

**Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta
Katedra biochemie**

**Charles University in Prague, Faculty of Science
Department of Biochemistry**

Doktorský studijní program: Biochemie
Ph.D. study program: Biochemistry

Autoreferát disertační práce
Summary of the Ph.D. Thesis



**Regulace transkripce proteiny rodin Early growth response a Myb
Regulation of transcription by proteins of the Early growth response
and Myb families**

Mgr. Vladimír Čermák

Školitel/Supervisor: RNDr. Michal Dvořák, CSc.

Praha, 2013

Obsah/Contents

Abstrakt	3
Abstract	5
Úvod	7
Rodina transkripčních faktorů EGR	7
Rodina transkripčních faktorů Myb	8
Cíle práce	10
Metody	11
Výsledky a diskuse	12
Regulace metastázování sarkomů proteinem EGR1	12
Kuřecí embryonální kožní myofibroblasty, regulace jejich fenotypu signální dráhou TGF- β a manipulace pomocí změněné hladiny proteinu EGR4	15
Volba diferenciální linie krvetvorných progenitorů a její regulace proteinem v-Myb ^{AMV}	19
Účinek proteinů Myb na volbu diferenciální linie v buňkách neurální lišty	21
Závěry	23
Introduction	25
EGR family of transcription factors	25
Myb family of transcription factors	26
Aims of the study	28
Methods	28
Results and discussion	30
Sarcoma metastasis regulation by EGR1	30
Chicken embryo dermal myofibroblasts, regulation of their phenotype by TGF- β signaling pathway, and manipulation by altered protein level of EGR4	33
Lineage commitment of hematopoietic progenitors and its regulation by v-Myb ^{AMV}	37
The effect of Myb proteins on lineage commitment in neural crest cells	39
Conclusions	41
Použitá Literatura/References	43
Curriculum vitae	46
Seznam publikací/List of publications	47

Abstrakt

Regulace transkripce desítek tisíc genů v organismu obratlovců je mimořádně komplexním fenoménem, jehož se účastní tisíce různých regulačních proteinů. Největší funkční kategorií těchto regulátorů jsou sekvenčně specifické DNA vazebné proteiny známé jako transkripční faktory. Proteiny z EGR a Myb rodin transkripčních faktorů jsou relativně dlouho zkoumanými regulátory různých fyziologických procesů, včetně buněčné proliferace a diferenciaci. Zatímco strukturální a fyzikální aspekty jejich funkce byly dobře charakterizovány, jejich buněčně specifická role v komplexních genové regulačních sítích není dostatečně prostudována a představuje hlavní výzvu v příslušných oblastech výzkumu.

Předběžná analýza dat genové exprese z metastázujících buněk PR9692 a nemetastázujících buněk PR9692-E9 (kuřecích sarkomové linie) odhalila, že transkripční faktor EGR1 je syntetizován v relativně větším množství v metastázujících buňkách a může se tak podílet na regulačních procesech, které jsou základem rozdílů mezi oběma buněčnými liniemi. Dalším zkoumáním jsme zjistili, že cílené zvýšení hladiny EGR1 v PR9692-E9 buňkách obnovuje jejich metastatický potenciál na úroveň PR9692 buněk. Mikročipová analýza takových buněk odhalila aktivaci genů, které jsou rozhodující pro kontraktilitu aktinového cytoskeletu (*MYL9*), integrinovou signalizaci (*RIAM*), tvorbu filopodií (*MYO10*), produkci specifických složek mezibuněčné hmoty (*HAS2*, *COL6A1-3*) a další základní prometastatické schopnosti. Zvýšená exprese EGR1 v PR9692-E9 buňkách také vedla ke snížení exprese mnoha genů, z nichž některé byly identifikovány v jiných studiích jako metastatické supresory (*SFRP4*, *IRX1* a *CADMI*).

Fibrotická onemocnění se vyznačují častým výskytem a vysokou úmrtností. Pochopení molekulárních mechanismů řídících vznik, progresi a možné potlačení fibrózy je předpokladem k vývoji úspěšné terapie. Ústřední roli v patogenezi fibrózy hrají buňky zvané myofibroblasty. Myofibroblast je specifický typ mesenchymální buňky charakterizovaný syntézou mezibuněčné hmoty, schopností kontrakce a sekreční aktivitou. Zatímco tyto buňky plní důležitou funkci během fyziologického hojení rány, mohou také způsobit devastující fibrózu za patologických podmínek. Zjistili jsme, že kuřecí embryonální kožní myofibroblasty (chicken embryo dermal myofibroblast - CEDM) představují užitečný *ex vivo* model vhodný pro analýzu myofibroblastického fenotypu a jeho regulace. Také jsme odhalili, že zvýšení proteinové hladiny EGR4 v těchto buňkách indukuje ztrátu typických myofibroblastických charakteristik. Dále jsme analyzovali tento efekt s ohledem na změny v aktivitě signálních drah a genové expresi po zvýšení hladiny EGR4. Jelikož je za hlavní signalizační systém řídící diferenciaci myofibroblastů považována TGF- β signální dráha, nejprve jsme identifikovali TGF- β regulované geny v CEDM buňkách pomocí specifického chemického inhibitoru kinasové aktivity TGF- β receptoru 1 a oligonukleotidových mikročipů. Nalezli jsme jak geny objevené dříve v savčích systémech (např. *SPON2*, *ASPN*, *COMP*, *LUM*, *HAS2*, *IL6*, *CXCL12*, *VEGFA*, *NGF*), tak i řadu nových TGF- β -závislých genů, mezi nimi *PGF*,

VEGFC, PTN, FAM180A, FIBIN, ZIC1, ADCY2, RET, HHIP, DNER a *TMEM45A*. Naše výsledky s dlouhodobou inhibicí TGF- β signalizace v buňkách CEDM naznačují, že TGF- β se primárně podílí na regulaci sekrece, včetně produkce mezibuněčné hmoty, zatímco kontraktální aktivita závisí na dalších regulačních signálech. Dále jsme se zaměřili na mechanismy, které jsou použity proteinem EGR4 při vynucení dediferenciace v CEDM buňkách. Zjistili jsme, že trvale zvýšená hladina EGR4 způsobuje silnou inhibici TGF- β signalizace a také vede k potlačení exprese genů kódujících klíčové složky kontraktálního aparátu myofibroblastů. Mikročipová analýza odhalila řadu genů ovlivněných proteinem EGR4 a mezi nimi několik kandidátů, kteří mohou zprostředkovávat některé z pozorovaných účinků. Další experimenty vedly k hypotéze, že geny *FOXG1, BAMBI, NABI, NAB2* a *DUSP5* společně tvoří EGR4 regulovanou síť potlačující autokrinní TGF- β signalizaci.

Výzkum úlohy proteinů Myb v procesech volby diferenační linie v krvetvorbě a melanocytogenesi byl prováděn souběžně s výzkumem proteinů EGR. Vývoj krvinek z pluripotentních kmenových buněk probíhá postupně přes multipotentní progenitory až po zralé buňky náležející do nejméně 8 různých linií. Proces volby diferenační linie, během kterého kmenové buňky a nezralé progenitory zvolí další směr diferenciaci, je regulován prostřednictvím koordinované činnosti extracelulárních signálů a transkripčních faktorů. Molekulární mechanismy řídící tuto volbu jsou z větší části neznámé. V našich pokusech jsme identifikovali schopnost transkripčního faktoru v-Myb^{AMV} regulovat diferenační rozhodnutí společného myeloidního progenitoru a více diferencovaných progenitorů myeloidní řady a odhalili jsme roli motivu leucínového zipu (LZ) v těchto efektech. Prokázali jsme, že v-Myb^{AMV} s neporušeným LZ řídí vývoj progenitorů do makrofágové linie. Mutace v tomto regionu zrušila výhradní makrofágovou diferenciaci nezralých krevních progenitorů a způsobila, že mutovaný v-Myb^{AMV} podporoval také diferenciaci buněk erytroidních, trombocytů a granulocytů, podobně jako protein c-Myb. Navrhli jsme proto hypotézu, že LZ může fungovat jako molekulární přepínač, který ovlivňuje expresi jiných klíčových transkripčních faktorů a řídí diferenciaci krvetvorných kmenových buněk buď do myeloidní nebo erythroidní linie.

Kromě krvetvorby jsme také prokázali schopnost proteinů c-Myb a v-Myb^{AMV} ovlivňovat volbu diferenační linie v buňkách neurální lišty (NL), kde oba proteiny vynucují melanocytogenesi. Zvýšená koncentrace proteinu c-Myb podporuje vývoj dendritických melanocytů a terminální diferenciaci. Onkoprotein v-Myb^{AMV} převádí v podstatě všechny buňky NL do melanocytární řady a způsobuje jejich transformaci. Oba proteiny Myb aktivují v buňkách NL expresi genu *c-kit*, který kóduje receptor růstového faktoru SCF, a následně c-Kit signalizaci - jednu ze základních signálních drah ve vývoji melanocytů. Jelikož byl v předchozí studii *c-kit* identifikován jako cíl proteinů Myb v hematopoetických buňkách, naše pozorování naznačují, že c-Myb - c-Kit dráha představuje společný regulační systém pro hematopoetické progenitory a progenitory

buňečných typů vznikajících z neurální lišty. Naše práce ukazuje nový experimentální model pro studium melanocytogenese a melanocytární transformace.

Abstract

The regulation of transcription of tens of thousands of genes in a vertebrate organism is an enormously complex phenomenon which entails the participation of thousands of various regulatory proteins. The largest functional category of these regulators is accounted for by sequence-specific DNA-binding proteins known as transcription factors. Proteins of the EGR and Myb families of transcription factors are long-studied regulators of a variety of physiological processes including cellular proliferation and differentiation. The structural and physical aspects of their function have been well characterized. Their cell-type specific participation in complex gene-regulatory networks, on the other hand, is still incompletely understood and represents a major challenge in the respective research areas.

Preliminary analysis of gene expression data from metastasizing PR9692 and non-metastasizing PR9692-E9 chicken sarcoma cell lines revealed that the transcription factor EGR1 is expressed at a higher level in metastasizing cells and can thus take part in the regulatory processes that underlie the differences between the two cell lines. Further investigation demonstrated that the introduction of exogenous EGR1 into PR9692-E9 cells restored their metastatic potential to a level indistinguishable from PR9692 cells. Microarray analysis of EGR1 reconstituted cells revealed the activation of genes that are crucial for actin cytoskeleton contractility (*MYL9*), integrin signaling (*RIAM*), filopodia formation (*MYO10*), the production of specific extracellular matrix components (*HAS2*, *COL6A1-3*) and other essential pro-metastatic abilities. Constitutive expression of EGR1 in PR9692-E9 cells also decreased the expression of numerous genes some of which have been identified in other studies as metastasis suppressors (*SFRP4*, *IRX1* and *CADMI*).

Fibrotic diseases are a group of pathologies with high incidence and mortality. Understanding the molecular mechanisms driving the onset, progression and possible resolution of fibrosis is a prerequisite to the development of successful therapies. The central role in fibrosis is played by myofibroblasts. The myofibroblast is a specific type of mesenchymal cell characterized by synthesis of the extracellular matrix (ECM), plus contractile and secretory activity. While these cells serve a beneficial function during physiological tissue wound healing, they can cause devastating fibrosis under pathological conditions. We have established that chicken embryo dermal myofibroblasts (CEDM) represent a useful *ex vivo* model suitable for analyses of the myofibroblastic phenotype and regulation. We have also revealed that increasing the protein level of EGR4 in these cells induces a loss of myofibroblastic characteristics. We further analyzed this effect with respect to alterations in activity of signaling pathways and gene

expression changes after EGR4 overexpression. As the major signaling system driving the differentiation of myofibroblasts is the TGF- β signaling pathway, we first identified TGF- β -regulated genes in CEDM cells using a specific chemical inhibitor of kinase activity of TGF- β receptor 1 and oligonucleotide microarrays. We revealed both genes previously reported in mammalian systems (e.g. *SPON2*, *ASPN*, *COMP*, *LUM*, *HAS2*, *IL6*, *CXCL12*, *VEGFA*, *NGF*) and novel TGF- β -dependent genes, among them *PGF*, *VEGFC*, *PTN*, *FAM180A*, *FIBIN*, *ZIC1*, *ADCY2*, *RET*, *HHIP*, *DNER* and *TMEM45A*. Our results on the long term inhibition of TGF- β signaling in CEDM cells suggests that TGF- β is primarily involved in the regulation of secretory activities including ECM production while contractile activity depends on additional regulatory signals. Next, we focused on the mechanisms that are employed by EGR4 to induce the observed dedifferentiation in CEDM cells. We found that sustained expression of EGR4 caused a strong inhibition of TGF- β signaling and also a suppression of the expression of genes encoding key components of the myofibroblast contractile apparatus. Microarray analysis identified a number of genes affected by EGR4 and among them a few candidates that may mediate some of the observed effects. Further experiments led to a hypothesis that *FOXG1*, *BAMBI*, *NAB1*, *NAB2* and *DUSP5* genes together form an EGR4 regulated network counteracting autocrine TGF-beta signaling.

Research on the role of Myb proteins in lineage commitment in hematopoiesis and melanocytogenesis was being performed in parallel with the EGR-related research. The development of blood cells proceeds from pluripotent stem cells through multipotent progenitors into mature elements belonging to at least 8 different lineages. The lineage choice process during which stem cells and progenitors commit to a particular lineage is regulated by a coordinated action of extracellular signals and transcription factors. Molecular mechanisms controlling commitment are largely unknown. We identified the ability of the transcription factor v-Myb^{AMV} to regulate the commitment of a common myeloid progenitor and progenitors restricted to the myeloid lineage and the role of its leucine zipper region (LZR) in these effects. We demonstrated that nemutovaný v-Myb^{AMV} with the intact LZR directs development of progenitors into the macrophage lineage. Mutations in this region compromised commitment toward myeloid cells and caused v-Myb^{AMV} to also support the development of erythroid cells, thrombocytes, and granulocytes, similar to the c-Myb protein. We proposed that Myb LZR can function as a molecular switch, affecting expression of lineage-specifying transcription factors and directing the development of hematopoietic progenitors into either myeloid or erythroid lineages.

In addition to hematopoiesis, we also demonstrated cell fate-directing abilities of c-Myb and v-MybAMV proteins in avian neural crest (NC), where both proteins determine melanocytogenesis. The increased concentration of c-Myb induced progression into dendritic melanocytes and differentiation. The v-MybAMV oncogene converted essentially all NC cells into melanoblasts and caused their transformation. Both Myb

proteins activated in NC cells the expression of the c-kit gene and SCF - c-Kit signaling – one of the essential pathways in melanocyte development. As c-kit was identified as a target of Myb proteins in hematopoietic cells in a previous study, our observations suggest that the c-Myb - c-Kit pathway represents a common regulatory scheme for both hematopoietic and NC-derived progenitors. Our work establishes a novel experimental model for studies of melanocytogenesis and melanocyte transformation.

Úvod

Rodina transkripčních faktorů EGR

Rodina transkripčních faktorů EGR se skládá ze čtyř proteinů molekulové hmotnosti cca. 50-55 kDa s vysoce homologními DNA vazebnými doménami. Tyto proteiny byly identifikovány v pozdních osmdesátých a počátkem devadesátých let 20. století jako produkty genů, které rychle reagují na různé typy podnětů včetně séra, růstových faktorů, ischemie a ionizujícího záření (odtud název early growth response – časná růstová odpověď). Proteiny EGR jsou typickými představiteli transkripčních faktorů se zinkovými prsty typu Cys2-His2. C-terminálně umístěné DNA vazebné domény sestávající ze tří motivů zinkových prstů jsou téměř totožné ve všech EGR proteinech, zatímco sekvence mimo DNA vazebné oblasti jsou velmi rozdílné. Všechny proteiny EGR rozpoznávají stejné sekvence DNA - GCG G/TGG GCG (EGR responzivní element) [1]. Schopnost proteinů EGR aktivovat nebo potlačit transkripci cílových genů závisí na interakcích s jinými proteiny. Bylo prokázáno, že EGR1 využívá koaktivátory p300 a CBP pro aktivaci exprese cílových genů [2]. EGR2 využívá jiné koaktivátory, a to HCFC1 a CITED1 [3-4]. Specifické koaktivátory pro EGR3 a EGR4 nebyly zatím identifikovány. Významnou roli v regulaci funkce EGR proteinů hrají korepresory NAB, které interagují s R1 oblastmi proteinů EGR1, EGR2 a EGR3 [5-6]. NAB proteiny obsahují aktivní represní doménu, která přivádí NuRD komplex (nucleosome remodeling and deacetylase) na promotory genů regulovaných faktory EGR a způsobuje deacetylaci histonů a následnou represi transkripcie [7-8]. Indukce syntézy proteinů NAB je zprostředkována, alespoň pro některé z podnětů, EGR proteiny, a tak vytváří negativní zpětnou vazbu [9].

MAPK (mitogeny aktivovaná protein kináza) signalizace je pravděpodobně nejuniverzálnější (ve všech ohledech) systém stimulace buněk. Je aktivní ve všech eukaryotických buňkách od kvasinek po všechny typy buněk obratlovců. Aktivuje se vazbou ligandů širokého spektra membránových receptorů a ovládá celou škálu procesů včetně proliferace, diferenciaci, inducibilní sekrece proteinů, adheze, apoptózy, přežití a aktivace imunitních buněk. Syntéza proteinů EGR je rychle indukována stimulací MAPK signálních drah v různých (asi všech) buněčných typech. Tato indukce je

zprostředkována koordinovanou vazbou transkripčních faktorů Elk-1 nebo Sap-1a (z ETS rodiny), které jsou fosforylovány a aktivovány MAP-kinázami, a SRF (serum response factor) na sousedící ETS vazebné místo (GGAA/T) a CArG box (CC(A/T)₆GG), které společně tvoří tzv. sérum responzivní element. Tato kompozitní vazebná místa jsou přítomna v řadě sérum nebo růstovými faktory indukovatelných promotorů, včetně těch, které regulují expresi genů *EGR*. Proteiny *EGR* tak aktivují nebo potlačují expresi svých cílových genů v reakci na stimulaci MAPK signální dráhy.

Rodina transkripčních faktorů Myb

Objev proteinů Myb vzešel z výzkumu ptačí leukémie vyvolané virem ptačí myeloblastózy. Rodinu obratlových transkripčních faktorů Myb tvoří tři homologní proteiny: A-Myb, B-Myb a c-Myb. Kromě toho existují dva proteiny blíže příbuzné c-Mybu kódované ptačími retroviry AMV (virus ptačí myeloblastózy) a E26 (virus ptačí erytroblastózy) a byly proto označeny v-Myb^{AMV} a v-Myb^{E26}. Transkripční faktory Myb jsou modulární proteiny složené z několika strukturních a funkčních domén [10]. A-Myb a c-Myb vykazují značnou celkovou podobnost, zatímco B-Myb je dosti odlišný a jen jeho DNA vazebná doména vykazuje vysoký stupeň homologie k ostatním proteinům Myb. Retrovirové onkoproteiny odvozené od c-Mybu jsou ve srovnání s ním zkrácené na obou koncích. Kromě toho v-Myb^{AMV} obsahuje jedenáct bodových mutací a krátké sekvence retrovirového původu na obou koncích [11]. Druhý onkoprotein, v-Myb^{E26}, je velký fúzní protein složený ze sekvence odvozené z c-mybu, téměř kompletní sekvence kuřecího proteinu Ets-1 a sekvencí pocházejících z retroviru (z *gag* a *env* genů) na obou koncích [12]. DNA vazebná doména proteinů Myb, která je typu helix-otáčka-helix, se skládá ze tří nedokonalých repetice (tzv. R1, R2 a R3) 51 až 52 aminokyselin, ale pouze repetice 2 a 3 jsou nezbytné pro vazbu na DNA (přímo kontaktují DNA ve velkém žlábků) [10, 13]. Proteiny Myb rozpoznávají sekvenci YAACNG s dalším mírnou preferencí v přilehlých nukleotidech [14]. Transaktivační doména, která se nachází v centrální části proteinů c-Myb a v-Myb (aminokyseliny 350-370 v kuřecím c-Mybu), slouží k vazbě koaktivátorů, což je schopnost nezbytná pro aktivaci cílových genů. Bylo prokázáno, že přímo interaguje s tzv. doménou KIX proteinů CBP a p300, blíže příbuzných koaktivátorů [15]. Sekvence následující C-terminálně za transaktivační doménou proteinů Myb byly označeny jako "negativně regulační doména" (NRD). Hlavním důvodem pro takové označení bylo pozorování, že C-terminální zkrácení proteinu c-Myb výrazně posiluje jeho schopnost neoplastické transformace nezralých krvetvorných buněk a také zvyšuje jeho transaktivační schopnosti [16-17]. V rámci NRD bylo identifikováno několik funkčních domén [18-19]. Také byla objevena intramolekulární interakce N-terminální DNA vazebné domény s C-koncem (aminokyseliny 541-567) [20]. Oblast leucinového zipu (LZ) je nejlépe definovanou funkční doménou v NRD. LZ zprostředkovává protein-proteinové interakce a bylo

identifikováno několik vazebných proteinů pro tuto oblast [21-23]. I když LZ negativně ovlivňuje aktivaci transkripce proteiny Myb (mutace v LZ ji zvyšuje), je nezbytný pro efektivní transformaci myeloidních progenitorových buněk onkoproteinem v-Myb^{AMV} [23-24]. Proteiny rodiny Myb se výrazně liší svými expresními profily ve vyvíjejících se i dospělých organizmech obratlovců. A-Myb vykazuje nejvíce omezenou expresi - pouze v germinálních B lymfocytech, samčích zárodečných buňkách, duktálním epitelu prsu a v několika oblastech vyvíjejícího se centrálního nervového systému [25-26]. B-Myb se naopak nachází ve všech typech buněk a hladina proteinu je úměrná míře buněčné proliferace. Nejsilnější exprese B-Mybu je detekována v embryonálních kmenových buňkách, vyvíjejících se tkáních a v nezralých krvetvorných buňkách dospělců [27-28]. Gen *c-myb* je exprimován v nezralých, proliferujících epiteliálních, endoteliálních, neurogenních a krvetvorných buňkách a je vypínán, když buňky dozrávají [29].

Krvetvorba je kontinuální vytváření buněčných složek krve. Všechny krevní buňky jsou odvozeny od hematopoetické kmenové buňky. Složité procesy, které řídí volbu linie, diferenciaci a zrání vyvíjejících se krvinek jsou jen částečně objasněny. Je jasné, že stejně jako v jiných systémech diferenciaci buněk, je základní regulační aparát tvořen extracelulárními ligandy, jejich receptory, navazujícími signálními drahami a sítí transkripčních faktorů, které v konečném důsledku přemění všechny signály do určitých vzorců genové exprese. Proteiny Myb byly poprvé objeveny jako onkogenní faktory retrovirů AMV a E26, které indukují leukémie u kuřat. AMV indukuje akutní monoblastickou leukémií s velmi rychlým průběhem [30]. E26 transformované buňky jsou směsí erytroblastů a myeloblastů (ranný předchůdce granulocytů a makrofágů) a prvé vykazují široký diferenciací potenciál [31]. Oba virové proteiny v-Myb jsou odvozeny od c-Mybu, savčího transkripčního regulátoru s kritickou rolí v krvetvorbě. Myši postrádající obě alely genu *c-myb* umírají 15. den embryonálního vývoje v důsledku absence definitivní krvetvorby [32]. Použitím podmíněného vyřazení genu a chimérických myší bylo zjištěno, že hematopoetické kmenové buňky jsou přítomny v *c-myb*^{-/-} myších, i když ve sníženém počtu a že také částečně diferencované progenitory erytroidní, myeloidní a lymfoidní linie mohou vznikat, ale nedochází k jejich dalšímu množení v nepřítomnosti proteinu c-Myb [33-34]. Žádné zralé *c-myb*^{-/-} buňky jakékoli lymfatické nebo myeloidní linie nejsou detekovány v dospělých krvetvorných tkáních. Účinky vyřazení genu *c-myb* na krvetvorbu jsou buněčně autonomní a korelují s absencí uni- a multiliniových progenitorů [33].

Neurální lišta (NL) je multipotentní populace migrujících buněk jedinečná pro embrya obratlovců. NL vzniká na boční hraně neurální ploténky, migruje po celém embryu a dává vzniknout celé řadě buněčných typů, včetně periferních a středních neuronů a glií, kraniofaciálních chrupavek a kostí, hladké svaloviny a melanocytů [35]. Procesy, které řídí vznik, migraci a diferenciaci NL, byly zatím jen částečně objasněny. Bylo zjištěno, že vývoj NL z ektodermy je řízen indukčními signály z přilehlé epidermis a mezodermy (shrnuto v [35]). Tyto signály jsou tvořeny sekretovanými proteiny rodin

WNT (wingless-type murine mammary tumor virus integration site), BMP (bone morphogenetic protein) a FGF (fibroblast growth factor). Jeden z typů buněk, které jsou produkovány diferenciací NL, je melanocyt. V roce 1999 byl odhalena zajímavá schopnost onkoproteinu v-Myb^{E26} transformovat progenitory melanocytů [36]. Experimenty prováděnými v naší laboratoři zhruba ve stejnou dobu bylo zjištěno, že i v-Myb^{AMV} je schopen efektivně transformovat buňky z časných embryí, přičemž vnikají rychle expandující populace melanoblastů v kultuře (Karafiát et al., nepublikováno). Následná studie se zaměřila na předpokládané zapojení endogenního proteinu c-Myb do regulace procesů řídicích vytváření a migraci NL v kuřecích embryích. Odhalili jsme důležitou roli proteinu c-Myb v epitelově-mezenchymovém přechodu, což je kritický krok ve formování NL [37].

Cíle práce

Naším hlavním zájmem bylo studium systémů regulace genové exprese, které jsou základem fenotypových přechodů vybraných primárních buněk a buněčných linií, abychom lépe pochopili procesy volby linie, buněčné diferenciaci a metastázování. Transkripční regulátory EGR1, EGR4, c-Myb a v-Myb^{AMV} se ukázaly být užitečnými molekulárními nástroji schopnými indukovat specifické přechody buněčných fenotypů.

Specifické cíle:

- 1) Potvrdit předběžná data naznačující, že protein EGR1 může být zapojen do regulace metastatického chování buněk kuřecí sarkomové linie PR9692. Pokud ano, pak dále analyzovat úlohu proteinu EGR1 v tomto procesu s hlavním zaměřením na regulaci genové exprese.
- 2) Charakterizovat fenotyp domnělých myofibroblastů odvozených z explantátů kůže kuřecího embrya a odhalit program genové exprese, který je řízen signální dráhou TGF- β v těchto buňkách. Rozšířit původní pozorování naznačující, že trvalá přítomnost proteinu EGR4 v těchto buňkách vyvolává jejich dediferenciaci a pokusit se odhalit příslušný molekulární mechanismus.
- 3) Analyzovat dopad mutací v oblasti leucinového zipu proteinu v-Myb^{AMV} na chování nezralých krvetvorných buněk infikovaných AMV s ohledem na jejich vývoj do erytroidní a myeloidní diferenciací řady.
- 4) Analyzovat účinky proteinů c-Myb a v-Myb^{AMV} na vývoj multipotentních buněk neurální lišty a na expresi vybraných genů během rané fáze diferenciaci melanocytů indukované proteiny Myb.

Metody

Retrovirové expresní vektory byly použity v každé z uvedených studií k dosažení stabilní exprese studovaných genů v modelových buňkách. Jednou z výhod použití kuřete jako modelového organismu je dostupnost několika spolehlivých retrovirových vektorů, které nabízejí pohodlné klonování, rychlé množení v buněčných populacích a na rezistenci vůči antibiotikům založenou selekci buněk infikovaných retrovirem. Vektor nesoucí studovaný gen je integrován do genomu cílové buňky a následná exprese řízená virovým promotorem LTR poskytuje snadno detekovatelné množství kódovaného proteinu.

Oligonukleotidové mikročipy umožňují analýzu genové exprese mnoha tisíc (teoreticky všech) genů v malém vzorku celkové RNA z modelového organismu v jednom experimentu. Základním principem mikročipové analýzy je hybridizace mezi dvěma řetězci DNA, schopnost komplementárních sekvencí nukleových kyselin specificky párovat vytvářením vodíkových vazeb mezi nukleotidy. Po odmytí nespecificky navázaných sekvencí zůstávají hybridizovány pouze silně párující řetězce. Fluorescenčně značené cílové sekvence, které se váží na sekvence sond umístěných na definovaných místech, generují signál, jehož intenzita je závislá na koncentraci cílové sekvence ve vzorku [převzato z Wikipedie]. Existuje mnoho výrobců oligonukleotidových mikročipů, jejichž platformy se liší v tom, jak jsou vyrobeny, a také v počtu, délce a uspořádání sond a v topologii jejich fyzického nosiče. Ve všech našich pokusech jsme použili mikročipy GeneChip™ od firmy Affymetrix. V případě těchto mikročipů jsou sondy syntetizovány in situ na skleněné destičce s použitím fotolitografie. Vynikajícího poměru signálu k šumu je dosaženo tím, že pro každý cíl je přítomna skupina sond (tzv. probe-set) pokrývající několik set nukleotidů sekvence. Signál odpovídající množství cílové sekvence ve vzorku se vypočítává ze signálů jednotlivých sond v probe-setu s využitím statistických metod.

Polymerázová řetězová reakce (PCR), je in vitro enzymatická reakce používaná pro zmnožení malého množství molekul DNA přes několik řádů, čímž vznikají miliony kopií určité sekvence DNA. V předložené práci jsme použili PCR pro dva různé účely. Prvním účelem bylo molekulární klonování požadovaných cDNA sekvencí. Druhým použitím byl odhad nebo kvantifikace relativních množství molekul mRNA ve studovaných vzorcích. Pro tento účel jsme použili buď RT-PCR (reverzní transkripce následovaná polymerázovou řetězovou reakcí) nebo qPCR (kvantitativní polymerázová řetězová reakce). V případě semi-quantitativní RT-PCR, jsou produkty amplifikace rozděleny na agarózovém gelu elektroforézou a zviditelněny obarvením ethidium bromidem. Tento postup umožňuje pouze hrubý odhad větších rozdílů v genové expresi. Druhá metoda, qPCR, je založena na automatizovaném měření fluorescence barviva (SYBR green), které fluoreskuje pouze v přítomnosti dvouřetězcových molekul DNA, po každém amplifikačním cyklu. Tato metoda umožňuje poměrně přesný odhad počátečních

množství cDNA molekul ve studovaných vzorcích a proto je použitelná i pro analýzu menších rozdílů v genové expresi (dvojnásobných nebo dokonce menších).

Western blot (nebo také imunoblot) je velmi rozšířená technika pro detekci studovaných proteinů v analyzovaných vzorcích. Pomocí gelové elektroforézy (SDS-PAGE) se nejprve denaturované proteiny rozdělí podle délky polypeptidového řetězce. V dalším kroku jsou pak přeneseny na membránu (nitrocelulózu nebo PVDF), kde jsou detekovány pomocí specifických protilátek.

Průtoková cytometrie je velmi výkonná technika pro současnou analýzu několika parametrů jednotlivých buněk v heterogenní populaci. Průtokový cytometr provádí tuto analýzu tím, že nechá procházet tisíce buněk za sekundu přes laserový paprsek a detekuje fluorescenci, která vychází z každé buňky (předtím označené konjugovanými protilátkami nebo přímo fluorescenčními barvivy).

Imunofluorescenční mikroskopie je metodou detekce proteinů přímo v buňkách. Tato technika využívá specifických protilátek vůči antigenu k fluorescenčnímu označení konkrétních proteinů ve studované buňce. Umožňuje studium nitrobuňčné lokalizace proteinů a topologie a morfologie struktur, jejichž jsou součástí.

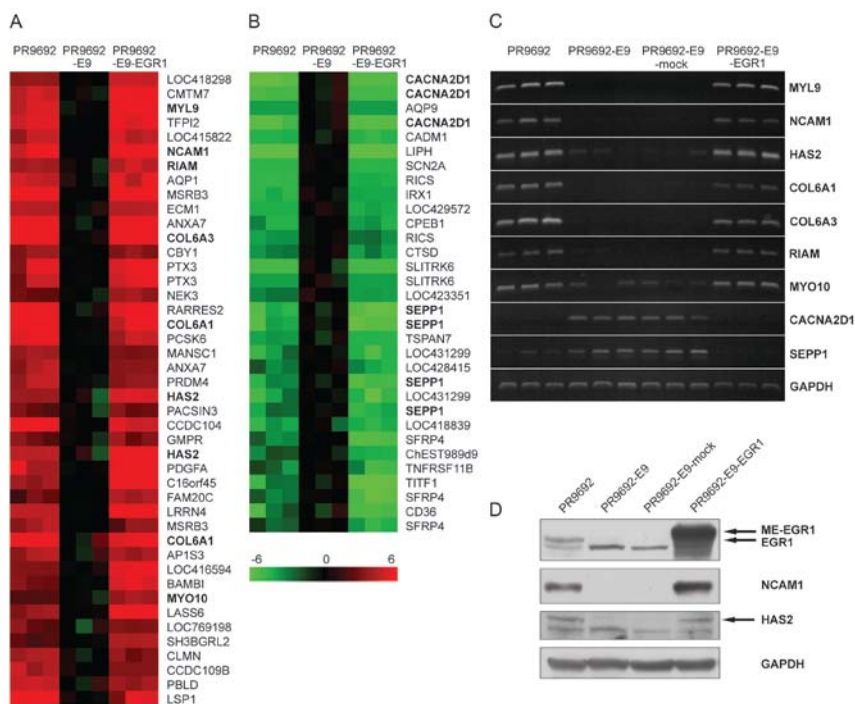
Výsledky a diskuse

Regulace metastázování sarkomů proteinem EGR1

V průběhu devadesátých let dvacátého století byl v Laboratoři virové a buněčné genetiky v ÚMG AV ČR vyvinut modelový systém vhodný pro studium molekulárních mechanismů, které jsou základem metastázování nádorů. Je založen na dvou kuřecích fibrosarkomových buněčných liniích transformovaných genem *v-src*. Původní („rodičovské“) buňky PR9692 jsou vysoce metastatické, zatímco odvozený klon PR9692-E9 nemetastazuje. Po inokulaci do prsního svalu pokusných zvířat obě buněčné linie tvoří rychle rostoucí primární nádory, ale pouze rodičovské PR9692 buňky zakládají plicní metastázy. Abychom odhalili rozdíly v genové expresi, které by mohly vysvětlit odlišné metastatické chování buněk PR9692 a PR9692-E9, analyzovali jsme tři nezávislé vzorky každé buněčné linie pomocí oligonukleotidových mikročipů (Affymetrix Chicken GeneChip™). Přibližně u 850 genů byla exprese zvýšena nejméně dvakrát a u 1350 genů nejméně dvakrát snížena v PR9692-E9 buňkách ve srovnání s PR9692.

Analýza genové exprese odhalila, že exprese genu pro transkripční faktor EGR1 byla snížena (20-krát podle mikročipů, cca. 3-krát podle qPCR) v nemetastazujících buňkách, což naznačuje, že EGR1 by mohl být důležitý pro metastázování. Na základě těchto pozorování jsme předpokládali, že zvýšení exprese genu *EGR1* v buňkách PR9692-E9 by mohlo obnovit jejich metastatický potenciál. Pro zvýšení exprese *EGR1* v buňkách PR9692-E9 jsme použili retrovirový vektor SFCV-LE s vloženou cDNA

kódující kuřecí EGR1 značený N-terminálně epitopem myc (SFCV-ME-EGR1). Přítomnost myc-označeného EGR1 ve výsledných buňkách PR9692-E9-EGR1 byla potvrzena technikou Western blot (obr. 1D). Pokusná zvířata pak byla injikována buňkami PR9692, PR9692-E9 nebo PR9692-E9-EGR1 a jejich plíce analyzovány na přítomnost metastáz 5 týdnů po injekci. Pokročilé metastázy byly nalezeny u všech zvířat injikovaných buď buňkami PR9692 nebo PR9692-E9-EGR1, zatímco žádné významné metastázování nebylo zjištěno u zvířat injikovaných buňkami PR9692-E9. Velikost a počet metastatických ložisek u zvířat injikovaných buňkami PR9692-E9-EGR1 byly srovnatelné s těmi, které byly injikovány buňkami PR9692. Abychom identifikovali potenciální EGR1 cílové geny zúčastněné v regulaci metastatického šíření sarkomů, ana-



Obr. 1. Geny spojené s metastatickým fenotypem. A Geny s vysokou expresí v metastázujících PR9692 a PR9692-E9-EGR1 buňkách a zároveň nízkou expresí v nemetastázujících PR9692-E9 buňkách. B Geny se sníženou expresí v metastázujících ve srovnání s nemetastázujícími buňkami. Geny, které byly dále analyzovány pomocí PCR a qPCR jsou uvedeny tučně. C PCR analýza diferenciální exprese genů. cDNA vzorky získané ze tří nezávislých kultur každé buněčné linie byly amplifikovány pomocí PCR a rozděleny na agarózovém gelu. D Proteinové hladiny odpovídající vybraným diferenciálně exprimovaným genům byly analyzovány technikou Western blot. ME-EGR1 znamená EGR1 značený epitopem z proteinu c-Myc.

lyzovali jsme buňky PR9692-E9-EGR1 pomocí oligonukleotidových mikročipů. Výsledný expresní genový profil byl pak porovnán s daty genové exprese, která byla získána dříve pro buňky PR9692 a PR9692-E9. Trvalá exprese *EGR1* v buňkách PR9692-E9 vedla k dvojnásobnému nebo silnějším zvýšení exprese asi 2150 genů a nejméně dvojnásobnému snížení exprese u asi 1850 genů. Ze srovnání všech expresních údajů vyplynulo, že exogenní exprese *EGR1* v nemetastázující buněčné linii PR9692-E9 obnovila expresi řady genů na úroveň srovnatelnou s metastázující linií PR9692. Geny, které vykazují podobnou aktivitu v obou metastatických buněčných liniích (PR9692 a PR9692-E9-EGR1) a tato je buď snížena nebo zvýšena u nemetastázujících buněk (PR9692-E9) představují hypotetický metastatický program genové exprese. Seznam těchto genů je uveden na obr. 1A, B. Pro další PCR a qPCR ověření rozdílů genové exprese jsme vybrali několik genů z obou skupin (zvýšených a snížených). Výsledky analýzy PCR potvrdily mikročipová data (viz obr. 1C). Seznam genů vykazujících podobnou expresi v buňkách PR9692 a PR9692-E9-EGR1 a snížení v buňkách PR9692-E9 obsahuje geny s již známou rolí v metastázování nádorů (např. *MYL9*, *RIAM*, *MYO10*, *NCAM1*, geny pro kolageny typu VI, *HAS2* a *PCSK6*), geny, které dosud nebyly spojovány s metastatickým chováním (např. *CMTM7*, *MSRB3*, *PRDM4*, *LRRN4*), stejně jako geny neznámé funkce (např. *CCDC104*, *C16orf45*, *AP1S3* a *CCDC109B*). Pravděpodobně nejzajímavější potenciální cíl *EGR1* je gen *MYL9*. Ten kóduje lehký regulační řetězec myosinu (MRLC/MLC/MLC2), cíl regulační fosforylace kinasou MLCK (myosin light chain kinase) a Rho-kinasou (ROCK). Tyto fosforylace řídí kontrakce aktinového cytoskeletu a jsou důležité pro vyzrávání adhezivních kontaktů, vytváření polaritu a následnou migraci buněk [38].

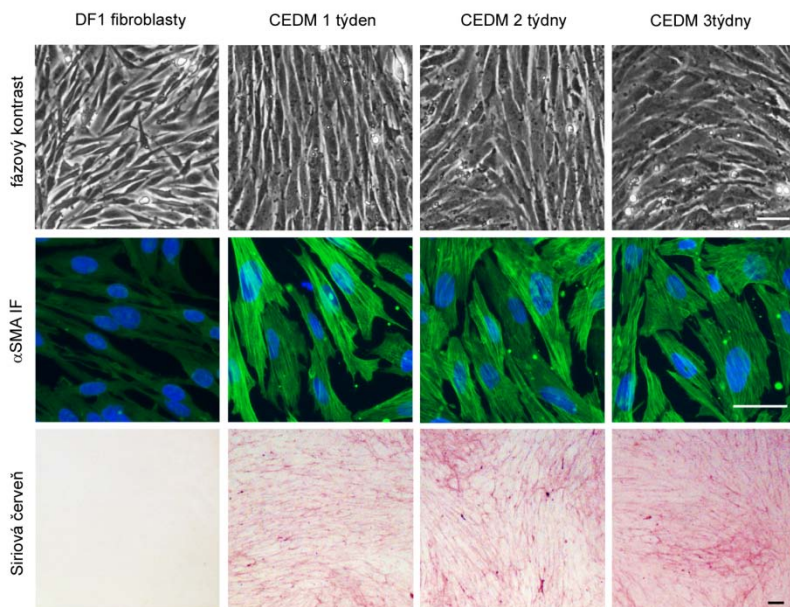
Transkripční regulace metastatického chování byla rozsáhle studována v transformovaných buňkách pocházejících z epitelu. Transkripční faktory identifikované v těchto buňkách jako důležité regulátory metastatického šíření, jsou téměř ve všech případech základní regulátory ustavení a udržování mezenchymálního fenotypu (twist, ZEB1, ZEB2, snail, slug a TCF3). Ačkoli transformované mezenchymální buňky exprimují tyto transkripční faktory konstitutivně, ne všechny mezenchymální nádory metastázuje. Například jen přibližně 20 procent sarkomů měkkých tkání lidských končetin progreduje do metastatické fáze [39-40]. Podobně naši kolegové z Laboratoře virové a buněčné genetiky v ÚMG AV ČR pozorovali, že primární fibrosarkomy indukované onkogenem *v-src* jsou nemetastázující (nepublikováno). Vzhledem k těmto pozorováním je zřejmé, že mezenchymální fenotyp sám o sobě není dostačující pro obdaření transformované buňky metastázujícími schopnostmi. Tento fakt naznačuje existenci další úrovně regulace transkripce, která kontroluje expresi genů důležitých pro metastatické šíření. Výsledky naší práce naznačují, že transkripční faktor *EGR1* může být klíčovým regulátorem celé sady genů, jejichž exprese je nutná pro efektivní šíření rakoviny formou metastáz.

Kučecí embryonální kožní myofibroblasty, regulace jejich fenotypu signální dráhou TGF- β a manipulace pomocí změněné hladiny proteinu EGR4

Myofibroblast je buněčný typ obratlovců, který má zásadní význam v normálním hojení ran, ale také je viníkem život ohrožujících fibroproliferativních onemocnění a aktivním pomocníkem nádorových buněk v maligní progresi lidských nádorů. Pro výzkum myofibroblastů je důležité mít vhodný modelový systém. Ačkoli procesy *in vivo* probíhají v trojrozměrném prostředí a vyžadují přímé a nepřímé mezibuněčné interakce, zdá se, že základní regulační děje udržující myofibroblastickou diferenciaci mezenchymální buňky jsou buněčně autonomní a mohou být studovány na buněčných liniích nebo primárních buňkách v kultuře. Primární fibroblasty připravené z kůže kuřecího embrya vykazují myofibroblastické rysy, zejména intenzivní produkci kolagenní mezibuněčné hmoty. Rozhodli jsme se proto analyzovat fenotyp těchto buněk podrobně a zjistit, zda by mohly být použity jako experimentální model pro studium biologie a biochemie myofibroblastů. Kombinace silné produkce mezibuněčné hmoty a přítomnosti stresových vláken tvořených α SMA (hladkosvalový α -aktin) v buňkách, je jedinečnou vlastností myofibroblastů. K prokázání myofibroblastického fenotypu buněk odvozených z kůže desetidenního kuřecího embrya jsme ustavili buněčné kultury a udržovali je po dobu až čtyř týdnů. Vzorky buněk byly analyzovány jednou týdně na přítomnost vláken tvořených α SMA imunofluorescenční mikroskopii a produkce mezibuněčné hmoty byla vizualizována barvením materiálu uloženého buňkami na povrchu kultivačních misek Siriovou červení. Jak lze vidět na obr. 2, prakticky 100% buněk vykazovalo velmi silné imunofluorescenční barvení vláken α SMA a současně bylo možno detekovat velké množství kolagenní mezibuněčné hmoty ve všech časových bodech. Tyto výsledky, podporované profily genové exprese popsány dále, ukazují, že buňky odvozené z explantátů kůže kuřecích embryí jsou myofibroblasty a že homogenita a časová stabilita jejich fenotypu ospravedlňuje jejich využití jako experimentálního modelu v biologii myofibroblastu. V následujícím textu bude používána zkratka CEDM (chicken embryo dermal myofibroblasts - kuřecí embryonální kožní myofibroblasty).

Centrálním regulátorem procesu myofibroblastické diferenciaci mezenchymálních buněk je TGF- β ligand. Je rovněž známo, že TGF- β autokrinní smyčka se ustavuje v diferencovaných myofibroblastech. Vazba ligandu TGF- β na receptor sestávající ze dvou TGFBR1 a dvou TGFBR2 podjednotek indukuje fosforylaci proteinů SMAD2 a SMAD3, které se následně přemisťují do buněčného jádra a aktivují transkripci prostřednictvím specifických vazebních míst v promotorových oblastech jejich cílových genů [41]. Kromě toho aktivuje signál TGF- β také MAPK signalizaci [42]. Pro identifikaci TGF- β regulovaných genů v CEDM buňkách jsme použili vysoce selektivní inhibitor kinasové aktivity TGFBR1 (2-(3-(6-methylpyridin-2-yl)-1H-pyrazol-4-yl)-1,5-naftyridin), dále zkráceno na MPPN, a profilování genové exprese pomocí mikročipů

(GeneChip™ Chicken Genome Array, Affymetrix). Abychom odhalili program genové exprese závislý na TGF- β , porovnávali jsme profily genové exprese CEDM buněk vystavených na 48 hodin působení 500 nM MPPN (rozpuštěného v DMSO) nebo pouze DMSO. Porovnání genových expresních profilů odhalilo velké množství genů, jejichž aktivita byla snížena (421 probe-setů) nebo zvýšena (475 probe-setů) v reakci na inhibici TGF- β signální dráhy. Geny kódující komponenty mezibuněčné hmoty, enzymy důležité pro její syntézu a úpravy a různé sekretované růstové faktory byly hojně přítomny mezi geny se sníženou expresí. Kromě nich, různé další geny kódující proteiny známé i neznámé funkce byly také přítomny ve stejné skupině. Mnohé z těchto genů byly již identifikovány v savčích buňkách jako TGF- β regulované. Poněkud překvapivě bylo zjištěno, že více než polovina z ovlivněných genů zvýšila svojí aktivitu v reakci na působení MPPN. Tradiční a stále převažující pojetí myofibroblastů jako aktivované formy dříve klidových fibroblastů předpokládá, že geny by měly být především aktivovány v reakci na TGF- β stimulaci a tudíž tlumeny při ztrátě TGF- β signalizace.



Obr. 2. Buňky odvozené z kůže kuřecího embrya vykazují myofibroblastické znaky. Imunofluorescenční barvení hladkosvalového α -aktinu odhalilo přítomnost výrazných vláken téměř ve všech buňkách CEDM (střední řada). CEDM buňky současně ukládaly velké množství mezibuněčné hmoty, jak o tom svědčí barvení kolagenů po lýze buněk pomocí Siriové červeně (dolní řada). Výsledky ukazují stabilitu fenotypu v průběhu tří týdnů kultury. Fibroblasty DF1 byly použity jako negativní kontrola.

Naše data poskytují silnou podporu pro alternativní hypotézu považující vznik myofibroblastu za složitější diferenciaci zahrnující jak zvyšování tak i snižování exprese různých genů. Přítomnost genů tvořících nedávno objevenou transkripční signaturu mezenchymálních kmenových buněk v aktivované skupině poskytuje další podporu pro tuto hypotézu. Ve stejné skupině jsme objevili také geny spojené s adipogenezí, ale žádné známky adipocytární diferenciaci nejsou pozorovány ani po dvou týdnech působení MPPN a buňky zůstávají myofibroblasty. Pravděpodobně nejlepší interpretace těchto dat je aktivace mezenchymální diferenciacní plasticity v reakci na inhibici TGF- β signální dráhy v myofibroblastických buňkách, která však nevede k fenotypové změně za použitých podmínek. Abychom ověřili a dále rozšířili výsledky získané mikročipy, byly změny genové exprese analyzovány pomocí PCR a hladina vybraných proteinových produktů stanovena technikou Western blot. Také nás zajímalo, zda geny identifikované jako TGF- β -závislé v buňkách CEDM budou odpovídat na TGF- β stimulaci u fibroblastů. Porovnali jsme citlivost vybraných genů na působení MPPN v buňkách CEDM a na silnou trvalou sekreci TGF- β 3 ligandu (přepisovaného z integrovaného retrovirového vektoru) v buňkách DF1. Pomocí PCR analýzy bylo zjištěno, že celá řada genů utlumených po působení MPPN v buňkách CEDM byla indukována v DF1 fibroblastech v reakci na TGF- β 3, čímž jsme potvrdili účinnost a selektivitu inhibitoru a biologickou relevanci identifikovaných genů. Dále byly geny aktivované v reakci na působení MPPN v buňkách CEDM analyzovány semikvantitativní RT-PCR a mikročipové výsledky byly potvrzeny. Dále jsme řešili otázku, zda dlouhodobé působení MPPN na buňky CEDM vyvolá jejich dediferenciaci na fibroblasty. Poněkud překvapivě, ani dva týdny kultury s kontinuální přítomností MPPN v kultivačním médiu nevedlo ke ztrátě všech myofibroblastických vlastností. PCR a Western blot analýzy odhalily trvalé utlumení genů kódujících některé komponenty mezibuněčné hmoty, růstové faktory a geny kódující cytoskeletární regulátory ACTG2 a TPM1, ale v podstatě nenastala žádná změna v expresi genů *ACTA2*, *CNN1* a *TAGLN*, které jsou odpovědné za vznik a kontraktilitu vláken tvořených α SMA. Některé z hlavních složek mezibuněčné hmoty (kolageny typu I a fibronectin) byly také nezávislé na dlouhodobém působení MPPN. Tyto výsledky naznačují, že v buňkách CEDM signalizace pomocí TGF- β řídí zejména produkci některých složek mezibuněčné hmoty a dalších sekretovaných proteinů, ale není hlavním regulátorem celého myofibroblastického fenotypu. Zejména program genové exprese ovládající kontraktilitu hladkosvalového aktinu se zdá být do značné míry nezávislý na TGF- β .

V navazující studii jsme analyzovali naše předběžné pozorování, že trvalá přítomnost proteinu EGR4 v buňkách CEDM indukuje jejich dediferenciaci (ztrátu myofibroblastické diferenciaci). Nejprve jsme charakterizovali fenotyp EGR4 exprimujících CEDM buněk. Pomocí stejných metod, jako bylo popsáno výše, jsme pozorovali výrazně nižší množství kolagenního materiálu uloženého na povrchu kultivačních misek buňkami s EGR4 ve srovnání s kontrolními buňkami infikovanými

prázdným retrovirovým vektorem. Anti- α SMA imunofluorescenční mikroskopie pak odhalila silné snížení intenzity vláken v EGR4-exprimujících buňkách ve srovnání s kontrolními buňkami. Myofibroblastický fenotyp tak byl evidentně silně potlačen v EGR4-exprimujících buňkách.

Abychom odhalili účinky stabilně zvýšené hladiny EGR4 na genovou expresi v buňkách CEDM, použili jsme oligonukleotidové mikročipy (Affymetrix GeneChip™ Chicken Genome Array). Expresní profily EGR4 buněk, ve srovnání s kontrolními buňkami, ukázaly významné (>2-krát) zvýšení nebo snížení exprese stovek genů, přičemž snížení exprese mírně převažovalo. Nejvýznamnějším účinkem stále zvýšené hladiny EGR4 bylo utlumení myofibroblastově specifických genů kódujících strukturální (kolageny, proteoglykany, fibronektin) a regulační (např. *TIMP3*, *THBS2*) složky mezibuněčné hmoty, geny spojené s kontraktilitou aktinového cytoskeletu (*CNN1*, *TAGLN*, *TPM1*, *ACTA2*) a geny kódující různé sekretované ligandy (*NOV*, *CXCL12*, *BDNF*, *FGF7*, *VEGFC* atd.). Mezi aktivovanými geny se objevilo několik známých negativních regulátorů TGF- β -signalizace nebo souvisejících profibrotických drah: *FOXG1*, *BAMBI*, *NAB1* a *DUSP5*. Abychom ověřili mikročipová data, provedli jsme qPCR analýzu exprese vybraných genů ve stejném souboru vzorků RNA a zjistili jsme, že všechny výsledky jsou v dobré shodě. Dále jsme analyzovali stav TGF- β signální dráhy v EGR4-exprimujících buňkách a kontrolních buňkách bez EGR4. Provedli jsme detekci fosforylované formy proteinu SMAD2 technikou Western blot a zjistili jsme, že zatímco lze detekovat silný signál v kontrolních neinfikovaných buňkách nebo buňkách infikovaných prázdným retrovirovým vektorem, tento prakticky chybí v EGR4 exprimujících buňkách. Dále jsme analyzovali stav MAPK-signalizace v EGR4 exprimujících buňkách detekcí fosforylovaných forem a celkové hladiny proteinů ERK, JNK a p38. Zjistili jsme, že trvalé zvýšení EGR4 potlačuje fosforylaci ERKu a dlouhé formy JNK, zatímco jejich celková hladina se nemění. Fosforylovaná forma p38 nebyla detekována v žádném ze vzorků.

Abychom odhalili relativní význam jednotlivých EGR4-cílů v potlačení TGF- β signalizace a v dediferenčním účinku, analyzovali jsme fenotypy CEDM buněk konstitutivně exprimujících proteiny FOXG1, BAMBI a NAB1. Pouze trvale zvýšený FOXG1 byl schopen účinně potlačit produkci mezibuněčné hmoty a vytváření α SMA vláken, zatímco BAMBI a NAB1 nevykázali žádný efekt. Expese FOXG1 rovněž vyvolala silné potlačení fosforylace SMAD2 srovnatelné s efektem konstitutivní exprese EGR4. Bylo také detekováno potlačení fosforylace ERK a dlouhé formy JNK ve FOXG1 exprimujících buňkách ve srovnání s kontrolními buňkami.

Pochopení molekulárních mechanismů, které mohou vyvolávat dediferenciaci myofibroblastů má klíčový význam pro budoucí pokrok v léčbě fibrotických onemocnění a pravděpodobně i karcinomů. Výsledky našich dvou studií ukazují, že inhibice TGF- β signalizace sama o sobě nestačí k vyvolání dediferenciace myofibroblastů, ale zároveň naznačují, že může být důležitou součástí dediferenčního procesu. Prokázali jsme, že

EGR4 je schopen zcela potlačit TGF- β signalizaci v myofibroblastech a odhalili jsme několik potenciálních zprostředkovatelů tohoto efektu. Zdá se, že mezi nimi hraje dominantní roli transkripční faktor FOXG1, jelikož může vyvolat fenotyp srovnatelný s konstitutivní expresí EGR4 v buňkách CEDM, pokud je exprimován z integrovaného retrovirového vektoru. Role ostatních genů - *BAMBI*, *NAB1* a *DUSP5* - v EGR4 indukované dediferenciaci myofibroblastů se zdá být méně důležitá, ale nelze ji vyloučit.

Volba diferenciální linie krvetvorných progenitorů a její regulace proteinem v-Myb^{AMV}

Zkoumání role oblasti leucinové zipu (leucine zipper region - LZR) proteinu v-Myb^{AMV} v AMV-indukované monoblastické leukémii byla hlavní náplní výzkumu v Laboratoři molekulární virologie od začátku devadesátých let dvacátého století. Nejvýznamnějším úspěchem z počátku této éry bylo odhalení skutečnosti, že LZR je naprosto nezbytný pro efektivní transformaci [23]. Další důležité zjištění bylo učiněno po konstrukci řady malých delečních mutantů v LZR a jeho okolí, když se ukázalo, že některé z těchto mutací zachovávají základní transformační schopnost, ale růst transformovaných buněk in vitro a jejich leukemogenicita in vivo jsou postižené v různé míře [43].

V navazující studii, prezentované zde, byly tyto mutanty analyzovány s ohledem na jejich schopnost podporovat množení a diferenciaci krvetvorných progenitorových buněk jiných než monoblastů. Transformační potenciál v-Myb^{AMV} (dále jen v-Myb) mutant byl analyzován v kulturách buněk blastodermu z 20 – 28 hodin starých kuřecích embryí. Tyto velmi časně embryonální buňky jsou zdrojem primitivních krvetvorných progenitorů, které mohou být transformovány v kultuře. Mutanty s neporušeným LZR stejně jako nemutovaný v-Myb vyvolali nárůst pouze buněk připomínajících monoblasty. Je zajímavé, že v kulturách infikovaných LZR mutantami, byly přítomny vedle myeloidních buněk také hemoglobinizované erytroidní buňky. Některé erytroidní buňky diferencovaly spontánně na zralé erytrocyty během 30-ti denní kultivace. V $\Delta P1$ (delece aminokyselin 301-311 ve v-Mybu) kulturách byly přítomny četné nezralé erytroidní buňky i po delší době kultivace. Blastodermové buňky transformované nemutovaným proteinem v-Myb a $\Delta P1$ mutací byly dále charakterizovány z hlediska růstového potenciálu, morfologie a exprese povrchových markerů, a také exprese genů důležitých pro vývoj myeloidních a erytroidních linií. Bylo zjištěno, že během prvních 7 dnů po infekci byly v-Mybové kultury tvořené převážně monoblasty s příměsí erytroidních buněk, zatímco později byly pozorovány už rychle se množící monoblasty. Naproti tomu v $\Delta P1$ kulturách byl v průběhu prvních 7 dnů po infekci pozorován nárůst především erytroidních buněk. Poté velká část buněk podstoupila spontánní diferenciaci na erytrocyty a výsledné kultury obsahovaly erytroidní buňky v různých fázích vývoje a také monoblasty. V pozdějších časových bodech byly také pozorovány buňky patřící do dalších hematopoetických linií - trombocyty, eozinofily a

heterofilní granulocyty (ekvivalent neutrofilů u savců). V pozdějších fázích (30 dní po infekci) v-Mybové kultury obsahovaly pouze myeloidní buňky, zatímco v kulturách $\Delta P1$ byly také pozorovány buňky erytroidní řady. Buňky s $\Delta P1$ exprimovaly vysoké hladiny mRNA kódujících proteiny c-Myb, SCL a GATA1, které jsou důležité pro vývoj erytroidní linie. V buňkách s nemutovaným v-Mybem naopak byly tyto mRNA v podstatě nepřítomny, zatímco mRNA pro myelomonocytární faktory C/EBP β , PU.1 a EGR1 byly hojně exprimovány.

V časných kulturách blastodermových krvetvorných buněk s $\Delta P1$ a v menší míře i v buňkách s nemutovaným v-Mybem některé buňky exprimovaly povrchové markery multipotentních myelo-erytroidních progenitorů (MEP). Abychom zvýšili sebeobnovovací kapacitu a/nebo zpozdili spontánní diferenciaci nezralých buněk exprimujících v-Myb nebo jeho mutovanou verzi $\Delta P1$, byly testovány různé růstové faktory a jejich kombinace. TGF α , bFGF a SCF, pokud působili současně, efektivně zvyšovali tempo růstu jak buněk s nemutovaným v-Mybem tak i s $\Delta P1$ variantou. Tyto buňky zůstávaly pozitivní na MEP antigeny. Abychom zjistili, zda LZR ovlivňuje hladiny mRNA pro C/EBP β , PU.1, EGR1, c-myb, SCL a GATA1 v nezralých buňkách a časných erytroidních progenitorech, analyzovali jsme RNA z buněk pěstovaných 21 a 30 dnů se směsí růstových faktorů. Zjistili jsme, že buňky s nemutovaným v-Mybem i s $\Delta P1$ verzí hojně exprimovaly SCL a GATA1 v obou časových bodech. Naproti tomu hladina mRNA pro c-Myb byla nižší u nemutovaného v-Mybu oproti $\Delta P1$ buňkám v čase 21 dnů, zatímco její hladiny byly v podstatě stejné 30. den. Hladiny mRNA pro myeloidní faktory C/EBP β a PU.1 byly vyšší u nemutovaného v-Mybu než v $\Delta P1$ buňkách 21. den a stěžejně detekovatelné v obou kulturách 30. Den. Tato data ukazují, že v nezralých krevních buňkách s v-Mybem (21. den) neporušený LZR způsobuje zvýšení hladiny C/EBP β a PU.1 mRNA a sníženou hladinu mRNA pro c-Myb ve srovnání s expresí těchto molekul v buňkách obsahujících $\Delta P1$ mutaci v LZR. Tento specifický expresní vzorec by měl předurčovat vývoj progenitorů na eozinofily a makrofágy, jelikož C/EBP β a PU.1 vynucují vývoj do těchto linií [44-45]. Výše uvedená data dokumentují schopnost LZR modulovat expresi regulátorů volby diferenciační linie.

Abychom odhalili diferenciační potenciál krevních progenitorů exprimujících exogenní v-Myb, kultivovali jsme je 14 dnů v přítomnosti TGF α , bFGF a SCF a pak jsme indukovali jejich diferenciaci odnětím růstových faktorů. Jelikož forbolový ester TPA působí jako silný induktor diferenciaci E26-infikovaných progenitorů [31], v některých experimentech bylo kombinováno odstranění růstových faktorů a přidání TPA. Výsledné buňky byly nejprve analyzovány na přítomnost povrchových proteinů specifických pro jednotlivé diferenciační linie. Bezprostředně před indukci diferenciaci jak buňky s nemutovaným v-Mybem, tak i buňky s $\Delta P1$ exprimovaly erytroidní marker JS4 a byly negativní na myeloidní marker MC51/2. Několik dní po indukci diferenciaci odstraněním růstových faktorů a přidáním TPA buňky s nemutovaným v-Mybem ztratily JS4 a začaly být pozitivní na MC51/2. Tyto buňky jednoznačně představovaly

makrofágové prekurzory, což potvrzovala také jejich morfologie. Naproti tomu buňky s $\Delta P1$ udržovaly vysokou expresi JS4 a byly negativní na MC51/2. Navíc si tyto buňky udržovaly nezralý fenotyp. V podobných pokusech byly diferencující buňky analyzovány cytochemickým barvením na přítomnost granulocytů a imunofluorescencí na přítomnost trombocytů 20 dní po indukci diferenciaci. Po přidání TPA byly v kulturách s nemutovaným *v-Myb* detekovány pouze monoblastické buňky a žádné trombocyty. V kulturách s $\Delta P1$ odhalilo barvení pomocí Astra modři četné heterofilní granulocyty. Použitím protilátky 11C3, která rozpoznává integrin GPIIb-IIIa specifický pro kuřecí trombocyty, byly detekovány četné pozitivní buňky. Analyzované kultury s $\Delta P1$ také obsahovaly monoblastické a erytroidní buňky. Tyto výsledky naznačují, že progenitory s $\Delta P1$ mají širší diferenciací potenciál než buňky s nemutovaným *v-Myb* a mohou diferencovat do všech linií odvozených od společného myeloidního progenitoru. Na druhou stranu, nemutovaný *v-Myb* brání progenitorům v diferenciaci na buňky erytroidní, trombocyty a heterofilní granulocyty. Absence heterofilních granulocytů v kulturách s nemutovaným *v-Myb* silně naznačuje, že *v-Myb* s neporušeným LZR nutí bipotentní progenitory granulocytů a makrofágů diferencovat pouze do makrofágové linie.

Účinek proteinů Myb na volbu diferenciací linie v buňkách neurální lišty

Jak již bylo zmíněno v úvodu, Bell s Framptonem a také my jsme odhalili schopnost proteinů *v-Myb* transformovat buňky z časných embryí, přičemž vznikaly rychle rostoucí populace melanoblastů v kultuře (Karafiát et al., nepublikováno a [36]). Také jsme prokázali významnou roli proteinu *c-Myb* v epitelově-mezenchymovém přechodu při formování neurální lišty (NL) [37]. V následném studii, která se soustředila na konkrétní roli *c-Myb* ve vývoji melanocytů a také jejich transformaci proteinem *v-Myb^{AMV}*, jsme se zaměřili na diferenciaci do melanocytární linie a to, jak je ovlivněna proteiny Myb. Označení *v-Myb* (protein) a *v-myb* (gen) bude v následujícím textu vždy znamenat AMV verzi.

Abychom zjistili, zda proteiny Myb mohou ovlivnit volbu diferenciací linie progenitorů melanocytů, byly geny *c-myb* a *v-myb* zavedeny pomocí retrovirových vektorů do naivních neurálních plotének, které obsahují pouze buňky budoucí NL a žádné rozhodnuté progenitory melanocytů. V explantátech neurálních plotének oba *myb* geny způsobily delaminaci a tvorbu pigmentových buněk. To znamená, že onkogen *v-myb*, podobně jako *c-myb* [37], může aktivovat velmi časně kroky v tvorbě trupové NL, a oba proteiny Myb podporují diferenciaci časných buněk NL do melanocytární buněčné linie. Pro další experimenty byly použity časně buňky NL vypočítané z fragmentů trupové části neurální trubice obsahujících nespojené neurální záhyby. Při vývoji embrya buňky NL delaminují z neurálních záhybů a prostupují okolní tkáň ve vlnách. Buňky časně vlny diferencují především na neurony a gliální buňky periferní nervové soustavy

(v případě trupové NL). Buňky druhé, opožděné vlny diferencují na melanocyty. Tento způsob emigrace NL/diferenciace je do jisté míry také rekapitulován ve tkáňové kultuře. Buňky první vlny in vitro spontánně diferencují především na gliální buňky. Jelikož buňky první vlny obsahují oligopotentní prekursor, včetně bipotentních gliových/melanocytárních progenitorů, mají také potenciál k vývoji podél melanocytární buněčné linie. Pro studium účinků proteinů Myb na volbu buněčné linie jsme použili buňky časné vlny NL. Tyto buňky byly infikovány retroviry kódujícími c-Myb a v-Myb a analyzovány o 7 - 12 dnů později. Oba proteiny směřovaly buňky časné vlny do melanocytární linie. V c-Mybových kulturách představovaly pigmentové buňky asi 50% populace, zatímco u v-Mybových kultur obvykle 90% buněk byly melanoblasty. Dále jsme analyzovali expresi vybraných genů zapojených do melanocytogeneze. Zavedení genů *c-myb* a *v-myb* do buněk časné vlny koreluje s akumulací transkriptu genu *MITF*, který kóduje transkripční faktor klíčový pro progresi vývoje melanocytů. Gen pro tyrosinazu - cíl transkripčního faktoru MITF - byl také silně aktivován v buňkách exprimujících vnesený c-Myb a v-Myb. Aktivita proteinu MITF je řízena několika způsoby. Mezi nimi modifikace MITF vyvolané SCF - c-Kit signalizací představují aktivační podnět důležitý pro vývoj melanocytární buněčné linie. Vzhledem k tomu, že exprese genu *c-kit* závisí na přítomnosti proteinu c-Myb v nezralých erytroidních buňkách, zajímalo nás, zda existuje podobná souvislost mezi expresemi genů *c-myb* a *c-kit* v buňkách NL. Infekce buněk časné vlny viry kódujícími c-Myb a v-Myb měla za následek akumulaci mRNA pro c-Kit, zatímco žádné významné změny nebyly pozorovány ve hladině mRNA pro SCF. Abychom zjistili, zda geny *myb* také zvyšují množství proteinu c-Kit na povrchu buněk, buňky NL vyputované v časné i pozdní vlně z explantátů neurální trubice stadia HH10 byly spojeny a infikovány kontrolním, c-Mybovým a v-Mybovým retrovirovým konstruktem a analyzovány průtokovou cytometrií s protilátkou kit2c75 proti kuřecímu proteinu c-Kit. V kontrolních buňkách NL jsme pozorovali detekovatelné množství proteinu c-Kit (na buňkách pozdní vlny, které obsahují diferencující melanocyty) a jeho výrazné zvýšení po zavedení genů *c-myb* a *v-myb*. Pro zjištění, zda zvýšení c-Kit mRNA závisí na proteinech Myb a není způsobené výhradně změněným buněčným složením diferencujících kultur, byly buňky první vlny NL vystaveny na 32 hodin retrovirům nesoucím 4-hydroxytamoxifen (4-OHT) indukci bilní v-*myb*-ER a v-*myb*(N118D)-ER (mutanta nerozpoznávající Myb specifické DNA sekvence) varianty a potom opůsobeny 4-OHT 7 nebo 24 hodin. Relativní koncentrace mRNA pro c-Kit byly analyzovány pomocí semikvantitativních a kvantitativních PCR reakcí. Výsledky qPCR stejně jako semikvantitativní PCR ukázaly nárůst c-Kit mRNA již po 7 h indukce s 4-OHT a tento efekt byl ještě výraznější po 24 h s 4-OHT. 4-OHT indukovatelné účinky fúzních proteinů Myb-ER byly zcela eliminovány mutací N118D v DNA vazebné doméně proteinu v-Myb. Tento výsledek podporuje představu přímé aktivace exprese genu *c-kit* proteinem v-Myb. Jelikož buňky první vlny NL produkují SCF, zvýšení hladiny receptoru c-Kit způsobené proteiny Myb

pravděpodobně vede ke zvýšení c-Kit signalizace. To může představovat alespoň část mechanismu, jehož prostřednictvím proteiny Myb aktivují melanocytogenesi v buňkách NL. Komplexní účinek obou genů *myb* na vznik NL a vývoj melanocytů se podobá jejich účinku na krvetvorné buňky. Výsledky této práce podporují představu překrývajících se genetických programů a podobných regulačních drah specifických diferenační směr v obou buněčných kompartmentech. Předpokládáme, že alespoň u ptáků se protein c-Myb účastní molekulárních mechanismů řídicích proliferaci, přežití a volbu diferenační linie jak u krvetvorných progenitorů tak i v buňkách NL.

Závěry

Tato disertační práce prezentuje výsledky několika studií, které byly provedeny souběžně. První studie analyzovala roli transkripčního faktoru EGR1 v regulaci metastatického chování buněk kuřecí sarkomové linie PR9692. Prokázali jsme, že:

- Metastázující buňky PR9692 ve srovnání s nemetastázujícími buňkami PR9692-E9 vykazují zvýšenou hladinu proteinu EGR1 i příslušné mRNA.
- Vynucení stále zvýšené hladiny proteinu EGR1 v nemetastázujících buňkách PR9692-E9 aktivuje jejich metastatický potenciál na úroveň odpovídající buňkám PR9692.
- Srovnání profilů genové exprese metastázujících a nemetastázujících buněk odhalilo kandidátní geny regulované transkripčním faktorem EGR1, jejichž proteinové produkty mohou být zodpovědné za metastatické chování buněk PR9692.

Druhá studie se zabývala mechanismy udržování myofibroblastické diferenciaci, rolí TGF- β -signalizace v tomto ději a manipulací myofibroblastického fenotypu pomocí zvýšené hladiny proteinu EGR4. Hlavní zjištění této studie jsou následující:

- Kuřecí embryonální kožní myofibroblasty vzhledem k velmi výraznému a časově stabilnímu myofibroblastickému fenotypu představují vhodný nesavčí experimentální modelový systém založený na primárních buňkách využitelný pro biologické studie myofibroblastů.
- Mikročipová analýza TGF- β -regulovaných genů v těchto buňkách odhalila mnohé nové i již známé cíle TGF- β -signalizace. Srovnání našich dat a publikované literatury odhalilo rozsáhlou evoluční konzervaci TGF- β -regulované transkripce v ptačích a savčích buňkách.
- Výsledky pokusů s dlouhodobou inhibicí TGF- β -signalizace v buňkách CEDM ukázaly, že tato signální dráha moduluje myofibroblastický fenotyp a stimuluje

sekreční funkce v těchto buňkách, ale není jediným regulátorem udržování myofibroblastické diferenciaci.

- Zvýšená exprese transkripčního faktoru EGR4 v buňkách CEDM indukuje jejich dediferenciaci doprovázenou ztrátou všech typických myofibroblastických znaků.
- Zvýšená exprese EGR4 způsobuje silnou inhibici TGF- β -signalizace a také vede k potlačení exprese genů, které kódují klíčové komponenty myofibroblastického kontraktálního aparátu.
- Mikročipová analýza genové exprese buněk CEDM se zvýšenou hladinou proteinu EGR4 poskytla data, která byla plně v souladu s pozorovanými efekty a odhalila několik genů regulovaných EGR4, které mohou zprostředkovávat některé z těchto efektů.
- Geny *FOXG1*, *BAMBI*, *NAB1*, *NAB2* a *DUSP5* mohou společně představovat EGR4-kontrolovanou regulační síť potlačující autokrinní TGF- β -signalizaci.

Třetí studie analyzovala roli oblasti leucinového zipu proteinu v-Myb^{AMV} v diferenciaci AMV-infikovaných krvetvorných buněk do erytroidní a myeloidní linie. Zjistili jsme, že:

- Transkripční faktor v-Myb^{AMV} je schopen regulovat diferenciaci společného myeloidního progenitoru a více diferencovaných progenitorů předurčených k vývoji do myeloidní linie.
- Nemutovaný v-Myb^{AMV} řídí vývoj progenitorů do makrofágové linie.
- Mutace v oblasti leucinového zipu ruší výhradní vývoj směrem k makrofágům a způsobují, že takto mutovaný v-Myb^{AMV} také podporuje vývoj erytrocytů, trombocytů a granulocytů.

Čtvrtá studie se zaměřila na regulaci vývoje buněk neurální lišty do melanocytární linie proteiny c-Myb a v-Myb^{AMV}. Odhalili jsme, že:

- Expese proteinu c-Myb v buňkách ptačí neurální lišty zvyšuje počet buněk, které se vyvíjejí směrem k melanocytům a podporuje jejich konečnou diferenciaci na dendritické melanocyty.
- Onkoprotein v-Myb^{AMV} převádí v podstatě všechny buňky neurální lišty na melanoblasty a způsobuje jejich transformaci.
- Oba proteiny aktivují v buňkách ptačí neurální lišty expresi genu *c-kit* a signalizaci SCF - c-Kit.
- Naše práce zavádí nový experimentální model pro studium melanocytogeneze a transformace melanocytů.

Introduction

EGR family of transcription factors

The EGR family of transcription factors consists of four proteins of molecular mass approx. 50-55 kDa with highly homologous DNA binding domains. They were identified in late 1980s and early 1990s as products of genes that rapidly respond to various types of stimuli including serum, growth factors, ischemia and ionizing radiation (hence the name “early growth response”). EGR proteins are prototypical Cys2-His2 zinc finger transcription factors. The C-terminally located DNA binding domains consisting of three zinc finger motifs are almost identical in all EGR proteins while the sequences outside the DNA binding region are highly divergent. All EGR proteins recognize the same DNA sequence GCG G/TGG GCG (EGR response element) [1]. The ability of EGR proteins to activate or repress transcription of target genes depends on interactions with other proteins. It was demonstrated that EGR1 recruits p300 and CBP coactivators to activate the expression of target genes [2]. EGR2 has been demonstrated to use different coactivators, namely HCFC1 and CITED1 [3-4]. Specific coactivators of EGR3 and EGR4 have not been identified so far. An important role in the regulation of function of EGR proteins is played by NAB corepressors which interact with R1 domain of EGR1, EGR2 and EGR3 [5-6]. NAB proteins were demonstrated to contain an active repression domain that recruits NuRD complex (nucleosome remodeling and deacetylase) to bring about histone deacetylation and subsequent repression of promoters regulated by EGR factors [7-8]. The induction of the synthesis of NAB proteins was shown to be mediated, at least for some of the stimuli, by EGR proteins, thus forming a negative feedback loop [9].

MAPK (mitogen-activated protein kinase) signaling is probably the most universal (in all respects) cell stimulation system. It is active in all eukaryotic cells from yeasts to all types of vertebrate cells. It is activated by ligation of a broad spectrum of membrane receptors and controls a huge range of processes including proliferation, differentiation, inducible protein secretion, adhesion, apoptosis, survival, and immune cell activation, just to name a few examples. EGR proteins are rapidly induced by stimulation of MAPK signaling pathways in various (probably all) cell types. This induction is mediated by coordinated binding of transcription factors Elk-1 or Sap-1a (ETS family members), which are phosphorylated and activated by MAPKs, and SRF (serum response factor) to neighboring ETS binding site (GGAA/T) and a CArG box (CC(A/T)₆GG), which together form a so called serum response element. These composite binding sites are present in a number of serum or growth factor inducible promoters including those regulating the expression of *EGR* genes. EGR proteins thus activate or repress the expression of their target genes in response to MAPK signaling pathway stimulation.

Myb family of transcription factors

The discovery of Myb proteins originated from the research of avian leukemia induced by the avian myeloblastosis virus. The Myb family of vertebrate transcription factors consists of three homologous proteins: A-Myb, B-Myb and c-Myb. In addition, two proteins closely related to c-Myb are encoded by avian retroviruses AMV (avian myeloblastosis virus) and E26 (avian erythroblastosis virus E26) and have been accordingly designated v-Myb^{AMV} and v-Myb^{E26}. Myb proteins are modular proteins composed of several structural and functional domains [10]. A-Myb and c-Myb show striking overall similarity, while B-Myb is more divergent and only its DNA binding domain shows high degree of homology to the other Myb proteins. The retroviral c-Myb derived oncoproteins are, compared to c-Myb, trimmed at both ends. In addition, v-Myb^{AMV} contains eleven point mutations and short sequences of retroviral origin at both ends [11]. The second oncoprotein, v-Myb^{E26}, is a large fusion protein composed of a c-myb derived sequence, almost complete chicken Ets-1 protein and retrovirus derived sequences (from *gag* and *env* genes) at both ends [12]. The DNA binding domain of Myb proteins which is of helix-turn-helix type is composed of three imperfect repeats (called R1, R2 and R3) of 51-52 amino acids, but only the repeats 2 and 3 are necessary for DNA binding (directly contacting the DNA in the major groove) [10, 13]. Myb proteins recognize the YAACNG sequence with additional mild preference in the adjoining nucleotides [14]. The transactivation domain located in the central part of c-Myb and v-Myb proteins (amino acids 350-370 in chicken c-Myb) serves to recruit coactivators, an activity necessary for the activation of target genes. It has been shown to directly interact with so called KIX domain of CBP and p300 closely related coactivators [15]. The sequences C-terminal to the transactivation domain of Myb proteins have been designated “negative regulatory domain” (NRD). The main reason for such designation was the observation, that C-terminal truncations of c-Myb protein markedly enhanced its ability to neoplastically transform hematopoietic progenitors and also increased its transactivation abilities [16-17]. Several functional domains were identified within NRD [18-19]. Also, an intramolecular interaction of the N-terminal Myb DNA binding domain with the C-terminus (amino acids 541-567) was reported [20]. The leucine zipper region (LZR) is the best studied functional domain in NRD. It is supposed to mediate protein-protein interactions and a few binding proteins were reported [21-23]. Although it is negatively affecting the activation of transcription by Myb proteins (mutations in LZR increase it), it is necessary for effective transformation of myeloid progenitors by v-Myb^{AMV} [23-24]. Proteins of the Myb family significantly differ in their expression profiles in developing as well as adult vertebrate organisms. A-Myb shows the most restricted expression pattern being detected only in germinal B lymphocytes, male germ cells, breast ductal epithelium and in several regions of the developing central nervous system [25-26]. B-Myb gene expression, on the other hand, is found in all cell types and protein level is proportional to the degree of cell proliferation. Strongest expression of B-

Myb is detected in embryonic stem cells, developing tissues and in adult hematopoietic precursor cells [27-28]. The c-Myb gene is highly expressed in immature, proliferating epithelial, endothelial, neurogenic and hematopoietic cells and is downregulated as cells become differentiated [29].

Hematopoiesis is the continuous formation of blood cellular components. All blood cells are derived from hematopoietic stem cells. The intricate processes that control lineage choice, differentiation and maturation of developing blood cells are only partially understood. It is clear that, as in other cell differentiation systems, the basic regulatory machinery is composed of extracellular ligands, their receptors, downstream signaling pathways, and a network of transcription factors that ultimately transform all the signals into gene expression patterns. Myb proteins were first discovered as the oncogenic factors of AMV and E26 retroviruses, which induce leukemias in chickens. AMV induces acute monoblastic leukemia with very rapid progression [30]. E26 transformed cells are a mixture of erythroblasts and myeloblasts (early precursor of granulocytes and macrophages) and the former show multilineage differentiation potential [31]. Both viral Myb proteins derived from c-Myb, a vertebrate transcriptional regulator with a critical role in hematopoiesis. Mice lacking both *c-myb* alleles die at day 15 of embryonic development due to the absence of definitive hematopoiesis [32]. Using conditional knockouts and chimerical mice it was found that hematopoietic stem cells are present in *c-myb*^{-/-} mice, albeit at reduced numbers and that also committed progenitors of erythroid, myeloid and lymphoid lineages can be produced, but their further expansion does not occur in the absence of c-Myb [33-34]. No mature *c-myb*^{-/-} cells of any lymphoid or myeloid lineage could be detected in adult hematopoietic tissues. The effects of *c-myb* ablation on hematopoiesis are cell autonomous and correlate with an absence of uni- and multilineage progenitors [33].

The neural crest is a multipotent population of migratory cells unique to the vertebrate embryo. Neural crest arises at the lateral edge of the neural plate and migrates throughout the embryo to give rise to a wide variety of cell types including peripheral and enteric neurons and glia, craniofacial cartilage and bone, smooth muscle, and melanocytes [35]. Only partial knowledge of the processes underlying formation, migration and differentiation of the neural crest has been accumulated so far. It has been revealed that the development of neural crest from ectoderm is driven by inductive signals coming from adjacent epidermis and underlying mesoderm (reviewed in [35]). These signals are accounted for by secreted proteins of WNT (wingless-type murine mammary tumor virus integration site), BMP (bone morphogenetic protein), and FGF (fibroblast growth factor) families. One of the cell types that are produced by differentiation of the neural crest is melanocyte. An intriguing ability of the v-Myb^{E26} oncoprotein to transform melanocyte precursors was revealed in 1999 [36]. Experiments performed in our lab at about the same time revealed that also v-Myb^{AMV} is able to effectively transform cells from early embryos giving rise to rapidly expanding

populations of melanoblasts in culture (Karafiat et al., unpublished). A follow-up study then focused on a hypothesized involvement of endogenous c-Myb in the regulation of processes related to the formation and migration of the neural crest in chicken embryos. An important role of c-Myb in epithelial-mesenchymal transition, a critical step in the formation of the neural crest, was revealed [37].

Aims of the study

The main interest was to study gene expression circuitries underlying phenotypic transitions of selected primary cells and cell lines to better understand regulations of commitment, differentiation, and metastasis. Transcriptional regulators EGR1, EGR4, c-Myb and v-Myb^{AMV} proved to be useful molecular tools capable of inducing specific transitions of cell phenotypes.

Specific aims:

- 1) To confirm preliminary data indicating that EGR1 might be involved in the regulation of metastatic behavior of chicken sarcoma cell line PR9692. If true, then analyze further the EGR1 role in this context with a main focus on EGR1-controlled gene expression.
- 2) To characterize the phenotype of presumable myofibroblasts derived from explants of chicken embryo skin and to reveal the gene expression program that is regulated by the TGF- β signaling pathway in these cells. To extend the initial observation indicating that sustained expression of EGR4 is inducing dedifferentiation in these cells and try to reveal the underlying molecular mechanism.
- 3) To analyze the impact of mutations in the leucine zipper region of v-Myb^{AMV} on behavior of hematopoietic progenitors infected with AMV with respect to their commitment to erythroid and myeloid lineages.
- 4) To analyze the effects of Myb proteins on the development of multipotential neural crest cells and on gene expression during the early phase of Myb-induced melanocyte differentiation.

Methods

Retrovirus-based expression vectors were used in each of the presented studies to achieve a stable expression of genes of interest in model-system cells. One of the advantages of using chicken as a model organism is the availability of several reliable retroviral vectors, which offer convenient cloning, rapid propagation in cell populations, and antibiotics-based selection of retrovirus-infected cells. The vector bearing the gene of

interest is integrated in target cell's genome and subsequent LTR-driven expression provides easily detectable amounts of the encoded protein.

Oligonucleotide microarrays enable gene expression analysis of many thousands (theoretically all) of genes in a small total RNA sample from a model organism in a single experiment. The basic principle behind microarrays is hybridization between two DNA strands, the property of complementary nucleic acid sequences to specifically pair with each other by forming hydrogen bonds between complementary nucleotide base pairs. After washing off of non-specific bonding sequences, only strongly paired strands will remain hybridized. Fluorescently labeled target sequences that bind to a probe sequence present on a defined spot generate a signal whose strength depends upon the concentration of target sequence in the sample [adopted from Wikipedia]. There are many manufacturers of oligonucleotide microarrays whose platforms differ in the way they are produced and also in the number, length, and arrangement of probes as well as topology of their physical support. We used Affymetrix GeneChips™ in all experiments. In this case, the probes are synthesized *in situ* on a glass plate with the use of photolithography. An excellent signal to noise ratio is achieved by including a group of probes (called a probe-set) for each target, covering a few hundred nucleotides of sequence. The signal corresponding to the amount of target sequence in the sample is estimated from signals of individual probes in the probe-set with the use of statistical methods.

The polymerase chain reaction (PCR) is an *in vitro* enzymatic reaction used to amplify a small number of copies of a piece of DNA across several orders of magnitude, generating millions of copies of a particular DNA sequence. We used PCR for two different purposes in the presented work. The first use was molecular cloning of desired cDNA sequences. The second use was the estimation of relative abundances of mRNAs of interest in samples under study. For this purpose, we used either RT-PCR (reverse transcription followed by polymerase chain reaction) or qPCR (quantitative polymerase chain reaction). In case of semi-quantitative RT-PCR, the amplification reaction products are resolved on an agarose gel with electrophoresis and visualized by staining with ethidium bromide, which enables only rough estimation of larger differences in gene expression. The other approach, qPCR, is based on the automated measurement of fluorescence of double-strand-DNA-binding dye (SYBR green) in each amplification cycle. This method enables relatively precise estimation of the initial amount of cDNA molecules in the studied samples and therefore is applicable also for analysis of smaller differences in gene expression (two-fold or even smaller).

Western blot (or immunoblot) is a widely used technique to detect specific proteins in samples under analysis. It uses gel electrophoresis (SDS-PAGE) to separate denatured proteins by the length of the polypeptide chain. The proteins are then transferred to a membrane (nitrocellulose or PVDF), where they are stained with antibodies specific to the target protein.

Flow cytometry is a powerful technique for the analysis of multiple parameters of individual cells in heterogeneous populations. The flow cytometer performs this analysis by passing thousands of cells per second through a laser beam and detecting the fluorescence that emerges from each cell (previously labeled with conjugated antibodies or directly with fluorescent dyes) as it passes through.

Immunofluorescence microscopy is a means to detect proteins directly in cells. This technique uses the specificity of antibodies to their antigen to target fluorescent dyes to specific protein targets within a cell. It enables studies of subcellular localization of proteins and of topology and morphology of structures they are involved in.

Results and discussion

Sarcoma metastasis regulation by EGR1

A model system suitable for studying molecular mechanisms underlying cancer metastasis was developed in the Laboratory of viral and cellular genetics at IMG ASCR during 1990s. It is based on two *v-src* transformed chicken fibrosarcoma cell lines – the highly metastatic parental PR9692 cells and the non-metastasizing clone, PR9692-E9. Upon inoculation into the pectoral muscle of experimental animals, both cell lines form rapidly growing primary tumors, but only the parental PR9692 cells give rise to lung metastases. To identify differences in gene expression that might explain the disparity between the PR9692 and PR9692-E9 cells with respect to their metastatic behavior, three independent samples of each cell line were analyzed using oligonucleotide microarrays (Affymetrix Chicken GeneChip™). Approximately 850 genes were found upregulated at least 2-fold and 1350 genes downregulated at least 2-fold in PR9692-E9 cells compared to PR9692. An inspection of the gene expression data revealed the transcription factor EGR1 to be downregulated (20-fold in microarray, approx. 3-fold in qPCR analysis) in non-metastasizing cells, suggesting it might be important for metastasis. Based on these observations we wondered whether increasing EGR1 expression in PR9692-E9 cells could restore their metastatic potential. To increase the expression of EGR1 in PR9692-E9 cells, we used the SFCV-LE retroviral vector containing cDNA encoding chicken EGR1 tagged N-terminally with a myc-tag and G418 resistance gene (SFCV-ME-EGR1). The presence of myc-tagged EGR1 in the resulting PR9692-E9-EGR1 cells was confirmed by immunoblotting (Figure 1D). Experimental animals were then injected with PR9692, PR9692-E9, or PR9692-E9-EGR1 cells and their lungs inspected for the presence of metastases 5 weeks post injection. High grade metastatic spreading was detected in all animals injected with either PR9692 or PR9692-E9-EGR1 cells while no significant metastasis was detected in animals injected with PR9692-E9 cells. The size and number of metastatic foci in animals injected with PR9692-E9-EGR1 were

comparable to those induced by PR9692 cells. To identify potential EGR1 target genes involved in regulating metastatic dissemination we analyzed PR9692-E9-EGR1 cells by microarray analysis. The resulting gene expression profile was then compared with the gene expression data obtained previously from the PR9692 and PR9692-E9 cells.

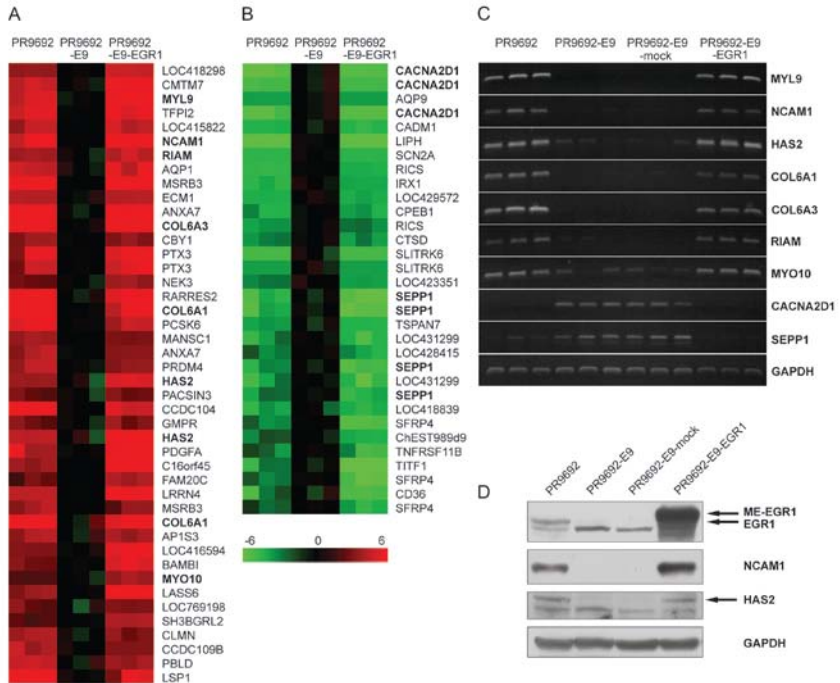


Figure 1. Genes associated with metastatic phenotype. **A** Genes with a high expression in metastatic PR9692 and PR9692-E9-EGR1 cells but low expression in non-metastatic PR9692-E9 cells. **B** Genes with a lowered expression in metastatic compared with non-metastatic cells. Genes further analyzed by PCR and qPCR are shown in boldface. **C** PCR analysis of differential gene expression. cDNA samples obtained from three independent cell cultures of each cell line were PCR amplified and resolved on an agarose gel. **D** Protein levels corresponding to selected differentially expressed genes were analyzed by Western blotting. ME-EGR1 stands for c-myc epitope-labeled EGR1

The sustained expression of EGR1 in PR9692-E9 cells led to 2-fold or stronger upregulation of approximately 2150 genes and at least 2-fold downregulation of approximately 1850 genes. The comparison of all the expression data revealed that the exogenous expression of EGR1 in the non-metastatic cell line reconstituted the expression of a number of genes to levels comparable to the parental PR9692 metastatic

cells. The genes that show similar expression in both metastatic cell lines (PR9692 and PR9692-E9-EGR1) and are either downregulated or upregulated in the non-metastatic cells (PR9692-E9) are supposed to be involved in a presumptive metastatic transcription program. A list of these genes is presented in Figure 1A,B. For the further PCR and qPCR verification of gene expression differences we chose several genes from both groups (upregulated and downregulated). The results of PCR analysis confirmed the microarray data (see Figure 1C). The list of genes showing similar expression in PR9692 and PR9692-E9-EGR1 and downregulation in PR9692-E9 contains genes already known to play a role in tumor metastasis (e.g. *MYL9*, *RIAM*, *MYO10*, *NCAM1*, type VI collagens, *HAS2* and *PCSK6*), genes that have not been correlated with metastatic behavior so far (e.g. *CMTM7*, *MSRB3*, *PRDM4*, *LRRN4*), as well as genes of unknown function (e.g. *CCDC104*, *C16orf45*, *AP1S3*, and *CCDC109B*). Probably the most intriguing potential EGR1 target revealed here is the *MYL9* gene. It encodes myosin regulatory light chain (MRLC/MLC/MLC2), a target of regulatory phosphorylation by the myosin light chain kinase (MLCK) and Rho-kinase (ROCK). This phosphorylation drives actin cytoskeleton contractions and is important for adhesion maturation, establishment of polarity and subsequent migration of the cells [38].

Transcriptional control of metastatic behavior has been extensively studied in transformed epithelial cells. The transcription factors identified there to play important roles in the metastatic spreading are in almost all cases basic regulators of mesenchymal phenotype establishment and maintenance (twist, ZEB1, ZEB2, snail, slug, TCF3). Although transformed mesenchymal cells express these transcription factors constitutively not all mesenchymal tumors metastasize. For example, only approximately 20 percent of human extremity soft tissue sarcomas proceed to the metastatic stage [39-40]. Similarly, our colleagues from the Laboratory of viral and cellular genetics at IMG ASCR have observed in their chicken animal model that *v-src* induced primary fibrosarcomas are non-metastasizing (unpublished observation). Given these observations, it is obvious that the mesenchymal phenotype itself is not sufficient to endow a transformed cell with metastatic abilities. This phenomenon suggests the existence of an additional level of transcriptional regulation to control genes important for metastatic dissemination. Results of our work suggest that the transcription factor EGR1 may be a principle regulator of a whole suite of genes the expression of which is required for effective cancer metastasis.

Chicken embryo dermal myofibroblasts, regulation of their phenotype by TGF- β signaling pathway, and manipulation by altered protein level of EGR4

Myofibroblast is a vertebrate cell type of critical importance in normal wound healing but also the culprit behind life-threatening fibroproliferative diseases and an active helper of cancer cells in malignant progression of human tumors. To perform a research on myofibroblasts a suitable model system has to be employed. Although the *in vivo* processes take place in a three-dimensional environment and entail multiple direct and indirect intercellular interactions, it seems that the basic regulatory processes maintaining myofibroblastic differentiation in a mesenchymal cell are cell-autonomous and can be studied on a cell line or primary cells kept in cell culture. Primary fibroblasts prepared from chicken embryo skin seemed to possess myofibroblastic features, especially an intense production of collagenous extracellular material. We chose to analyze the phenotype of these cells in detail and to find out whether they could be used as an experimental model in myofibroblast biology and biochemistry. A combination of strong extracellular matrix (ECM) production and the presence of stress fibers formed by α SMA (smooth muscle actin) in the cells is a unique property of myofibroblasts. To demonstrate the myofibroblastic phenotype of cells derived from day 10 chicken embryo skin, we established cell cultures and maintained them for up to four weeks. Samples of the cells were analyzed weekly for α SMA fibers with indirect immunofluorescence microscopy and ECM production was visualized with Sirius Red staining of material deposited by the cells on the surface of cell culture dishes. As shown in Figure 2, nearly 100% of the cells showed very strong immunofluorescence staining of α SMA fibers, and there were large quantities of collagenous ECM detected at all time points. These results, supported by the gene expression profiles described further, demonstrate that cells derived from explants of chicken embryo skin are myofibroblasts, and that the homogeneity and temporal stability of their phenotype warrants their use as an experimental model in myofibroblast biology. I further use the abbreviation CEDM (chicken embryo dermal myofibroblasts) in the following text.

The central regulator of myofibroblastic differentiation process from precursor mesenchymal cells is the TGF- β ligand. It is also known that a TGF- β autocrine loop is established in differentiated myofibroblasts. TGF- β binding to its receptor composed of two TGFBR1 and two TGFBR2 subunits induces phosphorylation of the SMAD2 and SMAD3 proteins, which subsequently translocate into the cell nucleus and activate transcription through specific binding sites in promoter regions of their target genes [41]. In addition, MAPK signaling is also activated by the TGF- β signal [42].

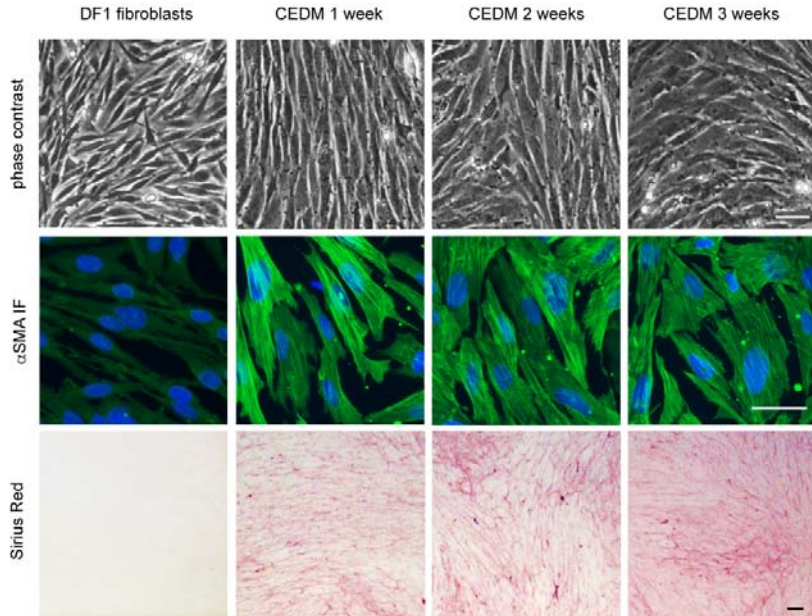


Figure 2. Cells derived from chicken embryo skin show myofibroblastic features. Immunofluorescence staining of alpha smooth muscle actin reveals prominent fibers in nearly all CEDM cells (middle row). Concomitantly, the cells deposit large quantities of ECM, as documented by Sirius Red staining of collagens after cell lysis (lower row). The stability of the phenotype over three weeks of culture is demonstrated. DF1 fibroblasts were used as a negative control.

To identify TGF- β regulated genes in CEDM cells, we used a highly selective TGFBR1 kinase inhibitor (2-(3-(6-methylpyridin-2-yl)-1H-pyrazol-4-yl)-1,5-naphthyridine), further abbreviated to MPPN, and high throughput gene expression profiling (GeneChipTM Chicken Genome Array, Affymetrix). To reveal the TGF- β dependent gene expression program, we compared gene expression profiles of CEDM cells treated for 48 h with 500 nM MPPN (dissolved in DMSO) or DMSO only. The gene expression profile comparisons revealed a large number of genes that were downregulated (421 probe sets) or upregulated (475 probe sets) in response to TGF- β signaling pathway inhibition. Genes encoding components of the ECM, ECM producing and modifying enzymes and miscellaneous growth factors were present in the downregulated group. In addition, multiple other genes encoding proteins of known and unknown function were also downregulated. Many of the genes have been already shown to be TGF- β -regulated in mammalian cells. Somewhat surprisingly, more than half of the affected genes were found to be upregulated in response to the MPPN treatment. The

traditional and still prevailing notion of myofibroblasts being just an activated form of previously resting fibroblasts implies that genes should be mainly activated in response to TGF- β stimulation and hence downregulated upon loss of TGF- β signaling. Our data provide strong support for an alternative hypothesis seeing the process as a more intricate differentiation involving both the upregulation and downregulation of genes. The presence of genes forming the recently identified mesenchymal stem cell transcriptional signature in the upregulated group provides further support for this hypothesis. There are also genes associated with adipogenesis present in the upregulated group, but no signs of adipocytic differentiation are observed even after 2 weeks of MPPN treatment and the cells still remain myofibroblastic. Probably the best interpretation of the data is the activation of mesenchymal differentiation plasticity in response to TGF- β signaling inhibition in myofibroblastic cells, which, however, does not lead to a phenotypic switch under the conditions used. To validate and further extend the microarray results, gene expression changes were analyzed with PCR and the levels of selected protein products determined. We also wondered whether genes revealed to be TGF- β -dependent in CEDM cells would be responsive to TGF- β stimulation in fibroblasts. We compared the responsiveness of selected genes to MPPN treatment in CEDM cells and to high sustained TGF- β 3 secretion (transcribed from integrated retroviral vector) in DF1 cells. PCR analysis revealed that a large number of genes downregulated after the MPPN treatment in CEDM cells were induced in DF1 fibroblasts in response to TGF- β 3, confirming the effectiveness and selectivity of the inhibitor and biological relevance of the genes. Next, the genes upregulated in response to MPPN treatment in CEDM were analyzed by semi-quantitative RT-PCR and the microarray results were confirmed. We further wondered whether the long term treatment of CEDM cells with MPPN results in their dedifferentiation to fibroblasts. Somewhat surprisingly, even two weeks of culture with the continuous presence of MPPN in culture medium did not result in the loss of all myofibroblastic features. PCR and Western Blot analyses revealed sustained downregulation of genes encoding some ECM components, growth factors and the cytoskeleton-related genes *ACTG2* and *TPM1*, but essentially no change in the expression of *ACTA2*, *CNN1* and *TAGLN*, the genes responsible for α SMA fiber assembly and contractility. Some of the major ECM constituents (type I collagens and fibronectin) were also unaffected by the long term MPPN treatment. These results suggest that in CEDM cells, the TGF- β signaling controls mainly the production of some ECM components and other secreted proteins but is not the master regulator of the whole myofibroblastic phenotype. In particular, the smooth muscle actin contractility controlling gene expression program seems to be largely TGF- β independent.

In a follow-up study, we analysed our preliminary observation that sustained expression of *EGR4* in CEDM cells induces their dedifferentiation (a loss of myofibroblastic differentiation). First, we characterized the phenotype of EGR4-expressing CEDM cells. Using the same methods as described above, we observed

significantly lower amounts of collagenous material deposited on the dish surface by the EGR4-expressing cells compared to control cells (infected with empty vector). Anti- α SMA immunofluorescence microscopy then revealed a strong reduction in the intensity of fibers in EGR4-expressing cells as compared to the empty vector control cells, so the myofibroblastic phenotype was strongly suppressed in EGR4-expressing cells.

To reveal the effects of stable expression of EGR4 on gene expression in CEDM myofibroblasts, we employed oligonucleotide microarrays (Affymetrix GeneChip™ Chicken Genome Array). Expression profiles of EGR4 cells, as compared to control cells, showed significant (> 2-fold) upregulation as well as downregulation of hundreds of genes, with downregulation slightly prevailing. The most prominent effect of the sustained expression of EGR4 was the downregulation of myofibroblast-specific genes encoding structural (collagens, proteoglycans, fibronectin) and regulatory (e.g. *TIMP3*, *THBS2*) ECM constituents, actin contractility associated genes (*CNN1*, *TAGLN*, *TPM1*, *ACTA2*) and miscellaneous secreted ligands (*NOV*, *CXCL12*, *BDNF*, *FGF7*, *VEGFC* etc.). A few known negative regulators of TGF- β signaling or associated pro-fibrotic pathways appeared among the upregulated genes: *FOXG1*, *BAMBI*, *NAB1* and *DUSP5*. To validate the microarray results, we performed real-time PCR analysis of the expression of selected genes in the same set of RNA samples and found that all the data were in good agreement. Next we analyzed the status of the TGF- β signaling pathway in EGR4 expressing and control non-expressing cells. We performed Western blot detection of phosphorylated SMAD2 and found that while a strong signal was detected in control non-infected or empty vector infected cells, it was practically absent in EGR4 expressing cells. To check the status of MAPK signaling in EGR4 expressing cells, we determined the levels of phosphorylated and total ERK, JNK, and p38 MAP-kinase proteins. We found that sustained expression of EGR4 suppresses phosphorylation of ERK and of the long form of JNK, while their total levels remain unchanged. Phosphorylated p38 was not detected in any of the samples.

To reveal the relative importance of individual EGR4 targets in the TGF- β signaling suppression and myofibroblasts dedifferentiation effect, we analyzed phenotypes of the CEDM cells constitutively expressing FOXG1, BAMBI, and NAB1. Only the sustained expression of FOXG1 was able to effectively suppress ECM production and α SMA fiber formation, while BAMBI and NAB1 showed no effect. FOXG1 expression also resulted in a strong suppression of the SMAD2 phosphorylation comparable to that elicited by the constitutive expression of EGR4. There was also a suppression of the phosphorylation of ERK and the long form of JNK observed in FOXG1 expressing cells as compared to control cells.

Understanding molecular mechanisms that can induce myofibroblast dedifferentiation is of key importance for the future progress in therapy of fibrotic diseases and probably also of carcinomas. Results of the two studies that we carried out on CEDM cells suggest that inhibition of TGF- β signaling is not sufficient to induce the

dedifferentiation of myofibroblasts as a sole treatment, but at the same time indicate that it may be an important part of the dedifferentiation process. We demonstrated that EGR4 is able to completely suppress TGF- β signaling in myofibroblasts and revealed a few potential mediators of this effect. Among them, the transcription factor FOXG1 seems to play a dominant role, as it can elicit a phenotype comparable to that of constitutive EGR4 expression when expressed in CEDM cells from an integrated retrovirus vector. The role of the other genes – *BAMBI*, *NABI*, and *DUSP5* – in the EGR4-induced myofibroblastic dedifferentiation seems to be less important but cannot be ruled out.

Lineage commitment of hematopoietic progenitors and its regulation by v-Myb^{AMV}

Researching the role of the leucine-zipper region (LZR) of v-Myb in AMV-induced monoblastic leukemia has been the main focus of the Laboratory of molecular virology since early 1990s. The most important achievement of the early era was the demonstration that LZR is absolutely required for effective transformation by v-Myb [23]. An important finding was also made after construction of a series of small deletion mutants in LZR and its vicinity, when it was revealed that some of these mutations preserve basic transformation activity but the growth of the transformed cells *in vitro* and their leukemogenicity *in vivo* are impaired to various extent [43].

In the follow-up study, presented here, these mutants were analyzed with respect to their ability to support the expansion and differentiation of other hematopoietic progenitors in addition to monoblasts. The term v-Myb will always mean v-Myb^{AMV} throughout the following text. The transforming potential of the v-Myb mutants was analyzed in cultures of blastoderm cells from 20- to 28-hour-old chicken embryos. These very early embryonic cells are a source of primitive hematopoietic progenitors that can be transformed in culture. The mutants with intact LZR as well as wild-type v-Myb caused an outgrowth only of cells resembling monoblasts. Interestingly, in cultures infected with the LZR mutants, numerous hemoglobinized erythroid cells were present in addition to myeloid cells. Some erythroid cells differentiated spontaneously into mature erythrocytes during the 30-day culture period. In $\Delta P1$ (deletion of amino acids 301-311 in v-Myb) cultures, numerous immature erythroid cells were present even after prolonged culture periods. Blastoderm cells transformed by wild-type and $\Delta P1$ v-Myb were further characterized for their growth potential, morphology, and surface marker expression, and also for expression of genes important for the development of the myeloid and erythroid lineages. It was found that within the first 7 days after infection, wild-type v-Myb cultures were composed of monoblast-like cells and some erythroid cells, whereas from day 7 on only rapidly proliferating monoblasts were observed. In contrast, in $\Delta P1$ cultures there was an initial outgrowth of primarily erythroid cells within the first 7 days after infection. Then, a high proportion of cells underwent spontaneous differentiation

into erythrocytes, and resulting cultures contained erythroid cells of different maturation stages and monoblasts. At later time points, cells belonging to additional hematopoietic lineages - thrombocytes, eosinophils, and heterophilic granulocytes (equivalent to neutrophils in mammals) - were also observed. At later stages (30 days after infection) wild-type *v-Myb* cultures contained only myeloid cells, whereas in $\Delta P1$ cultures erythroid cells were also detectable. $\Delta P1$ cells expressed high levels of *c-Myb*, *SCL*, and *GATA1* mRNAs, which are important for the development of the erythroid lineage. In contrast, in wild-type *v-Myb* cells these mRNAs were essentially undetectable whereas mRNAs for the myelomonocytic factors *C/EBP β* , *PU.1*, and *EGR1* were abundantly expressed.

In early cultures of $\Delta P1$ *v-myb*-infected and to a lesser extent also of wild-type *v-myb*-infected blastoderm hematopoietic cells, some cells expressed surface protein markers of multipotent progenitors. To enhance the self-renewing capacity and/or delay spontaneous differentiation of putative *Myb* progenitors, different growth factors and combinations thereof were tested. *TGF α* , *bFGF*, and *SCF*, when applied simultaneously, were effective in increasing growth rates of both wild-type and $\Delta P1$ *v-Myb* cells positive for MEP antigens. To find out whether *Myb* LZR influences levels of *C/EBP β* , *PU.1*, *EGR1*, *c-Myb*, *SCL*, and *GATA1* mRNAs in progenitors and early erythroid cells, RNA from cells grown for 21 and 30 days in growth factor mixture was analyzed. We found that both wild-type and $\Delta P1$ *v-Myb* cells abundantly expressed *SCL* and *GATA1* mRNAs at both time points. In contrast, *c-Myb* mRNA was lower in wild-type *v-Myb* cells than in $\Delta P1$ cells on day 21, whereas its levels were essentially the same on day 30. The mRNAs of myeloid factors *C/EBP β* and *PU.1* were more abundant in wild-type *v-Myb* cells than in $\Delta P1$ cells on day 21 and barely detectable in both cultures on day 30. The data show that in *v-Myb* progenitors (day 21), wild-type LZR causes elevated levels of *C/EBP β* and *PU.1* mRNAs and a reduced level of *c-Myb* mRNA when compared with expression of these molecules in cells containing the $\Delta P1$ LZR mutant. This specific expression pattern should predetermine the development of wild-type *v-Myb* progenitors into eosinophils and the macrophage lineage, as *C/EBP β* and *PU.1* were found to commit progenitors into these lineages [44-45]. The above data document the ability of *v-Myb* LZR to modulate expression of lineage-specifying factors.

To reveal the differentiation potential of exogenous *Myb* expressing progenitors, they were grown for 14 days in the presence of *TGF α* , *bFGF*, and *SCF*, and then their differentiation was induced by withdrawal of growth factors. As the phorbol ester TPA was found to be a potent inducer of differentiation of E26-infected progenitors [31], factor removal and TPA treatment were combined in some experiments. Resulting cells were first analyzed for the presence of lineage-specific surface proteins. Immediately prior to differentiation induction, both wild-type and $\Delta P1$ *v-Myb* cells expressed the erythroid JS4 marker and no myeloid MC51/2 marker. Several days after differentiation induction by growth factor removal and TPA treatment, wild-type *v-Myb* cells lost the

erythroid marker JS4 and upregulated the myelomonocytic marker MC51/2. These cells clearly represented macrophage precursors as also judged by morphology. In contrast, cells infected with $\Delta P1$ *v-myb* still retained high JS4 expression and were negative for MC51/2. Moreover, these cells kept their immature phenotype. In similar experiments, differentiating cells were analyzed by cytochemical staining for the presence of granulocytes and by immunofluorescence for thrombocytes 20 days after differentiation induction. Following TPA treatment, only monoblast-like cells and no thrombocytes were found in wild-type *v-Myb* cultures. In $\Delta P1$ *v-Myb* cultures, however, numerous heterophilic granulocytes were revealed by Astra blue staining. Using the 11C3 antibody recognizing the GPIIb-IIIa integrin on chicken thrombocytes, numerous positive cells were also detected. The analyzed $\Delta P1$ *v-Myb* cultures also contained monoblast-like cells and erythroid cells. These findings indicate that $\Delta P1$ progenitors have a broader differentiation potential than wild-type *v-Myb* cells and can differentiate into all lineages derived from the common myeloid progenitor. On the other hand, the wild-type *v-Myb* protein prevents progenitors from differentiating into erythroid cells, thrombocytes, and heterophilic granulocytes. The absence of heterophilic granulocytes in wild-type *v-Myb* cultures strongly indicates that wild-type *v-Myb* LZR forces the bipotent granulocyte/macrophage progenitor to differentiate only into the macrophage lineage.

The effect of Myb proteins on lineage commitment in neural crest cells

As already mentioned in Introduction, we and others have revealed the ability of *v-Myb* proteins to transform cells from early embryos giving rise to rapidly expanding populations of melanoblasts in culture (Karafiat et al., unpublished and [36]). We have also demonstrated an important role of *c-Myb* in epithelial-mesenchymal transition during the formation of the neural crest [37]. In the subsequent study that further followed the specific involvement of endogenous *c-Myb* in the development of melanocytes and also their transformation by *v-Myb*^{AMV}, we focused on the lineage commitment of melanocyte progenitors and how it is affected by Myb proteins. The terms *v-Myb* (protein) and *v-myb* (gene) will always mean the AMV version thereof throughout the following text.

To find out whether Myb proteins can determine melanocyte lineage choice, *c-myb* and *v-myb* genes were introduced into naive neural plates which contain only prospective neural crest (NC) cells and no committed melanocyte progenitors. In neural plate explants, both *myb* genes caused cell delamination and formation of pigmented cells. Thus, the *v-myb* oncogene, like *c-myb* [37], can activate very early steps in the formation of trunk NC, and both Myb proteins appear to sustain differentiation of early NC cells to the melanocyte cell lineage. The early NC cells emigrating from trunk neural tube fragments containing unfused neural folds were used for further experiments. NC cells

delaminate from neural folds and invade surrounding tissues in waves. Cells of the early wave differentiate mainly into neurons and glial cells of the peripheral nervous system (in case of trunk NC). Cells of the second delayed wave differentiate into melanocytes. This mode of NC emigration/differentiation is to some extent also recapitulated in tissue culture. Cells of the early wave spontaneously differentiate *in vitro* mainly into glial cells. However, as they contain oligopotent precursors, including bipotential glial/melanocytic progenitors, they have the potential to develop along the melanocyte cell lineage. We isolated early wave NC cells and used them to study the effects of Myb proteins on cell lineage determination. The early wave cells were then infected with *c-myb* and *v-myb* retroviruses and analyzed 7 – 12 days later. Both *c-myb* and *v-myb* directed early wave cells to the melanocyte cell lineage. In *c-myb* cultures, pigment cells represented about 50% of cells, while in *v-myb* cultures typically 90% of the cells were melanoblasts. Next we analyzed the expression of selected genes engaged in melanocytogenesis. The introduction of *c-myb* and *v-myb* genes into early wave cells correlated with the accumulation of transcripts of the *MITF* gene – the pivotal factor for the progression of melanocyte development. Messenger RNA of the tyrosinase gene – the target gene of the MITF factor – was also strongly upregulated in *c-myb* and *v-myb* cells. The activity of the MITF protein is controlled in several ways. Among them, MITF modifications induced by SCF/c-Kit signaling represent an activating cue important for the development of melanocyte cell lineage. Since *c-kit* expression depends on c-Myb in immature erythroid cells, we asked whether there is a link between *c-myb* and *c-kit* expression in NC cells as well. Infection of early wave cells with *c-myb* and *v-myb* resulted in the accumulation of *c-kit* mRNA, while no significant changes were observed in the levels of SCF mRNA. To find out whether *myb* genes also promote accumulation of the c-Kit protein at the cell surface, NC cells emigrating in early and late waves from the HH10 neural tube explants were pooled and infected with control, *c-myb* and *v-myb* retroviruses and analyzed by flow cytometry with the kit2c75 anti-chicken c-Kit antibody. We observed a detectable level of c-Kit in control NC cells (present on late wave cells, which contain committed melanocytes) and its significant increase following introduction of *c-myb* and *v-myb* genes. To find out whether the increase of *c-kit* mRNA depends on Myb proteins and is not solely caused by altered composition of cells in a differentiating cell culture, first wave NC cells were exposed for 32 h to retroviruses transducing the 4-hydroxytamoxifen (4-OHT)-inducible v-myb-ER and v-myb(N118D)-ER (unable to bind the Myb recognition sequence) variants and then treated with 4-OHT for 7 or 24 h. cDNAs were assayed for the relative concentrations of *c-kit* sequences by semiquantitative and quantitative PCR. The results of the qPCR as well as the semiquantitative PCR showed the increase in *c-kit* mRNA concentration already 7 h after 4-OHT induction, which became more pronounced after 24 h of 4-OHT treatment. The 4-OHT-inducible effects of v-Myb-ER were completely eliminated by the N118D mutation in the v-Myb DNA binding domain. This supports the concept of direct involvement of

v-Myb in the activation of *c-kit* expression. As early NC cells produce SCF, the increased levels of the c-Kit receptor caused by Myb proteins are likely to result in enhanced c-Kit signaling. This might represent at least some of the mechanism through which Myb proteins activate melanocytogenesis in NC cells. The complex effect of both *myb* genes on NC formation and melanocyte development resembles their effects on hematopoietic cells. The results of this work support the idea of overlapping genetic programs and similar cell fate specification regulatory pathways in both cell compartments. We hypothesize that at least in birds, c-Myb is involved in molecular mechanisms controlling proliferation, survival and fate determination programs related in both hematopoietic and NC progenitors.

Conclusions

The thesis presents results of a few studies that were conducted in parallel. The first study analyzed the role of the transcription factor EGR1 in the regulation of metastatic behavior in chicken sarcoma cell line PR9692. We have demonstrated that:

- Metastasizing cells PR9692 show increased expression of EGR1 at both mRNA and protein levels as compared to non-metastasizing PR9692-E9 cells.
- Constitutive expression of EGR1 in metastasis-deficient PR9692-E9 cells activates their metastatic potential to a level matching the metastasizing PR9692 cells.
- Comparison of gene expression profiles of metastasizing and non-metastasizing cells revealed candidate EGR1-regulated genes whose protein products may be responsible for the metastatic behavior of PR9692 cells.

The second study dealt with the mechanisms of maintenance of myofibroblastic differentiation, the role of TGF- β signaling in this context, and manipulation of myofibroblastic phenotype by altered protein level of EGR4. Main findings of this study are as follows:

- Chicken embryo dermal myofibroblasts are a non-mammalian primary cell-based experimental model system suitable for biological studies of myofibroblasts due to the strongly-pronounced and time-stable myofibroblastic phenotype in culture.
- High-throughput analysis of TGF- β regulated genes in these cells revealed multiple known and new TGF- β targets. Extensive evolutionary conservation of TGF- β regulated transcription between avian and mammalian cells was revealed through comparison of our data and those from published literature.
- Our results with long-term inhibition of TGF- β signaling in CEDM cells revealed that the pathway modulates the myofibroblastic phenotype and stimulates secretory

functions in these cells but is not the sole regulator of the maintenance of myofibroblastic differentiation.

- Increased expression of the transcription factor EGR4 in CEDM cells induces their dedifferentiation accompanied by a loss of all typical myofibroblastic features.
- Increased expression of EGR4 causes a strong inhibition of TGF- β signaling and also a suppression of the expression of genes encoding key components of the myofibroblast contractile apparatus.
- High-throughput gene expression profiling of EGR4 expressing CEDM cells was in agreement with the observed effects and revealed a few EGR4-regulated genes that may mediate some of the effects.
- The genes *FOXG1*, *BAMBI*, *NAB1*, *NAB2*, and *DUSP5* may together form an EGR4-regulated network counteracting autocrine TGF- β signaling.

The third study analyzed the role of the leucine zipper region of v-Myb^{AMV} in the commitment of AMV-infected hematopoietic progenitors to erythroid and myeloid lineages. We have found that:

- The transcription factor v-Myb^{AMV} is able to regulate the commitment of a common myeloid progenitor and progenitors restricted to the myeloid lineage.
- Wild-type v-Myb^{AMV} with the intact leucine zipper region directs development of progenitors into the macrophage lineage.
- Mutations in the leucine zipper region compromise commitment toward macrophages and cause v-Myb^{AMV} to also support the development of erythrocytes, thrombocytes, and granulocytes.

The fourth study focused on the regulation of commitment of neural crest cells into the melanocyte lineage by Myb proteins. We have revealed that:

- The expression of c-Myb protein in avian neural crest increases the number of cells committed to the melanocyte lineage and supports their further differentiation into dendritic melanocytes.
- The v-Myb^{AMV} oncoprotein converts essentially all neural crest cells into melanoblasts and causes their transformation.
- Both Myb proteins activate in neural crest cells the expression of the *c-kit* gene and SCF - c-Kit signaling.
- Our work establishes a novel experimental model for studies of melanocytogenesis and melanocyte transformation.

Použitá Literatura/References

- [1] B. Christy, D. Nathans, DNA binding site of the growth factor-inducible protein Zif268, *Proc Natl Acad Sci U S A* 86 (1989) 8737-8741.
- [2] E.S. Silverman, J. Du, A.J. Williams, R. Wadgaonkar, J.M. Drazen, T. Collins, cAMP-response-element-binding-protein-binding protein (CBP) and p300 are transcriptional co-activators of early growth response factor-1 (Egr-1), *Biochem J* 336 (Pt 1) (1998) 183-189.
- [3] R.L. Luciano, A.C. Wilson, HCF-1 functions as a coactivator for the zinc finger protein Krox20, *J Biol Chem* 278 (2003) 51116-51124.
- [4] R.L. Dillon, S.T. Brown, C. Ling, T. Shioda, W.J. Muller, An EGR2/CITED1 transcription factor complex and the 14-3-3sigma tumor suppressor are involved in regulating ErbB2 expression in a transgenic-mouse model of human breast cancer, *Mol Cell Biol* 27 (2007) 8648-8657.
- [5] M.W. Russo, B.R. Severson, J. Milbrandt, Identification of NAB1, a repressor of NGFI-A- and Krox20-mediated transcription, *Proc Natl Acad Sci U S A* 92 (1995) 6873-6877.
- [6] J. Svaren, B.R. Severson, E.D. Apel, D.B. Zimonjic, N.C. Popescu, J. Milbrandt, NAB2, a corepressor of NGFI-A (Egr-1) and Krox20, is induced by proliferative and differentiative stimuli, *Mol Cell Biol* 16 (1996) 3545-3553.
- [7] A.H. Swirnoff, E.D. Apel, J. Svaren, B.R. Severson, D.B. Zimonjic, N.C. Popescu, J. Milbrandt, Nab1, a corepressor of NGFI-A (Egr-1), contains an active transcriptional repression domain, *Mol Cell Biol* 18 (1998) 512-524.
- [8] R. Srinivasan, G.M. Mager, R.M. Ward, J. Mayer, J. Svaren, NAB2 represses transcription by interacting with the CHD4 subunit of the nucleosome remodeling and deacetylase (NuRD) complex, *J Biol Chem* 281 (2006) 15129-15137.
- [9] F. Mechta-Grigoriou, S. Garel, P. Charnay, Nab proteins mediate a negative feedback loop controlling Krox-20 activity in the developing hindbrain, *Development* 127 (2000) 119-128.
- [10] H. Sakura, C. Kanei-Ishii, T. Nagase, H. Nakagoshi, T.J. Gonda, S. Ishii, Delineation of three functional domains of the transcriptional activator encoded by the c-myc protooncogene, *Proc Natl Acad Sci U S A* 86 (1989) 5758-5762.
- [11] S. Gerondakis, J.M. Bishop, Structure of the protein encoded by the chicken proto-oncogene c-myc, *Mol Cell Biol* 6 (1986) 3677-3684.
- [12] M.F. Nunn, P.H. Seeburg, C. Moscovici, P.H. Duesberg, Tripartite structure of the avian erythroblastosis virus E26 transforming gene, *Nature* 306 (1983) 391-395.
- [13] K.M. Howe, C.F. Reakes, R.J. Watson, Characterization of the sequence-specific interaction of mouse c-myc protein with DNA, *EMBO J* 9 (1990) 161-169.
- [14] K.M. Howe, R.J. Watson, Nucleotide preferences in sequence-specific recognition of DNA by c-myc protein, *Nucleic Acids Res* 19 (1991) 3913-3919.
- [15] P. Dai, H. Akimaru, Y. Tanaka, D.X. Hou, T. Yasukawa, C. Kanei-Ishii, T. Takahashi, S. Ishii, CBP as a transcriptional coactivator of c-Myb, *Genes Dev* 10 (1996) 528-540.
- [16] T.J. Gonda, C. Buckmaster, R.G. Ramsay, Activation of c-myc by carboxy-terminal truncation: relationship to transformation of murine haemopoietic cells in vitro, *EMBO J* 8 (1989) 1777-1783.
- [17] F.A. Grasser, T. Graf, J.S. Lipsick, Protein truncation is required for the activation of the c-myc proto-oncogene, *Mol Cell Biol* 11 (1991) 3987-3996.
- [18] J.W. Dubendorff, L.J. Whittaker, J.T. Eltman, J.S. Lipsick, Carboxy-terminal elements of c-Myb negatively regulate transcriptional activation in cis and in trans, *Genes Dev* 6 (1992) 2524-2535.
- [19] A.B. Dash, F.C. Orrico, S.A. Ness, The EVES motif mediates both intermolecular and intramolecular regulation of c-Myb, *Genes Dev* 10 (1996) 1858-1869.

- [20] A. Kiewitz, H. Wolfes, Mapping of protein-protein interactions between c-myc and its coactivator CBP by a new phage display technique, *FEBS Lett* 415 (1997) 258-262.
- [21] D. Favier, T.J. Gonda, Detection of proteins that bind to the leucine zipper motif of c-Myb, *Oncogene* 9 (1994) 305-311.
- [22] T. Nomura, J. Tanikawa, H. Akimaru, C. Kanei-Ishii, E. Ichikawa-Iwata, M.M. Khan, H. Ito, S. Ishii, Oncogenic activation of c-Myb correlates with a loss of negative regulation by TIF1beta and Ski, *J Biol Chem* 279 (2004) 16715-16726.
- [23] P. Bartunek, V. Karafiat, M. Dvorakova, V. Zahorova, S. Mandikova, M. Zenke, M. Dvorak, The Myb leucine zipper is essential for leukemogenicity of the v-Myb protein, *Oncogene* 15 (1997) 2939-2949.
- [24] S.L. Fu, J.S. Lipsick, FAETL motif required for leukemic transformation by v-Myb, *J Virol* 70 (1996) 5600-5610.
- [25] A. Toscani, R.V. Mettus, R. Coupland, H. Simpkins, J. Litvin, J. Orth, K.S. Hatton, E.P. Reddy, Arrest of spermatogenesis and defective breast development in mice lacking A-myc, *Nature* 386 (1997) 713-717.
- [26] K. Trauth, B. Mutschler, N.A. Jenkins, D.J. Gilbert, N.G. Copeland, K.H. Klempnauer, Mouse A-myc encodes a trans-activator and is expressed in mitotically active cells of the developing central nervous system, adult testis and B lymphocytes, *EMBO J* 13 (1994) 5994-6005.
- [27] J. Sitzmann, K. Noben-Trauth, H. Kamano, K.H. Klempnauer, Expression of B-Myb during mouse embryogenesis, *Oncogene* 12 (1996) 1889-1894.
- [28] A. Sala, B-MYB, a transcription factor implicated in regulating cell cycle, apoptosis and cancer, *Eur J Cancer* 41 (2005) 2479-2484.
- [29] R.G. Ramsay, T.J. Gonda, MYB function in normal and cancer cells, *Nat Rev Cancer* 8 (2008) 523-534.
- [30] C. Moscovici, Leukemic transformation with avian myeloblastosis virus: present status, *Curr Top Microbiol Immunol* 71 (1975) 79-101.
- [31] T. Graf, K. McNagny, G. Brady, J. Frampton, Chicken "erythroid" cells transformed by the Gag-Myb-Ets-encoding E26 leukemia virus are multipotent, *Cell* 70 (1992) 201-213.
- [32] M.L. Mucenski, K. McLain, A.B. Kier, S.H. Swerdlow, C.M. Schreiner, T.A. Miller, D.W. Pietryga, W.J. Scott, Jr., S.S. Potter, A functional c-myc gene is required for normal murine fetal hepatic hematopoiesis, *Cell* 65 (1991) 677-689.
- [33] R. Sumner, A. Crawford, M. Mucenski, J. Frampton, Initiation of adult myelopoiesis can occur in the absence of c-Myb whereas subsequent development is strictly dependent on the transcription factor, *Oncogene* 19 (2000) 3335-3342.
- [34] R.D. Allen, 3rd, T.P. Bender, G. Siu, c-Myb is essential for early T cell development, *Genes Dev* 13 (1999) 1073-1078.
- [35] X. Huang, J.P. Saint-Jeannet, Induction of the neural crest and the opportunities of life on the edge, *Dev Biol* 275 (2004) 1-11.
- [36] M.V. Bell, J. Frampton, v-Myb can transform and regulate the differentiation of melanocyte precursors, *Oncogene* 18 (1999) 7226-7233.
- [37] V. Karafiat, M. Dvorakova, E. Krejci, J. Kralova, P. Pajer, P. Snajdr, S. Mandikova, P. Bartunek, M. Grim, M. Dvorak, Transcription factor c-Myb is involved in the regulation of the epithelial-mesenchymal transition in the avian neural crest, *Cell Mol Life Sci* 62 (2005) 2516-2525.
- [38] M.C. Gutjahr, J. Rossy, V. Niggli, Role of Rho, Rac, and Rho-kinase in phosphorylation of myosin light chain, development of polarity, and spontaneous migration of Walker 256 carcinosarcoma cells, *Experimental cell research* 308 (2005) 422-438.

- [39] M.A. Gadd, E.S. Casper, J.M. Woodruff, P.M. McCormack, M.F. Brennan, Development and treatment of pulmonary metastases in adult patients with extremity soft tissue sarcoma, *Annals of surgery* 218 (1993) 705-712.
- [40] N. Songur, M. Dinc, C. Ozdilekcan, S. Eke, U. Ok, M. Oz, Analysis of lung metastases in patients with primary extremity sarcoma, *Sarcoma* 7 (2003) 63-67.
- [41] J. Massague, R.R. Gomis, The logic of TGFbeta signaling, *FEBS Lett* 580 (2006) 2811-2820.
- [42] T. Reimann, U. Hempel, S. Krautwald, A. Axmann, R. Scheibe, D. Seidel, K.W. Wenzel, Transforming growth factor-beta1 induces activation of Ras, Raf-1, MEK and MAPK in rat hepatic stellate cells, *FEBS Lett* 403 (1997) 57-60.
- [43] M. Dvorakova, J. Kralova, V. Karafiat, P. Bartunek, M. Dvorak, An ex vivo model to study v-Myb-induced leukemogenicity, *Blood Cells Mol Dis* 27 (2001) 437-445.
- [44] C. Nerlov, T. Graf, PU.1 induces myeloid lineage commitment in multipotent hematopoietic progenitors, *Genes Dev* 12 (1998) 2403-2412.
- [45] C. Nerlov, K.M. McNagny, G. Doderlein, E. Kowenz-Leutz, T. Graf, Distinct C/EBP functions are required for eosinophil lineage commitment and maturation, *Genes Dev* 12 (1998) 2413-2423.

Curriculum vitae

Vzdělání

Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta, magisterské studium 1994 - 1999

Obor: biochemie

Diplomová práce: Příprava rekombinantních forem některých jaderných regulačních proteinů a studium jejich interakce s onkoproteinem v-Myb

Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta, doktorské studium 2007 - současnost

Obor: biochemie

Pracovní zkušenosti

Ústav molekulární genetiky AV ČR 1996 - 2013

odborný pracovník vědeckého výzkumu

Znalosti

Jazyky: Angličtina (TOEFL)

Účast na konferencích:

Fifth International Workshop on Molecular Aspects of Myeloid Stem Cell Development and Leukemia, 4. – 7. května 2003, Annapolis (USA)

FEBS special meeting; Cellular Signaling, 26. května – 1. června 2006, Cavtat (Chorvatsko)

International Chick Meeting, 11. – 14. dubna 2007, Barcelona (Španělsko)

10th International Conference on Limb Development and Regeneration, 13. – 16. srpna 2008, Madrid (Španělsko)

Beatson International Cancer Conference; Microenvironment, Motility and Metastasis, 5. – 8. července 2009, Glasgow (Velká Británie)

Frontiers in Tumour Progression, 24. – 27. října 2010, Madrid (Španělsko)

New Concepts in Cancer Metastasis, 25. – 28. června 2011, Lisabon (Portugalsko)

Seznam publikací/List of publications

Kosla J., Dvořák M., Čermák V. **An antifibrotic regulatory network governed by the transcription factor EGR4.**

(submitted manuscript)

Kosla J., Dvořák M., Čermák V. **Molecular analysis of the TGF-beta controlled gene expression program in chicken embryo dermal myofibroblasts.**

Gene 2013; 513(1): 90-100.

IF 2.34

Čermák V., Kosla J., Plachý J., Trejbalová K., Hejnar J., Dvořák M. **The transcription factor EGR1 regulates metastatic potential of v-src transformed sarcoma cells.**

Cell Mol Life Sci 2010; 67(20): 3557-68.

IF 6.57

Karafiát V., Dvořáková M., Pajer P., Čermák V., Dvořák M. **Melanocyte fate in neural crest is triggered by Myb proteins through activation of c-kit.**

Cell Mol Life Sci 2007; 64(22): 2975-84.

IF 6.57

Karafiát V., Dvořáková M., Pajer P., Králová J., Hořejší Z., Čermák V., Bartůněk P., Zenke M., Dvořák M. **The leucine zipper region of Myb oncoprotein regulates the commitment of hematopoietic progenitors.**

Blood 2001; 98(13): 3668-76.

IF 9.90