

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
Přírodovědecká fakulta

Katedra buněčné biologie



Mechanismy invazivity a transkripční regulace nádorových buněk

Disertační práce

Mgr. Ondřej Tolde

školitel: Doc. RNDr. Petr Folk, CSc.

školitel konzultant: RNDr. Jan Brábek, Ph.D.
RNDr. Daniel Rösel, Ph.D.

2011

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracoval samostatně, na základě studia citované literatury a konzultací se svým školitelem. Tato práce ani její část nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu.

V Praze, leden 2011

Ondřej Tolde

Chtěl bych poděkovat svým školitelům Doc. RNDr. Petru Folkovi, CSc., RNDr. Janu Brábkovi, Ph.D. a RNDr. Danielu Röselovi, Ph.D. za odborné vedení mé práce.

Práce vznikla díky podpoře grantů Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy České republiky (MSM0021620858 a LC06061) a Grantové agentury České republiky (301/06/1147 a 202/08/0590).

Obsah

1	Abstrakt.....	5
2	Summary	6
3	Úvod.....	7
4	Literární přehled.....	9
4.1	Příčiny vzniku nádorového onemocnění.....	9
4.2	Molekulární příčiny a mechanismy nádorové invazivity.....	11
4.2.1	Metastatická kaskáda	12
4.2.2	Epiteliálně-mezenchymální přechod.....	12
4.2.3	Mezibuněčné spoje epiteliálních buněk	14
4.2.4	Interakce buněk s mezibuněčnou hmotou.....	18
4.2.5	Úloha aktinu a myosinu v buněčné migraci.....	24
4.2.6	Role proteolytických enzymů v remodelaci mezibuněčné hmoty	27
4.3	Mechanismy invazivity nádorových buněk mezibuněčnou hmotou.....	30
4.3.1	Mezibuněčná hmota	30
4.3.2	Invazivní struktury	31
4.3.3	Způsoby buněčné migrace	35
4.4	Elongační fáze transkripce řízená RNA polymerázou II během stresu	40
4.4.1	Role transkripčního faktoru P-TEFb v elongační fázi transkripce ...	40
4.4.2	Protein p53	42
4.4.3	Transkripce genů při genotoxickém stresu	43
4.4.4	Protein SNW1	45
5	Hlavní cíle práce	48
6	Diskuse výsledků	49
7	Seznam zkratk, proteinů a proteinových domén	59
7.1.	Seznam zkratk	59
7.2.	Proteinové domény	59
7.3.	Seznam proteinů.....	60
8	Použitá literatura	63
9	Přílohy.....	79

1 Abstrakt

Nádorové onemocnění má svůj původ v normálních tělních buňkách, které se vymknou kontrole mateřského organismu. Nádorové buňky se pak mohou uvolnit z místa svého vzniku a šířit se po organismu. Pro průchod mezibuněčnou hmotou nebo vrstvou jiných buněk mohou tyto buňky využít mechanismy, které vedou k efektivnější migraci a invazivitě. Výzkum mechanismů, které nádorové buňky využívají pro migraci, má význam pro pochopení vzniku a šíření metastáz a následně pro protinádorovou léčbu. V rámci mé disertační práce jsem se podílel na výzkumu vlastností invazivních nádorových buněk. Porovnávali jsme vlastnosti neinvazivní sarkomové buněčné linie a z ní odvozené, vysoce metastatické linie. Ukázali jsme, že buňky invazivní linie využívají améboidní způsob migrace a vykazují zvýšenou aktivitu Rho/ROCK signalizace. Na vedoucím okraji mají tyto buňky nabohacený aktin a myosin a dochází zde ke generování síly. Buňky neinvazivní linie využívají mezenchymální způsob migrace a generují sílu převážně na zatahujícím se konci. Dále jsme porovnávali buňky dvou linií odvozených od prsního karcinomu. Ukázali jsme, že invazivnější linie, odvozená od méně invazivní, vykazuje větší dynamičnost v přestavbě aktinového skeletu. Rovněž jsme u těchto linií popsali přítomnost invadopodií v místech, kde dochází k degradaci mezibuněčné hmoty. Zavedli jsme užití bezbuněčné dermis pro studium invazivních struktur nádorových buněk v třírozměrném prostředí a následně jsme provedli detailní popis invazivních struktur a jejich prostorového uspořádání.

Výzkum mechanismů buněčných regulací, které mají uplatnění v nádorové biologii, zahrnuje v naší laboratoři i studium jaderných proteinů SNW. Proteiny SNW se účastní regulace transkripce a sestřihu. Ukázali jsme, že snížení množství proteinu SNW1 pomocí siRNA neovlivní akumulaci proteinu p53 během genotoxického stresu. Dále jsme ukázali, že snížení hladiny SNW1 nevede ke změně v produkci sledovaných genů, které jsou pod kontrolou proteinu p53. Naše výsledky tak naznačují, že protein SNW1 není nezbytný pro přepis/sestřih určitých stresem indukovaných genů.

2 Summary

Cancer originates in cells that overcome the control mechanisms of the organism. Cancer cells can be eventually released from the site of origin and spread through tissues. Cancer cells can acquire certain mechanisms that enable them to more effectively invade surrounding tissue or layers of other cells. The research on the migration of cancer cells is important for the understanding of the origin and spreading of metastases and consequently for anticancer therapy. In my Ph.D. work, I participated in the research of the properties of invasive metastatic cells. We compared non-invasive rat sarcoma cell line with a highly metastatic cell line derived from it. We showed that cells of the invasive cell line use amoeboid mode of migration, have upregulated Rho/ROCK signaling, and have accumulated actin and myosin at the leading edge. It is at the leading edge where the cells generate their traction forces. Cells of non-invasive cell line use mesenchymal mode of migration and generate forces mainly at their retracting end. We also compared two breast cancer cell lines derived from a single carcinoma. We showed that the more invasive cell line, derived from its parental line by neoplastic transformation, displayed elevated cytoskeletal dynamics. Moreover, we showed the presence of invadopodia at the sites of extracellular matrix degradation. We introduced the usage of acellular dermis for the study of invasive structures of cancer cells and described the morphology of these structures in complex three dimensional environment.

In our laboratory, the research of the mechanisms of cellular regulations involved in cancer biology concerns also the study of SNW proteins that act in regulation of transcription and splicing. We showed that stress induced accumulation of p53 is resistant to SNW1 downregulation by siRNA. We also showed that p53 response genes are induced independently of SNW1 depletion. Our results indicate that SNW1 is dispensable for the transcription and splicing of certain stress induced genes.

3 Úvod

Nádorová biologie zahrnuje širokou škálu buněčných dějů. Vznik nádoru je způsoben akumulací genetických změn v buňkách, které vedou ke změně regulace buněčného cyklu, růstu a apoptózy. Ztrátou mezibuněčných adhezí vedoucích ke změnám architektury tkáně a remodelací mezibuněčné hmoty mohou nádorové buňky získat mobilní charakter. Překonáním tkáňových bariér, jako jsou bazální membrány a stěny cév, se nádorové buňky mohou rozšířit po celém těle a umožnit vznik metastáz. Metastáze jsou nejnebezpečnější forma nádorového onemocnění. Výzkum zaměřený na migrační a invazivní vlastnosti nádorových buněk je tak stejně významný, jako výzkum zabývající se vznikem a růstem nádoru. Během svého doktorského studia jsem pracoval současně na dvou projektech. V prvním projektu jsem se podílel na charakterizaci invazivity nádorových buněk. Ve druhém projektu jsem se zabýval studiem vlivu jaderného proteinu SNW1 na transkripci vybraných genů během genotoxického stresu. Obě tyto tématicky jsou předmětem výzkumu v naší laboratoři. Literární přehled jsem proto rozdělil na část věnovanou nádorové invazivitě (kapitola 4.2 a 4.3) a na část věnovanou regulaci genové exprese během stresu (kapitola 4.4).

Studium invazivity nádorových buněk se zaměřuje na ty procesy, které buňky využívají k migraci z místa svého vzniku. Růst metastáz v organismu je ve většině případů život ohrožující. Aby ke vzniku metastáz mohlo dojít, musí nádorové buňky projít sérií změn, které jim šíření po těle umožní. Pro úspěšné šíření po těle se buňky musí uvolnit ze svého místa v tkáni, přerušit četné mezibuněčné kontakty a adheze na mezibuněčnou hmotu. Pohybující se buňky si rovněž musí osvojit mechanismy, které jim umožní proniknout okolní mezibuněčnou hmotou a dostat se přes bazální membrány, nebo stěny cév. Pro průchod mezibuněčnou hmotou většina invazivních nádorových buněk využívá činnosti sekretovaných proteáz. Bylo publikováno několik studií, které ukazují, že některé nádorové buňky štěpení mezibuněčné hmoty nevyužívají (Wolf et al., 2003; Wyckoff et al., 2006). Buňky linií studovaných v těchto pracech využívají pro pohyb skrz mezibuněčnou hmotu améboidního pohybu a jsou schopny působit silou a deformovat mezibuněčnou hmotu ve svém okolí.

Proteiny SNW jsou přítomné ve všech eukaryotech a jsou pro organismus nezbytné. Intenzivně byly proteiny SNW zkoumány v *Saccharomyces cerevisiae* (Prp45p) a v lidských buňkách (SNW1). Bylo zjištěno, že se tyto proteiny účastní klíčových jaderných procesů, regulace transkripce, sestřihu, regulace buněčného cyklu a některých vývojových dějů (shrnuto ve (Folk et al., 2004)). V roce 2005 byla uveřejněna práce, která ukázala, že lidský protein SNW1 asociuje s pozitivním elongačním faktorem P-TEFb a podílí se na regulaci elongace a alternativního sestřihu genů viru HIV-1 (Bres et al., 2005). Během genotoxického stresu dochází k aktivaci faktoru p53 a následně k přepisu stresových genů. Použitím specifických inhibitorů lze rozlišit geny, které jsou závislé na činnosti elongačního faktoru P-TEFb (*14-3-3σ*), nebo jsou na P-TEFb nezávislé (*p21*) (Gomes et al., 2006). Zajímalo nás, jaký bude mít vliv potlačení exprese proteinu SNW1 na přepis těchto genů za podmínek genotoxického stresu.

V následujícím textu se budu zabývat podrobnějším popisem těchto procesů. V textu se odkazuji na větší množství proteinů a proteinových domén, jejichž plné názvy jsem uvedl v sekci Seznam zkratek (kapitola 7). Pro přehlednost jsem kromě celého názvu uvedl i přístupový kód do uvedené databáze pro snazší hledání dalších informací. Pokud není uvedeno jinak, vztahují se názvy k lidským proteinům. Rovněž další údaje v textu, jako například číslo aminokyseliny podléhající posttranskripční úpravě nebo délka sekvence, se vztahují k lidským údajům.

4 Literární přehled

4.1 Příčiny vzniku nádorového onemocnění

Nádorové onemocnění má svůj původ v normálních tělních buňkách, které se vymknuly kontrole mateřského organismu a nezávisle se dělí a případně i šíří po těle. Za fyziologické situace všechny tělní buňky podléhají přísné kontrole růstu, dělení a diferenciaci. Jde o zachování rovnováhy mezi buněčným růstem, dělením a apoptózou. Dále jde o udržování buněk v diferencovaném stavu pro uchování integrity tkání a o schopnost organismu spustit ochranné, nebo opravné mechanismy za stresových situací (Hahn, 2004). V nádorových buňkách dochází k narušení či pozměnění některých kontrolních mechanismů a vzniklá nerovnováha může způsobit nekontrolované buněčné dělení a případně i šíření buněk po organismu. Ve vznikajících nádorech je běžným jevem genetická nestabilita a heterogenita a dochází k selekci buněk, které uniknou kontrolním mechanismům. Nádorové onemocnění je tak příkladem klonální evoluce uvnitř těla organismu (Merlo et al., 2006).

Změny, které se v buňce musí nahromadit, aby vznikl život ohrožující nádor, lze rozdělit do šesti hlavních kategorií (dle Hanahan and Weinberg, 2000, „The Hallmarks of Cancer“):

Soběstačnost na růstových faktorech

Běžné buňky se nemohou začít dělit, dokud nedostanou podnět od mitogéních růstových faktorů. Mnoho onkogenů působí tak, že napodobuje vliv růstových faktorů. Může jít například o nadprodukcii příslušných receptorů a následnou signalizaci nezávislou na ligandu, buňky mohou změnit typ receptorů růstových faktorů a upřednostnit ty, které přenáší pro-růstové signály, může dojít k produkci růstových faktorů samotnými nádorovými buňkami a nebo, což je častý případ, je pozměněna některá komponenta signalizace vedoucí od receptorů.

Odolnost vůči signálům potlačujícím růst

Uvnitř tkáně se vyskytuje více druhů faktorů potlačujících růst a dělení, jde o rozpustné faktory, o molekuly přítomné ve složkách mezibuněčné hmoty, nebo o

mezibuněčné kontakty. Signály zprostředkované těmito faktory směřují k udržení buněk v G0/G1 fázi a brání vstupu do S fáze.

Resistence k apoptóze

Apoptotický program je v latentní formě přítomen ve všech tělních buňkách. Aktivace apoptózy vede k sérii přesně řízených kroků, kdy dojde k rozpadu membrán, buněčného skeletu, fragmentaci jádra a degradaci chromozómů.

Potenciál nekonečného počtu dělení

Běžné buňky mají potenciál přibližně 60-70 buněčných dělení. Příčinou je ztráta koncových 50-100 párů bází během každé replikace. Obnovování telomerické DNA je nezbytné pro imortalizaci buněk, tj. potenciál nekonečného počtu dělení. U 85-90% nádorů je toho dosaženo zvýšenou produkcí enzymu telomeráza (Bryan and Cech, 1999).

Podpora tvorby cév

Přísun kyslíku a živin je pro život buněk nezbytný a buňky v tkáních se nenacházejí od cév dále než asi 100 μm . Růst nových cév, angiogeneze, je proces běžný při vývoji a opravě tkáně. Rostoucí nádory si často vytváří vlastní cévní řečiště napojené na tělní oběh.

Invazivita a tvorba metastáz

Buňky uvolňující se z místa vzniku původního nádoru mohou získat mechanismy, které jim umožní úspěšný průchod mezibuněčnou hmotou, nebo vrstvou jiných buněk. Následně dojde k šíření nádorových buněk po těle.

4.2 Molekulární příčiny a mechanismy nádorové invazivity

Migrace nádorových buněk po těle a vznik metastáz je komplexní proces, který se dá rozdělit do několika hlavních kroků: oddělení buněk z místa vzniku primárního nádoru, invaze skrz okolní mezibuněčnou hmotu a přes bazální membrány, vstup do oběhového systému (intravazace) a zachycení se na jiném místě. To je obvykle (ale ne nezbytně) následováno výstupem z oběhového systému do okolní tkáně (extravazace) a následnou proliferací. Po celou dobu musí buňky unikat smrti apoptózou a imunitnímu systému. Nejčastěji používaným modelem *in vivo* pro hledání genů odpovědných za zvýšený metastatický potenciál je injekce buněk do břišního peritonea imunodeficientních myší a následná analýza plicních metastáz (McSherry et al., 2007). Na základě porovnání různých expresních studií se usuzuje, že pro vznik metastáz nestačí pouze změna v nádorové buňce, ale je podstatná i změna ve vzájemné interakci s okolním prostředím. Tomu nasvědčují i rozdíly v expresi velkého množství genů účastnících se remodelace a interakce s mezibuněčnou hmotou. Jde o tzv. „seed-and-soil“ hypotézu, tj. nejen metastatický potenciál, ale i vhodné prostředí jsou nezbytné pro vznik metastáz (Fidler, 2003; McSherry et al., 2007).

Migrace nádorových buněk je podobná migraci normálních buněk, nicméně určité faktory jí mohou učinit více efektivní. Zatímco pro- a anti- migratorní signály jsou u tělních buněk pod přísnou kontrolou, mnohé experimenty naznačují, že u nádorových buněk převažují pro-migratorní signály, jako je zvýšená exprese receptorů pro růstové faktory (McSherry et al., 2007). Příkladem může být nadprodukce Her2 z rodiny receptorů EGF u prsního nádoru (Slamon et al., 1989). Poznatky o Her2 vedly k vyvinutí léčiva Herceptin (Pegram et al., 1998)*. Dalším příkladem může být zvýšená produkce HGF/SF (hepatocyte growth factor/scatter factor) u prsních nádorů (Elliott et al., 2002). HGF/SF je silný modulátor epiteliálně-mezenchymálního přechodu (EMT) epiteliálních buněk, stimulace buněk HGF vede k aktivaci GTPázy Rho, Cdc42 a Rac, rovněž dochází k formování filopodií a lamelipodií (Royal et al., 2000).

* Herceptin (Trastuzumab) je primární protilátka, původně myší, později lidská, která se váže specificky na protein Her2. Takto blokováný Her2 již nezpůsobuje nekontrolované dělení buněk, nicméně u nádorů často dochází k vytvoření rezistence na herceptin (Kute et al., 2004).

4.2.1 Metastatická kaskáda

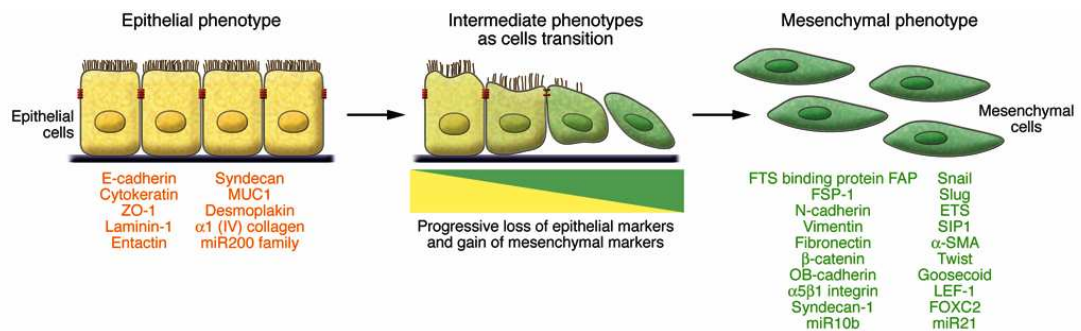
Metastáze jsou nejnebezpečnější formou nádorového onemocnění. Řádově může jít až o roky, kdy se z primárního nádoru v těle vytvoří nádory sekundární. Mechanismus jejich vzniku popisuje tzv. metastatická kaskáda. Jde o sérii kroků, které vedou ke vzniku sekundárních metastáz (dle Geiger and Peeper, 2009). Buňky primárního nádoru (pokud jsou epiteliálního původu) podstoupí epiteliálně-mezenchymální přechod a získají invazivní vlastnosti. Dochází k degradaci bazální membrány a remodelaci mezibuněčné hmoty proteolytickými enzymy. Nádorové buňky invadují okolní tkáň, migrace je buď individuální, nebo kolektivní. Procesem zvaným intravazace se buňky dostávají do cév v blízkosti nádoru (často do cév, které se vytvořily uvnitř primárního nádoru) a poté se pohybují v oběhovém systému. Pokud dojde k jejich uchycení na stěnu kapilár, mohou opustit krevní řečiště (extravazace). Na novém místě mohou nádorové buňky zůstat dormantní i po několik let, nebo dojde k růstu sekundárních nádorů (tento proces vyžaduje další remodelaci mezibuněčné hmoty a angiogenezi). Každý krok zároveň představuje fyziologickou bariéru pro vznik a šíření nádoru. Překonání každé z těchto bariér může být zároveň bráno i jako soubor fenotypových adaptací nádorových buněk (Gatenby and Gillies, 2008).

4.2.2 Epiteliálně-mezenchymální přechod

Epiteliálně-mezenchymální přechod (EMT) je biologický proces, při kterém polarizovaná epiteliální buňka získá mezenchymální fenotyp spojený se zvýšenou schopností pohybu, invazivity, resistenci k apoptóze a zvýšenou produkcí komponent mezibuněčné hmoty (Kalluri and Weinberg, 2009; Kopfstein and Christofori, 2006). Epiteliální buňka tak podstupuje transdiferenciaci, kdy se z terminálně diferencovaného stavu „vrací“ na mezenchymální fenotyp. Obrázek 1 shrnuje základní charakteristiky tohoto procesu. Pro epiteliálně-mezenchymální přechod se využívá výraz tranzice (oproti neoplastické transformaci), protože jde o do určité míry o reverzibilní krok. Například během embryogeneze a vývoje orgánů určité epiteliální buňky podstupují proměnu jak epiteliálně-mezenchymální, tak zpět mezenchymálně-epiteliální (EMT a MET). Jde o různé procesy a přesuny buněk

během gastrulace, vývoje nervové lišty, remodelace tkání a vývoje orgánů (Acloque et al., 2009; Lee et al., 2006; Thiery et al., 2009). EMT je za fyziologických podmínek u dospělého jedince běžný například při hojení ran, odtud se pro nádorové onemocnění používá výraz „*Wounds that do not heal*“ (Dvorak, 1986). Během EMT dochází k progresivní redistribuci, nebo potlačení exprese či funkce proteinů specifických pro apikální a bazolaterální části buněk, nebo těsné a adhezivní spoje (například E-cadherinu) a dochází k obnovení produkce mezenchymálních molekul (například N-cadherinu a vimentinu) (Kopfstein and Christofori, 2006).

Spektrum signálů, které přispívají k EMT, je značně široké a do určité míry specifické pro každý druh nádoru. Rovněž záleží na původu a genetickém základu, který vedl k neoplastické transformaci příslušných buněk. U mnoha karcinomů (maligní nádory epiteliálního původu) pocházejí signály pro EMT z podpůrné vazivové tkáně (stroma) v okolí vznikajícího nádoru, konkrétně jde o růstové faktory HGF, EGF, PDGF a TGF- β . Tyto faktory se zdají být odpovědné za funkční aktivaci transkripčních faktorů, které indukují EMT, jako jsou Snai1, Snai2, ZEB1, ZEB2, Twist1, FOXC2 (Kalluri and Weinberg, 2009; Kokudo et al., 2008; Medici et al., 2008; Thiery et al., 2009).



Obr. 1. Epiteliálně-mezenchymální přechod. EMT zahrnuje tranzici polarizovaných epiteliálních buněk na mobilní buňky, které mohou produkovat složky mezibuněčné hmoty. Barevně jsou zvýrazněné molekuly, které jsou charakteristické pro epiteliální (oranžově) a pro mezenchymální buňky (zeleně). Současná exprese některých z těchto dvou sad molekul se vyskytuje v přechodném fenotypu (uprostřed). Přechodný fenotyp je charakteristický progresivní ztrátou epiteliálních a nárůstem mezenchymálních molekul (převzato z Kalluri and Weinberg, 2009, upraveno)

K epiteliálně-mezenchymálnímu přechodu může dojít v důsledku změny v regulaci určitých signálních drah. Jde především o dráhy Wnt, TGF- β , Hedgehog, Notch a NF κ B, které se podílejí na vývoji mnohobuněčných organismů. Epiteliálně-mezenchymální přechod je proces analogický de-diferenciaci, ke které v organismu dochází během vývojových dějů nebo během hojení ran.

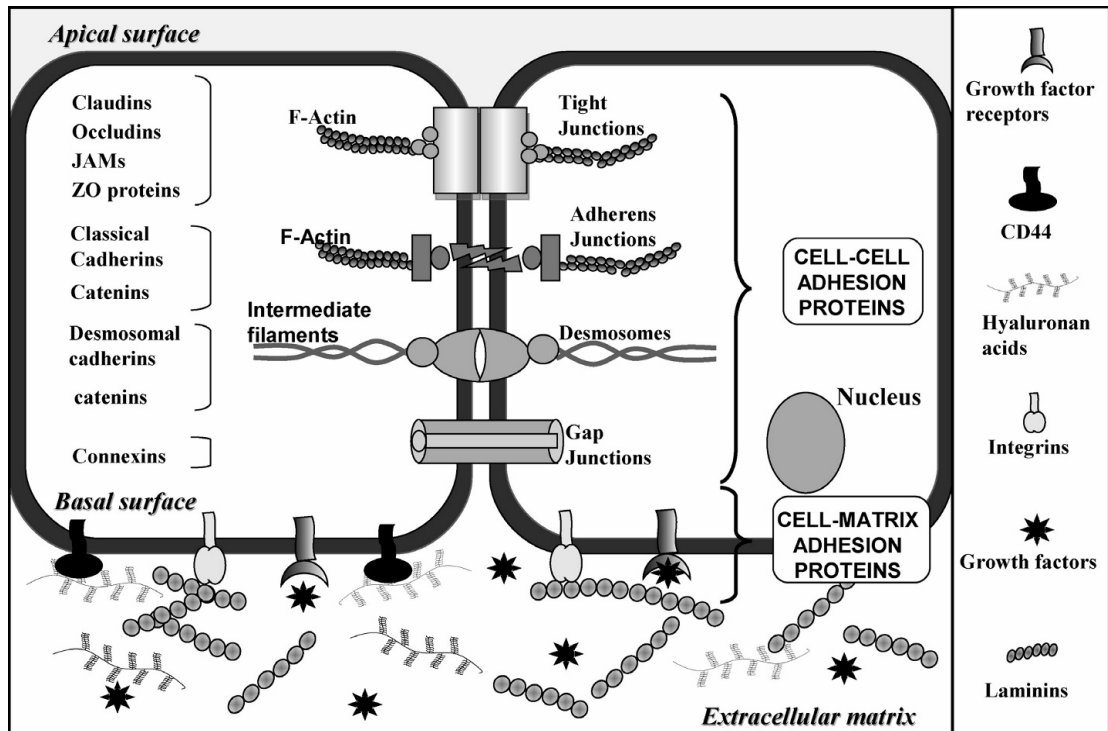
4.2.3 Mezibuněčné spoje epiteliálních buněk

Při epiteliálně mezenchymálním přechodu dochází k uvolnění mezibuněčných spojů, které jsou důležité pro udržení tkáňové integrity (viz obr. 2). U epiteliálních buněk se rozlišují tato spojení: těsné spoje, adhezivní spoje, desmozomy a vodivé spoje.

Těsné spoje jsou lokalizované těsně pod apikálním povrchem epiteliálních a endoteliálních buněk, udržují buněčnou polaritu a kontrolují průchod iontů, vody a dalších molekul mezi buňkami (Feldman et al., 2005). Při EMT dochází ke změně exprese některých proteinů, které jsou stavebními kameny těchto spojení. Proteiny, které tvoří těsné spoje, se rozdělují do dvou skupin: 1) integrální membránové proteiny, jako jsou claudiny (CLDN), occludin a proteiny JAM (junctional adhesion molecule) a 2) periferní membránové proteiny, jako jsou proteiny ZO (zonula occludens), MAGI-1, ASIP/PAR-3 a PAR-6 (proteiny PAR se označují jako „cell polarity molecules“) (Kawabe et al., 2001; Tokes et al., 2005).

Claudiny (CLDN) jsou rodina transmembránových proteinů, které tvoří páteř pro těsné spoje. U savců je známo 24 členů rodiny CLDN a jednotlivé proteiny mají tkáňově specifickou expresi. Extracelulární smyčky claudinů sousedních buněk spolu navzájem interagují a podílejí se na regulaci paracelulárního transportu mezi lumenálním a bazolaterálním prostorem (Lal-Nag and Morin, 2009). Bylo ukázáno, že CLDN-1 má na úrovni mRNA výrazně nižší expresi u prsního nádoru (Tokes et al., 2005). Claudiny rovněž interagují s proteiny ZO, tato interakce je významná, protože proteiny ZO se váží na aktin a propojují tak těsné spoje s aktinovým cytoskeletem (Findley and Koval, 2009). ZO jsou považovány za nádorové supresory (Tsukita et al., 1993), redukce exprese ZO-1 koreluje s dediferenciací a progresí prsního a kolorektálního karcinomu (Kaihara et al., 2003; Martin et al.,

2004). Chybná lokalizace, kdy se protein ZO-1 nenachází v těsných spojích, může rovněž vést ke zvýšené invazivitě (Polette et al., 2005). Ve zmíněné práci autoři dále ukázali, že se ZO-1 podílí na regulaci exprese proteázy MT1-MMP (prostřednictvím signální dráhy β -catenin/TCF/LEF) a tím může modulovat invazivní vlastnosti epiteliálních nádorových buněk.



Obr. 2. Nejvýznamnější molekuly mezibuněčných kontaktů a kontaktů buňka-mezibuněčná hmota u epiteliálních buněk. Schéma ukazuje nejvýznamnější složky (v levém sloupci) těsných spojů (tight junctions), adhezivních spojů (adherens junctions), desmozomů a vodivých spojů (gap junctions). V dolní části obrázku jsou zakresleny molekuly mezibuněčné hmoty a povrchové receptory těchto molekul (převzato z McSherry et al., 2007).

Adhezivní spoje jsou tvořeny převážně cadheriny a cateniny. Cadheriny jsou transmembránové proteiny, které svou extracelulární částí interagují s cadheriny sousedních buněk (většinou homofilně, tj. se stejnou molekulou). Cateniny jsou proteiny lokalizované pod buněčnou membránou, kde zprostředkovávají vazbu na buněčný skelet. Klasické cadheriny (tj. skupina I. zahrnující E-, N-, P-, R-cadheriny) obsahují pět extracelulárních (EC) domén. Správná konformace EC domén je závislá na přítomnosti vápenatých iontů (Hartsock and Nelson, 2008). Cytoplasmatická část váže proteiny, které regulují endocytózu cadherinů, signalizaci

uvnitř buňky, lokální kontrolu vazby a remodelaci aktinového cytoskeletu (Halbleib and Nelson, 2006). V cytoplasmatické části proteinu jsou dvě dobře definované domény: CBD (catenin binding domain) a JMD (juxtamembrane domain). Doména JMD je nezbytná pro shlukování cadherinů a vazbu p120 cateninu, doména CBD váže β -catenin. Vazba adhezivních spojů na cytoskelet je zprostředkována α -cateninem (Berx and van Roy, 2009).

Klíčová molekula organizace epitelu a obecně mezibuněčných spojů je protein **E-cadherin**. E-cadherin je považovaný za nádorový a invazivní supresor, protože udržuje buňky v diferencovaném stavu a brání v růstu a uvolnění se ze svého místa (McSherry et al., 2007). E-cadherin je rovněž považován za jednu z klíčových molekul epiteliálně-mezenchymálního přechodu. Ve většině epiteliálních nádorů je exprese E-cadherinu snížena, nejčastěji na úrovni transkripce, a souvislost mezi potlačením exprese E-cadherinu a EMT byla mnohokrát dokumentována (Kalluri and Weinberg, 2009). A naopak, pokud byla ektopicky exprimována cytoplasmatická část E-cadherinu (obsahující vazebné místo pro β -catenin) v buňkách, které již prodělaly EMT, docházelo u těchto buněk ke ztrátě mezenchymálního fenotypu, reorganizaci epiteliálních buněčných adhezí a potlačení proliferace (Eger et al., 2000). Tento experiment poukazuje na důležitost udržení β -cateninu v cytoplasmě u epiteliálních buněk. Pokud se β -catenin hromadí v jádře (k tomu dochází právě v důsledku absence E-cadherinu), stává se součástí komplexů s transkripčním komplexem LEF-1, které iniciují EMT (Kim et al., 2002). Gen pro E-cadherin* se nachází na pozici 16q22.1 a mutace v této chromosomové oblasti byly nalezeny u karcinomů žaludku, prostaty, jícnu a u hepatocelulární karcinomu (Strumane et al., 2004).

Promotor E-cadherinu je reprimován specifickými transkripčními represory, jako jsou Snai1, Snai2, SIP1/ZEB2, Twist1 a E12/E47 a následně hypermetylován (Peinado et al., 2004). Hypermetylace E-cadherinového promotoru je častým znakem epiteliálních nádorů (Strathdee, 2002). Zvýšená exprese Snai1, častá u duktálního prsního karcinomu, vede ke snížení exprese E-cadherinu (Cheng et al., 2001). Podobný efekt má i zvýšená exprese Snai2/Slug, SIP1/ZEB2 (Elloul et al.,

* E-cadherinový gen se nazývá *CDH1*. V 5' proximální oblasti genu *CDH1* se nachází velký CpG ostrov, který u některých karcinomů vykazuje aberantní metylaci a v důsledku toho sníženou expresi E-cadherinu (Berx and van Roy, 2009; Kanazawa et al., 2002).

2005) a Twist1 (Yang et al., 2004). Existuje vzájemná modulace mezi transkripčními represory pro E-cadherin a specifickými microRNA. MicroRNA rodiny miR-200 a miR-205 se váží přímo na mRNA ZEB1/deltaEF1 a ZEB2/SIP1, tím potlačují translaci mRNA pro ZEB1 a ZEB2 a to vede ke zvýšení exprese E-cadherinu (Berx and van Roy, 2009; Burk et al., 2008). Nadprodukce miR-200c v buňkách prsního nádoru potlačovala jejich invazivitu (Burk et al., 2008).

Vedle genetických a epigenetických mechanismů se na regulaci množství E-cadherinu v buňce podílí ještě další mechanismy. E-cadherin je z membrány odstraňován endocytózou a je recyklován na nové mezibuněčné kontakty. Zvýšená aktivace protoonkogenů, jako je c-Met (HGF/SF), Src a EGFR, vede ke zvýšené fosforylaci tyrosinů v cytoplasmatické doméně E-cadherinu. Tato fosforylace je signálem pro vazbu Hakai (E3-ubiquitin ligasa), následnou internalizaci a degradaci (Shen et al., 2008).

N-cadherin (neural cadherin) oproti E-cadherinu vytváří jak pevné, tak i přechodné slabé mezibuněčné interakce, které usnadňují procesy jako je růst neuritu nebo migrace (Hazan et al., 2000; Riehl et al., 1996). Ektopická exprese N-cadherinu v nádorových, ale jen slabě invazivních buňkách, zvyšuje jejich mobilitu a invazivní potenciál v Matrigelu (Hazan et al., 2000). V této práci bylo rovněž ukázáno, že nadprodukce N-cadherinu, za současného působení růstového faktoru FGF-2 vede ke zvýšení produkce metaloproteázy MMP-9. N-cadherin kromě homofilních interakcí vytváří i komplex s receptorem FGF. Tato interakce vede k aktivaci signální dráhy MAPK/ERK a následné produkci MMP-9. Tento mechanismus se uplatňuje jak u invazivních buněk, tak i při růstu neuritu (Hazan et al., 2004). U nádorových buněk je častým jevem, že dojde ke snížení produkce E-cadherinu a současně se zvýší produkce N-cadherinu, tomuto jevu se říká „Cadherin switch“ (Hazan et al., 2004).

VE-cadherin (vascular endothelial (VE) cadherin) udržuje adhezivní spoje sousedních buněk v endotelu a pouze v buňkách endotelu je produkován (Lampugnani et al., 1992). Jeho hlavní úloha spočívá v udržení paracelulárního transportu (Komarova and Malik, 2010). Bylo však ukázáno, že VE-cadherin byl silně nadprodukován v agresivních melanomech (Hendrix et al., 2001). Autoři této práce poukazují na to, že zvýšená exprese VE-cadherinu vede k vaskularizačnímu

fenotypu nádoru, který tak mimikuje endoteliální tkáň. Pro tento jev byl zaveden termín „vasculogenic mimicry“.

Pro přehled ostatních členů cadherinové proteinové rodiny a jejich vztah k různým nádorovým onemocněním odkazují na rozsáhlý souhrnný článek Berx and van Roy, 2009.

4.2.4 Interakce buněk s mezibuněčnou hmotou

V mnohobuněčném organismu existuje velké množství různých interakcí, které jednotlivé buňky navazují se svým okolím. Při migraci nádorových buněk mezibuněčnou hmotou jsou nejvýznamnější interakce zprostředkované integriny a receptorem hyaluronátu CD44. V dalším textu se zaměřím pouze na integriny a integriny zprostředkovanou signalizaci.

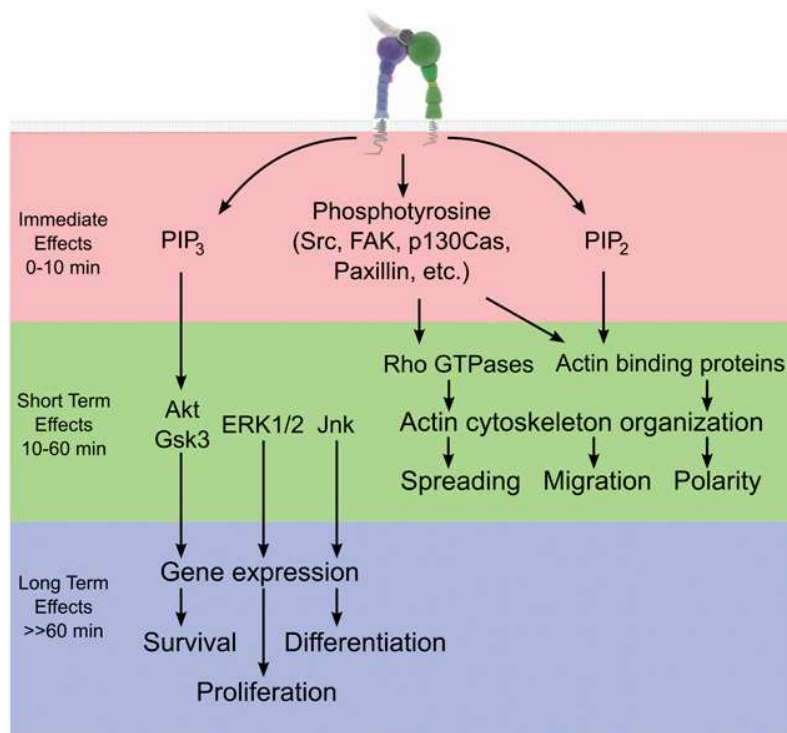
Integrinová signalizace

Integriny jsou rodina transmembránových glykoproteinů, které slouží jako receptory pro složky mezibuněčné hmoty a některé specifické mezibuněčné interakce. Integriny tvoří heterodimer z nekovalentně asociovaných podjednotek α a β . U obratlovců je známo osmnáct podjednotek α a osm podjednotek β , které skládají dvacet čtyři různých heterodimerů. Integriny se dělí buď podle podjednotkového složení, nebo podle ligandu (podrobné dělení integrinů do skupin podle podjednotek a podle vazebné specificity lze najít v pracích Barczyk et al., 2010; Luo et al., 2007 a Takada et al., 2007). Na cytoplasmatické straně buněčné membrány integriny zprostředkovávají vazbu na cytoskelet, převážně na aktinová vlákna, ale i na mikrotubuly a intemediální filamenta (Bhattacharya et al., 2009). Kromě cytoskeletu se na cytoplasmatickou část integrinů váže řada dalších proteinů a následně se aktivuje signalizace vedoucí k adhezi, proliferaci, změně tvaru, polaritě, motilitě a dalším dějům, z nichž většina je zprostředkována změnami v cytoskeletu (Takada et al., 2007).

Signalizace prostřednictvím integrinů se rozděluje na „inside-out“ a „outside-in“. „inside-out“ slouží převážně k tomu, aby uvedla integriny do aktivní konformace. Pro uvedení integrinů do aktivní konformace, tj. reorganizace konformace $\alpha\beta$ dimeru, jsou důležité dvě skupiny proteinů, taliny a kyndliny. Tyto

proteiny se váží na cytoplasmatickou část podjednotky β a současně slouží k napojení integrinů na aktinový skelet. Talin vazbou na podjednotku β způsobí konformační změnu v extracelulární části proteinu (za současného rozvolnění interakce s podjednotkou α), která zvýší vazebnou afinitu (Takada et al., 2007). Nicméně samotný talin pro plnou aktivaci integrinů nestačí, pro to je potřeba kooperace s proteiny zvané kindliny (Geiger et al., 2009). Kindliny se na aktivaci integrinů podílí rovněž přímou interakcí s cytoplasmatickým koncem β podjednotky, navíc jsou kindliny nezbytné pro správné sestavení adhezí buňky na mezibuněčnou hmotu (Larjava et al., 2008).

Pro „outside-in“ signalizaci je charakteristické, že po navázání ligandu dojde k vytváření integrinových shluků a přenosu signálu přes membránu do nitra buňky. Integriny vázané na ligand se nejprve shlukují do vznikajících adhezí (nascent adhesions). Vznikající adheze se zvětšují a vytvářejí postupně shluky integrinů o stovkách až tisících jednotkách, které dají vzniknout pevným fokálním adhezím (FA) (Legate et al., 2009). Důsledky aktivace integrinů se dají shrnout do tří fází: bezprostřední, krátkodobý a dlouhodobý efekt. Během prvních pár minut po aktivaci dojde k fosforylaci tyrosinů na specifických substrátech a následnému přenosu signálu prostřednictvím druhých posílů. Zpravidla do hodiny dojde k přestavbě tvaru buňky a dalším dějům spojených s přestavbou aktinového skeletu. Dlouhodobé propojení s ECM vede ke změnám v signálních drahách a genové expresi, které ovlivňují růst a diferenciaci (shrnutí na obr. 3). Následné vývojové procesy jsou z velké části ovlivněny mechanickými vlastnostmi ECM (hustotou, pevností a tenzní silou).



Obr. 3. Následnost dějů při aktivaci integrinové signalizace. Aktivace integrinů na buněčné membráně vede k dějům, které se dají rozdělit na tři časová stádia. Bezprostředně po aktivaci dojde ke zvýšené aktivitě kináz, které zprostředkují nárůst koncentrace lipidických druhých posílů a dojde k rychlé fosforylaci specifických proteinových substrátů. Během několika minut jsou aktivovány signální dráhy GTPáz rodiny Rho a jsou aktivovány proteiny podílející se na regulaci přestavby aktinového skeletu. Efekty následující v řádech hodin po aktivaci integrinů zahrnují aktivaci proliferačních drah a indukci genetického programu, který určuje buněčnou morfologii (převzato z Legate et al., 2009).

Sestavování signální platformy

Cytoplasmatická doména integrinů nemá vlastní katalytickou aktivitu. Tu zprostředkovávají četné molekuly, které jsou buď přímo, nebo nepřímo asociované s integriny. Při hledání v databázích a literatuře bylo nalezeno 156 signálních a adaptorových molekul, které jsou součástí tzv. „integrin adhesome“ (Zaidel-Bar et al., 2007; studie byla publikována v roce 2007, v současnosti bude toto číslo zřejmě ještě vyšší). Vazba přímých interakčních partnerů na integriny je ovlivňována posttranslační modifikací integrinů. Na cytoplasmatickém konci β -integrinů se nachází dva motivy NXXY, které jsou rozpoznávány proteiny obsahujícími doménu vázající fosfo-tyrosin (PTB). Tyto motivy mohou být fosforylovány kinázou Src, což následně ovlivní vazbu dalších proteinů (Oxley et al., 2008). V cytoplasmatické doméně integrinů se rovněž nachází seriny a threoniny, které jsou fosforylovány

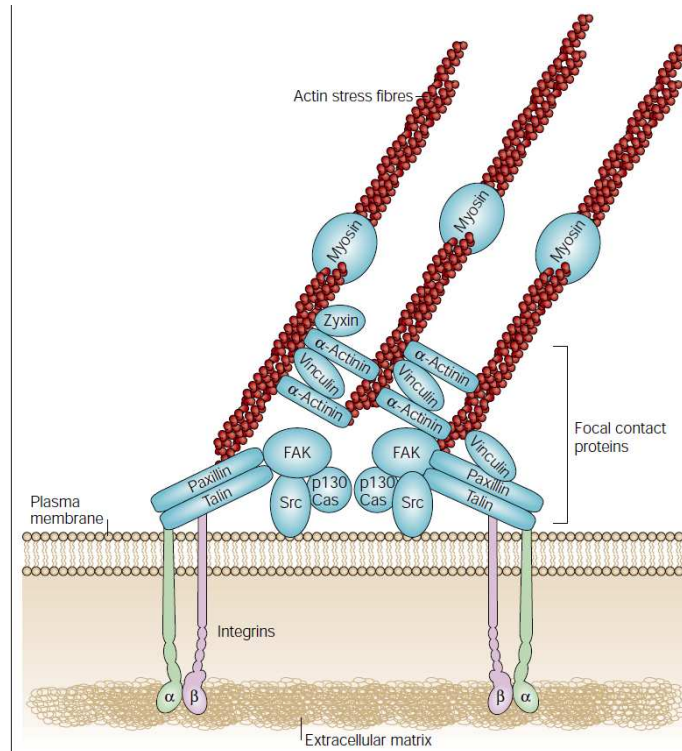
kinázami Akt, PDK1, ERK2 a Protein kinázou C. Na fosforylovaný Ser/Thr se váží adaptorové proteiny, jako je filamin nebo 14-3-3 (některé isoformy) (Legate et al., 2009). Komplex Src-FAK představuje hlavní uzel integrinové signalizace. Shlukování integrinů stimuluje autofosforylaci kinázy FAK (na pozici Tyr 397), čímž vznikne vazebné místo pro doménu SH2 proteinu Src. Src zprostředkovává další fosforylaci kinázy FAK a FAK tím nabývá své plné katalytické aktivity (Mitra et al., 2005).

Ve vznikajících fokálních adhezích dochází k mnohočetné fosforylaci proteinů s integriny asociovanými. Příkladem může být vazba adaptorového proteinu Crk do fokálních adhezí (FA). V počáteční fázi adheze je adaptorový protein paxillin fosforylován kinázami FAK a Src (Bellis et al., 1995). Tím se na paxillinu vytvoří vazebné místo pro Crk (Turner, 2000). V odpovědi na mechanický stres dojde uvnitř fokálních adhezí k fosforylaci proteinu p130Cas (Crk-associated substrate), který poté zprostředkovává vazbu dalších proteinů, včetně Crk (Defilippi et al., 2006). Přestože oba adaptorové proteiny (paxillin i p130Cas) váží Crk, jejich fosforylace má antagonistický efekt na migraci. Fosforylace paxillinu potlačuje migraci, fosforylace p130Cas migraci podporuje (Yano et al., 2000). Stimulační efekt proteinu p130Cas spočívá v aktivaci GTPázy Rac1 a následné polymerizaci aktinu. Dochází k tzv. „membrane ruffling“*, nebo tvorbě lamelipodií, obojí vede k buněčnému pohybu (Mitra et al., 2005).

Src-FAK může ovlivňovat dynamiku fokálních kontaktů také prostřednictvím regulace extra- a intracelulárních proteolytických dějů. FAK ovlivňuje expresi proteáz rodiny MMP (matrix metalloproteinase) a to signalizací přes Ras a Rac. Aktivace metaloproteáz na vedoucím okraji buňky vede ke štěpení složek mezibuněčné hmoty a k rozvolnění kontaktů integrin-ECM (Visse and Nagase, 2003). Některé komponenty fokálních kontaktů na cytoplasmatické straně buněčné membrány, jako je talin a spectrin, mohou být štěpeny proteázou calpain (Cuevas et al., 2003). Calpain je proteáza závislá na vápenatých iontech. Rozpad fokálních kontaktů je spojen s přechodným, lokálním nárůstem koncentrace

* „Membrane ruffling“ by se dalo doslova přeložit jako čepýření membrány. Tímto termínem se popisuje charakteristický děj převážně na vedoucím okraji buňky, kdy jsou v rovině podložky dopředu vysunována tenká filopodia, která se zvedají a následně hned zatahují či zanořují do dorsální části vedoucího okraje buňky. Tím se k sobě dostanou antiparalelní aktinová vlákna, která spolu s myosinem mohou vytvořit kotraktivní jednotky. Tento pohyb, dobře prostudovaný ve 2D (pohyb po sklíčku), zřejmě odráží mechanismus pohybu buňky ve 3D. Podrobnější popis je například ve Small and Resch, 2005.

vápenatých iontů v místech jednotlivých adhezí. Calpain tak může být selektivně aktivován buď na vedoucím okraji buňky, nebo zatahujícím se konci (Giannone et al., 2004).



Obr. 4. Molekulární architektura fokálních adhezí. Ve fokálních adhezích dochází prostřednictvím molekul integrinů k interakci buněčného skeletu na mezibuněčnou hmotu. Jde o dynamickou strukturu, kde se koncentrují strukturní a regulační proteiny. Proteiny paxilin a talin se váží na cytoplasmatickou část integrinů a následně váží kinázu FAK a protein vinculin. Protein α-actinin váže aktinová vlákna k sobě a společně s proteinem vinculin upevňuje aktinová vlákna k fokálním adhezím. Vazba kinázy Src do fokálních adhezí vede k vytvoření FAK-Src signálního komplexu, který fosforyluje další proteiny asociované s kinázou FAK, především proteiny p130Cas a paxilin. Fosforylace p130Cas a paxilinu má vliv na buněčnou migraci (viz. text; převzato z Mitra et al., 2005).

Interakce integrinů s cytoskeletem

Spojení integrinů s cytoskeletem je sítí přechodných, vysoce dynamických interakcí mezi proteiny fokálních adhezí a F-aktinem, které zprostředkovávají propojení s relativně statickými vazbami integriny-ECM. Klíčovou roli ve zprostředkování fyzického propojení integrinů, cytoskeletu a dalších komponent fokálních adhezí hrají proteiny: talin, vinculin, α-actinin a ILK. Další proteiny, jako je FAK a paxillin, mají spíše modulační úlohu prostřednictvím enzymových, nebo adaptorových vlastností (Legate et al., 2009).

Mechanosenzorické vlastnosti integrinových komplexů

Integrinové komplexy jsou rovněž odpovědné za konverzi fyzických signálů jako je mechanický tah na chemické signální děje. Jak bylo uvedeno u „inside-out“ signalizace, inaktivní integrin je dimer s kompaktně vázanou podjednotkou α a β . Po navázání talinu se vazba podjednotek α a β rozvolní a dojde k aktivaci, tj. nabytí konformace, která umožní vazbu ligandu. Několik studií naznačuje, že inaktivní konformace integrinů není stabilní a jednotlivé molekuly nabývají různých konformací. To může umožnit slabou vazbu na ligand (v tomto případě ECM) a následkem tahu stabilizaci natažené, aktivní konformace a aktivaci signalizace uvnitř buňky (Askari et al., 2009). Vedle integrinů je klíčovou molekulou této mechanosenze kináza FAK (Mitra et al., 2005). Jiným příkladem je vnímání tuhosti okolní mezibuněčné hmoty. Buňky se preferenčně pohybují do oblasti s vyšší tuhostí, tomuto jevu se říká durotaxe a je rovněž závislý na aktivitě kinázy FAK. U buněk s delecí genu pro FAK tato orientace směrem k tužšímu prostředí nebyla pozorována (Wang et al., 2001). Velikost fokálních adhezí je závislá na tuhosti prostředí; buňky vyseté na tuhém substrátu vytvářejí mohutnější adheze (Tilghman and Parsons, 2008). Tento růst fokálních adhezí je závislý na aktivaci Rho signalizace, jelikož pevnější prostředí vyžaduje generování větší síly prostřednictvím akto-myosinové kontrakce (Tilghman and Parsons, 2008). Měření trakčních sil u migrujících buněk ukázalo, že největší síla je generována na vedoucím okraji (Pelham, Jr. and Wang, 1999) a nárůst počtu buněčných protruzí byl zaznamenán právě v místech, kde byly naměřeny největší trakční síly a kde byl tedy vyvíjen největší tah na buněčný skelet (Parker et al., 2002). Přímé propojení mezi mechanickou změnou tvaru molekuly a následnou signalizací bylo ukázáno u proteinu p130Cas, který byl označen za primární mechanosenzor (Sawada et al., 2006). Natažení proteinu, které bylo detekováno protilátkou specifickou proti natažené substrátové doméně proteinu p130Cas, vedlo k fosforylaci p130Cas a následnému přenosu signálu prostřednictvím GTPázy Rac1.

4.2.5 Úloha aktinu a myosinu v buněčné migraci

Během buněčné migrace, při rychlých změnách tvaru, nebo tvorbě panožek, mají z buněčného skeletu nevýznamnější roli mikrofilamenta. Polymerizace aktinových monomerů v F-aktinová vlákna a následný rozpad vláken je základem pro pohyb eukaryotické buňky. Nové monomery jsou přidávány na plus („barbed“) konec a depolymerizace se děje na mínus („pointed“) konci. Proteinový komplex Arp2/3 je odpovědný za nukleaci nových vláken, proteiny FH a Ena/VASP stimulují přidávání nových monomerů (Pollard, 2007). U pohybujících se buněk je hlavní místo polymerizace ta část, která je proximálně vzhledem k buněčné membráně. Není ještě zcela objasněno, zda je membrána „natahována“ rostoucími vlákny, hydrostatickým tlakem, nebo roste v důsledku splývání váčků (Olson and Sahai, 2009). Aktivita proteinového komplexu Arp2/3 je regulována asociací s proteiny WAVE a WASP (mají doménu WH2, WASP homology 2). Proteiny z rodiny WAVE a WASP zprostředkovávají interakci mezi Arp2/3 a aktinovými monomery a jejich aktivita je stimulována četnými GTP-vazebnými proteiny (Cdc42, RhoA, RhoB) (Olson and Sahai, 2009; Pollard, 2007).

Polymerizace aktinu zprostředkovaná proteiny FH a Ena/VASP generuje lineární soubory vláken. Útvary, obsahující tyto soubory vláken, se označují jako filopodia, pokud vyrůstají laterálně z buňky, a jako microvilli, pokud rostou dorsálně (Olson and Sahai, 2009). Polymerizace zprostředkovaná proteiny Arp2/3 většinou vede k vytvoření obloukovité, listovité struktury zvané lamelipodium, které se rozprostírá po podkladu (Chhabra and Higgs, 2007). Udává se, že protein cortactin váže Arp2/3 na již existující aktinová vlákna a působením Arp2/3 tak vznikají větvená vlákna či soubory vláken (Buday and Downward, 2007). V aktuální studii byla pro vizualizaci lamelipodií použita elektronová tomografie. Bylo ukázáno, že k větvení aktinových souborů vláken v lamelipodiích vůbec nedochází a dřívější pozorování větvených vláken nejspíše ukazovala vlákna ležící přes sebe (Urban et al., 2010). Protein fascin váže sousední aktinová vlákna k sobě a díky tomu svazky vláken a celá filopodia nabývají na pevnosti (Vignjevic et al., 2006). Proteiny s doménou FERM (například 4.1B, ezrin) zprostředkovávají napojení F-aktinu na plazmatickou membránu (Chishti et al., 1998).

Regulace fosforylace lehkého řetězce myosinu

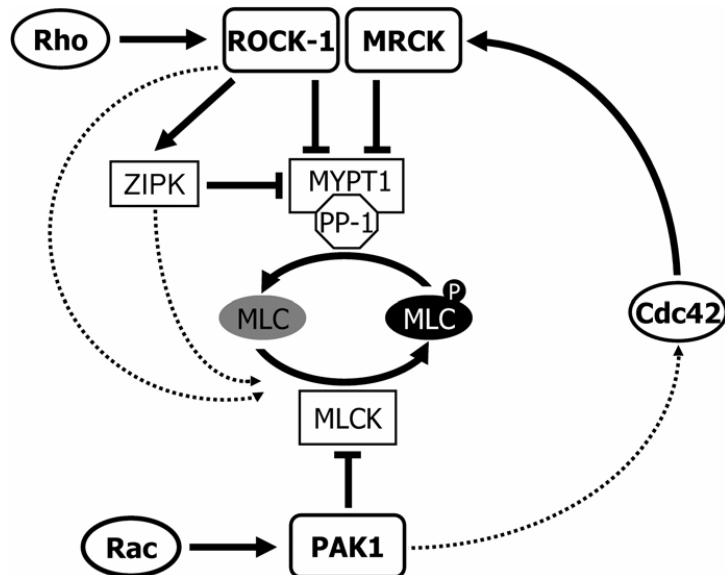
Vlákná F-aktinu a myosinu (tvořeného těžkým a lehkým regulačním řetězcem) vytváří komplex, který využívá energii ATP pro kontrakci. Fosforylace lehkého řetězce myosinu II (MLC) je klíčový mechanismus, kterým je kontrakce regulována (Somlyo and Somlyo, 2000). Rychlé generování kontraktilní síly je řízeno především stimulací kinázy MLCK prostřednictvím vápenatých iontů (Ca^{2+} /calmodulin). V nesvalových buňkách, při delší časové odpovědi, se uplatňuje modulace kinázami asociovanými s GTPázami z rodiny Rho (Yee, Jr. et al., 2001). MLCK je hlavní kináza při kontrakci závislé na vápníku, ROCK1 a ROCK2 jsou hlavní kinázy při kontrakci na vápníku nezávislé (Olson and Sahai, 2009).

Fosforylace MLC je zprostředkována větším počtem kináz (ROCK1, ROCK2, MRCK, ILK, PAK, MLCK a další; Olson and Sahai, 2009). Kinázy ROCK jsou efektoři malých GTPáz RhoA a RhoC a fosforylují serin 19 na MLC (Amano et al., 1996). ROCK rovněž fosforyluje MYPT1, regulační podjednotku MLC fosfatázy (Kimura et al., 1996). Působí tak pozitivně na aktivitu myosinu přímo i nepřímo. Přímá fosforylace se uplatňuje především v centru buňky, zatímco nepřímá, inhibicí MLCP a tím blokováním defosforylace MLC, působí hlavně na okraji buněk (Totsukawa et al., 2004). ROCK dále fosforyluje kinázu ZIPK. ZIPK působí podobně jako ROCK, tj. přímo fosforyluje MLC a MLCP, aktivita MLCP je fosforylací inhibována (Hagerty et al., 2007).

Defosforylace MLC je zprostředkována fosfatázovým komplexem PP1M (MLCP), který se skládá z katalytické podjednotky PP1C δ , MLC-vázající podjednotky MBS a malé podjednotky M20 (Ito et al., 2004). MBS je klíčovou regulační podjednotkou fosfatázového komplexu a je známo pět proteinů, které mohou fungovat jako MBS. Nejlépe prostudovaný je mechanismus zahrnující protein MYPT1. Fosforylací MYPT1 (kinázami ROCK1, ROCK 2, ILK, ZIPK) dojde k inhibici funkce fosfatázy (Feng et al., 1999).

U proteinu Cdc42 bylo ukázáno, že může jak zvyšovat, tak snižovat fosforylací MLC. Zvýšení fosforylace se děje prostřednictvím kinázy MRCK (myotonic dystrophy kinase-related Cdc42-binding kinase). MRCK kooperuje s ROCK, což vede k fosforylací MYPT-1 a tím inhibicí fosfatázy MLCP (Dong et al., 2002). Inhibiční působení Cdc42 se děje prostřednictvím kinázy PAK1. Kináza PAK (p21-activated kinase) je efektor GTPázy Rac1 a Cdc42 a stimuluje buněčný pohyb a invazivitu. PAK lokalizuje do fokálních adhezí a přispívá k jejich

dynamické přestavbě (Manser et al., 1997). Kináza PAK má více substrátů, aktivuje kinázu LIMK, která potlačuje aktivitu proteinu cofilin (Delorme et al., 2007). PAK fosforyluje a tím inhibuje funkci MLCK (Sanders et al., 1999).



Obr. 5. Role GTPáz rodiny Rho v regulaci fosforylace lehkého řetězce myosinu v nesvalových buňkách. Fosforylace MLC v nesvalových buňkách závisí na poměru aktivit kinázy MLCK a fosfatázy MLCP (na schéma reprezentovanou regulační podjednotkou MYPT1). GTPázy Rho, Rac1 a Cdc42 prostřednictvím asociovaných kináz regulují aktivitu kinázy MLCK a fosfatázy MLCP. Rho zvyšuje fosforylaci MLC inhibicí MLCP, zatímco Rac1 snižuje fosforylaci MLC inhibicí MLCK (Převzato z Micuda et al., 2010).

Koordinace polymerizace a kontrakce během migrace

Toto zdánlivě protichůdné působení regulačních molekul na polymerizaci aktinu a akto-myosinovou kontrakci vyvolává otázky, jak jsou tyto procesy koordinovány pro efektivní pohyb celé buňky, aby k aktivní polymerizaci docházelo před kontrakcí a v proximálních částech buňky (na okraji lamelipodií a filopodií). Imunofluorescenční mikroskopie lamelipodií migrujících buněk ukázala, že dochází k oscilaci polymerizace a depolymerizace aktinu (Ponti et al., 2004; Ponti et al., 2005) a k periodickým kontrakcím na vedoucím okraji lamelipodií (Giannone et al., 2004). GTPázy rodiny Rho regulují jak polymerizaci, tak kontrakci. Působením RhoA dochází k tvorbě fokálních komplexů a k tvorbě stresových vláken (Leung et al., 1996). Aktivované GTPázy Cdc42 a Rac1 podporují tvorbu fokálních adhezí (Manser et al., 1997) a vlivem působení Cdc42 dochází k posílení fosforylace MLC na buněčné periférii (Dong et al., 2002). Ve fokálních adhezích dojde působením

Cdc42 a Rac1 k aktivaci kinázy PAK, která způsobuje rozpad FA a stresových vláken (Manser et al., 1997) a snižuje fosforylaci MLC. Zřejmě tak dochází nejen k oscilacím v polymerizaci aktinu, ale i k fluktuaci aktivity kinázy MLCK a tím periodické fosforylaci MLC (Totsukawa et al., 2004).

Bylo ukázáno, že kináza MLCK je nezbytná pro rozpad fokálních kontaktů (Webb et al., 2004). Dynamická tvorba a rozpad FA je pro pohyb buňky esenciální, protože velké, stabilní adhezivní struktury fungují jako brzda v pohybu (Totsukawa et al., 2004). Periodická fosforylace myosinu na vedoucím okraji tak není důležitá jen pro kontrakci, ale i ke generování cyklů mezi formováním protruzí a tvorbou adhezivních struktur (Matsumura and Hartshorne, 2008).

4.2.6 Role proteolytických enzymů v remodelaci mezibuněčné hmoty

Membránově vázané a sekretované proteázy a jejich role v remodelaci mezibuněčné hmoty

Během vývoje organismu, ale i v dospělosti, dochází k četným přestavbám a přesunům buněk. Aby se buňky či skupiny buněk mohly dostat skrz mezibuněčnou hmotu, musí si vytvořit prostor. K tomu slouží četné proteolytické enzymy, ty mohou být membránově vázané, nebo sekretované. Dobře dokumentovaná role proteáz je například při vaskularizaci nebo růstu a remodelaci kosti a dalších pojivových tkání. Sekretované proteázy umožňují vytvoření prostoru v mezibuněčné hmotě, kudy se migrující buňky mohou protáhnout, ale mají i další biologické funkce. Štěpení substrátu vytváří fragmenty a epitopy, které mohou mít specifický význam. Proteázy se podílí na narušení mezibuněčných spojů a mohou zvýšit, modifikovat, či potlačit aktivitu biologicky aktivních molekul (Page-McCaw et al., 2007).

Extracelulární proteázy se dají rozdělit do několika skupin (dle van Hinsbergh et al., 2006): 1) matrixové metaloproteázy (matrix metalloproteinases); 2) cysteinové proteázy; 3) serinové proteázy. Tyto molekuly se staly předmětem intenzivního výzkumu, když se zjistilo, že jsou často nadprodukovány v maligních

nádorech. Nejvýznamnější, z hlediska nádorové invazivity, jsou proteázy rodiny MMP (matrix metalloproteinases).

MMP a MT-MMP

Matrixové metaloproteázy jsou endopeptidázy, které ke své funkci potřebují atom zinku vázaný ve své katalytické doméně (odtud název metaloproteázy)*. Matrixové metaloproteázy se dají rozdělit na membránově vázané a sekretované. Membránově vázané, označované MT-MMP, jsou aktivovány uvnitř buněk působením furinových proteáz a do membrány jsou vázané buď transmembránovou doménou, nebo GPI kotvou (glycosylphosphatidylinositol). Sekretované MMP jsou produkovány jako neaktivní proenzymy (proMMP) a až vně buňky jsou štěpeny a tím aktivovány. Na aktivaci MMP se podílí například proteáza plasmin (aktivuje proMMP-9). Případně se na aktivaci MMP podílí i membránově vázané proteázy, například MT1-MMP štěpí proMMP2 (van Hinsbergh et al., 2006; Visse and Nagase, 2003). MMP2, MMP9 a MT1-MMP jsou zároveň nejvýznamnější proteázy degradující mezibuněčnou hmotu v kontextu nádorové biologie. Vedle expresní regulace proteáz buňky produkují i specifické inhibitory zvané TIMP (tissue inhibitors of metalloproteinases), které se v tkáních podílejí na lokální kontrole aktivity proteáz (Visse and Nagase, 2003).

Vedle metaloproteáz MMP a MT-MMP, existují ještě metaloproteázy označované jako ADAM a ADAMT. ADAM (disintegrin and metalloproteinase domain) jsou transmembránové proteiny, zatímco ADAMT (disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs) jsou sekretované proteiny. Je známo 34 různých ADAM, z nichž 19 má proteolytickou aktivitu a působí jako „shedase“, tj. na vnějším povrchu buněčné membrány štěpí transmembránový protein, čímž uvolňují jeho ektodoménu a tak se účastní autokrinní a parakrinní stimulace (popsáno to bylo například pro některé cytokiny a cytokinové receptory) (Edwards et al., 2008). Některé proteiny ADAM a ADAMT se podílí na angiogenezi (tvorbě cévního řečiště například u hojení ran), ADAMT se podílí na štěpení mezibuněčné hmoty (Edwards et al., 2008). Proteázy z rodiny ADAM jsou často deregulovány v nádorových buňkách, zřejmě z toho důvodu, že nádorové buňky mají často

* MMP ve své katalytické doméně mají dva atomy zinku, jeden se nazývá katalitický, druhý strukturální. Mimo zinku obsahují obvykle ještě tři atomy vápníku (Visse and Nagase, 2003).

vysokou aktivitu autokrinní stimulace, které se ADAM účastní. Oproti MMP, ADAM se na štěpení mezibuněčné hmoty příliš nepodílí (s výjimkou ADAM-9, která štěpí laminin) (Edwards et al., 2008), nicméně se tyto proteázy účastní štěpení cadherinu v mezibuněčných spojích. To bylo ukázáno na proteáze ADAM-10, která štěpí E-cadherin. Zvýšená exprese ADAM-10 vede posléze k akumulaci β -cateninů v jádře a proliferaci (Maretzky et al., 2005).

Cysteinové proteázy

Cysteinové proteázy zahrnují rodinu proteáz zvané cathepsiny. Cathepsiny jsou endopeptidázy, které jsou primárně známy jako lysosomální enzymy (ke své funkci potřebují kyselé pH), některé cathepsiny však působí i na vnější membráně (van Hinsbergh et al., 2006).

Serinové proteázy

Serinové proteázy je označení pro větší počet různých enzymů, endopeptidáz, které mají společný motiv v katalytickém centru. V kontextu buněčné migrace a nádorové invazivity je nejčastěji zmiňován enzym urokinase-type PA (uPA) a plasmin. Fyziologický substrát uPA je plasminogen, neaktivní zymogen, který je štěpen na plasmin (rovněž serinová proteáza). Aktivovaný plasmin štěpí fibrinové sraženiny (fybrinolýza), ale i proteiny mezibuněčné hmoty (fibronectin, laminin) a podílí se na hojení ran. Nadprodukce proteázy uPA vede k vyšší degradaci ECM a zvýšené invazivitě buněk a vyšší hladina uPA je častým znakem maligních nádorů (McMahon and Kwaan, 2008).

4.3 Mechanismy invazivity nádorových buněk mezibuněčnou hmotou

Migrace buněk mezibuněčnou hmotou vyžaduje aktivaci specifických signálních drah a přestavbu buněčného skeletu vedoucí ke změně celkového tvaru a fenotypu buněk. Pro invazivní buňky je charakteristické vytváření specifických struktur, které jsou v kontaktu s okolní matrix. Existuje několik módů migrace. Buňky mohou migrovat kolektivně nebo individuálně. V této kapitole jsem se zaměřil na individuální způsob a především pak na rozdíl mezi mezenchymálním a améboidním způsobem migrace.

4.3.1 Mezibuněčná hmota

Mezibuněčnou hmotu lze v principu rozdělit do dvou typů: bazální membrány a vmezeřené pojivové tkáně. Bazální membrány jsou struktury, které obvykle separují buňky od pojivových tkání, nebo tvoří bariéru mezi buňkami a oddělují tak od sebe tkáně či orgány. Hlavní komponenty bazálních membrán jsou kolageny typu IV a V, laminin, entactin a několik druhů glykoproteinů. Tyto molekuly prostřednictvím nekovalentních interakcí tvoří hustou síť (McSherry et al., 2007). Za určitých okolností mohou být bazální membrány penetrovány, například při diapedéze krevních buněk do okolních tkání (Lukashev and Werb, 1998). Vmezeřené pojivové tkáně zahrnují různorodé struktury, jako je dermis, kost nebo chrupavka. Tyto tkáně v sobě obsahují buňky odpovědné za tvorbu okolní mezibuněčné hmoty (fibroblasty v pojivové tkáni, osteoklasty v kosti) a další buněčné typy, jako jsou buňky nervové, svalové, nebo buňky imunitního systému. Hlavní složkou pojivových tkání je kolagen, který tvoří až 90% proteinové složky (hlavně kolagen typu I a III). Hlavní složkou chrupavek je kolagen II a IX. Vedle kolagenů se v pojivových tkání vyskytuje fibronectin, elastin, proteoglykany, tenascin a kyselina hyaluronová (McSherry et al., 2007; Wolf et al., 2009).

4.3.2 Invazivní struktury

Různé buněčné typy vytváří na svém povrchu velké množství struktur. V následujícím textu jsou uvedeny pouze ty, které jsou v literatuře dávány do spojitosti s buněčnou migrací a invazí skrz mezibuněčnou hmotu. Konkrétně jde o filopodia a lamelipodia a o specializované adhezivní struktury - fokální adheze, invadopodia a podosomy. Je nutno poznamenat, že morfologický popis těchto struktur vychází z experimentů prováděných na mikroskopickém sklíčku, tj. ve 2D prostředí. Ve 3D prostředí, kdy je buňka uprostřed husté sítě mezibuněčné hmoty, jsou tyto struktury popsány již mnohem méně. Nicméně se dá předpokládat, i přes odlišnost ve 3D struktuře, že je jejich funkce a složení v obou případech podobná.

Filopodia

Filopodia vznikají polymerizací aktinu na plus koncích, shlukováním vláken a jejich protruzí do okolí buněk (viz. kapitola 4.2.5). Jde o vysoce dynamické struktury, které slouží jako senzory okolního prostředí a uplatňují se při buněčném pohybu a adhezi (Schirenbeck et al., 2005), ale i při růstu axonů (Dent and Gertler, 2003).

Lamelipodia

Lamelipodia jsou charakteristické struktury na vedoucím okraji rychle se pohybujících buněk. Jde o listovitý útvar o šířce 1 až 5 μm (v závislosti na buněčném typu) a tloušťce zhruba 200 nm, ve kterém jsou patrné svazky aktinových vláken. Svazky vláken se označují jako „microspikes“, pokud zůstávají za okrajem lamely, a jako filopodia, pokud vyčnívají dále dopředu (Small et al., 2002). Celé lamelipodium je kryté plazmatickou membránou a v cytoplasmatickém prostoru dochází k velmi rychlé přestavbě aktinového skeletu. Polymerizace aktinu je regulována GTPázami Rac1 a Cdc42 (viz. kapitola 4.2.5). V přední části lamelipodia dochází k utváření adhezí k mezibuněčné hmotě (Small and Resch, 2005). Dřívější model popisující mechanismus pohybu lamelipodia zdůrazňoval především roli polymerizace aktinu na vedoucím okraji a depolymerizaci u buněčného těla. Současný model předpokládá, že polymerizace a depolymerizace aktinu není ustálená, ale oscilující a že lamelipodium funguje jako kontraktilní

struktura (Giannone et al., 2007). Aktinová vlákna jsou v lamelipodiu uspořádána do dvou vrstev, kde spodní vrstva je méně dynamická. Na okraji lamelipodia dochází z konců filopodií k polymerizaci aktinu směrem k tělu buňky a tím k růstu horní vrstvy. V zadní části lamelipodia se akumuluje myosin II, jehož působením dochází k tahání nově vytvořeného aktinového svazku přes stabilnější vrstvu, tj. ke kontrakci. Vlivem tenze dojde na konci filopodií k vytvoření a zesílení fokálních adhezí (viz. kapitola 4.2.4). Stávající aktinový svazek se posune po lamelipodiu dozadu a na špičce filopodia začne nová vlna polymerizace (Giannone et al., 2007). Dle tohoto modelu k tzv. „ruffling“ membrány dochází v případě, kdy energie vazby spojující aktinový svazek mezi špičkou filopodia a zadním koncem lamelipodia (místem kontrakce) je větší než energie vazby vznikající fokální adheze k mezibuněčné hmotě. Tím dojde ke zvedání filopodií. Slabší adheze tak vedou k „ruffling“ na vedoucím okraji buňky. Tento model, tj. periodická aktivace polymerizace aktinu a kontrakce za účasti myosinu by podporovala i fluktuace ve fosforylaci myosinu na vedoucím okraji (Totsukawa et al., 2004).

Fokální adheze

Fokální adheze jsou místa, kde se buňka prostřednictvím integrinových komplexů přichytává k mezibuněčné hmotě. Velikost adhezí se pohybuje okolo $1 \mu\text{m}^2$ a počet se různí podle buněčného typu (Harjanto and Zaman, 2010). Fokální adheze se vytváří na vedoucím okraji lamelipodií, vytváří se ale i u buněk, kde se lamelipodia nevyskytují. Na fokální adheze je napojen aktinový cytoskelet. Akto-myosin je na vedoucím okraji migrujících buněk napojen na nové adheze. Starší adheze a adheze po okraji nebo na ventrální straně buněk jsou napojena na stresová vlákna. Na adheze jsou napojena i intermediální filamenta (Bhattacharya et al., 2009). Princip sestavování a hlavní komponenty fokálních adhezí již byly popsány v kapitole 4.2.4.

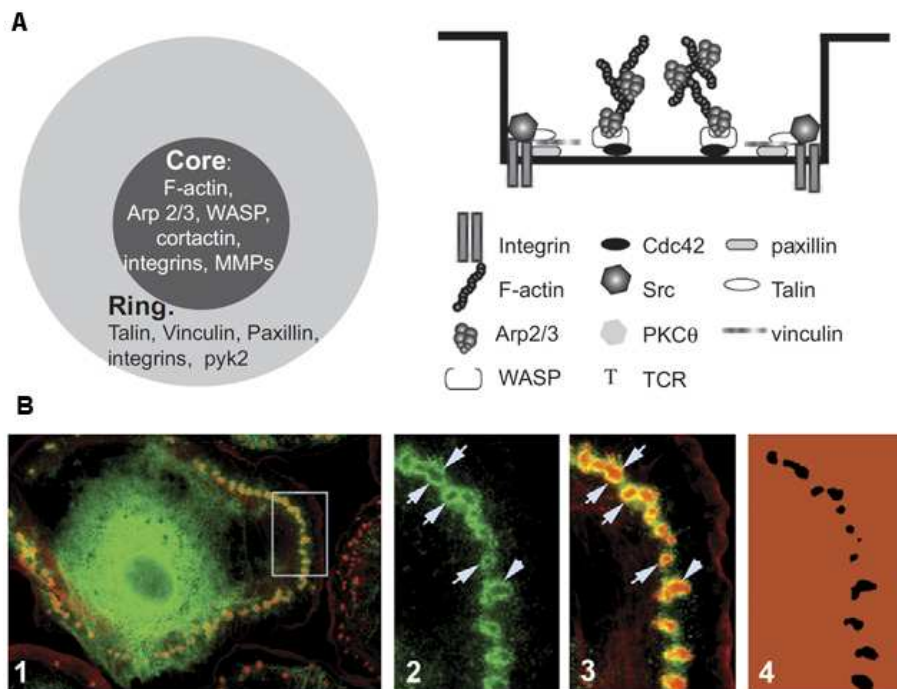
Invadopodia a podosomy

Podosomy a invadopodia* jsou adhezivní buněčné struktury nacházející se na ventrální straně buněk. Oproti fokálním adhezím mají kruhový tvar (při pohledu shora) a jejich charakteristickým znakem je, že v jejich blízkosti dochází k degradaci mezibuněčné hmoty. Tyto struktury se vytváří jen u některých buněčných typů a i jejich množství je buněčně specifické. Jde o struktury bohaté na aktin a proteiny regulující aktinovou přestavbu (Arp2/3, cortactin, WASP, N-WASP) a další proteiny podílející se na tvorbě adhezí (paxillin, talin, vinculin) (Linder, 2009). Vlastní kontakt mezi invadopodií a podosomy a mezibuněčnou hmotou, stejně jako u fokálních adhezí, zprostředkovávají integriny, na které se napojuje cytoskelet. U osteoklastů byla v podosomech nalezena i molekula CD44, receptor kyseliny hyaluronové (Saltel et al., 2008). Mnoho komponent podosomů a invadopodií je regulováno signalizací prostřednictvím tyrosinových kináz a tak je v místech těchto struktur vysoká koncentrace fosfotyrosinu. Tyto struktury se dají dobře rozpoznat při imunofluorescenčním značení pomocí protilátky proti fosfotyrosinu, nebo proti aktinu (aktin se obvykle značí phalloidinem) (Linder, 2007). Podosomy, invadopodia a fokální adheze jsou dobře patrné i za využití některých nepřímých zobrazovacích metod, jako je reflexní interference (Tolde et al., 2010).

Podosomy se v těle běžně vyskytují v monocytech, makrofázích, dendritických buňkách, osteoklastech, některých endoteliálních buňkách a buňkách hladké svaloviny. Výskyt invadopodií se váže především k nádorovým buňkám (Linder, 2007). Ve fibroblastech, ve kterých byly arteficiálně nadprodukovány některé tyrosinové kinázy (např. Src), se vytváří tzv. podosomové rosety (Brabek et al., 2005; Linder, 2007). Jde o velké kruhové nebo podkovovité útvary tvořené velkým počtem podosomů. Fyziologický význam podosomů souvisí s degradací mezibuněčné hmoty. U krevních buněk usnadňují migraci mezibuněčnou hmotou, u osteoklastů se podílí na resorpci kostní tkáně. Rozdíly mezi podosomy a invadopodií nejsou vždy jasně rozlišitelné, ale obecně se dá postulovat několik

* Invadopodia vs. podosomy: V současnosti se tyto dvě struktury v literatuře oddělují. Jejich funkční a strukturální podobnost však svádí k názoru, že jde o tutéž strukturu a zmíněné odlišnosti (viz. text) jsou dány především buněčně-enviromentálním kontextem. Proto je někteří autoři shrnují pod společný název invadosomes nebo PTA (podosome-type adhesions). Osobně se k tomuto názoru kloním, nicméně v textu ponechávám ten název, který byl u patřičné práce použit. V diskuzi k výsledkům našich prací se rovněž držím toho názvosloví, které jsme jako skupina pro daný text použili.

základních odlišností (více v Block et al., 2008; Gimona et al., 2008; Linder, 2007; Linder, 2009). Podosomy jsou v buňkách četnější (udává se až okolo sta na buňku, invadopodií je jen několik), podosomy jsou dynamičtější a poločas života je několik minut, u invadopodií až hodinu. Proteinové složení je podobné, ale udává se, že protein vinculin je nabohacen jen u podosomů.



Obr. 6. Architektura podosomů. (A) Schéma ukazuje uspořádání hlavních proteinových složek podosomů. Zvýrazněno je kruhové uspořádání integrinů a s integriny asociovaných molekul. Centrální oblast podosomů je bohatá na aktin a proteiny regulující přestavbu aktinových vláken. Prostřednictvím proteinů jako je vinculin, talin a α -actinin jsou aktinová vlákna napojena na komplexy proteinů v obvodové části. Po obvodu jsou prostřednictvím adaptorového proteinu paxillin koncentrovány kinázy Src, FAK, p130Cas a další (převzato z Wernimont et al., 2008). (B) Podosomy vizualizované v buňce hladké svaloviny. Kruhová struktura je značena proteinem plectin (2; zeleně). Centrální oblast bohatá na aktin (3; červeně) je místem, kde dochází k degradaci gelatinu (4) (převzato z Gimona et al., 2008).

Degradace mezibuněčné hmoty prostřednictvím podosomů a invadopodií je zprostředkována enzymy, jako jsou metaloproteázy a serinové proteázy. Nejčastěji zastoupené metaloproteázy jsou MT1-MMP, MMP-2 a MMP-9 (Linder, 2009). MT1-MMP má vedle degradační i regulační funkci. Inhibice aktivity MT1-MMP, nebo potlačení exprese, vede k výrazné redukci tvorby invadopodií (Artym et al., 2006). Agregace aktinu a cortactinu ve vznikajících invadopodiích iniciuje

akumulaci MT1-MMP (Artym et al., 2006). Proteázy se z Golgiho aparátu do míst degradace dostávají ve váčcích. Bylo ukázáno, že MT1-MMP se nachází ve váčcích pozitivních na Rab8 (Bravo-Cordero et al., 2007). Rab8 je GTPáza, která se podílí na polarizovaném transportu. Jak probíhá přesné „doručení“ váčku do invadopodií není přesně známo, ale několik recentních prací ukazuje na roli cortactinu a exocystu. Cortactin působí během polymerace aktinu (zprostředkované komplexem proteinů Arp2/3) a nachází se v místech, kde dochází k dynamické aktinové polymerizaci, jako jsou filopodia, lamelipodia, nebo invadopodia a zřejmě se podílí i na regulaci sekrece MT1-MMP, MMP2 a MMP9 v místech invadopodií (Clark and Weaver, 2008). Exocyst je proteinový komplex, který umožňuje vazbu exocytických váčků na plazmatickou membránu. Komponenty exocystu Sec3, Sec8 a Exo 70 interagují s proteinem IQGAP1 (White et al., 2009; IQGAP1 se podílí na regulaci buněčné polarizace během migrace). Byla ukázána společná lokalizace proteinů Sec8 a IQGAP1 v invadopodiích a tato interakce byla závislá na aktivitě GTPáz Cdc42 a RhoA (Sakurai-Yageta et al., 2008). Z buněčné membrány je MT1-MMP internalizován pomocí clathrinových, nebo caveolinových váčků a může dojít buď k relokaci na nové místo, nebo k degradaci v lysosomech (Poincloux et al., 2009).

4.3.3 Způsoby buněčné migrace

Buněčnou migraci skrz okolní tkáň lze v principu rozdělit na kolektivní a individuální. Individuální migraci nádorových buněk lze popisovat jako mezenchymální, na proteázách závislou, a améboidní, na proteázách nezávislou. Jde o krajní případy, ale buňky se často vyskytují v přechodných stavech, kdy využívají améboidní pohyb a při tom produkují proteázy. Specifickou situaci představuje transepiteliální migrace, kterou však ve svém textu nezahrnuji.

Kolektivní migrace

Při kolektivní migraci si buňky zachovávají mezibuněčné spoje a pohybují se jako skupina. Při tomto módu migrace pouze jedna nebo několik buněk na vedoucím okraji buněčného shluku řídí směr pohybu celé skupiny a vytváří „cestu“. Jen

u vedoucích buněk na jejich předním okraji dochází k vytváření integrinových adhezí, na integrinech závislé tensi a akto-myosinové kontrakci (Hegerfeldt et al., 2002) a tyto vedoucí buňky produkují enzymy štěpící mezibuněčnou hmotu (Nabeshima et al., 2000). Spojení mezi migrujícími buňkami je stabilizováno cadheriny, včetně koncové části vedoucích buněk. Retrakce konce vedoucích buněk pak pomáhá posouvat dopředu další linii buněk a dochází tak k modifikaci významu kontraktility kortikálního aktinu (Friedl, 2004).

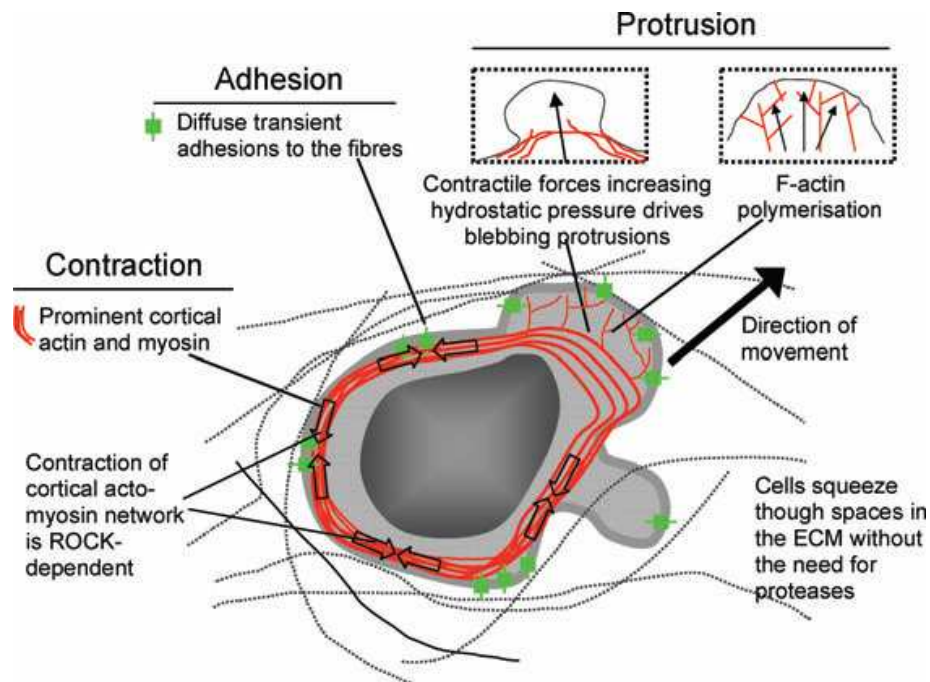
Mezenchymální migrace

Buňky, které využívají mezenchymálního způsobu migrace, mají většinou protáhlý vřetenovitý tvar. Protáhlý tvar je závislý na dynamice integrinových adhezí a přítomnosti trakčních sil na obou pólech buňky (Tamariz and Grinnell, 2002). U migrujících mezenchymálních buněk dochází na vedoucím okraji k tvorbě pseudopodií a lamelipodií a následně adhezí. Tento proces je řízen GTPázami z rodiny Rho, především Rac a Cdc42 (Pankova et al., 2010). Pro mezenchymální buňky je charakteristická přítomnost kontraktilních stresových vláken napojených na fokální adheze, která generují tenzi mezi anteriorním a posteriorním pólem buňky (Sheetz et al., 1998). V místech adheze buněk na mezibuněčnou hmotu dochází ke společné lokalizaci integrinů (hlavně $\beta 1$ a $\beta 3$) a následně proteáz (například MT1-MMP). Proteázy štěpí molekuly mezibuněčné hmoty v blízkosti buňky a dochází tak k remodelaci ECM v místech, kudy se buňka pohybuje. Tvorba a zánik fokálních adhezí se udává v rozmezí 10-120 minut, což ve svém důsledku vede k relativně pomalému pohybu (0,1-2 $\mu\text{m}/\text{min}$) (Friedl, 2004).

Améboidní migrace

Améboidní pohyb (pojmenovaný dle jednobuněčných eukaryot, například *Dictyostelium*) je u vyšších eukaryot pozorován například u leukocytů a některých typů nádorových buněk. Nádorové buňky, které využívají tento způsob pohybu, jsou ve 3D prostředí oválného tvaru s výrazným kortikálním aktinem. Tyto buňky vytváří jen slabé interakce, přizpůsobují svůj tvar okolnímu prostředí a protahují se otvory v mezibuněčné hmotě (Friedl, 2004; Pankova et al., 2010). Například leukocyty, které jsou vysoce deformovatelné a postrádají tvorbu stabilních fokálních kontaktů, se pohybují rychlostí až 2-20 $\mu\text{m}/\text{min}$ (Friedl et al., 1998). Dají se rozlišit dva typy

améboidního pohybu. U prvního jsou buňky kulaté a na svém povrchu tvoří tzv. „blebs“*. Při pohybu tyto buňky neadherují na ECM a pohyb není způsoben tím, že by se „popotahovaly“ po substrátu, ale spíše se tlačí dopředu a vytváří malé panožky („blebs“), které rostou vlivem hydrostatického tlaku. U druhého způsobu améboidního pohybu jsou buňky více protáhlé, na svém vedoucím okraji tvoří četná filopodia a vytváří přechodné, velmi slabé interakce s okolím (Friedl and Wolf, 2010). Dynamika kortikálního aktinu je pod kontrolou GTPázy RhoA a jejího efektorového proteinu ROCK. Pro tento typ pohybu skrz ECM nejsou proteázy potřeba, protože fosforylace lehkého řetězce myosinu a následná akto-myosinová kontrakce regulovaná kinázou ROCK by měla poskytovat dostatek síly, aby se buňky protáhly či mechanicky deformovaly okolní prostředí (Wyckoff et al., 2006).



Obr. 7. Model améboidního pohybu nádorové buňky ve třírozměrném prostředí. Obrázek ukazuje dva mechanismy pohybu v síti mezibuněčné hmoty, polymerizace aktinu na vedoucím okraji a tvorba tzv. „blebs“. „Blebs“ se vytvoří hydrostatickým tlakem a kontrakcí akto-myosinu při jejich základu. Kontrakce akto-myosinu je závislá na aktivitě kinázy ROCK. Adheze na vlákna mezibuněčné hmoty jsou značena zeleně (převzato z Pinner and Sahai, 2008).

* Český ekvivalent pro „bleb“, puchýřek nebo bublina, jsem v textu nepoužil. „Blebs“ na rozdíl od lamelopodií, které rostou v důsledku polymerace aktinu, obsahují velmi málo aktinu a rostou zřejmě v důsledku hydrostatického tlaku vyvolaného kontrakcí akto-myosinu. Tyto útvary jsou typické pro améboidní buňky a v 3D prostředí jsou dobrým poznávacím znakem. Nicméně je však třeba mít na paměti, že tvorba „blebs“ je typická i pro apoptotické buňky (Nusbaum et al., 2004).

Jak bylo zmíněno výše, mezenchymální a améboidní způsob migrace jsou dvě krajní možnosti a velká část invazivních nádorových buněk využívá mechanismů obou těchto módů. Byl vznesen názor, že čistě améboidní, na proteázách zcela nezávislý způsob migrace, se u nádorových buněk nevyskytuje (Sabeh et al., 2009). V této práci autoři poukazovali na to, že většina invazivních studií, kde se améboidní migrace studovala (Gadea et al., 2008; Sanz-Moreno et al., 2008; Wolf et al., 2003; Wyckoff et al., 2006), byla prováděna na matricích, které ne zcela rekapitulovaly situaci *in vivo*. Jednalo se především o používání rekonstituovaného kolagenu (dostupný od několika firem), který se získává extrakcí pepsinem. Pepsin odštěpí nehelikální N- a C- konce z kolagenových molekul a to včetně úseku obsahujícího lysinové zbytky, které *in vivo* slouží k vytvoření kovalentních vazeb sousedních molekul a následně tak zpevnění celého vlákna (Sato et al., 2000). Améboidní buňky tak mohou mít dost síly, aby se protlačily kolagenovou sítí, protože strukturní integrita a mechanická pevnost kolagenu neodpovídá situaci *in vivo*. Kolagen se dá získávat i kyselou extrakcí, kdy kovalentní vazby jsou v nízkém pH narušeny reversibilně. Takto připravený kolagen si po rekonstituci uchová pevnost kolagenu za situace *in vivo*. Při použití linií HT-1080 a MDA-MB-231 byla pozorována vyšší invazivita v kolagenu získaném extrakcí pepsinem a použití siRNA proti MT1-MMP inhibovalo schopnost těchto buněk invadovat do okolního kolagenu v kolagenu získaném kyselou extrakcí (Sabeh et al., 2009). Nicméně, ani HT-1080, ani MDA-MB-231 nejsou primárně améboidní buňky. Améboidní fenotyp u nich může být indukován, například přidáním proteázových inhibitorů, to ale nezaručí, že buňky jsou skutečně schopny efektivní améboidní invazivity (Pankova et al., 2010). Otázka, zda některé nádorové buňky jsou schopny invaze zcela nezávislé na proteázové aktivitě, tak zůstává otevřená.

Mezenchymálně-améboidní přechod

Mezenchymálně-améboidní (MAT) a améboidně-mezenchymální (AMT) přechod jsou dva procesy popisující fenotypovou změnu u nádorových buněk. Dříve zmiňovaný epiteliálně-mezenchymální přechod zahrnuje poměrně extenzivní změnu signalizace a genové exprese. Oproti tomu MAT a AMT jsou procesy relativně rychlé a umožňují dynamicky reagovat na aktuální specifika okolního prostředí (Pankova et al., 2010). Améboidní způsob migrace je závislý na Rho/ROCK signalizaci, která umožňuje kontrakci kortikálního akto-myosinu. Potlačení Rho/ROCK signalizace v améboidních buňkách vedlo k přechodu na mezenchymální fenotyp (Sahai and Marshall, 2003). Klíčovou molekulou mezenchymální migrace je Rac. Rac podporuje tvorbu protruzí a lamelipodií (Rac signalizace vede aktivaci Arp2/3), charakteristických znaků mezenchymálních buněk, a udržuje nízkou hladinu fosforylace MLC2 (Sanz-Moreno et al., 2008).

Rho a Rac mají tak protichůdné efekty a navzájem se ovlivňují. Rho/ROCK aktivuje protein ARHGAP22, který působí jako GAP pro Rac a potlačuje jeho aktivitu. Rac aktivuje Arp2/3 prostřednictvím komplexu SCAR/WAVE2 a WAVE současně potlačuje fosforylaci MLC2. Posílení Rho signalizace vede k améboidní migraci za současného potlačení Rac dráhy, zatímco posílení Rac dráhy vyvolává u buněk přechod k mezenchymálnímu módu pohybu (Sanz-Moreno et al., 2008). Buňka se tak může přizpůsobovat nárokům svého bezprostředního okolí jemnou manipulací s těmito signálními dráhami. Pro tuto hypotézu by svědčila i morfologická odlišnost jednotlivých buněk u různých nádorů.

4.4 Elongační fáze transkripce řízená RNA polymerázou II během stresu

Změny v regulaci genové exprese na úrovni elongační fáze vedou ke změnám v buňce a mohou se stát základem pro mnohá onemocnění, včetně nádorového. Nádorové onemocnění je ve své podstatě genetickým onemocněním (Vogelstein and Kinzler, 2004), dochází ke změně exprese, případně změně aktivity proteinových produktů, proto-onkogenů, nebo nádor potlačujících genů. Pro plné rozvinutí nádorového onemocnění je však třeba souhry více faktorů. Mezi nejvýznamnější nádor potlačující geny patří *p53*. *p53* je transkripční faktor a jeho aktivita přímo ovlivňuje transkripci genů řízenou RNA polymerázou II. Mutace v genu *p53* byla nalezena u více jak 50% nádorů (Harris, 1996). K aktivaci proteinu *p53* dojde při stresovém podnětu, nezvládnutí odpovědi na stresový podnět pak může být jednou z příčin vzniku nádorového onemocnění.

4.4.1 Role transkripčního faktoru P-TEFb v elongační fázi transkripce

RNA polymeráza II

Transkripce genů kódujících proteiny je zajišťována RNA polymerázou II (RNA pol II) a tradičně se dělí na několik fází: preiniciační, iniciační, uvolnění promotoru, elongaci a terminaci. Dřívější studie vycházely z předpokladu, že klíčové regulační kroky syntézy RNA se nachází v počátečních stádiích, ve formování preiniciačního a iniciačního komplexu. V posledních letech se však ukázalo, že rovněž elongační fáze je vysoce dynamickým a přísně regulovaným dějem, který ovlivňuje ostatní fáze syntézy a zrání mRNA. Jednotlivé kroky zrání mRNA, jako je tvorba čepičky, sestřih, úprava 3' konce, nebo export mRNA jsou modulovány prostřednictvím interakcí s elongačním komplexem RNA pol II (Sims, III et al., 2004).

Největší podjednotka RNA pol II, RPB1, má charakteristickou C-koncovou doménu (CTD), která obsahuje tandemové repetice heptapetidu Tyr-Ser-Pro-Thr-Ser-Pro-Ser (u savců je repetice 52). Fosforylace domény CTD je klíčový regulační

proces a v sekvenci heptapeptidu byla fosforylace popsána na pozicích Ser 2, Ser 5 a Ser 7. Fosforylace na Ser 5 převládá u formy, která je asociovaná s oblastí blízkou promotoru, tj. s iniciační fází transkripce, fosforylace na Ser 2 převládá během elongace. CTD je pro buňku zcela esenciální. S touto doménou interagují faktory, které řídí přestavbu chromatinu, post-transkripční úpravy pre-mRNA a export mRNA (Munoz et al., 2010; Sims, III et al., 2004). Současné poznatky ukazují, že tyto procesy probíhají současně. Význam prostorového a časového propojení dějů podílejících se na genové expresi (tzv. „cotranscriptionality“) je především v integraci regulačních procesů. To bylo ukázáno například při sledování vlivu rychlosti elongace na alternativní sestřih (shrnuto v Munoz et al., 2010).

Při iniciaci transkripce je RNA pol II fosforylována na pozici Ser 5 kinázou Cdk7 (Cdk7 v komplexu s cyklinem H tvoří obecný transkripční faktor TFIIF), dojde k vytvoření preiniciačního komplexu a syntéze krátkého úseku RNA (okolo 50 nukleotidů). V této fázi dochází k pozastavení syntézy molekuly RNA. Na Ser-5 se váže enzymový komplex, který na krátkém úseku RNA vytvoří 5' čepičku (Lenasi and Barboric, 2010). Za toto tzv. „pauzování“* RNA pol II jsou odpovědné především dva faktory: DSIF a NELF. Pro přechod do elongační fáze je potřeba funkce elongačního faktoru P-TEFb, který fosforyluje serinové zbytky domény CTD na pozici 2. Doména CTD fosforylovaná na pozicích Ser 2 navíc váže sestřihové faktory, jako jsou proteiny SR (proteiny bohaté na Arg-Ser) SF2/ASF a SPT6 (tyto faktory zprostředkovávají vazbu U1 snRNP a dalších komponent spliceosomu) a rovněž váže faktory podílející se na polyadenylaci a štěpení 3' konce mRNA (PCF11). Tím dojde ke vzájemné koordinaci dějů účastnících se zrání mRNA. Po terminaci transkripce je doména CTD působením fosfatázy FCP1 defosforylována (Lenasi and Barboric, 2010; Sims, III et al., 2004).

Elongační faktor P-TEFb

P-TEFb je heterodimer, který se skládá z kinázy Cdk9 (cyclin-dependent kinase 9) a jednoho z cyklinů typu C (T1, T2a, T2b, nebo K) (Kohoutek, 2009). P-TEFb se v buňce vyskytuje ve dvou formách, v aktivní a neaktivní a udržování

* Zde i nadále v textu uvádím termín „pauzovaná“ RNA pol II v uvozovkách, protože to může popisovat různé (vzájemně se nevylučující) situace: polymerázový komplex sestavený na promotoru a čekající na aktivaci elongace, nebo dynamicky asociující komplex, který provede jen počáteční syntézu krátkého úseku RNA, a poté z DNA disociuje.

vzájemného poměru těchto dvou forem v rovnováze je jedním z mechanismů regulace transkripce. Větší frakce P-TEFb se nachází v komplexu 7SK snRNP (7SK small nuclear ribonucleoprotein), kde je kinázová aktivita potlačena. Komplex 7SK snRNP vedle P-TEFb obsahuje řadu dalších proteinů, pro funkci P-TEFb je nejdůležitější protein Hexim 1 a 2, který specificky inhibuje kinázovou aktivitu P-TEFb. Volný P-TEFb asociuje s proteinem BRD4. BRD4 se váže na acetylované konce histonů a zřejmě tak umožňuje lokalizaci do míst aktivní transkripce (Zhou and Yik, 2006). Pozitivní působení P-TEFb na „pauzovanou“ RNA pol II spočívá jednak ve fosforylaci serinových zbytků Ser 2 v doméně CTD a rovněž ve fosforylaci faktorů DSIF a NELF. Fosforylace NELF vede k disociaci z polymerázy a fosforylovaný DSIF se stává pozitivním elongačním faktorem (Lenasi and Barboric, 2010).

Mechanismů, které zprostředkovávají uvolnění P-TEFb z komplexu 7SK snRNP a tím jeho aktivaci, je známo více. Fyziologicky nejvýznamnější je acetylace cyklinu T1 působením acetyltransferázy p300 (Cho et al., 2009). K aktivaci P-TEFb může dojít i za stresových podmínek, kdy působením MDM2 (p53-specifická E3 ubiquitin ligáza) dojde k vazbě ubiquitinu na Hexim1 a tím potlačení inhibiční funkce proteinu Hexim (Lau et al., 2009). Při infekci virem HIV-1 dochází ke kompetici mezi virovým proteinem Tat a proteinem Hexim o vazbu na P-TEFb. Na Tat-P-TEFb se váže virová RNA TAR, která má strukturní homologii s 7SK RNA. Komplex Tat-TAR-P-TEFb poté aktivuje transkripci virových genů (Egloff et al., 2006).

4.4.2 Protein p53

K aktivaci p53 dochází v odpovědi na poškození DNA, hypoxii, při změněné regulaci onkoproteinů a při jiných stresových situacích (Pluquet and Hainaut, 2001). Vlivem p53 dojde v závislosti na konkrétním podnětu k dočasné zástavě buněčného cyklu, případně senescenci (permanentní zástava buněčného cyklu). Pokud je poškození příliš veliké, je působením p53 aktivována apoptóza (Mattia et al., 2007). Protein p53 sekvenčně specificky váže DNA, působí primárně jako transkripční regulátor a je v buňce udržován ve velmi malém množství. To je způsobeno vazbou

proteinu MDM2, ubiquitinací a následnou degradací. Pokud dojde k poškození DNA (ionizační záření, UV, různé chemické vlivy), je aktivována kináza ATM, která fosforyluje a tím stabilizuje p53 (fosforylace brání vazbě MDM2) a následně dochází k akumulaci p53 v jádře. p53 poté působí jako transkripční faktor pro velké množství genů, které by se daly rozdělit do skupin podle následného efektu. Buď dojde k zástavě buněčného cyklu, k opravě DNA, nebo k apoptóze (Kruse and Gu, 2009). Mezi nejvýznamnější geny první skupiny patří *p21^{WAF1/CIP1}* (dále jen *p21*) a *14-3-3 σ* . Protein p21 je inhibitor cyklin dependentních kináz (CDK) a jeho aktivace vede k zástavě ve fázi G1 buněčného cyklu (Shu et al., 2007). Protein 14-3-3 σ (též označovaný jako stratifin) po aktivaci zastaví buňky ve fázi G2 (Hermeking et al., 1997).

Vlivem aktivace p53 dochází k expresi miRNA z rodiny miR-34. Efekt miR-34 se rovněž projeví v zástavě buněčného cyklu. Vedle potlačení exprese v důsledku inaktivace funkce p53, byla u některých nádorů detekována přímo snížená exprese miR-34. To může být způsobeno buď mutací genů kódujících miR-34, nebo epigenetickou inaktivací (Hermeking, 2007). Bylo rovněž ukázáno, že globální inhibice syntézy mRNA vede k aktivaci faktoru p53 a transkripci specifických stresových genů (Gomes et al., 2006). Jde svým způsobem o unikátní situaci, která má své vysvětlení v mechanismu regulace genové exprese za stresových podmínek.

4.4.3 Transkripce genů při genotoxickém stresu

Genotoxický stres označuje takové fyzikální či chemické vlivy, které v buňce vedou k poškození DNA. To v důsledku může vést k zastavení buněčného cyklu, nebo k apoptóze. Mezi tyto vlivy patří například UV ozáření, které vede k vytvoření kovalentní vazby u dvou sousedních pyrimidinů v molekule DNA. Hydroxyurea inhibuje enzym ribonukleotid reduktázu, to vede k nedostatku dNTP v buňce a zastavení replikace. Actinomycin D se váže na dvouřetězcovou DNA a brání transkripci a replikaci. Doxorubicin je látka, která se vmezeřuje mezi sousední nukleotidy v DNA (interkalace), brání funkci enzymu topoizoméráza II a tím zastavuje transkripci ((Espinosa et al., 2003; Gottifredi et al., 2001; Ljungman et al., 1999; Mattia et al., 2007).

Určité geny jsou přepisovány i za situace, kdy je buňka vystavena stresovým podmínkám, které vedou ke globální zástavě transkripce (Espinosa et al., 2003; Gottifredi et al., 2001; Mattia et al., 2007). Vysvětlení tohoto jevu spočívá v mechanismu, jakým jsou stresové geny regulovány. Bylo ukázáno, že iniciační komplex je na promotoru genů, jako je *p21* (Espinosa et al., 2003), *c-myc* (Krumm et al., 1992), nebo *hsp70* (Rougvie and Lis, 1988), sestaven a „pauzován“ v okamžiku, kdy je vytvořen krátký transkript. RNA pol II je na genu *p21* regulována v post-iniciačním kroku. „Pauzovaná“ RNA pol II se na promotoru sestaví ještě před stresovým stavem. Stres vede k aktivaci p53 a protein p53 následně indukuje konverzi „pauzovaného“ komplexu na elongační formu. Regulace těchto genů se tak děje především na úrovni elongace, nikoliv iniciace (Espinosa et al., 2003). Je zajímavé, že proapoptotické geny regulované proteinem p53 obsahují ve svém promotoru menší množství „předpřipravené“ RNA pol II než geny, které vedou k zastavení buněčného cyklu. To ukazuje na odlišný regulační mechanismus těchto genů (Gomes and Espinosa, 2010).

Po aktivaci elongační fáze se na oblast genu *p21* váže kináza Cdk9. Za běžných podmínek má tato vazba za následek fosforylaci DSIF a NELF a následnou disociaci transkripčního faktoru NELF. Nicméně bylo ukázáno, že toto není klíčový krok pro přechod z „pauzovaného“ na elongační komplex. Při inhibici Cdk9 pomocí DRB nedošlo k zabránění transkripce genu *p21* (Gomes et al., 2006). Rovněž při použití flavopiridolu (podobně jako DRB inhibuje kinázovou aktivitu Cdk9) na buňky *D. melanogaster*, nedošlo k potlačení transkripce z genů *hsp70* a *hsp26* (Ni et al., 2004). Kvantitativní CHIP analýza ukázala, že Cdk9 se v lokusu genu *p21* váže až okolo 200 bází od místa startu transkripce. To naznačuje, že tato kináza se k transkripčnímu komplexu přidružuje až po uvolnění z „pauzovaného“ stavu (Gomes et al., 2006). Experimenty využívající inhibitor DRB ukázaly, že aktivita Cdk9 je postradatelná pro některé geny, které jsou indukovány proteinem p53 (Gomes et al., 2006). Výsledky v této práci ukazují, že existují tři skupiny genů, dělené podle toho, zda je elongační faktor P-TEFb nezbytný pro jejich transkripci:

- 1) geny na P-TEFb nezávislé; po působení DRB i doxorubicinu jsou aktivovány transkripčním faktorem p53 (například geny *p21* a *PUMA*).

2) geny na P-TEFb závislé; po působení doxorubicinu jsou aktivovány transkripčním faktorem p53; inkubace s DRB vede k potlačení jejich exprese (*14-3-3 σ* a *DR5/Killer*).

3) „housekeeping“ geny; jejich exprese není indukována genotoxickým stresem.

Podrobnější informace na toto téma přinesla recentní publikace, která upřesňuje mechanismus „pauzování“ RNA pol II u proapoptického genu *PUMA* (je aktivován proteinem p53) (Gomes and Espinosa, 2010). Velká frakce lokusu genu *PUMA* (prvních 6 kb) je kontinuálně přepisována, nezávisle na p53. Jsou generovány dlouhé nesestřížené RNA, u kterých není známo, že by kódovaly známý produkt (například mikro RNA). RNA pol II je fosforylována na Ser 2 i Ser 5 a součástí polymerázového komplexu jsou obecné transkripční faktory (TBP, TFIID, TFIIF), komponenty mediátorového komplexu i P-TEFb. Tato oblast je ohraničena intergenovým rozhraním (cohesinový komplex a protein CTCF). Po aktivaci p53 RNA pol II překoná toto rozhraní a přepisuje celý gen. Význam vznikajících PUMA-TUF* není znám, ale je pravděpodobné, že jde o další úroveň regulace genové exprese, vzhledem k množství jaké tento druh RNA v jádře zaujímá (Gomes and Espinosa, 2010; Lindberg and Lundeberg, 2010).

4.4.4 Protein SNW1

SNW1 je jaderný protein a účastní se dějů při regulaci genové exprese a sestříhu (shrnutí ve Folk et al., 2004). Byla prokázána jeho interakce s transkripčními faktory, jako je receptor vitamínu D (Baudino et al., 1998), CBF1 (Zhou et al., 2000), Smad 2/3 (Leong et al., 2001), MyoD (Kim et al., 2001), LEF1 (Wang et al., 2010) a podílí se na vazbě aktivačních i transkripci potlačujících komplexů (Zhou et al., 2000). Z dosud známých dat se dá usuzovat, že tento protein

* Termín TUF (transcript of unknown function) byl zaveden konsorciem ENCODE pro transkripty nazývané non-coding RNA (ncRNA) (Kapranov 2007). Pouze 1-2% lidského genomu odpovídá exonovým oblastem, nicméně se ukazuje, že většina genomu je potenciálně transkribována. V jádře je pět krát víc přepisované RNA než v cytoplazmě a zhruba 80% odpovídá neanotovaným částem genomu. TUF se zavedlo jak označení pro ty transkripty, které by potenciálně mohly kódovat nějaké proteiny, nebo peptidy a mohly by mít regulační úlohu (více v Kapranov et al., 2007; Lindberg and Lundeberg, 2010).

působí pravděpodobně jako tzv. „scaffold“, nebo jako adaptorový protein v různých jaderných komplexech.

Protein SNW1* patří do rodiny proteinů označované SNW, které obsahují unikátní aminokyselinovou sekvenci S-N-W-K-N v centrální doméně. Jde o vysoce konzervované proteiny a jejich přítomnost je pro organismus esenciální (Ambrozkova 2001). U organismů se známým genomem byla nalezena pouze jedna funkční kopie na genom, v lidském genomu byly nalezeny tři sekvence pro SNW1, v myším pět, nicméně pouze jedna z nich dává funkční mRNA produkt (Hou et al., 2009). V několika fosfoproteomických studiích byla nalezena fosforylovaná forma proteinu SNW1 a to na místech Ser 224, Ser 232 a Ser 234 (Kim et al., 2005; Molina et al., 2007). Fosforylace na Ser 224 byla prokázána i experimentálně (Tang et al., 2005). Nicméně u žádné fosforylace nebyla prokázána funkční souvislost, nebo vliv na lokalizaci. U organismu *Schistosoma mansoni* byla ukázána acetylace SmNCoA-62/SNW1 (Fantappie et al., 2008) a u *Saccharomyces cerevisiae* byla prokázána sumoylace proteinu Prp45p/SNW1 (Reindle et al., 2006).

SNW1 byl nalezen jako součást sestřihových komplexů, prvně v tzv. interchromatinových granulích (IGC; interchromatin granule clusters) (Mintz et al., 1999). IGC jsou denzní granule v nukleoplazmě původně popsány na snímcích z elektronového mikroskopu a odpovídají „splicing speckles“, komplexům bohatým na sestřihové faktory. Později byl SNW1 prokázán jako součást spliceosomu (Makarov et al., 2002). Nejintenzivněji byla role proteinu SNW1 v sestřihu studována v kvasince *Saccharomyces cerevisiae*. Pomocí hmotnostní spektrometrie byl nalezen v sestřihových komplexech Cdc5p/Cef1p (Ohi et al., 2002) a penta-snRNP (Stevens et al., 2002). Byla prokázána jeho interakce s Prp46p a Prp22p (Albers et al., 2003). Prp22p je tzv. DEAH-box helikáza, která je nezbytná pro druhý krok sestřihu a pro uvolnění sestřižené mRNA ze spliceosomu. Prp45p/SNW zřejmě napomáhá vazbě Prp22p a ovlivňuje sestřih substrátů s odlišnostmi v konsenzus sestřihových místech (více v Gahura et al., 2009).

Bylo ukázáno, že SNW1 interaguje s proteinem pRb. pRb udržuje buňky ve fázi G0 a G1 buněčného cyklu a blokuje buněčné dělení. Společná ektopická exprese SNW1 s proteinem Ski dokáže inhibovat funkci pRb a obejít tak

* Protein SNW1 má více různých jmen, u savců: SKIP, SKIIP (Ski-interacting protein), NCoA-62 (Nuclear receptor coactivator), u dalších organismů: BX42 (*D. melanogaster*), SnwA (*D. discoideum*), Prp45p (*S. cerevisiae*). V textu se držím jména SNW1 (SNW domain-containing protein 1), pod kterým je vedený v databázi Uniprot.

zablokování v G1 fázi (Prathapam et al., 2002). Snížením exprese SNW1 pomocí siRNA došlo u dělících se buněk k defektnímu jadernému dělení (Kittler et al., 2004; Neumann et al., 2010).

Bylo ukázáno, že protein SKIP/SNW1 asociuje s P-TEFb a s komplexy Tat:P-TEFb, Tat:P-TEFb:TAR RNA a tri-snRNP110K (Bres et al., 2005). Tat vyvazuje P-TEFb pro transkripci virových genů a SNW1 v tomto kontextu působí pozitivně na elongaci, ale nemá vliv na iniciaci transkripce. V této práci bylo rovněž ukázáno, že nadprodukce proteinu SNW1 má vliv na alternativní sestřih z transkriptu HIV-1. Později bylo ukázáno, že se SNW1 váže na komplex Tat:P-TEFb:TAR RNA po asociaci s „pauzovanou“ RNA pol II a pomáhá vyvazovat další faktory (c-Myc, TRRAP; TRRAP působí jako „scaffold“ pro histonové acetyltransferázy) nezbytné pro transkripci HIV-1. Překvapivé bylo zjištění, že P-TEFb i SNW1 jsou postradatelné pro transkripci HIV-1 po ozáření UV světlem (Bres et al., 2009). To ukazuje, že vedle transkripce zprostředkované faktorem P-TEFb zřejmě existuje i jiný mechanismus pro transkripci HIV-1, který se uplatňuje při stresových podmínkách. Podobná situace byla popsána při expresi genu *p21* při genotoxickém stresu (Gomes et al., 2006).

Protein SNW1 byl nalezen jako interakční partner produktů některých protoonkogenů, nicméně přímá změna v hladině exprese genu nebo proteinu SNW1 v nádorové linii byla dokumentována jen v několika málo pracích. Při porovnání změn genové exprese po vystavení buněk 17 β -estradiolu (E2) u netumorogenní lidské linie epiteliálních buněk vaječníku a tří nádorových linií buněk vaječníku byl mezi nalezenými geny i *SNW1*, jehož exprese byla větší u nádorové linie. Vystavení působení E2 u kontrolní linie vedlo ke zvýšené expresi SNW1, zatímco u nádorové linie ke snížení. Další experimenty na těchto buněčných liniích ukázaly, že SNW1 má pozitivní vliv pro růst nezávislý na podkladu (Syed et al., 2005). Recentně bylo ukázáno, že potlačení produkce proteinu SNW1 vede k inhibici epiteliálně-mezenchymálního přechodu indukovaného faktorem TGF- β (Villar et al., 2010). Rovněž bylo ukázáno, že protein SNW1 je nezbytný pro migraci buněk a invazi do Matrigelu. V buňkách s potlačenou expresí SNW1 bylo detekováno snížené množství proteázy uPA a zvýšená produkce inhibitoru plasminogenu PAI-1 (proteázový systém uPA je významný v nádorové invazivitě, viz. kap. 4.2.6). Tyto výsledky ukazují na významnou roli proteinu SNW1 při vzniku i migraci nádorových buněk.

5 Hlavní cíle práce

Hlavní cíle práce byly následující:

- 1) analýza způsobů a mechanismů invazivity metastatických sarkomových buněk;
- 2) porovnání invazivních vlastností buněk prsního nádoru;
- 3) detailní popis invazivních struktur nádorových buněk;
- 4) analýza vlivu proteinu SNW1 na expresi genů indukovaných v odpovědi na stres.

Tato disertace se opírá o čtyři práce, které již byly publikované a o jednu práci, která byla zaslána k publikaci (k datu podání disertační práce).

1. Rösel D, Brábek J, **Tolde O**, Mierke CT, Zitterbart DP, Raupach C, Bicanová K, Kollmannsberger P, Panková D, Vesely P, Folk P, Fabry B. (2008). Up-regulation of Rho/ROCK signaling in sarcoma cells drives invasion and increased generation of protrusive forces. *Mol Cancer Res.* 6(9):1410-20. (IF 4.162)
2. Veselý P, Rösel D, Panková D, **Tolde O**, Blase C, Matousková E, Folk P, Brábek J, Bereiter-Hahn J. (2009). Confocal microscopy reveals Myzitis and Vthela morphotypes as new signatures of malignancy progression. *Scanning* 31(3):102-6. (IF 1.256)
3. **Tolde O**, Rösel D, Mierke CT, Paňková D, Folk P, Vesely P, Brábek J. (2010) Neoplastic progression of the human breast cancer cell line G3S1 is associated with elevation of cytoskeletal dynamics and upregulation of MT1-MMP. *Int J Oncol.* 36(4):833-9. (IF 2.447)
4. **Tolde O**, Rösel D, Veselý P, Folk P, Brábek J. (2010) The structure of invadopodia in a complex 3D environment. *Eur J Cell Biol.* 89(9):674-80. (IF 3.314)
5. **Tolde O.**, Folk P. Stress induced expression of p53-target genes is resistant to SNW1/SKIP depletion.

6 Diskuse výsledků

Up-Regulation of Rho/ROCK Signaling in Sarcoma Cells Drives Invasion and Increased Generation of Protrusive Forces

(1. publikace)

Vztah mezi améboidním a mezenchymálním způsobem migrace nádorových buněk se stal předmětem výzkumu několika posledních let. Mezenchymální migrace byla dlouho považována za hlavní způsob, kterým se nádorové buňky dostávají z místa svého vzniku, skrz mezibuněčnou hmotu a do cévního systému. Při tomto způsobu migrace se využívá činnosti enzymů štěpících mezibuněčnou hmotu. Enzymy mohou být sekretované nebo membránově vázané a jejich působením dochází k vytváření mezer v mezibuněčné hmotě, kterými se buňky protáhnou. Mezenchymálně migrující buňky mají charakteristická aktinová stresová vlákna, která jsou důležitá pro buněčnou kontrakci. Améboidní migrace je nezávislá na činnosti proteáz, ale je závislá na činnosti kinázy ROCK, jejímž působením dochází ke generování síly na přední části buňky. To vede k deformaci mezibuněčné hmoty a buňky se okolní matricí protlačí (Wyckoff et al., 2006). U améboidních buněk je myosin lokalizován na přední části buňky, kde je působením kinázy ROCK fosforylován (Wyckoff et al., 2006). Mezenchymální a améboidní způsoby migrace se vzájemně nevyklučují a většina dosud zkoumaných améboidních linií k invazivitě využívala činnosti sekretované proteázy, avšak při působení proteázových inhibitorů došlo k mezenchymálně-améboidnímu přechodu. Bylo ukázáno, že vystavení sarkomových buněk HT-1080 a karcinomových buněk MDA-MB-231 působení inhibitorů proteáz nevede k potlačení invazivity a dochází k mezenchymálně-améboidnímu přechodu (Wolf et al., 2003).

Pro studium způsobů a mechanismů invazivity byly v naší laboratoři použity sarkomové buněčné linie LW13K2 (K2) a A337/311RP (A3). Buňky linie K2 jsou spontánně transformované krysí embryonální fibroblasty, buňky linie A3 jsou od linie K2 odvozené neoplastickou progresí (Cavanna et al., 2007). Linie K2 je nemetastatická a tvarem podobná fibroblastům, buňky jsou protáhlé s výraznými

aktinovými stresovými vlákny. Jde o buňky mezenchymálního původu, byla u nich detekována sekrece metaloproteázy MMP-2 a slabá schopnost štěpit gelatin (nanesený na krycím sklíčku). Linie A3 je vysoce metastatická, ale bylo u ní detekováno jen velmi malé množství neaktivní proformy enzymu MMP-2, aktivní forma nebyla detekována.

Pro získání přesnějších informací o rozdílech v signalizaci mezi těmito dvěma liniemi byla provedena proteinová microarray analýza (Kinex). Tato metoda sleduje expresi a fosforylační status vybraných proteinů signálních drah, v našem případě šlo o využití 600 různých protilátek, 350 pan-specifických a 250 fosfo-specifických. Bylo nalezeno 83 významných rozdílů. Byla patrná zvýšená aktivita signální dráhy Rho/ROCK u linie A3. Bylo zjištěno zvýšení exprese kinázy ROCK-1 a LIMK1 a snížení exprese negativního regulátoru PAK1 a rovněž byla nalezena výrazně nižší fosforylace integrinu $\beta 1$. Tato data byla posléze potvrzena pomocí imunoblotů. Analýza Kinex ukázala i zvýšenou produkci proteinu cofilin. Cofilin se podílí na přestavbě aktinového cytoskeletu a je regulován kinázami ROCK-1 a LIMK1.

Ve spolupráci s laboratoří profesora Fabryho (Erlangen, Německo) byla sledována dynamika cytoskeletu a byla měřena pevnost fokálních adhezí u buněk linií K2 a A3. Rychlé přestavby cytoskeletu a fokálních adhezí umožňují vyšší invazivitu nádorových buněk, zatímco stabilní adhezivní struktury fungují jako brzda v pohybu (Totsukawa et al., 2004). Byla provedena analýza „nanoscale particle tracking“, která ukázala na zvýšenou dynamiku kortikálního cytoskeletu u linie A3. Dále byla použita metoda „magnetic tweezer“ na měření pevnosti fokálních adhezí. V této metodě se používají magnetické kuličky potažené fibronectinem. Buňky při kontaktu s takto upravenými kuličkami vytváří spoje prostřednictvím integrinů a dalších proteinů fokálních adhezí s buněčným skeletem (Mierke et al., 2008). Linie A3 vykazovala signifikantně slabší vazby než linie K2, což je v souladu s vyšší pohyblivostí buněk linie A3 a s vyšší dynamikou buněčného skeletu. Zvýšená aktivita signální dráhy Rho/ROCK umožňuje koncentrování MLC v kortikální části buněk a následné generování síly pro pohyb mezibuněčnou hmotou (Wyckoff et al., 2006). Pro měření kontraktilních sil byla použita metoda využívající akrylamidové gely, které mají povrch pokrytý kolagenem a uvnitř gelů jsou inkorporovány fluorescenční kuličky. Na gely se umístí buňky a měří se změna

pozice kuliček (při známé tuhosti gelů). Trakční síly na vedoucím okraji buněk linie A3 byly sedmkrát vyšší než u linie K2.

Signalizace Rho/ROCK vede k fosforylaci lehkého řetězce myosinu, a jak bylo ukázáno, u linie A3 je oproti K2 vyšší úroveň signalizace Rho/ROCK. Na sérii mikroskopických obrázků jsme ukázali nabohacení fosforylované formy MLC2 na vedoucím okraji buněk A3, kde byla i patrná společná lokalizace s aktinovými strukturami, tzv. „ruffles“. U linie K2 byla společná lokalizace aktinu a myosinu nejvýraznější na konci buněk, který je během pohybu zatahován. Pro ověření hypotézy, že pohyb buněk linie A3 je závislý na signalizaci Rho/ROCK, jsme provedli test invazivity v kolagenu a Matrigelu. Buňky linie A3 v těchto matricích vykazovaly vyšší invazivní potenciál než buňky linie K2. Nicméně pokud byl test proveden v přítomnosti inhibitoru Y-27632 (inhibitor kinázy ROCK), došlo u linie A3 k 60% poklesu invazivity. V přítomnosti inhibitoru GM6001 (širokospektrý inhibitor metaloproteáz) nebyla migrace výrazně ovlivněna ani u jedné linie.

Naše výsledky ukazují, že buňky mezenchymálního původu mohou používat améboidní (považovaný za ne-mezenchymální) způsob migrace jako jejich primární invazivní mechanismus. Tato migrace je závislá na aktivitě kinázy ROCK a není závislá na enzymech štěpících mezibuněčnou hmotu. V naší práci jsme ukázali, že na vedoucím okraji migrujících améboidních buněk dochází ke generování síly, která je nezbytná pro deformaci mezibuněčné hmoty. U mezenchymálních buněk nejsou trakční síly tak výrazné a jsou lokalizované do míst, kde dochází ke kontrakci stresových vláken, například zatahující se konec buněk.

Confocal Microscopy Reveals *Myzitis* and *Vthela* Morphotypes as New Signatures of Malignancy Progression

Neoplastic progression of the human breast cancer cell line G3S1 is associated with elevation of cytoskeletal dynamics and upregulation of MT1-MMP

(2. a 3. publikace)

Neoplastická progrese buněk karcinomu je často spojena se zvýšenou schopností buněk invadovat skrz bariéru mezibuněčné hmoty (Terranova et al.,

1986). Améboidní a mezenchymální migrace představují dva krajní způsoby, které buňky mohou využít. Při mezenchymálním módu migrace dochází k sekreci enzymů, které štěpí složky mezibuněčné hmoty. Především jde o proteázy z proteinových rodin metaloproteáz, serinových proteáz a cysteinových proteáz (van Hinsbergh et al., 2006). Vedle aktivace proteáz dochází i ke změnám ve struktuře a dynamice cytoskeletu. K degradaci mezibuněčné hmoty dochází nejčastěji v blízkosti podosomů a invadopodií. Podosomy se běžně vyskytují například v monocytech, dendritických buňkách, osteoklastech a některých endoteliálních buňkách; invadopodia byla popsána především u nádorových buněk (Linder, 2007).

Pro studium změn, které se odehrávají v nádorových buňkách, je výhodné využít buněčných linií, které jsou k sobě navzájem příbuzné, ale liší se svým metastatickým potenciálem. Tento přístup umožňuje odhalit morfologické nebo genetické změny, které se odehrávají v časných stádiích vzniku nádorů. V uvedených dvou pracích jsme se zaměřili na charakterizaci buněčné linie EM-G3 a G3S1. EM-G3 je klonální linie odvozená z primární léze ductální oblasti karcinomu prsu (Brozova et al., 2007). Buňky linie EM-G3 byly vystaveny chronickému nutričnímu stresu a působení TPA, aktivátoru protein kinázy C. Tato procedura vedla ke vzniku linie G3S1. Obě linie byly následně porovnávány z hlediska jejich invazivního potenciálu.

Studium invazivity se nejčastěji provádí v komůrkách, kde jsou dva oddělené prostory, mezi nimiž je bariéra tvořená složkami mezibuněčné hmoty (například Matrigel). Do jednoho prostoru se umístí buňky, ve druhém je chemoatraktant (v našem případě médium se sérem). G3S1 vykazovala 2,5x větší invazivitu než linie EM-G3. Pro analýzu morfologických změn byl použit HBSS test (Vesely et al., 2006). HBSS test je založen na sledování buněk během přisedání na sklíčko (čisté, nebo potažené kolagenem). Sleduje se, jaké struktury se vytváří v první hodině přisedání a po fixáži se buňky barví na aktin a fosfotyrosin. U G3S1 byla pozorována lamela po celém okraji kontaktu buňky se sklíčkem. Rozdíl ve schopnosti degradovat mezibuněčnou hmotu jsme analyzovali pomocí zymografie, kdy byla sklíčka potažena gelatinem obarveným FITC. Buňky linie G3S1 vykazovaly větší potenciál degradovat gelatin a tuto degradaci bylo možné potlačit působením metaloproteázových a uPA inhibitorů. Na příčných řezech, pořízených rekonstrukcí z optických řezů na konfokálním mikroskopu, jsou patrná

invadopodia v místech degradovaného gelatinu. V dalších experimentech bylo ukázáno, že v buňkách G3S1 je přítomno větší množství proteázy MT1-MMP. Nicméně tato linie v porovnání s EM-G3 produkuje menší množství aktivní formy proteáz MMP2 a uPA.

Pomocí metody „nanoscale particle tracking“ byla ukázána vyšší dynamika kortikálního cytoskeletu u linie G3S1. Zvýšenou dynamiku aktinového cytoskeletu potvrzuje i vyšší fosforylace cofilinu a nárůst v produkci kinázy LIMK1. Porovnání invazivity těchto dvou linií v 3D prostředí při působení různých inhibitorů ukázalo jednak na citlivost k metaloproteázovému inhibitoru GM6001, ale i k latrunculinu. Latrunculin, inhibitor polymerace aktinu, byl použit ve velmi nízké koncentraci (100 nM), při které nemá vliv na buněčnou morfologii.

Byla dokumentována zvýšená invazivita u nádorové linie G3S1, která je odvozená od linie získané z karcinomu prsu. Při porovnání této linie s linií mateřskou bylo ukázáno, že tato vyšší invazivita je způsobena membránově vázanou metaloproteázou MT1-MMP, nikoliv sekretovanými enzymy (MMP2, nebo uPA). Rovněž byla prokázána vyšší dynamika aktinového skeletu, podobně jako u předchozí práce, kde se srovnávaly sarkomové buněčné linie K2 a A3. Podstatná je také informace, že už u progenitorové linie EM-G3 byla pozorována invadopodia, struktury popisované hlavně v metastatických nádorových liniích (Linder, 2007). Tato studie tak dokumentuje tvorbu invazivních struktur již během ranné fáze maligní transformace.

The structure of invadopodia in a complex 3D environment

(4. publikace)

Invadopodia a podosomy byly v posledních letech intenzivně studovány, protože bylo ukázáno, že se tyto struktury podílí na degradaci mezibuněčné hmoty a tím přispívají k metastatickému potenciálu nádorových buněk (Block et al., 2008; Gimona et al., 2008). Nicméně většina studií, která se zabývala detailním popisem invazivních struktur, byla prováděna ve 2D uspořádání, tzn. převážně na mikroskopických sklíčkách. Ačkoliv tyto studie přinesly mnoho podstatných informací o složení a fungování invadopodií a podosomů, struktura těchto útvarů

ve 3D prostředí není zcela objasněna. Dobře popsané jsou multi-podozomové útvary u osteoklastů, nazývané „sealing zone“, které fungují při resorpci kostní tkáně (Luxenburg et al., 2007). Avšak kontakt buněk s kostní tkání je zcela specifická situace, která jako jediná v těle částečně připomíná kontakt buňky s mikroskopickým sklíčkem. V ostatních tkáních, mezibuněčné hmotě, nebo cévních stěnách jsou buňky vystaveny zcela odlišnému prostorovému uspořádání svého okolí. Pro popis buněk ve 3D prostředí se běžně používají různé gely (kolagen, Matrigel, hydrogel), ale s těmito gely je obtížná manipulace, pokud chceme provádět některé metody, jako je například imunolokalizace. Zavedli jsme použití bezbuněčné prasečí dermis jako vhodného materiálu, který je dostatečně pevný pro manipulaci, ale současně se více přibližuje situaci *in vivo*.

Jako modelovou buněčnou linii jsme použili Src-transformované krysí sarkomové buňky linie RsK4. U sarkomových buněk byla invaze do dermis dokumentována již dříve (Berdeaux et al., 2004) a linie RsK4 vytváří velké množství invazivních struktur (Vesely et al., 2006). Kontrolní pozorování buněk RsK4 rostlých na sklíčkách potvrdilo charakteristickou strukturu PTA (podosome-type adhesions). Střední část PTA je tvořená aktinem a cortactinem, okolo je kruh značený paxillinem a celá PTA pak má výrazný signál fosfotyrosinu. V blízkosti PTA dochází k degradaci gelatinu (značený FITC). Ukázali jsme, že buňky RsK4 vyseté na bezbuněčnou dermis jsou schopny invaze dovnitř matrix a že tato invaze je citlivá vůči inhibitoru metaloproteáz GM6001. Invaze byla dokumentována jak pomocí fluorescenční mikroskopie, tak pomocí skenovací elektronové mikroskopie (SEM). SEM navíc ukázala, že buňky narušují kolagenová vlákna „pod sebou“ a vytváří tak díry v dermis. Štěpení kolagenových vláken bylo potvrzeno i specifickou protilátkou (C1,2C). Detailní zobrazení invazivních struktur pomocí konfokální mikroskopie ukázalo, že PTA u buněk v dermis mají odlišnou strukturu než u buněk rostlých na sklíčku. Cortactinový a paxillinový signál byl přítomen v základech PTA, ze kterých vyrůstalo větší množství aktin obsahujících filopodií. Ke štěpení docházelo většinou v blízkosti základů PTA struktur, avšak buňky linie RsK4 produkují velmi malé množství membránově vázané metaloproteázy MT1-MMP. Při ektopické expresi GFP-MT1-MMP bylo ukázáno, že ke štěpení dochází i podél tenkých aktinem značených filament. 3D struktura

PTA, tj. báze a z ní vyrůstající tenká filamenta byla potvrzena i pomocí transmisní elektronové mikroskopie.

Zavedli jsme použití bezbuněčné dermis jako modelovou situaci pro studium nádorových buněk. Naše výsledky přispěly k detailnějšímu pochopení struktury invazivních útvarů ve třírozměrném prostředí. Dosavadní poznání vycházelo především z pozorování prováděných na mikroskopických sklíčkách, tj. dvojrozměrného, do jisté míry arteficielního uspořádání. S využitím bezbuněčné dermis se nám podařilo detailně popsat invazivní struktury při uspořádání, která mnohem více připomíná situaci *in vivo*. Studium nádorových buněk za těchto podmínek má význam pro pochopení mechanismů nádorové invazivity a může přinést podstatné informace pro další výzkum vzniku a šíření metastází po těle.

Stress induced expression of p53-target genes is resistant to SNW1/SKIP depletion

(5. publikace)

Adekvátní reakce buňky na stres závisí na schopnosti indukovat přepis skupiny specifických genů. Je nezbytné včas a v dostatečném množství aktivovat regulační i efektorové komponenty stresové odpovědi. Transkripční faktor p53 aktivuje geny, které vedou k zastavení buněčného cyklu nebo k apoptóze v odpovědi na poškození DNA, hypoxii, nebo jiné stresové situace (Pluquet and Hainaut, 2001). Přepis některých genů indukovaných p53 (například *p21* nebo *PUMA*) je regulován na úrovni post-iniciační fáze transkripce (Espinosa et al., 2003; Gomes et al., 2006). U genu *p21* byla vyslovena hypotéza, že transkripční komplex RNA pol II je zastaven („paused“, nebo též „poised“) v post-iniciačním kroku a exprese genu je regulována uvolněním komplexu (Espinosa et al., 2003).

Kontrola exprese v post-iniciačním kroku vyžaduje regulaci prostřednictvím pozitivních i negativních elongačních faktorů. Pozitivní elongační faktor P-TEFb je vyvazován do oblasti genu *p21* po aktivaci signalizace p53 (Gomes et al., 2006). P-TEFb je dimerní komplex kinázy Cdk9 a cyklinu typu C. Aktivita kinázy Cdk9 vede k fosforylaci C-terminální domény RNA pol II na pozici Ser2 heptapeptidové

repetice a k fosforylaci negativního elongačního faktoru DSIF. Následně dojde k odblokování elongační fáze transkripce (Lenasi and Barboric, 2010). Vlivem působení specifického inhibitoru kinázy Cdk9 (DRB) dojde ke globálnímu potlačení syntézy mRNA. Bylo však ukázáno, že aktivace genů indukovaných transkripčním faktorem p53 zůstává téměř nezměněna (Gomes et al., 2006). Výsledky zmíněné práce ukazují, že v reakci na DRB dojde k přepisu genů *p21* a *PUMA* a že pro přepis těchto genů není nezbytná fosforylace na pozici Ser2 v doméně CTD RNA pol II. Naproti tomu, stresový protein 14-3-3 σ , pro jehož produkci je nezbytná aktivita P-TEFb, nebyl v přítomnosti DRB produkován. Pomocí tohoto specifického inhibitoru tak lze rozlišit geny, jejichž přepis je závislý na aktivitě elongačního faktoru P-TEFb od genů, jejichž přepis probíhá i při inhibici aktivity kinázy P-TEFb.

Proteiny rodiny SNW se účastní regulace iniciace i elongace transkripce a sestřihu. Bylo ukázáno, že protein SNW1 je rovněž nezbytný pro přepis genů viru HIV-1 (Bres et al., 2005). Autoři publikace ukázali, že protein SNW1 se váže na komplex Tat:P-TEFb:TAR RNA. Dle této studie má SNW1 pozitivní vliv na elongaci transkripce virových genů a hladina exprese SNW1 ovlivňuje alternativní sestřih genů HIV-1. Cílem naší práce bylo zaměřit se na roli proteinu SNW1 za situace, kdy buňky nejsou infikovány virem, ale jsou vystaveny stresovým podmínkám. Vzhledem ke známé interakci proteinu SNW1 a elongačního faktoru P-TEFb jsme se zajímali, jaký vliv bude mít potlačení produkce proteinu SNW1 na přepis genů závislých nebo naopak nezávislých na aktivitě P-TEFb při stresu.

Jaderná lokalizace proteinu SNW1 připomíná distribuci sestřihových proteinů (Kim et al., 2001; Oswald et al., 2002). Sestřihové proteiny se v jádře akumulují v kompartmentech označovaných jako „speckles“ a tyto jaderné domény se typicky vyskytují v těsné blízkosti míst transkripce (Sutherland and Bickmore, 2009). V naší práci jsme se zabývali popisem lokalizace proteinu SNW1 pomocí konfokální mikroskopie na modelu lidských buněk linie HeLa. Analýza lokalizace proteinu SNW1 ve vztahu k místům aktivní transkripce (značených BrU) odpovídá výše uvedenému vztahu. Protein SNW1 má jen částečný překryv s RNA pol II a s místy transkripce. V publikacích Kittler et al., 2004 a Neumann et al., 2010 bylo ukázáno, že potlačení produkce proteinu SNW1 vede k aberantnímu jadernému dělení. To by naznačovalo, že tento protein má určitou roli v regulaci mitózy. Dle

našich výsledků protein SNW1 během mitózy zůstává lokalizován v nukleoplazmě a není patrné, že by interagoval s chromozómy nebo mikrotubulárním systémem. Ukázali jsme nicméně, že během cytokineze a rané G1 fáze je protein SNW1 nabohacen v chromozomální oblasti. Podobně byla ukázána asociace s chromozómy i pro podjednotky elongačního faktoru P-TEFb. P-TEFb však s chromozómy interaguje dříve, už během pozdní anafáze (Yang et al., 2008). Protein SNW1 se jaderného dělení zřejmě přímo neúčastní, ale ovlivňuje expresi určitých mitotických genů. Ukázali jsme, že při potlačení produkce SNW1 pomocí siRNA dochází k tvorbě většího počtu mikrotubulárních organizačních center (MTOC; microtubule-organising centre). Následně dojde k defektnímu jadernému dělení a z jednoho jádra, pokud se dělení dokončí, vzniknou tři nebo čtyři dceřinná jádra. Výsledky na *S. cerevisiae* ukazují, že buňky produkující C-koncově zkrácenou verzi proteinu Prp45p (ortholog SNW1) vykazují citlivost k inhibitorům polymerizace mikrotubulů (Gahura et al., 2009). Možnou příčinou by mohlo být, že je-li v buňkách nedostatek endogenní formy, nebo je produkována zkrácená verze Prp45p, dochází k defektům sestřihu pre-mRNA genů účastnících se regulace mitózy.

Pro testování vlivu proteinu SNW1 na expresi genů indukovaných inhibicí transkripce jsme zvolili postup publikovaný v práci Gomes et al., 2006. Pro potlačení transkripce jsme použili inhibitory DRB a doxorubicin. DRB je specifický inhibitor kinázové podjednotky elongačního faktoru P-TEFb. Doxorubicin se vmezeřuje do DNA a jeho působením dojde k inhibici enzymu topoizomeráza a následně k zastavení transkripce i replikace. Sledovali jsme časovou závislost v nabohacení množství proteinů p53, p21, 14-3-3 σ a PUMA po přidání DRB a doxorubicinu. Potvrdili jsme, že působením DRB dochází k nabohacení proteinů p53, p21 a v menší míře proteinu PUMA. Protein 14-3-3 σ byl nabohacen pouze v přítomnosti doxorubicinu. Rovněž jsme potvrdili pomocí dvou specifických protilátek, že působením DRB dochází k poklesu fosforylace RNA pol II. Zajímavé bylo zjištění, že působením DRB dochází i k redukcii množství proteinu SNW1. To naznačuje, že pro přepis genu SNW1 je nezbytný elongační faktor P-TEFb, nebo že působení DRB vede k degradaci proteinu SNW1.

Pro potlačení exprese SNW1 jsme použili systém Accell od firmy Dharmacon, který využívá čtyř různých oligonukleotidů komplementárních k oblasti cíleného genu. Hladina endogenního proteinu byla snížena asi na 30 %. Ukázali

jsme, že snížení množství proteinu SNW1 pomocí siRNA neovlivní akumulaci proteinu p53 po přidání DRB nebo doxorubicinu. Několik nezávislých biologických opakování dále ukázalo, že snížení hladiny SNW1 nemá vliv na produkci proteinů p21, PUMA a 14-3-3 σ během genotoxického stresu. Tento výsledek jsme potvrdili i na úrovni mRNA pomocí kvantitativního RT-PCR.

Naše výsledky ukázaly, že protein SNW1 je postradatelný při stresové indukci produkce proteinů p53 a p21. Analogické pozorování bylo uveřejněno v práci Bres et al., 2009. Autoři práce ukázali, že protein SNW1 je postradatelný během indukce exprese viru HIV-1 působením UV záření (ale nikoli při „běžné“ transkripci z virového genomu). Naše výsledky tak rozšiřují toto pozorování o endogenní regulační proteiny p53 a p21. Nemůžeme vyvrátit, že reziduální množství proteinu SNW1 je dostatečné pro zajištění sestřihu většiny genů a defekty se tak projeví pouze v některých případech, například u genů řídících buněčný cyklus. Přikláníme se však k alternativní hypotéze, a sice že protein SNW1 není nezbytný pro přepis/sestřih stresem indukovaných genů. Jde o zajímavou situaci, která ukazuje na variabilitu buněčných reakcí v odpověď na různé podněty. Zmiňované geny, které jsou indukovány stresem, běžně pro svou expresi využívají fosforylační aktivitu elongačního faktoru P-TEFb asociovaného s některými obecnými transkripčními faktory. Nicméně, inhibice aktivity P-TEFb nevede k potlačení exprese těchto genů. Přepis určité skupiny genů při inhibici aktivity P-TEFb je zprostředkován zřejmě jinými faktory a fosforylace na pozici Ser2 v doméně CTD RNA polymerázy II není pro aktivní elongaci vyžadována. Buňky tak na různé formy stresu mohou reagovat nejen aktivací konkrétních cílových genů, ale i modulací mechanismů transkripce.

Autorův podíl v jednotlivých publikacích:

Ondřej Tolde je v publikacích 1 a 3 autorem většiny výsledků z fluorescenční a konfokální mikroskopie. V publikaci 2 se podílel na tvorbě části mikroskopických výsledků. V publikacích 4 a 5 je autorem všech experimentů.

RNDr. Jan Brábek, Ph.D.

7 Seznam zkratek, proteinů a proteinových domén

7.1. Seznam zkratek

AMT	amoeboid-mesenchymal transition (améboidně-mezenchymální přechod)
CTD	C-terminal domain
dNTP	deoxyribonucleotide
DSIF	DRB sensitivity-inducing factor
DRB	5,6-Dichloro-1- β -D-ribofuranosylbenzimidazole
ECM	extracellular matrix (mezibuněčná hmota)
EMT	(epithelial-mesenchymal transition) epiteliálně-mezenchymální přechod
FA	focal adhesion (fokální adheze)
FITC	fluorescein isothiocyanate
GAP	GTPase-activating protein
GEF	guanine nucleotide exchange factor
HIV-1	human immunodeficiency virus 1
ChIP	chromatin immunoprecipitation
IGC	interchromatin granule clusters
ILP	invadosome-like protrusions
MAT	mesenchymal-amoeboid transition (mezenchymálně-améboidní přechod)
MET	mesenchymal-epithelial transition (mezenchymálně-epiteliální přechod)
mRNA	messenger RNA
miRNA	microRNA
MTOC	microtubule-organising centre
NELF	negative elongation factor
PTA	podosome-type adhesion
P-TEFb	positive transcription elongation factor b complex
RNA pol II	RNA Polymerase II (RNA polymeráza II)
snRNP	small nuclear ribonucleoprotein
TEM	transendothelial migration (transendoteliální migrace)
TPA	12- <i>O</i> -tetradecanoylphorbol-13-acetate
TUF	transcript of unknown function

7.2. Proteinové domény

Identifikační číslo domény se vztahuje k databázi Prosite <http://expasy.org/prosite>

SH2	Src-homology (SH)2 domain	PDOC50001
SH3	Src-homology (SH)3 domain	PDOC50002
FERM	four point one (4.1), ezrin radixin, moesin	PDOC00566
CTD	C-terminal domain, heptapeptide repeat	PDOC00106
PTB	phosphotyrosine-binding	PDOC51064
FH	forkhead domain	PDOC50006
WH2	WASP-Homology 2	PDOC51082

7.3. Seznam proteinů

V následující tabulce jsou v prvním sloupci uvedeny názvy proteinů, nebo zkratky názvů, jak byly použity v textu. Mnoho proteinů má v současnosti jiný název, než byl použit v původní literatuře, nicméně pro účel citace se většinou držím původního názvosloví. Ve druhém sloupci jsou uvedeny celé názvy proteinů, držím se doporučeného jména dle databáze Uniprot. V závorce uvádím některé často používané nebo alternativní názvy. Pro snadnější nalezení dalších informací o daném proteinu uvádím ve třetím sloupci příslušný kód pro databázi Uniprot (www.uniprot.org). Většina názvů a kódů se vztahuje k lidským proteinům.

<u>protein</u>	<u>název (dle Uniprot)</u>	<u>accession no.</u>
14-3-3 σ	14-3-3 protein sigma (stratifin)	P31947
α -actinin-1	alpha-actinin-1 (ACTN)	P12814
α -catenin	Catenin alpha-1 (CTNNA1)	P35221
Actin	beta-actin (ACTB)	P60709
ADAM10	Disintegrin and metalloproteinase domain-containing 10	O14672
Akt	Akt1 (PKB, RAC)	P31749
ARHGAP22	Rho GTPase-activating protein 22 (RHOGAP2)	Q7Z5H3
ATM	Ataxia telangiectasia mutated (Serine-protein kinase ATM)	Q13315
β -catenin	Catenin beta-1 (CTNNB1)	P35222
β 1-integrin	Integrin beta-1 (ITGB1)	P05556
BRD4	Bromodomain-containing protein 4	O60885
CAS	Crk-associated substrate (BCAR1, p130Cas)	P56945
CBF1	Recombining binding protein suppressor of hairless	Q06330
CCNH	Cyclin-H	P51946
CCNT1	Cyclin-T1	O60563
CD44	CD44 antigen, Hyaluronate receptor	P16070
Cdc5	Cell division control protein 5 (Cef1)	P39964
Cdc42	Cell division control protein 42	P60953
CDK7	Cell division protein kinase 7	P50613
CDK9	Cell division protein kinase 9 (Cyclin-dependent kinase 9)	P50750
CLDN1	Claudin-1	O95832
Cortactin	Cortactin (CTTN, EMS1)	Q14247
Crk	Crk (c-Crk, p38)	P46108
CTCF	CCCTC-binding factor	P49711
DAPK1	Death-associated protein kinase 1	P53355
DRAK1	DAP kinase-related apoptosis-inducing protein kinase 1	Q9UEE5
DR5	Death receptor 5 (Killer)	O14763
E-cadherin	Epithelial cadherin, Cadherin-1 (CDHE, CDH1)	P12830
E12/E47	Transcription factor E2-alpha (TCF3, E2A, ITF1)	P15923
EGFR	Epidermal growth factor receptor	P00533
Exo 70	Exocyst complex component 7 (EXOC7)	Q9UPT5
FAK	Focal adhesion kinase 1 (FAK1, PTK2)	Q05397
Fascin	Fascin (FSCN1, p55)	Q16658
FCP1	RNA polymerase II subunit A CTD phosphatase (CTDP1)	Q9Y5B0
FGF2	Heparin-binding growth factor 2, Fibroblast growth factor	P09038
Filamin	Filamin-B (FLNB, FLN3)	O75369
FOXC2	Forkhead box protein C2 (MFH1)	Q99958
Hakai	E3 ubiquitin-protein ligase Hakai (CBLL1, RNF188)	Q75N03

Her2	Receptor tyrosine-protein kinase erbB-2 (ERBB2)	P04626
Hexim 1	hexamethylene bisacetamide (HMBA)-inducible protein	O94992
HGF/SF	Hepatocyte growth factor receptor (MET, c-Met)	P08581
ILK	Integrin-linked protein kinase	Q13418
IQGAP1	Ras GTPase-activating-like protein IQGAP1	P46940
JAM1	Junctional adhesion molecule A (F11R)	Q9Y624
Kindlin-1	Fermitin family homolog 1 (FERMT1, KIND1)	Q9BQL6
LEF1	lymphoid enhancer factor 1 (TCF1 α)	Q9UJU2
MAGI1	Membrane-associated guanylate kinase	Q96QZ7
MAPK1	Mitogen-activated protein kinase 1 (ERK2)	P28482
MDM2	E3 ubiquitin-protein ligase Mdm2	Q00987
MLC2	Myosin regulatory light chain 2 (MYL9)	P24844
MLCK	Myosin light chain kinase	Q15746
MMP2	Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2)	P08253
MMP9	Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9)	P14780
MT1-MMP	Membrane-type matrix metalloproteinase 1 (MMP14)	P50281
MYC	Myc proto-oncogene protein (c-Myc)	P01106
MYOD1	Myoblast determination protein 1	P15172
MYPT1	Myosin phosphatase-targeting subunit 1 (PPP1R12A)	O14974
MRCK	myotonic dystrophy kinase-related Cdc42-binding kinase	Q5VT25
N-cadherin	Neural cadherin, Cadherin-2 (CDHN, CDH2)	P19022
N-WASP	Neural Wiskott-Aldrich syndrome protein	O00401
p120 catenin	Catenin delta-1 (CTNND1, p120ctn)	O60716
Occludin	Occludin (OCLN)	Q16625
p21	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1 (CIP1, WAF1)	P38936
p53	Cellular tumor antigen p53	P04637
p300	Histone acetyltransferase p300	Q09472
Paxillin	Paxillin (PXN)	P49023
PAK1	p21-activated kinase 1	Q13153
PAR3	Partitioning defective 3 homolog (ASIP)	Q8TEW0
PAR6	Partitioning defective 6 homolog alpha (PARD6A)	Q9NPB6
PCF11	Pre-mRNA cleavage complex 2 protein Pcf11	O94913
PDK1	3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1 (PDKP1)	O15530
pRb	Retinoblastoma-associated protein (RB1)	P06400
Prp22	Pre-mRNA-splicing factor ATP-dependent RNA helicase	P24384
Prp46	Pre-mRNA-splicing factor PRP46	Q12417
PUMA	p53 up-regulated modulator of apoptosis (BBC3)	Q9BXH1
Rab8	Ras-related protein Rab-8A (MEL)	P61006
RAC1	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1, p21-Rac1	P63000
RhoA	Transforming protein RhoA (ARHA)	P61586
RhoB	Rho-related GTP-binding protein RhoB (ARHB)	P62745
RhoC	Rho-related GTP-binding protein RhoC (ARHC)	P08134
ROCK1	Rho-associated protein kinase 1	Q13464
ROCK2	Rho-associated protein kinase 2	O75116
RPB1	DNA-directed RNA polymerase II subunit RPB1	P24928
Sec3	Exocyst complex component 1 (EXOC1)	Q9NV70
Sec8	Exocyst complex component 4 (EXOC4)	Q96A65
SF2	Splicing factor, arginine/serine-rich 1 (ASF)	Q07955
Ski	Ski (Ski oncogene, c-Ski)	P12755
Smad2	Mothers against decapentaplegic homolog 2	Q15796

Smad3	Mothers against decapentaplegic homolog 3	P84022
Snai1	Zinc finger protein SNAI1	O95863
Snai2	Zinc finger protein SNAI2 (Slug)	O43623
SNW1	SNW domain-containing protein 1 (SKIP, NCoA-62)	Q13573
SPT6	Transcription elongation factor SPT6 (SUPT6H)	Q7KZ85
Src	Src (c-Src, p60-Src, SRC1)	P12931
Talin	Talin-1 (TLN1)	Q9Y490
TGF- β	Transforming growth factor beta-1	P01137
TRRAP	transformation/transcription domain-associated protein	Q9Y4A5
Twist1	Twist-related protein 1	Q15672
uPA	Urokinase-type plasminogen activator	P00749
VASP	Vasodilator-stimulated phosphoprotein	P50552
Vinculin	Vinculin (VIC)	P18206
VE-cadherin	Vascular endothelial cadherin, Cadherin-5 (CDH5)	P33151
WASP	Wiskott-Aldrich syndrome protein	P42768
WAVE-1	WASP family protein member 1 (WASF1)	Q92558
WAVE-2	WASP family protein member 2 (WASF2)	Q9Y6W5
ZEB1	Zinc finger E-box-binding homeobox 1 (AREB6, TCF8)	P37275
ZEB2	Zinc finger E-box-binding homeobox 2 (SIP1, ZFX1B)	O60315
ZIPK	Zipper-interacting protein kinase (DAPK3)	O43293
ZO	Zonula occludens protein 1 (TJP1)	Q07157
ZPK	Leucine-zipper protein kinase (MAP3K12)	Q12852

8 Použitá literatura

- Acloque H., Adams M.S., Fishwick K., Bronner-Fraser M., and Nieto M.A. (2009) Epithelial-mesenchymal transitions: the importance of changing cell state in development and disease. *J.Clin.Invest* 119, 1438-1449.
- Albers M., Diment A., Muraru M., Russell C.S., and Beggs J.D. (2003) Identification and characterization of Prp45p and Prp46p, essential pre-mRNA splicing factors. *RNA*. 9, 138-150.
- Amano M., Ito M., Kimura K., Fukata Y., Chihara K., Nakano T., Matsuura Y., and Kaibuchi K. (1996) Phosphorylation and activation of myosin by Rho-associated kinase (Rho-kinase). *J.Biol.Chem.* 271, 20246-20249.
- Artym V.V., Zhang Y., Seillier-Moiseiwitsch F., Yamada K.M., and Mueller S.C. (2006) Dynamic interactions of cortactin and membrane type 1 matrix metalloproteinase at invadopodia: defining the stages of invadopodia formation and function. *Cancer Res.* 66, 3034-3043.
- Askari J.A., Buckley P.A., Mould A.P., and Humphries M.J. (2009) Linking integrin conformation to function. *J.Cell Sci.* 122, 165-170.
- Barczyk M., Carracedo S., and Gullberg D. (2010) Integrins. *Cell Tissue Res.* 339, 269-280.
- Baudino T.A., Kraichely D.M., Jefcoat S.C., Jr., Winchester S.K., Partridge N.C., and MacDonald P.N. (1998) Isolation and characterization of a novel coactivator protein, NCoA-62, involved in vitamin D-mediated transcription. *J.Biol.Chem.* 273, 16434-16441.
- Bellis S.L., Miller J.T., and Turner C.E. (1995) Characterization of tyrosine phosphorylation of paxillin in vitro by focal adhesion kinase. *J.Biol.Chem.* 270, 17437-17441.
- Berdeaux R.L., Diaz B., Kim L., and Martin G.S. (2004) Active Rho is localized to podosomes induced by oncogenic Src and is required for their assembly and function. *J.Cell Biol.* 166, 317-323.
- Berx G. and van Roy F. (2009) Involvement of members of the cadherin superfamily in cancer. *Cold Spring Harb.Perspect.Biol.* 1, a003129
- Bhattacharya R., Gonzalez A.M., Debiase P.J., Trejo H.E., Goldman R.D., Flitney F.W., and Jones J.C. (2009) Recruitment of vimentin to the cell surface by beta3 integrin and plectin mediates adhesion strength. *J.Cell Sci.* 122, 1390-1400.
- Block M.R., Badowski C., Millon-Fremillon A., Bouvard D., Bouin A.P., Faurobert E., Gerber-Scokaert D., Planus E., and Albiges-Rizo C. (2008) Podosome-

type adhesions and focal adhesions, so alike yet so different. *Eur.J.Cell Biol.* 87, 491-506.

- Brabek J., Constancio S.S., Siesser P.F., Shin N.Y., Pozzi A., and Hanks S.K. (2005) Crk-associated substrate tyrosine phosphorylation sites are critical for invasion and metastasis of SRC-transformed cells. *Mol.Cancer Res.* 3, 307-315.
- Bravo-Cordero J.J., Marrero-Diaz R., Megias D., Genis L., Garcia-Grande A., Garcia M.A., Arroyo A.G., and Montoya M.C. (2007) MT1-MMP proinvasive activity is regulated by a novel Rab8-dependent exocytic pathway. *EMBO J.* 26, 1499-1510.
- Bres V., Gomes N., Pickle L., and Jones K.A. (2005) A human splicing factor, SKIP, associates with P-TEFb and enhances transcription elongation by HIV-1 Tat. *Genes Dev.* 19, 1211-1226.
- Bres V., Yoshida T., Pickle L., and Jones K.A. (2009) SKIP interacts with c-Myc and Menin to promote HIV-1 Tat transactivation. *Mol.Cell* 36, 75-87.
- Brozova M., Kleibl Z., Netikova I., Sevcik J., Scholzova E., Brezinova J., Chaloupkova A., Vesely P., Dundr P., Zadinova M., Krasna L., and Matouskova E. (2007) Establishment, growth and in vivo differentiation of a new clonal human cell line, EM-G3, derived from breast cancer progenitors. *Breast Cancer Res.Treat.* 103, 247-257.
- Bryan T.M. and Cech T.R. (1999) Telomerase and the maintenance of chromosome ends. *Curr.Opin.Cell Biol.* 11, 318-324.
- Buday L. and Downward J. (2007) Roles of cortactin in tumor pathogenesis. *Biochim.Biophys.Acta* 1775, 263-273.
- Burk U., Schubert J., Wellner U., Schmalhofer O., Vincan E., Spaderna S., and Brabletz T. (2008) A reciprocal repression between ZEB1 and members of the miR-200 family promotes EMT and invasion in cancer cells. *EMBO Rep.* 9, 582-589.
- Cavanna T., Pokorna E., Vesely P., Gray C., and Zicha D. (2007) Evidence for protein 4.1B acting as a metastasis suppressor. *J.Cell Sci.* 120, 606-616.
- Cheng C.W., Wu P.E., Yu J.C., Huang C.S., Yue C.T., Wu C.W., and Shen C.Y. (2001) Mechanisms of inactivation of E-cadherin in breast carcinoma: modification of the two-hit hypothesis of tumor suppressor gene. *Oncogene* 20, 3814-3823.
- Chhabra E.S. and Higgs H.N. (2007) The many faces of actin: matching assembly factors with cellular structures. *Nat.Cell Biol.* 9, 1110-1121.
- Chishti A.H., Kim A.C., Marfatia S.M., Lutchman M., Hanspal M., Jindal H., Liu S.C., Low P.S., Rouleau G.A., Mohandas N., Chasis J.A., Conboy J.G., Gascard P., Takakuwa Y., Huang S.C., Benz E.J., Jr., Bretscher A., Fehon R.G., Gusella J.F., Ramesh V., Solomon F., Marchesi V.T., Tsukita S.,

- Tsukita S., Hoover K.B., and . (1998) The FERM domain: a unique module involved in the linkage of cytoplasmic proteins to the membrane. *Trends Biochem.Sci.* 23, 281-282.
- Cho S., Schroeder S., Kaehlcke K., Kwon H.S., Pedal A., Herker E., Schnoelzer M., and Ott M. (2009) Acetylation of cyclin T1 regulates the equilibrium between active and inactive P-TEFb in cells. *EMBO J.* 28, 1407-1417.
- Clark E.S. and Weaver A.M. (2008) A new role for cortactin in invadopodia: regulation of protease secretion. *Eur.J.Cell Biol.* 87, 581-590.
- Cuevas B.D., Abell A.N., Witowsky J.A., Yujiri T., Johnson N.L., Kesavan K., Ware M., Jones P.L., Weed S.A., DeBiasi R.L., Oka Y., Tyler K.L., and Johnson G.L. (2003) MEKK1 regulates calpain-dependent proteolysis of focal adhesion proteins for rear-end detachment of migrating fibroblasts. *EMBO J.* 22, 3346-3355.
- Defilippi P., Di Stefano P., and Cabodi S. (2006) p130Cas: a versatile scaffold in signaling networks. *Trends Cell Biol.* 16, 257-263.
- Delorme V., Machacek M., DerMardirossian C., Anderson K.L., Wittmann T., Hanein D., Waterman-Storer C., Danuser G., and Bokoch G.M. (2007) Cofilin activity downstream of Pak1 regulates cell protrusion efficiency by organizing lamellipodium and lamella actin networks. *Dev.Cell* 13, 646-662.
- Dent E.W. and Gertler F.B. (2003) Cytoskeletal dynamics and transport in growth cone motility and axon guidance. *Neuron* 40, 209-227.
- Dong J.M., Leung T., Manser E., and Lim L. (2002) Cdc42 antagonizes inductive action of cAMP on cell shape, via effects of the myotonic dystrophy kinase-related Cdc42-binding kinase (MRCK) on myosin light chain phosphorylation. *Eur.J.Cell Biol.* 81, 231-242.
- Dvorak H.F. (1986) Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *N.Engl.J.Med.* 315, 1650-1659.
- Edwards D.R., Handsley M.M., and Pennington C.J. (2008) The ADAM metalloproteinases. *Mol.Aspects Med.* 29, 258-289.
- Eger A., Stockinger A., Schaffhauser B., Beug H., and Foisner R. (2000) Epithelial mesenchymal transition by c-Fos estrogen receptor activation involves nuclear translocation of beta-catenin and upregulation of beta-catenin/lymphoid enhancer binding factor-1 transcriptional activity. *J.Cell Biol.* 148, 173-188.
- Egloff S., Van Herreweghe E., and Kiss T. (2006) Regulation of polymerase II transcription by 7SK snRNA: two distinct RNA elements direct P-TEFb and HEXIM1 binding. *Mol.Cell Biol.* 26, 630-642.

- Elliott B.E., Hung W.L., Boag A.H., and Tuck A.B. (2002) The role of hepatocyte growth factor (scatter factor) in epithelial-mesenchymal transition and breast cancer. *Can.J.Physiol Pharmacol.* 80, 91-102.
- Elloul S., Elstrand M.B., Nesland J.M., Trope C.G., Kvalheim G., Goldberg I., Reich R., and Davidson B. (2005) Snail, Slug, and Smad-interacting protein 1 as novel parameters of disease aggressiveness in metastatic ovarian and breast carcinoma. *Cancer* 103, 1631-1643.
- Espinosa J.M., Verdun R.E., and Emerson B.M. (2003) p53 functions through stress- and promoter-specific recruitment of transcription initiation components before and after DNA damage. *Mol.Cell* 12, 1015-1027.
- Fantappie M.R., Bastos de Oliveira F.M., de Moraes M.R., Rumjanek F.D., Wu W., and Loverde P.T. (2008) Cloning of SmNCoA-62, a novel nuclear receptor co-activator from *Schistosoma mansoni*: assembly of a complex with a SmRXR1/SmNR1 heterodimer, SmGCN5 and SmCBP1. *Int.J.Parasitol.* 38, 1133-1147.
- Feldman G.J., Mullin J.M., and Ryan M.P. (2005) Occludin: structure, function and regulation. *Adv Drug Deliv.Rev.* 57, 883-917.
- Feng J., Ito M., Ichikawa K., Isaka N., Nishikawa M., Hartshorne D.J., and Nakano T. (1999) Inhibitory phosphorylation site for Rho-associated kinase on smooth muscle myosin phosphatase. *J.Biol.Chem.* 274, 37385-37390.
- Fidler I.J. (2003) The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nat.Rev.Cancer* 3, 453-458.
- Findley M.K. and Koval M. (2009) Regulation and roles for claudin-family tight junction proteins. *IUBMB.Life* 61, 431-437.
- Folk P., Puta F., and Skruzny M. (2004) Transcriptional coregulator SNW/SKIP: the concealed tie of dissimilar pathways. *Cell Mol.Life Sci.* 61, 629-640.
- Friedl P. (2004) Preshaping and plasticity: shifting mechanisms of cell migration. *Curr.Opin.Cell Biol.* 16, 14-23.
- Friedl P. and Wolf K. (2010) Plasticity of cell migration: a multiscale tuning model. *J.Cell Biol.* 188, 11-19.
- Friedl P., Zanker K.S., and Brocker E.B. (1998) Cell migration strategies in 3-D extracellular matrix: differences in morphology, cell matrix interactions, and integrin function. *Microsc.Res.Tech.* 43, 369-378.
- Gadea G., Sanz-Moreno V., Self A., Godi A., and Marshall C.J. (2008) DOCK10-mediated Cdc42 activation is necessary for amoeboid invasion of melanoma cells. *Curr.Biol.* 18, 1456-1465.
- Gahura O., Abrahmova K., Skruzny M., Valentova A., Munzarova V., Folk P., and Puta F. (2009) Prp45 affects Prp22 partition in spliceosomal complexes and

- splicing efficiency of non-consensus substrates. *J.Cell Biochem.* 106, 139-151.
- Gatenby R.A. and Gillies R.J. (2008) A microenvironmental model of carcinogenesis. *Nat.Rev.Cancer* 8, 56-61.
- Geiger B., Spatz J.P., and Bershadsky A.D. (2009) Environmental sensing through focal adhesions. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 10, 21-33.
- Geiger T.R. and Peeper D.S. (2009) Metastasis mechanisms. *Biochim.Biophys.Acta* 1796, 293-308.
- Giannone G., Dubin-Thaler B.J., Rossier O., Cai Y., Chaga O., Jiang G., Beaver W., Dobreiner H.G., Freund Y., Borisy G., and Sheetz M.P. (2007) Lamellipodial actin mechanically links myosin activity with adhesion-site formation. *Cell* 128, 561-575.
- Giannone G., Ronde P., Gaire M., Beaudouin J., Haiech J., Ellenberg J., and Takeda K. (2004) Calcium rises locally trigger focal adhesion disassembly and enhance residency of focal adhesion kinase at focal adhesions. *J.Biol.Chem.* 279, 28715-28723.
- Gimona M., Buccione R., Courtneidge S.A., and Linder S. (2008) Assembly and biological role of podosomes and invadopodia. *Curr.Opin.Cell Biol.* 20, 235-241.
- Gomes N.P., Bjerke G., Llorente B., Szostek S.A., Emerson B.M., and Espinosa J.M. (2006) Gene-specific requirement for P-TEFb activity and RNA polymerase II phosphorylation within the p53 transcriptional program. *Genes Dev.* 20, 601-612.
- Gomes N.P. and Espinosa J.M. (2010) Gene-specific repression of the p53 target gene PUMA via intragenic CTCF-Cohesin binding. *Genes Dev.* 24, 1022-1034.
- Gottifredi V., Shieh S., Taya Y., and Prives C. (2001) p53 accumulates but is functionally impaired when DNA synthesis is blocked. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 98, 1036-1041.
- Hagerty L., Weitzel D.H., Chambers J., Fortner C.N., Brush M.H., Loiselle D., Hosoya H., and Haystead T.A. (2007) ROCK1 phosphorylates and activates zipper-interacting protein kinase. *J.Biol.Chem.* 282, 4884-4893.
- Hahn W.C. (2004) Cancer: surviving on the edge. *Cancer Cell* 6, 215-222.
- Halbleib J.M. and Nelson W.J. (2006) Cadherins in development: cell adhesion, sorting, and tissue morphogenesis. *Genes Dev.* 20, 3199-3214.
- Hanahan D. and Weinberg R.A. (2000) The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57-70.
- Harjanto D. and Zaman M.H. (2010) Matrix mechanics and receptor-ligand interactions in cell adhesion. *Org.Biomol.Chem.* 8, 299-304.

- Harris C.C. (1996) p53 tumor suppressor gene: from the basic research laboratory to the clinic--an abridged historical perspective. *Carcinogenesis* 17, 1187-1198.
- Hartsock A. and Nelson W.J. (2008) Adherens and tight junctions: structure, function and connections to the actin cytoskeleton. *Biochim.Biophys.Acta* 1778, 660-669.
- Hazan R.B., Phillips G.R., Qiao R.F., Norton L., and Aaronson S.A. (2000) Exogenous expression of N-cadherin in breast cancer cells induces cell migration, invasion, and metastasis. *J.Cell Biol.* 148, 779-790.
- Hazan R.B., Qiao R., Keren R., Badano I., and Suyama K. (2004) Cadherin switch in tumor progression. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 1014, 155-163.
- Hegerfeldt Y., Tusch M., Brocker E.B., and Friedl P. (2002) Collective cell movement in primary melanoma explants: plasticity of cell-cell interaction, beta1-integrin function, and migration strategies. *Cancer Res.* 62, 2125-2130.
- Hendrix M.J., Seftor E.A., Meltzer P.S., Gardner L.M., Hess A.R., Kirschmann D.A., Schatteman G.C., and Seftor R.E. (2001) Expression and functional significance of VE-cadherin in aggressive human melanoma cells: role in vasculogenic mimicry. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 98, 8018-8023.
- Hermeking H. (2007) p53 enters the microRNA world. *Cancer Cell* 12, 414-418.
- Hermeking H., Lengauer C., Polyak K., He T.C., Zhang L., Thiagalingam S., Kinzler K.W., and Vogelstein B. (1997) 14-3-3 sigma is a p53-regulated inhibitor of G2/M progression. *Mol.Cell* 1, 3-11.
- Hou X., Xie K., Yao J., Qi Z., and Xiong L. (2009) A homolog of human ski-interacting protein in rice positively regulates cell viability and stress tolerance. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 106, 6410-6415.
- Ito M., Nakano T., Erdodi F., and Hartshorne D.J. (2004) Myosin phosphatase: structure, regulation and function. *Mol.Cell Biochem.* 259, 197-209.
- Kaihara T., Kusaka T., Nishi M., Kawamata H., Imura J., Kitajima K., Itoh-Minami R., Aoyama N., Kasuga M., Oda Y., Hattori M., and Fujimori T. (2003) Dedifferentiation and decreased expression of adhesion molecules, E-cadherin and ZO-1, in colorectal cancer are closely related to liver metastasis. *J.Exp.Clin.Cancer Res.* 22, 117-123.
- Kalluri R. and Weinberg R.A. (2009) The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J.Clin.Invest* 119, 1420-1428.
- Kanazawa T., Watanabe T., Kazama S., Tada T., Koketsu S., and Nagawa H. (2002) Poorly differentiated adenocarcinoma and mucinous carcinoma of the colon and rectum show higher rates of loss of heterozygosity and loss of E-cadherin expression due to methylation of promoter region. *Int.J.Cancer* 102, 225-229.

- Kapranov P., Willingham A.T., and Gingeras T.R. (2007) Genome-wide transcription and the implications for genomic organization. *Nat.Rev.Genet.* 8, 413-423.
- Kawabe H., Nakanishi H., Asada M., Fukuhara A., Morimoto K., Takeuchi M., and Takai Y. (2001) Pilt, a novel peripheral membrane protein at tight junctions in epithelial cells. *J.Biol.Chem.* 276, 48350-48355.
- Kim J.E., Tannenbaum S.R., and White F.M. (2005) Global phosphoproteome of HT-29 human colon adenocarcinoma cells. *J.Proteome.Res.* 4, 1339-1346.
- Kim K., Lu Z., and Hay E.D. (2002) Direct evidence for a role of beta-catenin/LEF-1 signaling pathway in induction of EMT. *Cell Biol.Int.* 26, 463-476.
- Kim Y.J., Noguchi S., Hayashi Y.K., Tsukahara T., Shimizu T., and Arahata K. (2001) The product of an oculopharyngeal muscular dystrophy gene, poly(A)-binding protein 2, interacts with SKIP and stimulates muscle-specific gene expression. *Hum.Mol.Genet.* 10, 1129-1139.
- Kimura K., Ito M., Amano M., Chihara K., Fukata Y., Nakafuku M., Yamamori B., Feng J., Nakano T., Okawa K., Iwamatsu A., and Kaibuchi K. (1996) Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase). *Science* 273, 245-248.
- Kittler R., Putz G., Pelletier L., Poser I., Heninger A.K., Drechsel D., Fischer S., Konstantinova I., Habermann B., Grabner H., Yaspo M.L., Himmelbauer H., Korn B., Neugebauer K., Pisabarro M.T., and Buchholz F. (2004) An endoribonuclease-prepared siRNA screen in human cells identifies genes essential for cell division. *Nature* 432, 1036-1040.
- Kohoutek J. (2009) P-TEFb- the final frontier. *Cell Div.* 4, 19
- Kokudo T., Suzuki Y., Yoshimatsu Y., Yamazaki T., Watabe T., and Miyazono K. (2008) Snail is required for TGFbeta-induced endothelial-mesenchymal transition of embryonic stem cell-derived endothelial cells. *J.Cell Sci.* 121, 3317-3324.
- Komarova Y. and Malik A.B. (2010) Regulation of endothelial permeability via paracellular and transcellular transport pathways. *Annu.Rev.Physiol* 72, 463-493.
- Kopfstein L. and Christofori G. (2006) Metastasis: cell-autonomous mechanisms versus contributions by the tumor microenvironment. *Cell Mol.Life Sci.* 63, 449-468.
- Krumm A., Meulia T., Brunvand M., and Groudine M. (1992) The block to transcriptional elongation within the human c-myc gene is determined in the promoter-proximal region. *Genes Dev.* 6, 2201-2213.
- Kruse J.P. and Gu W. (2009) Modes of p53 regulation. *Cell* 137, 609-622.

- Kute T., Lack C.M., Willingham M., Bishwokama B., Williams H., Barrett K., Mitchell T., and Vaughn J.P. (2004) Development of Herceptin resistance in breast cancer cells. *Cytometry A* 57, 86-93.
- Lal-Nag M. and Morin P.J. (2009) The claudins. *Genome Biol.* 10, 235
- Lampugnani M.G., Resnati M., Raiteri M., Pigott R., Pisacane A., Houen G., Ruco L.P., and Dejana E. (1992) A novel endothelial-specific membrane protein is a marker of cell-cell contacts. *J.Cell Biol.* 118, 1511-1522.
- Larjava H., Plow E.F., and Wu C. (2008) Kindlins: essential regulators of integrin signalling and cell-matrix adhesion. *EMBO Rep.* 9, 1203-1208.
- Lau J., Lew Q.J., Diribarne G., Michels A.A., Dey A., Bensaude O., Lane D.P., and Chao S.H. (2009) Ubiquitination of HEXIM1 by HDM2. *Cell Cycle* 8, 2247-2254.
- Lee J.M., Dedhar S., Kalluri R., and Thompson E.W. (2006) The epithelial-mesenchymal transition: new insights in signaling, development, and disease. *J.Cell Biol.* 172, 973-981.
- Legate K.R., Wickstrom S.A., and Fassler R. (2009) Genetic and cell biological analysis of integrin outside-in signaling. *Genes Dev.* 23, 397-418.
- Lenasi T. and Barboric M. (2010) P-TEFb stimulates transcription elongation and pre-mRNA splicing through multilateral mechanisms. *RNA.Biol.* 7, 145-150.
- Leong G.M., Subramaniam N., Figueroa J., Flanagan J.L., Hayman M.J., Eisman J.A., and Kouzmenko A.P. (2001) Ski-interacting protein interacts with Smad proteins to augment transforming growth factor-beta-dependent transcription. *J.Biol.Chem.* 276, 18243-18248.
- Leung T., Chen X.Q., Manser E., and Lim L. (1996) The p160 RhoA-binding kinase ROK alpha is a member of a kinase family and is involved in the reorganization of the cytoskeleton. *Mol.Cell Biol.* 16, 5313-5327.
- Lindberg J. and Lundeberg J. (2010) The plasticity of the mammalian transcriptome. *Genomics* 95, 1-6.
- Linder S. (2007) The matrix corroded: podosomes and invadopodia in extracellular matrix degradation. *Trends Cell Biol.* 17, 107-117.
- Linder S. (2009) Invadosomes at a glance. *J.Cell Sci.* 122, 3009-3013.
- Ljungman M., Zhang F., Chen F., Rainbow A.J., and McKay B.C. (1999) Inhibition of RNA polymerase II as a trigger for the p53 response. *Oncogene* 18, 583-592.
- Lukashev M.E. and Werb Z. (1998) ECM signalling: orchestrating cell behaviour and misbehaviour. *Trends Cell Biol.* 8, 437-441.

- Luo B.H., Carman C.V., and Springer T.A. (2007) Structural basis of integrin regulation and signaling. *Annu.Rev.Immunol.* 25, 619-647.
- Luxenburg C., Geblinger D., Klein E., Anderson K., Hanein D., Geiger B., and Addadi L. (2007) The architecture of the adhesive apparatus of cultured osteoclasts: from podosome formation to sealing zone assembly. *PLoS.One.* 2, e179
- Makarov E.M., Makarova O.V., Urlaub H., Gentzel M., Will C.L., Wilm M., and Luhrmann R. (2002) Small nuclear ribonucleoprotein remodeling during catalytic activation of the spliceosome. *Science* 298, 2205-2208.
- Manser E., Huang H.Y., Loo T.H., Chen X.Q., Dong J.M., Leung T., and Lim L. (1997) Expression of constitutively active alpha-PAK reveals effects of the kinase on actin and focal complexes. *Mol.Cell Biol.* 17, 1129-1143.
- Maretzky T., Reiss K., Ludwig A., Buchholz J., Scholz F., Proksch E., de Strooper B., Hartmann D., and Saftig P. (2005) ADAM10 mediates E-cadherin shedding and regulates epithelial cell-cell adhesion, migration, and beta-catenin translocation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 102, 9182-9187.
- Martin T.A., Watkins G., Mansel R.E., and Jiang W.G. (2004) Loss of tight junction plaque molecules in breast cancer tissues is associated with a poor prognosis in patients with breast cancer. *Eur.J.Cancer* 40, 2717-2725.
- Matsumura F. and Hartshorne D.J. (2008) Myosin phosphatase target subunit: Many roles in cell function. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 369, 149-156.
- Mattia M., Gottifredi V., McKinney K., and Prives C. (2007) p53-Dependent p21 mRNA elongation is impaired when DNA replication is stalled. *Mol.Cell Biol.* 27, 1309-1320.
- McMahon B. and Kwaan H.C. (2008) The plasminogen activator system and cancer. *Pathophysiol.Haemost.Thromb.* 36, 184-194.
- McSherry E.A., Donatello S., Hopkins A.M., and McDonnell S. (2007) Molecular basis of invasion in breast cancer. *Cell Mol.Life Sci.* 64, 3201-3218.
- Medici D., Hay E.D., and Olsen B.R. (2008) Snail and Slug promote epithelial-mesenchymal transition through beta-catenin-T-cell factor-4-dependent expression of transforming growth factor-beta3. *Mol.Biol.Cell* 19, 4875-4887.
- Merlo L.M., Pepper J.W., Reid B.J., and Maley C.C. (2006) Cancer as an evolutionary and ecological process. *Nat.Rev.Cancer* 6, 924-935.
- Micuda S., Rosel D., Ryska A., and Brabek J. (2010) ROCK inhibitors as emerging therapeutic candidates for sarcomas. *Curr.Cancer Drug Targets.* 10, 127-134.

- Mierke C.T., Kollmannsberger P., Zitterbart D.P., Smith J., Fabry B., and Goldmann W.H. (2008) Mechano-coupling and regulation of contractility by the vinculin tail domain. *Biophys.J.* 94, 661-670.
- Mintz P.J., Patterson S.D., Neuwald A.F., Spahr C.S., and Spector D.L. (1999) Purification and biochemical characterization of interchromatin granule clusters. *EMBO J.* 18, 4308-4320.
- Mitra S.K., Hanson D.A., and Schlaepfer D.D. (2005) Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 6, 56-68.
- Molina H., Horn D.M., Tang N., Mathivanan S., and Pandey A. (2007) Global proteomic profiling of phosphopeptides using electron transfer dissociation tandem mass spectrometry. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 104, 2199-2204.
- Munoz M.J., de la M.M., and Kornblihtt A.R. (2010) The carboxy terminal domain of RNA polymerase II and alternative splicing. *Trends Biochem.Sci.*
- Nabeshima K., Inoue T., Shima Y., Okada Y., Itoh Y., Seiki M., and Koono M. (2000) Front-cell-specific expression of membrane-type 1 matrix metalloproteinase and gelatinase A during cohort migration of colon carcinoma cells induced by hepatocyte growth factor/scatter factor. *Cancer Res.* 60, 3364-3369.
- Neumann B., Walter T., Heriche J.K., Bulkescher J., Erfle H., Conrad C., Rogers P., Poser I., Held M., Liebel U., Cetin C., Sieckmann F., Pau G., Kabbe R., Wunsche A., Satagopam V., Schmitz M.H., Chapuis C., Gerlich D.W., Schneider R., Eils R., Huber W., Peters J.M., Hyman A.A., Durbin R., Pepperkok R., and Ellenberg J. (2010) Phenotypic profiling of the human genome by time-lapse microscopy reveals cell division genes. *Nature* 464, 721-727.
- Ni Z., Schwartz B.E., Werner J., Suarez J.R., and Lis J.T. (2004) Coordination of transcription, RNA processing, and surveillance by P-TEFb kinase on heat shock genes. *Mol.Cell* 13, 55-65.
- Nusbaum P., Laine C., Seveau S., Lesavre P., and Halbwachs-Mecarelli L. (2004) Early membrane events in polymorphonuclear cell (PMN) apoptosis: membrane blebbing and vesicle release, CD43 and CD16 down-regulation and phosphatidylserine externalization. *Biochem.Soc.Trans.* 32, 477-479.
- Ohi M.D., Link A.J., Ren L., Jennings J.L., McDonald W.H., and Gould K.L. (2002) Proteomics analysis reveals stable multiprotein complexes in both fission and budding yeasts containing Myb-related Cdc5p/Cef1p, novel pre-mRNA splicing factors, and snRNAs. *Mol.Cell Biol.* 22, 2011-2024.
- Olson M.F. and Sahai E. (2009) The actin cytoskeleton in cancer cell motility. *Clin.Exp.Metastasis* 26, 273-287.
- Oswald F., Kostezka U., Astrahantseff K., Bourteele S., Dillinger K., Zechner U., Ludwig L., Wilda M., Hameister H., Knochel W., Liptay S., and Schmid

- R.M. (2002) SHARP is a novel component of the Notch/RBP-Jkappa signalling pathway. *EMBO J.* 21, 5417-5426.
- Oxley C.L., Anthis N.J., Lowe E.D., Vakonakis I., Campbell I.D., and Wegener K.L. (2008) An integrin phosphorylation switch: the effect of beta3 integrin tail phosphorylation on Dok1 and talin binding. *J.Biol.Chem.* 283, 5420-5426.
- Page-McCaw A., Ewald A.J., and Werb Z. (2007) Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 8, 221-233.
- Pankova K., Rosel D., Novotny M., and Brabek J. (2010) The molecular mechanisms of transition between mesenchymal and amoeboid invasiveness in tumor cells. *Cell Mol.Life Sci.* 67, 63-71.
- Parker K.K., Brock A.L., Brangwynne C., Mannix R.J., Wang N., Ostuni E., Geisse N.A., Adams J.C., Whitesides G.M., and Ingber D.E. (2002) Directional control of lamellipodia extension by constraining cell shape and orienting cell tractional forces. *FASEB J.* 16, 1195-1204.
- Pegram M.D., Lipton A., Hayes D.F., Weber B.L., Baselga J.M., Tripathy D., Baly D., Baughman S.A., Twaddell T., Glaspy J.A., and Slamon D.J. (1998) Phase II study of receptor-enhanced chemosensitivity using recombinant humanized anti-p185HER2/neu monoclonal antibody plus cisplatin in patients with HER2/neu-overexpressing metastatic breast cancer refractory to chemotherapy treatment. *J.Clin.Oncol.* 16, 2659-2671.
- Peinado H., Portillo F., and Cano A. (2004) Transcriptional regulation of cadherins during development and carcinogenesis. *Int.J.Dev.Biol.* 48, 365-375.
- Pelham R.J., Jr. and Wang Y. (1999) High resolution detection of mechanical forces exerted by locomoting fibroblasts on the substrate. *Mol.Biol.Cell* 10, 935-945.
- Pinner S. and Sahai E. (2008) Imaging amoeboid cancer cell motility in vivo. *J.Microsc.* 231, 441-445.
- Pluquet O. and Hainaut P. (2001) Genotoxic and non-genotoxic pathways of p53 induction. *Cancer Lett.* 174, 1-15.
- Poincloux R., Lizarraga F., and Chavrier P. (2009) Matrix invasion by tumour cells: a focus on MT1-MMP trafficking to invadopodia. *J.Cell Sci.* 122, 3015-3024.
- Polette M., Gilles C., Nawrocki-Raby B., Lohi J., Hunziker W., Foidart J.M., and Birembaut P. (2005) Membrane-type 1 matrix metalloproteinase expression is regulated by zonula occludens-1 in human breast cancer cells. *Cancer Res.* 65, 7691-7698.
- Pollard T.D. (2007) Regulation of actin filament assembly by Arp2/3 complex and formins. *Annu.Rev.Biophys.Biomol.Struct.* 36, 451-477.

- Ponti A., Machacek M., Gupton S.L., Waterman-Storer C.M., and Danuser G. (2004) Two distinct actin networks drive the protrusion of migrating cells. *Science* 305, 1782-1786.
- Ponti A., Matov A., Adams M., Gupton S., Waterman-Storer C.M., and Danuser G. (2005) Periodic patterns of actin turnover in lamellipodia and lamellae of migrating epithelial cells analyzed by quantitative Fluorescent Speckle Microscopy. *Biophys.J.* 89, 3456-3469.
- Prathapam T., Kuhne C., and Banks L. (2002) Skip interacts with the retinoblastoma tumor suppressor and inhibits its transcriptional repression activity. *Nucleic Acids Res.* 30, 5261-5268.
- Reindle A., Belichenko I., Bylebyl G.R., Chen X.L., Gandhi N., and Johnson E.S. (2006) Multiple domains in Siz SUMO ligases contribute to substrate selectivity. *J.Cell Sci.* 119, 4749-4757.
- Riehl R., Johnson K., Bradley R., Grunwald G.B., Cornel E., Lilienbaum A., and Holt C.E. (1996) Cadherin function is required for axon outgrowth in retinal ganglion cells in vivo. *Neuron* 17, 837-848.
- Rougvie A.E. and Lis J.T. (1988) The RNA polymerase II molecule at the 5' end of the uninduced hsp70 gene of *D. melanogaster* is transcriptionally engaged. *Cell* 54, 795-804.
- Royal I., Lamarche-Vane N., Lamorte L., Kaibuchi K., and Park M. (2000) Activation of cdc42, rac, PAK, and rho-kinase in response to hepatocyte growth factor differentially regulates epithelial cell colony spreading and dissociation. *Mol.Biol.Cell* 11, 1709-1725.
- Sabeh F., Shimizu-Hirota R., and Weiss S.J. (2009) Protease-dependent versus -independent cancer cell invasion programs: three-dimensional amoeboid movement revisited. *J.Cell Biol.* 185, 11-19.
- Sahai E. and Marshall C.J. (2003) Differing modes of tumour cell invasion have distinct requirements for Rho/ROCK signalling and extracellular proteolysis. *Nat.Cell Biol.* 5, 711-719.
- Sakurai-Yageta M., Recchi C., Le Dez G., Sibarita J.B., Daviet L., Camonis J., D'Souza-Schorey C., and Chavrier P. (2008) The interaction of IQGAP1 with the exocyst complex is required for tumor cell invasion downstream of Cdc42 and RhoA. *J.Cell Biol.* 181, 985-998.
- Saltel F., Chabadel A., Bonnelye E., and Jurdic P. (2008) Actin cytoskeletal organisation in osteoclasts: a model to decipher transmigration and matrix degradation. *Eur.J.Cell Biol.* 87, 459-468.
- Sanders L.C., Matsumura F., Bokoch G.M., and de Lanerolle P. (1999) Inhibition of myosin light chain kinase by p21-activated kinase. *Science* 283, 2083-2085.

- Sanz-Moreno V., Gadea G., Ahn J., Paterson H., Marra P., Pinner S., Sahai E., and Marshall C.J. (2008) Rac activation and inactivation control plasticity of tumor cell movement. *Cell* 135, 510-523.
- Sato K., Ebihara T., Adachi E., Kawashima S., Hattori S., and Irie S. (2000) Possible involvement of aminotelopeptide in self-assembly and thermal stability of collagen I as revealed by its removal with proteases. *J.Biol.Chem.* 275, 25870-25875.
- Sawada Y., Tamada M., Dubin-Thaler B.J., Cherniavskaya O., Sakai R., Tanaka S., and Sheetz M.P. (2006) Force sensing by mechanical extension of the Src family kinase substrate p130Cas. *Cell* 127, 1015-1026.
- Schirenbeck A., Arasada R., Bretschneider T., Schleicher M., and Faix J. (2005) Formins and VASPs may co-operate in the formation of filopodia. *Biochem.Soc.Trans.* 33, 1256-1259.
- Sheetz M.P., Felsenfeld D.P., and Galbraith C.G. (1998) Cell migration: regulation of force on extracellular-matrix-integrin complexes. *Trends Cell Biol.* 8, 51-54.
- Shen Y., Hirsch D.S., Sasiela C.A., and Wu W.J. (2008) Cdc42 regulates E-cadherin ubiquitination and degradation through an epidermal growth factor receptor to Src-mediated pathway. *J.Biol.Chem.* 283, 5127-5137.
- Shu K.X., Li B., and Wu L.X. (2007) The p53 network: p53 and its downstream genes. *Colloids Surf.B Biointerfaces.* 55, 10-18.
- Sims R.J., III, Belotserkovskaya R., and Reinberg D. (2004) Elongation by RNA polymerase II: the short and long of it. *Genes Dev.* 18, 2437-2468.
- Slamon D.J., Godolphin W., Jones L.A., Holt J.A., Wong S.G., Keith D.E., Levin W.J., Stuart S.G., Udove J., Ullrich A., and . (1989) Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science* 244, 707-712.
- Small J.V. and Resch G.P. (2005) The comings and goings of actin: coupling protrusion and retraction in cell motility. *Curr.Opin.Cell Biol.* 17, 517-523.
- Small J.V., Stradal T., Vignat E., and Rottner K. (2002) The lamellipodium: where motility begins. *Trends Cell Biol.* 12, 112-120.
- Somlyo A.P. and Somlyo A.V. (2000) Signal transduction by G-proteins, rho-kinase and protein phosphatase to smooth muscle and non-muscle myosin II. *J.Physiol* 522 Pt 2, 177-185.
- Stevens S.W., Ryan D.E., Ge H.Y., Moore R.E., Young M.K., Lee T.D., and Abelson J. (2002) Composition and functional characterization of the yeast spliceosomal penta-snRNP. *Mol.Cell* 9, 31-44.
- Strathdee G. (2002) Epigenetic versus genetic alterations in the inactivation of E-cadherin. *Semin.Cancer Biol.* 12, 373-379.

- Strumane K., Berx G., and van Roy F. (2004) Cadherins in cancer. *Handb.Exp.Pharmacol.* 69-103.
- Sutherland H. and Bickmore W.A. (2009) Transcription factories: gene expression in unions? *Nat.Rev.Genet.* 10, 457-466.
- Syed V., Zhang X., Lau K.M., Cheng R., Mukherjee K., and Ho S.M. (2005) Profiling estrogen-regulated gene expression changes in normal and malignant human ovarian surface epithelial cells. *Oncogene* 24, 8128-8143.
- Takada Y., Ye X., and Simon S. (2007) The integrins. *Genome Biol.* 8, 215
- Tamariz E. and Grinnell F. (2002) Modulation of fibroblast morphology and adhesion during collagen matrix remodeling. *Mol.Biol.Cell* 13, 3915-3929.
- Tang J., Chang H.Y., and Yang X. (2005) The death domain-associated protein modulates activity of the transcription co-factor Skip/NcoA62. *FEBS Lett.* 579, 2883-2890.
- Terranova V.P., Hujanen E.S., Loeb D.M., Martin G.R., Thornburg L., and Glushko V. (1986) Use of a reconstituted basement membrane to measure cell invasiveness and select for highly invasive tumor cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 83, 465-469.
- Thiery J.P., Acloque H., Huang R.Y., and Nieto M.A. (2009) Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* 139, 871-890.
- Tilghman R.W. and Parsons J.T. (2008) Focal adhesion kinase as a regulator of cell tension in the progression of cancer. *Semin.Cancer Biol.* 18, 45-52.
- Tokes A.M., Kulka J., Paku S., Szik A., Paska C., Novak P.K., Szilak L., Kiss A., Bogi K., and Schaff Z. (2005) Claudin-1, -3 and -4 proteins and mRNA expression in benign and malignant breast lesions: a research study. *Breast Cancer Res.* 7, R296-R305.
- Tolde O., Rosel D., Vesely P., Folk P., and Brabek J. (2010) The structure of invadopodia in a complex 3D environment. *Eur.J.Cell Biol.* 89, 674-680.
- Totsukawa G., Wu Y., Sasaki Y., Hartshorne D.J., Yamakita Y., Yamashiro S., and Matsumura F. (2004) Distinct roles of MLCK and ROCK in the regulation of membrane protrusions and focal adhesion dynamics during cell migration of fibroblasts. *J.Cell Biol.* 164, 427-439.
- Tsukita S., Itoh M., Nagafuchi A., Yonemura S., and Tsukita S. (1993) Submembranous junctional plaque proteins include potential tumor suppressor molecules. *J.Cell Biol.* 123, 1049-1053.
- Turner C.E. (2000) Paxillin and focal adhesion signalling. *Nat.Cell Biol.* 2, E231-E236.

- Urban E., Jacob S., Nemethova M., Resch G.P., and Small J.V. (2010) Electron tomography reveals unbranched networks of actin filaments in lamellipodia. *Nat.Cell Biol.* 12, 429-435.
- van Hinsbergh V.W., Engelse M.A., and Quax P.H. (2006) Pericellular proteases in angiogenesis and vasculogenesis. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 26, 716-728.
- Vesely P., Blase C., Matouskova E., and Bereiter-Hahn J. (2006) Arising podosomal structures are associated with neoplastic cell morphological phenotype induced by the microenvironment. *Anticancer Res.* 26, 967-972.
- Vignjevic D., Kojima S., Aratyn Y., Danciu O., Svitkina T., and Borisy G.G. (2006) Role of fascin in filopodial protrusion. *J.Cell Biol.* 174, 863-875.
- Villar V., Kocic J., Bugarski D., Jovcic G., and Santibanez J.F. (2010) SKIP is required for TGF-beta1-induced epithelial mesenchymal transition and migration in transformed keratinocytes. *FEBS Lett.*
- Visse R. and Nagase H. (2003) Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ.Res.* 92, 827-839.
- Vogelstein B. and Kinzler K.W. (2004) Cancer genes and the pathways they control. *Nat.Med.* 10, 789-799.
- Wang H.B., Dembo M., Hanks S.K., and Wang Y. (2001) Focal adhesion kinase is involved in mechanosensing during fibroblast migration. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 98, 11295-11300.
- Wang Y., Fu Y., Gao L., Zhu G., Liang J., Gao C., Huang B., Fenger U., Niehrs C., Chen Y.G., and Wu W. (2010) *Xenopus* skip modulates Wnt/beta-catenin signaling and functions in neural crest induction. *J.Biol.Chem.* 285, 10890-10901.
- Webb D.J., Donais K., Whitmore L.A., Thomas S.M., Turner C.E., Parsons J.T., and Horwitz A.F. (2004) FAK-Src signalling through paxillin, ERK and MLCK regulates adhesion disassembly. *Nat.Cell Biol.* 6, 154-161.
- Wernimont S.A., Cortesio C.L., Simonson W.T., and Huttenlocher A. (2008) Adhesions ring: a structural comparison between podosomes and the immune synapse. *Eur.J.Cell Biol.* 87, 507-515.
- White C.D., Brown M.D., and Sacks D.B. (2009) IQGAPs in cancer: a family of scaffold proteins underlying tumorigenesis. *FEBS Lett.* 583, 1817-1824.
- Wolf K., Alexander S., Schacht V., Coussens L.M., von Andrian U.H., van Rheenen J., Deryugina E., and Friedl P. (2009) Collagen-based cell migration models in vitro and in vivo. *Semin.Cell Dev.Biol.* 20, 931-941.
- Wolf K., Mazo I., Leung H., Engelke K., von Andrian U.H., Deryugina E.I., Strongin A.Y., Bocker E.B., and Friedl P. (2003) Compensation

- mechanism in tumor cell migration: mesenchymal-amoeboid transition after blocking of pericellular proteolysis. *J.Cell Biol.* 160, 267-277.
- Wyckoff J.B., Pinner S.E., Gschmeissner S., Condeelis J.S., and Sahai E. (2006) *Curr.Biol.* 16, 1515-1523.
- Yang J., Mani S.A., Donaher J.L., Ramaswamy S., Itzykson R.A., Come C., Savagner P., Gitelman I., Richardson A., and Weinberg R.A. (2004) Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. *Cell* 117, 927-939.
- Yang Z., He N., and Zhou Q. (2008) Brd4 recruits P-TEFb to chromosomes at late mitosis to promote G1 gene expression and cell cycle progression. *Mol.Cell Biol.* 28, 967-976.
- Yano H., Uchida H., Iwasaki T., Mukai M., Akedo H., Nakamura K., Hashimoto S., and Sabe H. (2000) Paxillin alpha and Crk-associated substrate exert opposing effects on cell migration and contact inhibition of growth through tyrosine phosphorylation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 97, 9076-9081.
- Yee H.F., Jr., Melton A.C., and Tran B.N. (2001) RhoA/rho-associated kinase mediates fibroblast contractile force generation. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 280, 1340-1345.
- Zaidel-Bar R., Itzkovitz S., Ma'ayan A., Iyengar R., and Geiger B. (2007) Functional atlas of the integrin adhesome. *Nat.Cell Biol.* 9, 858-867.
- Zhou Q. and Yik J.H. (2006) The Yin and Yang of P-TEFb regulation: implications for human immunodeficiency virus gene expression and global control of cell growth and differentiation. *Microbiol.Mol.Biol.Rev.* 70, 646-659.
- Zhou S., Fujimuro M., Hsieh J.J., Chen L., and Hayward S.D. (2000) A role for SKIP in EBNA2 activation of CBF1-repressed promoters. *J.Virol.* 74, 1939-1947.

9 Přílohy

1. Rösel D, Brábek J, **Tolde O**, Mierke CT, Zitterbart DP, Raupach C, Bicanová K, Kollmannsberger P, Panková D, Vesely P, Folk P, Fabry B. (2008). Up-regulation of Rho/ROCK signaling in sarcoma cells drives invasion and increased generation of protrusive forces. *Mol Cancer Res.* 6(9):1410-20.
2. Veselý P, Rösel D, Panková D, **Tolde O**, Blase C, Matousková E, Folk P, Brábek J, Bereiter-Hahn J. (2009). Confocal microscopy reveals Myzitiras and Vthela morphotypes as new signatures of malignancy progression. *Scanning* 31(3):102-6.
3. **Tolde O**, Rösel D, Mierke CT, Paňková D, Folk P, Vesely P, Brábek J. (2010) Neoplastic progression of the human breast cancer cell line G3S1 is associated with elevation of cytoskeletal dynamics and upregulation of MT1-MMP. *Int J Oncol.* 36(4):833-9.
4. **Tolde O**, Rösel D, Veselý P, Folk P, Brábek J. (2010) The structure of invadopodia in a complex 3D environment. *Eur J Cell Biol.* 89(9):674-80.
5. **Tolde O**, Folk P. Stress induced expression of p53-target genes is resistant to SNW1/SKIP depletion.