

**Univerzita Karlova**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie



**Věra Chvalová**

Úloha signální dráhy ERK v regulaci genů časně odpovědi  
The regulation of primary response genes by the ERK signaling pathway

Bakalářská práce

Vedoucí práce: Ing. Tomáš Vomastek, Ph.D.

Praha, 2018

**Poděkování:**

Ráda bych poděkovala mému školiteli Ing. Tomáši Vomastkovi, Ph.D. za jeho vstřícný přístup, trpělivost a čas, který mi věnoval během psaní této bakalářské práce. Dále děkuji Mgr. Tomáši Groušlovi, Ph.D. a ostatním členům laboratoře za jejich cenné rady. Také bych chtěla poděkovat rodině a mému příteli Martinu Peškovi za trpělivost a podporu nejen při psaní této práce, ale během celého studia.

**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, 9. 5. 2018

Podpis:

## Abstrakt

Signální dráha ERK představuje evolučně konzervovaný mechanismus, který buňkám umožňuje vnímat extracelulární signály a převádět je v široké spektrum specifických intracelulárních odpovědí, jako je proliferace, diferenciace, apoptóza či buněčná migrace. Mezi klíčové prvky této dráhy patří proteinkinázy Raf, MEK a efektorová proteinkináza ERK. Konstitutivní aktivace dráhy ERK, způsobená somatickými mutacemi některých jejích členů, se často objevuje u mnoha typů lidských nádorových onemocnění. Tato dráha proto hraje významnou roli i z biomedicínského hlediska.

Zmíněné fyziologické i patologické děje jsou podmíněny především schopností signální dráhy ERK regulovat změny v expresi velkého množství genů. Po aktivaci proteinkinázy ERK dochází k její translokaci do jádra, kde fosforyluje rozličné transkripční faktory. To vede k jejich aktivaci a následně k několikasupňovým změnám v genové expresi. Nejdříve dochází k transkripci genů tzv. časné odpovědi (immediate early genes; IEGs), z nichž mnoho kóduje další transkripční faktory, jako jsou c-Fos, c-Jun či c-Myc. Ty následně regulují expresi genů tzv. sekundární odpovědi (secondary response genes, SRGs), které kódují další strukturní či signalizační proteiny. Hromadné změny v genové expresi poté vedou k funkčnímu přeprogramování buněk. V této práci jsou shrnuty základní způsoby, kterými dráha ERK reguluje tyto několikasupňové, sekvenčně uspořádané změny v genové expresi.

**Klíčová slova:** ERK, MAPK, fosforylace, buněčná signalizace, genová exprese, transkripční faktory, transkripce, geny časné odpovědi, Elk, Jun, Fos

## **Abstract**

The ERK signaling pathway represents an evolutionary conserved mechanism that enables cells to perceive various extracellular signals and convert them to a diverse array of biological outcomes such as proliferation, differentiation, cell cycle control, apoptosis or cell migration. Key components of this pathway are protein kinases Raf, MEK and the effector protein kinase ERK. In addition to its physiological role, continuous activation of the ERK pathway caused by somatic mutations of some of its components or upstream regulators appears to be significant cause of many human tumor diseases. That is why this pathway plays an important role also from the biomedical viewpoint.

The multistep changes in gene expression are primarily responsible for these physiological and pathological events. Changes in genes expression are induced by activated kinase ERK that after translocation into the nucleus phosphorylates transcription factors (TFs) whose activation, in turn, leads to transcription of so-called immediate early genes (IEGs), many of which also code for other TFs (e.g. c-Fos, c-Jun or c-Myc). The latter TFs then regulate expression of further genes for structural and signaling proteins. This causes global changes in gene expression and leads to functional reprogramming of the cells. This thesis summarizes the known ways by which the ERK pathway regulates these multistep and sequentially ordered changes in gene expression.

**Key words:** ERK, MAPK, phosphorylation, cell signaling, gene expression, transcription factors, transcription, primary response genes, Elk, Jun, Fos

## Seznam použitých zkratek:

<b>Zkratka:</b>	<b>Význam:</b>	<b>Význam v češtině:</b>
AP-1	activating protein 1	aktivující protein 1
ATF	activating transcription factor	aktivující transkripční faktor
ATP	adenosine triphosphate	adenosintrifosfát
bHLH	basic-helix-loop-helix motiv	bazický motiv helix-smyčka-helix
bZIP	basic leucine zipper	bazický leucinový zip
bp	base pair	pár bází
cAMP	cyclic adenosine monophosphate	cyklický adenosinmonofosfát
CaCRE	Ca <sup>2+</sup> and cAMP-response element	Ca <sup>2+</sup> a cAMP-odpovídající element
CRE	cAMP responsive element	cAMP-odpovídající element
CREB	CRE-binding protein	CRE-vazebný protein
DEF	docking site for ERK FXFP	kotevní místo pro ERK FXFP
DEG	delayed early gene	opožděně časné geny
DNA	deoxyribonucleic acid	kyselina deoxyribonukleová
DUSP	dual-specificity phosphatase	fosfatáza s duální specificitou
EGR	early growth response protein	časný růstový protein
Elk-1	Ets-like protein 1	Ets-podobný protein
Ets	E-twenty six	E-dvacet šest
ERK	extracellular signal-regulated kinase	extracelulárním signálem regulovaná kináza
GDP	guanosine diphosphate	guanosindifosfát
GPCR	G-protein coupled receptor	receptor spřažený s G-proteinem
Grb2	growth factor receptor-bound protein 2	protein vázající receptor růstového faktoru
GTP	guanosine triphosphate	guanosintrifosfát
HAT	histone acetyltransferase	histon acetyltransferáza
IEG	immediate early gene	gen časně odpovědi
JAK	Janus kinase	Janus kináza
JNK	c-Jun N-terminal kinase	c-Jun N-koncová kináza
KIM	kinase interacting motif	motiv zajišťující interakci s kinázou
LRG	late response gene	gen pozdní odpovědi
LZ	leucine zipper	leucinový zip
MAP3K	MAP kinase kinase kinase	MAP kináza kináza kináza
MAP2K	MAP kinase kinase	MAP kináza kináza
MAPKAPK	MAPK-activated protein kinase	MAPK-aktivovaná proteinkináza
MAPK	mitogen-activated protein kinase	mitogenem aktivovaná proteinkináza
MEK	MAPK/ERK kinase	MAPK/ERK kináza
MNK	MAPK-interacting kinase	MAPK-interagující kináza
mRNA	messenger RNA	messengerová/mediátorová RNA
MSK	mitogen-and stress-activated kinase	mitogenem a stresem aktivovaná kináza
NFI	nuclear factor 1	jaderný faktor 1

NLS	nuclear localisation signal	jaderný lokalizační signál
PARP1	poly(ADP-ribose) polymerase 1	poly(ADP-ribóza) polymeráza 1
PKA	protein kinase A	proteinkináza A
PRG	primary response gene	gen primární odpovědi
RNA	ribonucleic acid	ribonukleová kyselina
rRNA	ribosomal RNA	ribozomální RNA
RSK	ribosomal protein S6 kinase	kináza ribozomálního proteinu S6
RTK	receptor tyrosine kinase	receptorová tyrosinkináza
Sap-1	SRF accessory protein 1	SRF přídatný protein 1
SIE	the v-sis-inducible element	v-sis indukibilní element
SOS	son of sevenless	vazebný protein RTK
SRE	serum response element	sérem aktivovaný element
SRF	serum response factor	sérem aktivovaný faktor
SRG	secondary response gene	gen sekundární odpovědi
STAT	signal transducer and activator of transcription	přenašeč signálu a aktivátor transkripce
SUMO	small ubiquitin-like modifier	malý ubiquitinu podobný modifikátor
TAF	TBP-associated factor	faktor asociovaný s TBP
TBP	TATA-binding protein	TATA-vazebný protein
TCF	ternary complex factor	faktor ternárního komplexu
TF	transcription factor	transkripční faktor
TRE	TPA responsive element	TPA odpovídající element
tRNA	transfer RNA	transferová RNA
TSS	transcription start site	místo startu transkripce
wHTH	winged helix-turn-helix	„okřídlený“ helix-otáčka-helix

# Obsah

<b>1. Úvod .....</b>	<b>1</b>
<b>2. Transkripce .....</b>	<b>3</b>
2.1. Cis elementy.....	4
2.2. Trans elementy.....	6
2.2.1. Obecné transkripční faktory.....	6
2.2.2. Chromatin remodelující komplexy a histon-acetyltransferázy .....	7
2.2.3. Specifické transkripční faktory .....	8
<b>3. Přenos signálu a signální dráha ERK .....</b>	<b>9</b>
3.1. Složení a základní mechanismus aktivace dráhy ERK.....	11
<b>4. Transkripční faktory regulované dráhou ERK .....</b>	<b>14</b>
4.1. Primární transkripční faktory .....	16
4.1.1. Ets family/Ternary complex factor subfamily a touto rodinou regulované geny.....	16
4.1.1.1. Aktivace Elk-1 pomocí fosforylace a defosforylace .....	17
4.1.1.2. Vazba Elk-1 na DNA, asociace se serum response factor .....	18
4.1.2. Další primární transkripční faktory.....	20
4.1.2.1. Sp1 .....	20
4.1.2.2. STATs.....	21
4.2. Geny indukované v rámci časné odpovědi.....	21
4.2.1. Indukce genů časné odpovědi: zpětnovazebná inhibice.....	21
4.2.2. Indukce genů časné odpovědi: Transkripční faktor AP-1 a jiné TFs.....	22
4.3. Transkripční faktory indukované v rámci časné odpovědi .....	23
4.3.1. Komponenty AP-1 .....	23
4.3.1.1. c-Fos.....	23
4.3.1.2. c-Jun.....	23
4.3.1.3. Regulace aktivity AP-1 .....	23
4.3.2. Jiné TFs exprimované v rámci časné odpovědi .....	24
4.3.2.1. c-Myc .....	24
4.3.2.2. EGR1.....	25
4.4. Secondary response genes.....	25
<b>5. Závěr .....</b>	<b>27</b>
<b>6. Seznam použité literatury .....</b>	<b>28</b>

# 1. Úvod

Všechny buňky, ať už existují individuálně či jako součást mnohobuněčného organismu, jsou neustále zahrnovány nejrůznějšími podněty ze svého okolí. Aby mohly přežívat a plnit své funkce, vlastní tyto buňky ve své výbavě prostředky, které jim umožňují na změny v prostředí odpovídajícím způsobem reagovat, ať už jednotlivě, či koordinovaně v rámci tkání. Toto probíhá nejen na negenomové úrovni, kdy buňky reagují velice rychle, ale především na genové úrovni změnou exprese různých genů. Tyto změny pak umožňují buňkám odpovídat na rozmanité podněty a případně se na ně adaptovat.

Během evoluce došlo ke vzniku systému intracelulárních signálních drah, umožňujících příjem a zpracování signálu pocházejícího v rámci organismu i ze značných vzdáleností. Tyto signální dráhy transformují extracelulární podněty v intracelulární signály a předávají je dál ke konečnému cíli. Tím může být jádro, kde jsou primárními cílovými příjemci transkripční faktory, které regulací genové exprese kontrolují např. buněčný růst či dělení. Jiné odpovědi, nevyžadující změny v genové expresi, mohou představovat kupříkladu změny v buněčném pohybu nebo metabolismu.

Jedna ze signálních drah zúčastněných v monitoringu extracelulárního prostředí je signální dráha ERK, která je aktivována celou řadou extracelulárních podnětů a jim odpovídajících membránových receptorů. Jádro této dráhy je složeno z proteinkináz Raf, MEK a ERK a signál mezi nimi je přenášen fosforylací následující proteinkinázy tou předchozí. Aktivace proteinkinázy ERK (kináza regulovaná extracelulárním signálem, extracellular signal-regulated kinase) je klíčovým dějem v signalizaci, protože ERK fosforyluje a tím i mění aktivitu celé řady substrátů, z nichž významnou skupinu pak představují transkripční faktory.

Expese genů regulovaných dráhou ERK má zajímavý průběh – většina z nich není expri-mována přímo, ale přes tzv. geny časně odpovědi či immediate early genes (IEGs) a delayed early genes (DEGs), které mají mírně pozdější aktivaci oproti IEGs. První z nich nejčastěji kódují transkripční faktory zodpovídající za transkripci či regulaci exprese tzv. secondary response genes (SRGs), jejichž expresi teprve vznikají finální produkty formující konečnou odpověď buňky na konkrétní signál. Zatímco DEGs se svými produkty podílejí většinou na inhibici signalizace nebo genové exprese.

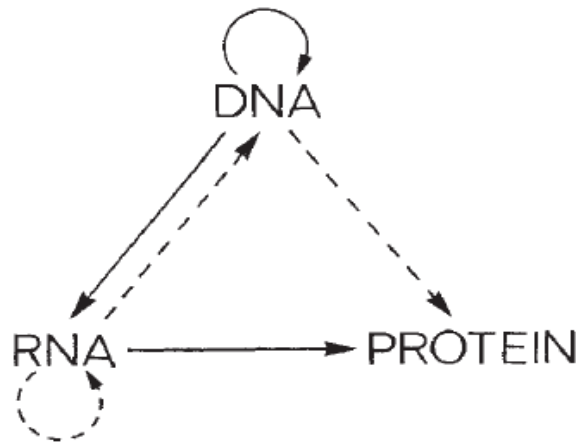
Tato bakalářská práce si klade za cíl popsat základní způsoby regulace exprese IEG a DEG signální dráhou ERK. Detailní pohled je věnován zejména regulaci transkripčních faktorů rodiny

Ets (E-twenty six) a transkripčnímu komplexu AP-1 (aktivující protein 1, activating protein 1). První skupinou jsou tzv. pre-existující transkripční faktory, jejichž aktivita je řízena na úrovni post-translačních modifikací, a to zejména na úrovni fosforylace, zatímco regulace AP-1 se odehrává především na úrovni genové exprese.

## 2. Transkripce

Krátce po odhalení struktury deoxyribonukleové kyseliny (DNA) v padesátých letech minulého století zmínil v roce 1958 Francis Crick, jeden z objevitelů struktury DNA, vliv genu na uspořádání aminokyselin v konkrétním proteinu a souvislost mezi RNA a syntézou proteinů. V článku poprvé zazněl pojem „centrální dogma“, objasnění toku informace mezi nukleovými kyselinami a proteiny: „The Central Dogma: This states that once 'information' has passed into protein it cannot get out again. In more detail, the transfer of information from nucleic acid to nucleic acid, or from nucleic acid to protein may be possible, but transfer from protein to protein, or from protein to nucleic acid is impossible. Information means here the precise determination of sequence, either of bases in the nucleic acid or of amino acid residues in the protein” (Crick 1958, s. 153).

Crick později rozdělil možné typy přenosu informace do tří skupin: obecný přenos (general transfer), speciální přenos (special transfer) a neznámý přenos (unknown transfer) (viz. obr. 1) (Crick 1970).



Obrázek 1: Crickova představa centrálního dogmatu: plnou čarou značen obecný přenos, přerušovanou čarou speciální přenos, chybějící šipky směrem od proteinu k nukleovým kyselinám a mezi proteiny znamenají neznámý přenos (převzato z: Crick 1970).

„Centrální dogma molekulární biologie“ tak, jak ho známe dnes, se stále drží základní Crickovy myšlenky, tedy objasnění toku informace mezi nukleovými kyselinami a proteiny. Díky obrovskému rozvoji metod molekulární biologie se však stalo mnohem komplexnějším a popisuje i děje, které Crick řadil do neznámého druhu přenosu (Jafari *et al.*, 2017).

Tato bakalářská práce se zabývá jedním z těchto dějů, a to transkripcí, která slouží k přepisu genetické informace z DNA do RNA. V eukaryotických buňkách probíhá v jádře a může dát vzniknout mnoha různým druhům RNA. V průběhu transkripce se jedno vlákno DNA použije jako předloha (templát) pro tvorbu komplementárního vlákna RNA neboli genového transkriptu. Přepis sestává ze tří po sobě jdoucích kroků – iniciace, elongace a terminace. Iniciace transkripce hraje důležitou úlohu v genové expresi, jelikož umožňuje efektivně regulovat přepis genů podle potřeb buňky či organismu. Toto je zajištěno regulací aktivity transkripčních faktorů, které rozeznávají specifické DNA sekvence před přepisovaným genem a umožňují sestavení transkripčního komplexu. Samotný proces transkripce poté probíhá pomocí enzymu RNA-polymerázy, přičemž většinu eukaryotních genů transkribuje RNA-polymeráza II (viz kap. 2.2.1.).

Správné rozeznání přepisovaného genu, zvláště pak určení místa počátku transkripce, vyžaduje tedy dva vzájemně komplementární elementy: specifické nukleotidové sekvence, tzv. cis-elementy, které určují pozici přepisovaného genu, a dále transkripční faktory (tzv. trans-elementy), které dokážou cis-element rozpoznat a transkripci iniciovat a regulovat.

## 2.1. Cis elementy

Ke správnému průběhu transkripce jsou potřeba nekódující oblasti DNA, pomáhající s regulací přepisu. Tyto již zmíněné cis-elementy mohou ležet v bezprostřední blízkosti regulovaného genu, nebo se vyskytovat i desítky tisíc párů bází daleko. Mezi cis-elementy nacházející se nejbližší transkribovanému genu patří oblast zvaná promotor. Ten je umístěný ve většině případů před genem (neboli upstream od genu) a určuje místo vazby RNA-polymerázy a směr transkripce. Nasednutí polymerázy na promotorovou oblast DNA zprostředkovávají proteiny zvané obecné transkripční faktory, které rozeznávají centrální část („core“) všech promotorů, určují počátek transkripce a bez nich je zahájení transkripce nemožné.

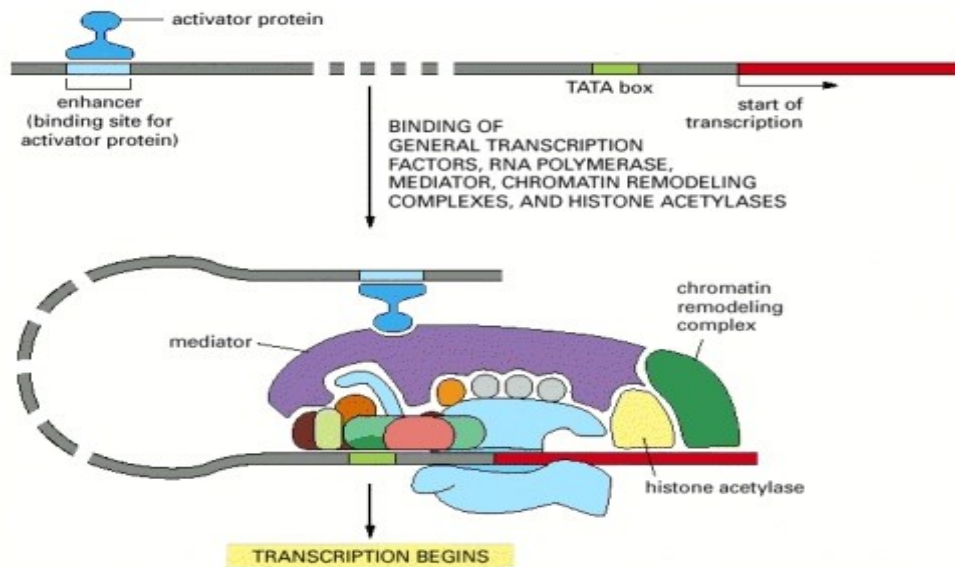
Promotory obsahují více či méně konzervované sekvence nukleotidů. Patrně nejlépe popsanou konzervovanou sekvencí, která tvoří „core“ promotoru, je tzv. TATA-box se sekvencí TATAAAA, ležící asi 30 párů bází před začátkem transkripce a který se vyskytuje asi v 25 % promotorů rozeznávaných RNA polymerázou II. Tento motiv je rozpoznán TATA-vazebným proteinem (TATA-binding protein, TBP), jenž je součástí obecného transkripčního faktoru TFIID a komplexu RNA polymerázy II. TATA-box a další specifické sekvence promotoru slouží jako místa navázání obecných transkripčních faktorů, které tak vytvoří tzv. preiniciační komplex a umožní tím nasednutí RNA polymerázy (viz kap. 2.2.1.). Některé geny eukaryotických buněk

mají v promotoru místo TATA-boxu tzv. iniciátorovou sekvenci, některé geny pak obsahují jak TATA, tak i iniciátorovou sekvenci (Gill, 2001). Jiné geny, zvané provozní (housekeeping genes), exprimované ve většině buněk organismu na konstantní úrovni, neobsahují TATA-box ani iniciátorovou sekvenci, ale mají promotory bohaté na tzv. CpG ostrovy, obsahující hodně cytosinových a guaninových zbytků.

Účinnost zahájení transkripce je dále podmíněna přítomností dalších specifických nukleotidových sekvencí, které leží „upstream“ od promotoru buď v jeho proximální části, nebo až několik tisíc nukleotidů daleko. Tyto regulační sekvence umožňují vazbu mnoha různých specifických transkripčních faktorů (regulačních proteinů), které následně ovlivňují účinnost transkripce ať už pozitivně v případě aktivátorů, nebo negativně v případě transkripčních represorů.

Některé z těchto dalších regulačních oblastí jsou umístěny nedaleko promotoru – tzv. promoter-proximal elements. Terminologie se však v tomto případě může lišit, někteří autoři počítají s tímto elementem jako se součástí promotoru (Lodish, 2000). Nacházejí se obvykle několik set párů bází „upstream“ od regulovaného genu a jsou většinou poměrně krátké, přibližně 15-30 bp. Tyto elementy bývají často aktivní jen ve specifických buněčných typech a mívají poměrně konzervované sekvence, na které se vážou konkrétní specifické transkripční faktory.

Další regulační sekvence se nazývají enhancery (zesilovače) a mohou se nacházet i tisíce nukleotidových párů od regulovaného genu. Tyto elementy vážou další proteiny pozitivně ovlivňující transkripci. Přestože jsou daleko od genu, jsou schopné ovlivňovat jeho transkripci tím, že tvoří smyčku na DNA (viz. obr. 2). Podobné vlastnosti, ale opačně působící, mají sekvence zvané silencery neboli zeslabovače. Jedná se opět o nukleotidové sekvence specifické pro vazbu mnoha různých transkripčních faktorů. Na rozdíl od promoter-proximal elements jsou dlouhé většinou 100-200 bp.



Obrázek 2: Iniciační transkripce vyžaduje přítomnost obecných a specifických transkripčních faktorů (převzato z: Alberts, 2002).

## 2.2. Trans elementy

Transkripce je tedy regulována nejen specifickými sekvencemi DNA, ale i proteiny, které se na tyto sekvence vážou, tzv. trans-elementy. Tyto transkripční faktory lze rozdělit na dva druhy. Obecné transkripční faktory (general transcription factors) nasedají na obecné cis-elementy před prepisovaným genem a za *in vitro* podmínek jsou schopny samy iniciovat transkripci. Nicméně za *in vivo* podmínek, obecné transkripční faktory nejsou samostatně schopny transkripci iniciovat a potřebují k tomu přítomnost specifických transkripčních faktorů, které rozeznávají další cis-elementy, které jsou specifické pro prepisovaný gen.

### 2.2.1. Obecné transkripční faktory

Vznik RNA katalyzuje RNA-polymeráza postupným připojováním komplementárních nukleotidů RNA k jednomu z řetězců DNA. U eukaryotických buněk rozlišujeme tři typy tohoto enzymu. RNA-polymeráza I se nachází v jadérku a je zodpovědná za syntézu ribozomální RNA (rRNA). RNA-polymeráza II prepisuje do mRNA (messenger RNA, mediátorová RNA) všechny geny kódující proteiny. RNA-polymeráza III zajišťuje vznik především transferové RNA (tRNA), nezbytné v procesu translace. Následující text se bude týkat především komplexu RNA-polymerázy II a řady proteinů, prepisujících protein-kódující geny do mRNA.

Zatímco RNA polymeráza je nutná pro samotný průběh transkripce, k zahájení transkripce jsou potřeba obecné transkripční faktory, proteiny pomáhající RNA-polymeráze nasednout na promotor, oddělit od sebe vlákna DNA a začít s přepisem genu. Komplex obecných transkripčních faktorů navázaný na promotoru, který umožňuje navázání RNA-polymerázy, je označován jako preiniciační komplex. Tyto transkripční faktory, které jsou označovány zkratkou TFII (transcription factor for polymerase II) jsou většinou multiproteinové komplexy, které rozeznávají všechny promotory přepisované RNA polymerázou II. Ve většině eukaryot je jejich proteinové složení vysoce konzervované. Největší z nich je TFIID, který je složen z TATA-vazebného proteinu (TBP) a 13 TBP-asociovaných faktorů (TAFs). TFIID je rovněž první TFII, který rozeznává sekvenci TATA-boxu a váže se na ni. TBP způsobí lokální ohyb DNA, který může sloužit jako označení promotoru pro další TFII. Následuje nasednutí monomeru TFIIB a poté tetrameru TFIIF v komplexu s RNA polymerázou, která je umístěna na start transkripce (transcription start site, TSS). V řadě případů však již může být RNA polymeráza předem připravena na promotoru a jen čekat na příslušný signál (Weake a Workman, 2010). Následně dojde k vazbě dalších dvou TFII, konkrétně TFIIE a TFIIH. Helikázová aktivita jedné z deseti podjednotek TFIIH způsobí, za spotřeby adenosintrifosfátu (ATP), rozvinutí dvojšroubovice na TSS. Jiná podjednotka fosforyluje RNA polymerázu, tím dojde ke změně konformace RNA-polymerázy, jejímu uvolnění z preiniciačního komplexu a zahájení přepisu.

### **2.2.2. Chromatin remodelující komplexy a histon-acetyltransferázy**

Transkripce je ovlivňována i vyššími strukturami, a to na úrovni nukleozómů a kondenzace chromatinu. Kondenzovaný chromatin zabraňuje přístupu transkripčních faktorů a jiných proteinů účastnících se transkripce DNA. Změny v uspořádání chromatinu („chromatin remodeling“) proto hrají důležitou roli v regulaci transkripce. Tato remodelace může být uskutečněna kovalentní modifikací histonů, methylací DNA nebo činností proteinových chromatin remodelujících komplexů („chromatin remodeling complexes“). Ty, za využití energie získané z hydrolýzy ATP, posunují a destabilizují nukleozomy či celkově mění jejich strukturu. Výsledkem je rozvolnění chromatinu nebo naopak zvýšení jeho kondenzace a tím dojde buď k podpoře nebo represi transkripce (Clapier a Cairns, 2009). Kovalentní modifikace histonů zajišťují enzymy histon-acetyltransferázy (HATs), deacetylázy, methyltransferázy či kinázy. Pro tuto práci jsou významné zejména HATs provádějící acetylaci, neboť ta má velký význam u transkripce IEGs (immediate early genes, viz kap. 4.). Acetylace aminokyseliny lysinu na N-konci histonu neutralizuje její kladný náboj, díky kterému

jinak dochází k interakci s DNA. Tím tedy nastane uvolnění komplexu histonu s DNA a umožnění transkripce (Crump *et al.*, 2011).

### 2.2.3. Specifické transkripční faktory

Zatímco obecné transkripční faktory jsou totožné pro všechny geny přepisované RNA-polymerázou II, v eukaryotních buňkách existuje velké množství dalších transkripčních faktorů, které se vážou na specifické sekvence a ovlivňují expresi jen některých genů v závislosti na měnících se požadavcích organismu. Terminologie se v tomto případě často liší, různí autoři uvádějí pojmy jako specifické transkripční faktory (specific transcription factors), sekvenčně-specifické faktory (sequence specific factors), upstream-transkripční faktory (upstream transcription factors) či regulační proteiny (gene regulatory proteins). Tyto faktory na rozdíl od obecných transkripčních faktorů rozpoznávají a selektivně vážou sekvence DNA, které jsou unikátní pro jednotlivý gen nebo skupinu genů. Jsou schopny transkripci nejen aktivovat, ale i reprimovat a podle toho se často označují jako aktivátory, nebo represory. Celá řada transkripčních faktorů, jako např. Snail/Snai1, však může pak působit jako represor jednoho genu a aktivátor exprese genu jiného (Rembold *et al.*, 2014).

Vazba specifických transkripčních faktorů na DNA je nejčastěji zprostředkovaná jejich post-translační modifikací, nejčastěji po fosforylaci kinázou. Řada z nich také vyžaduje pro aktivaci dimerizaci s dalším proteinem, buď se stejným transkripčním faktorem (tvoří homodimer) či odlišným TF (heterodimer).

Transkripční faktory obsahují několik významných domén, zejména pak DNA-vazebnou doménu a trans-aktivační/represivní doménu. Vazbě na DNA napomáhají strukturální motivy DNA-vazebné domény, dané charakteristickým uspořádáním peptidových řetězců. Nejznámější jsou helix-otáčka-helix (helix-turn-helix), homeodoména (obdoba helix-turn-helix), helix-smyčka-helix (helix-loop-helix), zinkový prst (zinc finger), či leucinový zip (leucine zipper).

Funkce aktivovaných transkripčních faktorů spočívá zejména v jejich asociaci s tzv. koaktivátorem či korepresorem transkripce a jejich rekrutování do promotorové oblasti genu. Jako příklad může posloužit protein p300, transkripční koaktivátor pre-existujícího transkripčního faktoru Elk-1. Jejich interakcí se zvýší vnitřní histonacetyltransferázová aktivita p300, která vede ke změně struktury chromatinu v okolí promotoru regulovaného genu (viz kap. 4.1.1.2.). To má za následek umožnění nasednutí dalších proteinů potřebných pro zahájení transkripce, aktivaci chromatin-remodelujících komplexů nebo stabilizaci RNA-polymerázy na DNA.

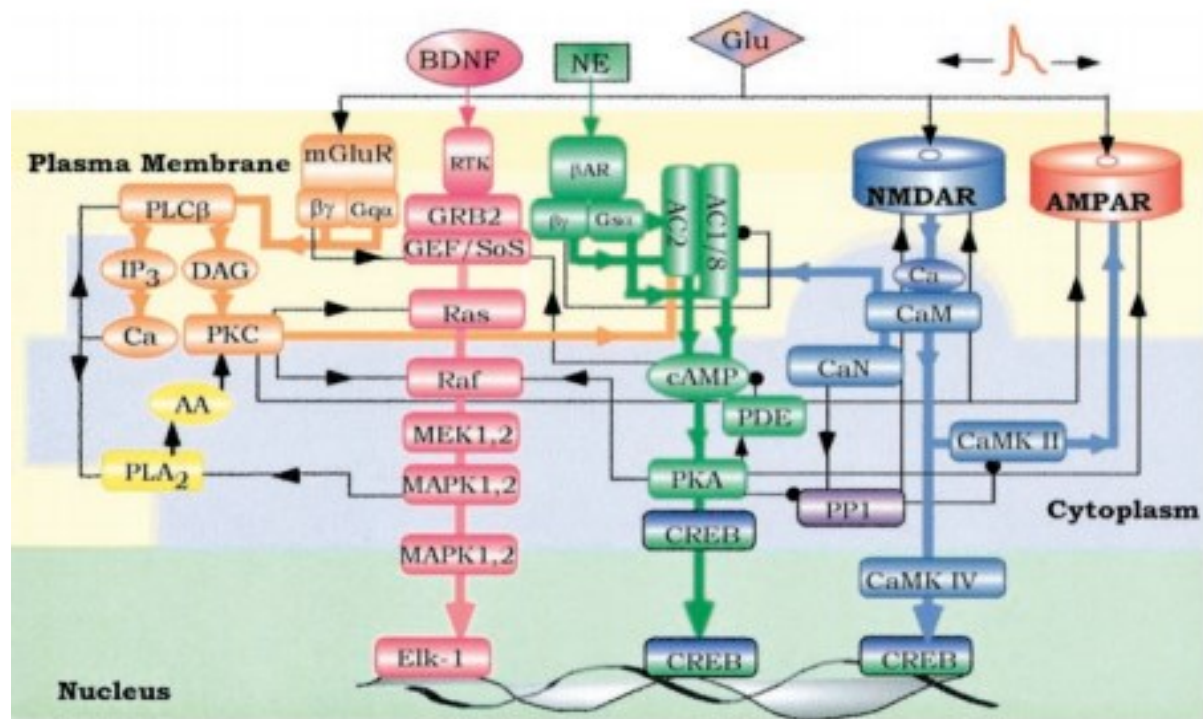
### 3. Přenos signálu a signální dráha ERK

U evolučně nižších, ale zejména u vyšších živočichů existuje velké množství rozmanitých signálních drah lišících se nejen ve způsobu a rychlosti přenosu podnětu, ve vzájemné vzdálenosti komunikujících jednotek, ale především v rozličných odpovědích cílových buněk. Variabilita buněčné signalizace začíná už v okamžiku vyslání signálu, který může být představován různorodými molekulami, jako např. peptidy, lipidy, aminokyselinami, ale i třeba plyny. Signál se poté může šířit na dlouhou vzdálenost krví (endokrinní signalizace zprostředkovaná hormony), na krátkou vzdálenost difúzí (parakrinní a autokrinní signalizace), či přímým kontaktem cílové buňky s okolními buňkami či extracelulární matrix a v neposlední řadě i pomocí tzv. gap junctions (vodivé spoje). Zvláštní případ přenosu signálu na dlouhou vzdálenost představuje nervový systém a akční potenciál, který se šíří podél axonu nervové buňky. Signál mezi dvěma neurony se poté přenáší parakrinně pomocí molekul zvaných neurotransmitery.

Po doputování signálu k cílové buňce existuje více způsobů jeho přenosu do intracelulárního prostředí. Některé signální molekuly (např. steroidní hormony) jsou schopny proniknout přes cytoplazmatickou membránu dovnitř buňky a vázat se až na receptory v cytosolu či v jádře. Jeden z nejčastějších způsobů příjmu signálu spočívá v zachycení extracelulárního signálu povrchovým transmembránovým receptorem, který následně na intracelulární straně buňky aktivuje různé signální dráhy a kaskády. Tyto dráhy jsou často tvořeny proteinkinázami a přenášejí signál pomocí série sekvenčních fosforylací. Pomocí fosforylace ovlivňují proteinkinázy aktivitu svých substrátů a tímto způsobem dochází k přenosu neboli transdukcí signálu ke konečnému cíli. Tím může být jádro; v tomto případě dochází k úpravám v genové expresi a tím ke kontrole např. buněčného růstu či dělení. Jiné odpovědi, nevyžadující změny v genové expresi, mohou představovat kupříkladu změny v buněčném pohybu či metabolismu (Hancock 1997).

V buňce dochází k aktivaci řady signálních drah, a to stimulací více různých signálních drah jedním receptorem, nebo paralelní aktivací více receptorů různými extracelulárními podněty. Mezi jednotlivými prvky těchto kaskád probíhají interakce známé jako „crosstalk“ nebo „cross-signaling“. Takových interakcí může v každé buňce probíhat naráz ohromující množství, dané nejen počtem zúčastněných kaskád a jejich prvků, ale i existencí mnoha různých způsobů jejich vzájemného působení. Jedná se o nesmírně komplikovaný jev, jak můžeme vidět například na obrázku 3. (Dumont *et al.*, 2001). Crosstalk probíhá i na úrovni transkripčních faktorů, řada jich

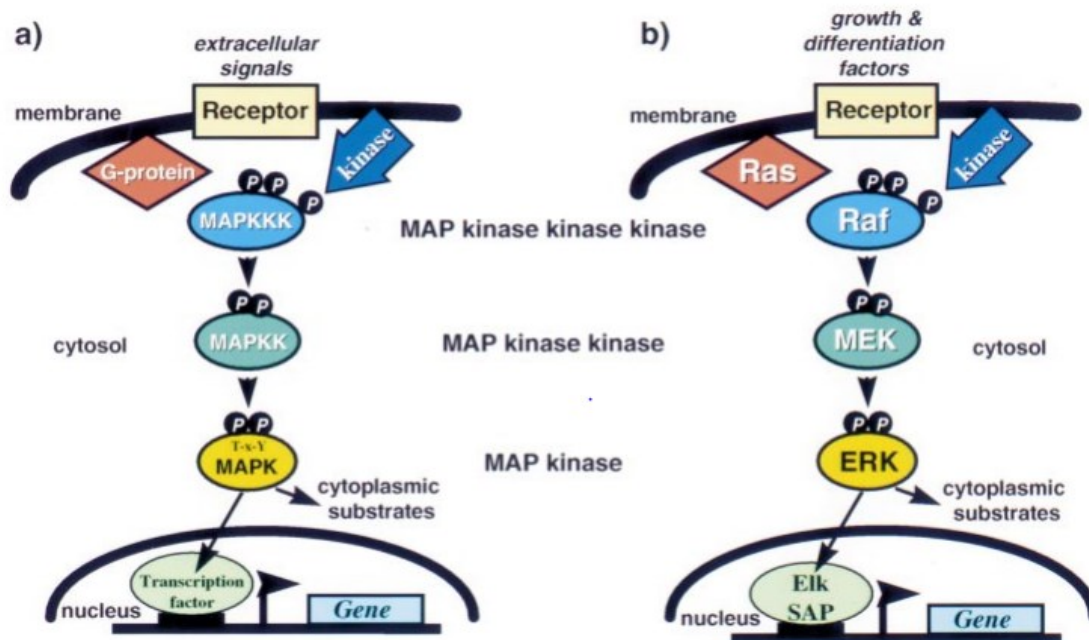
může být aktivována souběžně několika různými paralelními drahami. Například do regulace exprese genu *c-jun* mohou být zapojeny dráhy ERK, JNK i p38 (viz dále a kap. 4.3.1.2.).



Obrázek 3: „Signaling crosstalk“ (Převzato z: Weng et al., 1999).

Jak bylo zmíněno, k přenosu signálu z jednoho prvku kaskády na jiný dochází často jejich sekvenční fosforylací pomocí proteinkináz. Podle typu fosforylované aminokyseliny se eukaryotické proteinkinázy rozlišují na tyrosinkinázy a serin/threonin proteinkinázy. Výjimku pak představuje malá skupina tzv. duálních proteinkináz, která je schopna fosforylovat tyrosinové a threoninové zbytky (Dhanasekaran a Reddy, 1998). Mezi významné a intenzivně studované signální kaskády patří rodina tzv. MAP kináz (mitogenem aktivované proteinkinázy, mitogen-activated protein kinases, MAPKs). MAPK kaskády jsou evolučně konzervované dráhy obsahující obecnou trojici proteinkináz MAP3K, MAP2K a MAPK, které přenášejí signál sekvenční fosforylací od MAP3Ks přes MAP2K až k MAPK (viz obr. 4). MAPK kaskády se vyskytují u všech eukaryot od kvasinek až po člověka a umožňují buňkám odpovídat na nejrůznější podněty z okolí změnou řady buněčných funkcí, jako je např. buněčná diferenciace, růst, dělení či apoptóza (Cuenda *et al.*,

2017). Nejintenzivněji studované MAPK signální dráhy v savčích buňkách jsou ERK1/2, JNK a p38 (Roux a Blenis, 2004). Tato práce se bude zabývat pouze ERK dráhou.



Obrázek 4: Schématické znázornění MAPK kaskád a jejich jednotlivých pater: a) MAPK dráhy obecně; b) ERK dráha (převzato z: Kolch, 2000).

### 3.1. Složení a základní mechanismus aktivace dráhy ERK

Signální dráha ERK či ERK1/2 (kináza regulovaná extracelulárním signálem, extracellular signal-regulated kinase), nebo také MAPK/ERK či p42/p44 mitogen-activated protein kinase (MAPK), hraje významnou roli v řadě buněčných procesů jako je např. růst, diferenciace, proliferace, či programovaná buněčná smrt. Jádrem této dráhy tvoří proteinkinázy Raf, MEK a ERK. Jako ostatní MAPK dráhy je i dráha ERK aktivována nejrůznějšími extracelulárními stimuly jako jsou růstové faktory, hormony či neurotransmitery (Yoon a Seger, 2006). Přenos signálu do buňky je poté umožněn jejich navázáním na membránové receptory, jako jsou receptorové tyrosinkinázy (receptor tyrosine kinases, RTKs) nebo receptory spřažené s G-proteinem (G-protein coupled receptors, GPCRs), ale také iontové kanály a další (Wortzel a Seger, 2011). Ve většině případů poté dochází pomocí faktoru SOS (son of sevenless) k výměně guanodifosfátu (GDP) za guanostriposfát (GTP) u malého GTP vázajícího proteinu Ras a tím k jeho aktivaci. Jeho prostřednictvím

je umožněno pokračování přenosu signálu kaskádou aktivací proteinkinázy Raf-1 nebo B-Raf představujících tzv. MAP3Ks (MAPKKK) stupeň kaskády. Raf aktivuje proteinkinázu MEK (MAPK/ERK kinase), spadající do MAPKK stupně kaskády a ta přenesení signál do MAPK patra dráhy aktivací proteinkinázy ERK1 nebo její izoformy ERK2 (Roux a Blenis, 2004; Yoon a Seger, 2006).

Aktivovaná proteinkináza ERK fosforyluje řadu cytosolických i jaderných proteinů a v současné době je popsáno přes 200 různých substrátů (Yoon a Seger, 2006, Wortzel a Seger, 2011). Substráty představují různorodé proteiny, které zahrnují cytoskeletální proteiny, proteiny účastníci se buněčného metabolismu, diferenciace, migrace či regulace genové exprese. Významnou skupinu cytosolických substrátů představují tzv. MAPKAPK proteinkinázy (MAPK-activated protein kinases). Z těch je třeba zmínit RSKs (The 90 kDa ribosomal S6 kinases) rodinu Ser/Thr kináz, zajišťujících fosforylaci dalších jaderných i cytosolických substrátů a tím regulaci transkripce, syntézy proteinů a buněčné motility (Anjum a Blenis, 2008). RSK však není jediná popsána MAPKAPK; řadí se sem ještě např. MSKs (mitogen-and stress-activated kinases), MAPKAPs-K2/3 (MAPK-activated protein kinases 2 a 3) nebo MNKs (MAPK-interacting protein kinases) (Roux a Blenis, 2004). MNKs a jejich nejznámější substrát, translační iniciační faktor eIF4E, hrají důležitou roli v kontrole translace; protein eIF4E rozpoznává strukturu čepičky (cap strukturu) na 5' konci mRNA a usnadňuje ribozomu se zde navázat (Proud, 2015).

Cílovými molekulami dráhy ERK v jádře jsou především transkripční faktory jako např. Elk1. Aktivace tohoto i dalších transkripčních faktorů fosforylovaných kinázou ERK způsobí přepis tzv. genů časně odpovědi (immediate early genes, IEGs). Produkty těchto genů se objeví již několik minut po stimulaci buňky a patří mezi ně další transkripční faktory jako jsou např. c-Fos, c-Jun či c-Myc. Ty poté regulují expresi genů kódujících strukturní proteiny potřebné pro růst, dělení, migraci či diferenciaci stimulované buňky (Wortzel a Seger, 2011; Yoon a Seger, 2006).

Při tak obrovském množství různých proteinkináz a jejich substrátů zajišťujících rozmanité buněčné odpovědi se objevuje otázka, jakým způsobem je zajištěna specifita interakcí mezi proteinkinázou ERK s jejími substráty a jejich následná fosforylace. Správná selekce substrátu je zajišťována na několika stupních. V první řadě musí substrát obsahovat fosforylovatelný serinový nebo threoninový zbytek. ERK preferuje tyto zbytky v motivu Pro-Xxx-Ser/Thr-Pro, i když minimální motiv Ser/Thr-Pro je dostatečný k účinné fosforylaci (Sheridan *et al.*, 2008). Fosforylace

některých proteinů, např. kalpainu 2, však probíhá v jiném aminokyselinovém kontextu (Glading *et al.*, 2004).

V neposlední řadě pak ke správnému výběru substrátu napomáhají specifické „kotevní“ interakce, tzv. „docking interactions“, které jsou zajištěny existencí určitých sekvencí v blízkosti fosforylovaného místa cílových molekul. Díky těmto sekvencím, nebo také doménám či motivům („recognition motifs“) je umožněna efektivní vazba mezi určitou proteinkinázou a jejím konkrétním cílem. V případě substrátů kinázy ERK se jedná o dva odlišné motivy. Jedním z nich je D-doména (DEJL, docking site for ERK and JNK LXL), někdy také nazývaná kinase interacting motif (KIM), který je rozpoznáván členy všech MAPK signálních drah, tedy ERK, JNK a p38. Interakce probíhá mezi zbytky bazických aminokyselin v rámci D-domény a určitými zbytky aspartátu členů MAPK drah (Biondi a Nebreda, 2003). Druhým motivem je DEF doména (docking site for ERK, FXF), sestávající ze sekvence FXFP, i když zbytek prolinu a prvního fenylalaninu není v některých případech vyžadován. DEF doména je specificky rozpoznávána pouze aktivovanou proteinkinázou ERK (Jacobs *et al.*, 1999).

V případě nepřítomnosti stimulu potřebného k vyvolání a přenosu signálu je neaktivní proteinkináza ERK ukotvena v cytosolu v komplexu s MEK nebo různými regulačními proteiny. Po fosforylaci kinázou MEK se aktivovaná ERK uvolní a během minut je schopna translokovat do jádra. Průchod skrz jaderný pór si ERK pravděpodobně může sama regulovat pomocí vazby na některé nukleoporiny a následné změny propustnosti póru. Import do jádra také může být usnadněn asociací ERK s některými jadernými proteiny obsahujícími jaderný lokalizační signál (nuclear localisation signal/sequence, NLS) (Yang *et al.*, 2013).

## 4. Transkripční faktory regulované dráhou ERK

Již několik minut po přijetí signálu buňkou dochází prostřednictvím signální dráhy ERK k indukci transkripce vybraných genů. Ty s nejrychlejším nástupem exprese jsou známé jako „bezprostředně časné geny“, nebo také „geny časné odpovědi“ (immediate-early genes, IEGs). Většina IEGs, jako jsou např. *c-fos*, *c-jun* či *c-myc*, kóduje transkripční faktory nebo regulátory signálních drah. Nejvyšší míra jejich transkripce nastává typicky 30 minut po stimulaci buňky (viz obr. 5).

S patrným zpožděním následně dojde k aktivaci transkripce dalších „opožděných časných“ genů (delayed early genes, DEGs). Nejvyššího stupně transkripce dosáhnou přibližně 90 minut po stimulaci buňky (viz obr. 5). Produkty DEGs jsou většinou buď zpětnovazebné inhibitory signálních drah, jako např. MAPK fosfatázy, nebo inhibitory transkripce. Některé inhibují přímo transkripční faktory, které indukují IEGs, jiné tlumí aktivitu produktů IEGs *c-fos* a *c-jun* v komplexu AP-1 (viz kap. 4.2.2., 4.3.1.). Řadí se sem např. DUSPs (viz kap. 4.2.1.) (Feldman a Yarden, 2014).

Základním a rozpoznávacím rysem IEGs i DEGs je, že jejich exprese není blokována inhibitory translace, a tudíž indukce transkripce těchto genů nevyžaduje předchozí syntézu proteinů *de novo*. Jejich transkripce je zajištěna aktivací již přítomných, primárních či pre-existujících transkripčních faktorů (pre-existing transcription factors), jako je např. Elk-1 (Feldman a Yarden, 2014). Oproti ostatním genům jsou promotorové oblasti IEGs typické vyšším počtem vazebných míst pro transkripční faktory, jejich primární transkripty jsou krátké a neobsahují mnoho exonů. Naproti tomu DEGs jsou podobnější ostatním „klasickým“ genům, tzn. že mají delší transkripty a více exonů. Další společná vlastnost IEGs je rychlá degradace. Ta je daná nestabilitou jejich mRNA (Tullai *et al.*, 2007), ale v některých případech i nestabilitou proteinových produktů (Murphy *et al.*, 2002). Přes tyto významné rozdíly řadí většina autorů oba druhy genů, IEGs a DEGs, do společné skupiny zvané geny primární odpovědi (primary response genes, PRGs) (Bahrami a Drabløs, 2016; Feldman a Yarden, 2014).

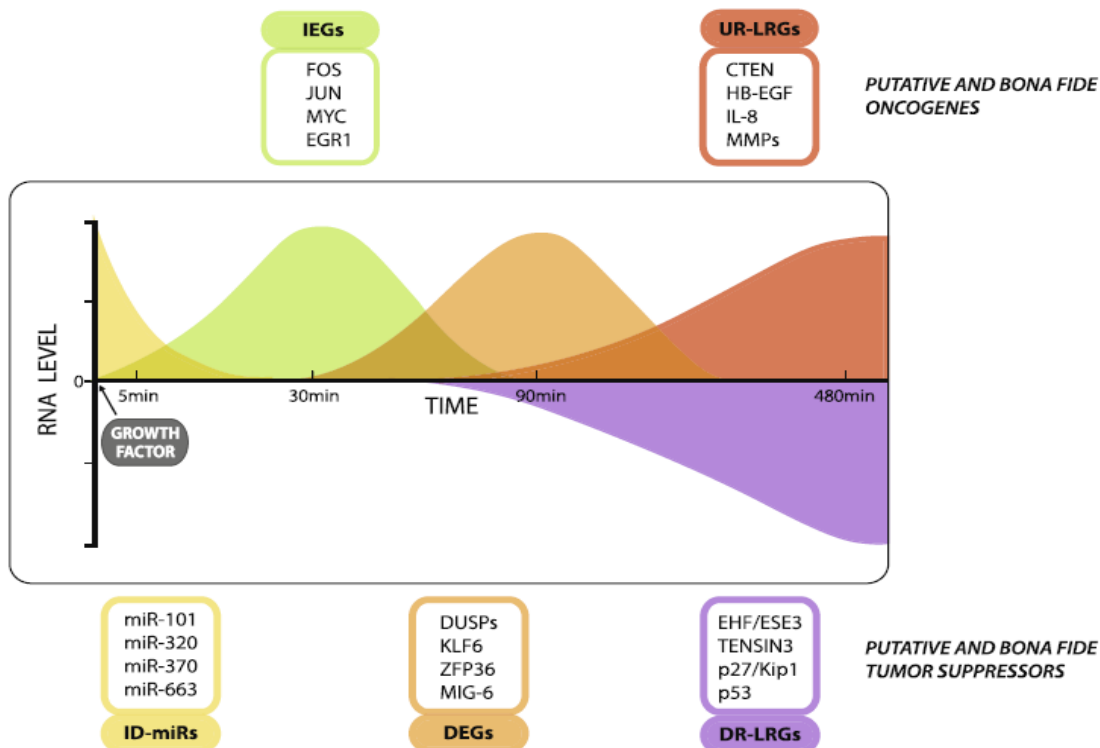
Po transkripci IEGs a DEGs následuje aktivace genů pozdní odpovědi (late response genes, LRGs) nebo také immediate-late genes (ILGs). Na rozdíl od IEGs i DEGs je nástup LRGs pomalejší, nejvyšší míry transkripce dosahují po několika hodinách (viz obr. 5), a jejich mRNA je stabilní. Kvůli pozdnímu nástupu jejich exprese se dříve předpokládalo (a takový názor stále spíše převládá, viz dále), že k jejich transkripci je potřeba předchozí syntéza proteinů a byly tudíž řazeny mezi geny sekundární odpovědi (secondary response genes, SRGs), které proteosyntézu *de novo* vyžadují. Později se ale ukázalo, že některé z těchto SRGs nejsou senzitivní k působení inhibitorů

translace, tedy předchozí syntézu proteinů *de novo* nevyžadují a byly zařazeny do nové skupiny, LRGs. Tato skupina genů zahrnuje jak onkogeny, tak tumorsupresorové geny a ovlivňuje trvalé změny organismu jako je buněčná migrace či diferenciaci. Patří sem např. významný tumorsupresor p53 (Feldman a Yarden, 2014; Uhlitz *et al.*, 2017).

Životnost produktů PRGs je závislá na době, po kterou je aktivována signální dráha ERK. Tato doba je regulována mnoha molekulárními mechanismy, závislými na konkrétním typu buňky, délce přijímaného signálu, hustotě receptorů na povrchu buňky či míře exprese „scaffold“ proteinů (Murphy a Blenis, 2006; Nagashima *et al.*, 2015).

Většina IEGs kóduje transkripční faktory, což vede k indukci již zmíněných genů sekundární odpovědi (secondary response genes, SRGs). Na rozdíl od PRGs je tedy pro indukci SRGs nutná předchozí syntéza proteinů. SRGs kódují buď další transkripční faktory nebo „efektorové“ proteiny účastníci se např. regulace buněčného cyklu (cykliny). Expresí SRGs často dojde ke změně ve funkci či stavbě buňky jako konečné odpovědi na příchozí signál (O'Donnell *et al.*, 2012).

Klasifikace je však v případě LRGs a SRGs někdy obtížná a terminologie trochu zmatečná. Převládající názor totiž tyto skupiny genů nerozděluje, ale řadí je do společné skupiny SRGs, na základě jejich později se objevující a déle trvající transkripce vzhledem k IEGs a DEGs. Například exprese enzymů matrixových metaloproteáz (matrix metalloproteases, MMPs), častých cílů signální dráhy ERK, může být indukována transkripčním faktorem AP-1, produktem IEGs. Zároveň ale promotory MMPs obsahují i vazebné místo pro Ets transkripční faktory, tedy rodinu pre-existujících transkripčních faktorů, do kterých se řadí např. Elk-1. Z tohoto důvodu mohou být MMPs také považovány za PRGs, nevyžadující syntézu proteinů *de novo* (Bergman *et al.*, 2003; Feldman a Yarden, 2014). V některých případech přesná klasifikace není možná. Česká terminologie používá pouze výraz „geny pozdní odpovědi“, pod které se řadí jak LRGs, tak SRGs. V této práci jsou však SRGs přeloženy doslovně, tedy jako „geny sekundární odpovědi“.



Obrázek 5: Časový průběh transkripce PRGs: Nejvyšší míra transkripce u IEGs nastává typicky 30 minut po stimulaci buňky, u DEGs je to 90 minut a u LRGs i více než 8 hodin (převzato z: Feldman a Yarden 2014).

## 4.1. Primární transkripční faktory

Primární transkripční faktory jsou pre-existující transkripční faktory, které řídí expresi genů časné odpovědi. Tyto transkripční faktory jsou přítomny v době aktivace dráhy ERK, nicméně jejich exprese může být také částečně regulována.

### 4.1.1. Ets family/Ternary complex factor subfamily a touto rodinou regulované geny

Ets-family je rodina transkripčních faktorů podmíněná přítomností evolučně konzervované DNA-vazebné domény E-twenty six (Ets). Tato doména umožňuje specifické rozpoznání sekvenčního motivu 5'-GGA(A/T)-3' v rámci nejčastěji 12 - 15 bp dlouhé DNA sekvence (Hollenhorst *et al.*, 2011). Podle stupně homologie jejich Ets domén a upřednostňované DNA vazebné sekvence rozlišujeme 12 podrodin (subfamilies) Ets rodiny transkripčních faktorů (Besnard *et al.*, 2011; Hollenhorst *et al.*, 2011). Bylo popsáno 27 členů Ets rodiny, z nichž u necelé poloviny bylo prokázáno, že jsou přímými substráty ERK (Selvaraj *et al.*, 2015). Významné substráty pak tvoří podrodiny ERF (ERF, ETV3), PEA3 (ETV1), ERG a TCF.

Pravděpodobně nejintenzivněji studovanou podrodinou Ets proteinů ve vztahu k ERK jsou Ternary complex factors (TCFs) (Buchwalter *et al.*, 2004). TCFs jsou fosforylovány ERK a po fosforylaci heterodimerizují se SRFs (serum response factors). TCF/SRF tvoří ternary complex na SRE (serum response element) promotorů IEGs a tím aktivují transkripci (Demir *et al.*, 2011). Prvním popsáním členem této skupiny byl transkripční faktor Elk-1 (Ets-like protein 1), dále se sem řadí Elk-4/Sap-1 (SRF accessory protein 1) a Sap-2/Erp/Net/Elk-3 (Besnard *et al.*, 2011). Mezi hlavní cíle Ets proteinů patří především IEGs kódující transkripční faktory, ale i např. některé součásti preiniciačního komplexu (viz. kap. 2.1.), jako je TBP (TATA-binding protein) (Besnard *et al.*, 2011; Limin a John Q., 2003). Tato práce věnuje pozornost především proteinu Elk-1, jedné z hlavních cílových molekul MAP kinázových signálních drah, tedy i signální dráhy ERK.

#### **4.1.1.1. Aktivace Elk-1 pomocí fosforylace a defosforylace**

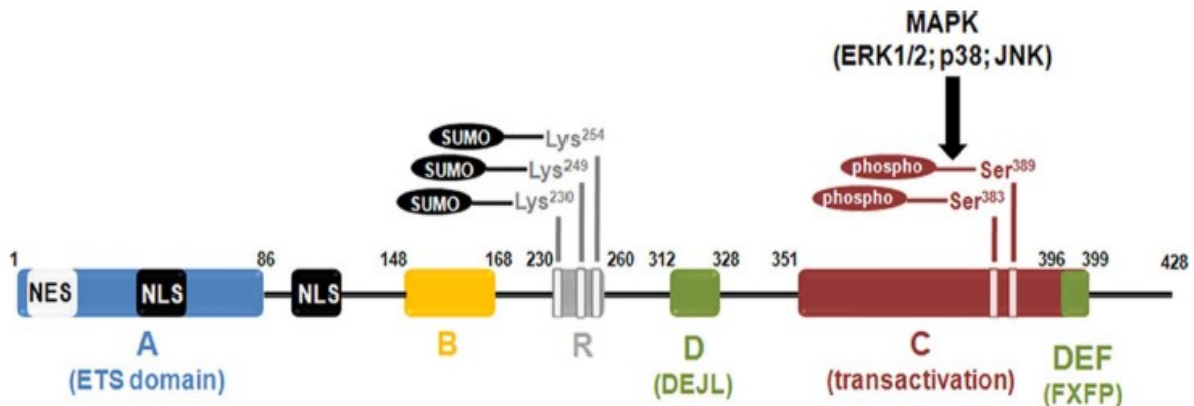
Hlavní mechanismus aktivace transkripčních faktorů signální dráhou ERK představuje fosforylace určitých aminokyselin ve struktuře transkripčního faktoru. Dále většina transkripčních faktorů vyžaduje ke své funkci dimerizaci s jiným proteinem, v případě Elk-1 se jedná o transkripční faktor SRF (serum response faktor), který je schopen rozpoznat sekvenci SRE (serum response element) u řady promotorů IEGs.

V rámci TCFs existuje osm evolučně konzervovaných fosforylačních míst, u kterých byla popsána fosforylace. V případě Elk-1 dochází především k fosforylacím zbytků Thr369 a Ser383 (někteří autoři uvádí Ser384) v trans-aktivační doméně (Mylona *et al.*, 2016; Yang *et al.*, 1999). Fosforylace vyvolá konformační změnu proteinu Elk-1, který dimerizuje se SRF, společně se naváží na DNA a zahájí aktivaci transkripce (Yang *et al.*, 1999). Vazba proteinkinázy ERK na Elk-1 je zajištěna přítomností D-domény (DEJL, docking site for ERK and JNK LXL) proteinu Elk-1. Na tuto doménu se kromě ERK mohou vázat také MAP kinázy JNK a p38. Směrem k C-konci od D-domény leží C-doména (transcriptional activation domain), oblast obsahující zbytky aminokyselin, které mohou být MAP kinázami fosforylovány (Besnard *et al.* 2011). Součástí C-domény je dále FXFP neboli DEF (docking site for ERK FXFP) motiv, vazebná doména, určená pro specifickou vazbu pouze proteinkinázy ERK (viz obr. 6.) (Mylona *et al.* 2016).

Kromě aktivačních domén obsahuje Elk-1 také R-doménu, která slouží k inhibici jeho funkce. Inhibice je zajištěna reverzibilní sumoylací, tedy navázáním malých signálních proteinů SUMO (small ubiquitin-like modifier) na lysinové zbytky této domény. K aktivaci proteinu Elk-1

je tedy zapotřebí nejen fosforylace jeho aktivačních domén, ale také odstranění sumoylace R-domény (viz obr. 6.) (Yang *et al.*, 2003).

Na N-konci proteinu Elk-1 se nachází A-doména, která slouží k vazbě Elk-1 na DNA (viz kap. 4.1.1.2.). Její součástí jsou navíc jaderný lokalizační signál (NLS) a jaderný exportní signál (NES), které slouží k transportu Elk-1 mezi cytosolem a jádrem (viz obr. 6.) (Besnard *et al.*, 2011).



Obrázek 6: Domény a post-translační modifikace proteinu Elk-1 (převzato z: Besnard *et al.*, 2011).

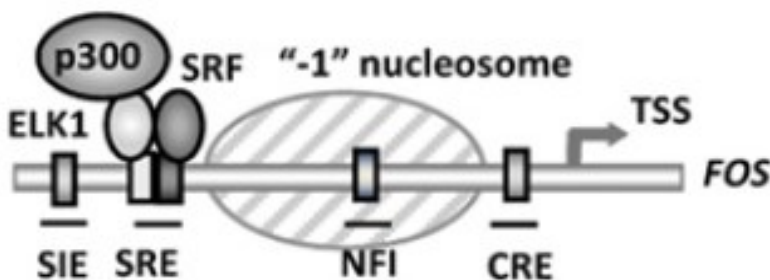
#### 4.1.1.2. Vazba Elk-1 na DNA, asociace se serum response factor

Vazba transkripčního faktoru Elk-1 na DNA probíhá pomocí N-koncové Ets-domény (neboli A-domény) proteinu. Strukturu Ets-domény představují tři  $\alpha$ -helixy a čtyři antiparalelní  $\beta$ -listy tvořící společně tzv. „winged helix-turn-helix“ motiv (wHTH), společný všem členům Ets-rodiny. Přímý kontakt Elk-1 a DNA pomocí specifických interakcí se sekvencí GGA zprostředkuje  $\alpha$ 3-helix vnořený do velkého žlábků DNA. Tento rozpoznávaný úsek má v porovnání se zbylou DNA velký žlábek užší a hlubší, což umožňuje snadnější zanoření  $\alpha$ 3-helixu (Mo *et al.*, 2000). Nejvýznamnější interakce mezi  $\alpha$ 3-helixem a velkým žlábkem představují vodíkové vazby mezi dvěma argininy helixu a dvěma guaniny DNA (Hollenhorst *et al.*, 2011). Segment  $\beta$ 3-turn- $\beta$ 4 a turn (otočka) mezi helixy  $\alpha$ 2 a  $\alpha$ 3 vytvářejí kontakty s vlákny DNA obklopujícími  $\alpha$ 3-helix (Mo *et al.*, 2000).

K aktivaci transkripce cílových genů proteinu Elk-1 je navíc zapotřebí již zmíněný serum response factor (SRF). Pro interakci Elk-1 se SRF je nutná fosforylace C-domény, která způsobí konformační změnu Elk-1 a tím odhalení B-domény, umožňující vazbu Elk-1 k SRF. SRF

s Elk-1 se společně vážou na serum response element (SRE), nacházející se na promotoru cílového genu. SRE zahrnuje jak vazebné místo pro Ets-doménu Elk-1, tak vazebné místo pro SRF, představující tzv. CArG box s obecnou sekvencí 5'-CC(A/T)<sub>6</sub>GG-3' (Buchwalter *et al.*, 2004; Besnard *et al.*, 2011; Hollenhorst *et al.*, 2011).

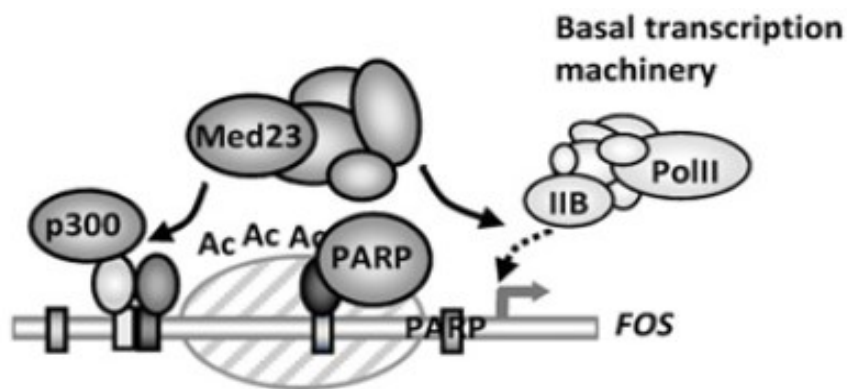
Vazba proteinu Elk-1 spolu se SRF na SRE je nutnou podmínkou vedoucí k aktivaci transkripce. Situace je však mnohem složitější, protože k aktivaci transkripce je totiž třeba nejen komplex Elk-1/SRF, ale je nutné zapojení mnoha dalších molekul. Jednou z nich je enzym p300. Jedná se o transkripční koaktivátor s vnitřní acetyltransferázovou aktivitou. Elk-1 interaguje s N-koncem p300 svou trans-aktivační doménou, i pokud právě není fosforylována. Fosforylace Elk-1 usnadní jeho vazbu s p300 a tato interakce výrazně zvýší acetyltransferázovou aktivitu koaktivátoru (Li *et al.*, 2003). V případě genu *c-fos*, jednoho z nejčastějších cílů proteinu Elk-1, je modifikace chromatinu, zejména acetylace histonů, podmínkou k aktivaci transkripce. Klíčovou roli při aktivaci pak zřejmě hraje tzv. „-1 nucleosome“, nukleozom nacházející se „upstream“ od počátku transkripce (TSS; transcription start site). V této oblasti a jejím blízkém okolí se totiž nachází promotor, kde probíhá největší množství změn vedoucích k zahájení transkripce, včetně již popsané vazby Elk-1 na DNA (viz obr. 7. a 8.) (O'Donnell *et al.*, 2008, 2012).



Obrázek 7: Znáznornění promotoru, cis-regulačních sekvencí, „-1“ nukleozomu, TSS a některých molekul zapojených do aktivace transkripce *c-fos* (převzato z: O'Donnell *et al.*, 2012).

Acetylace histonů zprostředkovaná aktivitou p300 vede k vazbě transkripčního faktoru NFI (nuclear factor 1) na sekvenci promotoru „downstream“ od SRE, umístěnou v rámci „-1“ nukleozomu. Bez acetylace a následné změny struktury chromatinu v této oblasti by navázání NFI na DNA nebylo možné. Vazba NFI je nezbytná pro rekrutování dalších molekul zapojených do regulace transkripce (O'Donnell *et al.*, 2008). První z nich je protein PARP1 (poly(ADP-ribose))

polymerase 1), jehož funkcí je pravděpodobně usnadnění aktivace některých členů chromatin-remodelujícího komplexu, což má za následek další změny ve struktuře „-1“ nukleozomu. Poté je přes vazbu na Elk-1 rekrutován mediátor MED23, důležitý pro skládání obecných transkripčních faktorů do preiniciačního komplexu, následnou aktivaci RNA-polymerázy II a iniciaci transkripce (viz obr. 8.) (O’Donnell *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2005).



Obrázek 8: Děje na promotoru těsně před iniciací transkripce genu *c-fos*; vazba PARP1, mediátoru, skládání pre-iniciačního komplexu (převzato z: O’Donnell *et al.*, 2012).

#### 4.1.2. Další primární transkripční faktory

##### 4.1.2.1. Sp1

Dalším pre-existujícím transkripčním faktorem je například Sp1 (specificity protein 1), který patří do rodiny obsahující dále členy Sp2, Sp3 a Sp4. Na promotorech cílových genů rozeznává Sp-vazebné sekvence bohaté na guanin a cytosin. S DNA poté interaguje pomocí tří C-koncových motivů zinkového prstu. Sp1 je schopen pozitivní i negativní regulace genové exprese. Jeho aktivita je regulována post-translačními modifikacemi a interakcemi s dalšími proteiny. V rámci post-translačních modifikací může podstoupit O-glykosylaci, fosforylaci, sumoylaci a acetylaci. Tyto modifikace ovlivňují zejména stabilitu Sp1, jeho afinitu k DNA a schopnost regulovat transkripci (Black *et al.*, 1999; Vizcaíno *et al.*, 2015). Fosforylaci Sp1 může provádět velké množství kináz. Jedna kináza pak může fosforylovat různé aminokyselinové zbytky Sp1, nebo naopak více různých kináz může fosforylovat Sp1 na totožném místě (Chu, 2012). Mezi kinázy přímo i nepřímo zapojené ve fosforylaci Sp1 patří např. proteinkináza C (PKC). Nepřímá

fosforylace Sp1 pomocí PKC je uskutečněna prostřednictvím signální dráhy ERK, kdy proteinkináza ERK fosforyluje Sp1 poté, co je dráha ERK aktivována proteinkinázou C (Guo *et al.*, 2010). Dále může být Sp1 fosforylován např. JNK nebo p38 (Chu, 2012).

#### 4.1.2.2. STATs

Další primární transkripční faktory jsou proteiny STAT (přenašeč signálu a aktivátor transkripce, signal transducer and activator of transcription). V savčích buňkách se vyskytuje sedm různých STAT proteinů, které jsou členy intenzivně studované signální dráhy JAK/STAT. Stejně jako dráha ERK, JAK/STAT ovlivňuje zejména buněčnou proliferaci, diferenciaci, migraci a apoptózu. Aktivace STAT probíhá po stimulaci receptoru, zejména růstovými faktory a cytokiny, kdy tyrosinkináza JAK (Janus kinase) navázaná na receptoru podstoupí auto-fosforylaci a zároveň fosforyluje jinou JAK. Tyto dvě aktivované JAK poté fosforylují tyrosinové zbytky cytosolických částí receptoru a tím umožní navázání transkripčních faktorů STAT. JAK kinázy fosforylací aktivují STAT transkripční faktory, které vytvoří dimer. Následuje translokace dimeru do jádra, kde se váže na palindromické sekvence řady genů a umožňuje jejich transkripci (Kiu a Nicholson, 2012). Dráha JAK/STAT může komunikovat s dalšími signálními drahami včetně ERK, a to na mnoha úrovních kaskády (Rawlings *et al.*, 2004). ERK může fosforylovat STAT3 přímo na serinovém zbytku 727 a tato fosforylace může dále zvyšovat transkripční aktivitu STAT3, pokud je fosforylován na tyrosinových zbytcích (Wen *et al.*, 1995; Gough *et al.*, 2013). Na druhou stranu může ERK za určitých podmínek inhibovat tyrosinovou fosforylací STAT3 a tím transkripci inhibovat (Krasilnikov *et al.*, 2003).

## 4.2. Geny indukované v rámci časné odpovědi

### 4.2.1. Indukce genů časné odpovědi: zpětnovazební inhibice

Jednou ze skupin genů exprimovaných v rámci časné odpovědi jsou proteiny podílející se na zpětnovazební regulaci daných signálních drah. V případě dráhy ERK se jedná především o zpětnovazební inhibitory, které se podílejí na utlumení signalizace dráhou ERK. Zpětnovazební inhibice geny časné odpovědi je pak zprostředkována buď proteinovými inhibitory nebo defosforylací proteinkináz pomocí proteinfosfatáz.

Proteinové inhibitory interagují s členy signálních drah a zabraňují jejich aktivaci nebo dalšímu přenosu signálu. Sprouty jsou proteiny inhibující signalizaci RTKs a jejich exprese představuje negativní zpětnovazební smyčku (negative feedback loop). Exprese sprouty je indukována

signalizací přes některé RTK receptory aktivující dráhu ERK. Sprouty proteiny jsou schopné narušit tvorbu komplexu mezi proteinem Grb2 a RTK, a tím bránit aktivaci dráhy ERK (Hanafusa *et al.*, 2002). Tento mechanismus umožňuje odpovídat na různě silné signály a optimalizovat odpověď (Reich *et al.*, 1999). V savčích buňkách se vyskytují čtyři izoformy rozlišené podle typu jejich působení a způsobu, jakým je regulována jejich funkce (Hanafusa *et al.*, 2002). V některých buněčných typech však mohou sprouty naopak podporovat ERK signalizaci (Lim *et al.*, 2002).

Dalšími významnými inhibitory je rodina fosfatáz s duální specificitou (dual-specificity phosphatases, DUSPs). Jedná se o enzymy regulující funkci substrátu defosforylací zbytků fosfotyrosinu, fosfothreoninu či fosfoserinu. Dělí se do šesti skupin, jednou z nich jsou fosfatázy MAP kináz (mitogen-activated protein kinase phosphatases, MKPs), které defosforylují a tím inhibují proteinkinázy ERK, JNK i p38. Chybná regulace sprouty, DUSPs i dalších inhibitorů signálních drah je spojena s aberantní regulací těchto drah a může vést k mnoha různým onemocněním (Patterson *et al.*, 2009).

#### **4.2.2. Indukce genů časné odpovědi: Transkripční faktor AP-1 a jiné TFs**

Jednou z nejdůležitějších skupin genů exprimovaných v rámci časné odpovědi jsou transkripční faktory, které jsou součástí komplexu AP-1. AP-1 (aktivující protein 1, activating protein 1) je dimerický transkripční faktor, který se skládá z proteinů pocházejících z různých rodin. Z nich významné jsou transkripční faktory rodiny Jun (obsahující proteiny c-Jun, JunB a JunD) a Fos (s členy c-Fos, FosB, Fra-1 a Fra-2), dále sem patří ATF (aktivující transkripční faktor, activating transcription factor) a Maf (Shaulian, 2010). Celá řada těchto nově exprimovaných genů je také fosforylována kinázou ERK a ostatními MAPK dráhami. Tyto fosforylace vedou jak ke zvýšení transkripční aktivity, tak i ke stabilizaci fosforylovaných proteinů (Murphy *et al.* 2002).

Při sdružování těchto proteinů do dimerů vzniká řada kombinací, což spolu s post-translačními modifikacemi a interakcí s řadou dalších proteinů způsobuje vysokou specifitu a afinitu ke konkrétním regulovaným genům. Interakcí členů AP-1 může vzniknout 18 různých homo- a heterodimerů. Tvorba dimerů je možná díky leucinovým zipům přítomným ve struktuře těchto proteinů, které se proto řadí do rodiny bZIP (basic leucine zipper, „bazický leucinový zip“). Dimery mohou dále interagovat s více než 50 různými proteiny, z nichž některé jsou rovněž členy bZIP rodiny (Chinenov a Kerppola, 2001).

Členové rodiny Jun mohou fungovat jako homodimer i heterodimer s proteiny Fos, zatímco Fos tvoří jen heterodimery. Jun homodimer i Jun/Fos heterodimer vážou přednostně sekvenci na

cílové DNA zvanou TRE (tetradecanoylphorbol-13-acetate/TPA responsive element) neboli „AP-1 DNA recognition element“ (5'-TGA(C/G)TCA-3'), zatímco Jun/ATF upřednostňuje sekvenci 5'-TGACGTCA-3', známou jako CRE (cyclic AMP responsive element) (Kappelman *et al.*, 2014; Shaulian, 2010).

AP-1 nemusí vždy fungovat jako aktivátor transkripce; např. kde dimery Jun/Jun a Jun/Fos působí aktivačně, dimer Jun/JunB se chová jako represor (Herschman, 1991).

### **4.3. Transkripční faktory indukované v rámci časné odpovědi**

#### **4.3.1. Komponenty AP-1**

##### **4.3.1.1. c-Fos**

Asi nejlépe prostudovaným členem AP-1 je produkt IEG *c-fos*, patřící do Fos rodiny transkripčních faktorů. Nejvyšší míra jeho exprese nastává typicky 30-60 min po stimulaci, do 90 min proběhne návrat zpět do klidových hodnot (O'Donnell *et al.*, 2012).

Promotor *c-fos* obsahuje tři regulační cis-elementy – CaCRE, SRE a SIE (viz obr. 7.). Každý z nich je rozeznáván jinou molekulou v rámci odlišných signálních drah, což umožňuje *c-fos* promotoru odpovídat na nepříbuzné podněty (O'Donnell *et al.*, 2012; Tulchinsky, 2000). CaCRE (The Ca<sup>2+</sup> and cAMP-response element) je cíl pro transkripční faktor CREB, aktivovaný signální dráhou cAMP/PKA nebo Ca<sup>2+</sup>. Element SIE (The *v-sis*-inducible element) je rozpoznáván proteiny STAT1 a STAT3, aktivovanými cytokiny či růstovými faktory. Funkce CREB i STAT1 a STAT3 může být pozměněna i MAPK kaskádami (Nissen *et al.*, 2001).

##### **4.3.1.2. c-Jun**

Dalším významným členem AP-1 je c-Jun z Jun rodiny. Pro jeho funkci je nezbytná MAPkinázová dráha JNK, která nejen reguluje transkripci *c-jun* genu, ale také aktivuje samotný protein c-Jun fosforylací na jeho N-koncových serinových reziduích. Transkripce však vyžaduje i zapojení ERK dráhy, kdy dochází k aktivaci promotoru pomocí proteinů CREB či ATF1. Jejich funkce je zajištěna fosforylací kinázami z RSK a MSK rodiny, jež jsou aktivovány signálními drahami p38 (pouze v případě MSK) či právě ERK (Gupta a Prywes, 2002).

##### **4.3.1.3. Regulace aktivity AP-1**

Aktivita transkripčního komplexu AP-1 je regulována více způsoby. Jedním z nich je schopnost dimerizace členů komplexu pomocí leucinových zipů, čímž vzniká řada kombinací.

Různé homo- i heterodimery rozpoznávají odlišné sekvence v promotorech cílových genů, některé mohou fungovat jako aktivátory a jiné jako represory transkripce (viz kap. 4.2.2.).

Další možností regulace jsou post-translační modifikace členů AP-1, konkrétně fosforylace. Ta může vést jak ke stabilizaci komponent AP-1 a tím k usnadnění tvorby dimerů, tak ke zvýšení transkripční aktivity komplexu. Fosforylace vedoucí k transaktivaci probíhá nejčastěji u proteinu c-Jun na aminokyselinových zbytcích Ser63 and Ser73 a obdobná místa jsou konzervovaná a fosforylována i v transkripčních faktorech JunB, JunD, and ATF2 (Davis, 2000). Zdá se, že fosforylace a aktivita těchto TFs je regulována především fosforylační kinázou JNK. Ukázalo se, že různé izoformy JNK působí na aktivitu c-Jun odlišně, pravděpodobně v závislosti na charakteru signalizace a na buněčném typu (Sabapathy *et al.*, 2004).

Ve fosforylaci vedoucí ke stabilizaci IEGs a členů AP-1 má důležitou úlohu signální dráha ERK. Tento jev byl pravděpodobně nejlépe popsán u proteinu c-Fos, kde fosforylace stabilizuje c-Fos. Pokud je signalizace dráhou ERK pouze přechodná (v řádu minut), produkty genu *c-fos*, které se objevují v řádu desítek minut, nejsou kinázou ERK fosforylovány. V tomto stavu jsou vysoce nestabilní a rychle podléhají degradaci. Pokud je však signalizace ERK trvalejší, dojde k fosforylaci proteinu c-Fos přítomnými kinázami ERK a RSK na jeho C-koncových Ser374 a Ser362. To vede ke zvýšení stability proteinu c-Fos a odkrytí jeho DEF domény, vazebného místa pro ERK. Zde se ERK naváže a fosforyluje další aminokyselinové zbytky proteinu c-Fos (konkrétně Thr325 a Thr331), což vede ke zvýšení jeho transkripční aktivity. Také ostatní produkty IEGs, jejichž úlohou je např. kontrola buněčného cyklu a proliferace, obsahují pravděpodobně ve své struktuře DEF doménu. To naznačuje, že tyto proteiny fungují jako senzory délky trvání signalizace dráhou ERK (Murphy *et al.*, 2002).

### **4.3.2. Jiné TFs exprimované v rámci časné odpovědi**

#### **4.3.2.1. c-Myc**

Jiným cílem signální dráhy ERK je IEG *c-myc* z Myc rodiny. Jeho transkripce může být regulována řadou transkripčních faktorů, včetně Ets-rodiny aktivované signální dráhou ERK (Wang *et al.*, 2006). Podobně jako u c-Fos, i pro aktivitu a stabilitu proteinu c-Myc je významná jeho fosforylace proteinkinázou ERK (Yoon a Seger, 2006). Proteiny Myc obsahují na svém C-konci basic-helix-loop-helix motiv (bHLH) a motiv leucinového zipu (LZ), proto se řadí do bHLH-LZ rodiny. Tyto motivy umožňují dimerizaci Myc s jiným členem této rodiny, proteinem Max. Proteiny z bHLH rodiny se běžně vážou na sekvence CANNTG („E-box“) na cílové DNA,

dimer Myc/Max rozeznává sekvenci CACGTG (Martinato et al., 2008). Exprese genu *c-myc* i aktivita jeho produktu může být negativně auto-regulována fosforylovaným c-Myc při dlouhotrvající aktivaci ERK (Wang et al., 2006).

#### 4.3.2.2. EGR1

EGR1 (Early-growth response factor 1) je transkripční faktor, produkt IEG a člen EGR rodiny sestávající z členů EGR1-4. Tyto transkripční faktory rozeznávají cílovou sekvenci GCG(T/G)GGGCG. K aktivaci transkripce vyžadují transkripční koaktivátory jako jsou CREB-binding protein nebo p300 (Silverman et al., 1998). Aktivita EGR1 může být ovlivněna i negativně, prostřednictvím korepresorů jako např. NAB1 a NAB2 (NGFI-A-binding proteins 1 and 2). Jeho transkripce je regulována TCF/SRF přes MAPK signální dráhy ERK, JNK i p38 (Silverman a Collins, 1999).

### 4.4. Secondary response genes

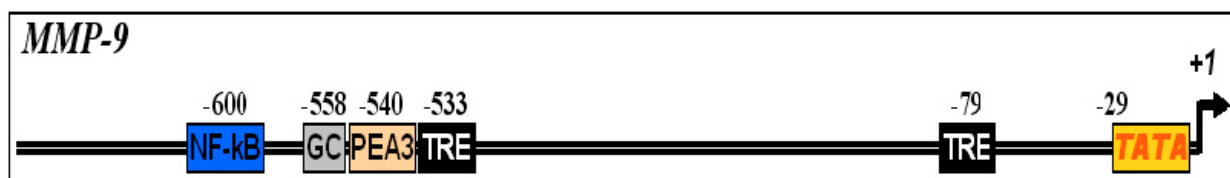
Transkripční faktory exprimované v rámci primární odpovědi následně regulují přepis „genů sekundární odpovědi“ (secondary response genes, SRGs). Expresí těchto genů může nastat konečná odpověď buňky na přijatý signál. SRGs totiž kromě dalších transkripčních faktorů kódují „efektorové“ proteiny, účastníci se regulace buněčného cyklu, růstu, diferenciaci a dalších globálních změn ve funkci a struktuře buňky. Mezi tyto proteiny patří např. cykliny, matrixové metaloproteázy (MMPs), kadheriny, proteiny cytoskeletu a další.

Cykliny jsou proteiny nezbytné pro regulaci buněčného cyklu. Fungují jako regulační podjednotky enzymů cyklin-dependentních kináz (cyclin-dependent kinases, CDKs), které zahajují procesy probíhající v různých částech buněčného cyklu, např. v S-fázi cyklu spouští děje vedoucí k replikaci DNA. Různá míra exprese a degradace cyklinů, v závislosti na příchozích signálech, způsobuje cyklické změny v jejich koncentraci. Koncentrace CDKs je přitom po celou dobu relativně stabilní, přičemž při nízké koncentraci cyklinů jsou CDKs neaktivní. Z důvodu potřeby regulace odlišných dějů v rámci buněčného cyklu existuje více typů cyklinů i Cdk (Coqueret, 2002).

Matrixové metaloproteázy (matrix metalloproteases, MMPs) jsou enzymy degradující proteiny extracelulární matrix (ECM), jako jsou kolageny, elastiny nebo lamininy. Následné úpravy v uspořádání ECM mohou vést ke změnám v komunikaci sousedících buněk nebo buněk s ECM, což také hraje roli v buněčné proliferaci a diferenciaci (Mancini a A Di Battista, 2006).

Vliv na změny ve struktuře buňky má také exprese SRGs kódujících součásti buněčného cytoskeletu. Významným cílem AP-1 je např. gen kódující protein vimentin, který patří do skupiny intermediárních filament a hraje významnou roli v embryonálním vývoji (Wu *et al.*, 2007).

Některé z těchto proteinů mohou být řazeny také mezi produkty genů primární odpovědi, konkrétně mezi late response genes. Geny některých SRGs, jako jsou např. MMPs či cykliny (Albanese *et al.*, 1995), obsahují ve svém promotoru nejen vazebné místo pro transkripční faktory vzniklé přepisem PRGs, ale i vazebné místo pro pre-existující transkripční faktory, jako je např. Elk-1 (viz. kap. 4. a obr. 9.).



Obrázek 9: Regulační sekvence genu pro MMP-9, jednu z MMPs. Na GC-box (-558) se může vázat pre-existující transkripční faktor Sp1, stejně jako EGR1, produkt IEG. PEA3 (-540) slouží jako vazebné místo pro Ets-rodinu, tedy pre-existující TFs (převzato z: Mancini a A Di Battista, 2006).

## 5. Závěr

V této bakalářské práci byly popsány některé děje, které probíhají v buňce od okamžiku přijetí extracelulárního signálu až po konečnou odpověď buňky na tento signál. Konkrétně se práce zaměřila na signální dráhu ERK a její úlohu v regulaci transkripce genů primární odpovědi. Detailnější pohled pak byl věnován genům časné odpovědi, zejména genu *c-fos* a jeho proteinovému produktu v transkripčním komplexu AP-1.

Celá práce naznačila, jak neuvěřitelně komplikovaný mechanismus buněčné signální dráhy představují. Díky velkému množství rozmanitých signálních komponent si buňky mohou dovolit dokonalou, pozitivní i negativní, regulaci signalizace na různých úrovních. Tato regulace může probíhat integrací odlišných signálních drah a zapojením dalších komponent, různou dobou trvání signalizace, existencí řady izoform jednoho proteinu, tvorbou dimerů určující variabilitu transkripčních faktorů či specifickým rozpoznáváním cílových sekvencí jednotlivými transkripčními faktory. Další regulace pak probíhá na úrovni translace a posttranslačních modifikací.

Tak vysoký počet komponent jednotlivých drah však nese i určitou nevýhodu. Pokud z jakéhokoli důvodu nastane změna v některé části signální dráhy, a tím dojde buď ke konstitutivní aktivaci dráhy nebo naopak k zastavení přenosu signálu, může to mít pro organismus závažné následky. V prvním případě se může jednat o vznik nádorového bujení, ve druhém případě o různé vývojové vady.

Signální dráha ERK je intenzivně studována na všech jejích úrovních, v každé z nich se však jistě najde oblast, která by zasloužila intenzivnější pozornost.

## 6. Seznam použité literatury

- Albanese, C., Johnson, J., Watanabe, G., Eklund, N., Vu, D., Arnold, A., and Pestell, R.G. (1995). Transforming p21ras Mutants and c-Ets-2 Activate the Cyclin D1 Promoter through Distinguishable Regions. *J. Biol. Chem.* 270, 23589–23597.
- Alberts, B. (2002). *Molecular biology of the cell.* (New York, NY : Garland Science, [2002]).\*\*
- Ana Cuenda, José M. Lizcano, and José Lozano (2017). Editorial: Mitogen Activated Protein Kinases. *Front. Cell Dev. Biol.* Vol 5 2017.\*
- Anjum, R., and Blenis, J. (2008). The RSK family of kinases: emerging roles in cellular signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 747–758.\*
- Bahrami, S., and Drabløs, F. (2016). Gene regulation in the immediate-early response process. *Adv. Biol. Regul.* 62, 37–49.\*
- Bergman, M.R., Cheng, S., Honbo, N., Piacentini, L., Karliner, J.S., and Lovett, D.H. (2003). A functional activating protein 1 (AP-1) site regulates matrix metalloproteinase 2 (MMP-2) transcription by cardiac cells through interactions with JunB-Fra1 and JunB-FosB heterodimers. *Biochem. J.* 369, 485–496.
- Besnard, A., Galan-Rodriguez, B., Vanhoutte, P., and Caboche, J. (2011). Elk-1 a transcription factor with multiple facets in the brain. *Front. Neurosci.* 5, 35–35.\*
- Biondi, R.M., and Nebreda, A.R. (2003). Signalling specificity of Ser/Thr protein kinases through docking-site-mediated interactions. *Biochem. J.* 372, 1–13.\*
- Black, A.R., Jensen, D., Lin, S.Y., and Azizkhan, J.C. (1999). Growth/cell cycle regulation of Sp1 phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 274, 1207–1215.
- Buchwalter, G., Gross, C., and Wasylyk, B. (2004). Ets ternary complex transcription factors. *Gene* 324, 1–14.\*
- Chinenov, Y., and Kerppola, T.K. (2001). Close encounters of many kinds: Fos-Jun interactions that mediate transcription regulatory specificity. *Oncogene* 20, 2438.\*
- Chu, S. (2012). Transcriptional regulation by post-transcriptional modification--role of phosphorylation in Sp1 transcriptional activity. *Gene* 508, 1–8.\*
- Clapier, C.R., and Cairns, B.R. (2009). The biology of chromatin remodeling complexes. *Annu. Rev. Biochem.* 78, 273–304.\*
- Coqueret, O. (2002). Linking cyclins to transcriptional control. *Gene* 299, 35–55.\*
- Crick, F. (1958). On Protein Synthesis. *The Symposia of the Society for Experimental Biology* 12. 138-163.
- Crick, F. (1970). Central dogma of molecular biology. *Nature* 227, 561.
- Crump, N.T., Hazzalin, C.A., Bowers, E.M., Alani, R.M., Cole, P.A., and Mahadevan, L.C. (2011). Dynamic acetylation of all lysine-4 trimethylated histone H3 is evolutionarily conserved and mediated by p300/CBP. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 7814–7819.

- Davis RJ. (2000). Signal Transduction by the JNK Group of MAP Kinases. *Cell* 103, 239–252.\*
- Demir, O., Onder, Z., Turkel, N., Kurnaz, I.A., Sharrocks, A.D., Aysit, N., and Ozturk, G. (2011). ETS-domain transcription factor Elk-1 mediates neuronal survival: SMN as a potential target. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* 1812, 652–662.
- Dhanasekaran N., Reddy E. (1998). Signaling by dual specificity kinases. *Oncogene* 17, 1447.\*
- Dumont, J.E., Pécasse, F., and Maenhaut, C. (2001). Crosstalk and specificity in signalling. Are we crosstalking ourselves into general confusion? *Cell. Signal.* 13, 457–463.\*
- Feldman, M.E., and Yarden, Y. (2014). Steering tumor progression through the transcriptional response to growth factors and stroma. *FEBS Lett.* 588, 2407–2414.\*
- Gill, G. (2001). Regulation of the initiation of eukaryotic transcription. *Essays Biochem.* 37, 33–43.\*
- Glading, A., Bodnar, R.J., Reynolds, I.J., Shiraha, H., Satish, L., Potter, D.A., Blair, H.C., and Wells, A. (2004). Epidermal Growth Factor Activates m-Calpain (Calpain II), at Least in Part, by Extracellular Signal-Regulated Kinase-Mediated Phosphorylation. *Mol. Cell. Biol.* 24, 2499–2512.
- Gough DJ, Koetz L, Levy DE. (2013). The MEK-ERK Pathway Is Necessary for Serine Phosphorylation of Mitochondrial STAT3 and Ras-Mediated Transformation. *PLoS One* 8(11), e83395.
- Guo, L., Eviatar-Ribak, T., and Miskimins, R. (2010). Sp1 phosphorylation is involved in myelin basic protein gene transcription. *J. Neurosci. Res.* 88, 3233–3242.
- Gupta, P., and Prywes, R. (2002). ATF1 phosphorylation by the ERK MAPK pathway is required for epidermal growth factor-induced c-jun expression. *J. Biol. Chem.* 277, 50550–50556.
- Hanafusa, H., Torii, S., Yasunaga, T., and Nishida, E. (2002). Sprouty1 and Sprouty2 provide a control mechanism for the Ras/MAPK signalling pathway. *Nat. Cell Biol.* 4, 850–858.
- Hancock, J.T. (1997). *Cell Signalling*. (B.m.: Longman. Pearson Education).\*\*
- Herschman, H.R. (1991). Primary Response Genes Induced by Growth Factors and Tumor Promoters. *Annu. Rev. Biochem.* 60, 281–319.\*
- Hollenhorst, P.C., McIntosh, L.P., and Graves, B.J. (2011). Genomic and Biochemical Insights into the Specificity of ETS Transcription Factors. *Annu. Rev. Biochem.* 80, 437–471.\*
- Jacobs, D., Glossip, D., Xing, H., Muslin, A.J., and Kornfeld, K. (1999). Multiple docking sites on substrate proteins form a modular system that mediates recognition by ERK MAP kinase. *Genes Dev.* 13, 163–175.
- Jafari, M., Ansari-Pour, N., Azimzadeh, S., and Mirzaie, M. (2017). A logic-based dynamic modeling approach to explicate the evolution of the central dogma of molecular biology. *PLoS ONE* 12.
- Kappelmann, M., Bosserhoff, A., and Kuphal, S. (2014). AP-1/c-Jun transcription factors: Regulation and function in malignant melanoma. *Spec. Issue Melanoma Res.* 93, 76–81.\*
- Kiu, H., and Nicholson, S.E. (2012). Biology and significance of the JAK/STAT signalling pathways. *Growth Factors.* 30, 88–106.\*

- Kolch, W. (2000). Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. *Biochem. J.* 351 Pt 2, 289–305.\*
- Krasilnikov M, Ivanov VN, Dong J, Ronai Z. (2003). ERK and PI3K negatively regulate STAT-transcriptional activities in human melanoma cells: implications towards sensitization to apoptosis. *Oncogene* 22(26), 4092-101.
- Li, Q.-J., Yang, S.-H., Maeda, Y., Sladek, F.M., Sharrocks, A.D., and Martins-Green, M. (2003). MAP kinase phosphorylation-dependent activation of Elk-1 leads to activation of the co-activator p300. *EMBO J.* 22, 281–291.
- Lim, J., Yusoff, P., Wong, E.S.M., Chandramouli, S., Lao, D.-H., Fong, C.W., and Guy, G.R. (2002). The cysteine-rich sprouty translocation domain targets mitogen-activated protein kinase inhibitory proteins to phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in plasma membranes. *Mol. Cell. Biol.* 22, 7953–7966.
- Limin, M., and John Q., W. (2003). Metabotropic glutamate receptor 5-regulated Elk-1 phosphorylation and immediate early gene expression in striatal neurons. *J. Neurochem.* 1006.
- Lodish, H.F. (2000). *Molecular cell biology.* (New York : W.H. Freeman and Company, c2000).\*\*
- Mancini, A., and A Di Battista, J. (2006). Transcriptional regulation of matrix metalloprotease gene expression in health and disease. *Front Biosci.* 11, 423-46\*
- Martinato, F., Cesaroni, M., Amati, B., and Guccione, E. (2008). Analysis of Myc-Induced Histone Modifications on Target Chromatin. *PLoS ONE* 3, e3650.
- Mo, Y., Vaessen, B., Johnston, K., and Marmorstein, R. (2000). Structure of the elk-1-DNA complex reveals how DNA-distal residues affect ETS domain recognition of DNA. *Nat. Struct. Biol.* 7, 292–297.
- Murphy, L.O., and Blenis, J. (2006). MAPK signal specificity: the right place at the right time. *Trends Biochem. Sci.* 31, 268–275.\*
- Murphy, L.O., Smith, S., Chen, R.-H., Fingar, D.C., and Blenis, J. (2002). Molecular interpretation of ERK signal duration by immediate early gene products. *Nat. Cell Biol.* 4, 556–564.
- Mylona, A., Theillet, F.-X., Foster, C., Cheng, T.M., Miralles, F., Bates, P.A., Selenko, P., and Treisman, R. (2016). Opposing effects of Elk-1 multisite phosphorylation shape its response to ERK activation. *Science* 354, 233–237.
- Nagashima, T., Inoue, N., Yumoto, N., Saeki, Y., Magi, S., Volinsky, N., Sorkin, A., Kholodenko, B.N., and Okada-Hatakeyama, M. (2015). Feedforward regulation of mRNA stability by prolonged extracellular signal-regulated kinase activity. *FEBS J.* 282, 613–629.
- Nissen, L.J., Gelly, J.C., and Hipskind, R.A. (2001). Induction-independent recruitment of CREB-binding protein to the c-fos serum response element through interactions between the bromodomain and Elk-1. *J. Biol. Chem.* 276, 5213–5221.
- O'Donnell, A., Yang, S.-H., and Sharrocks, A.D. (2008). MAP Kinase-Mediated c-fos Regulation Relies on a Histone Acetylation Relay Switch. *Mol. Cell* 29, 780–785.

- O'Donnell, A., Odrowaz, Z., and Sharrocks, A.D. (2012). Immediate-early gene activation by the MAPK pathways: what do and don't we know? *Biochem. Soc. Trans.* *40*, 58–66.\*
- Patterson, K.I., Brummer, T., O'Brien, P.M., and Daly, R.J. (2009). Dual-specificity phosphatases: critical regulators with diverse cellular targets. *Biochem. J.* *418*, 475.\*
- Proud, C.G. (2015). Mnks, eIF4E phosphorylation and cancer. *BBA-Genes Regul. Mech.* *1849*, 766–773.\*
- Rawlings, J.S., Rosler, K.M., and Harrison, D.A. (2004). The JAK/STAT signaling pathway. *J. Cell Sci.* *117*, 1281–1283.\*
- Reich, A., Sapir, A., and Shilo, B.-Z. (1999). Sprouty is a general inhibitor of receptor tyrosine kinase signaling. *Development* *126*, 4139–4147.
- Rembold, M., Ciglar, L., Yáñez-Cuna, J.O., Zinzen, R.P., Girardot, C., Jain, A., Welte, M.A., Stark, A., Lepatin, M., and Furlong, E.E. (2014). A conserved role for Snail as a potentiator of active transcription. *Genes Dev.* *28*, 167–181.
- Roux, P.P., and Blenis, J. (2004). ERK and p38 MAPK-Activated Protein Kinases: a Family of Protein Kinases with Diverse Biological Functions. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* *68*, 320–344.\*
- Sabapathy, K., Hochedlinger, K., Nam, S.Y., Bauer, A., Karin, M., and Wagner, E.F. (2004). Distinct Roles for JNK1 and JNK2 in Regulating JNK Activity and c-Jun-Dependent Cell Proliferation. *Mol. Cell* *15*, 713–725.
- Selvaraj, N., Kedage, V., and Hollenhorst, P.C. (2015). Comparison of MAPK specificity across the ETS transcription factor family identifies a high-affinity ERK interaction required for ERG function in prostate cells. *Cell Commun. Signal. CCS* *13*, 12.
- Shaulian, E. (2010). AP-1 - The Jun proteins: Oncogenes or tumor suppressors in disguise? *Cell. Signal.* *22*, 894–899.\*
- Sheridan, D.L., Kong, Y., Parker, S.A., Dalby, K.N., and Turk, B.E. (2008). Substrate Discrimination among Mitogen-activated Protein Kinases through Distinct Docking Sequence Motifs. *J. Biol. Chem.* *283*, 19511–19520.
- Silverman, E.S., and Collins, T. (1999). Pathways of Egr-1-Mediated Gene Transcription in Vascular Biology. *Am. J. Pathol.* *154*, 665–670.\*
- Silverman, E.S., Du, J., Williams, A.J., Wadgaonkar, R., Drazen, J.M., and Collins, T. (1998). cAMP-response-element-binding-protein-binding protein (CBP) and p300 are transcriptional co-activators of early growth response factor-1 (Egr-1). *Biochem. J.* *336*, 183–189.
- Tulchinsky, E. (2000). Fos family members: regulation, structure and role in oncogenic transformation. *Histol. Histopathol.* *15*, 921–928.\*
- Tullai, J.W., Mullenbrock, S., Sholder, G., Cooper, G.M., Schaffer, M.E., and Kasif, S. (2007). Immediate-early and delayed primary response genes are distinct in function and genomic architecture. *J. Biol. Chem.* *282*, 23981–23995.

- Uhlig, F., Sieber, A., Wyler, E., Fritsche-Guenther, R., Meisig, J., Landthaler, M., Klinger, B., and Blüthgen, N. (2017). An immediate-late gene expression module decodes ERK signal duration. *Mol. Syst. Biol.* *13*, 928.
- Vizcaíno, C., Mansilla, S., and Portugal, J. (2015). Sp1 transcription factor: A long-standing target in cancer chemotherapy. *Pharmacol. Ther.* *152*, 111–124.\*
- Wang, G., Balamotis, M.A., Stevens, J.L., Berk, A.J., Yamaguchi, Y., and Handa, H. (2005). Mediator requirement for both recruitment and postrecruitment steps in transcription initiation. *Mol. Cell* *17*, 683–694.
- Wang, Z., Ge, L., Wang, M., and Carr, B.I. (2006). Phosphorylation regulates Myc expression via prolonged activation of the mitogen-activated protein kinase pathway. *J. Cell. Physiol.* *208*, 133–140.
- Weake, V.M., and Workman, J.L. (2010). Inducible gene expression: diverse regulatory mechanisms. *Nat. Rev. Genet.* *11*, 426–437.\*
- Wen Z, Zhong Z, Darnell JE Jr. (1995). Maximal activation of transcription by Stat1 and Stat3 requires both tyrosine and serine phosphorylation. *Cell.* *82*(2), 241-50.
- Weng, G, Bhalla, S., and Iyengar, R. (1999). Complexity in Biological Signaling Systems. *Science* (New York, N.Y.). *284*, 92-96.\*
- Wortzel, I., and Seger, R. (2011). The ERK Cascade: Distinct Functions within Various Subcellular Organelles. *Genes Cancer* *2*, 195–209.\*
- Wu, Y., Zhang, X., Salmon, M., Lin, X., and Zehner, Z.E. (2007). TGFβ1 regulation of vimentin gene expression during differentiation of the C2C12 skeletal myogenic cell line requires Smads, AP-1 and Sp1 family members. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* *1773*, 427–439.
- Yang, S.H., Shore, P., Willingham, N., Lakey, J.H., and Sharrocks, A.D. (1999). The mechanism of phosphorylation-inducible activation of the ETS-domain transcription factor Elk-1. *EMBO J.* *18*, 5666–5674.
- Yang, S.-H., Sharrocks, A.D., and Whitmarsh, A.J. (2013). MAP kinase signalling cascades and transcriptional regulation. *Gene* *513*, 1–13.\*
- Yang, S.-H., Sharrocks, A.D., Jaffray, E., and Hay, R.T. (2003). Dynamic interplay of the SUMO and ERK pathways in regulating Elk-1 transcriptional activity. *Mol. Cell* *12*, 63–74.
- Yoon, S., and Seger, R. (2006). The extracellular signal-regulated kinase: multiple substrates regulate diverse cellular functions. *Growth Factors* *24*, 21–44.\*

\* označeny review

\*\* označeny knihy nebo učebnice