiny směřující MLV do TSS prostřednictvím jejich interakce s virovou integrázou. MLV integráza obsahuje tři domény, N-terminální doménu (N-Terminal Domain, NTD), katalytickou doménu (Catalytic Core Domain, CCD) a C-terminální doménu (C-Terminal Domain, CTD). Interakci mezi integrázou a BET proteiny zajišťují CTD doména integrázy a extraterminální (Extraterminal, ET) doména proteinů BET (Gupta et al, 2013; Sharma et al, 2013; Rijck et al, 2013). Pokud integráza neinteraguje s proteiny BET, integruje se MLV s menší preferencí pro TSS. (El Ashkar et al, 2014) BET interakce je specifická pro MLV integrázu (Llano et al, 2004).

Virus nádoru mléčné žlázy u myší (Mouse Mammary Tumor Virus, MMTV) je asociován s adenokarcinomy prsní žlázy a T buněčnými lymfomy v myších. Vznik těchto tumorů je převážně spojen s inzerční mutagenezí. MMTV nepreferuje TU v lidských ani v myších buňkách. Při rozdělení genů na osm stejně velkých regionů není preference pro určitou část genu. MMTV nepreferuje TSS, CpG ostrovy nebo repetitivní elementy. (Faschinger et al, 2008) MMTV s nízkou účinností infikuje lidské buňky, ale po určitém počtu replikačních cyklů v lidských buňkách je zvýšena replikační kinetika oproti rodičovskému viru. Substitucí jedné aminokyseliny v receptor vázající doménu obalového proteinu (G42E) je virus schopen infikovat i jiné buňky než myší (Konstantoulas et al, 2015), což spolu s náhodnou integrační preferencí dělá z MMTV vhodný vektor pro genovou terapii.

ASLV je v Oddělení virové a buněčné genetiky v Ústavu molekulární genetiky (ÚMG) studovaným modelem a jeho studiem se zabývám i v této diplomové práci. V mononukleárních buňkách periferní krve vykazuje ASLV slabé preference pro aktivní geny, ale nepreferuje TSS (Mitchell et al, 2004). Oproti HIV a MLV vykazuje ASLV v CD34+ hematopietických kmenových/progenitorových buňkách mírnou preferenci pro geny nebo promotory, neintegruje se do CpG ostrovů, náhodně integruje do repetitivních elementů. ASLV vykazuje téměř náhodný integrační profil. (Moiani et al, 2014) V HeLa buňkách se ASLV integruje se slabou preferencí do genů bez ohledu na jejich transkripční aktivitu, ale na rozdíl od MLV se neintegruje do blízkosti TSS (Narezkina et al, 2004).

Výše zmíněné studie zabývající se integrací ASLV byly prováděny na savčích buňkách. Barr a spol. v roce 2005 publikovali práci, která je prováděna na buňkách ptačích. Dále ptačí buňky infikovalivirem HIV a sledovali, zda se změní integrační preference. V ptačích buňkách ASLV slabě preferuje aktivní TU a HIV silně preferuje aktivní TU. Preference jsou tedy shodné s lidskými buňkami. Předpokládané faktory směřující preintegrační komplex k hostitelské DNA zřejmě tedy existují v kuřatech i v lidech. Dále pro ASLV a HIV nebyla pozorována preference pro integraci v blízkosti 5' nebo 3' přiléhající oblasti genu. (Barr et al, 2005)

Kuřecí genom lze dělit na makrochromozomy a mikrochromozomy. Obecně platí, že větší chromozomy jsou A/T bohaté, naopak mají málo CpG ostrovů, obsahují hustě repetice, mají méně genů s delšími introny. Mikrochromozomy mají opačné charakteristiky. Kuřata mají ve svém genomu rozsáhlou skupinu endogenních retrovirů, které jsou příbuzné

replikačně-kompetentním ASLV (dvě hlavní skupiny: skupina K a skupina L). Tyto retroviry jsou akumulovány hlavně mimo TU, a pokud jsou v TU (11,2% skupina K a 19% skupina L), tak v intronech a v antisense orientaci, takže nenarušují syntézu buněčných mRNA, s pravděpodobně minimálním efektem na hostitelské TU. Protože se jedná o endogenní retroviry, byla jejich distribuce nejspíše selektována proti narušení genů hostitele (vs. 37,1% *de novo* integrovaných ASLV v TU). Podobně je tomu u endogenních retrovirů člověka, myši nebo krysy. Pokud se ASLV integruje do TU *de novo*, nevykazuje upřednostňování orientace, sense nebo antisense. (Barr et al, 2005)

Další příklad selekce je práce publikovaná Plachým a spol. (2010), ve které sledovali vzor integrace, selekci distribuce, ASLV způsobujících tumory v kuřatech po infekci tímto virem. Tato distribuce byla silně nenáhodná, proviry se nacházely v TU nebo v jejich blízkosti. Analyzované buňky měly vysokou míru exprese v-src onkogenu podílejícího se na tumorogenním růstu. (Plachý et al, 2010)

Proviry byly identifikovány v makro- i mikrochromozomech, nacházely se v oblastech s vysokou hustotou G/C, ne s nejvyšší. Preferovaly oblasti bohaté na geny, největší hustota byla pozorována v místě obsahujícím sedm až osm genů na 50 kb. Byla signifikantní preference pro TU (v porovnání s intergenovými oblastmi) a CpG ostrovy. Integrační místa vytvářela klastry +/- 5 kb okolo TSS. Tkáňově nespecifické geny byly upřednostňovány transkripčně aktivními proviry. Pouze 3,3% genů představovaly tkáňově specifické geny. Stejně tomu bylo u tumorů indukovaných virem Roussova sarkomu (Rouss Sarcoma Virus, RSV), integrace byla především v GC bohatých oblastech a oblastech bohaté na geny, především pak široce tkáňově exprimovaných genech. (Plachý et al, 2010)

Plachý a spol. (2010) prováděli studii s RSV, který nese onkogen v-src. RSV je tedy akutně transformující virus. Tumory, které tak vznikly, jsou způsobené jedním integrovaným virem, který je dlouhodobě a vysoce aktivní. Tato vlastnost je dána okolním genomem. Jiná práce, Pajer a spol. (2006), identifikuje tzv. obecná integrační místa (Common Integration Sites, CIS). Tato integrační místa vznikla infekcí viru asociovaného s myeloblasty typu 2 (Myeloblastosis-Associated Virus Type 2, MAV-2), který indukuje nefroblastomy v kuřatech. MAV-2 neobsahuje žádný virový onkogen, tumory vznikly chronickou infekcí. Tento odlišný

metodický způsob umožňuje identifikovat kandidátní geny podílející se na rozvoji tumoru. (Pajer et al, 2006)

Derse a spol. (2007) porovnávali integrační vzory provirů viru opičí imunodeficiencie (Simian Immunodeficiency Virus, SIV), HIV, FIV, MLV, HTLV-1 a ASLV. HTLV-1, podobně jako ASLV, necílí specificky TU a TSS. HTLV-1 má slabou, ale signifikantní preferenci pro TSS a promotory. Podobné vzory integrace mají SIV a HIV. SIV preferuje geny s frekvencí 80% a HIV s frekvencí 72%. FIV geny nepreferuje, ale spolu s MLV upřednostňuje TSS. Uvnitř genů se HTLV-1 a ASLV integrují rovnoměrně, HIV a SIV preferují střední oblasti genů. (Derse et al, 2007)

Po fylogenetické analýze bylo prokázáno, že viry s podobnými preferencemi mají příbuzné geny pro integrázy. Globální integrační profily dalších retrovirů mohou být předpověděny z fylogenetického porovnání integrázy, která je hlavní virovou determinantou ovlivňující integraci proviru. (Derse et al, 2007)

1.2. Epigenetické mechanismy umlčování retrovirů

Různé proviry jsou odlišně umlčovány v různých typech buněk epigenetickými mechanismy. Umlčování je prováděno stejnými mechanismy jako u jaderných genů. MLV je sekvenčně specificky umlčován v embryonálních kmenových (Embryonic Stem, ES) buňkách nebo embryonálních nádorových (Embryonic Carcinoma, EC) buňkách (Schlesinger a Goff, 2012). RSV LTR je extrémně citlivý na metylaci v savčích buňkách, ale potřebuje vysokou úroveň metylace, aby byl umlčen v ptačích buňkách (Hejnar et al, 1999). Metylaci viru HIV je napomáháno ustanovení latentní infekce. Umlčení může být okamžité bez exprese proviru, nebo po proběhnutí akutní infekce může docházet k postupnému umlčování (Matsuda et al, 2015).

Epigenetické změny mohou být reverzibilní, anebo dědičné. Mezi epigenetické mechanismy patří metylace DNA a histonové modifikace. Modifikací DNA savců je metylace cytosinu na pozici pět, čímž vzniká 5-metylcytosin. Metylace probíhá v kontextu dinukleotidů CpG. Metylace DNA je mechanismus běžně buňkou využívaný k regulaci transkripce. (Turek-

Plewa a Jagodzinski, 2005) Úroveň metylace promotorů koreluje s umlčováním transkripce. (Curradi et al, 2002)

Metylaci CpG v buňce zajišťují DNA metyltransferázy (DNA methyltransferases, DNMT). Tzv. udržovací DNMT1 je součástí multiproteinového DNA replikačního komplexu (Vertino et al, 2002) a je přítomna během reparace DNA (Mortusewicz et al, 2005), protože jejím N-koncem váže ke svorkovému proteinu PCNA (z anglického Proliferating Cell Nuclear Antigen) (Iida et al, 2002). DNMT1 se k DNA neváže přímo, ale přes protein UHRF1 (z anglického Ubiquitin-Like, Containing PHD (Plant Homeo Domain) and RING (Really Interesting New Gene) Finger Domains 1). Doména SRA (z anglického SET and RING Associated) proteinu UHRF1 interaguje s velkým i malým žlábkem DNA a s vysokou afinitou váže hemimetylovaný CpG. Otočí 5mC ven z helixu a obklopí ho. (Hashimoto et al, 2008) UHRF váže DNA i bez interakce s DNMT1, při depleci UHRF1 dochází k výraznému poklesu metylace (Bostick et al, 2007).

K DNMT1 jsou vzdáleně příbuzné tzv. *de novo* DNA metyltransferázy DNMT3A a DNMT3B (Bestor, 2000). Jejich aktivita je primárně regulována na úrovni cílení DNMT k DNA. Váží s vysokou afinitou oblasti s CpG a předchází metylace neovlivňuje jejich aktivitu. Navzájem jsou částečně zastupitelné. (Baubec et al, 2015) Za směřování DNMT ke konkrétním elementům jsou zodpovědné jejich domény. Exon 10 DNMT3B je zřejmě důležitý pro *de novo* metylaci DNA. (Choi et al, 2011).

Ačkoliv nejsou *de novo* DNMT sekvenčně specifické vykazují určité preference míst metylace. DNMT3A preferuje thymin v pozici -2 od CpG a v pozici +2 cytosin, nejméně metylovaná místa měly v pozici -2 a +2 od CpG guanin. DNMT3A metyluje i CpT a CpA místa v buněčné linii HEK293 EBNA1. DNMT3B preferenčně metyluje oblasti s thyminem v pozici -1 a s guaninem v pozici +1. Je tedy možné, že touto preferencí mohly být selektovány sekvence promotorů obsahující CpG. (Wienholz et al, 2010)

Další DNA metyltransferáza DNMT3L (z anglického DNMT3-like). Ta sama o sobě nemá metylační aktivitu, ale opět je regulační. Stimuluje aktivitu DNMT3A při imprintingu (Chédin et al, 2002). C-terminální konec DNMT3L je zodpovědný za zesílení metylační aktivity DNMT3A. DNMT3L necílí *de novo* DNMT na specifickou DNA sekvenci (Suetake et al, 2004), ale je asociována s histonovým core. Váže se k N-konci histonu H3. Vazbě mezi DNMT3L a

histonem H3 brání metylace H3K4 (Ooi et al, 2007), která patří mezi aktivační histonové modifikace (Barski et al, 2007). Modifikace jiných pozic vazbě nebrání. DNMT3L tak může svou interakcí s DNMT3A aktivovat nebo směřovat *de novo* methylaci. (Ooi et al, 2007)

Je mnoho sestřihových variant DNMT3B, ne všechny jsou katalyticky aktivní. Inaktivní izoformy vážou aktivní a tvoří s nimi komplexy. Katalyticky inaktivní formy plní regulační funkci. Např. izoforma DNMT3B3 zvyšuje aktivitu DNMT3A2 a DNMT3B4 po vazbě s DNMT3B2 metylační aktivitu snižuje. (Gordon et al, 2013)

Metylovaná DNA je rozeznávána proteiny s metyl vázající doménou (Methyl-Binding Domain, MBD). MBD se za fyziologických podmínek váže se zvýšenou afinitou k metylovanému CpG (mCpG), zatímco k CpG se váže s mnohonásobně nižší afinitou (< 86 násobně). (Khrapunov et al, 2014) Jedním z proteinů vázajících metylovanou DNA je protein MeCP2 (Methyl CpG Binding Protein 2) (Lorincz et al, 2001). MeCP2 je důležitý pro vývoj neuronů, působí globální změny chromatinu během neuronálního vývoje (Singleton et al, 2011). Mutací v genu MeCP2 vzniká vzácné onemocnění vývojové regrese, Rettův syndrom. Při deficienci MeCP2 dochází k hyperacetylaci histonu H4, převážně na lysinu 16. (Wan et al, 2001)

Dalšího protein vázající mCpG je protein s doménou vázající metylovaný cytosin 2 (Methyl Cytosine Binding Domain Protein 2, MBD2), který je za normálních podmínek asociován s proliferací buněk prsní tkáně. Exprese MBD2 a MeCP2 je zvýšena při vývoji prsních žláz. Ve třicátém třetím týdnu těhotenství je již úroveň transkripce MeCP2 plodu shodná s úrovní transkripce prsních žláz u dospělého člověka. (Billard et al, 2002) V nádorových buňkách jsou často metylovány tumor supresorové geny. Umlčování zajišťuje MBD2, jehož knockdown vyústí v signifikantní zastavení růstu buněk nádoru prsu oproti kontrole. Buňky se morfologicky přibližují netransformovaným lidským prsním epiteliálním buňkám, ale agresivnější nádorové linie jsou deficienci MBD2 méně citlivé. Knockdown MBD2 neovlivňuje úroveň metylace, po znovuoživení funkční hladiny proteinu MBD2 jsou metylované geny znovu umlčeny. (Mian et al, 2011)

Dalším epigenetickým mechanismem jsou histonové modifikace. Histony a z nich skládané nukleozomy jsou první z mnoha úrovní chromatinové struktury. Kolem histonového oktameru tvořeného histony H2A, H2B, H3 a H4 je omotáváno 146 bp DNA. (Sterner a

Berger, 2000) N-konce histonů se výrazně nepodílejí na struktuře histonů a vazbě k DNA, ale přesto N-konce histonů H2B a H3 přispívají ke stabilitě nukleozomů (Morales a Richard-Foy, 2000).

Existuje velké množství histonových modifikací, metylace a acetylace. Jsou aktivační i represivní. Mezi aktivační patří např. H3K4me3, H3K4me2, H3K9me1, H3K27me1, H3K36me3, H3K79me3 a H4K20me1. Mezi represivní patří např. H3K9me3, H3K9me2, H3K27me3 a H3K27me2. (Barski et al, 2007). Modifikace H3K4me1 označuje enhancery, ale pouze aktivní enhancery nesou specifickou acetylaci (H3K27ac) (Creyghton et al, 2010). Virové LTR jsou pak např. reprimovány histonovými modifikacemi H3K9me3 a H4K20me3 (Shalginskikh et al, 2013).

Hyperacetylované N-konce histonů H3 a H4 umožňují relaxaci DNA. Interakce histonů H2A a H2B jsou dostatečné ke stabilizaci struktury. (Morales a Richard-Foy, 2000) Acetylace H3 a H4 je prováděna histonovými acetyltransferázami (Histone Acetyltransferase, HAT), které připojují acetylový zbytek z acetyl-koenzymu A na N-konec histonů. Acetylace lysinu neutralizuje kladný náboj histonových konců, tím je umožněna konformační změna a DNA se stane přístupnější pro transkripční faktory. Histonová acetylace je proces vratný histonovými deacetylázami (Histone Deacetylases; HDACs) (Sterner a Berger, 2000)

Vedle HAT a HDAC jsou za modifikace histonů zodpovědné různé histonové metyltransferázy. Např. histonová metyltransferáza Set2 jejím N-koncem interaguje s lysinem na histonu H4. Tato interakce je důležitá pro H3K36me2/3. Bez N koncové domény Set2 nedochází k metylaci. (Du et al, 2008) Myší metyltransferáza ESET (z anglického ERG-Associated Protein With SET Domain), z 92% identická s lidským proteinem SETDB1 (SET Domain Bifurcated 1), specificky metyluje histon H3 na lysinu 9 (Yang et al, 2002). Je známo, že knockout Setdb1 vyústí v úbytek H3K9me3. (Liu et al, 2014)

Methyltransferáza G9a je nezbytná pro účinnou metylaci v ES buňkách. V buňkách deficientních na G9a dochází ke snížení hladiny H3K9me2. Katalyticky aktivní G9a je kritická pro umlčování nově integrovaných provirů. Zatímco G9a je důležitá pro ustanovení umlčení, za udržování metylace je zodpovědná ESET. (Leung et al, 2011)

Existuje blízký vztah mezi metylací DNA a histonovými modifikacemi. DNMT3A preferuje vazbu k místům značených H3K4me3 (Choi et al, 2011), což je modifikace značící aktivní části genomu (Barski et al, 2007). DNMT3B preferenčně cílí H3K36me3 (Baubec et al, 2015) a H3K27me3 (Choi et al, 2011). Při absenci H3K36me3 se okamžitě projeví úbytek metylace DNA. Pokud jsou transkribované oblasti genů metylovány a značeny H3K36me3, pak promotory těchto genů jsou nemetylované a mají nízkou hladinu represivních modifikací H3K27me3, H3K9me3 a H4K20me3. (Hahn et al, 2011)

MeCP2 může reprimovat transkripci v asociaci s HDAC nebo mechanismem na HDAC nezávislým (Yu et al, 2000). MBD1 váže mCpG a také SETDB1 (Sarraf a Stancheva, 2004), čímž dochází k provázání DNA metylace a histonové modifikace H3K9. Na H3K9me1 se pak váže heterochromatinový protein 1 (HP1) (Jacobs et al, 2001). Prostřednictvím Suv39h1 váže MBD1 HDAC (Fujita et al, 2003). MBD2 a MBD3 vytváří homo- nebo hetero-dimery. Mohou vázat metylovanou i hemi-metylovanou DNA, HBD3 má represivní funkci rekrutováním HDAC. (Tatematsu et al, 2000)

G9a ovlivňuje DNA metylaci retrovirových LTR. DNA metylace promotorů je sice závislá na G9a, ale stupeň vlivu G9a na DNA metylaci závisí na konkrétním promotoru. V buňkách deficientních na G9a dochází k částečnému snížení metylační aktivity a obnovení G9a je dostatečné pro nové ustanovení DNA metylace v ES buňkách deficientních na G9a. Tato závislost mezi G9a a DNMT není dána katalytickou aktivitou G9a. (Dong et al, 2008) DNMT1 přímou interakcí váže G9a, PCNA navádí G9a a DNMT1 k DNA (Estève et al, 2006).

Epigenetické mechanismy jsou zodpovědné za umístování značek genové exprese a vytvářejí tzv. epigenetický kód, který spolu s genetickým kódem reguluje veškeré buněčné procesy.

Endogenní retroviry (Endogenous Retrovirus, ERV) jsou specificky sekvenčně rozeznávány (Rowe a spol., 2013) proteiny rodiny KRAB-ZFP (z anglického Krüppel-Associated Box Zinc Finger Proteins), které tvoří největší rodinu transkripčních represorů (de Sio, 2014). Tato vysoká rozmanitost je výsledkem koevoluce ERV a KRAB-ZFP (Lukic et al, 2014). KRAB-ZFP mají tandemově uspořádané zinkové prsty na C-konci, kterými vážou specifické polynukleotidové sekvence, a jednu nebo dvě domény KRAB na N-konci pro vazbu proteinu KAP1 (z anglického KRAB Associated Protein 1). Protein KAP1 je znám i pod názvy

TRIM28, TIF1 β a KRIP1. Má několik domén a funguje jako „scaffold“ pro další proteiny. (de Sio, 2014) KRAB-ZFP a KAP1 mohou umlčovat promotory vzdálené několik desítek kbp od jejich místa navázání prostřednictvím šíření histonové modifikace H3K9me3 a proteinu HP1. (Groner et al, 2010) Při nulové mutaci KAP1 dochází k redukci represivní histonové modifikace H3K9me3 a aktivaci transkripce endogenních retrovirů (Turelli et al, 2014; Fasching et al, 2015). Umlčování ERV hraje důležitou roli při embryonálním vývoji, ale v somatických buňkách je tento mechanismus postradatelný (Wolf et al, 2015).

Existuje vztah mezi umlčováním exogenních a endogenních retrovirů. MLV je rychle umlčováno v ES buňkách mechanismem závislým na ZFP809 (Schlesinger a Goff, 2012). ZFP809 rozeznává vazebné místo pro prolinovou tRNA na provirové DNA a dále váže protein KAP1, které zprostředkuje umlčení proviru (Wolf a Goff, 2009).

Protein KAP1 se účastní mnoha protein-proteinových interakcí, váže např. histonové metyltransferázy SETDB1 (Sripathy et al, 2006; Schultz et al, 2002) a ESET (Leung et al, 2011) a DNA metyltransferázu DNMT3A (Zuo et al, 2012).

1.3 Ochrana vektorů před umlčováním

V genové terapii jsou snahy o úpravy provirové DNA tak, aby se zvýšila stabilita a intenzita exprese vektorů. Bylo použito několik různých přístupů. Jako první byla mutována místa CpG. Další možností je vložení inzulátorů, které mají protektivní charakter. Poté co byly identifikovány negativní elementy, byly ze sekvencí odstraňovány. Dalším přístupem je použití CpG ostrovů.

CpG místa jsou místy metylace DNA, a proto byla snaha o jejich odstranění. CpG se nachází i v MLV LTR. Po mutaci těchto míst docházelo ke zvýšení stability proviru. (Swindle et al, 2004)

Enhancery fungují na dlouhé vzdálenosti. Existují mechanismy, které omezují dosah jejich fungování, proto mohou být aktivní i umlčené chromatinové domény blízko sebe. Jedním z elementů jsou inzulátory. (Valenzuela a Kamakaka, 2006) Kontrolní oblast, hypersenzitivní místo 4 (Hypersensitive Site 4, HS4) beta-globinového lokusu, vložená do

retrovirového vektoru zvyšuje stabilitu vektoru a zesiluje expresi. (Benabdellah et al, 2014) Práce Emery a spol. (2000) využila kuřecí inzulátor k ochraně myšího viru kmenových buněk, který tak byl úspěšně chráněn před umlčováním. (Emery et al, 2000) Na druhou stranu vektor s kuřecím inzulátorem HS4 integrovaný do blízkosti protoonkogenu může ovlivňovat zvyšování exprese tohoto protoonkogenu (Desprat a Bouhassira, 2009).

Dalším použitým inzulátorem byl lokus z genu pro arylsulfatázu z mořské ježovky. Tento lokus byl vnášen do lentivirových vektorů. V některých buněčných liniích měl výrazný protektivní charakter, záleží ovšem také na orientaci inzulátoru. (Hino et al, 2004)

MLV je v ES buňkách umlčován mechanismem využívajícím KRAB-ZFP, které rozeznávají místo vazby tRNA pro prolin na provirové DNA. Mutací tohoto místa se snižuje míra umlčování viru. (Wolf a Goff, 2009)

Virus RSV je výrazně umlčován v savčích buňkách, ale je velmi stabilní v buňkách ptačích (Hejnar et al, 1999). RSV integrované v savčích genomech jsou většinou inaktivovány. Výjimku tvoří vzácná permisivní místa pro expresi RSV. CpG ostrovy křeččího genu *aprt* přilehlé k provirům RSV v orientaci 5'-3' zvyšují frekvenci stabilních provirů asi třicetkrát, opačná orientace snižuje frekvenci stabilních provirů. Podobně křeččí CpG ostrovy s mutovanými vazebnými místy Sp1 mají v orientaci 5'-3' frekvenci výskytu stabilních provirů sníženu, ale při opačné orientaci mutovaných CpG ostrovů je ochrana provirů před umlčením neúčinná. I přes přítomnost CpG ostrovu jsou integrované RSV silně ovlivňovány okolní DNA. (Hejnar et al, 2001) Tento přístup byl dále rozvíjen.

Vnitřní element CpG ostrova křeččího genu *aprt*, o délce 120 bp obsahující osm dinukleotidů CpG a dvě vysokoafinitní místa vázající transkripční faktor Sp1, byl vkládán do RSV LTR. Po transdukci vektorů, modifikovaných i nemodifikovaných, do ptačích buněk byly klony dlouhodobě stabilní. Jiná situace nastala při transdukci do savčích buněk. Nemodifikované vektory byly umlčeny a modifikované vykazovaly různé stupně transkripčního umlčování. Vložený element poměrně dobře stabilizoval dlouhodobou expresi vektorů, aniž by ovlivňoval úroveň jejich transkripce. Vektory s mutovaným Sp1 mají signifikantní pokles protektivního účinku. Inhibitory DNMT a HDAC reaktivují expresi vektorů. Jejich účinek však byl ovlivněn dobou aplikace. Čím déle po umlčení byly inhibitory

aplikovány, tím méně docházelo k reaktivaci. Úroveň metylace odpovídá míře stability proviru. (Šenigl et al, 2008)

Mutací CpG může docházet k poškození promotorů. Vkládání inzulátorů, dlouhých sekvencí, vektory zatěžuje. CpG ostrovy jsou oproti inzulátorům kratší. Odstraňování negativních elementů může mít stejně poškozující účinek jako mutace CpG.

1.4. Epigenomika

Dinukleotidy CpG jsou v genomu zřídka z důvodu vysoké mutační frekvence mCpG, který je chemicky deaminován za konverze na TpG. Dinukleotidy CpG mohou být shluknuté v tzv. CpG ostrovech. (Chatterjee a Vinson, 2012) CpG ostrov je definován jako oblast DNA větší než 500 bp obsahující z více než 55% CpG, CpG pobřeží je definováno jako oblast 0 až 2 kb od CpG v obou směrech a CpG šelf je definován jako oblast 2 až 4 kb od CpG ostrovů v obou směrech. Dinukleotidy CpG v CpG ostrovech jsou hypometylovány, CpG v pobřežích mají variabilní míru metylace a CpG v šelfech jsou hypermetylovány. Methylace sousedících CpG je závislá na genomickém kontextu. V rámci pobřeží se zvyšuje metylace směrem od ostrova po šelf. Toto uspořádání ostrova obklopeného pobřežími a šelfy vytváří symetrický metylační vzor. Samostatná místa CpG jsou hypermetylovány. (Zhang et al, 2015) Ačkoliv jsou geny často asociovány s CpG ostrovy, jsou v savčích genomech distribuovány nenáhodně (Han et al, 2008). V lidském genomu se CpG ostrovy nacházejí v promotorech nebo mohou zasahovat až do prvního exonu (Chatterjee a Vinson, 2012). Po evolučním průniku CpG ostrovů do promotorů mohla být účinněji regulována transkripce v souvislosti s metylací dinukleotidů CpG (Sharif et al, 2010). Hladina metylace CpG ostrovů v promotorech negativně koreluje s genovou expresí. Promotory s nízkou hladinou metylace jsou exprimovány ve více tkáních. (Du et al, 2012) Většina CpG ostrovů je hypometylována ve vývojových stádiích i dospělých tkáních (Miyahara et al, 2015).

CpG ostrovy mají velmi nízkou míru substituce CpG na TpG nebo CpA především díky malé míře metylace a s tím související mutační frekvencí. (Miyahara et al, 2015) Nemetylované CpG ostrovy korelují s vysokou hladinou H3K4me2 (Weber et al, 2007). Nemetylované ostrovy pak mohou být výsledkem bránění nasednutí DNMT3L navádějící

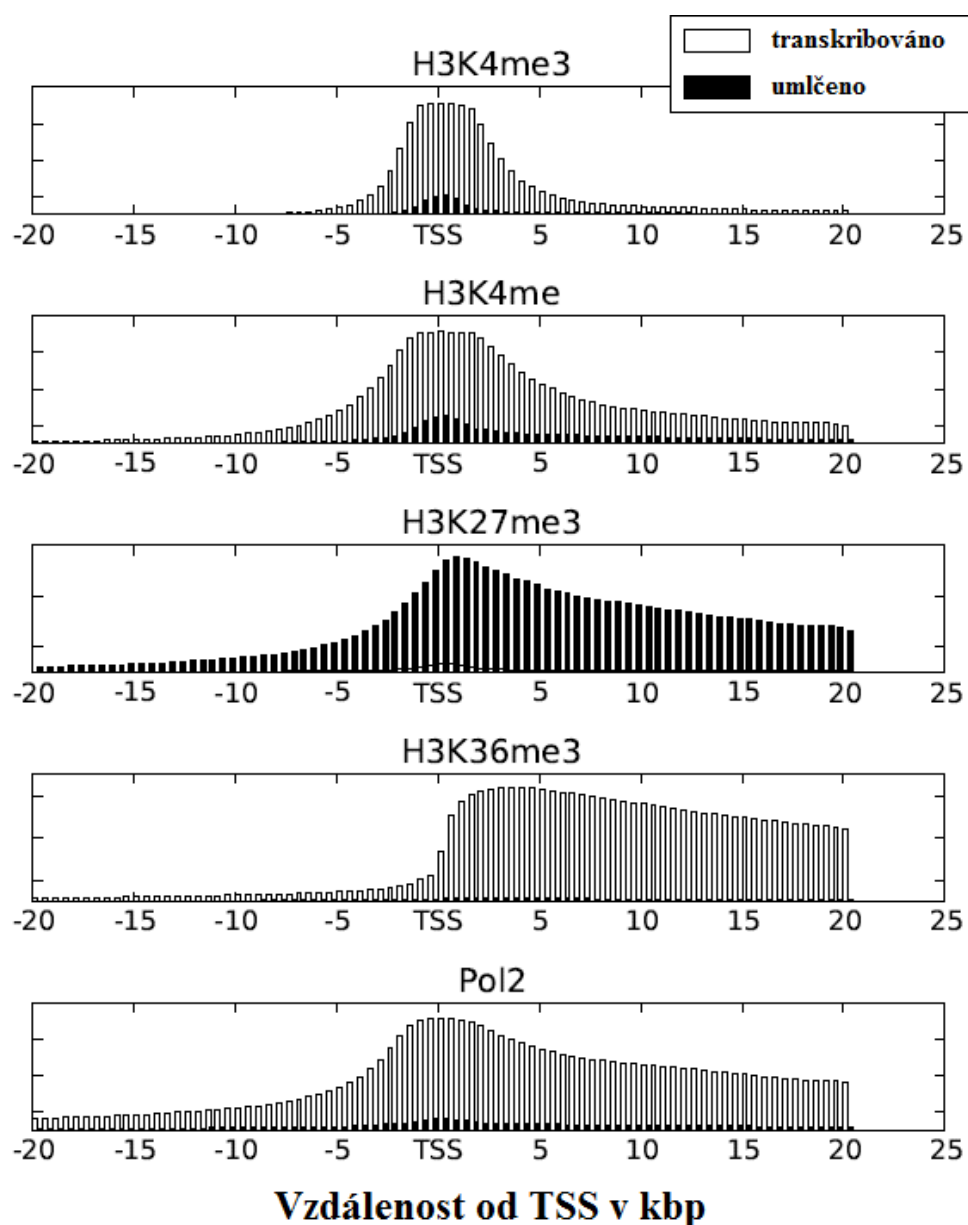
DNMT3A k DNA (Ooi et al, 2007), nebo může docházet k demetylaci. *In vitro* metylovaný transgen je v myších ES buňkách demetylován na 5' konci a 3' konec zůstává metylován (Frank et al, 1991).

Jak bylo již zmíněno, CpG ostrovy v promotorech nejsou metylovány a mohou být bez nukleozomů (Choi, 2010). Zvyšující se počet CpG destabilizuje chromatinovou strukturu, zvýšená četnost CpG na 5' konci pak zvyšuje účinnost transkripce (Krinner et al, 2014). Promotory bez CpG ostrovů pak již nukleozomy mají. CpG ostrovy v exonech jsou vysoce metylované a sbalené nukleozomy, toto uspořádání má zřejmě vliv na sestřih RNA. (Choi, 2010) Geny s CpG ostrovy mají vysokou hladinu histonových modifikací asociovaných s transkripční elongací H4K20me1, H2BK5me1 a H3K79me1/2/3 v 5' konci genů. Modifikace H3K36me1 pak obohacuje transkribované oblasti aktivních genů. (Vavouri a Lehner, 2012)

Metylace CpG ostrovů je normálním stavem, míra metylace ovlivňuje expresi (Du et al, 2012), např. CpG ostrov intronu 22 genu pro factor VIII na X chromozomu je převážně u mužů metylován (De Brasi et al, 2002). Ale metylace může být také aberantní, metylace CpG ostrovů tumor-supresorových genů se podílí na rozvoji nádorů (Kang et al, 2003; Lee et al, 2004).

Chromatinová imunoprecipitace (Chromatin Immunoprecipitation, ChIP) následovaná hybridizací na mikročipu (tzv. ChIP-ChIP) nebo „high-throughput“ sekvenování (tzv. ChIP-seq) umožňují studium interakcí mezi proteiny, transkripčními faktory nebo histonovými modifikacemi, a DNA. ChIP-seq umožňuje profily s lepším poměrem signálu a šumu, umožňuje detekci většího počtu vrcholů a užších vrcholů. (Ho et al, 2011) Výsledná mapa interakcí DNA a histonových modifikací je zobrazena jako sekvence s vyznačenými vrcholy jednotlivých modifikací. Pokud je některá oblast tzv. obohacena o nějakou modifikaci, je zde tato modifikace zastoupena více než jinde. Vrcholy mohou mít různou šířku a mohou vykazovat různé trendy (obr. č. 1.1).

Spojením mapování integračních míst provirů a epigenomických dat je možné posouzení vlivu integračního místa, a jeho modifikací, na provirus. Uvádí se pak různé korelace mezi aktivitou proviru a histonovou modifikací přilehlé genomové oblasti. Integrační místo ovlivňuje integrovaný provirus, ale o ovlivnění místa integrace provirem se příliš neví.



Obr. č. 1.1. Zastoupení histonových modifikací v genech – Zastoupení histonových modifikací se mění podle toho, jestli je gen aktivní (prázdné pruhy), nebo umlčen (vyplněné pruhy). (upraveno podle Rye et al, 2011)

Enhancery je možné dělit na tři podtřídy lišící se zastoupením histonových modifikací. Všechny enhancery jsou značeny histonovou modifikací H3K4me1, aktivní enhancery jsou navíc značeny H3K27ac a tiché enhancery mají H3K27me3. Protože geny spojené s

enhancery značenými H3K4me1, bez přítomnosti histonových modifikací H3K27ac a H3K27me3, mají expresi vyšší než tiché a nižší než aktivní, jsou označovány jako tzv. intermediární. Všechny tyto tři typy jsou ochuzené o H3K4me3. Aktivní enhancery obsahují vyšší hladinu H3K4me1, než další dvě skupiny. Tiché enhancery v ES buňkách se později ve vývoji stávají aktivními a mají více otevřenou chromatinovou konformaci, neboť jsou kontrolovány represivními mechanismy. Hlavní funkcí tichých enhancerů je exprese vývojově důležitých transkripčních faktorů. (Zentner et al, 2011)

Jednotlivé třídy enhancerů mohou být podle hladiny H3K4me1, H3K27ac a H3K27me3 dále děleny na podtřídy. Aktivní jsou např. děleny na tři podtřídy A1, A2 a A3. Hladina exprese genů asociovaných s aktivními enhancery koreluje s hladinou H3K36me3 a fosforylovanou formou RNA polymerázy II, tyto modifikace rovněž odlišují aktivní enhancery od zbylých dvou skupin. Tiché enhancery jsou kromě represivní modifikace H3K27me3 značeny další represivní modifikací, H3K9me3. Mezi intragenovými a extragenovými enhancery nebyly pozorovány rozdíly. (Zentner et al, 2011)

Enhancery ES buněk se ale liší i jinak. Intermediární enhancery jsou vzdáleny více od TSS (> 50 kb) než zbylé dvě skupiny a tiché enhancery jsou blíže k TSS (<10 kb) než aktivní enhancery. (Zentner et al, 2011)

Při vývoji se mění aktivita enhancerů. V neurálních prekursorových buňkách ES aktivní enhancery mohou zůstat aktivní, nebo se mohou stát neutrálními při ztrátě H3K4me1 a H3K27ac, anebo mohou být v tzv. stavu „H3K27me3-only“. Tiché enhancery mohou přijít o represivní modifikace H3K9me3 a H3K27me3 a získat aktivační modifikaci H3K27ac, nebo se mohou stát neutrálními, bez H3K4me1 a H3K27me3, a „H3K27me3-only“. Intermediární se mohou stát aktivními, získají H3K27ac, nebo mohou být neutrální, ale nikdy nejsou „H3K27me3-only“. (Zentner et al, 2011)

Transkripční faktory se vážou na histony označené H3K4me. V případě H3K4me3 nasedají transkripční faktory na promotory a rozeznáním H3K4me1 se váží na enhancery. Oblasti označené H3K27ac a H3K9ac se téměř kompletně překrývají s H3K4me. H3K4me je preferenčně rozeznávám transkripčními faktory jako marker otevřené chromatinové struktury. H3K4me je obohacena kolem TSS, H3K36me3 a Pol II jsou v transkribovaných oblastech a H3K27me3 je v umlčených genech. (Rye et al, 2011)

Na základě epigenomiky lze definovat funkční chromatinové segmenty. Podle histonových modifikací lze predikovat pozici genů. Nukleozomy silně obohacené o H3K4me2/3 a H3K9ac se nachází na 5' konci genů blízko TSS, jedná se o promotory. Přímo před TSS se nukleozomy nenachází. Enhancery jsou obohaceny o H3K4me1 a H2AZ. Elongační časná oblast, blízka 5' konci je obohacena o H3K79me2 a H4K20me1. Elongační oblast blízka 3' konci je obohacena o H3K36me3 a H3K9me1. Reprimované oblasti jsou obohaceny o H3K9me3 a H3K27me3. (Mammana et al, 2013)

Intergenové oblasti jsou velmi variabilní, co se týče histonových modifikací. Pericentromery, oblasti mezi dvěma geny nejbližší k centromere, jsou obohaceny o H3K9me2, H3K9me3, H3R2me2, H4K20me3 (obohacena pouze v tomto typu elementu), H4R3me2. Genové pouště („gene deserts“) jsou definovány jako oblasti větší než 1 Mb mezi dvěma geny. Genové pouště jsou značeny H3K9me2 a H3K9me3. Subtelomery mají H2AH5ac, H3K14ac, H3K27me2, H3K27me3 a H3R2me1. Úplně chybí modifikace H3K27me3 a H3K9me1 vyskytující se v genech. (Rosenfeld et al, 2009)

1.4.1. Epigenomika integračních míst provirů

V laboratoři Virové a buněčné genetiky na ÚMG je jedním z modelových virů ASLV. O tomto viru pojednává i práce Šenigla a spol. (2012) zabývající se vztahem mezi aktivitou proviru a integračním místem. O této práci bude pojednávat celá následující podkapitola. Na základě výsledků této práce je vypracovávána tato diplomová práce.

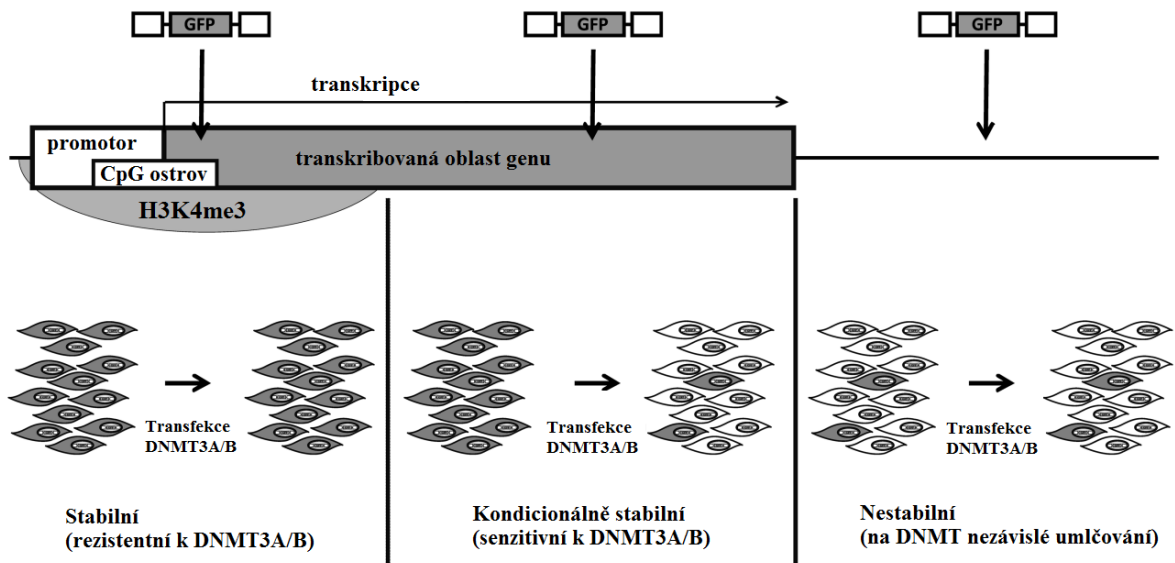
Buněčná linie HCT116 byla infikována vektorem odvozeným od ASLV. Aktivita proviru byla měřena mírou exprese zeleného fluorescenčního proteinu (Green Fluorescent Protein, GFP). Byly infikovány buňky HCT116 divokého typu a buňky postrádající různé DNMT, HCT116 *Dnmt1*^{-/-}, HCT116 *Dnmt3b*^{-/-}, HCT116 *Dnmt1*^{-/-} *Dnmt3b*^{-/-}, HCT116 *Dnmt3a*^{-/-} *Dnmt3b*^{-/-}. Tři dny po infekci byly vytríděny GFP pozitivní buňky a stabilita výsledných klonů byla sledována po dobu čtyř měsíců. V buňkách divokého typu byla většina klonů umlčena, stejně tak v buňkách HCT116 *Dnmt1*^{-/-}. Oproti tomu klony deficientní na *de novo* DNMT byly až na několik případů stabilní, v některých případech pouze s mírným umlčováním. (Šenigl et al, 2012)

Většina klonů buněk divokého typu byla umlčena již čtyři týdny po infekci, vzácně zůstávaly klony stabilní. Stabilní klony v buňkách deficientních na *de novo* DNMT byly transfekovány vektorem obnovujícím aktivitu *de novo* DNMT. Sedm dní po transfekci byla většina klonů umlčena. Pouze malá část klonů zůstávala stále stabilní. Umlčené proviry v buňkách divokého typu byly částečně aktivovány po přidání inhibitorů DNMT a HDAC. Efekt byl výraznější v kombinaci obou inhibitorů. (Šenigl et al, 2012)

Dále byla analyzována úroveň metylace v klonech s umlčenými i aktivními proviry. Aktivní proviry měly nemetylované nebo téměř nemetylované 5' LTR v buňkách divokého typu i deficientních pro DNMT. Ve většině umlčených klonů buněk divokého typu byly 5' LTR silně metylovány. Nevyskytoval se žádný signifikantně metylovaný umlčený provirus v HCT116 *Dnmt3a*^{-/-} *Dnmt3b*^{-/-}. Ztráta GFP exprese po transfekci buněk DNMT3A/B byla provázena silnou DNA metylací provirových 5' LTR. Míra umlčování korelovala s mírou metylace LTR. (Šenigl et al, 2012)

Analýza integračních míst odhalila, že stabilně exprimované proviry byly téměř výhradně v TU. Stabilně aktivní proviry buněk divokého typu se integrovaly blízko TSS s absolutním překryvem s histonovou modifikací H3K4me3. Stabilní proviry v HCT116 *Dnmt3a*^{-/-} *Dnmt3b*^{-/-} byly integrovány po celé délce TU. Umlčené proviry v buňkách HCT116 divokého typu byly integrovány v TU mimo oblast výskytu H3K4me3 a intergenových oblastech. V HCT116 *Dnmt3a*^{-/-} *Dnmt3b*^{-/-} byly umlčené proviry pouze v intergenových oblastech. Proviry v antisense orientaci byly nejvíce náchylné k umlčení, i když byly v blízkosti TSS. Po vnesení DNMT3A/B do *de novo* DNMT deficientních buněk došlo k expanzi metylace z okolí integrace do LTR. DNMT3B se jevila jako účinnější DNMT v umlčování proviru.

Na základě těchto výsledků byl vytvořen model, podle kterého proviry integrované do blízkosti TSS jsou chráněny před metylací. Proviry integrované do transkribovaných oblastí genů byly umlčovány aktivitou *de novo* DNMT. V intergenových oblastech byly proviry umlčovány nezávisle na *de novo* DNMT. Schéma modelu na obr. č. 1.2.



Obr. č. 1.2. – Model závislosti aktivity proviru na integračním místě – Při integraci do blízkosti TSS jsou proviry stabilní, překryv s H3K4me3. Při integraci do transkribované oblasti genu jsou proviry umlčovány *de novo* DNMT. Proviry integrované do intergenových oblastí jsou umlčovány nezávisle na *de novo* DNMT. (upraveno podle Šenigl et al, 2012)

2. Cíle práce

Tato práce vychází z předchozího výzkumu v laboratoři Dr. Jiřího Hejnara (ÚMG), kdy byl studován vliv integračního místa na stabilitu exprese retroviru, respektive retrovirového vektoru. Během tohoto studia bylo zjištěno, že mechanismus umlčování integrovaných provirů ASLV je závislý na místě integrace. Proviry integrované v intergenových oblastech jsou umlčovány mechanismem nezávislým na DNA metyltransferázách, zatímco umlčení provirů integrovaných uvnitř genů je závislé na přítomnosti *de novo* DNA metyltransferáz. (Šenigl et al, 2012) Cílem této práce je další studium tohoto fenoménu a zejména vytvoření systému, který by umožňoval detailnější studium vlivu transkripční aktivity integračního místa na umlčování retroviru. Toho má být dosaženo vytvořením arteficiální transkripční jednotky, jejíž transkripční aktivitu by bylo možné cíleně zapínat a ve které by byl přítomen retrovirus s reportérovým genem. Tato kazeta by po integraci do hostitelské buňky umožňovala simulovat podmínky, kdy je retrovirus integrován do transkripčně aktivního genu, a studovat epigenetické mechanismy, které se podílejí na jeho umlčování. V této diplomové práci bude kladen důraz především na roli aktivity DNA metyltransferáz a transkripčního pročitání retrovirového LTR promotoru. Dalším cílem je ověření, zda je mechanismus umlčení závislý i na konkrétním retroviru, kdy budou studovány tak rozdílné retroviry jako je ASLV a HIV.

Prvním cílem této diplomové práce je navrhnutí a vytvoření plazmidových konstruktů expresního systému sestávajících ze samotných reportérových kazet a expresního konstruktů sloužícímu k jejich zapínání. Reportérová kazeta bude představovat arteficiální systém. Jejimi hlavními požadavky jsou indukované pročtení proviru, které bude detekováno reportérovým genem kódujícím fluorescenční protein. Míra exprese proviru, jeho stability, bude detekována dalším fluorescenčním reportérovým genem v odlišné oblasti emisního spektra. Budou vytvořeny dvě varianty vektorů, s ASLV a HIV, které budou vytvářeny metodami molekulárního klonování. Protože tyto retroviry patří do různých podčeledí, bude možné posoudit, zda je mechanismus umlčení specifický pro určité retroviry.

Druhým cílem této práce je ověření samotného fungování a účinnosti vytvořeného expresního systému, kdy budou výše zmíněné kazety vneseny do buněčných linií HEK-293 a HCT116 (buněk divokého typu a buněk deficientních na *de novo* DNMT). V těchto buňkách bude analyzována exprese z provirových LTR a účinnost zapínání těchto kazet. Získané buněčné klony dvou zmíněných linií HCT116 se stabilně vnesenou kazetou budou dále využity pro analýzy umlčování retrovirů.

Třetím cílem práce jsou předběžná pozorování umlčování integrovaných provirů v souvislosti s transkripčním pročitáním jejich 5'LTR a posouzení role *de novo* DNA metyltransferáz.

3. Materiál a metody

3.1. Materiál

3.1.1. Buněčné linie a jejich kultivace

Pro testy genové exprese byly používány adherentní buňky HEK-293 (dále jen 293) a HCT116, kultivované v termálním boxu při 37 °C a 5% CO₂. Na kultivační médium bylo použito 2 x DMEM:F12 (přípravna médií ÚMG), 56 mg/ml NaHCO₃ (přípravna médií ÚMG), 2 µl 100 x Antibiotic Antimycotic Solution (Sigma) na 1 ml média, 30 mg/ml L-glutaminu (přípravna médií ÚMG), 40 µl/ml média fetálního telecího séra (Gibco), 40 µl/ml média telecího séra (PAA). Všechny práce s tkáňovými kulturami byly prováděny v biohazard boxu (Schoeller Instruments).

Buňky 293 jsou původem lidské epiteliální buňky embryonálních ledvin. Tato buněčná linie byla vybrána, protože se snadno kultivuje, účinně se transfekuje a je klonogenní.

Buňky HCT116 jsou původem lidské buňky odvozené z kolorektálního karcinomu. Původem to jsou epiteliální buňky. (Brattain et al, 1983) Tato linie má mutaci v kodonu 13 genu v protoonkogenu pro protein ras. Tato linie si zachovává schopnost homologní rekombinace, čehož bylo využito k vytvoření nulových mutant pro *de novo* metyltransferázy (dále jen 3AB12).

Buňky byly pasážovány dvakrát týdně při dosažení konfluencie 90%. Při pasáži bylo nejprve odsáno staré médium, pak byly buňky oplachovány 1 x PBS (přípravna médií ÚMG), a potom trypsinovány (0,125% trypsin, 0,01% EDTA v 1 x PBS; přípravna médií ÚMG), což bylo následováno inkubací v termálním boxu po dobu minimálně 10 min. Po inkubaci byly buňky resuspendovány v čerstvém médiu, část média s buňkami byla odstraněna a doplněna čerstvým médiem. Při selekci transfekovaných buněk zeocinem byly buňky tzv. autopasážovány. Po trypsinizaci byly buňky pouze resuspendovány.

Objemy oplachovacích roztoků a média byly měněny podle velikostí jamek na deskách a Petriho misek. Na 24-jamkovou mikrotitrační destičku bylo používáno cca 200 µl 1

x PBS nebo trypsinu na jamku a 500 μ l média. Na 96-jamkovou destičku bylo používáno cca 100 μ l 1 x PBS nebo trypsinu na jamku a 200 μ l média. Na 6-jamkovou destičku byl používán 1 ml 1 x PBS nebo trypsinu na jamku a 2 ml média. Na 10-centimetrovou Petriho misku byly používány 3 ml 1 x PBS nebo trypsinu a 12 ml média.

Pro účely zamražení byly buňky resuspendovány v médiu obsahujícím z 80% 2 x DMEM.F12, 10% DMSO (99%; Serva) a 10% fetální telecí sérum. Buňky byly zamrazovány ve zkumavkách CryoTube Vials (Thermo Scientific) a v -80 °C byly zamrazovány v zamrazovacích krabičkách (Nalgene). Tyto krabičky byly naplněny isopropanolem (Lach Ner) zajišťující snížení teploty buněk o 1 °C/min (z 37 °C na -80 °C).

3.1.2. Bakteriální kmeny

Při konstrukci expresních vektorů byly používány kompetentní bakterie STBL. Genotyp: F– *mcrA* Δ (*mcrBC-hsdRMS-mrr*) *recA1 endA1 lon gyrA96 thi supE44 relA1* λ – Δ (*lac-proAB*). (Tento kmen nerozeznává metylovanou DNA jako cizí, nedochází k rekombinaci, je eliminována nescifická endonukleázová aktivita Endonukleázy I, je snížena degradace rekombinantních proteinů, RNA syntéza probíhá bez syntézy proteinu.)

Kompetentní bakterie se připravují kultury o optické denzitě 0,8 při 600 nm. Tato kultura byla stočena (2 500 rpm, 7 min, 4 °C). Na pelet z 50 ml buněčné suspenze bylo přidáno 15 ml roztoku TFB1 (pH 5,8; 100 mM RbCl, 50 mM MnCl₂, 10 mM CaCl₂, 30 mM KAc a 15% glycerolu). Otáčením zkumavky na ledu byly buňky resuspendovány. Opět byly buňky stočeny a na pelet byly přidány 2 ml roztoku TFBII (pH 6,8; 10 mM MOPS pH 0,7, 10 mM RbCl, 75 mM CaCl₂, 15% glycerol; MOPS – pH 7,0, 1 M NaOH). Po resuspendování buněk otáčením na ledu byly buňky po 100 μ l alikvotovány. Buňky byly zamrazeny ve směsi suchý led a ethanol (96%, WWR) a skladovány při -80 °C. Kompetice je ověřována nárůstem počtu kolonií z 1 μ g DNA.

3.1.3. Zdrojové plazmidy

Pro vytváření a testování expresního systému byly používány plazmidy pCLZTLT, pVITRO3B, pAG3, pACreIGW2-2EDD, pLCGSIB, pHIV1-TG byly převzaty v laboratoři Virové a buněčné genetiky na ÚMG (Šenigl, nepublikováno). Dále byl používán pTaqBFP-N (Evrogen). Plazmidy obsahují geny pro selekční antibiotika zeocin, kanamycin, ampicilin a blasticidin (Sigma).

3.2. Metody molekulárního klonování

3.2.1. Štěpení restrikčními endonukleázami

Reakční směs obsahuje restrikční enzym (obvykle 4 U/reakci; NEB), 10 x pufr (podle enzymu, respektive jeho aktivity v daném pufru; NEB), vektorovou DNA (1,5 µg), vodu na doplnění objemu reakce 20 µl a pokud to enzym vyžaduje, byl přidán 10 x hovězí sérový albumin (Bovine Serum Albumin, BSA; NEB). Restrikční endonukleázy použité pro účely této práce jsou uvedeny v tabulce č. 3.1.

3.2.2. Elektroforetické metody

Pro analýzu plazmidových štěpů byl používán 1,5% agarózový gel. Agaróza (Invitrogen) byla rozvařena v 1 x trisacetátovém pufru (400 mM Tris Base, 1 mM EDTA pH 8,0, 0,112% C₂H₄O₂). Bylo přidáno 0,5 µg ethydium bromidu (Boehringer Mannheim) na 1 ml pufru. Po zatuhnutí byl gel na nosiči vložen do elektroforetické vany (HE33 mini Horizontal Agarose Electrophoresis Unit, Hoefer).

Elektroforéza probíhala při elektrickém napětí 9,5 V/cm. Jako zdroj napětí byl použit PS 251-2 (Sigma-Aldrich Techware).

Gely jsem prohlížela na dvou různých transluminátorech. Po ozáření UV světlem v boxu byl elektroforetický gel snímán dokumentačním systémem GDS 8000A (UVP) a za použití programu AlphaDigiDoc RT2 byl obraz analyzován a upravován. Dále byl použit transluminátor vhodný pro vyřezávání fragmentů z gelu UVstar 365 nm (Biometra).

Tabulka č. 3.1: Seznam použitých restričních endonukleáz (New England BioLabs).

Enzym	Rozeznávaná sekvence	10 x BSA	Použitý pufr (NEB)	Teplota štěpení (°C)
Apal	5'... GGGC [▼] CC... 3' 3'... C [▲] CCGGG... 5'	✓	4	25
AvrII	5'... C [▼] CTAGG... 3' 3'... GGAT [▲] CC... 5'		4	37
BamHI	5'... G [▼] GATCC... 3' 3'... CCTAG [▲] G... 5'	✓	4	37
EcoRV - HF	5'... GAT [▼] ATC... 3' 3'... CTA [▲] TAG... 5'		4	37
FspI	5'... TG [▼] CGCA... 3' 3'... ACG [▲] CGT... 5'		4	37
NheI	5'... G [▼] CTAGC... 3' 3'... CGAT [▲] CG... 5'	✓	4	37
NlaIII	5'... CAT [▼] G... 3' 3'... G [▲] TAC... 5'	✓	4	37
PciI	5'... A [▼] CATGT... 3' 3'... TGTAC [▲] A... 5'	✓	3	37
PstI - HF	5'... CTGC [▼] AG... 3' 3'... G [▲] ACGTC... 5'		4	37
PvuI	5'... CGAT [▼] CG... 3' 3'... GC [▲] TAGC... 5'	✓	3	37
Scal	5'... AGT [▼] ACT... 3' 3'... TCA [▲] TGA... 5'		3	37
SpeI	5'... A [▼] CTAGT... 3' 3'... TGAT [▲] CA... 5'	✓	4	37
XbaI	5'... T [▼] CTAGA... 3' 3'... AGAT [▲] CT... 5'	✓	4	37

3.2.3. Izolace fragmentů plazmidové DNA z gelu

Z gelu byla vyříznuta část s požadovaným fragmentem a vložena do 2 ml zkumavky. Byly použity komponenty kitu High Pure PCR Product Purification Kit (Roche). Podle hmotnosti vyříznuté části gelu byly přidány 3 μ l vazebného pufru na mg agarózy, obsah zkumavky byl zamíchán na vortexu a inkubován po dobu 10 min při 56 °C (každé 2-3 min míchat), pak bylo přidáno 1,5 μ l isopropanolu na 1 mg agarózy a vše bylo zamícháno. Směs byla přenesena ze zkumavky na kolonku a stočena na centrifuze (1 min, 13 000 rpm, 20 °C), tekutina ze spodní části kolonky byla vylita a na vrchní část kolonky bylo přidáno 500 μ l promývacího pufru, kolonka byla opět stočena a vylita, pak bylo přidáno 200 μ l promývacího pufru, kolonka byla stočena, vylita a potom byla předána do čisté zkumavky. Bylo přidáno 22 μ l elučního pufru (2 μ l určeny pro měření) a zkumavka byla stočena (1,5 min).

Po izolaci z gelu byly koncentrace a čistota měřeny na spektrofotometru Nanodrop 1000 (Thermo Scientific). Spektrofotometr byl nastaven na měření nukleových kyselin a iniciován destilovanou vodou. Před samotným měřením bylo nastaveno pozadí („blank“) kapaliny, ve které byla nukleová kyselina rozpuštěna.

3.2.4. Polymerázová řetězová reakce

K polymerázové řetězové reakci (Polymerase Chain Reaction, PCR) byla použita Thermo Scientific Phusion Hot Start II High-Fidelity DNA polymeráza (Thermo Scientific).

Na reakci bylo mícháno 5 x Phusion HF Buffer, 0,2 mM dNTPs, 0,2 μ M primeru R, 0,2 μ M primeru L, 20 ng DNA a 0,6 U/reakci Phusion Hot Start polymerázy.

Reakce byla provedena v thermocyleru ProFlex PCR System (Life Technologies). Základní program uveden v tabulce č. 3.2. Pro amplifikaci polyA byla teplota nasedání primerů 61 °C a doba polymerace 1,5 min. Pro amplifikaci tdTomata byla teplota nasedání primerů 63 °C a doba polymerace 2 min. Pro amplifikaci spaceru s vnitřním místem pro vstup ribozomu (Internal Ribosome Entry Site, IRES) byla použita teplota nasedání primerů 61 °C a doba polymerace 2 min. Pro amplifikaci provirů byla použita teplota nasedání primerů 61 °C a doba polymerace 4,5 min (+ každý další cyklus byl prodloužen o 15 s). Pro amplifikaci rekombinázy Cre byla teplota nasedání primerů 61 °C a doba polymerace 2 min.

Tabulka č. 3.2. – Programy pro thermocycler

Typ PCR	Krok	Teplota (°C)	Čas	Počet opakování
PCR vysoce přesnou polymerázou	Počáteční denaturace	98	30 s	1x
	Denaturace	98	9 s	35x
	Nasedání primerů	x*	30 s	
	Polymerace	72	x*	
	Polymerace	72	5 min	1x
	Uchovávání	10	∞	
Koloniová PCR	Počáteční denaturace	95	3 min	1x
	Denaturace	95	15 s	30x
	Nasedání primerů	61	20 s	
	Polymerace	68	3 min 15 s	
	Polymerace	68	7 min	1x
	Uchovávání	12	∞	
1. kolo splinkerette PCR (štěpeno restrikční endonukleázou NlaIII)	Počáteční denaturace	94	3 min	1x
	Denaturace	94	15 s	2x
	Nasedání primerů	59	30 s	
	Polymerace	72	2 min	
	Denaturace	94	15 s	32x
	Nasedání primerů	65-59 (gradient)	30 s	
	Polymerace	72	2 min	
	Polymerace	72	5 min	1x
	Uchovávání	4	∞	
2. kolo splinkerette PCR (štěpeno restrikční endonukleázou NlaIII)	Počáteční denaturace	94	3 min	1x
	Denaturace	94	15 s	30x
	Nasedání primerů	59	30 s	
	Polymerace	72	2 min	
	Polymerace	72	5 min	1x
	Uchovávání	4	∞	

*konkrétní hodnoty uvedeny v textu

Tabulka č. 3.3. – Přehled použitých primerů

Název primeru	Zdrojový plazmid
Sekvence	Lokalizace primeru
ASLV-XbaI_L <u>TTGTCGAGCATGCATCTAGATTAGGATATAGTAGTTTCGCTTT</u>	pAG3 nt 119-141
ASLV-XbaI_R <u>GGGGAGGGCCCTCTAGACCACTATTCCCTAACTATCACGT</u>	pAG3 nt 499-521
HIV-XbaI_L <u>TTGTCGAGCATGCATCTAGAAAATCAGTTGTTTATATTTGGAA</u>	pHIV1-TG nt 3 044-3 066
HIV-XbaI_R <u>GGGGAGGGCCCTCTAGATCCATAATCAATTTACAACAGCC</u>	pHIV1-TG nt 6 507-6 529
SI-EcoRV_L <u>TGGAATTCTGCAGATATCTTACGATCCCCGATCACTATGG</u>	pLGSIB nt 3 616- 3 637
SI-tdT_R ATTATCGTGTTTTTCAAAGGGAA	pLGSIB nt 4 898- 4 920
polyA_ApaI_R <u>AGCATGCATCTAGAGGGCCCTCCCCAGCATGCCTGCTATTGTCT</u>	pCLZTLT nt 1 810-1 833
polyA_PciI_L TTGCTCACATGTCTAGGCTCGTGATCAGCCTCG	pCLZTLT nt 1 607-1 624
tdTomato_L <u>GAAAAACACGATAATGCCACCATGGTGAGCAAGGGCGA</u>	pCLZTLT nt 105-123
tdTomato_XbaI_R <u>GGGGAGGGCCCTCTAGAGCCTTACTTGTACAGCTCGTCCATGCCGTA</u>	pCLZTLT nt 1 511-1 534
Cre_L <u>CGCGGGCCCCGGGATCTCGACCATGCCAAGAAGAAGAGGAA</u>	pACreIGW2-2EDD nt
Cre_R <u>GGCGACCGGTGGATCagAACCTCCACCTCCTGACCCTCCGCCACC</u> ATCGCCATCTTCCAGCAGGCGCACC	pACreIGW2-2EDD nt

Poznámka: podtržené části sekvencí jsou homologní sekvence využívané při rekombinačním klonování (In-Fusion), zvýrazněné části sekvencí představují restrikční místa plazmidů

Použité primery jsou uvedeny v tabulce č. 3.3. Proviry byly amplifikovány dvojicí primerů ASLV-XbaI_L a ASLV-XbaI_R nebo HIV-XbaI_L a HIV-XbaI_R. polyA bylo amplifikováno pomocí dvojice primerů polyA-ApaI_R a polyA-PciI_L. Spacer a IRES byly amplifikovány dvojicí primerů SI-EcoRV_L s SI-tdT_R a tdTomato bylo amplifikováno dvojicí primerů tdTomato_L s tdTomato-XbaI_R. Rekombináza Cre byla amplifikována dvojicí primerů Cre_L a Cre_R.

3.2.5. Koloniová PCR

Tato metoda byla používána pro testování bakteriálních kolonií na přítomnost plazmidu s inzertem vneseným transformací. Do reakční směsi s finálním objemem 20 µl byla pipetovací špičkou přenesena část buněk kolonie narostlé na Petriho miskách s agarem obohaceným o selekční antibiotikum. Reakční směs obsahovala 10 µl OneTaq Master Mix (NEB), 0,2 µM primeru R, 0,2 µM primeru L a vodu. Reakční směs s částí buněk kolonie byla umístěna do thermocycleru a byl spuštěn program, uvedený v tabulce č. 3.2.

3.2.6. Rekombinační klonování

Pro tuto metodu byl používán kit In-Fusion HD Cloning Kit (Clontech). Enzym In-Fusion fúzuje amplifikované PCR fragmenty a linearizované vektory podle jejich přesahujících konců vzniklých použitými PCR primery a restričními endonukleázami.

Bylo smícháno 5 x In-Fusion HD Enzyme Premix, 10-200 ng purifikovaného PCR fragmentu a 50-200 ng linearizovaného vektoru a doplněno vodou do konečného objemu 10 µl. Při klonování dvou fragmentů do linearizovaného vektoru bylo použito dvojnásobného množství premixu a reakce byla doplněna na finální objem 20 µl. Reakce probíhala v 50 °C v thermocycleru po dobu 15 min a pak uchovávána v chladu. Pokud byly vektorem ihned transformovány bakterie, byla reakce držena na ledě, ale jinak byla uchovávána v -20 °C.

3.2.7. Transformace bakterií

STBL bakterie byly vyjmuty z $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ a nechány rozmraznout, ale stále byly drženy na ledu. Bakterie smíchané s požadovaným plazmidem (In-Fusion) byly inkubovány na ledu po dobu 30 min. Potom byly na 25 sekund přendány do vodní lázně o teplotě $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ a okamžitě bylo přidáno 0,5 ml výživově bohatého, LB média (přípravna médií ÚMG). Minimálně 1 hodinu pak byly buňky inkubovány v $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ v třepačce při 230 otáčkách/min. Pak byly bakterie vysety na Petriho misky s agarem (100 μl a zbytek) obohaceným o odpovídající antibiotikum. Bakterie na miskách pak byly inkubovány přes noc při $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ v termálním boxu.

Na transformaci bylo používáno 100 μl bakteriální suspenze.

3.2.8. Izolace plazmidové DNA

Bakteriální buňky s vneseným plazmidem byly naočkovány do 50 ml LB média se 100 μg odpovídajícího antibiotika na 1 ml média v $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ přes noc na třepačce při 230 otáčkách/min.

K izolaci byl použit GenElute HP Plazmid Midiprep Kit (Sigma). Namnožené buňky byly přelity z baňky do 50 ml zkumavky, stočeny (10 min, 5 000 x g) a byl odebrán supernatant. K buněčnému peletu byly přidány 4 ml resuspendačního roztoku (s přídáním Rnázou A), ve kterém byly buňky resuspendovány, pak byly přidány 4 ml lyzačního roztoku, obsah zkumavky byl po přidání každé chemikálie promíchán pouze několikanásobným otočením zkumavky. Buňky byly lyzovány 3-5 min. Lyze byla zastavena přidáním 4 ml neutralizačního roztoku. Pak byly přidány 3 ml vazebného roztoku a lyzát byl přelit do stříkačky s filtrem. Kolonka byla připravena přidáním 4 ml roztoku „na přípravu kolonky“ na vrchní část kolonky, stočena (2 min, 3 000 x g). Roztok byl vylit a na kolonku byl přefiltrován lyzát ze stříkačky. Kolonka byla stočena (2 min, 3 000 x g) a prošlá tekutina ze spodní části kolonky vylita. Na kolonku byly přidány 4 ml promývacího roztoku 1, stočeno, přidány 4 ml promývacího roztoku 2, stočeno a vylito. Kolonka byla přendána do čisté sběrné zkumavky, přidán 1 ml elučního roztoku a stočeno (5 min, 3 000 x g). Pro koncentrování plazmidu byla tekutina přenesena do 2 ml zkumavky, přidáno 0,1 objemu 3 M NaAc (pH 5,2) a 0,7 objemu isopropanolu, dobře zamícháno stočeno (30 min, 15 000 x g, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$). Byl odebrán supernatant

a pelet opláchnut 1,5 ml 70% ethanolem. Zkumavka byla stočena (10 min) a odebrán ethanol. Po oschnutí byl rozpuštěn v T₁₀E_{0,1} (dále jen TE; 10 mM Tris pH 7,6, 0,1 mM EDTA pH 8,0).

Pro získání menšího množství DNA byl použit Plazmid mini Kit (Qiagen). 3 ml média s namnoženými buňkami byly posupně přeneseny do 2 ml zkumavek a stočeno (3,5 min, 7,6 rpm, 4 °C). Supernatant byl odebrán a k peletu v každé zkumavce bylo přidáno 400 µl pufru P1 a resuspendováno, přidáno 400 µl pufru P2 a jemně promícháno, po 5 min bylo přidáno 400 µl pufru P3. Po 5 min stání na ledu byly zkumavky stočeny (15 min, 14-18 000 x g, 4 °C). Na kolonku byl nanesen 1 ml pufru QBT, který byl přes kolonku nechán prokapán. Pak byl na kolonku nanesen lyzát a byl nechán prokapán. Postupně bylo přidáno dvakrát 2 ml promývacího pufru. Po umístění kolonky do čisté zkumavky bylo přidáno 800 µl elučního pufru, 0,7 objemu isopropanolu, a pak byla kolonka stočena (20 min, 13 200 rpm, 4 °C). Po odebrání supernatantu byl pelet opláchnut 1 ml 70% ethanolu. Zkumavka byla stočena (10 min) a odebrán ethanol. Po oschnutí byl pelet rozpuštěn v TE.

Urychlená varianta tzv. miniprepů označovaná jako tzv. hrubé miniprepy byla používána k izolaci plazmidové DNA určené pouze k testování. Opět byl používán kit Plazmid mini Kit (Qiagen). Bylo stočeno 1,5 ml bakteriální kultury a médium bylo odsáto. Bylo přidáno 100 µl P1, 100 µl P2 a 100 µl P3. Zkumavka byla stočena (15 min, 14-18 000 x g, 4 °C), supernatant odsán a přidáno k němu 700 µl ethanolu. Vysrážený a usušený precipitát byl rozpuštěn v cca 20 µl TE.

3.2.9. Práce s bakteriálními konzervami

Bakteriální konzervy s meziprodukty a finálními plazmidy připravovány z 300 µl glycerolu, který byl pro lepší manipulaci skladován v 37 °C, a 1 ml suspenze bakteriální kultury namnožené přes noc. Glycerol a suspenze buněk byly dobře promíchány a uchovávány při -80 °C. Pro namnožení plazmidu bylo 150 µl suspenze připravené konzervy přidáno do 20 ml LB média s antibiotikem (100 µg/ml média).

3.3. Testování genové exprese a průtoková cytometrie

3.3.1. Transfekce buněk plazmidy

Jednu hodinu před samotnou transfekcí bylo kultivační médium vyměňováno.

Při transfekci pomocí X-tremeGENE HP DNA Transfection Reagent (Roche) bylo do 100 μ l Opti-MEM média přidáno 2-3 μ l X-treme Reagent a 1 μ g DNA. Reakce byla inkubována při pokojové teplotě po dobu 30 min, každých 10 min byla reakce opatrně promíchána. Na transfekci 24-jamkové desky bylo používáno 0,5 μ g DNA na jamku, na 6-jamkové desce bylo používáno 1 μ g DNA na jamku. 2 μ l X-treme Reagent byly používány při transfekci plazmidy s pCPT-A/H, 3 μ l X-treme Reagent byly používány při transfekci plazmidem pTaq-CreB.

Při transfekci pomocí Lipofectamine 3000 (Life Technologies) bylo ve zkumavce smícháno 25 μ l Opti-MEM média (Gibco) a 1,5 μ l Lipofectamine 3000 Reagent (pro 24-jamkovou destičku). Ve druhé zkumavce bylo smícháno 25 μ l Opti-MEM média (Gibco), 0,5 μ g DNA a 1 μ l P3000 Reagent (2 μ l/ μ g DNA). Pak byl obsah zkumavek smíchán a při pokojové teplotě byla reakce inkubována po dobu 5 min. Poté byl celý objem transfekční směsi přidán k buňkám na jedné jamce. Objem média při transfekci činil 250 μ l média (24-jamková deska), nebo 1 ml (6-jamková deska).

Před kvantitativním měřením na průtokovém cytometru byla účinnost transfekce kontrolována na fluorescenčním mikroskopu (Olympus IX51).

3.3.2. Analýza exprese GFP a tdTomato na průtokovém cytometru

Pro měření byl používán průtokový cytometr BD LSR II (BD Biosciences) s akvizitátorem vzorků HTS pro LSR II (Automated Micro-Titer Plate Acquisition) v uživatelském režimu na pracovišti Světelné mikroskopie a cytometrie na ÚMG.

Pro měření buněk na průtokovém cytometru byly buňky resuspendovány v médiu jako při pasáži, ale buňky nebyly odhazovány do odpadu, ale byly přenášeny do 96-jamkové desky (cca polovina obsahu 24-jamkové desky). Tato deska byla stočena v centrifuze (Univerzal; 1 400 rpm, 10 min). Poté bylo médium opatrně vycáknuto z desky, buňky zůstaly

přisedlé na dně jamek. K buňkám bylo přidáno 100 μ l 1 x PBS nebo PBS s přidaných Hoechst 33258 (1 μ g/ml, Invitrogen) a resuspendovány.

Pomocí průtokového cytometru byly měřeny různé vlastnosti buněk, bylo nastavováno elektrické napětí pro různé parametry (FSC, SCC, Hoechst, GFP a tdTomato), které byly měněny v závislosti na konkrétním nastavení cytometru. Naměřené hodnoty byly vyhodnocovány programem FlowJo (Tree Star).

Cytometr má nastavenou výchozí konfiguraci fluorescenčních detektorů – 405 nm laser: Hoechst (450/50), BV510 (525/50), FuraRed (675/40); 488 nm laser: FITC (525/50), PerCP (675/20); 561 nm laser: PE (586/20), PE/A610 (610/20), PE/Cy5 (670/14), PE/Cy5.5 (712/21), PE/Cy7 (780/60); 644 nm laser: APC (660/20), A700 (705/20), APC/A750 (780/60).

Expres GFP je měřena po excitaci laserem 488 nm, tdTomato po excitaci laserem 561 nm a Hoechst po excitaci laserem 405 nm.

3.3.3. Sortování buněk

Sortr BD Influx high speed cell sorter (BD Biosciences) je v servisním režimu na pracovišti Světelné mikroskopie a cytometrie na ÚMG. Jednotlivá sortování jsou oprávněni provádět pouze školení pracovníci tohoto centra.

Buňky připravované na třídění byly resuspendovány. Poté byly přeneseny do zkumavky, stočeny (5 min, 1,5 rpm), bylo odsáno médium a buňky byly resuspendovány v bezsérovém médium. Buňky byly připravovány v 15 ml zkumavkách ke snížení pravděpodobnosti kontaminace. Před samotným sortováním byly buňky filtrovány tak, aby byly buňky od sebe dobře odděleny.

Buňky byly sortovány do kondiciovaného média. Médium částečně zpracované buňkami (ideálně cca 1 den) bylo nasáno do stříkačky a přefiltrováno přes „28mm syringe filter“ (Corning Incorporated) a přidána čerstvá antibiotika. Podle stupně zmetabolizování ředěno čerstvým médiem. Médium starší než jeden den nebylo používáno.

Sortování bylo prováděno tak, aby zkumavka nebo destička, do kterých se sortuje, byla otevřena co nejkratší dobu, aby bylo předcházeno kontaminaci.

Několik dní po sortování bylo přidáno čerstvé médium, po týdnu bylo kompletně vyměněno.

3.4. Analýza integračních místv buněčných klonech

3.4.1. Fenol-chloroformová extrakce DNA

Tuto metodu jsem používala k izolaci chromozomální DNA z buněčných klonů. Klony byly namnoženy na 6-jamkových destičkách a sklizeny.

K buněčnému peletu v 2 ml zkumavkách byl přidán 1 ml lyzačního pufru (400 μ l H₂O, 500 μ l 0,4 M EDTA pH 8,0, 100 μ l 10% SDS). Pelet byl resuspendován a bylo přidáno 200 μ g proteinkinázy K. Zkumavky byly nechány rolovat v rotátoru přes noc při 55 °C. Bylo přidáno 250 μ g Rnázy A a necháno rolovat v rotátoru (37 °C, 1 hod). Pak bylo přidáno 800 μ l fenol-chloroformu (1:1; Lach Ner) a důkladně protřepáno. Po chvíli stání byly zkumavky stočeny (3 min, 13 200 rpm, 20 °C). Oddělené vodní fáze byly přendány do čistých zkumavek (v případě potřeby bylo opakováno přidání fenol-chloroformu) a bylo přidáno 800 μ l chloroformu. Opět byly zkumavky stočeny a vodní fáze byly přendány do čistých zkumavek, přesráženy jedním objemem 96% ethanolu a protřepány, stočeno (3 min, 13 200 rpm). Pelet byl opláchnut pelet 80% ethanolem, odsán ethanol. Po oschnutí byl pelet rozpuštěn v cca 30-50 μ l TE (podle velikosti peletu). Proces extrakce byl prováděn v digestoři.

3.4.2. Vysolovací metoda izolace DNA

Tuto metodu jsem používala při větším množství vzorků určených k izolaci chromozomální DNA. K izolaci byly použity klony sklizené ze 6-jamkových desek.

K buněčnému peletu v 2 ml zkumavkách bylo přidáno 400 μ l čerstvě připraveného lyzačního pufru (0,4 M NaCl, 10 mM Tris (pH 8,0), 2 mM EDTA, 2% SDS a 400 μ g/ml proteinázy K) a zkumavky byly točeny v rotátoru při 55 °C přes noc. Dále bylo přidáno 250 μ g Rnázy A a točeno 1 hod při 37 °C. Pak bylo přidáno 300 μ l 6 M NaCl, 30 s mícháno a stočeno (30 min, 10 000 x g). Supernatant byl odebrán a sražen 1 objemem isopropanolu. Zkumavky

byly stočeny (20 min, 10 000 x g), supernatant byl odebrán a pelet byl opláchnut 70% ethanolem. Po uschnutí byl pelet rozpuštěn v cca 20 až 30 μ l TE (podle velikosti peletu). (Aljanabi a Martinez, 1997)

3.4.3. Splinkerette PCR

1,5 μ g DNA bylo štěpeno restriční endonukleázou NlaIII. Reakce byla teplotně inaktivována (65 °C, 20 min). Pak byla namíchána ligační reakce z 200 ng štěpené DNA, 3 U/reakci T4 DNA ligázy, 10 x T4 DNA ligázového pufru, 10 x splinkerette mixu na 1 μ l reakce a H₂O (objem reakce 20 μ l). Ligační reakce byla inkubována při 15 °C přes noc v thermocycleru Touchgene (Techne).

Splinkerette mix byl připraven ze 400 pM oligonukleotidů, 10 x BioTherm pufru (GeneCraft) a H₂O. Reakce byla dána do thermocycleru předehřátého na 94 °C po dobu 3 min, a pak byla postupně ochlazována na 21 °C (1 °C/15 s). Pak byl k reakci přidán 1 objem H₂O.

Oligonukleotidy použité pro vytvoření adaptérů určených k ligaci k restričně štěpené chromozomální DNA v metodě splinkerette PCR a použité primery jsou uvedeny v tabulce č. 3.4.

Ligační reakce byla přečištěna kitem High Pure PCR Product Purification Kit (Roche). Na 1 μ l ligační reakce bylo přidáno 12,5 μ l vazebného pufru, obsah zkumavky byl dobře promíchán a přenesen na kolonku. Kolonka byla stočena (1 min, 13 200 rpm, 20°C), prošlá kapalina byla vylita a na vrchní část kolonky bylo přidáno 250 μ l promývacího pufru. Kolonka byla stočena (1 min, 13 200 rpm, 20 °C). Kapalina byla opět vylita, bylo přidáno 100 μ l promývacího pufru a kolonka byla stočena (1,5 min). Kolonka byla přendána do čisté 1,5 ml zkumavky, bylo přidáno 30 μ l elučního pufru a kolonka byla stočena (1,5 min).

Pak bylo provedeno nested PCR. V prvním kole bylo po 0,6 μ M primerů (Splink 1 a Sp_NlaIII_I), 0,3 mM dNTPs, 10 x BioTherm pufru, 0,5 U/reakci BioTherm Taq polymerázy, 50 ng přečištěné DNA doplněno H₂O (finální objem 20 μ l). PCR reakce byla provedena v thermocycleru podle programu uvedeného v tabulce č. 3.2. V druhém kole bylo 1,5 μ M primeru (Splink 2), 1 μ M primeru (Spin_NlaIII_II), 0,3 mM dNTPs, 10 x BioTherm pufru, 1

U/reakci BioTherm Taq polymerázy, amplifikovaná DNA (0,1 objemu prvního kola PCR) doplněno H₂O (finální objem 50 µl). PCR reakce byla provedena v thermocycleru podle programu uvedeného v tabulce č. 3.2. Produkt byl pak nanesen na elektroforetický gel.

Tabulka č. 3.4 – Přehled použitých oligonukleotidů a primerů (splinkerette PCR)

Oligo – splinkerette mix – 1 CGAAGAGTAACCGTTGCTAGGAGAGACCGTGGCTGAATGAGACTGGTGTGCGACACTAGTGGCATG
Oligo – splinkerette mix – 2 CCACTAGTGTGCGACACCAGTCTCATTTTTTTTTTTTCAAAAAA
Sp_NlaIII_I GAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCA
Spin_NlaIII_II ACATTTCCGTGTGCGCCCTTAT
Splink 1 CGAAGAGTAACCGTTGCTAGGAGAGACC
Splink 2 GTGGCTGAATGAGACTGGTGTGCGAC

3.5. Použitý software

Při navrhování PCR primerů bylo použito volně přístupného softwaru OligoAnalyzer 3.1 (Integrated DNA Technologies (IDT); <http://eu.idtdna.com/calc/analyzer>). V tomto programu je možné zadat sekvenci primeru, požadované koncentrace hořčnatých kationtů, nukleotidů nebo požadovaných primerů a program pak je schopen vypočítat teplotu tání pro daný primer, navrhne možnosti intramolekulárních vlásenek, tvorbu (homo/hetero)dimerů.

Pro přepočet G-síly na rpm byl používán volně přístupný software G Force RPM Calculator (ENDMEMO; <http://www.endmemo.com/bio/grpm.php>) obsahující seznam centrifug a jejich typů rotorů a k nim příslušný údaj o jejich poloměru. Byly používány centrifugy 5415R (Eppendorf) a Zentrifugen Universal 320 R (Hettich).

Vytváření map a klonování *in silico* bylo prováděno za použití softwaru DNASTAR Lasergene.

4. Výsledky

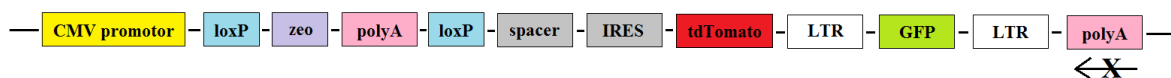
4.1. Reportérový expresní systém pro studium umlčování integrovaného proviru v transkribované oblasti genu

Cílem práce je konstrukce plazmidů expresního systému pro studium transkripčního umlčování provirů a ověření jeho fungování v savčích buňkách. Na základě výsledků práce Šenigl a spol (2012) byla vytvořena hypotéza, že k umlčování proviru integrovaného do transkribované oblasti genu by mohlo docházet při transkripčním pročtení z hostitelského genomu do proviru.

Navržené konstrukty představují artificiální systém simulující integraci proviru do transkribované oblasti genu. Schematické zobrazení vektoru je na obr. č. 4.1. Expresní kazeta s transkripcí řízenou z bezprostředně časného (Immediate Early, IE) cytomegalovirového (CMV) promotoru nahrazuje buněčný gen. Spuštění exprese tdTomato je přísně řízeno a tedy i samotné pročtení do sekvence proviru je plně kontrolováno. K indukci je využito Cre-loxP systému, který rekombinací odstraní terminační sekvenci bránící pročtení.

Připravené vektory se budou lišit přítomnými proviry, což umožní porovnávání mechanismu umlčování u dvou různých podčeledí. Konkrétně se jedná o viry HIV a ASLV, respektive vektory z nich odvozené. Vektory ponosou LTR a vložený gen pro GFP, jehož míra exprese bude vyjadřovat aktivitu provirů. Vektory jsou zobrazeny na obr. č. 4.3.

Vektory budou integrovány do hostitelského genomu, a proto budou integrační místa analyzována pro posouzení vlivu integračního místa na provirus metodou splinkerette PCR. V tomto případě neprobíhá vložení do hostitelského genomu retrovirovou integrací.



Obr. č. 4.1. Schematické znázornění důležitých komponent expresního vektoru

Vektory využívají CMV-IE promotor s enhancerem. Jedná se o silný konstitutivní promotor, je běžně využívaný v savčích expresních vektorech při transienční i stabilní expresi. Zajišťuje silnou expresi v mnoha typech buněčných linií.

Z CMV promotoru je řízena transkripce genu pro rezistenci k zeocinu, který slouží k selekci buněk transfekovaných tímto vektorem. Zeocin byl vybrán, protože použitá buněčná linie je k němu citlivá. Dalším důvodem je, že rezistence k zeocinu není založena na enzymatickém štěpení substrátu. Tento gen kóduje malý protein, který se stechiometricky váže na zeocin a tím mu zabraňuje štěpit DNA. Aby byla tato ochrana před aktivitou zeocinu účinná, je třeba vysoké hladiny tohoto proteinu v buňce. Umožňuje tedy selekci buněk s vysokou aktivitou CMV promotoru. (Oliva-Trastoy et al, 2005)

Následuje sekvence pro polyA signál ukončující transkripci. Za sekvencí pro polyA se nachází 730 bp dlouhý mezerník (spacer), zvyšující pravděpodobnost disociace transkripčního aparátu před dosažením sekvence tdTomato a zejména proviru. Následuje IRES, ze kterého probíhá translace transkriptu pro tdTomato. Toto IRES pochází z viru encefalomyokarditidy iniciující translaci polycistronní mRNA.

Gen pro zeocinovou rezistenci, původně izolován z *Streptoalloteichus hindustanus*, a sekvenci pro polyA leží mezi dvěma místy loxP. Exprese tdTomata by tak měla probíhat pouze v buňkách současně nesoucí integrovaný vektor a vektor pro expresi rekombinázy Cre. Rekombináza Cre katalyzuje rekombinaci mezi dvěma místy loxP, což vede k odstranění sekvence ležící mezi těmito místy loxP, v tomto případě gen pro zeocinovou rezistenci a sekvenci pro polyA, a jednoho z míst loxP. Po odstranění terminační sekvence probíhá transkripce až do 5' LTR proviru, kde je terminována za signálem pro polyA v něm obsaženým (obr. č. 4.4. B). Zapnutí exprese tdTomato před vnesením rekombinázy Cre indikuje poškození vektoru před integrací a odstranění sekvence pro zeocinovou rezistenci a polyA. Exprese je pak řízena z buněčného promotoru řídícího transkripci probíhající ze stejného směru, jako je pozice CMV promotoru.

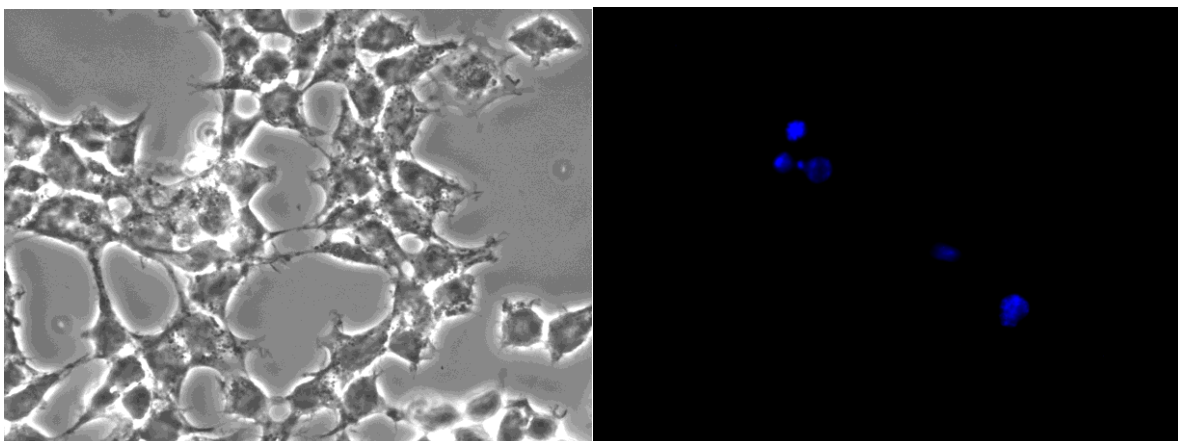
Za tdTomato se nachází proviry, HIV nebo ASLV. Respektive pod kontrolou LTR je přepisováno GFP. U HIV leží před sekvencí pro GFP sekvence pro protein Tat, regulační protein zesilující virovou transkripci.

Za proviry je v opačné orientaci vložena sekvence pro polyA. Tato sekvence má za úkol chránit proviry, především jejich 5' LTR, před transkripcí z hostitelské DNA v obrácené orientaci vzhledem k integrovanému vektoru.

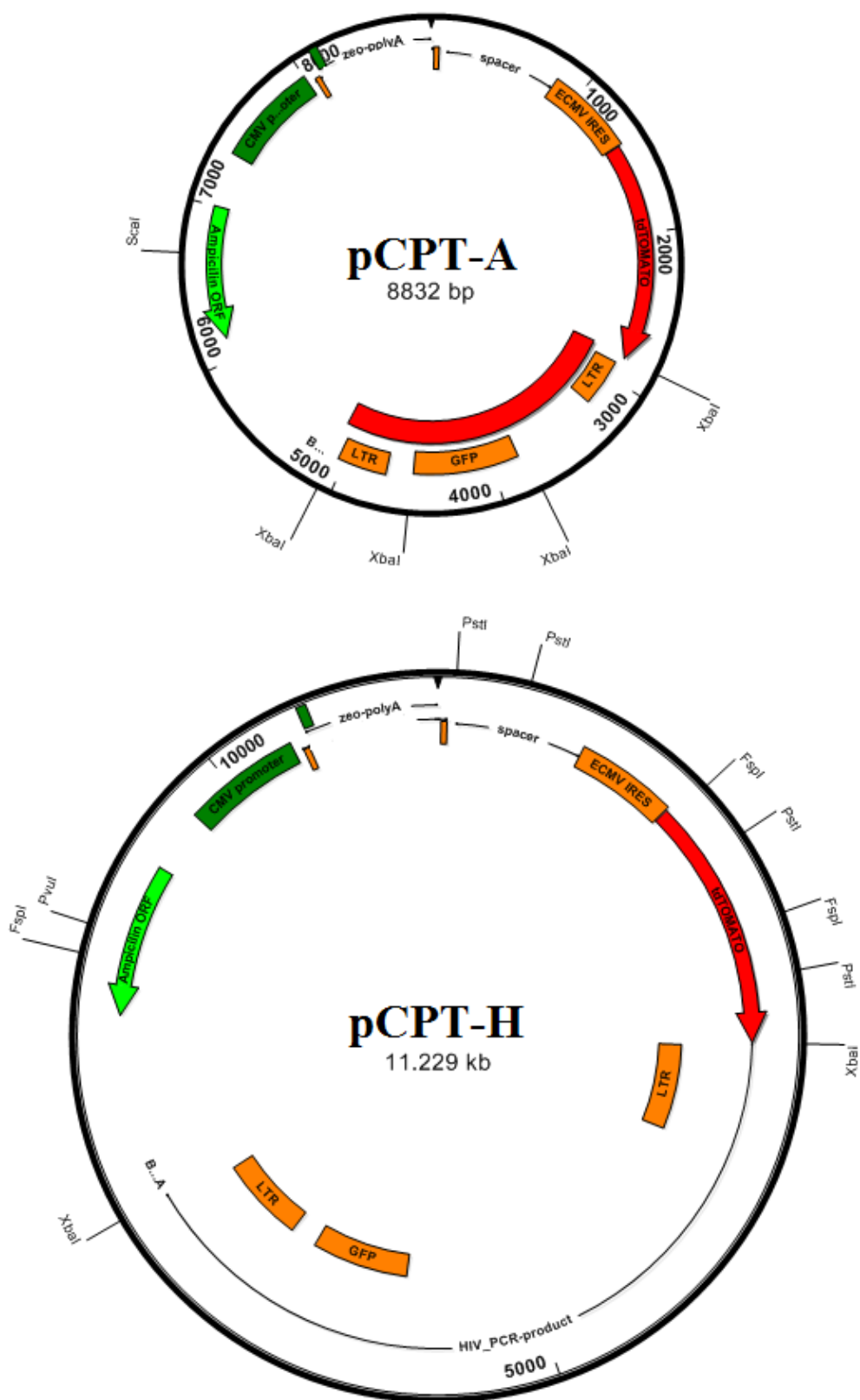
Mezi polyA v opačné orientaci a CMV promotorem se nachází sekvence plazmidu, která je využívána pro štěpení, linearizaci, vektorů. Součástí této oblasti je gen pro rezistenci k ampicilinu, který je zde pro účely klonování.

Vytvořený vektor nese komponenty pro třístupňový systém selekce, jak je znázorněno na obrázku č. 4.4. A. Ze silného CMV promotoru je spouštěna exprese genu pro rezistenci k zeocinu umožňující selekci buněk s integrovaným vektorem. Exprese GFP umožňuje měřit aktivitu, respektive míru umlčování, provirů. Exprese tdTomato signalizuje pročítání z přilehlého buněčného promotoru do proviru.

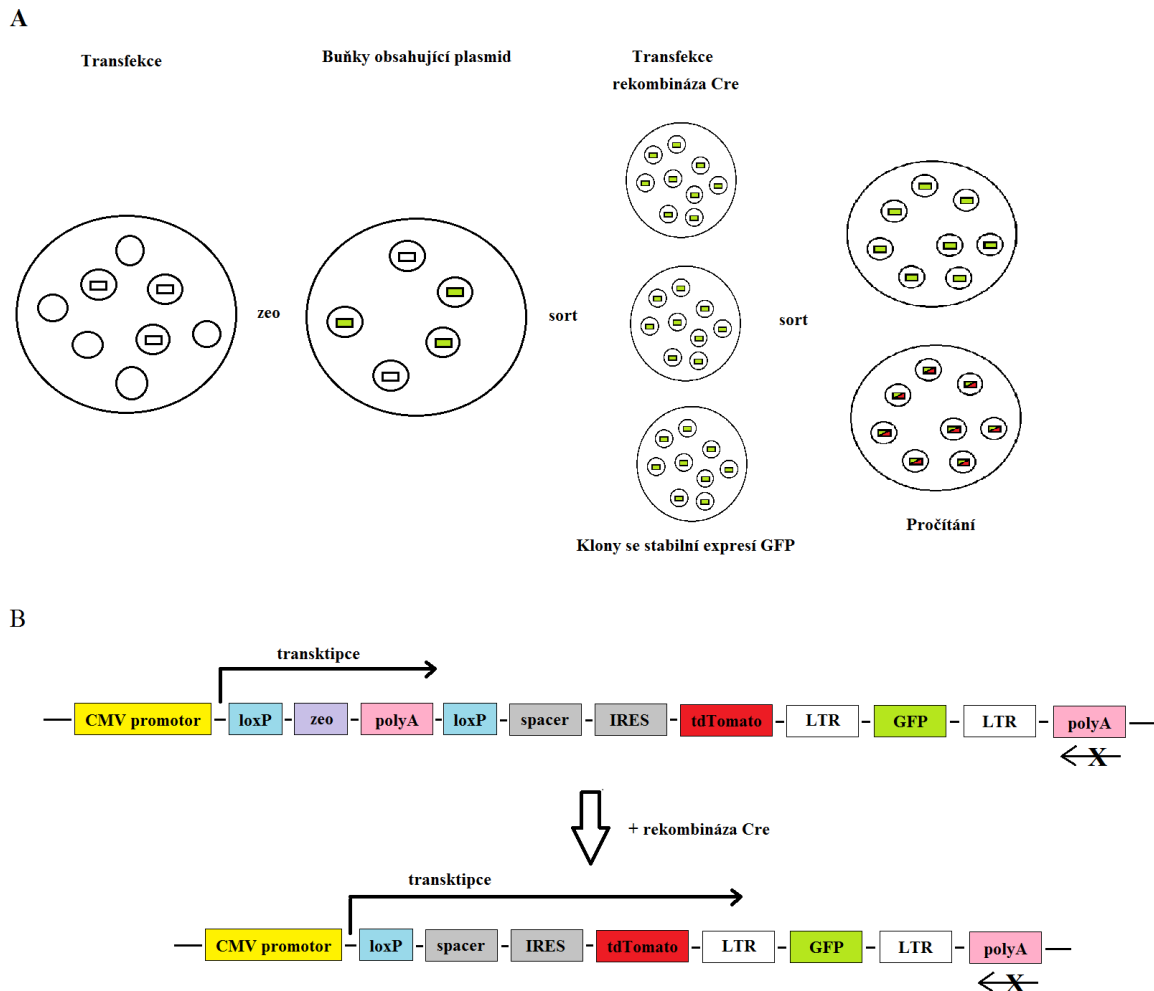
Aby mohlo dojít k rekombinaci mezi dvěma místy loxP je třeba dalšího vektoru vnášejícího do buněk gen pro rekombinázu Cre. Vektorem, do kterého se rekombináza vkládá, je plazmid pTaqBFP (Evrogen). Nese modrý fluorescenční protein (Blue Fluorescent Protein, BFP), kterým je možné posoudit účinnost transfekce. Exprese rekombinázy Cre, respektive fúzního proteinu sestávajícího z rekombinázy Cre a BFP, je pak řízena z CMV promotoru. Rekombináza je opatřena jaderným lokalizačním signálem zajišťující transport proteinu do jádra (obr. č. 4.2.).



Obr. č. 4.2. Rekombináza Cre nesoucí jaderný lokalizační signál – vlevo pod viditelným spektrem světla, vpravo při UV světle



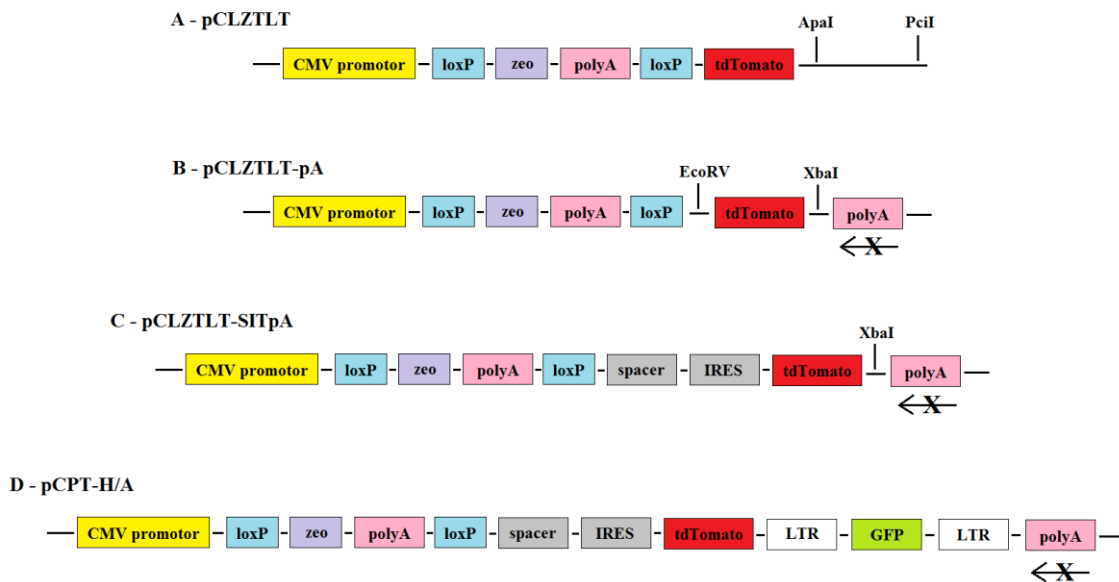
Obr. č. 4.3. Mapy vektorů pCPT-A a pCPT-H s vyznačenými restrikčními místy



Obrázek č. 4.4. A – Selekční schéma – Po transfekci buněk vektorem umožní zeocin selekci transfekovaných buněk, exprese GFP značí aktivní proviry umožňující studium umlčování a tdTomato indikuje okamžik pročtení provirů. B – Aktivita rekombinázy Cre – rekombinace odstraňující část vektoru umožňuje expresi červeného fluorescenčního proteinu.

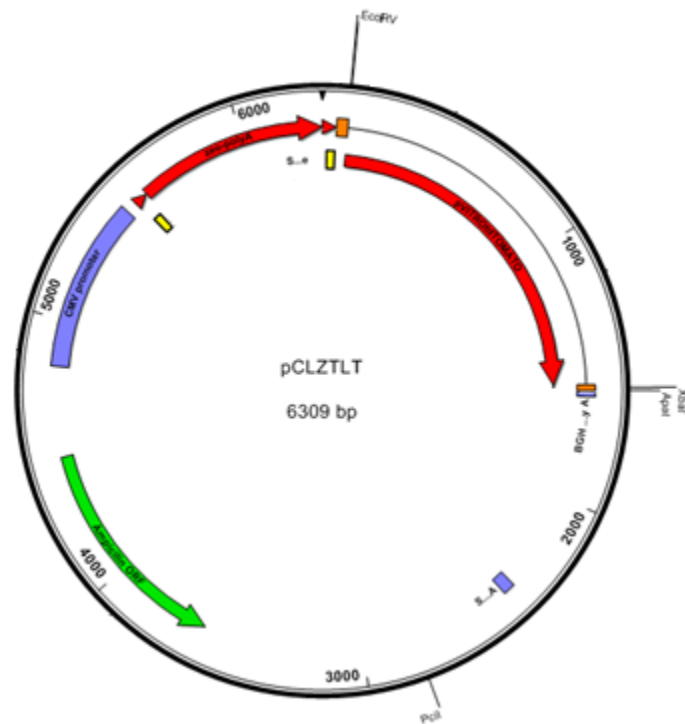
4.2. Konstrukce expresních vektorů

Schematické znázornění postupu je na obrázku č. 4.5.

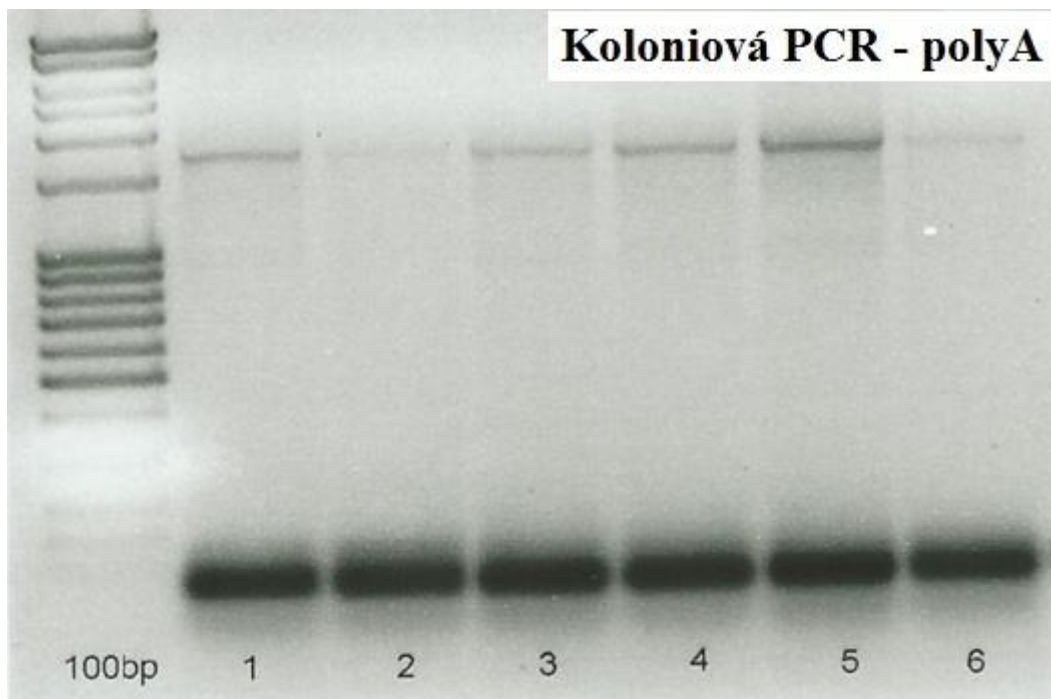


Obr. č. 4.5. Schematické znázornění postupu tvorby expresního systému: A – pCLZTLT – Štěpení plazmidu restričními endonukleázami ApaI a PciI a vytváření místa pro polyA sekvenci. B – pCLZTLT-pA – Štěpení plazmidu EcoRV a XbaI a vytváření místa pro spacer, IRES a tdTomato. C – pCLZTLT-SITpA – Štěpení XbaI a vytváření místa pro proviry. D – pCPT-H/A – Konečná podoba vektoru.

Nejprve jsem zdrojový plazmid pCLZTLT (obr. č. 4.6) štěpila restričními endonukleázami ApaI a PciI, abych odstranila přebytečnou sekvenci mezi geny pro tdTomato a amplicilinovou rezistenci a zároveň vytvořila linearizovaný vektor (cca 5 kbp). Do linearizovaného vektoru jsem klonovala sekvenci pro polyA (cca 250 bp) amplifikovanou z plazmidu pCLZTLT. PolyA sekvence se díky koncům vytvořenými restričními endonukleázami a použitými primery vkládá v opačné orientaci oproti zbývající sekvenci. Přítomnost inzertu polyA jsem kontrolovala koloniovou PCR (obr. č. 4.7).

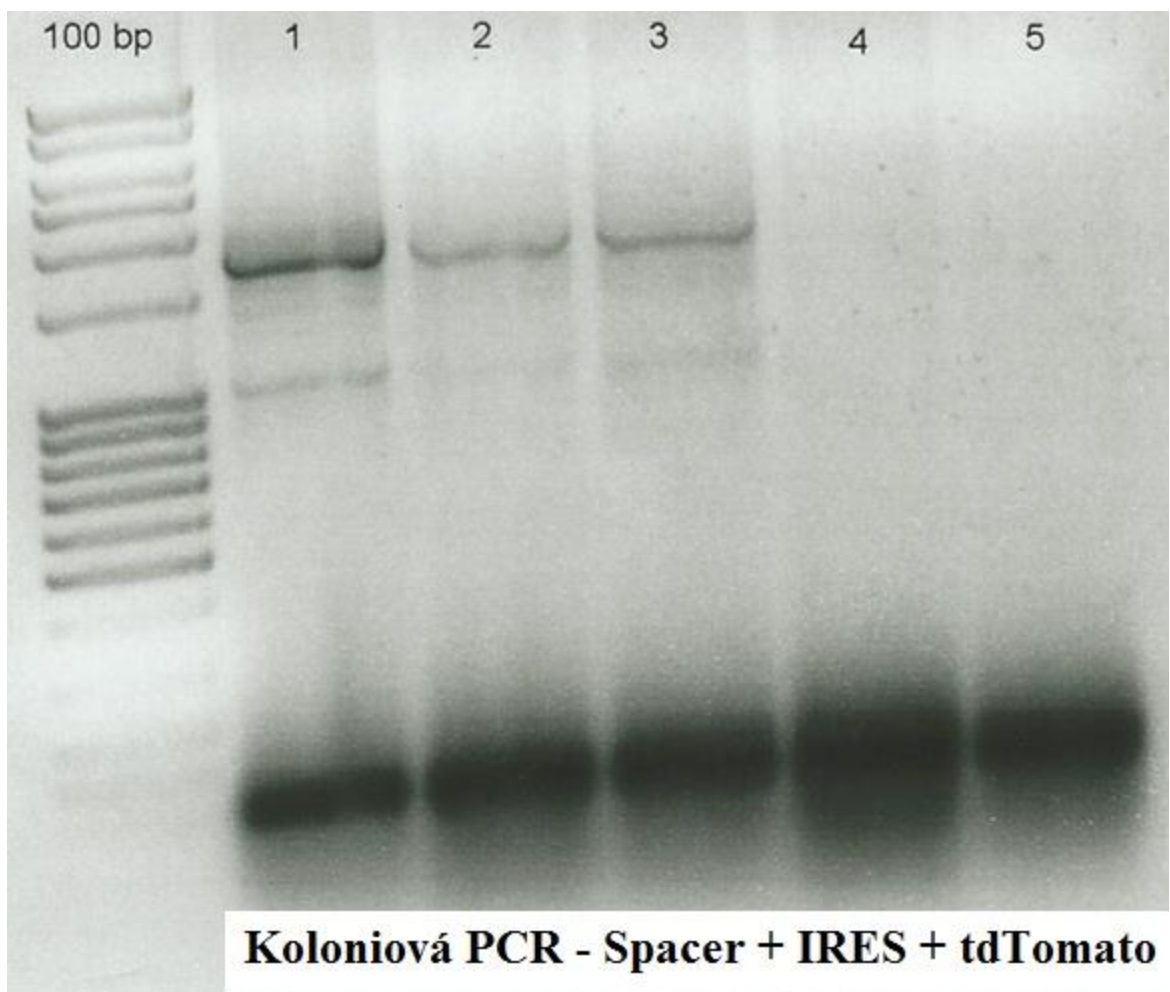


Obr. č. 4.6. Mapa plazmidu pCLZTLT s vyznačenými místy klonování



Obr. č. 4.7. Koloniová PCR – polyA: V levém sloupci nanesen marker, ve sloupcích 1-6 testované kolonie. Všechny testované kolonie jsou pozitivní na insert (fragment o velikosti 1 700 bp)

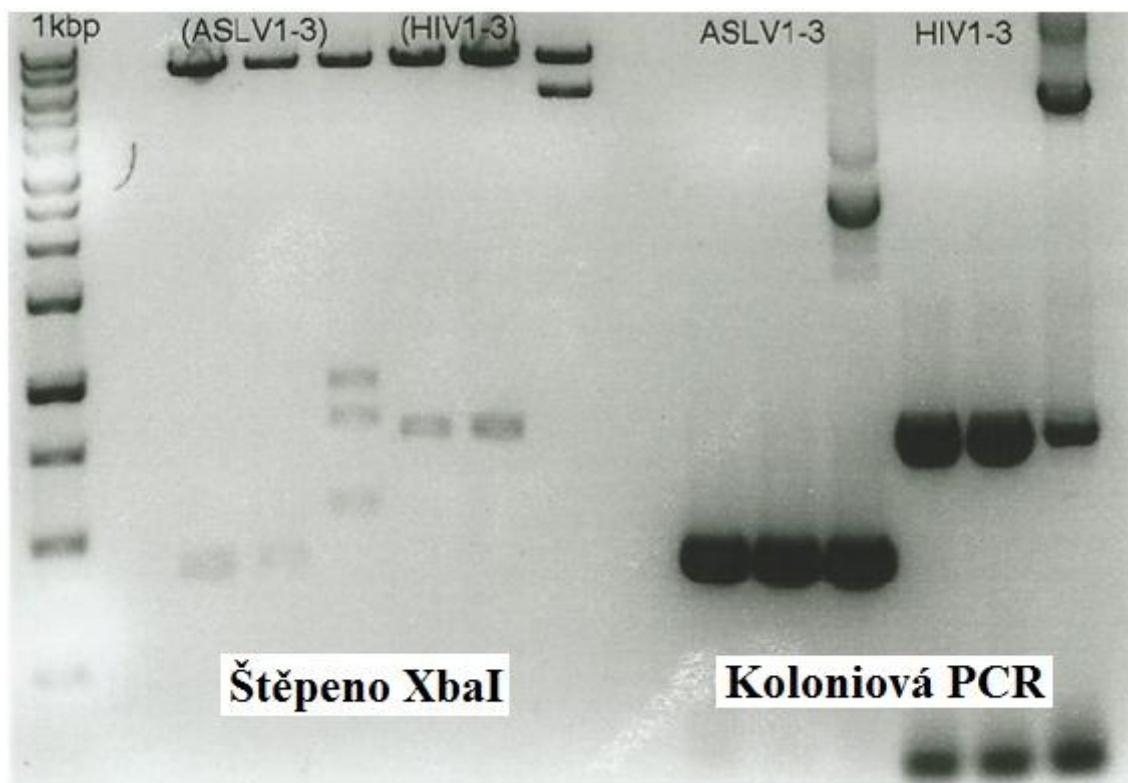
Meziprodukt, pCLZTLT-pA jsem štěpila restričními endonukleázami EcoRV a XbaI, čímž jsem odstranila fragment o velikosti cca 1,5 kbp mezi druhým loxP místem a polyA sekvencí v opačné orientaci. Do linearizovaného vektoru jsem klonovala sekvence spaceru s IRES amplifikované z plazmidu pLCGSIB a tdTomato amplifikací z pCLZTLT. tdTomato se sice v původním vektoru vyskytuje, ale bylo vloženo opětovně, protože zde nebylo vhodné restriční místo k vložení IRES. Přítomnost inzertů jsem ověřila koloniovou PCR (obr. č. 4.8).



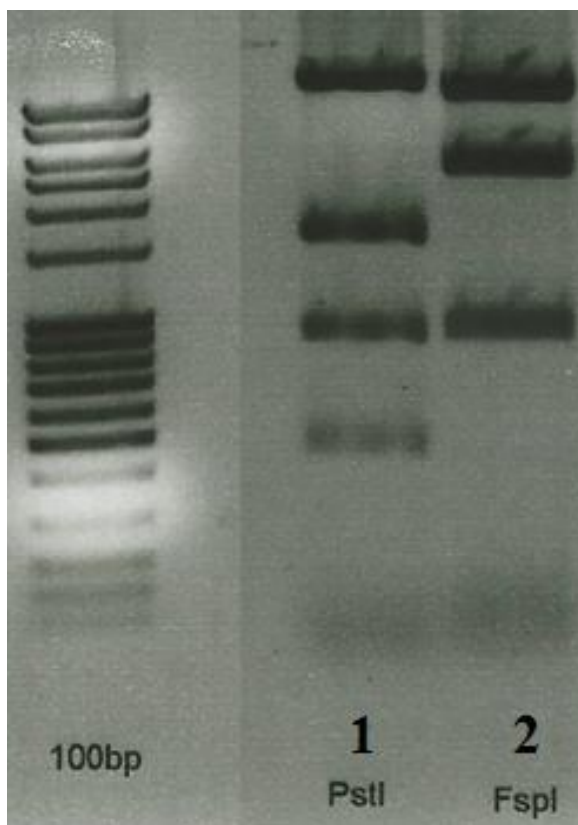
Obr. č. 4.8. Koloniová PCR – Spacer + IRES + tdTomato: V levém sloupci nanesen marker, ve sloupcích 1-5 testované kolonie. Sloupce 1-3 pozitivní na inzert (fragment o velikosti 1 700 bp)

Meziprodukt, pCLZTLT-SITpA, jsem štěpila restriční endonukleázou XbaI, která štěpí mezi genem pro tDTomato a polyA, a do tohoto místa jsem klonovala amplifikované proviry. HIV jsem amplifikovala z plazmidu HIV a ASLV z plazmidu pAG3.

Ke kontrole správnosti vytvořených vektorů jsem použila koloniovou PCR (obr. č. 4.9) a restriční ověření. Plazmidy pCPT-A a pCPT-H jsem štěpila restriční endonukleázou XbaI (obr. č. 4.9) a plazmid pCPT-H jsem štěpila restričními endonukleázami PstI a FspI (obr. č. 4.10).

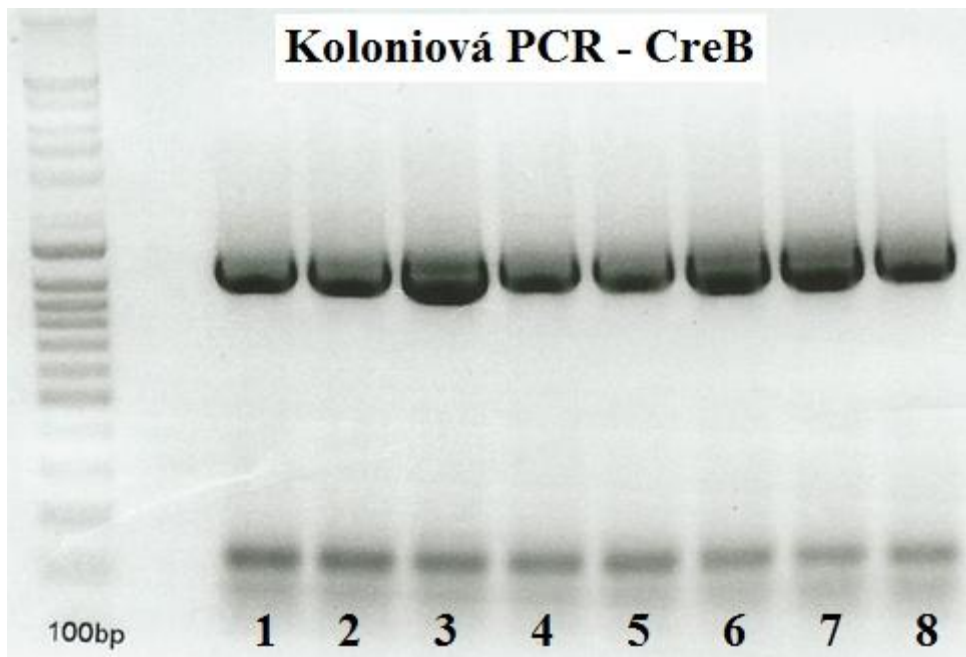


Obr. č. 4.9. Štěpení vektorů XbaI, koloniová PCR – Zleva: marker, tři sloupce štěpení vektoru pCPT-A enzymem XbaI, 3 sloupce štěpení vektoru pCPT-H enzymem XbaI, 3 sloupce testovaných kolonií na přítomnost proviru ASLV, 3 sloupce testovaných kolonií na přítomnost proviru HIV. U štěpení enzymem XbaI u vzorku ASLV-3 jsou patrné 4 pruhy (cca 6 600 bp, 930 bp, 780 bp a 530 bp). U štěpení enzymem XbaI u vzorku HIV-3 jsou patrné 2 pruhy (cca 4 630 bp a 6 600 bp). Štěpením XbaI odpovídá koloniová PCR. U vzorků č. 3 amplifikace vloženého proviru. Výrazné pruhy koloniové PCR jsou amplifikované LTR sekvence.

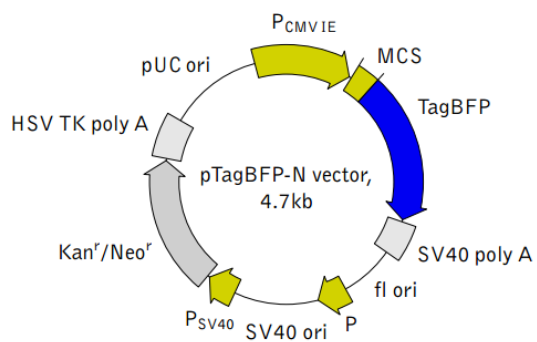


Obr. č. 4.10. Restrikční štěpení – V levém sloupci nanesen marker, ve sloupci 1 štěpení plazmidu pCPT-H enzymem PstI, ve sloupci 2 štěpení téhož plazmidu enzymem FspI. Po štěpení PstI jsou na gelu patrné 4 fragmenty (cca 8 845 bp, 1 295 bp, 730 bp a 360 bp). Po štěpení FspI jsou na gelu tři fragmenty (cca 6 640 bp, 3 860 bp a 730 bp).

Třetím typem vytvářeného vektoru je plazmid nesoucí rekombinázu Cre. K tomuto účelu jsem použila komerčně dostupný plazmid pTaqBFP (Evrogen, obr. č. 4.12.). Plazmid jsem štěpila restrikční endonukleázou BamHI, která štěpí v místě tzv. mnohočetného klonovacího místa (Multiple Cloning Site, MCS) a do tohoto místa jsem klonovala rekombinázu Cre s deletovaným stop kodonem amplifikovanou z plazmidu pACreIGW2-2EDD. Rekombináza Cre a BFP jsou ve stejném čtecím rámci, vzniká fúzní protein. Přítomnost inzertu klonování jsem ověřila koloniovou PCR (obr. č. 4.11.).



Obr. 4.11. Koloniová PCR – rekombináza Cre – vlevo marker, sloupce 1-8 se testovanými koloniemi, ve všech testovaných klonech byla rekombináza Cre přítomna.



Obr. č. 4.12. Schéma plazmidu pTagBFP (www.evrogen.com)

4.3. Průkaz účinnosti expresního systému

Účinnost expresního vektoru jsem prokázala expresí reportérových genů, zeocinovou selekcí a kontrolními vzorky.

Provedla jsem transientní transfekci nebo kotransfekci vektorů do buněčné linie 293. Tato linie byla vybrána, protože se snadno kultivuje, dobře transfekuje a je klonogenní. Použila jsem různé kombinace vektorů: pCPT-A a pTaq-CreB, samotné pCPT-A, pCPT-H a pTaq-CreB, samotné pCPT-H, pCLZTLT a pTaq-CreB, samotné pCLZTLT a samotné pTaq-CreB.

Již čtyři dny po transfekci (obr. č. 4.13) je patrné, že velká část buněk je po transfekci vektory pCPT-A a pCPT-H GFP pozitivních, při kotransfekci vektory pCPT-A a pCPT-H s pTaq-CreB buňky zůstávají GFP pozitivní, ale posouvají se v signálu pro tdTomato. Buňky kotransfekované pCLZTLT, bez provirů, a vektorem s rekombinázou Cre mají pouze signál pro tdTomato. Buňky transfekované pTaq-CreB se ve spektru GFP a tdTomato jeví jako negativní, netransfekované, buňky.

Čtyři dny po transfekci (dpt) jsou buňky kotransfekované pCPT-H s rekombinázou Cre více tdTomato pozitivní než pCPT-A a rekombinázou Cre. Sedm dpt (obr. č. 4.14.) je zřetelné výrazné umlčování GFP pozitivních buněk. U buněk s pCPT-A je větší podíl tdTomato pozitivních buněk než čtyři dpt.

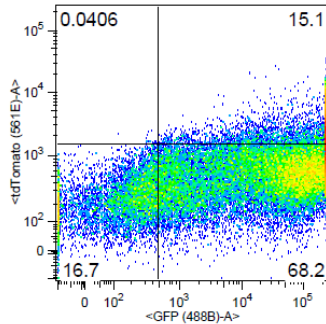
Buňky kotransfekované pCLZTLT s pTaq-CreB mají vyšší intenzitu fluorescence tdTomato, protože nemají IRES, které je ve pCPT-A a pCPT-H poměrně daleko od začátku transkriptu a má nižší účinnost iniciace translace.

Buňky mohou začít svítit v kanále pro tdTomato při poškození vektoru. Potvrzení, že je exprese skutečně výsledkem aktivity rekombinázy Cre, je prokázáno na obr. č. 4.15. Pokud jsou GFP pozitivní buňky transfekovány původním vektorem pTaqBFP, nedochází k zapnutí exprese červeného fluorescenčního proteinu. Podíl tdTomato pozitivních buněk je dán přesvitěním silné exprese GFP a neklasickou transkripcí vektoru odhalené DNA při transientní transfekci. Při stabilní transfekci se tdTomato pozitivní buňky nevyskytují. Na obrázku jsou měření na průtokovém cytometru pět dpt.

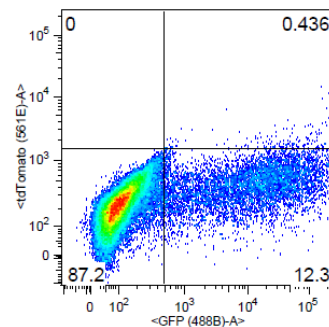
4dpt

A-ASLV

pCPT-A

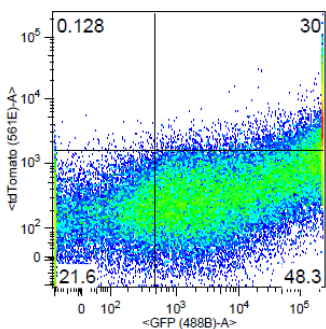


pCPT-A + pTaq-CreB

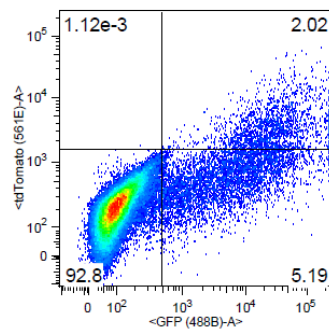


B-HIV

pCPT-H

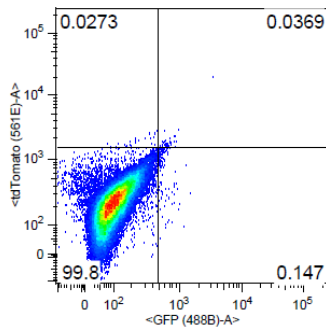


pCPT-H + pTaq-CreB

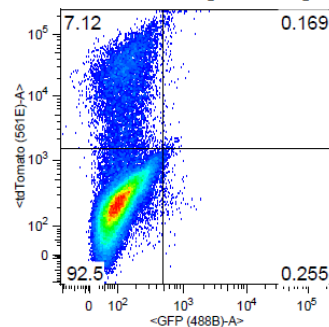


C

pTaq-CreB



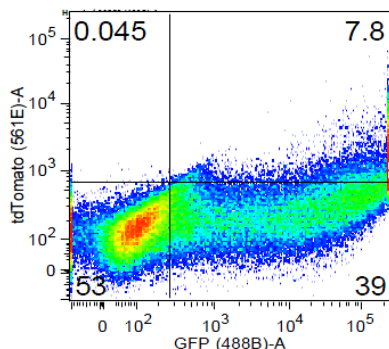
pCLZTLT + pTaq-CreB



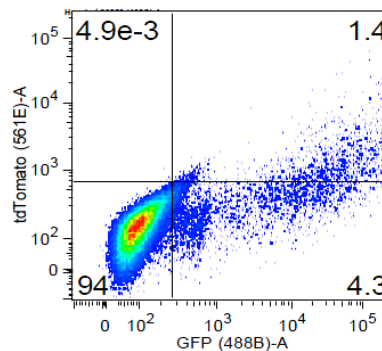
Obr. č. 4.13 Účinnost vektorů (4 dpt) A – na levém diagramu transfekce buněčné linie 293 vektorem pCPT-A, na pravém diagramu kotransfekce vektory pCPT-A a pTaq-CreB. B – na levém diagramu transfekce pouze vektorem pCPT-H, na pravém diagramu kotransfekce vektory pCPT-H a pTaq-CreB. C – na levém diagramu transfekce vektorem pTaq-CreB, na pravém diagramu kotransfekce zdrojovým vektorem pCLZTLT a pTaq-CreB.

7dpt

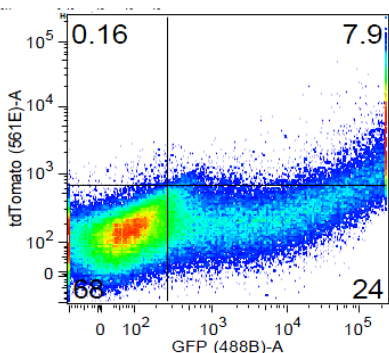
A-ASLV pCPT-A



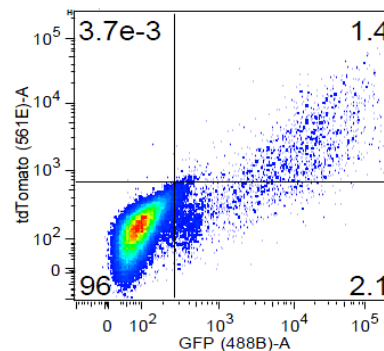
pCPT-A + pTaq-CreB



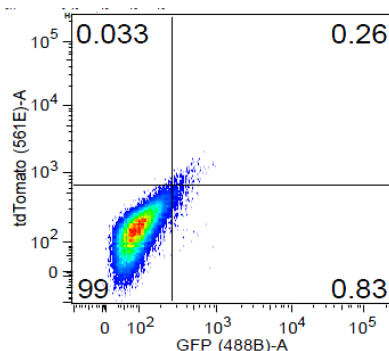
B-HIV pCPT-H



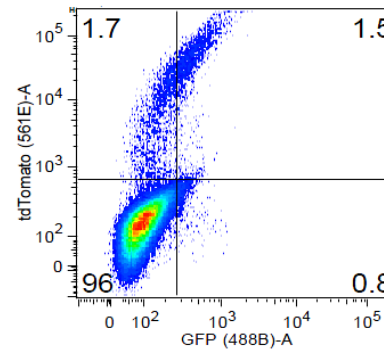
pCPT-H + pTaq-CreB



C pTaq-CreB

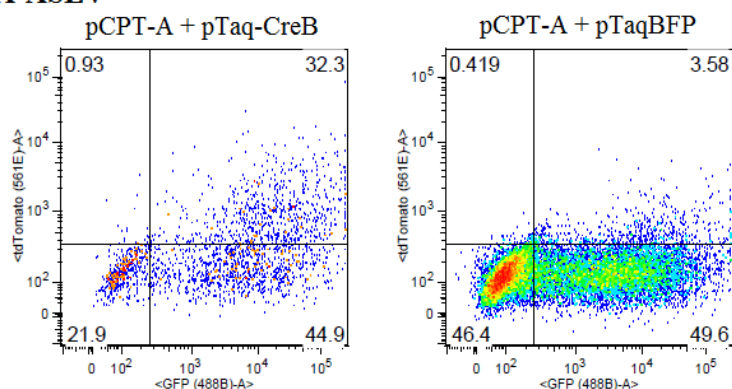


pCLZTLT + pTaq-CreB

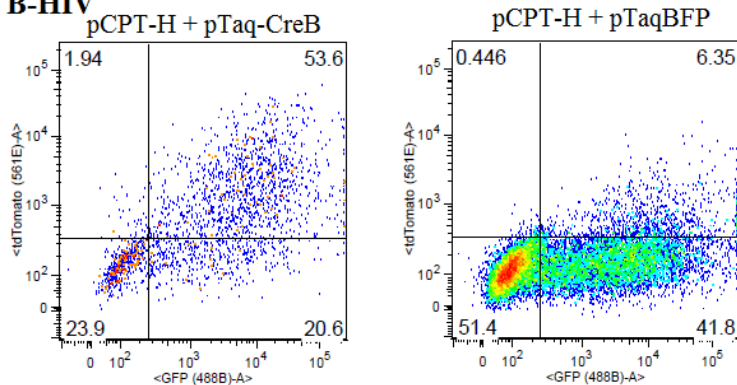


Obr. č. 4.14 Účinnost vektorů (7 dpt) – A – na levém diagramu transfekce buněčné linie 293 vektorem pCPT-A, na pravém diagramu kotransfekce vektory pCPT-A a pTaq-CreB. B – na levém diagramu transfekce pouze vektorem pCPT-H, na pravém diagramu kotransfekce vektory pCPT-H a pTaq-CreB. C – na levém diagramu transfekce vektorem pTaq-CreB, na pravém diagramu kotransfekce zdrojovým vektorem pCLZTLT a pTaq-CreB.

A-ASLV



B-HIV



Obr. č. 4.15. Účinnost rekombinázy Cre – A – na levém diagramu kotransfekce buněčné linie 293 vektory pCPT-A a pTaq-CreB, na pravém diagramu kotransfekce vektory pCPT-A a pTaqBFP. B – na levém diagramu kotransfekce vektory pCPT-H a pTaq-CreB, na pravém diagramu kotransfekce vektory pCPT-H a pTaqBFP. (5dpt)

Před transfekcí do buněčné linie HCT116 jsem vektory linearizovala. Tím je snížena účinnost transfekce. Plazmid pCPT-H jsem štěpila enzymem PvuI a plazmid pCPT-A jsem štěpila enzymem Scal.

Po ověření funkčnosti plazmidů v buňkách 293 jsem plazmidy pCPT-A a pCPT-H transfekovala (X-treme) do buněčné linie HCT116, buněk divokého typu a 3AB12. Buňky jsem kultivovala jeden týden, aby transfekované buňky začaly být rezistentní k zeocinu. Po dvou týdnech selekce zeocinem jsem si nechala vytřídit GFP pozitivní buňky.

Stabilní klony jsem transfekovala expresním vektorem s genem pro rekombinázu Cre. Z každého klonu jsem si pět dní po transfekci nechala vytřídit dvě subpopulace buněk, GFP pozitivní a dvojitě pozitivní (GFP a tdTomato), které byly použity k dalším experimentům popsáných v následující kapitole.

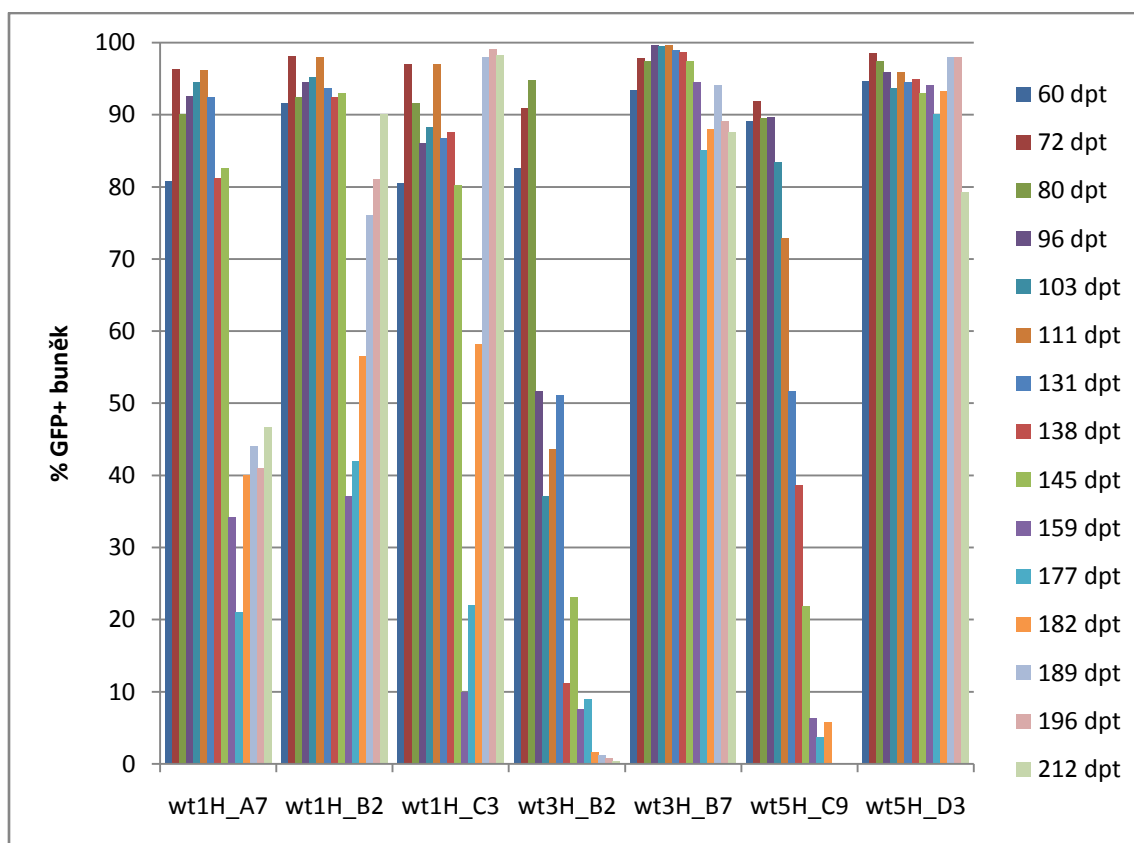
4.4 Předběžná pozorování provirového umlčování v buněčných klonech

Na základě účinnosti transfekce a účinnosti expresního systému jsem po sortu z cca 1,8 mil buněk transfekovaných plazmidy pCPT-A a pCPT-H získávala přibližně 200 GFP pozitivních buněk. Z nich pak přežilo přibližně 10% buněk, které vytvořily klony. 20-30% klonů bylo tvořeno z více než 50% buňkami, které byly GFP pozitivní. Jako stabilní klony jsem pak definovala ty klony, které měly více než 90% GFP pozitivních buněk s pCPT-H a více než 80% GFP pozitivních buněk nesoucích pCPT-A.

Nepodařilo se vyselektovat žádné klony s ASLV s více než 90% GFP pozitivních buněk z linie 3AB12 a stabilní klony z buněk HCT116 divokého typu, což ukazuje na větší citlivost ASLV na umlčování v lidských buňkách. Celkově jsem neselektovala příliš mnoho stabilních klonů z buněk 3AB12, které jsou oproti buňkám divokému typu menší, pomaleji rostou a celkově mají nižší fitness.

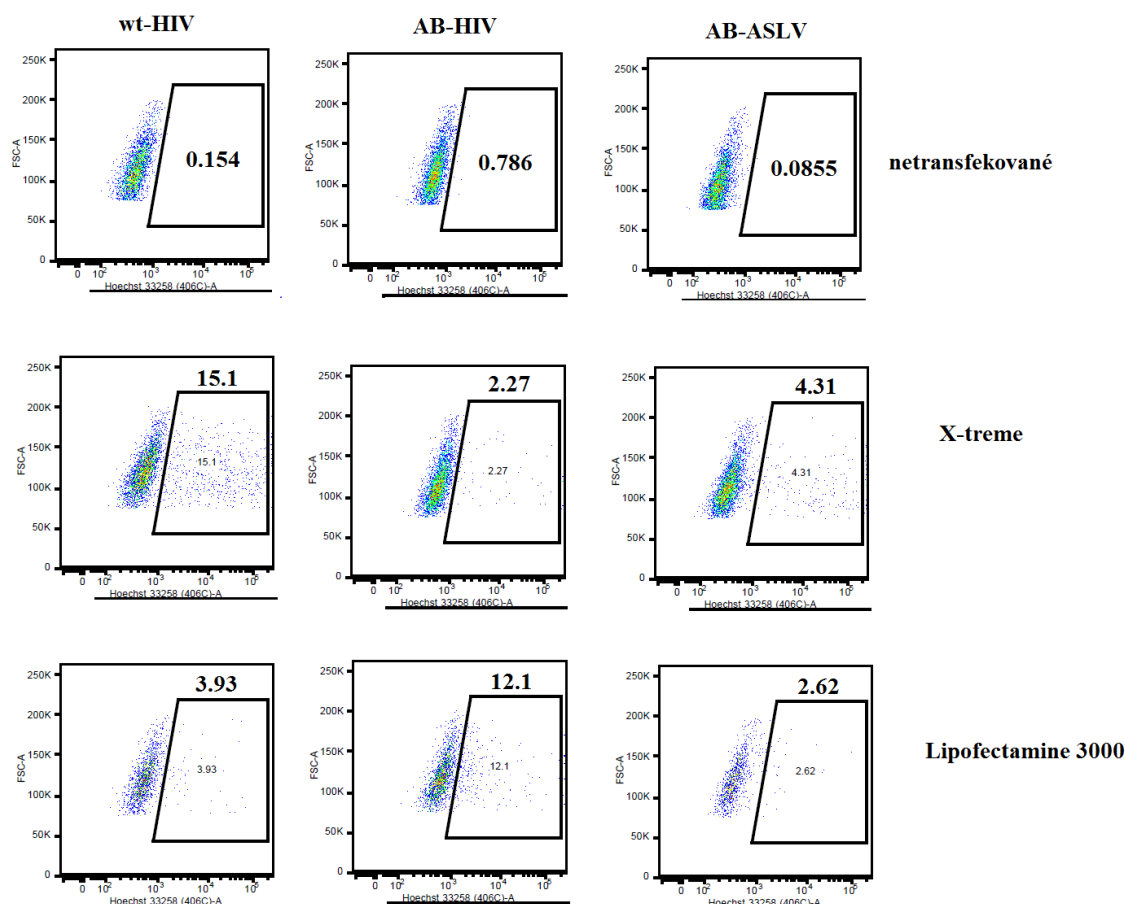
Klony vykazovaly různé stupně umlčování. Některé byly postupně umlčovány, některé byly umlčovány velmi rychle a některé klony zůstávaly stabilní i po dobu několika měsíců po transfekci. V období pět a půl až šest měsíců jsem pozorovala dramatické snížení stability u mnoha klonů, které do té doby měly více než 50% GFP pozitivních buněk, zhruba o polovinu. Některé klony zůstávaly stále stabilní.

Po poklesu exprese GFP jsem ke klonům opětovně přidala zeocin a opět se klony chovaly odlišným způsobem. U některých klonů se zvýšil podíl GFP pozitivních buněk, ale jiné klony podíl GFP pozitivních buněk nezvýšily. Jiné klony byly zeocinem zabity, ale vyskytly se i takové klony, které sice nebyly GFP pozitivní, ale dále v kultuře přežívaly. Tyto možnosti reakce na zeocin jsou pravděpodobně kombinací míry umlčení CMV promotoru a provirů. Porovnání klonů s různými stupni umlčování na obr. č. 4.16.



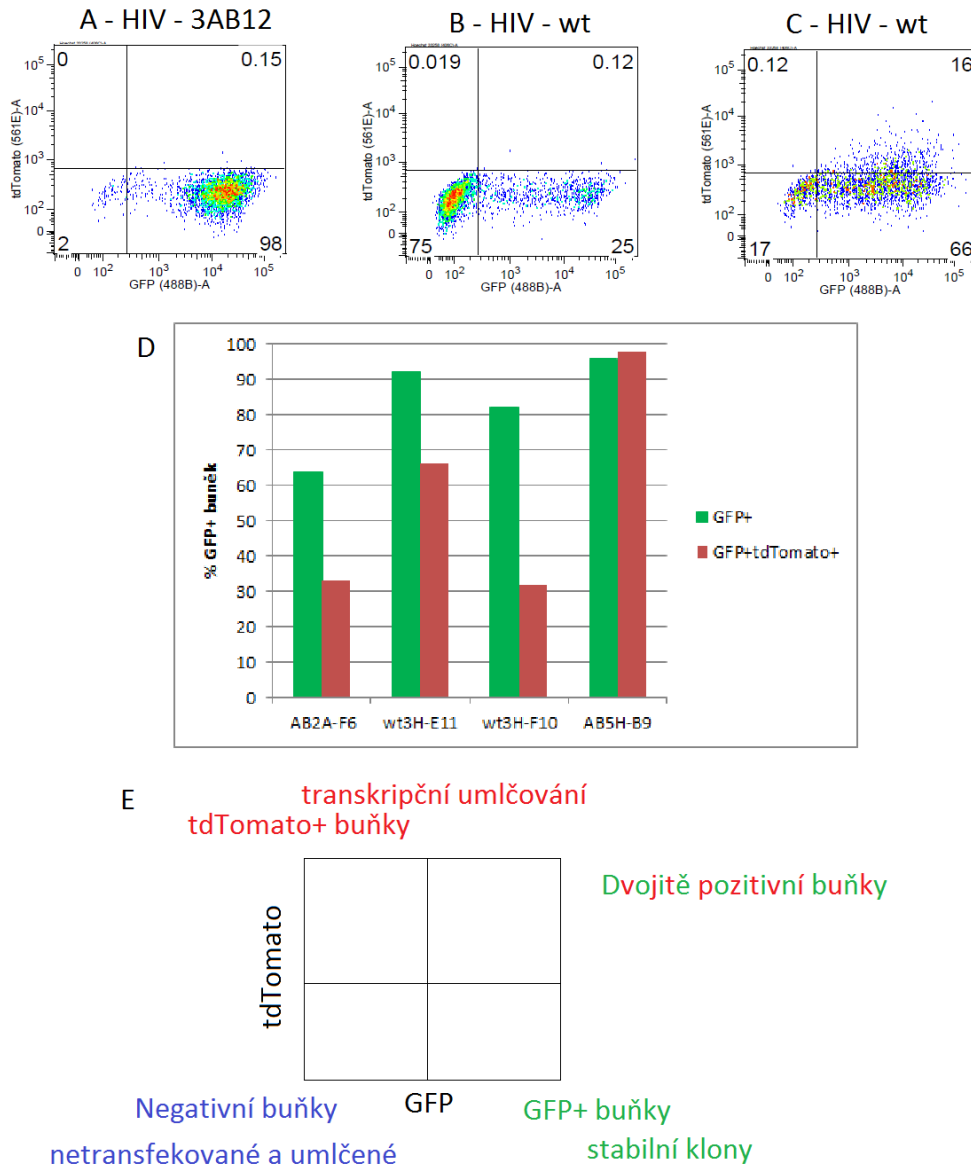
Obr. č. 4.16. Srovnání stability provirů – Klon s označením wt1H_A7 byl dlouho stabilní, s prudkým poklesem podílu GFP+ buněk. Klony s označením wt1H_B2 a wt1H_C3 dlouho stabilní, prudký pokles podílu GFP+ buněk, zvýšení podílu GFP+ buněk po přidání zeocinu do kultury. Klon wt3H_B2 nezvyšuje podíl GFP+ buněk, ale přežívá selekci zeocinem. Klony wt3H_B7 a wt5H_D3 byly velmi dlouho stabilní. Klon wt5H_C9 po poklesu podílu GFP+ buněk nepřežívá selekci zeocinem. Zeocin byl přidán 175 dpt.

Účinnost transfekce stabilních klonů plazmidem pTaq-CreB pomocí X-treme Transfection Reagents (Roche) podle oficiálního protokolu (poměr X-treme Reagents a DNA 2:1) byla tak nízká, že jsem v kultuře nepozorovala dvojité pozitivní buňky. V rámci optimalizace metody se ukázalo, že některé klony jsou účinněji transfekovatelné X-tremeReagents v poměru k DNA 3:1, pro jiné klony bylo účinnější transfekční činidlo Lipofectamine 3000. Přesto účinnost transfekce nepřesahovala 20%, ve většině případů se pohybuje kolem několika málo procent. Účinnost transfekce jsem stanovovala pomocí průtokového cytometru měřením modré fluorescence (obr. č. 4.17.).



Obr. č. 4.17. – Porovnání účinnosti transfekce různými transfekčními činidly u různých typů klonů – V horním řádku netransfekované buňky, v prostředním řádku transfekce X-treme Reagent a v dolním řádku za použití Lipofectaminu 3000. V levém sloupci údaje pro klon s HIV v buňkách divokého typu, v prostředním sloupci pro klon s HIV v 3AB12 buňkách a v pravém sloupci klon s ASLV v 3AB12 buňkách.

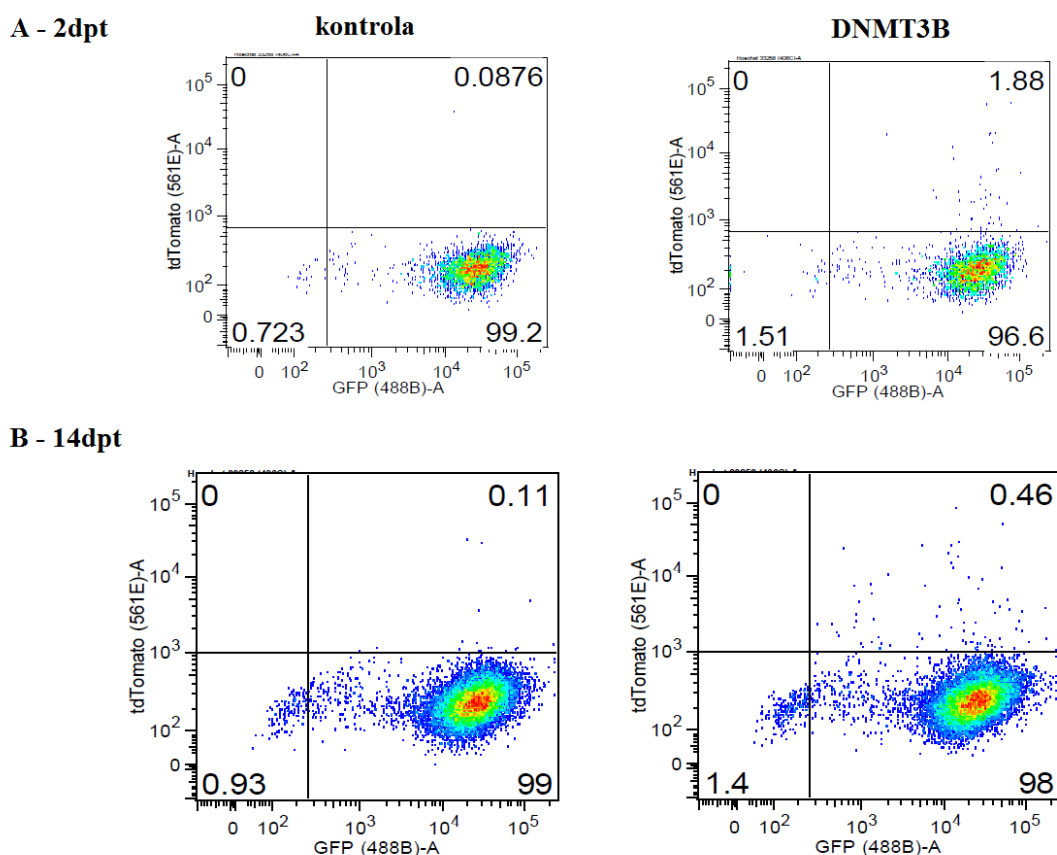
Většina sortovaných dvojité pozitivních buněk nebyla po třech týdnech po sortu již tdTomato pozitivní, CMV promotor byl umlčován ve větší míře, než bylo předpokládáno, pouze jeden klon byl stále tdTomato pozitivní, CMV promotor byl pravděpodobně místem integrace chráněn před umlčením. V buňkách HCT116 divokého typu s vektorem pCPT-H byla v porovnání s kontrolou, kde nebyla indukována transkripce z CMV promotoru do proviru, výrazněji snížena exprese GFP. Klon v buňkách 3AB12 s vektorem pCPT-H byl stabilní, nedošlo k umlčování, ale klon s vektorem pCPT-A umlčení vykazoval (obr. č. 4.18.).



Obr. č. 4.18. Měření na průtokovém cytometru – A – Schematické znázornění předpokládaných výsledků měření na průtokovém cytometru (osa x: GFP, osa y: tdTomato), vlevo dole netransfekované a umlčené buňky po transfekci vektory pCPT-A a pCPT-H, vpravo dole stabilní klony, vlevo nahoře umlčené klony (GFP-) po transfekci rekombinázou Cre, vpravo nahoře dvojitě pozitivní klony = stabilní klony transfekované rekombinázou Cre; B – podíl GFP+ buněk před transfekcí rekombinázy Cre (GFP+) a po transfekci rekombinázy Cre (GFP+tdTomato+); C – Klon deficientní na *de novo* metyltransferázy není po transfekci rekombinázy Cre umlčován; D – Klon v buňkách HCT116 divokého typu je výrazně umlčen po transfekci rekombinázy Cre, umlčení i CMV promotoru; E – Klon v buňkách HCT116 divokého typu zůstává aktivní, je GFP i tdTomato pozitivní.

Protože byly buňky sortovány pět dní po transfekci rekombinázou Cre, mohlo již docházet k umlčování CMV promotoru, což má za následek zdánlivě nižší účinnost kazety. Toto vede k problému spojeným s nárůstem subpopulace dvojitě pozitivních buňky z relativně malého počtu buněk. Možným řešením je transfekce většího počtu buněk.

Stabilní klon s pCPT-H v 3A12 jsem transfekovala vektorem pVITRO3B nesoucí gen pro DNMT3B, opět s velmi nízkou účinností. pVITRO3B nese reportérový gen pro tdTomato. U buněk pozitivních na tdTomato bylo patrné snížení exprese GFP, částečné umlčení provirů. Je možné, že po delší době by byly buňky umlčeny úplně (obr. č. 4.19).



Obr. č. 4.19. Transfekce klonu v buňkách 3A12 pomocí vektoru nesoucího gen pro DNMT3B (reportérový gen pro tdTomato) – A – 2 dny po transfekci – buňky jsou s nízkou účinností transfekovány; B – 14 dní po transfekci – transfekované buňky jsou částečně umlčeny (posun tdTomato⁺ buněk na ose x doleva)

5. Diskuze

Tato práce byla zaměřena na vytvoření nástroje pro studium umlčování retrovirů v kontextu hostitelského genomu. Tento nástroj je představován expresní kazetou, která je složena z retrovirového vektoru umístěného uvnitř expresní kazety, která svou konstrukcí umožňuje cíleně zapínat transkripční pročitání ze silného promotoru do proviru, zejména do jeho 5'LTR promotoru. Tato konstrukce simuluje situaci, kdy je retrovirus integrován do genu a umožňuje studovat vliv transkripční aktivity tohoto genu na umlčování v něm integrovaného retroviru. Navržená konstrukce umožňuje pomocí analýzy fluorescence exprimovaných reportérů snadno sledovat jak transkripční aktivitu retroviru (GFP) tak aktivitu hostitelské transkripční jednotky (tdTomato).

Při počátečním testování byla pozorována nízká úroveň exprese tdTomato. Bližší analýzou mapy vektoru bylo zjištěno, že během konstrukce vektorů vznikl složením tdTomato a IRES k sobě na jejich rozhraní druhý ATG kodon. Nízká úroveň exprese tdTomato by tak mohla být výsledkem interference iniciace translace z obou míst transkriptu. Proto jsem vytvořila další dvě varianty. Pomocí PCR primerů bylo ze sekvence odstraněno G na konci IRES a tím byl zrušen nežádoucí iniciační kodon, nebo jsem mezi IRES a tdTomato vložila část sekvence, která se nachází před tdTomato ve zdrojovém vektoru pCLZTLT. Nové varianty byly ještě méně účinné než ta první, a proto byla pro další práci použita původní varianta.

Fungování a účinnost vektorů byly ověřeny transfekcí plazmidů do buněčné linie 293. Čtyři dny po transfekci bylo mnoho buněk kultury transfekované vektory pCPT-A a pCPT-H GFP pozitivní. Buňky kotransfekované plazmidy pCPT-A nebo pCPT-H spolu s pTaq-CreB jsou dvojitě pozitivní. To ukazuje, že rekombináza Cre byla v buňkách účinně exprimována a transportována do jádra, kde rekombinací loxP míst z konstruktu odstranila signál pro polyA. Tento polyA signál je umístěn za CMV promotorem a jeho odstranění vede k pokračování transkripce přes spacer a kódující sekvenci tdTomato do signálu pro polyA v 5'LTR vloženého retroviru. Výsledkem je exprese tdTomato a červená fluorescence buněk. U plazmidu pCPT-H s kotransfekovaným plazmidem pTaq-CreB bylo pozorovatelné výrazné zvýšení intenzity

fluorescence tdTomato u GFP pozitivních buněk. U plazmidu pCPT-A bylo toto zvýšení méně patrné. Kotransfekce zdrojového plazmidu pCLZTLT s pTaq-CreB vede k silné fluorescenci tdTomato transfekovaných buněk. Zdrojový plazmid neobsahuje reportérový provirus, proto nejsou buňky GFP pozitivní. U plazmidu pCLZTLT není translace tdTomato iniciována pomocí IRES, proto je intenzita fluorescence tdTomato výrazně vyšší. V reportérových vektorech pCPT-A a pCPT-H je navíc před IRES 730 bp dlouhý spacer, což může také dále snižovat úroveň exprese tdTomato.

Buněčné kultury kotransfekované reportérovými konstrukty spolu s pTaq-CreB vykazují stejný podíl dvojitě pozitivních buněk v kulturách s ASLV i HIV variantou konstruktů. Jednou z možností proč byla po kotransfekci plazmidy pCPT-A s pTaq-CreB pozorována nižší intenzita exprese tdTomato než u pCPT-H je, že CMV promotor může být ovlivněn enhancerem obsaženým v LTR proviru. Virus ASLV obsahuje slabý enhancer, zatímco HIV obsahuje silný enhancer, který může mít větší vliv na CMV promotor a tedy expresi tdTomato.

Výsledky měření transfekce linie 293 jsou zobrazeny přesvitěním GFP do kanálu tdTomato. Objevují se také buňky, které ovšem zcela jistě tdTomato pozitivní jsou. To je dáno typem transfekce. Při transienční transfekci dochází k „spurious“ transkripci z oblastí plazmidu, ze kterých není iniciace transkripce předpokládána. V takovém případě může být transkripce iniciována až za signálem pro polyA, který má za úkol bránit transkripci genu tdTomato z CMV promotoru, a tdTomato může být exprimováno i z konstruktů v „nezapnutém“ stavu. (Nejepinská et al, 2012) Při transienční transfekci postrádá vnášená DNA nukleozomy, jejichž pozice a modifikace přesněji definují místa iniciace transkripce. (Henning a Fischer, 2013)

Porovnání transfekce buněk plazmidy pCPT-A a pCPT-H s kotransfekcí buněk plazmidy pCPT-A nebo pCPT-H a pTaq-CreB podporuje hypotézu, že dochází k transkripčnímu umlčování provirů. V nepřítomnosti rekombinázy Cre je kultura tvořena buňkami s různým stupněm aktivity provirů, ale po vnesení rekombinázy je většina provirů umlčena, což se projevuje extrémním snížením podílu GFP pozitivních buněk.

Pro selekci buněk transfekovaných reportérovými konstrukty byl využíván zeocin, který po navázání štěpí DNA. Toto selekční antibiotikum je vázáno proteinem, který kóduje

gen sh ble. Pokud není protein Sh ble v buňce ve vysoké hladině, jsou buňky stále poškozovány zeocinem. (Trastoy et al, 2005) Díky tomu je možné vytřídit buňky s vysokou aktivitou CMV promotoru, který řídí expresi genu pro rezistenci k zeocinu.

Při stabilní transfekci buněk HCT116 jsou v kultuře tdTomato pozitivní buňky, i když by být neměly, což je nejpravděpodobněji způsobeno poškozením vektoru před integrací do buněčného genomu. Do buněk se transfekuje linearizovaný vektor, který je velmi náchylný k poškození. Manipulací mohla být část vektoru odštěpena a transkripce tdTomato může být řízena z buněčného promotoru. Další možností je, že buněčné reparační mechanismy, které se účastní integrace vektoru do genomu buňky, mohly způsobit rekombinaci homologních míst loxP a vlastně tak zapnout expresní kazetu. Je potom tedy důležité třídít GFP pozitivní tdTomato negativní buňky, které nesou nepoškozený vektor. Pro následné experimenty je důležité, aby stabilně transfekované buňky obsahovaly pokud možno pouze jednu funkční kopii reportérového vektoru. Jeden integrovaný vektor na buňku byl zajištěn typem transfekce a linearizací vektoru před transfekcí, což snižuje účinnost transfekce.

Buňky byly tříděny 21 dní po transfekci, takže tím bylo přeskočeno časné umlčování provirů. Různé klony vykazují různé stupně stability. Některé klony byly velmi rychle umlčovány, u některých docházelo k postupnému umlčování v průběhu několika měsíců a některé zůstávaly stále stabilní. Po umlčení jsem klony selektovala opět zeocinem, abych zvýšila podíl GFP pozitivních buněk v kultuře a opět se různé klony chovaly různě. Některé klony zvýšily podíl GFP pozitivních buněk, jiné klony na selekci zeocinem nereagovaly, jiné klony byly zeocinem zabity a jiné klony, ačkoliv nezvýšily podíl GFP pozitivních buněk stále přežily. Tato možná chování klonů jsou dána kombinací aktivity CMV promotoru a provirů. Zvýšení podílu GFP pozitivních buněk po selekci zeocinem bylo dosaženo pouze v případě, kdy byl reportérový konstrukt umlčován jako celek, tzn. CMV promotor řídící zeocinovou rezistenci byl umlčován současně s provirem exprimujícím GFP. Různé stupně umlčování pozorované v této práci jsou v souladu s pozorováními popsány v práci Mok a spol. (2007). Stabilita provirů není měřena v pravidelných úsecích, data vznikla v rámci testování účinnosti kazety a optimalizace podmínek.

Buněčná linie HCT116 je citlivá na uvolnění od podkladu a proto po sortování pouze malá část buněk přežívá a vytváří klony. I když jsem izolovala velké množství klonů,

nepodařilo se mi selektovat žádné stabilně exprimované klony v buňkách divokého typu s ASLV, což naznačuje velkou citlivost ASLV na umlčování. Celkově se mi nepodařilo selektovat mnoho klonů v buňkách 3AB12. Ačkoliv tyto buňky nemají *de novo* DNMT, jsou menší, pomaleji rostou a celkově mají nižší fitness. K získání většího počtu klonů ke kvantifikaci bude zapotřebí velkého množství opakování třídění a selekcí stabilních klonů.

Při transfekci stabilních klonů rekombinázou Cre pomocí X-treme Reagent v poměru k DNA 2:1 byla velmi nízká účinnost transfekce. Nejprve jsem testovala, jestli není izolovaný plazmid rychleji degradován. Po transformaci do bakterií vyrostlo velké množství kolonií, což naznačuje, že se plazmid nedegradoval. Pro optimalizaci transfekční reakce jsem testovala různé poměry X-treme ku DNA, konkrétně 2:1, 3:1, 4:1 a 5:1. Při poměru 2:1 se tranfekované buňky nelišily od kontroly. Poměr 5:1 byl silně cytotoxický. Z variant 3:1 a 4:1 byla varianta 3:1 účinnější. Protože je rekombináza Cre fúzovaná s BFP, účinnost transfekce je možné měřit na průtokovém cytometru. Nízká účinnost transfekce je dána vlastnostmi klonů, protože původní linie je transfekována s větší účinností.

Používaná rekombináza Cre má na N-konci silný jaderný lokalizační signál, a proto by měl fúzní protein CreB také migrovat do jádra. Ve fluorescenčním mikroskopu jsem pozorovala modrou fluorescenci jader, což potvrzuje správnost transportu a funkci vytvořeného fúzního proteinu.

Dvojitě pozitivní buňky a k nim odpovídající kontrola byly měřeny na průtokovém cytometru 21 dní po sortování. Tato dlouhá doba mezi sortováním a měřením je dána pomalým růstem dvojitě pozitivních buněk, kterých bylo sortováno velmi málo. HCT116 jsou buňky, které potřebují pro optimální proliferaci konfluenci více než 50%. Snížení času potřebného pro nárůst dostatečného množství buněk by bylo možné vyřešit větším počtem sortovaných buněk. Bylo by lepší buňky jednoho klonu sortovat po částech, protože jinak by byly buňky velmi dlouho v suboptimálních podmínkách a průchod sortovacím strojem je pro buňky již velmi stresující. Dalším problémem nárůstu subpopulace z malého počtu buněk je, že je chování této subpopulace určeno z omezeného počtu buněk.

Většina dvojitě pozitivních buněk byla 21 dní po transfekci bez exprese tdTomato. Nebyla předpokládána tak vysoká míra umlčování CMV promotoru. Pouze jeden klon zůstal tdTomato pozitivní, což je pravděpodobně dáno místem integrace, které chrání CMV

promotor před umlčením. Přesto je patrný pokles podílu GFP pozitivních buněk u subpopulace původně dvojitě pozitivních buněk oproti kontrole, subpopulaci GFP pozitivních buněk. To naznačuje, že i relativně krátké období transkripčního pročitání LTR promotoru z CMV promotoru bylo dostatečné pro pozorovatelné zvýšení míry umlčování proviru (pokles podílu GFP pozitivních buněk).

ASLV v buňkách 3AB12 bylo umlčováno po transfekci rekombinázy Cre. Celkově ASLV klony nedosahovaly tak vysoké stability jako HIV. Všechno naznačuje na vysokou citlivost ASLV na umlčování v savčích buňkách.

Klon s integrovaným pCPT-H v buňkách 3AB12 byl transfekován plazmidem nesoucí gen pro DNMT3B. Tato de novo DNMT byla vybrána, protože podle Šenigla a spol. (2012) je především tato DNMT zodpovědná za metylační aktivitu umlčující integrované proviry. Expresní vektor s DNMT3B nese reportérový gen pro tdTomato, transfekované buňky jsou viditelné na grafu měření z průtokového cytometru, protože netransfekované buňky již tdTomato pozitivní nebyly. Dva dny po transfekci ještě k žádnému poklesu aktivity nedochází, ale sedmý den bylo možné pozorovat malý rozdíl aktivity projevující se roztažením subpopulace tdTomato pozitivních buněk na ose GFP positivity. Čtrnáct dní po transfekci byly pozorovány již zcela dvě samostatné populace dvojitě pozitivních buněk. Pokud by byly buňky sledovány delší dobu, je pravděpodobné, že by byl efekt aktivity DNMT3B na umlčování ještě výraznější. Podobné chování klonů bylo pozorováno při studiu vlivu DNMT na proviry (Šenigl, nepublikováno). Vnesení DNMT3B do klonu může mít za následek různé projevy v expresi GFP. Klon může zůstat stabilní, pomalu být umlčován, nebo být umlčován velmi rychle. Tedy se může chovat tak, jako klony v buňkách divokého typu.

S umlčováním provirů souvisí úroveň metylace LTR. Ta je zjišťována pomocí bisulfitové reakce. Tato metoda je v naší laboratoři Virové a buněčné genetiky na ÚMG již etablována, proto nebyla součástí této práce, ale bude využívána až při samotném testování tohoto expresního systému.

Protože se vektor integruje do DNA, jeho aktivita může být různým způsobem ovlivňována okolním genomem, na což poukazuje umlčování CMV promotoru. Proto budou integrační místa mapována do genomu pomocí metody splinkerette PCR. Tato metoda je rovněž potřeba k vyloučení identických klonů, které byly rozděleny při sortování. PCR

primery, které jsem používala, nasedají do integrovaného vektoru v místech před CMV promotorem, což je zhruba 300 bp od místa linearizace. Nepodařilo se mi amplifikovat žádnou sekvenci v testovaných klonech. Sekvence odpovídající PCR primerům byla pravděpodobně degradována před integrací vektoru. Při samotné analýze bude potřeba nalézt vhodnější místo pro navržení PCR primerů. Případně by bylo možné použít jinou metodu, např. inverzní PCR.

6. Závěr

Vytvořila jsem expresní systém, který umožňuje simulovat situaci, kdy je retrovirus integrován do genu. Systém sestává z kazety, kde je provirus umístěn do transkripční jednotky, která je řízena CMV promotorem. Expresí rekombinázy Cre v buňkách s integrovanou kazetou je možné indukovat pročitání virového LTR promotoru z výše zmíněného CMV promotoru. Vlastnosti tohoto systému jsem ověřila nejdříve transientní transfekcí do buněk 293 a následně stabilní transfekcí do dvou linií HCT116 (divoký typ a linie postrádající *de novo* DNA metyltransferázy). Analýza ukázala, že proviry jsou v tomto systému transkripčně aktivní a transfekce aktivačního vektoru exprimujícího rekombinázu Cre dokáže spustit pročitání z CMV promotoru až na hranici 5'LTR. Tento systém tedy umožňuje studium umlčování retrovirů integrovaných do transkribovaných oblastí genů.

Podle předběžných výsledků analýzy buněčných klonů obsahujících zmíněné kazety dochází k umlčování provirů, i když nedochází k pročtení jejich LTR, což je zřejmě dáno místem integrace celé kazety. Pročtení podstatně k umlčování přispívá, ale předběžné výsledky byly prováděny z malého počtu vzorků, takže nebylo možné vyvodit obecné závěry o míře vlivu pročitání retrovirového LTR na jeho umlčování a roli *de novo* DNA metyltransferáz v tomto procesu.

Během analýzy izolovaných klonů se ukázalo, že virus ASLV je v porovnání s HIV velmi citlivý na umlčování v savčích buňkách. Z toho důvodu bude k získání dostatečného počtu stabilních klonů potřeba velkého počtu opakování sortování buněk k selekci stabilních klonů.

7. Seznam použitých zkratek

- 293 – HEK-293
- 3AB12 – nulové mutanty pro *de novo* metyltransferázy
- ASLV (Avian Sarcoma/Leukosis Virus) – ptačí sarkomový a leukózní virus
- BET (Bromodomain and Extraterminal Domain) – bromodoména a extraterminální doména
- BFP (Blue Fluorescent Protein) – modrý fluorescenční protein
- BSA (Bovine Serum Albumin) – hovězí sérový albumin
- CCD (Catalytic Core Domain) – katalytická doména
- CIS (Common Integration Sites) – obecná integrační místa
- CMV – cytomegalovirový
- CTD (C-Terminal Domain) – C-terminální doména
- DNMT (DNA Methyltransferases) – DNA metyltransferáza
- DNMT3L (DNMT3-like)
- dpt – dny po transfekci
- EC (Embryonic Carcinoma) – embryonální nádorové
- ERV (Endogenous Retrovirus) – endogenní retrovirus
- ES (Embryonic Stem) – embryonální kmenové
- ESET (ERG-Associated Protein With SET Domain)
- ET (Extraterminal) – extraterminální
- FIV (Feline Immunodeficiency Virus) – virus kočičí imunodeficiency
- GFP (Green Fluorescent Protein) – zelený fluorescenční protein
- HAT (Histone Acetyltransferase) – histonová acetyltransferáza
- HDAC (Histone Deacetylase) – histonová deacetyláza
- HIV (Human Immunodeficiency Virus) – virus lidské imunodeficiency
- HP1 – heterochromatinový protein 1
- HRP-2 (Hepatoma-Derived Growth Factor-Related Protein 2)
- HS4 (Hypersensitive Site 4) – hypersenzitivní místo 4
- HTLV-1 (Human T-Leukemia virus 1) – virus lidské T leukémie 1
- ChIP (Chromatin Immunoprecipitation) – chromatinová imunoprecipitace
- IE (Immediate Early) – bezprostředně časný
- IRES (Internal Ribosome Entry Site) – vnitřní místo pro vstup ribozomu
- KAP1 (KRAB Associated Protein 1)
- KRAB-ZFP (Krüppel-Associated Box Zinc Finger Protein)
- LEDGF/p75 (Lens Epithelium-Derived Growth Factor/p75) – růstovým faktorem odvozeným z epitelu čočky/p75
- LMO2 (LIM Domain-Only 2)
- LTR (Long Terminal Repeats) – dlouhé terminální repetice
- MAV-2 (Myeloblastosis-Associated Virus Type 2) – virus asociovaný s myeloblasty typu 2
- MBD (Methyl-Binding Domain) – metyl vázající doména

- MBD2 (Methyl Cytosine Binding Domain Protein 2) – protein s doménou vázající metylovaný cytosin 2
- mCpG – metylovaný CpG
- MCS (Multiple Cloning Site) – mnohočetné klonovací místo
- MeCP2 (Methyl CpG Binding Protein 2)
- MLV (Murine Leukemia Virus) – virus myší leukémie
- MMTV (Mouse Mammary Tumor Virus) – virus nádoru mléčné žlázy u myší
- NTD (N-Terminal Domain) – N-terminální doména
- PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen)
- PCR (Polymerase Chain Reaction) – polymerázová řetězová reakce
- PHD (Plant Homeodomain)
- RING (Really Interesting New Gene)
- RSV (Rous Sarcoma Virus) – virus Roussova sarkomu
- SCID (Severe Combined Immunodeficiency Disease) – těžká kombinovaná deficiencie
- SETDB1 (SET Domain Bifurcated 1)
- SIV (Simian Immunodeficiency Virus) – virus opičí imunodeficiencie
- SPAG6 (Sperm Associated Antigen 6)
- TE – T₁₀E_{0,1}
- TSS (Transcription Start Site) – místo transkripčního startu
- TU (Transcriptional Unit) – transkripční jednotka
- UHRF1 (Ubiquitin-Like, Containing PHD and RING Finger Domains 1)
- ÚMG – Ústav molekulární genetiky
- ZFP (Zinc Finger Protein)

7.1. Seznam zkratk histonových modifikací

- H2AH5ac – acetylace histonu H2A na histidinu 5
- H2BK5me1 – metylace histonu H2B na lysinu 5
- H3K14ac – acetylace histonu H3 na lysinu 14
- H3K4me1/2/3 – mono-, di-, trimetylace histonu H3 na lysinu 4
- H3K9ac – acetylace histonu H3 na lysinu 9
- H3K9me1/2/3 – mono-, di-, trimetylace histonu H3 na lysinu 9
- H3K27ac – acetylace histonu H3 na lysinu 27
- H3K27me1/2/3 – mono-, di-, trimetylace histonu H3 na lysinu 27
- H3K36me2/3 – di-, trimetylace histonu H3 na lysinu 36
- H3R2me1/2 – mono-, dimetylace histonu H3 na argininu 2
- H3K79me1/2/3 – mono-, di-, trimetylace histonu H3 na lysinu 79
- H4K20me1/3 – mono-, trimetylace histonu H4 na lysinu 20

8. Seznam použitých informačních zdrojů

- Aljanabi, S. M., Martinez, I. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Research* (1997); 25(22): 4692-4693.
- Barr, S. D. et al. Integration Targeting by Avian Sarcoma-Leukosis Virus and Human Immunodeficiency Virus in the Chicken Genome. *Journal of Virology* (2005); 79(18): 12035–12044.
- Barski, A. et al. High-Resolution Profiling of Histone Methylations in the Human Genome. *Cell* (2007); 129(4): 823-837.
- Baubec, T. et al. Genomic profiling of DNA methyltransferases reveals a role for DNMT3B in genic methylation. *Nature* (2015); 520(7546): 243-247.
- Benabdellah, K. et al. A Chimeric HS4-SAR Insulator (IS2) That Prevents Silencing and Enhances Expression of Lentiviral Vectors in Pluripotent Stem Cells. *PLOS One* (2014); 9(1): e84268.
- Berry, Ch. et al. Selection of Target Sites for Mobile DNA Integration in the Human Genome. *PLOS Computational Biology* (2006); 2(11): e157.
- Bestor, T. H. The DNA methyltransferases of mammals. *Human Molecular Genetics* (2000); 9(16): 2395-2402.
- Billard, L.-M. et al. MeCP2 and MBD2 expression during normal and pathological growth of the human mammary gland. *Oncogene* (2002); 21(17): 2704-2712.
- Bostick, M. et al. UHRF1 Plays a Role in Maintaining DNA Methylation in Mammalian Cells. *Science* (2007); 317(5845): 1760-1764.
- Brattain, M. G. et al. Characterization of human colon carcinoma cell lines isolated from a single primary tumor. *British Journal of Cancer* (1983); 47(3): 373-381.
- Creyghton, M. P. et al. Histone H3K27ac separates active from poised enhancers and predicts developmental state. *PNAS* (2010); 107(50): 21931-21936.
- Curradi, M. et al. Molecular Mechanisms of Gene Silencing Mediated by DNA Methylation. *Molecular and Cellular Biology* (2002); 22(9): 3157-3173.
- De Brasi, C. D. et al. The CpG island in intron 22 of the factor VIII gene is predominantly methylated on the X chromosome of human males. *Journal of Human Genetics* (2002); 47: 239–242.
- Derse, D. et al. Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 Integration Target Sites in the Human Genome: Comparison with Those of Other Retroviruses. *Journal of Virology* (2007); 81(12): 6721-6741.

- de Sio, F. R. S. Kruppel-associated box (KRAB) proteins in the adaptive immune system. *Nucleus* (2014); 5: 138-148.
- Desprat, R., Bouhassira, E. E. Gene Specificity of Suppression of Transgene-Mediated Insertional Transcriptional Activation by the Chicken HS4 Insulator. *PLOS One* (2009); 4(6): e5956.
- Dong, K. B. et al. DNA methylation in ES cells requires the lysine methyltransferase G9a but not its catalytic activity. *The EMBO journal* (2008); 27(20): 2691-2701.
- Du, H.-N. et al. Histone H3 K36 methylation is mediated by a *trans*-histone methylation pathway involving an interaction between Set2 and histone H4. *Genes & Development* (2008); 22(20): 2786-2798.
- Du, X. et al. Features of methylation and gene expression in the promoter-associated CpG islands using human methylome data. *Comp Funct Genomics* (2012); 2012: 598987.
- El Ashkar, S. et al. BET-independent MLV-based Vectors Target Away From Promoters and Regulatory Elements. *Molecular therapy. Nucleic Acids.* (2014); 3: e179.
- Elleder, D. et al. Preferential integration of human immunodeficiency virus type 1 into genes, cytogenetic R band and GC-rich DNA regions: insight from the human genome sequence. *FEBS Letters* (2002); 517(1-3): 285-286.
- Emery, D. W. et al. A chromatin insulator protects retrovirus vectors from chromosomal position effects. *PNAS* (2000); 97(16): 9150-9155.
- Estève, P.-O. et al. Direct interaction between DNMT1 and G9a coordinates DNA and histone methylation during replication. *Genes & Development* (2006); 20: 3089-3103.
- Fasching, L. et al. TRIM28 Represses Transcription of Endogenous Retroviruses in Neural Progenitor Cells. *Cell Rep* (2015); 10(1):20-28.
- Faschinger, A. et al. Mouse Mammary Tumor Virus Integration Site Selection in Human and Mouse Genomes. *Journal of Virology* (2008); 82(3): 1360-1367.
- Frank, D. et al. Demethylation of CpG islands in embryonic cells. *Nature* (1991); 351(6323): 239-241.
- Fujita, N. et al. Methyl-CpG binding domain 1 (MBD1) interacts with the Suv39h1-HP1 heterochromatic complex for DNA methylation-based transcriptional repression. *The Journal of biological chemistry* (2003); 278(26):24132-24138.
- Gijsbers, R. et al. LEDGF Hybrids Efficiently Retarget Lentiviral Integration Into Heterochromatin. *Molecular Therapy* (2010); 18(3): 552-560.
- Gordon, C. A. et al. Inactive DNMT3B splice variants modulate de novo DNA methylation. *PLOS One* (2013); 8(7): e69486.

- Groner, A. C. et al. KRAB-Zinc Finger Proteins and KAP1 Can Mediate Long-Range Transcriptional Repression through Heterochromatin Spreading. *PLOS Genetics* (2010); 6(3): e1000869.
- Gupta, S. S. et al. Bromo- and extraterminal domain chromatin regulators serve as cofactors for murine leukemia virus integration. *Journal of Virology* (2013); 87(23): 12721-12736.
- Hacein-Bey-Abina, S. et al. Insertional oncogenesis in 4 patients after retrovirus-mediated gene therapy of SCID-X1. *The Journal of clinical investigation* (2008); 118(9): 3132-3142.
- Hahn, M. A. et al. Relationship between Gene Body DNA Methylation and Intragenic H3K9me3 and H3K36me3 Chromatin Marks. *PLOS One* (2011); 6(4): e18844.
- Han, L. et al. CpG island density and its correlations with genomic features in mammalian genomes. *Genome Biology* (2008); 9(5): R69.
- Hashimoto, H. et al. The SRA domain of UHRF1 flips 5-methylcytosine out of the DNA helix. *Nature* (2008); 455(7214): 826-829.
- Hejnar, J. et al. Inhibition of the rous sarcoma virus long terminal repeat-driven transcription by in vitro methylation: different sensitivity in permissive chicken cells versus mammalian cells. *Virology* (1999); 255(1): 171-181.
- Hejnar, J. et al. CpG island protects Rous sarcoma virus-derived vectors integrated into nonpermissive cells from DNA methylation and transcriptional suppression. *PNAS* (2001); 98(2): 565-569.
- Hennig, B. P., Fischer, T. The great repression: Chromatic and cryptic transcription. *Transcription* (2013); 4(3): 97-101.
- Hino, S. et al. Sea urchin insulator protects lentiviral vector from silencing by maintaining active chromatin structure. *Gene therapy* (2004); 11(10): 819-828.
- Ho, J. W. et al. ChIP-chip versus ChIP-seq: lessons for experimental design and data analysis. *MBC Genomics* (2011); 12:134.
- Chatterjee, R., Vinson, C. CpG methylation recruits sequence specific transcription factors essential for tissue specific gene expression. *Biochimica et biophysica acta* (2012); 1819(7): 763-770.
- Chédin, F. et al. The DNA methyltransferase-like protein DNMT3L stimulates de novo methylation by Dnmt3a. *PNAS* (2002); 99(26): 16916-19921.
- Choi, J. K. Contrasting chromatin organization of CpG islands and exons in the human genome. *Genome Biology* (2010); 11(7): R70.
- Choi, S. H. et al. Identification of preferential target sites for human DNA methyltransferases. *Nucleic Acids Research* (2011); 39(1): 104-118.

- Iida, T. et al. PCNA clamp facilitates action of DNA cytosine methyltransferase 1 on hemimethylated DNA. *Genes to Cells* (2002); 7, 997-1007.
- Jacobs, S. A. et al. Specificity of the HP1 chromo domain for the methylated N-terminus of histone H3. *The EMBO Journal* (2001); 20(18): 5232-5241.
- Kang, G. H. et al. Aberrant CpG Island Hypermethylation of Chronic Gastritis, in Relation to Aging, Gender, Intestinal Metaplasia, and Chronic Inflammation. *The American Journal of Pathology* (2003); 163(4): 1551-1556.
- Khrapunov, S. et al. Unusual Characteristics of the DNA Binding Domain of Epigenetic Regulatory Protein MeCP2 Determine Its Binding Specificity. *Biochemistry* (2014); 53(21): 3379–3391.
- Konstantoulas, C. J. et al. Single amino acid substitution (G42E) in the receptor binding domain of mouse mammary tumour virus envelope protein facilitates infection of non-murine cells in a transferrin receptor 1-independent manner. *Retrovirology* (2015); 12:43.
- Krinner, S. et al. CpG domains downstream of TSSs promote high levels of gene expression. *Nucleic Acids Research* (2014); 42(6): 3551-3564.
- Krishnan, L., Engelman, A.. Retroviral Integrase Proteins and HIV-1 DNA Integration. *J Biol Chem* (2012); 287(49): 40858-40866.
- Lee, S. et al. Aberrant CpG island hypermethylation of multiple genes in colorectal neoplasia. *Laboratory Investigation* (2004); 84: 884-893.
- Leung et al. Lysine methyltransferase G9a is required for de novo DNA methylation and the establishment, but not the maintenance, of proviral silencing. *PNAS* (2011); 108(14): 5718-5723.
- Lewinski, M. K. et al. Retroviral DNA integration: viral and cellular determinants of target-site selection. *PLOS Pathogens* (2006); 2(6): e60.
- Li, H. et al. The Histone Methyltransferase SETDB1 and the DNA Methyltransferase DNMT3A Interact Directly and Localize to Promoters Silenced in Cancer Cells. *J Biol Chem* (2006); 281(28): 19289-19500.
- Liu, S. et al. Setdb1 is required for germ line development and silencing of H3K9me3-marked endogenous retroviruses in primordial germ cells. *Genes & Development* (2014); 28(18):2041-2055.
- Llano, M. et al. LEDGF/p75 determines cellular trafficking of diverse lentiviral but not murine oncoretroviral integrase proteins and is a component of functional lentiviral preintegration complexes. *Journal of Virology* (2004); 78(17):9524-9537.
- Lorincz, M. C. et al. Methylation-Mediated Proviral Silencing Is Associated with MeCP2 Recruitment and Localized Histone H3 Deacetylation. *Molecular and cellular biology* (2001); 21(23):7913-7922.

- Lukic, S. et al. The diversity of zinc-finger genes on human chromosome 19 provides an evolutionary mechanism for defense against inherited endogenous retroviruses. *Cell Death & Differentiation* (2014); 21(3): 381-387.
- Mammana, A. et al. Inferring nucleosome positions with their histone mark annotation from ChIP data. *Bioinformatics* (2013); 29(20): 2547-2554.
- Matsuda, Y. et al. Epigenetic Heterogeneity in HIV-1 Latency Establishment. *Scientific reports* (2015); 5:7701.
- Mian, O. Y. et al. Methyl-binding domain protein 2-dependent proliferation and survival of breast cancer cells. *Molecular Cancer Research* (2011); 9(8): 1152-1162.
- Mitchell, R. S. et al. Retroviral DNA integration: ASLV, HIV and MLV show distinct target site preferences. *PLOS Biology* (2004); 2(8): E234.
- Miyahara, H. et al. Factors to preserve CpG-rich sequences in methylated CpG islands. *MBC Genomics* (2015); 16: 144.
- Moiani, A. et al. Genome-Wide Analysis of Alpharetroviral Integration in Human Hematopoietic Stem/Progenitor Cells. *Genes* (2014); 5(2): 415-429.
- Mok, H. P. et al. Stable gene expression occurs from a minority of integrated HIV-1-based vectors: transcriptional silencing is present in the majority. *Gene therapy* (2007); 14(9): 741-751.
- Morales, V., Richard-Foy, H. Role of Histone N-Terminal Tails and Their Acetylation in Nucleosome Dynamics. *Molecular and Cellular Biology* (2000); 20(13): 7230-7237.
- Mortusewicz, O. et al. Recruitment of DNA methyltransferase I to DNA repair sites. *PNAS* (2005); 102(25): 8905-8909.
- Müller, H.-P., Varmus, H. E. DNA bending creates favored sites for retroviral integration: an explanation for preferred insertion sites in nucleosomes. *The EMBO Journal* (1994); 13(19): 4704-2714.
- Narezkina, A. et al. Genome-Wide Analyses of Avian Sarcoma Virus Integration Sites. *Journal of Virology* (2004); 78(21): 11656-11663.
- Nejepinská, J. et al. Deep sequencing reveals complex spurious transcription from transiently transfected plasmids. *PLOS One* (2012); 7(8): e43283.
- Okitsu, C. Y., Hsieh, Ch.-L. DNA Methylation Dictates Histone H3K4 Methylation. *Molecular and Cellular Biology* (2007); 27(7): 2746-2757.
- Oliva-Trastoy, M et al. Resistance to the antibiotic Zeocin by stable expression of the Sh ble gene does not fully suppress Zeocin-induced DNA cleavage in human cells. *Mutagenesis* (2005); 20(2): 111-114.

- Ooi, S. K. T. et al. DNMT3L connects unmethylated lysine 4 of histone H3 to de novo methylation of DNA. *Nature* (2009); 448(7154):714-717.
- Pajer, P. et al. Identification of Potential Human Oncogenes by Mapping the Common Viral Integration Sites in Avian Nephroblastoma. *Cancer Research* (2006); 66(1): 78-86.
- Plachý, J. et al. Proviruses Selected for High and Stable Expression of Transduced Genes Accumulate in Broadly Transcribed Genome Areas. *Journal of Virology* (2010); 84(9): 4204-4211.
- Ravin, S. S. D. et al. Enhancers Are Major Targets for Murine Leukemia Virus Vector Integration. *Journal of Virology* (2014); 88(8): 4504-4513.
- Rijck, J. D. et al. The BET family of proteins targets Moloney Murine Leukemia Virus integration near transcription start sites. *Cell Rep* (2013); 5(4): 886-894.
- Rosenfeld, J. A. et al. Determination of enriched histone modifications in non-genic portions of the human genome. *BMC Genomics* (2009); 10: 143.
- Roth, S. L. et al. Gammaretroviral Integration into Nucleosomal Target DNA *In Vivo*. *Journal of Virology* (2011); 85(14): 7393-7401.
- Rowe, H. M. et al. TRIM28 repression of retrotransposon-based enhancers is necessary to preserve transcriptional dynamics in embryonic stem cells. *Genome Research* (2013); 23(3): 452-461.
- Rye, M. et al. Clustered ChIP-Seq-defined transcription factor binding site and histone modifications map distinct classes of regulatory elements. *BMC Biology* (2011); 9:80.
- Schlesinger, S., Goff, S. P. Silencing of proviruses in embryonic cells: efficiency, stability and chromatin modifications. *EMBO reports* (2012); 14(1): 73-79.
- Schröder, A. R. et al. HIV-1 Integration in the Human Genome Favors Active Genes and Local Hotspots. *Cell* (2002); 110(4): 521-529.
- Shalginskikh, N. et al. Retroviral DNA Methylation and Epigenetic Repression Are Mediated by the Antiviral Host Protein Daxx. *Journal of Virology* (2013); 87(4): 2137-2150.
- Sharif, J. et al. Divergence of CpG island promoters: A consequence or cause of evolution? *Development, Growth & Differentiation* (2010); 52: 545-554.
- Sharma, A. et al. BET proteins promote efficient murine leukemia virus integration at transcription start sites. *PNAS* (2013); 110(29): 12036-12041.
- Sarraf, S. A., Stancheva, I. Methyl-CpG Binding Protein MBD1 Couples Histone H3 Methylation at Lysine 9 by SETDB1 to DNA Replication and Chromatin Assembly. *Molecular Cell* (2004); 15(4): 595-605.

- Schultz, D. C. et al. SETDB1: a novel KAP-1-associated histone H3, lysine 9-specific methyltransferase that contributes to HP1-mediated silencing of euchromatic genes by KRAB zinc-finger protein. *Genes & Development* (2002); 16(8): 919-932.
- Singleton, M. K. et al. MeCP2 is required for global heterochromatic and nucleolar changes during activity-dependent neuronal maturation. *Neurobiology of disease* (2011); 43(1) 190-200.
- Sripathy, S. P. et al. The KAP1 Corepressor Functions To Coordinate the Assembly of De Novo HP1-Demarcated Microenvironments of Heterochromatin Required for KRAB Zinc Finger Protein-Mediated Transcriptional Repression. *Molecular and Cellular Biology* (2006); 26(22): 8623-8638.
- Sterner, D. E., Berger, S. L. Acetylation of histones and transcription-related factors. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* (2000); 64(2): 435-459.
- Suetake, I. et al. DNMT3L Stimulates the DNA Methylation Activity of Dnmt3a and Dnmt3b through a Direct Interaction. *J Biol Chem* (2004); 279(26): 27816-27823.
- Swindle, C. S. et al. Mutation of CpGs in the Murine Stem Cell Virus Retroviral Vector Long Terminal Repeat Represses Silencing in Embryonic Stem Cells. *J Biol Chem* (2004); 279(1): 34-41.
- Šenigl, F. et al. The Core Element of a CpG Island Protects Avian Sarcoma and Leukosis Virus Derived Vectors from Transcriptional Silencing. *Journal of Virology* (2008); 82(16): 7818-7827.
- Šenigl, F. et al. Transcriptional provirus silencing as a crosstalk of de novo DNA methylation and epigenomic features at the integration site. *Nucleic Acids Research* (2012); 40(12): 5298-5312.
- Tatematsu, K. et al. MBD2-MBD3 complex binds to hemi-methylated DNA and forms a complex containing DNMT1 at the replication foci in late S phase. *Genes to Cells* (2000); 5, 677-688.
- Turek-Plewa, J., Jagodzinski, P. P. The role of mammalian dna methyltransferases in the regulation of gene expression. *Cell Mol Biol Lett* (2005); 10(4): 631-647.
- Turelli, P. et al. Interplay of TRIM28 and DNA methylation in controlling human endogenous retroelements. *Genome Research* (2014); 24: 1260-1270.
- Valenzuela, L., Kamakaka, R. T. Chromatin insulators. *Annu Rev Genet* (2006); 40:107-138.
- Vavouri, T., Lehner, B. Human genes with CpG island promoters have a distinct transcription-associated chromatin organization. *Genome Biol* (2012); 13(11): R110.
- Venegas, M. et al. Identification of the LEDGF/p75 HIV-1 integrase interaction domain and NLS reveals NLS-independent chromatin tethering. *Journal of Cell Science* (2005); 118: 1733-1743.
- Vertino, P. M. et al. DNMT1 is a component of a multiprotein DNA replication complex. *Cell Cycle* (2002); 1(6):416-423.
- Wan, M. et al. MECP2 truncating mutations cause histone H4 hyperacetylation in Rett syndrome. *Human Molecular Genetics* (2001); 10(10): 1085-1092.

- Weber, M. et al. Distribution, silencing potential and evolutionary impact of promoter DNA methylation in the human genome. *Nature genetics* (2007); 39(4): 457-466.
- Wienholz, B. L. et al. DNMT3L Modulates Significant and Distinct Flanking Sequence Preference for DNA Methylation by DNMT3A and DNMT3B In Vivo. *PLOS Genetics* (2010); 6(9): e1001106.
- Wolf, G. et al. The KRAB zinc finger protein ZFP809 is required to initiate epigenetic silencing of endogenous retroviruses. *Genes & Development* (2015); 29: 538-554.
- Wolf, D., Goff, S. P. Embryonic stem cells use ZFP809 to silence retroviral DNAs. *Nature* (2009); 458(7242): 1201-1204.
- Yang, L. et al. Molecular cloning of ESET, a novel histone H3-specific methyltransferase that interacts with ERG transcription factor. *Oncogene* (2002); 21(1): 148-152.
- Yu, F. et al. Histone deacetylase-independent transcriptional repression by methyl-CpG-binding protein 2. *Nucleic Acids Research* (2000); 28(10):2201-2206.
- Zentner, G. E. et al. Epigenetic signatures distinguish multiple classes of enhancers with distinct cellular functions. *Genome Research* (2011); 21(8): 1273-1283.
- Zhang, W. et al. Predicting genome-wide DNA methylation using methylation marks, genomic position, and DNA regulatory elements. *Genome Biology* (2015); 16:14
- Zhou, H. et al. Substrate Sequence Selection by Retroviral Integrase. *Journal of Virology* (2001); 75(3):1359-1370.
- Zuo, X. et al. Zinc Finger Protein ZFP57 Requires Its Co-factor to Recruit DNA Methyltransferases and Maintains DNA Methylation Imprint in Embryonic Stem Cells via Its Transcriptional Repression Domain. *J Biol Chem* (2012); 287(3): 2107-2118.