

Masarykova Univerzita
Přírodovědecká fakulta

Epigeneticky kontrolované změny exprese genů u nádorových onemocnění

Diplomová práce

Bc. Stanislav Stejskal

Školitel: RNDr. Irena Koutná Ph.D.

Brno, duben 2006

„Prohlašuji tímto, že jsem tuto diplomovou práci na téma - Epigeneticky kontrolované změny exprese genů u nádorových onemocnění – zpracoval sám a pouze s využitím pramenů v práci uvedených.“

Brno, duben 2006

Stanislav Stejskal

Souhrn

cDNA microarrays je progresivní technika umožňující studovat, sledovat a porovnávat transkripční aktivitu až několika tisíců genů najednou a dává nám ucelený obraz o genové expresi. Použili jsme tuto techniku pro studium a definování transkripčního statusu vydiferencovaných neutrofilů (z buněčné linie HL-60), u kterých během procesu diferenciaci do granulocytů dochází k výrazné změně tvaru buněčného jádra. Pro *ex vivo* studium granulopoézy jsme použili buněčnou linii HL-60.

Pomocí cDNA microarrays techniky jsme porovnali změnu exprese v HL-60 buněčné linii, granulocytů diferencovaných z HL-60 pomocí DMSO a granulocytů získaných z periferní krve pacientů. Transformací dat získaných z cDNA do transkripčních map jsme vybrali chromosomální doménu s nízkou změnou exprese (upregulace nebo downregulace) v průběhu myeloidní diferenciaci do neutrofilních granulocytů. Vybraná chromosomální doména splňovala nejlépe kritéria, která jsme si pro daný experiment stanovili. Vzhledem k tomu, že chromosom 19 nemění polohu svého těžiště během diferenciaci, nejsou případné polohové změny upregulovaných či downregulovaných oblastí bezprostředně spojeny se změnou polohy celého chromosomálního teritoria a lze na nich sledovat změny spojené s lokálními posuny. Pro tento genetický lokus jsme připravili DNA sondy a pak jsem pomocí FISH techniky sledovali jeho prostorovou distribuci v jádře. V další části experimentu jsme pomocí imunoznačících metod sledovali distribuci heterochromatických a transkripčně aktivních oblastí v jádře.

V této práci jsme potvrdili, že cDNA microarrays v kombinaci s FISH a imunoznačením je vynikající metoda pro výběr a sledování epigenetických mechanismů regulace genové exprese. Naše výsledky přinášejí nové informace o změně topografických parametrů genetických lokusů s malou změnou exprese a jaderné architektury v průběhu diferenciačních procesů nádorových buněk.

Abstract

cDNA microarrays is an advanced technique that provides possibility of studying, monitoring and making comparison of transcription activity of more than thousands of genes at one moment and brings large scale view to gene expression. We have used this technique to study and define transcription statuses of differentiated granulocytes (from HL-60 cell line) that dramatically change nuclear shape during granulocyte differentiation process. We have used the HL-60 cell line to study *ex vivo* granulopoiesis.

Using cDNA microarrays technique we have compared changes of gene expression in HL-60 cell line, in granulocytes differentiated from HL-60 by DMSO and granulocytes obtained from peripheral blood of patients. Using our microarrays data we have generated transcription maps. We have chosen chromosomal domain with low alternations of gene expression during myeloid differentiation to neutrophilic granulocyte. Selected chromosomal domains matched the requirements we have determined for our experiments in advance. Because of the fact that centre of gravity of chromosome 19 doesn't change its position during differentiation, positions of up-regulated or down-regulated domains are not linked with positional alteration of whole chromosomal territory, alterations linked with local displacement can be monitored. DNA probes marked by fluorescence have been prepared and used for FISH experiments studying spatial arrangement of genetic loci during granulopoiesis. In the other part of our experiments we have studied the distribution of heterochromatical and transcriptionally active domains in the nucleus.

In this work we have confirmed that cDNA microarrays in combination with FISH and immunostaining is an excellent approach for dispatching and monitoring epigenetic mechanisms of gene expression. In conclusion, our data have provided new information about spatial arrangement and higher order nuclear organization during tumor cells differentiation processes.

Poděkování

Rád bych poděkoval RNDr. Ireně Koutné Ph.D. a Evě Jansové Ph.D. za to že mi nabídly diplomovou práci na velmi zajímavém tématu a ze velmi příkladného vedení mne dovedly do zdárného konce. Také děkuji za mnoho podnětných rad, připomínek a možnosti rovnocenné diskuse nad získanými výsledky.

RNDr. Petrovi Matulovi Ph.D. bych chtěl poděkovat za neocenitelnou pomoc a potřebné rady s analýzou interfázních jader a za jeho dva vynikající programy, které mi velmi usnadnily práci.

Petrovi Krontorádovi M.Sc. velmi děkuji za normalizaci, analýzu cDNA microarrays dat, podnětné rady a za přípravu transkripčních map, které mi výrazně ulehčily výběr pro genetických lokusů pro diplomovou práci. Také mu společně se Zbyňkem Svobodou M.Sc. děkuji za vytvoření programu JABS.

Doc. RNDr. Michalovi Kozubkovi. Ph.D děkuji že mě umožnil dělat svou diplomovou práci v pracovištích CABO, za pomoc se snímáním interfázních jader a za vytvoření programu FISH, usnadňující práci s mikroskopem.

Také bych chtěl poděkovat lidem v laboratořích CABO, jmenovitě Mgr. Radce Rosické, RNDr. Davidovi Svobodovi Ph.D., Mgr. Vlado Ulmanovi, Mgr. Janu Hubenému, Mgr. Marku Kašíkovi, RNDr. Pavlu Matulovi Ph.D., a dalším, za velmi přátelskou atmosféru na pracovišti a za to, že v případě potřeby obětovali svůj čas a dokázali pomoci či poradit.

Biofyzikálnímu Ústavu AVČR děkuji za možnost izolace BAC klonů a také všem lidem, kteří mi pomohli a poradili v průběhu tvorby diplomové práce.

Obrazová dokumentace byla vytvořena s využitím programového balíku Corel Draw 8 (Copyright © 2006 Corel Corporation).

Obsah

Teoretický úvod	1
1. Jádru	1
1.1 Architektura a funkce buněčného jádra	1
1.2 DNA a její architektura v jádře	2
2. Epigenetická regulace genové exprese	4
2.1 Chemická modifikace DNA a histonů	4
2.1.1 Heterochromatický protein 1 (HP1)	4
2.2 Topografie jádra	5
2.2.1 Model chromosomálních teritorií a interchromosomálního prostoru (CT - IC)	6
2.3 Jaderné kompartmenty	9
3. Granulopoéza	11
3.1 Neutrofilní cesta granulopoézy	11
3.2 HL-60 buněčná linie	14
3.3 Vlastnosti a funkce neutrofilu	15
3.4 Jaderná architektura HL-60 buněčné linie a granulocytů	16
4. DNA Microarray	18
5. Fluorescenční <i>in situ</i> technologie	20
5.1 Fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace (FISH)	20
5.2 Imunofluorescenční značení	21
5.3 Fluorescenční <i>in situ</i> metody ve spojení s vysokorozlišovací cytometrií	22
6. Materiál a metody	23
6.1 Buněčné kultury	23
6.1.1 Izolace granulocytů z periferní krve	23
6.2 DNA microarray	23
6.2.1 Izolace RNA	23
6.2.2 Gelová elektroforéza RNA	24
6.2.3 Gelová elektroforéza DNA	24
6.2.4 Analýza DNA microarray	25
6.3 Příprava hybridizačních sond	25
6.3.1 Kultivace <i>E. coli</i> nesoucí BAC v plazmidech	25
6.3.2 Purifikace DNA sondy	26

6.3.3	Značení DNA sond Nick translační směsí	26
6.4	Fluorecenční <i>in situ</i> hybridizace	27
6.4.1	3D fixace HL-60 a neutrofilů	27
6.4.2	Denaturace a hybridizace cílové a značené DNA	27
6.4.3	Promývání po hybridizaci	28
6.4.4	Získání a analýza obrazu	28
6.5	Imunofluorescenční značení	28
6.5.1	3D fixace HL-60 a neutrofilů	28
6.5.2	Nanesení protilátek	29
6.6	Použité chemikálie	30
6.6.1	Roztoky použité při diferenciaci HL-60 a izolaci granulocytů	30
6.6.2	Roztoky použité při cDNA microarray	30
6.6.3	Roztoky použité při izolaci DNA sond	31
6.6.4	Roztoky použité při fluorescenčních <i>in situ</i> metodách	31
6.6.5	Kultivační média	32
	Cíle diplomové práce	33
7.	Výsledky	34
7.1	cDNA microarray	34
7.2	Izolace a výroba DNA sond pro FISH experimenty	39
7.3	Porovnání topografických parametrů DNA sond v 3D fixovaných jádrech	40
7.3.1	Distribuce genetického lokusu RP11-137E22 a RP11-815E8 v jádře HL-60 a neutrofilů vydiferencovaných pomocí DMSO	42
7.3.2	Teoretická distribuce genetického lokusu 19p13.3 (5,6 – 6,9 Mb) v jádře HL-60 a neutrofilů vydiferencovaných pomocí DMSO	45
7.4	Porovnání distribuce jaderných proteinů v 3D fixovaných jádrech	47
7.4.1	Distribuce jaderných proteinů u HL-60 buněčné linie	47
7.4.2	Distribuce jaderných proteinů u neutrofilů vydiferencovaných z HL-60 pomocí DMSO	48
7.4.3	Distribuce jaderných proteinů u neutrofilů z periferní krve	50
8.	Závěry	51
9.	Diskuse	52
10.	Software vyvinutý v laboratořích CABO	57
11.	Seznam použité literatury	58