

# 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 diferenciace. 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- $\beta$  signální dráha, nejprve jsme identifikovali TGF- $\beta$  regulované geny v CEDM buňkách pomocí specifického chemického inhibitoru kinasové aktivity TGF- $\beta$  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- $\beta$  závislých genů, mezi nimi *PGF*, *VEGFC*, *PTN*, *FAM180A*, *FIBIN*, *ZIC1*, *ADCY2*, *RET*, *HHIP*, *DNER* a *TMEM45A*. Naše výsledky s dlouhodobou inhibicí TGF- $\beta$  signalizace v buňkách CEDM naznačují, že TGF- $\beta$  se primárně podílí na regulaci sekrece, včetně produkce mezibuněčné hmoty, zatímco kontraktilní aktivita závisí na dalších regulačních signálech. Dále jsme se zaměřili na mechanismy, které jsou použity proteinem EGR4 při vynucení dediferenciaci v CEDM buňkách. Zjistili jsme, že trvale zvýšená hladina EGR4 způsobuje silnou inhibici TGF- $\beta$  signalizace a také vede k potlačení exprese genů kódujících klíčové složky kontraktilního 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*, *NAB1*, *NAB2* a *DUSP5* společně tvoří EGR4 regulovanou síť potlačující autokrinní TGF- $\beta$  signalizaci.

Výzkum úlohy proteinů Myb v procesech volby diferenciaci 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 diferenciaci 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<sup>AMV</sup> regulovat diferenciaci rozhodnutí společného myeloidního progenitoru a více diferencovaných progenitorů myeloidní řady a odhalili jsme roli motivu leucinového zipu (LZ) v těchto efektech. Prokázali jsme, že v-Myb<sup>AMV</sup> 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<sup>AMV</sup> 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<sup>AMV</sup> ovlivňovat volbu diferenciací 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<sup>AMV</sup> 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 buněčných typů vznikajících z neurální lišty. Naše práce ukazuje nový experimentální model pro studium melanocytogenese a melanocytární transformace.

