

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Buněčná a vývojová biologie



Bc. Jan Rasil

**Úloha signální kaskády ERK v regulaci aktinového
cytoskeletu a morfologických změn epiteliálních buněk**

**Regulation of actin cytoskeleton and epithelial cells
morphology by the ERK signaling pathway**

Diplomová práce

Školitel: Ing. Tomáš Vomastek, Ph.D.

Praha, 2014

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a na základě konzultací se svým školitelem a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 5. 5. 2014

Poděkování:

Děkuji svému školiteli Ing. Tomáši Vomastkovi, Ph.D. za cenné rady, odborné konzultace, vedení a trpělivost při řešení této práce.

Také děkuji svým kolegům Mgr. Zuzaně Klímové, Mgr. Miloslavě Maninové, Mgr. Vojtěchu Bráborcovi a zejména pak Mgr. Josefu Čáslavskému za vytvoření příjemného kolektivu a přátelské atmosféry během celého mého magisterského studia. Byli mi velkou oporou při hodnoceních mých výsledků, diskuzích a radách s následným experimentálním postupem.

Také děkuji své rodině a přátelům za veškerou podporu, které se mi dostávalo během celého studia.

Abstrakt

Signální kaskáda ERK patří mezi základní signální dráhy eukaryotických buněk, která reaguje na široké spektrum podnětů a následně se podílí na vytvoření konkrétní odpovědi. Ukazuje se, že signální kaskáda ERK indukuje rozpad architektury epitelu a indukuje morfologické změny vedoucí k zisku autonomie epiteliálních buněk. Během rozvolnění epiteliální struktury se signální kaskáda ERK účastní remodelace aktinového cytoskeletu, což má za následek ztrátu epiteliální polarity, rozvolnění mezibuněčných spojů a následně spuštění migračního programu, který umožňuje epiteliálním buňkám využít mezenchymálního způsobu migrace. Jednou z nejméně prozkoumaných aktinových struktur epiteliálních buněk je tzv. periferní aktin, kontraktilní aktinová struktura, která obemyká kolonie epiteliálních buněk. Periferní aktin se nachází na bazální straně buněk a pravděpodobně se podílí na udržení integrity epitelu. Nicméně dodnes není známo, jestli, a popřípadě jakým způsobem, se signální kaskáda ERK účastní na regulaci periferního aktinu a jestli remodelace periferního aktinu hraje roli v buněčné migraci.

V této práci ukazujeme, že signální kaskáda ERK je důležitá pro remodelaci periferního aktinu. Aktivace signální kaskády ERK vede k rozrušení této aktinové struktury a jejího nahrazení dendritickým aktinem lamellipodia a ustanovením mezenchymálního způsobu migrace. Dále jsme zjistili, že procesu přestavby periferního aktinu se preferenčně účastní proteinkináza ERK2, která využívá pro přestavbu periferního aktinu svou DBP-doménu. Proteinkináza ERK interaguje svou DBP-doménou se substrátovým aminokyselinovým motivem Phe-Xxx-Phe. To nám umožnilo identifikovat pravděpodobné efektorové proteiny, které jsou nutné pro přestavbu periferního aktinu.

Klíčová slova: ERK, CD-doména, DBP-doména, aktin, calpain, Rho-GTPázy

Abstract

The ERK signalling cascade belongs to a family of the signalling pathways conserved in eukaryotic cells, which responds to the wide spectrum of extracellular stimuli and convert these stimuli to appropriate response. In epithelial cells the ERK signalling cascade induces disintegration of epithelial architecture and induces morphological changes leading to the gain of the autonomy of the epithelial cells. During morphological changes of the epithelial structure, the ERK signalling cascade participates in the remodelling of the actin cytoskeleton, which leads to the disassembly of cell-cell adhesions and the loss of the epithelial polarity. Subsequently ERK activates the migration programme, which enables epithelial cells to use individual mesenchymal-like mode of migration. The so called peripheral actin is one of the least explored actin structures that forms at the periphery of the epithelial cells and surrounds the colony of epithelial cells. Peripheral actin is located at the basal side of the cell and it probably takes part in the integrity of epithelial tissue. Nevertheless, up to date it is not known if and how ERK signalling cascade regulates the peripheral actin and if remodeling of peripheral actin takes part in the cell migration.

In this thesis we show, that ERK signalling cascade is important for the remodeling of peripheral actin. The Activation of the ERK signalling cascade leads to the disintegration of this actin structure that is substituted by the dendritic actin of lamellipodia. This sequence of events allows cells to establish the mesenchymal mode of migration resulting in scattering of epithelial colonies. In addition, we found that protein kinase ERK2 is the preferred ERK isoform participating in the process of remodelling of the peripheral actin. Protein kinase ERK2 use its DBP-domain for remodelling of peripheral actin suggesting that the interaction of ERK2 with the substrate containing aminoacids motif Phe-Xxx-Phe is necessary for peripheral actin remodeling. This finding enabled us to identify possible ERK substrates which are necessary for the peripheral actin remodeling.

Key words: ERK, CD-domain, DBP-domain, actin, calpain, Rho-GTPases

Obsah

Abstrakt.....	4
Abstract.....	5
Obsah.....	6
Seznam zkratk.....	10
1. Úvod.....	12
2. Literární přehled.....	13
2.1. MAP-kinázové dráhy.....	13
2.2. Signální kaskáda ERK.....	14
2.2.1 Popis signální kaskády ERK.....	14
2.2.2. Aktivace signální kaskády ERK.....	15
2.2.3. Proteinkináza Raf.....	17
2.2.3.1. Struktura proteinkinázy Raf.....	17
2.2.3.2. Regulace proteinkinázy Raf.....	18
2.2.4. Proteinkináza MEK.....	20
2.2.4.1. Struktura proteinkinázy MEK.....	20
2.2.4.2. Regulace proteinkinázy MEK.....	21
2.2.5. Proteinkináza ERK.....	22
2.2.5.1. Struktura proteinkinázy ERK.....	22
2.2.5.1.1. Interakční domény proteinkinázy ERK.....	23
2.2.5.2. Regulace proteinkinázy ERK.....	25
2.2.5.3. Lokalizace proteinkinázy ERK v buňce.....	26
2.2.5.4. Cíle proteinkinázy ERK.....	27
2.3. Model migrace samostatných buněk.....	28
2.4. Rho GTPázy a jejich efektorové proteiny.....	31
2.5. Aktinový cytoskelet v epiteliálních buňkách.....	32
2.5.1. Kolektivní migrace epiteliálních buněk.....	34
2.5.2. Individuální migrace epiteliálních buněk.....	35
2.6. Signální kaskáda ERK řídí migraci individuálních buněk regulací Rho-GTPáz a jejich drah.....	36
2.7. Signální kaskáda ERK řídí reorganizaci aktinového cytoskeletu během rozpadu epitelu na jednotlivé buňky.....	38
3. Shrnutí, cíle práce.....	39
4. Materiál a metody.....	42
4.1. Materiál.....	42
4.1.1. Použité buněčné linie a kultury.....	42
4.1.2. Seznam plasmidů.....	43

4.1.3. Seznam deoxy-oligonukleotidů	43
4.1.4. Seznam restričních enzymů	44
4.1.5. Seznam primárních protilátek	44
4.1.6. Seznam sekundárních protilátek	45
4.1.7. Seznam použitých inhibitorů	45
4.1.8. Ostatní materiál	45
4.2. Metody	45
4.2.1. Kultivace MDCK buněk	45
4.2.2. Transfekce MDCK buněk	46
4.2.3. Stimulace/inhibice signálních drah v MDCK buňkách	46
4.2.4. Příprava vzorků pro SDS-PAGE, SDS PAGE elektroforéza	46
4.2.5. SDS-PAGE elektroforéza	47
4.2.6. Western blot, imunodetekce	48
4.2.7. Fluorescenční mikroskopie	48
4.2.8. Mikroskopie v reálném čase	49
4.2.8.1. Mikroskopie v reálném čase za použití fázového kontrastu	49
4.2.8.2. Mikroskopie v reálném čase za použití konfokální mikroskopie	49
4.2.9. Kvantifikace buněčných parametrů, statistická analýza	49
4.2.10. Práce s DNA	50
4.2.10.1. Polymerázová řetězová reakce (PCR), restrikce a ligace DNA	50
4.2.10.2. Agarózová elektroforéza, extrakce DNA z agarózového gelu	51
4.2.10.3. Použité bakterie, izolace DNA	51
4.3. Příprava stabilních linií (Stabilní vložení DNA sekvence do MDCK buněk)	51
4.3.1. Plasmidy použité pro přípravu stabilních linií	54
4.3.1.1. Příprava plasmidu DDNN ERK2 pcDNA5/FRT	55
4.3.1.2. Příprava plasmidu HL ERK2 pcDNA5/FRT	55
4.3.2. Postup zanesení genů/konstruktů do pFRT MDCK buněk	58
5. Výsledky:	61
5.1. Popis periferního aktinu v MDCK buňkách	61
5.1.1. Periferní aktin asociuje s fokálními adhezemi	61
5.1.2. Buňky na periférii kolonie mají stejnou plochu i rychlost, jako buňky v centrální části kolonie	63
5.1.3. Shrnutí kapitoly	64
5.2. Regulace periferního aktinu signální kaskádou ERK v artificiaálním systému Δ Raf-1:ER MDCK buněk	64
5.2.1. Základní popis linie Δ Raf-1:ER MDCK buněk	64
5.2.2. Δ Raf-1:ER MDCK buňky mění svou morfologii po stimulaci signální kaskády ERK	67

5.2.3. Reorganizace periferního aktinu Δ Raf-1:ER při stimulaci signální kaskády ERK	69
5.2.4. Inhibice signální kaskády ERK zabrání přestavbě periferního aktinu v Δ Raf-1:ER MDCK buňkách.....	71
5.2.5. Shrnutí kapitoly.....	72
5.3. Změny periferního aktinu v parentální linii MDCK buněk	72
5.3.1. Stimulace MDCK buněk růstovým faktorem HGF/SF remodeluje periferní aktin	73
5.3.2. Inhibice proteinkinázy MEK zabrání remodelaci periferního aktinu v parentální linii MDCK buněk.....	74
5.3.3. Konstitutivně aktivní proteinkináza MEK mění organizaci aktinového cytoskeletu v MDCK buňkách	74
5.3.4. Shrnutí kapitoly.....	75
5.4. Periferní aktin se skládá z řady menších vláken	76
5.5. Vliv efektorových proteinkináz ERK1 a ERK2 na morfologii MDCK buněk a přestavbu periferního aktinu	79
5.5.1. Biochemický popis linií MDCK buněk s ektopickou expresí proteinkinázy ERK1 a ERK2	79
5.5.2. Morfologie MDCK buněk ektopicky exprimující proteinkinázu ERK1 a ERK2.....	81
5.5.3. MDCK buňky s ektopickou expresí proteinkinázy ERK2 zaujímají vyšší plochu a jsou rychlejší než buňky s ektopickou expresí proteinkinázy ERK1	82
5.5.4. Proteinkináza ERK2 reorganizuje periferní aktinový cytoskelet v MDCK buňkách	83
5.5.5. Linie MDCK buněk s ektopickou expresí proteinkinázy ERK2 reaguje na růstový faktor HGF/SF intenzivněji	85
5.5.6. Shrnutí kapitoly.....	87
5.6. Role vazebných domén proteinkinázy ERK2 při přestavbě periferního aktinu v MDCK buňkách	88
5.6.1. Biochemická charakteristika stabilních linií MDCK buněk s vloženými geny proteinkinázy ERK2	88
5.6.2. Ektopická exprese proteinkinázy ERK2 s mutací v DBP-doméně nevyvolá morfologické změny v MDCK buňkách.....	91
5.6.3. Vliv mutantních variant proteinkinázy ERK2 na buněčnou plochu a rychlost migrace MDCK buněk.....	92
5.6.4. Mutace v DBP-doméně zabrání v přestavbě periferního aktinu v MDCK buňkách	93
5.6.5. Ektopicky exprimované mutantní varianty proteinkinázy ERK2 neblokují morfologické změny MDCK buněk vyvolané růstovým faktorem HGF/SF	95
5.6.6. Shrnutí kapitoly.....	97
5.7. Identifikace možných efektorových proteinů signální kaskády ERK pro přestavbu periferního aktinu MDCK buněk	97

5.7.1. Aktivita signální kaskády ERK koreluje s aktivitou cofilinu v MDCK buňkách	97
5.7.2. Proteáza calpain2 může hrát roli prostředníka mezi proteinkinázou ERK a Rho GTPázami v MDCK buňkách	98
5.7.3. Shrnutí kapitoly	99
6. Diskuze	99
6.1. Proteinkináza ERK způsobuje morfologické změny epiteliálních buněk a rozpad periferního aktinu	100
6.2. Proteinkináza ERK2 a nikoliv ERK1 reguluje rozpad periferního aktinu.....	101
6.3 Pro přestavbu periferního aktinu je esenciální DBP-doména proteinkinázy ERK2	103
6.4 Role dimerizace proteinkinázy ERK v přestavbě periferního aktinu není jasná	106
6.5. Význam a role periferního aktinu.....	106
7. Závěr	108
8. Seznam použité literatury	109

Seznam zkratek

4HT	4-hydroxytamoxifen
ADP	Adenosine diphosphate
AMP	Adenosine monophosphate
APS	Ammonium persulfate
Arp	Actin related protein
ATP	Adenosine triphosphate
BSA	Bovine serum albumin
cAMP	Cyclic AMP
Capn2	Calpain2
CD (doména)	Common docking (domain)
CdGAP	Cdc42 GTPase-activating protein
Cfl	Cofilin
CK2	Casein kinase 2
CR	Conserved region
CRD	Cystein rich domain
D (doména)	Docking (domain)
DBP (doména)	DEF-binding pocket (domain)
DEF (doména)	Docking site for ERK, FXFP (domain)
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
EGF	Epidermal growth factor
EGFP	Enhanced Green Fluorescent Protein
EMT	Epithelial to mesenchymal transition
ER	Estrogen receptor
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
FAK	Focal Adhesion Kinase
FRT	Flp recombination target
GAP	GTPase-activating protein
GDP	Guanosine diphosphate
GEF	Guanine nucleotide exchange factor
GOI	Gene of interest
GPCR	G protein-coupled receptor
Grb2	Growth factor receptor-bound protein 2
GTP	Guanosine triphosphate
HGF/SF	Hepatocyte growth factor/scatter factor
IEG	Immediate early genes
JNK	c-Jun N-terminal kinases
KID	kinase interaction domain
LIMK	LIM-kinase
MAPK	Mitogen activated protein kinase
MAPKK	Mitogen activated protein kinase kinase
MAPKKK	Mitogen activated protein kinase kinase kinase
MDCK	Madin-Darby canine kidney
MEK	MAP/ERK kinase
MLCK	Myosin light chain kinase

MYPT	Myosin phosphatase targeting protein
NGF	Nerve growth factor
PAK	p21-activated kinase
PCR	Polymerase chain reaction
PDGF	Platelet-derived growth factor
PI-3K	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase
PKA	Protein kinase A
PLC	Phospholipase C
PP2A	Protein phosphatase 2A
PTB	Phosphotyrosine-binding domain
Raf	Rapidly accelerated fibrosarcoma
Ras	Rat sarcoma
RBD	Ras binding domain
RFP	Red Fluorescent Protein
ROCK	Rho-associated protein kinase
RSK	Ribosomal s6 kinase
RTK	Receptor tyrosine kinase
SH2	Src homology 2
SOS	Son of sevenless
WASP	Wiskott–Aldrich Syndrome Protein
WAVE	WASP family Verprolin homologous protein
ZO-1	Zona occludens protein 1

1. Úvod

Epiteliální tkáň patří mezi základní tkáně živočichů a je součástí všech vyšších buněčných struktur. Její hlavní funkcí je oddělit a chránit ostatní buňky dané struktury od vnějšího prostředí. Z tohoto důvodu vytvářejí epitheliální buňky souvislou vrstvu buněk a jsou vzájemně propojeny mezibuněčnými spoji. Zároveň díky své pozici a funkci v rámci organismu odolávají vnějšímu prostředí a jeho změnám. Jsou vystavovány chemickým i mechanickým podnětům. Současně musí fungovat jako selektivní semipermeabilní bariéra pro živiny a metabolity.

Pro všechny tyto funkce a vlastnosti epitheliálních buněk je bezpodmínečně nutný aktinový cytoskelet, který dodává buňce tvar, polaritu, mechanickou pevnost a je důležitý také pro vnitřní buněčné procesy. Aktin může být v buňce organizován do několika výrazných struktur – stresových vláken nebo laterálního aktinu, který je součástí mezibuněčných kontaktů. Zvláštním typem organizace aktinového cytoskeletu je silná aktinová struktura na periferii epitheliálních kolonií, tzv. periferní (supracelulární) aktin. Tato struktura obemyká prakticky celou kolonii a pravděpodobně se podílí na její integritě a udržení epitheliální architektury.

Jednou z klíčových drah, která vnímá vnější podněty a odpovídajícím způsobem na ně reaguje, je signální kaskáda ERK. Ta se skládá z trojice proteinkináz Raf, MEK a ERK a podílí se na široké škále buněčných dějů, jako jsou buněčná proliferace, diferenciace a buněčné migrace. Zejména díky patologickým jevům, kterých je signální kaskáda ERK zdrojem nebo během kterých je deregulována, víme, že aktivace signální kaskády ERK má za následek dynamickou přestavbu aktinového cytoskeletu a tím podporuje migraci celé řady buněčných typů včetně epitheliálních buněk. V případě epitheliálních buněk vede aktivace signální kaskády ERK zpravidla k morfologickým změnám, pro které je typická ztráta mezibuněčných kontaktů, ztráta epitheliální polarity, rozpad epitelu a zisk buněčné autonomie. Během tohoto komplexního a heterogenního procesu, souhrnně označovaného jako epitheliálně mezenchymální tranzice (EMT), ztrácí buňky své epitheliální vlastnosti a získávají morfologii mezenchymálních buněk. Přestože je EMT poměrně volně definována, je nutně spjatá s remodelací všech struktur aktinového cytoskeletu.

V případě periferního aktinu jsou naše poznatky ve vztahu k signální kaskádě ERK i ve vztahu k migraci epitheliálních buněk mizivé. Z tohoto důvodu jsme se zaměřili na to, zdali signální kaskáda ERK remodeluje periferní aktin. Jelikož některé

publikace poukazují na rozdílné vlastnosti efektorových proteinkináz ERK1 a ERK2 v regulaci aktinového cytoskeletu a indukci buněčné migrace, chtěli jsme i my objasnit, zda je mezi izoformami rozdíl v regulaci periferního aktinu. Dalším cílem této práce bylo zjistit, které interakční domény proteinkinázy ERK jsou pro proces přestavby periferního aktinu během získání buněčné autonomie nutné a na základě těchto znalostí identifikovat pravděpodobné substráty proteinkinázy ERK účastníci se remodelace periferního aktinu.

2. Literární přehled

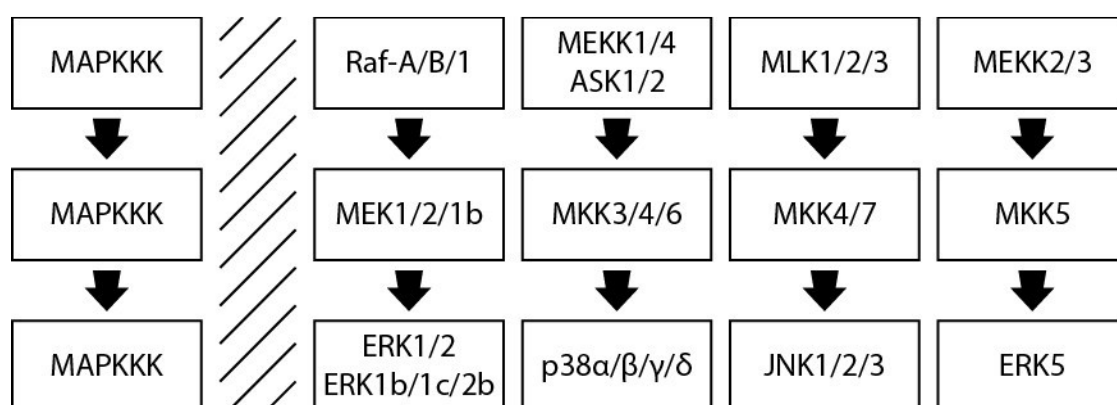
2.1. MAP-kinázové dráhy

Proteinkinázy jsou jedny z nejdůležitějších proteinů, které se účastní přenosu a zpracování signálu v buňce a podílí se prakticky na všech buněčných procesech. Jejich význam také podporuje fakt, že 1,7% známých lidských genů kóduje právě proteinkinázy (Manning *et al.*, 2002; Shchemelinin *et al.*, 2006).

Proteinkinázy jsou důležité proteiny, které se podílejí na přenosu signálu jak v rámci buňky, tak i při odpovědi na změny v extarcellulárním prostředí. Tyto proteiny se často seskupují do signálních drah, kde jedna proteinkináza mění vlastnosti jiné proteinkinázy přenosem fosfátové skupiny na akceptorovou hydroxylovou skupinu. Spolu s příslušnou fosfatázou umožňuje tento způsob efektivní a rychlé reakce na změny podmínek uvnitř i vně buňky. Buňka je tímto způsobem schopna vyrovnat se s drobnými výkyvy v signalizaci a nereagovat na podněty, které nedosáhnou dostatečné intenzity. Zároveň tento systém dovoluje amplifikaci signálu, kdy první úroveň proteinkináz fosforyluje větší množství proteinkináz v druhé úrovni a ty následně mění vlastnosti většího množství substrátových proteinů. Ovšem toto hierarchické uspořádání také umožňuje redukci signálu při využití fosfatáz v kterékoliv kinázové nebo i substrátové úrovni.

Jedním z příkladů, kdy proteinkináza reguluje jinou proteinkinázu, jsou MAP-kinázové signální kaskády (mitogen-activated protein kinase), které patří mezi základní pilíře signalizace eukaryotických buněk (Dhillon *et al.*, 2007; Zhang a Liu, 2002). Pro MAP-kinázové dráhy jsou typické tři úrovně proteinkináz: MAPKKK (MAP kinase kinase kinase), MAPKK (MAP kinase kinase) a MAPK (MAP kinase). Signál je přenášen postupnou fosforylací z první proteinkinázy MAPKKK na MAPKK a z té na

efektorovou proteinkinázu MAPK, která reguluje řadu cílových substrátů. Dnes jsou známé čtyři savčí MAP-kinázové dráhy, které jsou pojmenovány podle jejich efektorových kináz. Jsou to ERK1/2 (Extracellular signal-regulated kinase), JNK 1-3 (c-Jun N-terminal kinase), p38 $\alpha/\beta/\gamma/\delta$ (také známá jako SAPK – Stress-activated protein kinase) a ERK5 (Obr. 1). Byly objeveny také tzv. atypické MAP-kinázové dráhy, které se nemusí skládat ze tří úrovní proteinkináz, ale mají sekvenční podobnosti s MAP-kinázovými drahami (Cargnello a Roux, 2011). Do této skupiny patří ERK3/4, ERK7 a NLS (Nemo-like kinase).



Obr. 1: Zjednodušený přehled savčích MAP-kinázových signálních kaskád. Vlevo na schématu je znázorněná obecná tří-stupňová hierarchie MAP-kinázové signální kaskády. Vpravo je organizace systému proteinkináz pro čtyři základní savčí MAPK-kinázové kaskády ERK1/2, p38, JNK a ERK5.

2.2. Signální kaskáda ERK

2.2.1 Popis signální kaskády ERK

Signální kaskáda ERK je tvořena trojicí proteinkináz Raf, MEK a ERK a patří mezi jednu z nejlépe prostudovaných savčích MAP-kinázových signálních drah. Je přítomna ve většině eukaryotických buněk a účastní se řady buněčných procesů, jakými jsou buněčná proliferace, diferenciace, regulace metabolismu, migrace aj. Vedle nezastupitelného podílu v řadě fyziologických procesů byla její účast popsána i při patologických jevech. Její deregulace byla popsána u více než 30% lidských typů nádorů, kdy došlo k onkogenní mutaci v proteinkináze Raf nebo v jejím regulačním proteinu Ras. Recentní publikace ukazují, že aktivita signální dráhy Ras-Raf-MEK-ERK může být u transformovaných buněk zvýšena, aniž by došlo k mutaci onkogenní v jednotlivých komponentech ERK signalizace. (Downward, 2003; Hoshino *et al.*, 1999; Roberts a Der, 2007; Rubinfeld a Seger, 2005).

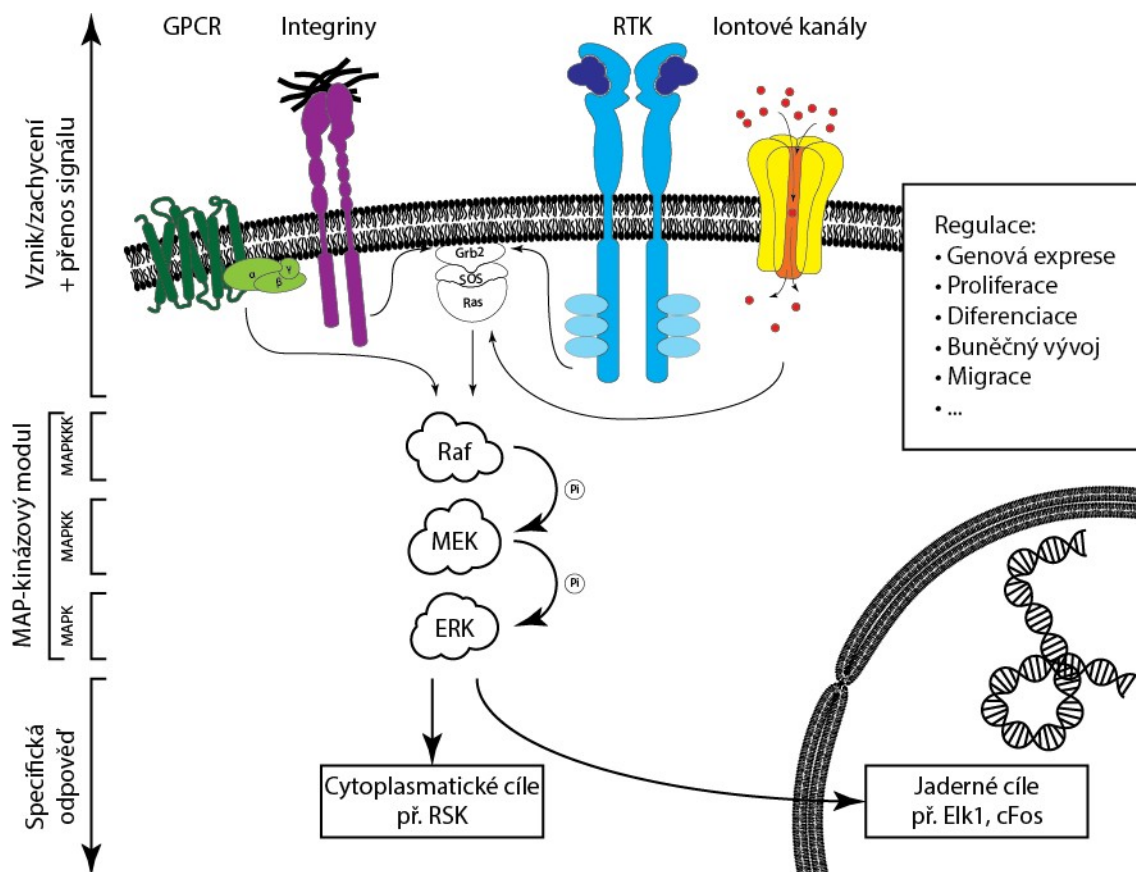
2.2.2. Aktivace signální kaskády ERK

K aktivaci signální kaskády ERK dochází zpravidla na plasmatické membráně (Obr. 2). Buňka aktivuje signální kaskádu ERK jako odezvu na vnější podněty, kdy reaguje na přítomnost hormonů, růstových faktorů, cytokinů nebo na stimuly z extracelulární matrix. Tyto podněty jsou zachyceny, zpracovány a signál je přenesen do intracelulárního prostředí receptorovými tyrosinovými kinázami (RTK; receptor tyrosine kinase), receptory trimetrických G-proteinů (GPCR; G-protein-coupled receptor) nebo integriny (Cargnello a Roux, 2011; Saleem *et al.*, 2009). Aktivita signální kaskády ERK může být modulována také podněty z cytoskeletu, iontovými kanály nebo při genotoxickém a metabolickém stresu (Aikawa *et al.*, 1997; Huang *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2000).

Stimulace signální kaskády ERK růstovými faktory, kterými jsou např. EGF (Epidermal growth factor), HGF/SF (Hepatocyte growth factor/Scatter factor), NGF (Nerve growth factor), PDGF (Platelet-derived growth factor) a následná aktivace RTK, patří dnes mezi nejlépe prostudované stimulační mechanismy signální kaskády ERK. Receptorové tyrosinové proteinkinázy jsou transmembránové proteiny zakotvené v cytoplasmatické membráně s ligand-vazebnou doménou vně a kinázovou doménou uvnitř buňky. Po vazbě příslušného růstového faktoru na RTK dochází zpravidla k dimerizaci receptoru a k autofosforylaci mnoha tyrosinových zbytků v intracelulární části proteinu. Fosforylované tyrosinové zbytky následně slouží jako vazebné místo pro proteiny s SH2 (Src homology 2) nebo PTB (Phosphotyrosine binding) doménou. Jedním z nich je adaptorový protein Grb2 (Growth factor receptor-bound protein 2), který má na svém povrchu spektrum dalších vazebných míst a interaguje s řadou proteinů, mj. s proteinem SOS (Son of sevenless). Protein SOS patří mezi GEF-proteiny (Guanine nucleotide exchange factor) a po vazbě na adaptor Grb2 aktivuje GTPázu Ras, důležitý regulační protein proteinkinázy Raf (Cargnello a Roux, 2011; Zwick *et al.*, 2001).

GTPáza Ras (Rat sarcoma) je 21 kDa veliký protein, který byl objeven jako buňky transformující faktor a je součástí stejnojmenné superrodiny Ras GTPáz. Dnes jsou známy celkem čtyři lidské, vysoce homologní, izoformy: H-Ras, N-Ras, K-Ras2A, K-Ras2B (dále jako Ras). GTPázy K-Ras2A/2B jsou alternativní sestřihové varianty genu K-Ras. GTPáza Ras má v buňkách funkci signálního uzlu. Vedle účasti při aktivaci proteinkinázy Raf se také podílí na aktivaci PI-3K (Phosphoinositide 3-kinase),

Ral GTPázy, nebo PLC γ (Phospholipase C). Regulací těchto i dalších substrátů je GTPáze Ras připisována účast v široké škále buněčných dějů a z tohoto důvodu musí mít buňka způsob, kterým GTPázu Ras řídí (Hancock, 2003; Mor a Philips, 2006).



Obr. 2: Schematické znázornění signální kaskády ERK, její aktivace a jejího funkčního významu v buňce. Signální kaskáda ERK je aktivována na plasmatické membráně vazbou ligandů na specifické receptory včetně receptorových tyrosinových kináz (RTK), receptorů trimetrických G-proteinů (GPCR) a integrinů. Signální kaskáda ERK může být aktivována také při změně iontové síly. Všechny tyto signály přímo či nepřímo aktivují proteinkinázu Raf, která fosforyluje a aktivuje proteinkinázu MEK a ta fosforyluje a aktivuje proteinkinázu ERK. Fosforylací mění proteinkináza ERK vlastnosti cytoplasmaticky i jaderně lokalizovaných proteinů. Tím se účastní řady buněčných funkcí, kterými jsou regulace genové exprese, proliferace či migrace. Toto schéma vzniklo na základě literatury použité v kapitole o signální kaskádě ERK. Při jeho tvorbě byly převzaty motivy z následujících zdrojů: www.perkinelmer.com, <http://jonlieffmd.com>, Guo a Giancotti, 2004.

Stejně jako u ostatních GTPáz je aktivita Ras GTPázy dána zejména tím, zda je v komplexu s GTP nebo GDP. Proteiny GEF zprostředkovávají výměnu GDP za GTP a uvádí GTPázy do aktivního stavu. GTPázy mají zpravidla hydrolytickou aktivitu a jsou schopny sami hydrolyzovat navázaný GTP na GDP a anorganický fosfát. Avšak rychlost, s jakou dojde k hydrolýze GTP, není pro efektivní signalizaci dostatečná.

Proto buňka disponuje proteiny GAP (GTPase activating protein), které interakcí s GTPázami urychlují hydrolyzu GTP a inaktivují je (Cherfils a Zeghouf, 2013). Následně po aktivaci Ras GTPázy dochází k aktivaci signální kaskády ERK.

2.2.3. Proteinkináza Raf

Proteinkináza Raf patří mezi serin/threoninové proteinkinázy a je první z triády proteinkináz signální kaskády ERK. Podobně jako u Ras GTPázy byla původně objevena její mutantní varianta, tzv. v-Raf, která byla schopna transformovat buňky a která dala proteinkináze jméno (Virus-induced rapidly accelerated fibrosarcoma). Do dnešního dne byly popsány tři izoformy: A-Raf, B-Raf a Raf-1 (také označovaný jako C-Raf). Všechny tři izoformy proteinkinázy Raf (dále souhrnně označovány jako Raf) jsou v savčích buňkách všeobecně exprimovány (Zebisch a Troppmair, 2006).

Proteinkináza MEK je bezpochyby nejdůležitějším substrátem proteinkinázy Raf, ale jsou známy také další efektorové proteiny, které nejsou součástí signální kaskády ERK. Proteinkináza Raf fosforyluje např. adenylylcyklázy 2, 5 a 6, retinoblastoma protein, MYPT (myosin phosphatase targeting protein) a troponin T. Fosforylace těchto proteinů proteinkinázou Raf nebyla narušena inhibicí proteinkinázy MEK. Zmíněné substráty, u kterých byla popsána fosforylace proteinkinázou Raf, mohou vysvětlovat důvod, proč je deregulace proteinkinázy Raf odlišná od deregulace proteinkinázy MEK a popř. ERK (Broustas *et al.*, 2002; Pfliegerer *et al.*, 2009; Shimizu *et al.*, 2000; Tan *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 1998).

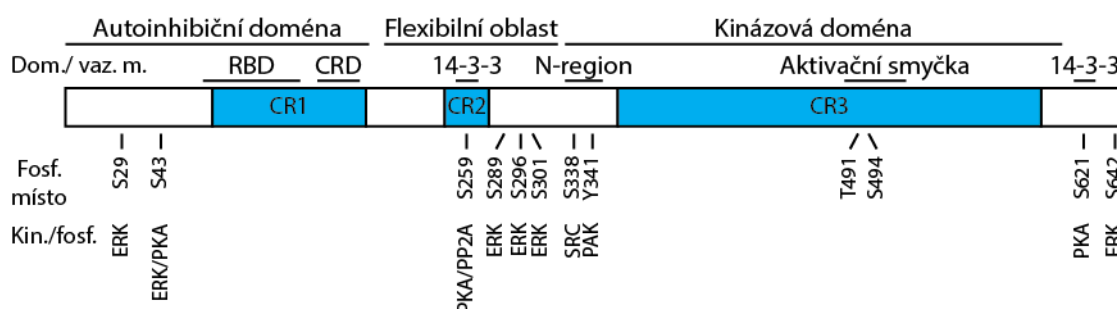
2.2.3.1. Struktura proteinkinázy Raf

Všechny tři izoformy proteinkinázy Raf obsahují tři konzervované oblasti CR1, CR2 a CR3 (conserved region; Obr. 3). CR1 oblast slouží jako regulační doména, která se skládá ze dvou částí: Ras-vazebné domény (RBD – Ras binding domain) a cystein-bohaté oblasti (CRD – Cysteine rich domain). Součástí RBD je ubiquitinový motiv, který umožňuje vazbu k aktivní Ras GTPáze. K vzájemné interakci dochází mezi dvěma antiparalelně orientovanými β -listy: β 2-listem GTPázy Ras a β 2-list RBD proteinkinázy Raf (Nassar *et al.*, 1995). CRD funguje v proteinkináze Raf jako lipid vazebná doména. Obsahuje motiv zinkového prstu, který je schopen vázat ceramid či fosfatidylserin a zprostředkovává vazbu k plasmatické membráně (Ghosh *et al.*, 1994; Huwiler *et al.*,

1996). CRD navíc kromě vazby k membráně poskytuje aditivní vazbu ke GTPáze Ras. Interakce RBD i CRD s GTPázou Ras jsou nutné pro Ras-indukovanou aktivaci proteinkinázy Raf (Hu *et al.*, 1995).

Mezi CR1 a CR3 se nachází vysoce flexibilní oblast, jejíž součástí je CR2, konzervovaná serin/threonin bohatá oblast. Nachází se zde velké množství serinových a threoninových aminokyselinových zbytků, které mohou být fosforylovány a které se podílí na aktivitě proteinkinázy Raf. Dále se zde nachází vazebné místo pro regulační protein 14-3-3, jeho druhé vazebné místo se nachází na C-konci proteinkinázy Raf (Cutler *et al.*, 1998).

CR3 oblast tvoří kinázovou doménu proteinkinázy Raf a nachází se zde další regulační motivy. Na N-konci kinázové domény se nachází tzv. N-region, pomocí kterého dochází k intramolekulární interakci s CRD. Dále se zde nachází aktivační smyčka a vazebné místo pro proteinkinázu MEK (Cutler *et al.*, 1998; Xiang *et al.*, 2002).



Obr. 3: Schematické znázornění doménové organizace proteinkinázy Raf-1. Na schématu jsou znázorněny konzervované domény a lokalizace dalších funkčních částí proteinkinázy Raf, zmíněných v textu. Dále jsou na schématu znázorněny fosforylační místa včetně označení proteinkináz, popř. proteinfosfatáz, které je rozpoznávají. Uvedena jsou pouze fosforylační místa, která jsou zmíněna v této práci. Schéma vzniklo na základě lidské proteinové sekvence proteinkinázy Raf-1.

2.2.3.2. Regulace proteinkinázy Raf

Proteinkináza Raf je cílem celé řady signálních drah. Z tohoto důvodu je aktivace proteinkinázy Raf velice komplexní událost, která je založena na změně protein-proteinových a intramolekulárních interakcí, fosforylací a defosforylací řady aminokyselinových zbytků (uváděné pozice odpovídají lidské proteinkináze Raf-1). Proteinkináza Raf zaujímá ve svém neaktivním stavu autoinhibiční konformaci, kdy se CRD váže na N-region. Odstranění této autoinhibiční interakce je nezbytné pro aktivaci

proteinkinázy Raf. Po vazbě RBD na GTPázu Ras je interakce CRD s kinázovou doménou odstraněna a CRD se může vázat k membráně (Cutler *et al.*, 1998). Odstranění intramolekulární interakce je také podpořeno fosforylací Ser338 a Tyr341 uvnitř N-regionu, které se účastní proteinkinázy rodiny Src a proteinkináza PAK (p21-activated kinase) (Chong *et al.*, 2001; Zang *et al.*, 2008; Zang *et al.*, 2002). Opačný význam má fosforylace Ser43 v proteinkináze Raf, která blokuje interakci s GTPázou Ras a udržuje proteinkinázu Raf v neaktivní konformaci. K fosforylaci Ser43 dochází při vysokých hladinách cAMP (cyklického AMP) v buňkách a je zprostředkována proteinkinázou PKA (protein kinase A) (Ramstad *et al.*, 2000; Wu *et al.*, 1993).

Proteinkináza Raf obsahuje dvě důležitá regulační místa, Ser259 a Ser621. Fosforylace těchto míst, která je zprostředkována proteinkinázou PKA, je nutná pro vazbu 14-3-3 proteinu. Pokud interaguje s proteinkinázou Raf pomocí obou svých vazebných motivů, stabilizuje inaktivní konformaci proteinkinázy Raf. Po defosforylaci Ser259 proteinfosfatázou PP2A (Protein phosphatase 2A) zůstává 14-3-3 protein navázán pouze svým druhým vazebným motivem a naopak pomáhá stabilizovat aktivní konformaci proteinkinázy Raf (Abraham *et al.*, 2000; Dumaz a Marais, 2003).

Stejně jako proteinkinázy MEK a ERK má také proteinkináza Raf aktivační smyčku s fosforylovatelnými zbytky Thr491 a Ser494. Fosforylace těchto zbytků vede k vyšší aktivitě *in vitro* i *in vivo*, ale jejich mutace na nefosforylovatelné zbytky (T491A, T494A) má za následek pouze částečnou inhibici proteinkinázy Raf (Chong *et al.*, 2001). Dnes nejsou známy proteinkinázy, které zprostředkovávají fosforylaci těchto míst. Spekuluje se, že může jít o autofosforylaci.

Další z podmínek, za kterých proteinkináza Raf fosforyluje své substráty, je dimerizace. Členy rodiny Raf nemusí striktně formovat homodimery, ale tvoří také enzymaticky funkční heterodimery. Zajímavé je, že u heterodimeru B-Raf a Raf-1 byla prokázána daleko vyšší aktivita v porovnání s odpovídajícími homodimery (Rushworth *et al.*, 2006).

Stimulace buněk růstovými faktory zvýší aktivitu proteinkinázy Raf, která následně aktivuje signální kaskádu ERK a dochází k fosforylaci příslušných substrátů. Dochází také k negativní zpětnovazební regulaci, během které je proteinkináza Raf fosforylována proteinkinázou ERK v pozicích Ser29, Ser43, Ser289, Ser296, Ser301, a Ser642. Tyto fosforylace inhibují proteinkinázu Raf a pomáhají ukončit odpověď na příslušné stimuly (Dougherty *et al.*, 2005).

Na základě aktivačního mechanismu proteinkinázy Raf lze protein rozdělit na dvě části – regulační a katalytickou. Po odstranění regulační části, která se skládá z CR1 a CR2, získává proteinkináza Raf onkogenní potenciál (Heidecker *et al.*, 1990). Samotná kinázová doména je pak dostatečná pro fosforylaci substrátů. Nicméně nejvýznamnější onkogení formou je mutace B-Raf v pozici 600, kdy je valinový zbytek nahrazen zbytkem aspartátovým. Tato mutace zvyšuje bazální aktivitu B-Raf a podílí se na vzniku celé řady nádorů, především pak vzniku melanomů a nádorů tlustého střeva (Davies *et al.*, 2002).

2.2.4. Proteinkináza MEK

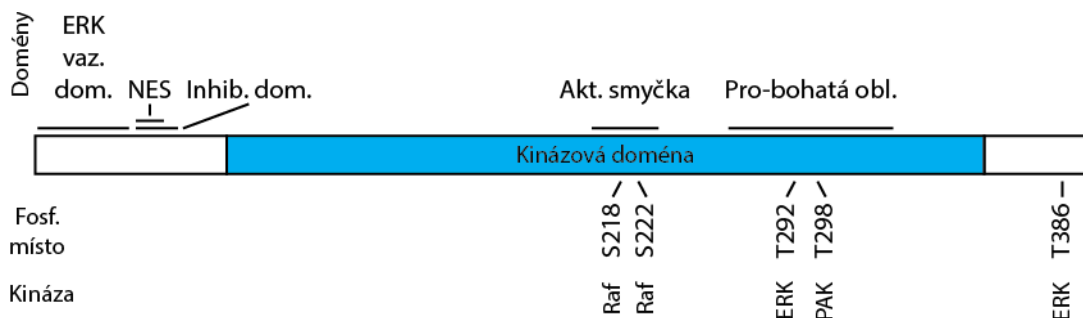
Proteinkináza MEK (MAP/ERK kinase) patří mezi duální proteinkinázy, fosforylující serin/threoninové i tyrosinové zbytky a tvoří druhou úroveň signální kaskády ERK. Dnes jsou známy izoformy MEK1, MEK2 (dále jako MEK). Byla popsána také sestřihová varianta proteinkinázy MEK1, MEK1b (také označována jako MEK3). U proteinkinázy MEK1b se ukázalo, že má minoritní dopad na hlavní izoformy proteinkinázy ERK (ERK1, ERK2). Na rozdíl od GTPázy Ras a proteinkinázy Raf nebyl dodnes objeven onkoprotein odvozený od proteinkinázy MEK, avšak bodovými mutacemi lze připravit konstitutivně aktivní formu, která má potenciál transformovat buňky (Mansour *et al.*, 1994; Zheng a Guan, 1993). Z klinického hlediska je důležité, že mutace, která vede ke zvýšené aktivitě MEK, se objevuje spontánně v reakci na léčbu melanomů inhibítorem blokujícím B-Raf. Tato mutace pomáhá reaktivovat signální kaskádu ERK a přispívá k získání rezistence vůči inhibitoru B-Raf (Wagle *et al.*, 2011).

U proteinkinázy MEK nebyl objeven jiný substrát, než je proteinkináza ERK. V *in vitro* podmínkách byla popsána autofosforylace proteinkinázy MEK v jejím aktivačním segmentu, ale její funkční význam není znám (Gardner *et al.*, 1994).

2.2.4.1. Struktura proteinkinázy MEK

Proteinkináza MEK je přibližně 43 kDa velký protein, který je z velké části tvořen kinázovou doménou (Obr. 4). N-terminálně od kinázové domény se nachází přibližně 70 aminokyselin dlouhý segment (N-koncová extenze), který se účastní regulace proteinkinázy MEK a její lokalizace v rámci buňky. Nachází se zde inhibiční doména, která interaguje s α C-helixem uvnitř kinázové domény a stabilizuje její

neaktivní konformaci. Součástí inhibiční domény je jaderný exportní signál (NES, nuclear export signal), který je zodpovědný za lokalizaci v cytoplasmě. Na N-koncové extenzi se nachází také interakční doména s proteinkinázou ERK. Uvnitř kinázové domény se nachází aktivační smyčka a prolin bohatá oblast (Fischmann *et al.*, 2009; Fukuda *et al.*, 1996)



Obr. 4: Schematické znázornění doménové organizace proteinkinázy MEK1. Na schématu jsou znázorněny funkční části proteinkinázy MEK1. Dále jsou zde znázorněna fosforylační místa s příslušnými proteinkinázami, které jsou zmíněné v této práci. Schéma vzniklo na základě lidské proteinové sekvence proteinkinázy MEK1.

2.2.4.2. Regulace proteinkinázy MEK

Regulace proteinkinázy MEK je v porovnání s proteinkinázou Raf výrazně jednodušší a její aktivita je dána fosforylačním statusem. Proteinkináza MEK je aktivována fosforylací Ser218 a Ser222 (uváděné pozice odpovídají lidské proteinkináze MEK1) v aktivační smyčce, zprostředkované proteinkinázou Raf. Tato fosforylace je dostatečná pro následnou fosforylací proteinkinázy ERK (Alessi *et al.*, 1994). Proteinkináza PAK1 může fosforylovat proteinkinázu MEK v pozici Thr298, která působí stimulačně a která podporuje interakci mezi proteinkinázami MEK a ERK (Eblen *et al.*, 2004).

Proteinkináza MEK dále obsahuje dva aminokyselinové zbytky Thr292 a Thr386, které jsou rozeznávány a fosforylovány proteinkinázou ERK v prolin bohaté oblasti (Brunet *et al.*, 1994). Fosforylace Thr292 vede k potlačení aktivity MEK1 a vedle fosforylace proteinkinázy Raf je toto další způsob, kterým se proteinkináza ERK formou negativní zpětné vazby účastní na ukončení odpovědi na příslušné stimuly.

Dimerizace je podmínkou proteinkinázy MEK pro její aktivitu. Stejně jako v případě proteinkináz Raf, tak také proteinkinázy MEK1 a MEK2 mohou tvořit homo- nebo hetero- dimery. Složení těchto dimerů pak určuje dobu aktivace proteinkinázy

ERK. Dimery, jejichž součástí je izoforma MEK1, poskytují krátkodobou aktivaci proteinkinázy ERK (Catalanotti *et al.*, 2009).

2.2.5. Proteinkináza ERK

Proteinkináza ERK (Extracellular signal-regulated kinase) patří mezi serin/threoninové kinázy a tvoří poslední úroveň MAPK signální kaskády ERK. Dnes jsou známy dvě základní, všeobecně exprimované, izoformy ERK1 a ERK2 (dále jako ERK), které mezi sebou sdílí 84% sekvenční podobnost. Obě izoformy mají své sestřihové varianty, ERK1b, ERK1c a ERK2b, které mají tkáňovou a mezidruhovou specifitu (Aebersold *et al.*, 2004; Gonzalez *et al.*, 1992; Yung *et al.*, 2000).

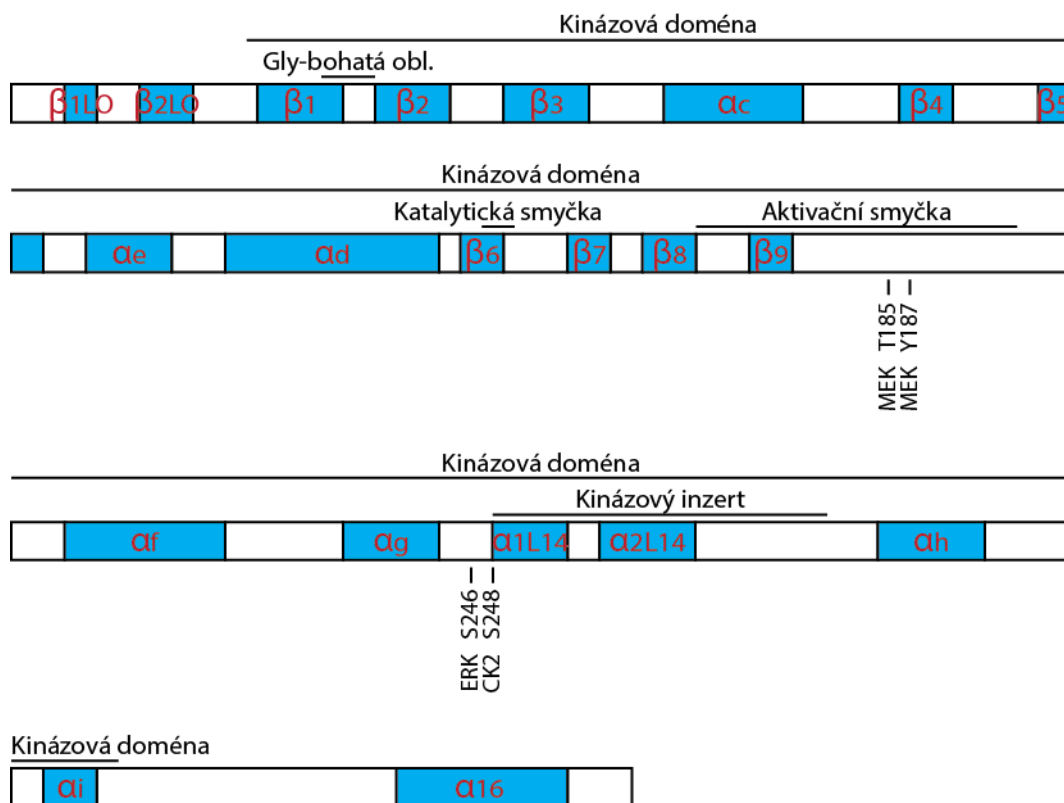
Izoformy ERK1 a ERK2 jsou ko-exprimovány ve většině tkání a během stimulace signální kaskády ERK jsou paralelně aktivovány. Pravděpodobně spolu sdílí všechny substráty a mohou se vzájemně zastupovat. Přesto některé publikace ukazují, že mohou mít v buňkách odlišné funkce (Lefloch *et al.*, 2009; Pearson *et al.*, 2001). Např. v případě delece obou alel proteinkinázy ERK1 (ERK1^{-/-}) došlo u myši k defektům ve vývoji thymocytů a z nich odvozených maturovaných buněk, ale myši byly životaschopné. Delece proteinkinázy ERK2 (ERK2^{-/-}) embryonálně byla letální (Pages *et al.*, 1999; Yao *et al.*, 2003).

2.2.5.1. Struktura proteinkinázy ERK

Aminokyselinovou sekvenci proteinkinázy ERK lze rozdělit do několika částí na základě sekundárních struktur (Obr. 5). Téměř celý protein je tvořen kinázovou doménou, která se skládá z N-laloku a většího C-laloku. Laloky jsou vůči sobě pohyblivé a mezi nimi se nachází katalytické centrum proteinkinázy. Bylo identifikováno celkem 12 subdomén, které tvoří katalytické jádro kinázové domény. Mezi základní části patří glycin bohatá smyčka mezi $\beta 1$ a $\beta 2$ listy, αC helix a $\beta 3$ list. Tyto jmenované struktury se účastní vazby ATP a jeho správné konformace vůči substrátu. Pro přenos γ -fosfátu z ATP na substrát je nezbytný Asp149 v katalytické smyčce (uváděné pozice platí pro lidskou proteinkinázu ERK2) (Hanks *et al.*, 1988; Zhang *et al.*, 1994).

Proteinkináza ERK obsahuje ve své kinázové doméně inserci 31 aminokyselin (Zhang *et al.*, 1994), tzv. KID (kinase insert domain), které se podílejí na funkční

specifitě a účastní se vazby proteinkinázy ERK se substráty (Yazicioglu *et al.*, 2007). N-terminálně od kinázového inzertu se nachází aktivační smyčka s aktivačním TEY motivem (Thr185, Glu186, Tyr187).



Obr. 5: Schematické znázornění proteinkinázy ERK2. Na schématu jsou znázorněny sekundární proteinové struktury, funkční domény a fosforylační místa včetně příslušných proteinkináz. Jsou uvedena pouze fosforylační místa, která jsou zmíněna v textu. Schéma bylo adaptováno pro lidskou proteinovou sekvenci proteinkinázy ERK2 a vytvořeno na základě tohoto zdroje: Zhang *et al.*, 1994.

2.2.5.1.1. Interakční domény proteinkinázy ERK

Proteinkináza ERK1/2 má na svém povrchu dvě na sobě nezávislé interakční domény, které jsou nutné pro kontakt se substrátem a jeho následnou fosforylaci (Obr. 6). Blíže ke katalytickému centru se nachází DBP doména (DEF-binding pocket), která rozeznává substrátový DEF motiv (docking site for ERK, FXFP; také nazýván jako FRS, F-site recruitment site). Na opačné straně, než je katalytické centrum, se nachází CD-doména (common docking; také nazývána jako DRS, D-site recruitment site), která interaguje s D-doménou (docking domain; také popisována jako DEJL, docking site for ERK, JNK, LXL).

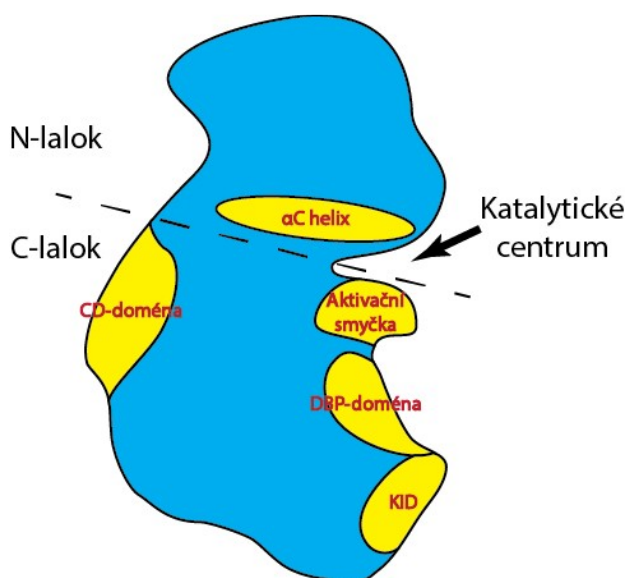
DBP-doména je tvořena hydrofobním žlábkem mezi α F-helixem a kinázovým insertem. Toto místo je bohaté na leucinové a tyrosinové řetězce, přesněji DBP doména je tvořena aminokyselinovými zbytky Met199, Leu200, Tyr233, Leu234, Leu237, Tyr263. Substráty, které interagují s DBP-doménou, obsahují preferenčně aminokyselinový motiv Phe-Xxx-Phe-Pro (FXFP), ale ERK interaguje i se substráty obsahujícími minimální motif FXF. Na základě hydrofobních interakcí mezi DBP-doménou (M199, L200, L237) a DEF-doménou (FXFP) dojde k vazbě substrátu s proteinkinázou ERK1/2 a jeho následné fosforylaci (Jacobs *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 2004; Sheridan *et al.*, 2008). Pro interakci pomocí DBP-domény je nutné, aby byla proteinkináza ERK fosforylována ve své aktivační smyčce, která se nachází v její blízkosti. Pokud není aktivační smyčka fosforylována, konformačně blokuje DEF-vazebné místo a vytváří s ním intramolekulární interakce (Lee *et al.*, 2004).

Zatímco DBP-doména se nachází výhradně v proteinkinázách ERK, CD-doména je kromě ERK navíc součástí MAP-kináz p38 a JNK. Z tohoto důvodu mohou MAP-kinázy sdílet některé substráty. CD-doména proteinkinázy ERK se skládá ze dvou částí. První část CD-domény je tvořena hydrofobním žlábkem, který se nachází mezi α D a α E helixy a dvěma β -listy β 7 a β 8. V blízkosti hydrofobního žlábků se nachází druhá část CD-domény, tvořená negativně nabitými aminokyselinami Asp318 a Asp321. V případě jiných MAP-kináz mohou být jeden nebo oba aspartáty nahrazeny kyselinou glutamovou. Substrátová D-doména je tvořena polárními bazickými a hydrofobními (\emptyset) zbytky. Substráty s D-doménou zpravidla obsahují aminokyselinovou sekvenci (R/K)₁₋₂-X₂₋₆- \emptyset -X- \emptyset , kde hydrofobní zbytky jsou tvořeny leucinem (tzv. LXL motiv), popř. izoleucinem nebo valinem. K interakci mezi proteinkinázovou CD-doménou a substrátovou D-doménou dochází na základě polárních (Asp318, Asp321 s Arg/Lys) a nepolárních interakcí (hydrofobní žlábek s \emptyset -X- \emptyset motivem). Vazba pomocí CD-domény k substrátu je nezávislá na aktivitě proteinkinázy ERK (Lee *et al.*, 2004; Smith *et al.*, 1999; Tanoue *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2003; Zhou *et al.*, 2006).

Substráty mohou využívat k interakci s proteinkinázou ERK DBP-doménu (např. c-Fos), D-doménu (např. RSK), nebo mohou mít na svém povrchu obě domény (např. Elk-1). Zanesením bodové mutace do DBP- nebo D-domény vede k zabránění interakce s příslušnými substráty. Bodová mutace v DBP-doméně brání interakci se proteiny jako je c-Fos, ale má minimální vliv na asociaci se substráty, jakou je proteinkináza RSK. Naopak mutace v CD-doméně naruší vazbu k proteinkináze RSK, ale neovlivňuje c-Fos. Mutace v obou doménách zabrání interakci a následné fosforylaci

s oběma typy interakčních partnerů. Některé proteiny jsou přímými substráty proteinkinázy ERK1/2 (např. Stathmin), ale k vazbě nevyužívají DEF- ani D-doménu. Nicméně přítomnost interakčních domén není vždy vyžadována. Bylo ukázáno, že mutace DBP- i CD-domény nenaruší vazbu ani fosforylaci stathminu (Burkhard *et al.*, 2011).

CD-doména, na rozdíl od DBP-domény, funguje také jako dokovací místo pro proteinkinázu MEK a proteinfosfatázy, které se podílejí na aktivitě proteinkinázy ERK. Bodová mutace naruší vazbu s proteinfosfatázami, ale interakce s proteinkinázou MEK je narušena pouze částečně. Je to dáno tím, že proteinkináza MEK má další vazebné místo v oblasti α G-helixu proteinkinázy ERK. Z tohoto důvodu může být takto mutovaná proteinkináza stále aktivována (Dimitri *et al.*, 2005; Robinson *et al.*, 2002; Tanoue *et al.*, 2000).



Obr. 6: Zjednodušené schéma prostorového uspořádání proteinkinázy ERK. Na schématu je uvedeno umístění interakčních domén (CD-doména, DBP-doména), kinázového inzertu (KID) a aktivační smyčky proteinkinázy ERK. Pro lepší orientaci je vyobrazen α C-helix. Na schématu je dále zobrazeno umístění katalytického centra proteinkinázy ERK, které se nachází mezi N- a C- lalokem. Schéma vzniklo zjednodušením modelu získaného na stránkách <http://swissmodel.expasy.org>, na základě proteinové sekvence lidské proteinkinázy ERK2.

2.2.5.2. Regulace proteinkinázy ERK

Hlavním regulačním mechanismem proteinkinázy ERK je fosforylace v její aktivační smyčce, kde proteinkináza MEK rozeznává a fosforyluje threoninový a tyrosinový zbytek v rámci tzv. TEY motivu v pozici 185-187. Pro plnou aktivaci musí

dojít k fosforylaci Thr185 i Tyr187 (Ferrell a Bhatt, 1997). Proteinkináza ERK je pravděpodobně schopna také autofosforylace ve své aktivační smyčce (Zhou a Zhang, 2002). Defosforylace Thr185 a Tyr 187 se účastní např. proteinfosfatázy PP2A, CD45 nebo proteinfosfatázy z rodiny DUSP (Dual-specificity phosphatase) (Caunt a Keyse, 2013; Zhou *et al.*, 2002).

Proteinkináza ERK po své aktivaci dimerizuje a preferenčně tvoří homodimery (Khokhlatchev *et al.*, 1998). Nicméně recentní práce ukazují, že tvorba dimerů nemusí být nutná pro všechny funkce proteinkinázy ERK. Zatímco dimerizačně defektní proteinkináza ERK vykazuje defekt ve fosforylaci testovaných cytoplasmatických substrátů, fosforylace některých jaderně lokalizovaných proteinů nebyla narušena a v případě transkripčního faktoru Elk-1 byla dokonce zvýšena (Casar *et al.*, 2008).

2.2.5.3. Lokalizace proteinkinázy ERK v buňce

Buňky tkáňových linií mají v nepřítomnosti séra proteinkinázu ERK preferenčně v cytoplasmě. Po přidání séra dochází ke stimulaci signální kaskády ERK a následně je většina proteinkinázy ERK translokována do jádra (Chen *et al.*, 1992). I když změna lokalizace proteinkinázy ERK mezi jádrem a cytoplasmou byla tématem řady publikací, dodnes není znám přesný mechanismus transportu přes jadernou membránu.

Proteinkináza ERK nemá klasický jaderný lokalizační signál ani jaderný exportní signál ve své primární proteinové sekvenci. Díky své velikosti (44/42 kDa pro ERK1/2) splňuje proteinkináza ERK podmínky pro volný pohyb jadernými póry a byl u ní pozorován difuzní pohyb mezi jádrem a cytoplasmou nezávisle na fosforylaci v aktivační smyčce. Nicméně translokace proteinkinázy ERK je v buňkách zpravidla podmíněna její aktivací. V neaktivním stavu tvoří proteinkináza ERK komplex s proteinkinázou MEK nebo jinými cytoplasmatickými proteiny a je udržována v cytosolu. Po aktivaci proteinkinázy ERK dochází k rozpadu těchto komplexů, ale také k fosforylaci Ser246 proteinkinázou ERK a Ser248 Casein kinázou 2 (CK2) v kinázovém insertu. Fosforylace obou zbytků je nutná pro vazbu na jaderné kanály a následnou translokaci do jádra. V případě mutací L232A, Y261A/N, L198/232A, které jsou stejně jako KID součástí DBP-domény, nebo v případě mutace CD-domény nebyly pozorovány defekty v jaderné lokalizaci po stimulaci signální kaskády ERK (Adachi *et al.*, 1999; Chuderland *et al.*, 2008; Dimitri *et al.*, 2005; Plotnikov *et al.*, 2011; Yazicioglu *et al.*, 2007).

Dimerizace proteinkinázy ERK po její aktivaci pravděpodobně není podmínkou jaderného transportu. Ukazuje se, že dimerizačně defektní proteinkinázy ERK1 i ERK2 jsou schopny vstoupit do jádra po stimulaci signální kaskády ERK (Adachi *et al.*, 1999; Burack a Shaw, 2005; Lidke *et al.*, 2010). Nicméně existují také práce, které popisují závislost mezi dimerizací a jadernou lokalizací (Khokhlatchev *et al.*, 1998).

2.2.5.4. Cíle proteinkinázy ERK

Aktivovaná proteinkináza ERK rozeznává prolin bohaté oblasti v typickém uspořádání Pro-Xxx-Ser/Thr-Pro, kde fosforyluje serinový nebo threoninový zbytek. První prolinový zbytek nemusí být striktně vyžadován a jako minimální fosforylační motiv se uvádí sekvence Xxx-Ser/Thr-Pro. Substrátů proteinkinázy ERK, které nespĺňují tuto podmínku, je minimum. Např. proteáza Calpain2 je fosforylována na Ser50 v kontextu Pro-Ser-Phe (Glading *et al.*, 2004; Gonzalez *et al.*, 1991). Dnes známe okolo 200 substrátů (Yoon a Seger, 2006), kdy fosforylací jednoho nebo více Ser/Thr zbytků dochází ke změně substrátové aktivity, lokalizace či stability. Mezi substráty fosforylované proteinkinázou ERK patří také proteinkinázy MEK a Raf a jejich regulační proteiny. Tyto fosforylace jsou zpravidla součástí negativní zpětnovazebné regulace ukončující odpověď na příslušné stimuly.

V klasickém pojetí zprostředkovává signální kaskáda ERK spojnici mezi extracelulárním prostředím a jadernými proteiny, kde reguluje genovou expresi a remodelaci chromatinu. Hlavní skupinu jaderně lokalizovaných substrátů tvoří transkripční faktory, zejména ty, které se účastní regulace tzv. genů časně odpovědi (immediate early genes; IEG). K jejich aktivaci dochází během několika minut po stimulaci. Mezi nejlépe prostudované patří Elk-1, c-Fos, Fra-1, c-Jun či c-Myc. Proteinkináza ERK fosforylací svých jaderných substrátů podporuje diferenciaci buněk, vstup do buněčného cyklu, ale také apoptózu (Karin *et al.*, 1997; Marais *et al.*, 1993; Whitmarsh a Davis, 1996). Lokalizace proteinkinázy ERK a asociace s dalšími proteiny včetně tzv. „scaffold“ proteinů, adaptorů, regulačních proteinů a efektorových substárů proteinkinázy ERK určují délku a intenzitu signálu, a tím vzniká výsledná buněčná odpověď.

Vedle jaderných substrátů fosforyluje proteinkináza ERK také řadu cytoplasmatických proteinů, mezi které patří fosfolipázy, cAMP fosfodiesterázy, MAPK-interagující kinázy (MNK; MAPK-interacting kinase), cytoskeletální proteiny,

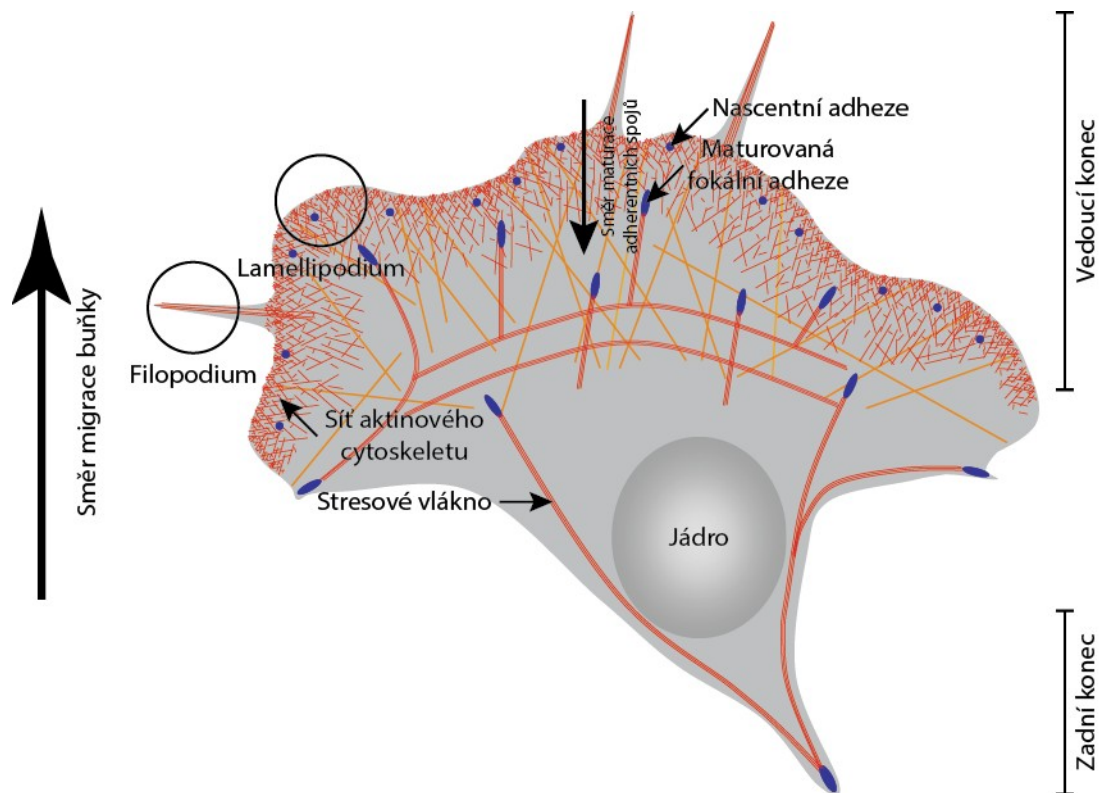
komponenty regulační mašinerie buněčného cytoskeletu či proteiny fokálních adhezí (Cargnello a Roux, 2011; Rubinfeld a Seger, 2005). Důležitým cytoplasmatickým substrátem je Ser/Thr proteinkináza p90^{RSK} (dále jako RSK). Dnes známe okolo 50 cytoplasmatických a jaderných substrátů proteinkinázy RSK, které jsou fosforylovány v aminokyselinovém motivu Arg/Lys-Xxx-Arg-Xxx-Xxx-Ser/Thr nebo Arg-Arg-Xxx-Ser/Thr (Leighton *et al.*, 1995; Romeo *et al.*, 2012). Stejně jako proteinkináza ERK je proteinkináza RSK důležitou efektorovou proteinkinázou, která prostřednictvím fosforylace konkrétních substrátů řídí specifickou buněčnou odpověď. Přítomnost dvou efektorových proteinkináz v rámci jedné signální dráhy nebyla dlouho zcela srozumitelná. Až nedávné studie ukazují, že během stimulace signální kaskády ERK spolu obě efektorové proteinkinázy koordinovaně řídí vznik specifické buněčné odpovědi (Caslavsky *et al.*, 2013; Murphy *et al.*, 2002). Souhra mezi proteinkinázou ERK a RSK tak poskytuje další stupeň regulace v rámci signální kaskády ERK.

Jedním z podstatných dějů, na kterých se podílí signální kaskáda ERK, je buněčná migrace, založená z principu na remodelaci aktinového cytoskeletu. Popsané mechanismy vstupu proteinkinázy ERK do přestavby aktinového cytoskeletu spočívají zejména v regulaci malých Rho GTPáz a jejich signálních drah nebo tvorbě vazebných míst pro aktin-remodelační proteiny.

2.3. Model migrace samostatných buněk

Pohyb samostatných buněk, který je založen na kombinaci tažných a tlačných sil, můžeme pozorovat u řady mezenchymálních buněk, jako např. u savčích fibroblastů. Pro tento typ migrace je zcela nezbytná přesná a efektivní remodelace aktinového cytoskeletu, který poskytuje mechanickou energii pro pohyb. Síly, které jsou generovány aktinovým cytoskeletem, mohou být přeměněny pro pohyb po podkladu, pouze pokud je k němu buňka připojena. K tomu slouží soubor fokálních adhezí, popř. dalších struktur, který propojí podklad s aktinovým cytoskeletem a jeho následná remodelace umožňuje pohyb buňky vpřed (Le Clainche a Carlier, 2008). Buňka začíná migrovat zpravidla v reakci na vnější podněty (např. růstové faktory), podle kterých se buňka polarizuje a získává typický kónický tvar s odlišitelným vedoucím a zadním koncem (Obr. 7). Vedoucí konec má několik morfologicky odlišných částí. V centrální části vedoucího konce se nachází lamellipodium tvořené hustou aktinovou sítí pod plasmatickou membránou. Z lamellipodia vybíhají filopodia – tenké svazky

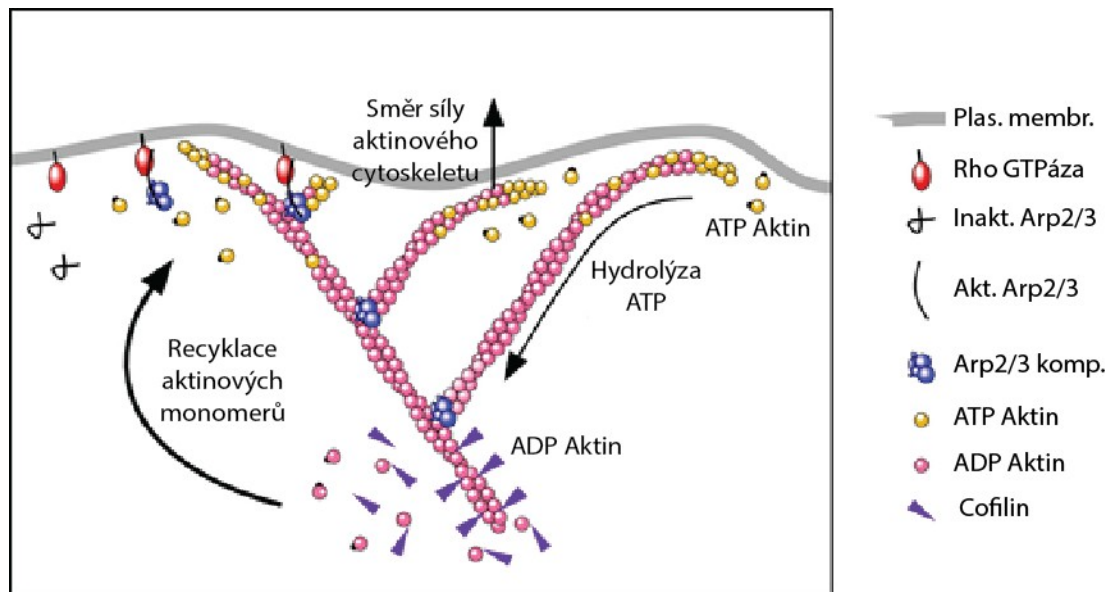
nevětveného aktinu, formující drobné a velmi dynamické protruze (Le Clainche a Carlier, 2008).



Obr. 7: Schéma aktinového cytoskeletu a adherentních struktur u polarizovaného migrujícího fibroblastu. Ve vedoucím konci jsou vyznačeny dvě základní oblasti: filopodium tvořené nevětvenými tenkými aktinovými svazky a lamellipodium tvořené aktinovou sítí. V přední části lamellipodia vzniká nascentní adheze, která může maturovat do struktury fokální adheze. Do fokálních adhezí jsou zakotvena stresová vlákna. Pro zadní část je typická přítomnost dlouhých stresových vláken a v této části nedochází k polymerizaci aktinu. Schéma bylo převzato a upraveno z tohoto zdroje: Le Clainche a Carlier, 2008.

Buněčná migrace je aktin dependentní proces a polymerace aktinu ve vedoucím konci je naprosto nezbytná pro buněčný pohyb. Polymerací většího množství aktinových vláken a jejich větvením vzniká pod plazmatickou membránou membránová protruze (Obr. 8). Aby k tomu došlo, je nejprve nutné vytvořit nukleární centrum, které vzniká vazbou Arp2/3 komplexu (Actin related protein) na již existující aktinové vlákno. Komplex Arp2/3 je aktivován proteiny WASP/WAVE (Wiskott-Aldrich syndrome proteins/WASP family Verprolin homologous protein) a indukuje polymeraci větveného aktinu pod plazmatickou membránou, kterou tlačí před sebou. Po určité době může být polymerace ukončena proteiny stabilizujícími konec aktinového vlákna, tzv.

„capping“ proteiny, nebo degradováno pomocí cofilinu zpět na monomerní aktin (Pollard a Cooper, 2009; Watanabe, 2010).



Obr. 8: Znázornění obratu aktinového cytoskeletu ve vedoucím konci migrujícího fibroblastu. Po aktivaci malých Rho-GTPáz dochází k aktivaci Arp2/3 komplexu a k vytvoření nukleačního centra. Arp2/3 komplex indukuje polymeraci větveného aktinového vlákna z monomerního ATP-aktinu. Po hydrolýze ATP může být aktinové vlákno degradováno a aktinové monomery recyklovány. Schéma bylo převzato a upraveno z tohoto zdroje: <http://www.dayel.com>.

V přední části buněčné protruze dochází ke vzniku kontaktu mezi buňkou a extracelulárním substrátem pomocí nascentních adhezí. Vznik nascentních adhezí je iniciován shluknutím α a β integrinů, které se váží k extracelulárnímu substrátu. Následně tyto adheze spojují aktin s integriny pomocí dalších proteinů, jako je např. vinculin, talin, tensin nebo paxillin. Tyto nascentní adheze jsou v průběhu migrace buď degradovány, nebo jsou obohacovány o další proteiny a maturují do podoby fokálních adhezí. Fokální adheze jsou v porovnání s nascentními adhezemi rozsáhlé struktury, do kterých jsou ukotvena stresová vlákna (Nagano *et al.*, 2012).

Fokální adheze v přední části buňky slouží především jako opěrné body aktinového cytoskeletu při vzniku protruze, ale podílejí se také na přitažení zadního konce buňky stresovými vlákny. Stresová vlákna vznikají z paralelně orientovaných 10-20 aktinových vláken pospojovaných α -actininem a myosinem (Tojkander *et al.*, 2012). Důležitou vlastností stresových vláken je schopnost generovat kontraktilní síly. Po fosforylaci myosinu proteinkinázou MLCK dochází ke kontrakci stresových vláken

a ke generování tažné síly, která přitáhne zadní konec buňky (Burton *et al.*, 1999; Totsukawa *et al.*, 2004).

Buněčná migrace se ve výsledku skládá z několika po sobě se opakujících kroků. Nejprve dochází ke vzniku membránové protruze ve vedoucím konci, na jejíž špičce vzniká kontakt se substrátem, a k zakotvení aktinového cytoskeletu. Následně dochází k zesílení kontaktu, stabilizaci aktinových svazků a k navázání molekul generujících sílu (myosinu apod.). Poté dochází ke kontrakci aktinových svazků, degradaci fokálních adhezí v zadní části buňky a posunu vpřed (Friedl, 2004; Lauffenburger a Horwitz, 1996).

2.4. Rho GTPázy a jejich efektorové proteiny

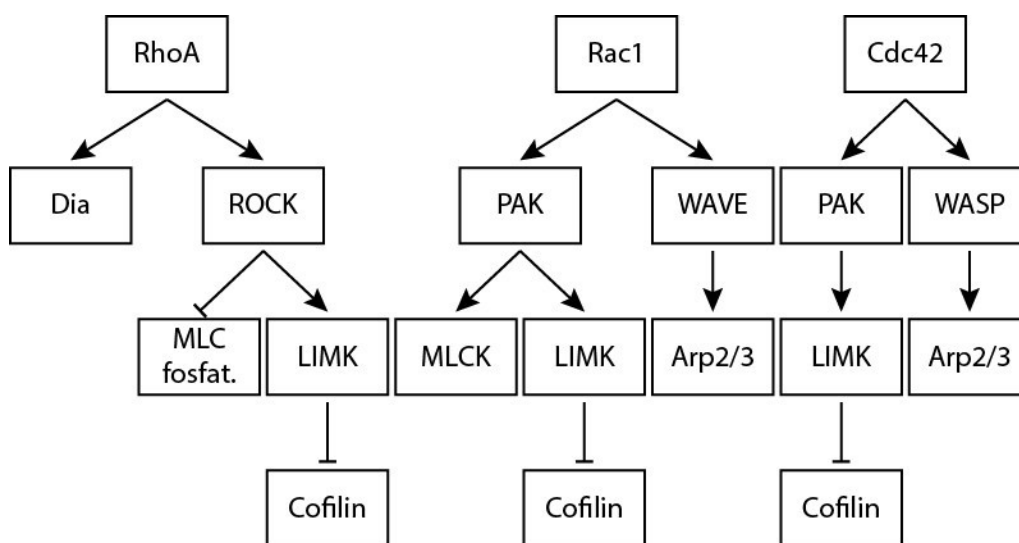
Rho GTPázy patří mezi hlavní regulátory aktinového cytoskeletu během všech biologických procesů včetně buněčné migrace. Dnes patří mezi nejlépe prostudované tři GTPázy RhoA, Rac1 a Cdc42 (Bustelo *et al.*, 2007). Jejich aktivací dochází k regulaci jejich efektorových proteinů (Obr. 9) a k tvorbě funkčně a strukturně odlišných aktinových struktur.

GTPázy Rac1 a Cdc42 mají některé společné nebo evolučně příbuzné efektorové proteiny. Aktivací WASP/WAVE dochází k aktivaci a tvorbě Arp2/3 komplexu a následné polymeraci aktinového cytoskeletu. Stabilita aktinových struktur je regulována proteinkinázou PAK, která aktivuje proteinkinázu LIMK a ta následně brání depolymeraci aktinu fosforylací cofilinu (Bishop a Hall, 2000). Rac1 GTPáza je spojována zejména s tvorbou lamellipodia, Cdc42 GTPáza s tvorbou filopodií (Hall, 1998).

Mezi důležité přímé efektorové proteiny RhoA GTPázy patří forminy rodiny DRF (Diaphanous-related formin – mDia1-3), které po své aktivaci polymerují aktin do dlouhých nevětvených vláken. Dalším významným efektozem RhoA GTPázy je proteinkináza ROCK, která aktivuje proteinkinázu LIMK a myosin fosfatázu. Aktivací proteinkinázy LIMK dochází ke zvýšení stability aktinových vláken a aktivací myosin fosfatáz ke zvýšení akto-myosinové kontraktility (Amano *et al.*, 2001; Maekawa *et al.*, 1999). RhoA GTPáza a její signální dráha se podílí zejména na regulaci stresových vláken (Hall, 1998).

Rho GTPázy se podílejí na výstavbě dalších aktinových struktur, které jsou typické pro epitelální buňky. Tyto struktury jsou kritické pro formování a udržení

epiteliální polaritu, mezibuněčných spojů a tvaru buněk. Tím se stává aktinový cytoskelet zcela nepostradatelný pro funkci a morfologii epitheliálních buněk.



Obr. 9: Znázornění hierarchie v Rho-GTPázových drahách. Rho GTPáza indukuje polymeraci aktinového cytoskeletu aktivací proteinu Dia. Rac1 a Cdc42 využívají k iniciaci polymerace aktinu komplex Arp2/3, který je aktivován proteiny WASP/WAVE. Rho GTPázy v komplexu s GTP inhibují skrze své efektorové proteiny protein cofilin, který se účastní depolymerace aktinových vláken.

2.5. Aktinový cytoskelet v epitheliálních buňkách

Epitheliální tkáň je tvořena polarizovanými buňkami se strukturně a funkčně odlišenou apikální a bazo-laterální stranou. Svou bazální membránou jsou ukotveny k substrátu, naopak jejich apikální strana je vystavena vnějšímu prostředí. Navíc jsou buňky vzájemně propojeny souborem mezibuněčných spojů. Mezi důležité mezibuněčné struktury, které se podílí na soudržnosti sousedních buněk, patří adherentní spoje, těsné spoje a dezmozomy. Stejně jako migrující buňky fibroblastů (popř. také dalších mezenchymálních buněk), tak také epitheliální buňky mají stresová vlákna i dendriticky polymerující aktin, které jsou nutné pro morfologii a funkci epithelu. Aktin v epitheliálních buňkách tvoří další struktury, které jsou kritické pro formování a udržení epitheliální polaritu, mezibuněčných spojů a tvaru buněk.

Aktin hraje důležitou úlohu při tvorbě adherentních spojů, které jsou lokalizovány podél laterální membrány epitheliálních buněk. Nedílnou součástí adherentních spojů je transmembránový protein E-cadherin (epitheliální cadherin), kde extracelulární domény cadherinových molekul homotypicky interagují za vzniku mezibuněčných spojů. Intracelulární doména poskytuje množství vazebných domén pro

regulační nebo strukturní proteiny podílejících se na stabilitě mezibuněčného kontaktu. Jedním z důležitých stabilizačních prvků mezibuněčných spojů je jejich asociace s kortikálním aktinem. Tato struktura je součástí tzv. laterálního aktinu, kdy termínem „laterální aktin“ je souhrnně označována aktinová struktura po celé laterální membráně epiteliální buňky. Laterální aktin je k adherentním molekulám E-cadherinu vázána přes komplex α/β cateninů. Propojení mezibuněčných kontaktů s laterálním aktinem udržuje integritu epitelu a podílí se na stabilizaci epiteliální polarity (Gooding *et al.*, 2004; Halbleib a Nelson, 2006).

Druhou zcela esenciální strukturou pro funkci epitelu jsou těsné spoje, které se nacházejí apikálně od adherentních spojů. Strukturní proteiny ZO-1 (Zona occludens protein 1), claudiny nebo occludin vytvářejí mezi buňkami spojení, díky kterému je vrstva epiteliálních buněk schopna v organismu oddělit vnější a vnitřní prostředí. Zároveň jsou těsné spoje společně s laterálním aktinem důležité pro ustanovení a udržení apiko-bazální polarity (Anderson a Van Itallie, 2009; Shin *et al.*, 2006).

Další strukturou mezibuněčných spojů jsou dezmozomy. Jedná se o bodové propojení epiteliálních buněk za pomoci cadherinů. Do těchto spojů jsou za pomoci desmoplakinů zakotvena intermediální filamenta. Tím dezmozomy napomáhají odolávat mechanickým silám působícím na epiteliální buňky (Garrod a Chidgey, 2008).

Při subkonfluentní kultivaci vytvářejí buňky epitelu oddělené kruhové kolonie. Za těchto podmínek kultivace jsou okrajové buňky v kolonii ohraničeny dominantní strukturou silného aktinového svazku označovaného jako periferní (supracelulární) aktin. Jedná se o kontraktilní strukturu, která obepíná celou kolonii a je pravděpodobně zakotvena ve fokálních adhezích (Reffay *et al.*, 2014; Ridley *et al.*, 1995). Tato supracelulární aktinová struktura se podílí na kolektivní migraci epiteliálních buněk při vyplňování mezer v epitelu, např. při hojení ran. Tento proces, v anglicky psané literatuře nazývaný „purse string closure“, je regulován GTPázou Rho a jejím efektoem ROCK a vyžaduje akto-myosinovou kontraktilitu. Při tomto způsobu migrace buňky nevyužívají aktinové polymerace a tvorbu protruzí k migraci, ale buněčný pohyb je pasivní a zajišťují ho kontraktilní síly generované akto-myosinovými supracelulárními svazky (Anon *et al.*, 2012; Bement *et al.*, 1993; Nobes a Hall, 1995). Velmi recentní publikace ukazuje i na další funkci periferního aktinu. Bylo ukázáno, že periferní aktin koordinuje jednotný pohyb epitelu při migraci do uměle vytvořené mezery v epitelu. Lokální přerušování periferního aktinu laserovou ablací způsobí vycestování takto

uvolněné buňky do mezery a předběhnutí epitelu (Reffay *et al.*, 2014). Nicméně mechanismus regulace periferního (supracelulárního) aktinu není zcela znám.

Migrace epiteliálních buněk je výrazně omezena přítomností mezibuněčných spojů, které za normálních podmínek znemožňují individuální migraci mimo vrstvu epitelu. Buňky tak využívají k nucenému přesunu kolektivní migraci, při které jsou mezibuněčné kontakty zachovány, a celá skupina buněk vykazuje stejný směr migrace. Buňky epitelu také využívají řízenou konverzi na buňky morfologicky a funkčně připomínající mezenchymální buňky. V takovém případě dochází u buněk epitelu ke ztrátě apiko-bazální polarity, rozpadu mezibuněčných spojů a uvolnění samostatných buněk schopných individuální migrace. Ačkoliv účast signální kaskády ERK byla popsána v kolektivní i individuální migraci, zdá se, že je preferenčně spojena s odstraněním mezibuněčných kontaktů a podporou samostatné migrace (Lamouille *et al.*, 2014; Matsubayashi *et al.*, 2004; Schramek *et al.*, 2003).

2.5.1. Kolektivní migrace epiteliálních buněk

Kolektivní migrace je epiteliálními buňkami využívána v řadě fyziologických a patologických dějů, jako je morfogeneze, regenerace poškozených tkání nebo také metastatických procesů (Friedl *et al.*, 2004). Kolektivně migrující epiteliální buňky využívají dva základní mechanismy migrace. První možností je, že se na migraci aktivně podílí většina, nebo velké množství buněk, kdy všechny vykazují stejný směr pohybu. Druhou možností je, že směr migrace určuje jedna buňka, která aktivně migruje, a ostatní buňky tuto vedoucí buňku následují. Oba způsoby kolektivní migrace - aktivní migrace všech buněk, nebo ustanovení vedoucí buňky, mohou být buňkami využívány ve stejných fyziologických, popř. patofyziologických procesech.

V případě 2D uspořádání experimentu, kdy byl epitel záměrně poškozen vytvořením rýhy v buněčném epitelu, bylo pozorováno, že buňky v bezprostřední blízkosti poškození vytvořily souvislé lamellipodium směrem do vzniklé mezery. Nicméně buňky, které nebyly přímo na okraji rýhy, vykazovaly stejným směrem orientované lamellipodium, které vytvořily pod sousední buňkou (Farooqui a Fenteany, 2005). Tyto výsledky naznačují, že během kolektivní migrace nejsou buňky epitelu pouze pasivně taženy buňkami na okraji, ale že celý epitel se aktivně podílí na migraci. Nicméně přesný mechanismus není znám.

V případě kolektivní migrace epiteliálních buněk, iniciované ustanovením vedoucí buňky (leader cell; tip cell), je zřejmé, že vedoucí buňky vykazují odlišnou regulaci Rho-GTPáz. Vedoucí buňky mohou mít vyšší aktivitu Rac1 GTPázy v přední části vedoucí buňky a/nebo sníženou aktivitu dráhy Rho-ROCK. Vedoucí buňky vykazují vyšší dynamiku aktinového cytoskeletu a organizace aktinu je podobná migrujícím mezenchymálním buňkám (Lebreton a Casanova, 2014; Omelchenko *et al.*, 2003).

2.5.2. Individuální migrace epiteliálních buněk

Fenotyp epiteliálních buněk je relativně plastický, z tohoto důvodu mohou podstoupit sérii kroků, které vedou k získání autonomie v procesu epiteliálně mezenchymální transice (EMT; epithelial-mesenchymal transition). Během EMT buňky ztrácí apiko-bazální polaritu, mezibuněčné spoje, dochází ke změnám v genové expresi a dochází i ke změnám v jejich cytoskeletu, které vedou ke změnám buněčného tvaru. Získáním individuality a aktivací promigračních genů se zvyšuje migrační potenciál buněk, které využívají mechanismus pohybu pozorovaný u fibroblastů. Stejně jako kolektivní migrace, hraje i individuální migrace epiteliálních buněk důležitou úlohu v řadě fyziologických i patofyziologických procesů, jako jsou buněčné přesuny v raném embryonálním vývoji, přesuny buněk epitelu do míst s poškozenou tkání nebo proces uvolňování transformovaných buněk z oblastí primárních nádorů (Christiansen a Rajasekaran, 2006).

V některých případech může být průběh získání individuality epiteliálních buněk popisován jako EMT-podobný (EMT-like) proces. EMT jako taková je často popisována jako soubor změn, při kterém buňky zcela přijdou o své epiteliální znaky vyvolané transkripčními faktory asociovanými s EMT: SNAIL, SLUG, ZEB nebo TWIST (Sanchez-Tillo *et al.*, 2012). V EMT-podobném procesu může dojít pouze k potlačení funkce některého z epiteliálních znaků. Např. jednou z vlastností EMT je kompletní (popř. téměř úplná) ztráta exprese E-cadherinu, zatímco v EMT-podobném procesu může dojít pouze k jeho internalizaci z plasmatické membrány do cytosolického prostoru, čímž ztratí svou funkci (Caslavsky *et al.*, 2013).

2.6. Signální kaskáda ERK řídí migraci individuálních buněk regulací Rho-GTPáz a jejich drah

Ukazuje se, že signální kaskáda ERK je schopna vstoupit do regulace aktinového cytoskeletu v klíčových krocích buněčné migrace. Zasahuje do vzniku buněčné protruze v lamellipodiu, přestavby stresových vláken a regulace fokálních adhezí.

Ve vedoucím konci se ukazuje, že proteinkináza ERK reguluje polymeraci dentritického aktinu a podporuje vznik buněčné protruze. ERK fosforyluje a aktivuje proteiny WAVE a Abi1, klíčové proteiny podílející se na polymeraci a větvení aktinu na vedoucím konci. Fosforylace těchto proteinů pravděpodobně podporuje konformační změny WAVE komplexu vyvolané Rac1 GTPázou a následně vede k vazbě Arp2/3 komplexu (Mendoza *et al.*, 2011). Formování lamellipodia může být dále podpořeno interakcí proteinkinázy ERK a proteinu CdGAP, který je následně fosforylován a inhibován. Protein CdGAP patří mezi negativní regulátor GTPázy Rac1 a působí proti formování vedoucího konce včetně lamellipodia a membránových protruzí (Kurokawa *et al.*, 2004; Lamarche-Vane a Hall, 1998; Tcherkezian *et al.*, 2005).

S rozpadem fokálních adhezí souvisí i přestavba stresových vláken, které jsou aktivně remodelovány během buněčné migrace. Stresová vlákna jsou stabilizována zakotvením ve fokálních adhezích a rozpad fokálních adhezí má tedy za následek i rozpad stresových vláken. Nicméně rozpad stresových vláken může být podmíněn také přímo, a to inhibicí proteinkinázy ROCK a snížením akto-myosinové kontraktility. Ukazuje se, že konstitutivní aktivace signální kaskády ERK vede k redukcí množství nebo i ke kompletní ztrátě stresových vláken (Pawlak a Helfman, 2002a, b). Jsou známy dva mechanismy, kterými proteinkináza ERK vstupuje do Rho-GTPázové dráhy a způsobuje disrupci stresových vláken. Buď může dojít ke snížení exprese proteinkinázy ROCK (Pawlak a Helfman, 2002b), nebo může být zabráněno interakci mezi proteinkinázou ROCK a jejími substráty (Sahai *et al.*, 2001). Překvapivé je, že inaktivace genu kódujícího B-Raf vede také ke snížení počtu stresových vláken skrze dráhu Rho/ROCK (Pritchard *et al.*, 2004). Tento výsledek naznačuje, že signální kaskáda ERK může mít na stresová vlákna dvojitý efekt.

Jedním z nejdůležitějších dějů, kterým dráha ERK kontroluje buněčnou migraci, je regulace dynamiky fokálních adhezí. Signální kaskáda ERK zasahuje do regulace fokálních adhezí ve dvou protichůdných krocích – indukuje rozpad fokálních adhezí a paradoxně také dokáže fokální adheze stabilizovat. V případě maturace a stabilizace

adhezí je znám mechanismus tohoto děje. První fáze vzniku fokálních kontaktů jsou pod kontrolou GTPáz Rac1 a Cdc42, ale RhoA GTPáza je zde inhibována. Avšak pro maturaci fokálních adhezí a tvorbu kontraktálních stresových vláken je zcela esenciální, aby byla RhoA GTPáza aktivována (Rottner *et al.*, 1999). Integriny aktivovaná proteinkináza ERK fosforyluje protein p190-RhoGAP na jeho C-terminální části. Tato fosforylace inhibuje protein p190-RhoGAP a umožňuje aktivitu RhoA GTPázy a maturaci fokálních struktur (Pullikuth a Catling, 2010). Opačný děj, rozpad fokálních adhezí, je esenciální pro buněčnou migraci. Sledování dynamiky fokálních adhezí v reálném čase ukázalo, že jejich rozpad je kontrolován proteinkinázami ERK a MLCK. Jelikož proteinkináza ERK fosforyluje proteinkinázu MLCK, předpokládá se, že aktivace proteinkinázy MLCK vede následně k rozpadu fokálních adhezí na přední části buňky (Webb *et al.*, 2004). K rozpadu fokálních adhezí je nutné, aby aktivní ERK byla přítomna v adhezivních placích (Vomastek *et al.*, 2007). Molekulární mechanismus, kterým ERK reguluje rozpad adhezí, není znám.

V regulaci buněčné migrace může signální kaskáda ERK také využívat cílenou degradaci proteinů. Bylo ukázáno, že proteinkináza ERK je schopna asociovat a přímo fosforylovat proteázu calpain2 v pozici Ser50 a indukovat tak její aktivaci (Glading *et al.*, 2004). Aktivní proteáza calpain rozpoznává a degraduje některé komponenty fokálních adhezí, což vede k odstranění nepotřebných kontaktů mezi buňkou a podkladem. Do současné doby byla popsána přímá asociace a proteolytická degradace několika proteinů fokálních adhezí, mezi které patří např. talin nebo proteinkináza FAK (Carragher *et al.*, 2003; Franco a Huttenlocher, 2005). Kromě rozpadu fokálních adhezí by se proteáza calpain mohla podílet na remodelaci aktinového cytoskeletu během migrace proteolytickým štěpením GTPázy RhoA či důležitého regulačního proteinu GTPázy Rac1, proteinu Tiam1 (Kulkarni *et al.*, 2002; Woodcock *et al.*, 2009). Tímto způsobem proteáza calpain může podporovat obrat fokálních adhezí a reorganizovat aktinový cytoskelet během buněčného pohybu.

Signální kaskáda ERK se tedy podílí na optimalizaci migrace buněk. Buňka ji může využívat, a také ji využívá, během migrace pro remodelaci aktinového cytoskeletu. Regulací malých Rho GTPáz a jejich drah podporuje mnohé kroky v buněčné migraci od regulace fokálních adhezí až po výstavbu různých aktinových struktur. V případě epitelálních buněk však musí dojít k dalším aditivním procesům, než začnou samostatně migrovat. Jedná se hlavně o ztrátu epitelální polarity a rozpad

epitelu na jednotlivé buňky. Tyto procesy jsou úzce spojeny s reorganizací laterálního i periferního aktinu.

2.7. Signální kaskáda ERK řídí reorganizaci aktinového cytoskeletu během rozpadu epitelu na jednotlivé buňky

Mezibuněčné kontakty epiteliálních buněk jsou za standardních podmínek stabilizovány asociací s laterálním aktinovým cytoskeletem na laterální membráně. Jeho funkce spočívá nejen ve správné organizaci adherentních spojů, ale zároveň se ukazuje, že má podíl na udržení integrity jednovrstevného epitelu (Caslavsky *et al.*, 2013; Vasioukhin *et al.*, 2000). Aktivace signální dráhy ERK růstovými faktory nebo aktivovanými protoonkogeny Src, Ras nebo Raf vedou k významným morfologickým změnám, které jsou doprovázeny ztrátou epiteliální polarity, rozpadem mezibuněčných kontaktů a zahajením individualní buněčné migrace. Tyto morfologické změny jsou zároveň doprovázeny významnou reorganizací kortikálního, laterálního a periferního aktinu. Inhibice signální kaskády ERK během působení těchto faktorů efektivně zabrání remodelaci aktinového cytoskeletu a udrží organizaci mezibuněčných spojů epiteliálních buněk. To naznačuje, že signální kaskáda ERK je klíčovou signální dráhou účastnící se přestavby aktinového cytoskeletu během konverze epiteliálních buněk na buňky samostatně migrující (Guarino, 2010; Lamouille *et al.*, 2014; Lu *et al.*, 2004).

Nicméně je stále málo známé, jakým způsobem se signální kaskáda ERK účastní remodelace aktinového cytoskeletu, který je součástí mezibuněčných spojů. Avšak zdá se, že stejně jako v případě migrace, bude i u regulace laterálního aktinu hrát hlavní podíl regulace skrze Rho GTPázové dráhy.

Studium Rho GTPáz ukázalo, že aktivita GTPázy Rac1 je esenciální pro tvorbu a výstavbu laterálního aktinového cytoskeletu. Ztráta její aktivity vede k morfologickým změnám epiteliálních buněk, k rozpadu epiteliální tkáně a k zeslabení laterálního aktinu (Kuroda *et al.*, 1997; Takaishi *et al.*, 1997). Ukazuje se, že signální kaskáda ERK inhibuje GTPázu Rac1. Toto je podmíněno ztrátou exprese proteinu Tiam1 (GEF protein pro Rac1), dochází ke ztrátě aktivity Rac1 GTPázy a naopak je posílněna aktivita GTPázy Rho. Tato deregulace GTPáz vede ke kompletní ztrátě epiteliálních vlastností a k rozpadu epitelu (Zondag *et al.*, 2000). Paradoxně v jiném buněčném modelu se ukázalo, že inhibice GTPázy Rho také vede k rozpadu epitelu (Sahai a Marshall, 2002).

Stejně jako v případě regulace buněčné migrace se ukazuje, že proteolytická degradace může hrát roli v regulaci laterálního aktinu a doplnit výše zmíněné mechanismy. Inhibice proteázy calpain při současné aktivaci signální kaskády ERK účinně zablokovala reorganizaci laterálního aktinového cytoskeletu během ztráty epiteliální polarity (Caslavsky *et al.*, 2013). Tyto výsledky naznačují, že by signální kaskáda ERK mohla využívat definované proteolýzy malých Rho GTPáz nebo jejich regulačních proteinů. Jako možný cíl proteázy calpain byl charakterizován GEF protein Tiam1 GTPázy Rac1. Jeho proteolytická degradace a následný pokles aktivity Rac1 GTPázy vede k reorganizaci aktinového cytoskeletu v oblasti mezibuněčných spojů (Woodcock *et al.*, 2009). Bylo také ukázáno, že proteáza Calpain-1 štěpí malou GTPázu RhoA (Kulkarni *et al.*, 2002), což představuje další možný mechanismus v regulaci epiteliálního aktinového cytoskeletu.

Reorganizace laterálního aktinu vyvolaná růstovým faktorem HGF/SF je zároveň doprovázena přestavbou aktinového cytoskeletu na periferii u subkonfluentně narostlých kolonií epiteliálních buněk. Ukazuje se, že tato struktura je pod regulací Rac1 a Cdc42 GTPáz přestavěna do podoby vedoucího konce a za současné přestavby laterálního aktinového cytoskeletu dochází k zisku autonomie (Ridley *et al.*, 1995; Royal *et al.*, 2000). Ukazuje se, že aktin na periferii je, stejně jako kortikální aktin, kontraktilní strukturou (Reffay *et al.*, 2014). Bohužel periferní aktin nepatří mezi studované aktinové struktury a dnes o něm máme pouze velice málo informací.

3. Shrnutí, cíle práce

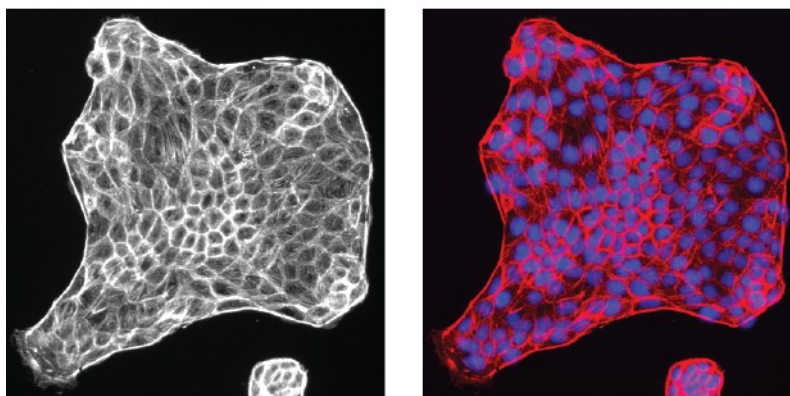
Doposud získané informace ukazují, že změna aktinového cytoskeletu je nutná pro změnu epiteliální integrity vedoucí k zisku buněčné autonomie a k podpoře buněčné migrace. K tomuto ději je nutná aktivita signální kaskády ERK (Caslavsky *et al.*, 2013). Nicméně dnes není známo, zda signální kaskáda ERK reguluje periferní aktin, a pokud tomu tak je, není jasné, která izoforma proteinkinázy ERK se procesu účastní. Proto jsme si pro tento projekt stanovili následující cíle:

1. Stanovit, zdali je periferní aktin regulován signální dráhou ERK. Rozhodli jsme se sledovat změny v periferním aktinu spojené s morfologickými změnami buněk a dokázat, že jsou vyvolány signální kaskádou ERK.

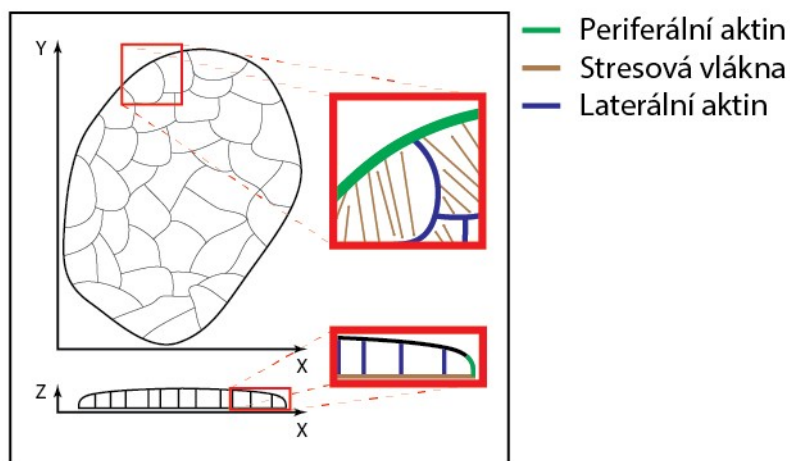
2. Stanovit, zdali je periferní aktin regulován proteinkinázou ERK1 nebo ERK2. V experimentech jsme využili koncept studie (Shin *et al.*, 2010), která ukazuje, že ektopická exprese proteinkinázy ERK1 nebo ERK2 vyvolá v buňkách různé morfologické změny. Tímto přístupem jsme zjišťovali, která izoforma proteinkinázy ERK reguluje periferní aktin a které interakční motivy k tomuto procesu využívá.
3. Stanovit, zdali ERK využívá DBP- či DEF-doménu k reorganizaci aktinových struktur. Stejně jako v bodě 2 jsme využili koncept ektopické exprese proteinkinázy ERK a jejích forem mutovaných v jednotlivých vazebných doménách.

Jako model jsme si zvolili MDCK (Madin-Darby canine kidney) buňky, immortalizované buňky psiho ledvinného jednovrstevného epitelu. Tato buněčná linie je využívána pro studium aktinového cytoskeletu v epiteliálních buňkách, v laboratoři je dlouhodobě zavedena a navíc nám umožňuje efektivní stabilní zavedení a následnou expresi zvolených genů. Při sub-konfluentní kultivaci vykazuje stresová vlákna, laterální a periferní aktin (Obr. 10).

A



B



Obr. 10: Aktinový cytoskelet v koloniích MDCK buněk. [A] Aktinový cytoskelet v MDCK buňkách po 48 hodinách kultivace na skleněném podkladu. Aktinový cytoskelet byl barven pomocí faloidinu konjugovaným s rhodaminem (na snímcích bíle/červeně), jádra byla vizualizovaná pomocí DAPI (modře). [B] Schéma aktinového cytoskeletu v MDCK buňkách, na schématu jsou vyznačeny aktinové struktury popisované v této práci.

4. Materiál a metody

4.1. Materiál

4.1.1. Použité buněčné linie a kultury

Pro účely této diplomové práce byly použity MDCK buňky (Madin-Darby canine kidney). Byly použity geneticky nemodifikované MDCK buňky a linie MDCK buněk, které měly ve svém genomu stabilně vložené geny/konstrukty. Seznam použitých linií MDCK buněk je v tabulce níže. Jejich příprava je uvedena v kapitole 4.3. Příprava stabilních linií.

Linie MDCK buněk	Vložená DNA sekvence	Popis linie
Parentální MDCK	---	Nemodifikovaná linie MDCK buněk (Tissue culture core facility, University of Virginia)
pFRT MDCK	FRT rekomb. místo	Linie MDCK buněk se zaneseným FRT-rekombinačním místem bez dalšího genu (Čáslavský <i>et al.</i> 2013)
Δ Raf-1:ER MDCK	Δ Raf-1:ER	Linie MDCK buněk s kondicionálně aktivním konstruktem odvozeným od lidské proteinkinázy Raf-1 (Čáslavský <i>et al.</i> 2013)
RFP-actin MDCK	RFP-actin	Linie MDCK buněk s fluorescenčně značeným aktinem; buňky vykazují různou expresi
wt ERK1 MDCK	FLAG-ERK1	Linie MDCK s krysím genem pro proteinkinázu ERK1, na N-terminu FLAG
wt ERK2 MDCK	FLAG-ERK2	Linie MDCK s krysím genem pro proteinkinázu ERK2, na N-terminu FLAG
DDNN ERK2 MDCK	FLAG-DDNN-ERK2	Linie MDCK s krysím genem pro proteinkinázu ERK2, mutace v CD-doméně, na N-terminu FLAG
L232 ERK2 MDCK	FLAG-L232-ERK2	Linie MDCK s krysím genem pro proteinkinázu ERK2, mutace v DBP-doméně, na N-terminu FLAG
HL-ERK2 MDCK	HL-ERK2-ERK2	Linie MDCK s krysím genem pro proteinkinázu ERK2, dimerizačně defektní, na N-terminu FLAG

Pokračování tabulky		
Linie MDCK buněk	Vložená DNA sekvence	Popis linie
wt-Capn2 MDCK	FLAG-wtCapn2	Linie MDCK s lidským genem pro proteázu calpain2, na N-terminu FLAG (příp. J. Čáslavským)
S50E-Capn2 MDCK	FLAG-S50Ecapn2	Linie MDCK s lidským genem pro proteázu calpain2, mutována v pozici Ser50 pro mimikaci fosforylace, na N-terminu FLAG (příp. J. Čáslavským)

Buněčná linie pFRT MDCK vykazuje Zeocinovou rezistenci, odvozené linie mají Hygromycinovou rezistenci

4.1.2. Seznam plasmidů

Jméno plasmidu	Popis
DDNN ERK2 pcDNA3/3.1	Myšší proteinkináza ERK2 s mutací v CD-doméně
DDNN ERK2 pcDNA5	Myšší proteinkináza ERK2 s mutací v CD-doméně, FLAG N-terminálně
HL ERK2 pcDNA3/3.1	Kryší dimerizačně defektní proteinkináza ERK2
HL ERK2 pcDNA5	Kryší dimerizačně defektní proteinkináza ERK2; FLAG N-terminálně
L232 ERK2 pcDNA5	Myšší proteinkináza ERK2 s mutací v DBP-doméně
MEK SD pIRES2-EGFP	Konstitutivně aktivní lidská proteinkináza MEK1 (proteinkináza není fúzována s EGFP)
RACK1 pcDNA5	„Scaffold“ protein RACK1, FLAG N-terminálně
RFP-actin pcDNA5	Aktin N-terminálně fúzovaný s RFP
wt ERK1 pcDNA5	Kryší proteinkináza ERK1, N-terminálně FLAG
wt ERK2 pcDNA5	Kryší proteinkináza ERK2, N-terminálně FLAG

Název plasmidu se skládá z pojmenování genu/genového konstruktů a z typu plasmidu. Označení pcDNA3/3.1 odpovídá plasmidu pcDNA3 nebo pcDNA3.1, není znám jeho přesný typ. Označení pcDNA5 odpovídá plasmidu pcDNA5/FRT

4.1.3. Seznam deoxy-oligonukleotidů

Jméno	Sekvence	Výrobce
Primer "1"	CCAATGGCGGCCGCGGCGGCGGGCCCG	Metabion
Primer "2"	AAAACCTCGAGTTAAGATCTGTATCCTGGC	Metabion

4.1.4. Seznam restrikčních enzymů

Restrikční enzym	Výrobce	Ředění
ApaI	New England Biolabs	1:20
MfeI	New England Biolabs	1:20
NotI-HF	New England Biolabs	1:20
StuI	New England Biolabs	1:20
XhoI	New England Biolabs	1:20

4.1.5. Seznam primárních protilátek

Protilátka	Výrobce	Původ	Řed' (WB)	Řed' (IF)
Cofilin	BD Transduction Laboratories	Myš	1:1 000	---
E-cadherin	BD Transduction Laboratories	Myš	---	1:100
ERK1	Santa Cruz	Králík	1:1 000	---
ERK1/2	Cell Signalling	Myš	1:1 000	---
ERK2	poskytnul J.M.Weber (clone B3B9)	Myš	1:5 000	---
FAK	Upstate Biotechnology	Myš	1:1 000	---
FLAG (M2)	Sigma	Myš	1:1 000	---
Paxillin	Upstate Biotechnology	Myš	---	1:100
P-Cofilin (S3)	Cell Signalling	Králík	1:1 000	---
P-ERK1/2 (TEY motiv)	poskytnul J.M.Weber	Králík	1:1 000	---
P-RSK (S221)	RD Systems	Králík	1:1 000	---
RSK	BD Transduction Laboratories	Myš	1:1 000	---
FLAG M2 Affinity gel	Sigma	Myš	---	---
Phalloidin-rhodamine	Invitrogen		---	1:50

FLAG M2 Affinity gel byl používán pro imunoprecipitaci
WB = western blot, IF = imuno fluorescence

4.1.6. Seznam sekundárních protilátek

Protilátka	Výrobce	Původ	Ředění
Sek. protilátka proti myšší protilátce konj. s HPR	Sigma	Koza	1:10 000
Sek. protilátka proti králičí protilátce konj. s HPR	Sigma	Koza	1:5 000
Sek. protilátka proti myšší protilátce; IR DYE 680RD	Li-cor	Koza	1:10 000
Sek. protilátka proti králičí protilátce; IR DYE 800CW	Li-cor	Koza	1:10 000
Sek. protilátka proti myšší protilátce; Alexa fluor 488	Invitrogen	Koza	1:200

4.1.7. Seznam použitých inhibitorů

Jméno	Funkce	Výrobce	Používaná koncentrace
CI1040	MEK1/2 inhibitor	Selleckchem	2 μ M

4.1.8 Ostatní materiál

Jméno	Popis	Výrobce	Ředění
4-hydroxytamoxifen	Aktivace Δ Raf-1:ER konstruktů	Sigma	1 μ M
HGF/SF	Růstový faktor	Sigma	100 ng/ml

4.2. Metody

4.2.1. Kultivace MDCK buněk

MDCK buňky byly kultivovány při 37°C v DMEM médiu (Dulbecco's Modified Eagle Medium; Sigma), s 10% FBS (fetal bovine serum; Gibco), v atmosféře obsahující 5% CO₂. Buňky byly pasážovány jednou za 2-3 dny tak, aby nepřesáhly konfluenci 80%. Buňky byly nejprve opláchnuty v PBS (137mM NaCl, 2,7mM KCl, 10mM Na₂HPO₄, 1,8mM KH₂PO₄, pH=7.3) a následně po dobu cca 7 minut trypsinizovány (popř. do doby jejich uvolnění od podkladu v závislosti na linii MDCK buněk; 0,05% trypsin v PBS). Následně byly buňky naředěny na finální koncentraci přibližně 40000 buněk/ml.

Stabilní linie MDCK buněk (viz kap. 4.3. Příprava stabilních linií) nesly hygromycinovou rezistenci a byly udržovány v médiu s hygromycinem (Invitrogen) o

finální koncentraci 200 µg/ml. Minimálně 7 dní před vyšetím buněk pro experimentální účely byly stabilní linie MDCK buněk kultivovány v médiu bez antibiotika. Antibiotikum měnilo morfolonii MDCK buněk nezávisle na vloženém genu/konstruktu. Po sedmi dnech bez přítomnosti antibiotika získaly buňky zpět svou morfolonii typickou pro danou stabilní linii.

4.2.2. Transfekce MDCK buněk

Pro přípravu stabilních linií byla pro transfekci buněk použita transfekční reagentie Lipofectamine2000 (Invitrogen), pro transientní transfekce buněk pak transfekční reagentie PolyFect (Qiagen). Při transfekci byl přesně dodržen postup výrobce (Polyfect - protokol pro COS-7, NIH/3T3, CHO buňky). Pokud není zmíněno jinak, byly buňky transfekovány nejdříve 36 hodin od vyšetí, kdy dosáhly konfluencie přibližně 25%. Po 6-12ti hodinách od transfekce bylo medium s transfekční směsí vyměněno za čerstvé medium.

4.2.3. Stimulace/inhibice signálních drah v MDCK buňkách

Příslušné reagentie byly k buněčné kultuře přidány vždy s novým médiem (ve kterém byly reagentie rozpuštěny). V případě současného použití 4HT (popř. HGF/SF) a inhibitorů byly buňky nejprve kultivovány pouze s inhibitorem po dobu 30 min. a následně bylo k buňkám přidáno medium obsahující jak inhibitor, tak i 4HT (resp. HGF/SF). Uváděné časové intervaly (pokud není zmíněno jinak) jsou uváděny od okamžiku přidání 4HT (HGF/SF), popř. s příslušnými aditivními reagentiemi.

4.2.4. Příprava vzorků pro SDS-PAGE, SDS PAGE elektroforéza

MDCK buňky byly 2x opláchnuty vychlazeným (4°C) roztokem PBS a následně lyzovány v RIPA-pufriu (50mM Tris-HCl o pH 7,4, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 1% deoxycholát, 0,1% SDS, 1mM EDTA, pH=7.3). Pro lyzi buněk o konfluenci 50% na Petriho misce o Ø 6 cm bylo použito 200 µl předchlazeného RIPA pufriu. Po 20 minutách inkubace na ledu byl lyzát centrifugován a odebrán supernatant (přibližně 75% celkového objemu). U lyzátu (supernatantu) byla změřena koncentrace oproti standardům BSA v RIPA pufriu (BCA protein assay kit, Pierce; postup podle návodu výrobce). Následně byl lyzát smíchán s Laemmliho vzorkovým pufriem (50mM Tris-HCl pH 6,8, 2% SDS, 10% glycerol, 1% β-merkatpoethanol, 12,5mM EDTA, 0,02%

bromfenolová modř) v poměru 4:1 (supernatant:Laemmli pufr) a po dobu 10 minut povařen při 100°C.

V případě imunoprecipitace byly buňky kultivovány na Petriho miskách o Ø 10 cm do konfluency max. 60% (min. 48 hodin kultivace od vysetí) a po opláchnutí v PBS byly buňky lyzovány ve FLAG-puftru (50mM Tris-HCl, 150mM NaCl, 1% Triton X-100, 10% glycerol, 0,5mM EDTA, 0,5mM EGTA o pH 7,3). Následně byl lyzát centrifugován, a odebraný supernatant byl po dobu 1,5 hod inkubován s Anti-FLAG protilátkou navázanou na agarózových kuličkách (Anti-Flag M2 affinity gel; Sigma) při 4°C. Poté byly nenavázané proteiny odstraněny od Anti-FLAG agarózových kuliček několikanásobným oplachem ve FLAG-puftru a centrifugací. Následně byl k navázaným proteinům na protilátce přidán FLAG-pufr, Laemmliho vzorkový pufr (v poměru 4:1) a připravený lyzát byl povařen při 100°C po dobu 10 minut.

4.2.5. SDS-PAGE elektroforéza

Proteiny z jednotlivých lyzátů byly rozděleny podle velikosti na 10% nebo 12% akrylamidovém gelu (složení separačního a zaostřovacího gelu je uvedeno níže) v elektroforetickém puftru (25mM Tris-HCl, 192mM glycin, 0,1% SDS) při konstantním napětí maximálně 10 V/cm². Všechny reagenty byly od firmy Sigma.

Separací gel (pro 14 ml)		
Roztok	10% gel	12% gel
29% Akrylamid, 1%bisakrylamid	4.6 ml	5.7 ml
1.5M Tris pH 8.8	3.5 ml	3.5 ml
10% SDS	140 µl	140 µl
10% APS	140 µl	140 µl
TEMED	14 µl	14 µl
H ₂ O	5.7 ml	4.6 ml

Zaostřovací gel (pro 4 ml)	
Roztok	4% gel
29% Akrylamid, 1%bisakrylamid	530 µl
0.5M Tris pH 6.8	1 ml
10% SDS	40 µl
10% APS	40 µl
TEMED	5 µl
H ₂ O	2.36 ml

SDS = Sodium dodecyl sulfate; APS = Ammonium persulfát; TEMED = N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine

4.2.6. Western blot, imunodetekce

Proteiny rozdělené dle molekulové hmotnosti v akrylamidovém gelu byly přeneseny na nitrocelulóзовou membránu (Sigma; velikost póru 0,45 μm) v transferovém pufru (48mM Tris-HCl, 39mM Glycin, 0,0375% SDS, 20% methanol, vše Sigma) po dobu 1 hodiny při konstatním proudu 360 mA. Pro kontrolu přenosu proteinu byly membrány barveny v roztoku 0,2% Ponceau S v 0,1% kyselině octové a následně odbarveny v destilované vodě. Membrány byly blokovány po dobu 1 hodiny v blokovacím roztoku (5% BSA v PBS, 0,05% Tween-20, 0,01% NaN₃) nebo v 5% roztoku odtučněného sušeného mléka (Nestlé; 5% mléko v PBS, 0,05% Tween-20, 0,01% NaN₃). Nitrocelulóзовá membrána s navázanými proteiny byla přes noc inkubována s primární protilátkou (rozpuštěna v blokovacím roztoku) při 4°C. Následně byla membrána po dobu 1 hodiny inkubována se sekundární protilátkou konjugovanou s křenuvou peroxidázou, nebo se sekundární protilátkou konjugovanou s fluoroforem. Poté byla přebytečná sekundární protilátka odstraněna promýváním v PBS s 0,05% Tweenem-20 (3x10 min). Detekce byla provedena po 4-minutové inkubaci s chemiluminiscenčním substrátem (SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate, Pierce) na autoradiografické filmy. Filmy byly vyvolány na přístroji Agfa Curix 60. Signál z fluorescenčně značených sekundárních protilátek byl snímán na přístroji Odyssey (LiCor Biosciences).

Pro opakovanou imunodetekci proteinů na membráně byly navázané protilátky odstraněny inkubací s vroucím „stripping“ pufrém (62,5mM Tris-HCl o pH 6,8, 2% SDS, 100mM β -merkaptoethanol) po dobu 15 minut. Po důkladném promytí byly membrány zablokovány v blokovacím roztoku nebo v odtučněném mléce a inkubovány s novou protilátkou.

4.2.7. Fluorescenční mikroskopie

Pro přípravu fluorescenčních preparátů byly buňky kultivovány na krycích sklíčkách pokrytých vrstvou fibronectinu (Millipore; sklíčka byla inkubována po dobu 16 hodin při 4°C v 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ roztoku fibronectinu v PBS). Buňky byly 2x opláchnuty roztokem PBS, fixovány 30 minut 2% paraformaldehydem v PBS, permeabilizovány 5 minut 0,5% Tritonem-X100 v PBS a následně 2x5 minut opláchnuty v PBS. Sklíčka s buňkami byla 1 hodinu blokována v 20% kozím séru (PAA) v PBS a poté inkubována 1 hodinu s primární protilátkou (rozpuštěna v 5% kozím séru v PBS). Přebytečná

protilátka byla odstraněna 3x10 minutovým oplachem v PBS. Následně byla sklíčka s buňkami 1 hodinu inkubována v sekundární protilátce současně s faloidinem konjugovaným s rhodaminem (Life Technologies), rozpuštěných v 5% kozím séru v PBS a následně opláchnuty v PBS (3x 10 min). Po opláchnutí v destilované vodě byla krycí sklíčka s buňkami položena na podložní sklíčko s montovacím médiem (Vectashield s DAPI; Vector Laboratories).

Snímky byly pořízeny na konfokálním mikroskopu (konfokální mikroskop Olympus Fluoview fv1000 s digitální kamerou Hamamatsu EM-CCD), nebo na epi-fluorescenčním mikroskopu (Olympus mikroskop X81 s kamerou Olympus FV2T).

4.2.8. Mikroskopie v reálném čase

4.2.8.1. Mikroskopie v reálném čase za použití fázového kontrastu

Buňky byly kultivovány na plastickém podkladu, který byl pokryt fibronectinem (materiál i postup je shodný s úpravou povrchu krycích sklíček určených pro fluorescenční mikroskopii, kap. 4.2.7). Snímky byly pořízeny na invertovaném mikroskopu Olympus Cell-R při 37°C. Medium s buňkami převrstveno minerálním olejem (Sigma), aby nedocházelo k vysychání média.

4.2.8.2. Mikroskopie v reálném čase za použití konfokální mikroskopie

Buňky stabilně exprimující RFP-actin (viz. kap. 4.3. Příprava stabilních linií) byly kultivovány na miskách se skleněným dnem, který byl pokryt fibronectinem (1 µg/ml v PBS; inkubace přes noc při 4°C). Před natáčením byly buňky kultivovány minimálně 36 hodin za standardních podmínek a před mikroskopickým sledováním bylo médium s buňkami převrstveno minerálním olejem. Snímky živých buněk byly pořízeny při 37°C konfokálním mikroskopem (Olympus Fluoview fv1000 s digitální kamerou Hamamatsu EM-CCD) v jedné fokální rovině, zabírající oblast přilehlou ke krycímu sklíčku.

4.2.9. Kvantifikace buněčných parametrů, statistická analýza

Ke kvantifikaci buněčné plochy a rychlosti migrace byly použity snímky získané pomocí časosběrné mikroskopie mikroskopem Olympus Cell-R (při použití objektivu

10x0,3 UPLFLN). Kvantifikace byla provedena programem ImageJ (verze 2006.02.01), popř. s využitím zásuvného modulu MTrackJ (verze 1.5.0). Buňky, které byly kvantifikovány, se svými vlastnostmi výrazným způsobem neodlišovaly od obecného trendu v kultuře (nebyly kvantifikovány buňky s větším počtem jader, buňky vykazující morfologické defekty apod.) za podmínek stanovených u jednotlivých obrázků ve výsledkové kapitole. Při rozdělení buňky byla náhodně vybrána jedna z dceřiných buněk (pokud splňovala požadované podmínky), která byla dále sledována (např. při měření trajektorie v časovém intervalu).

Ke statistickému vyhodnocení byl použit program Prism GraphPad5. Grafické vynesení výsledků obsahuje také porovnání mezi jednotlivými měřenými skupinami, které vychází z nepárového t-testu, kde „*“ odpovídá $p < 0,05$ (P-hodnota/P-value), „**“ odpovídá $p < 0,01$, „***“ odpovídá $p < 0,001$ a „ns“ označuje statisticky nevýznamný rozdíl.

4.2.10. Práce s DNA

4.2.10.1. Polymerázová řetězová reakce (PCR), restrikce a ligace DNA

K amplifikaci DNA byl použit přístroj Minicycler MJ Research, bylo vždy provedeno max. 35 amplifikačních cyklů (program níže). Polymerázové reakce probíhaly vždy v objemu 50 μ l (2x0,3mM DNA primer, Pfu pufr s $MgSO_4$ [Fermentas], 20 μ M dNTP [deoxynukleotidtrifosfát; Fermentas], 0,8-1,2 μ g/ μ l templátové DNA, 0,5 μ l Pfu DNA polymerázy [pro 50 μ l reakční směsi; Fermentas]).

PCR program		
Č. kroku	Teplota	Čas
1. krok	95°C	1.5 min
2. krok (35 cyklů)	95°C	0.5 min
	60°C	1 min
	72°C	1 min (pro 1 kbp DNA)
3. krok	72°C	10 min
4. krok	4°C	(konec PCR)

Restrikce DNA probíhala minimálně 2 hodiny podle doporučení výrobce restrikáz (New England Biolabs). Při použití dvou restrikáz současně byly restrikční podmínky optimalizovány na základě stránek výrobce: <http://66.155.211.155/nebecomm/DoubleDigestCalculator.asp>. K ligaci DNA byla

použita ligáza T4 (Thermo scientific) a probíhala podle návodu výrobce vždy přes noc (cca 16 hodin) při pokojové teplotě.

4.2.10.2. Agarózová elektroforéza, extrakce DNA z agarózového gelu

Vodný roztok DNA byl smíchán s nanášecím pufrém (Thermoscientific) a k rozdělení DNA dle její velikosti byl použit 0,5-2% agarózový gel (viz tabulka níže; složení gelu: prášková agaróza [Lonza] v Tris-acetátovém pufru [TAE; 40mM Tris, 20mM kys. octová, 1mM EDTA], 0,05 µg/ml Ethidium bromid). Elektroforéza probíhala v TAE pufru při konstantním napětí 80V.

Konc. agaru v TAE p.	Velikost DNA
0,5%	1000 - 30 000 bp
0,7%	800 - 12 000bp
1,0%	500 - 10 000bp
1,2%	400 - 7 000bp
1,5%	200 - 3 000bp
2,0%	50 - 2 000bp

Extrakce DNA z gelu byla provedena použitím „QIAquick Gel Extraction Kit“ (Qiagen) dle návodu výrobce (procedura pro stolní centrifugu). Ve finálním kroku izolace byla DNA eluována destilovanou vodou.

4.2.10.3. Použité bakterie, izolace DNA

Plasmidová DNA byla vkládána do kompetentních buněk E. coli (kmen DH5α) metodou tepelného šoku. Kultivace bakterií DH5α a následná izolace plasmidové DNA byla provedena dle protokolu „QIAprep Miniprep Kit,“ nebo „QIAprep Midiprep Kit“ (protokol pro použití centrifugy) od firmy Qiagen. Ve finálním kroku izolace byla DNA eluována destilovanou vodou.

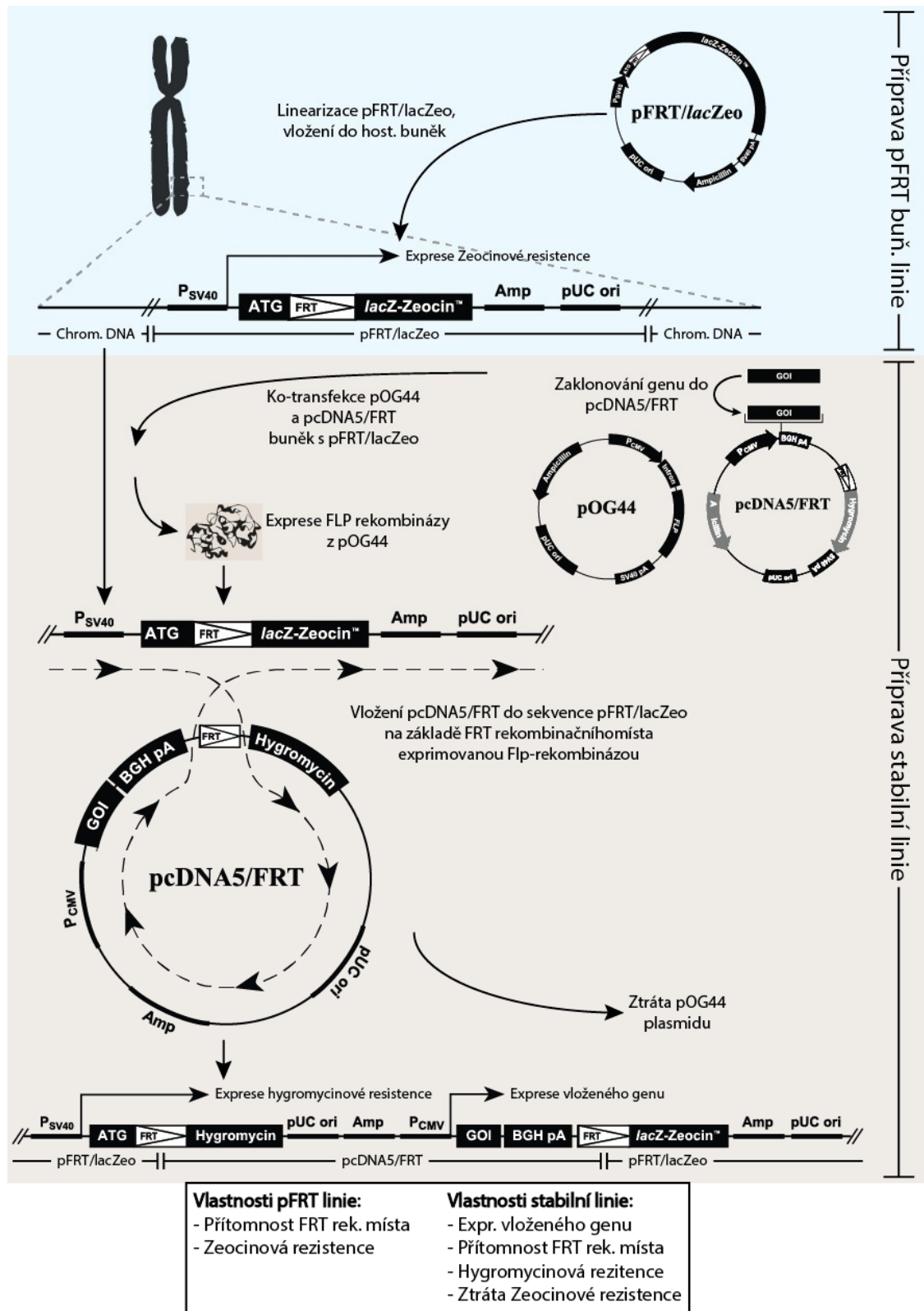
4.3. Příprava stabilních linií (Stabilní vložení DNA sekvence do MDCK buněk)

MDCK buňky, použité v této práci, do kterých byl stabilně vložen gen našeho zájmu (dále používán termín „Stabilní linie“), byly vytvořeny Flp-In systémem firmy

Invitrogen. Při přípravě stabilních linií bylo postupováno podle protokolu výrobce, avšak v některých bodech došlo ke změnám. Stabilní vložení genu do buněk lze rozdělit do dvou kroků. V prvním kroku byla zavedena rekombinační sekvence FRT (Flp recombination target) do genomu MDCK buněk (dále označovány jako pFRT MDCK). V druhém kroku je sekvence FRT využita pro vložení našeho genu.

Schéma přípravy stabilních linií je uvedeno na Obr. 11. V prvním kroku dochází k náhodné integraci plasmidu pFRT/lacZeo do genomu buněk. Tento plasmid obsahuje gen se zeocinovou resistencí, která je za iniciačním kodonem přerušena FRT-rekombinační sekvencí. Přítomnost FRT-rekombinační sekvence nemá vliv na vlastnosti exprimovaného proteinu. Plasmid je před transfekcí linearizován v kostře plasmidu z toho důvodu, aby nedošlo během integrace k narušení SV40 promotorové nebo FTR/Zeocinové sekvence. Po selekci vzniká buněčná linie, která umožňuje snadné a definované vkládání genů. V druhém kroku jsou buňky s integrovaným FRT místem ko-transfekovány plasmidem s požadovaným genem (v plasmidu pcDNA5/FRT) a plasmidem kódující Flp rekombinázu (pOG44). Rekombináza Flp zprostředkuje vložení plasmidu pcDNA5/FRT do sekvence plasmidu pFRT/lacZeo integrovaného v genomu. Gen pro hygromycinovou resistenci kódovaný na plasmidu pcDNA5/FRT neobsahuje promotorovou sekvenci ani iniciační kodon. Pouze buňky, které správně provedou rekombinaci, získávají hygromycinovou reistenci za současné ztráty Zeocinové resistance. Plasmid pOG44 nenesse sekvence, které by umožňovaly dlouhodobé udržení v buňkách a dochází k jeho vyředění.

Výchozím bodem pro přípravu stabilních linií byly pFRT MDCK buňky, které byly připraveny J. Čáslavským podle protokolu výrobce (jejich příprava zde není popisována). Integrace sekvence FRT (plasmidu pFrt/lacZeo) do genomu neovlivnila vlastnosti MDCK buněk, svými parametry byly shodné s parentálními buňkami MDCK. Není známé místo integrace ani počet kopií sekvence FRT v genomu MDCK buněk.



Obr. 11: Příprava stabilních linií metodou Flp-in. Plasmid pFRT/lacZeo byl linearizován a následně vložen do genomu hostitelských buněk. Do pcDNA5/FRT plasmidu je vložen gen našeho zájmu (GOI) a je ko-transfekován s plasmidem pOG44 do buněk s integrovaným FRT místem. Následně dochází k rekombinaci plasmidu pcDNA5/FRT s GOI do genomu hostitelských buněk na základě FRT rekombinačního místa. Plasmid pOG44 je během kultivace buněk vyředěn. Při přípravě tohoto schématu byly použity obrázky z manuálu výrobce (Invitrogen).

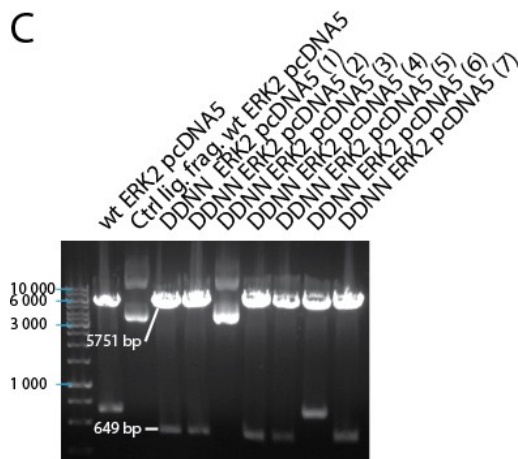
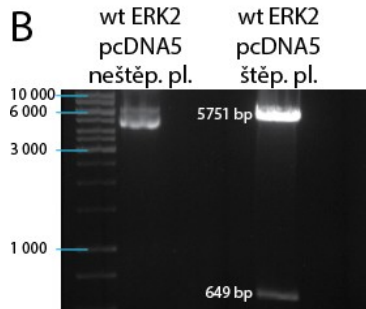
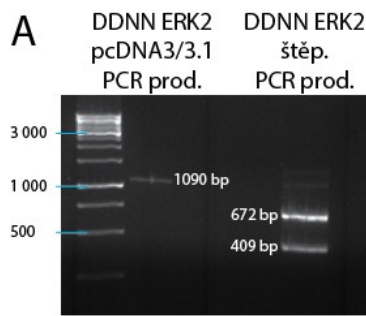
Plasmidy stabilně vkládané do MDCK buněk
RFP-Actin pcDNA5/FRT
wt ERK1 pcDNA5/FRT
wt ERK2 pcDNA5/FRT
DDNN ERK2 pcDNA5/FRT
L232 ERK2 pcDNA5/FRT
HL ERK2 pcDNA5/FRT

4.3.1.1. Příprava plasmidu DDNN ERK2 pcDNA5/FRT

Gen proteinkinázy DDNN ERK2 byl amplifikován z pcDNA3/3.1 plasmidu (Obr 13A, 13D, 13E). Použitím restriktáz StuI a XhoI byl amplifikovaný úsek štěpen a byl izolován 3'-koncový fragment DNA s požadovanými mutacemi (Obr 13A). Z akceptorového plasmidu pcDNA5/FRT s genem nemutované proteinkinázy ERK2 se značkou FLAG byla použitím restriktáz StuI a XhoI odstraněna 3'-koncová sekvence proteinkinázy ERK2 spolu s SP6 promotorem (Obr. 13B, 13E) a nahrazena 3'-koncovou sekvencí proteinkinázy DDNN ERK2. Připravený plasmid byl restriktivně testován (Obr. 13C) a varianta 1 byla po sekvenační kontrole použita pro přípravu stabilních linií.

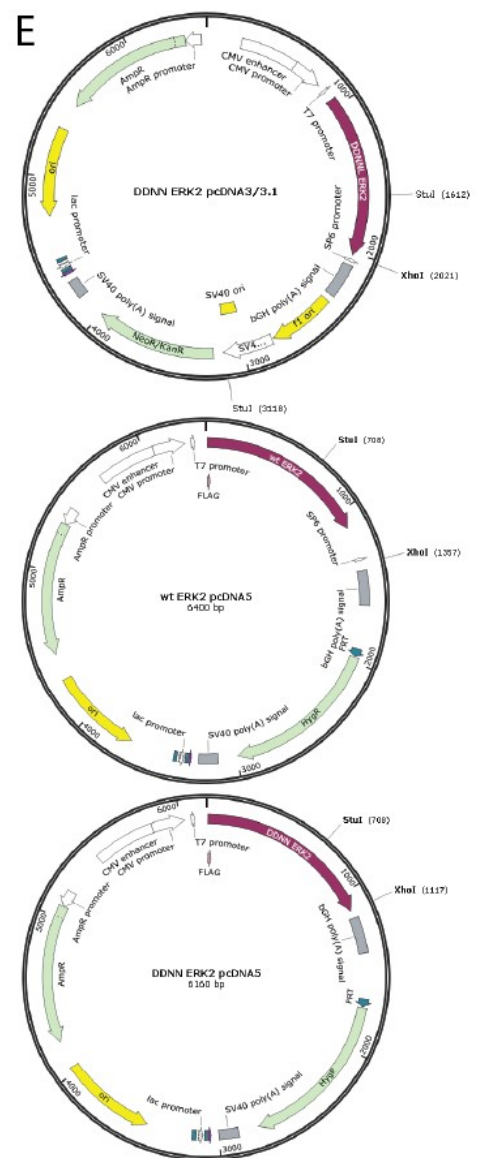
4.3.1.2. Příprava plasmidu HL ERK2 pcDNA5/FRT

Z akceptorového plasmidu RACK1 pcDNA5/FRT byla odstraněna sekvence genu RACK1 restriktázami NotI a XhoI (Obr. 14A). Nukleotidová sekvence dimerizačně defektní proteinkinázy ERK2 (dále HL ERK2) byla amplifikována metodou PCR a vzniklý produkt byl štěpen restriktázami NotI a XhoI (Obr. 14B, 14D, 14E). Restriktivně upravená sekvence pro HL ERK2 byla vložena do plasmidu pcDNA5/FRT. Připravený plasmid HL ERK2 pcDNA5/FRT byl restriktivně testován (Obr. 14C). Po sekvenační kontrole byla pro přípravu stabilních linií použita varianta 2.

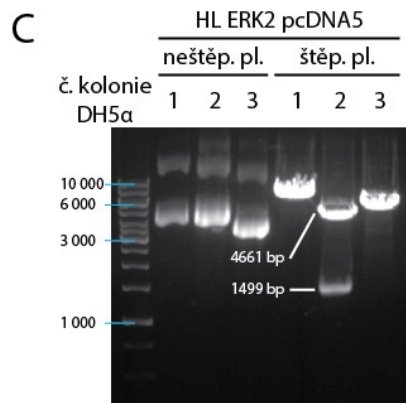
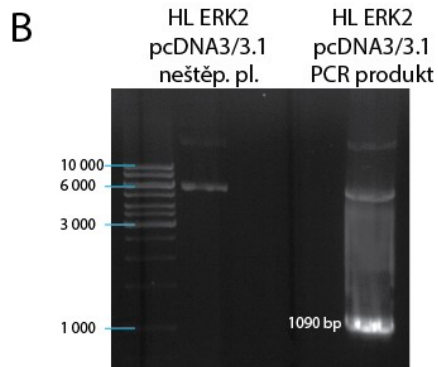
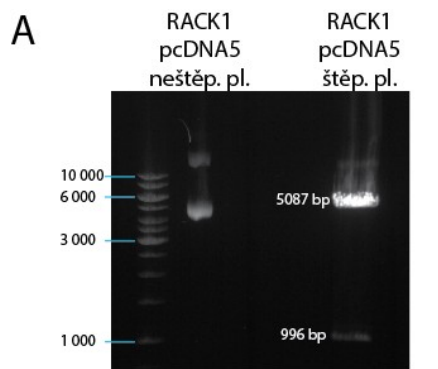


D

Primer 1: CCAATGGCGCCGCGGCGGCGGGCCCG
Primer 2: AAAACTCGAGTTAAGATCTGTATCCTGGC

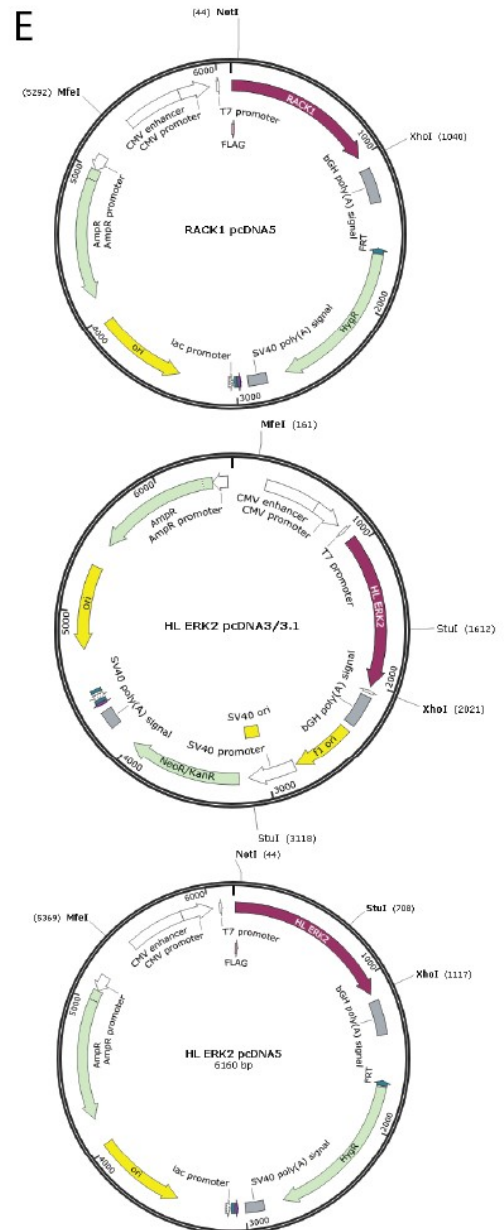


Obr. 13: Příprava plasmidu pcDNA5/FRT se sekvencí DDNN ERK2. [A] Neštěpený a štěpený PCR produkt vzniklý amplifikací genu pro DDNN ERK2 v pcDNA3/3.1. Pro restrikci byly použity restrikční enzymy StuI a XhoI. [B] Restrikce akceptorového vektoru pcDNA5/FRT, který obsahuje sekvenci pro nemutovanou formu proteinkinázy ERK2. Byly použity restrikční enzymy StuI a XhoI. [C] Restrikční ověření připraveného plasmidu DDNN ERK2 pcDNA5/FRT. K ověření byly použity restrikční enzymy StuI a XhoI. V třetím sloupci je restrikční ověření plasmidu, který vznikl odstraněním 649 bp (viz Obr. 13B) a následnou ligací. [D] Použité oligonukleotidy pro amplifikaci genu DDNN ERK2 z pcDNA3/3.1 plasmidu. [E] Schématické mapy vytvořeného/použitých plasmidů. Nahoře DDNN ERK2 pcDNA3/3.1, uprostřed wtERK2 pcDNA5/FRT, dole DDNN ERK2 pcDNA5/FRT. Pokud jsou přítomny, jsou uvedena restrikční místa StuI, XhoI. Mapy byly vytvořeny pomocí programu Snapgene (verze 1.4.1).



D

Primer 1: CCA ATG GCG GCC GCG GCG GCG GCG GGC CCG
Primer 2: AAA ACT CGA GTT AAG ATC TGT ACT CTG GC

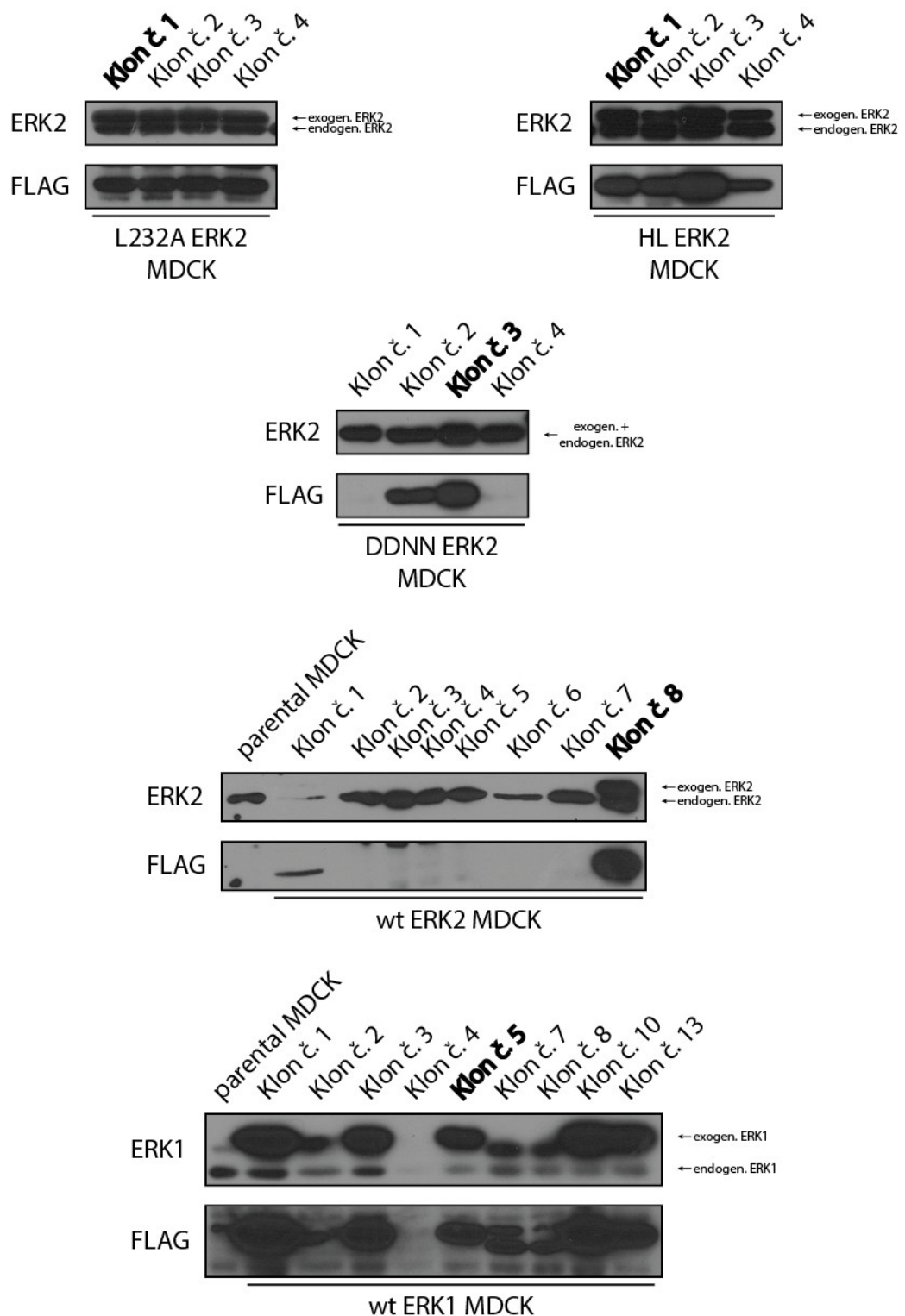


Obr. 14: Příprava plasmidu pcDNA5/FRT s nukleotidovou sekvencí HL ERK2. [A] Odstranění sekvence genu RACK1 (996 bp) z plasmidu pcDNA5/FRT restrikázami NotI a XhoI; za iniciačním kodonem byla ponechána sekvence pro značku FLAG. [B] PCR produkt vzniklý amplifikací genu pro HL ERK2 z plasmidu HL ERK2 pcDNA3/3.1 [C] Restrikční ověření 3 variant plasmidu HL ERK2 pcDNA5/FRT; pro restrikční ověření byly použity restrikční enzymy MfeI a StuI. [D] Sekvence oligonukleotidů použitých pro amplifikaci genu HL ERK2 v pcDNA3/3.1 plasmidu. [E] Schématické mapy výsledného/použitých plasmidů. Nahoře RACK1 pcDNA5/FRT, uprostřed HL ERK2 pcDNA3/3.1, dole HL ERK2 pcDNA5/FRT. Pokud jsou přítomny, jsou uvedena restrikční místa NotI, MfeI, StuI, XhoI. Mapy byly vytvořeny pomocí programu Snapgene (verze 1.4.1).

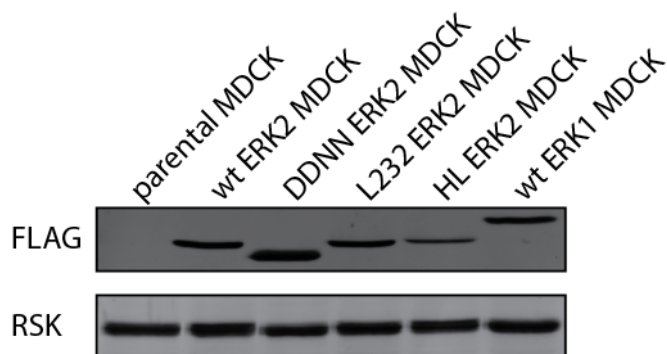
4.3.2. Postup zanesení genů/konstruků do pFRT MDCK buněk

Buňky pFRT MDCK byly vysety o koncentraci cca 80 000 buněk/ml na misku o průměru 2 cm. Po 24 hodinách dosáhly buňky konfluence přibližně 25% a byly ko-transfekovány pcDNA5/FRT plasmidem se zaklonovaným genem/konstrukem a pOG44 plasmidem nesoucí Flp rekombinázu v poměru 1:4 (pcDNA5/FRT:pOG44). Po 24 hodinách od transfekce byly buňky trypsinizovány a přeneseny na misku o průměru 10 cm do média obsahující hygromycin o finální koncentraci 200 µg/ml. Každé 2 dny bylo médium s hygromycinem B vyměněno. V okamžiku, kdy kolonie na misce čítaly 50-100 buněk, byly jednotlivé kolonie za pomoci silikonových insertů trypsinizací izolovány. Izolace kolonií (klonů) nebyla provedena u MDCK buněk, do kterých byl stabilně vložen plasmid s RFP-actinem, proto buňky této linie vykazují různou expresi konstruktu RFP-actin.

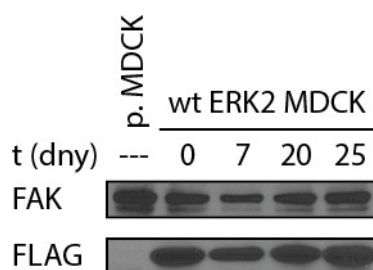
Klony MDCK buněk s vloženou proteinkinázou ERK1 nebo ERK2 byly testovány na expresi proteinů z vložených plasmidů (Obr. 15). Pro práci byly vybrány klony s podobnou hladinou exprese vložených genů proteinkináz ERK1 a ERK2 (označeny na Obr. 15, porovnání exprese mezi liniemi na Obr. 16). Abychom otestovali stabilitu exprese zanesených genů, testovali jsme linii MDCK buněk s ektopickou expresí proteinkinázy ERK2, která byla po dobu 25 dnů kultivována bez přítomnosti hygromycynu B. V jednotlivých časových intervalech byly vytvořeny lyzáty, které byly následně testovány metodou western blot (Obr. 17). Během 25 dnů nedošlo ke změnám exprese exogenní varianty proteinkinázy ERK2.



Obr. 15: Detekce hladiny exprese klonů MDCK buněk. Porovnání exprese exogenních variant proteinkinázy ERK1 nebo ERK2 u jednotlivých klonů. Pro detekci byly použity protilátky proti značce FLAG a proti proteinkináze ERK1 nebo ERK2. Vzorky z jednotlivých klonů byly připraveny po 48 hodinách kultivace při standardních podmínkách v přítomnosti Hygromycinu B (200 $\mu\text{g/ml}$). Tučným písmem jsou vyznačeny klony MDCK buněk, který byly nadále používány pro experimenty. Pojem „parental MDCK“ označuje parentální linii MDCK buněk (nebyl u ní proveden žádný aditivní genetický zásah). Tento termín bude využíván i při popisu dalších obrázků.



Obr. 16: Porovnání hladiny exprese exogenní proteinkinázy ERK mezi liniemi MDCK buněk. Byly použity stejné lyzáty, které byly použity pro detekci exprese na Obr. 15 (označeny tučným popiskem). Pro detekci exprese vloženého genu byla použita protilátka proti značce FLAG. Pro porovnání nanášky byla použita protilátka proti proteinkináze RSK.



Obr. 17: Změna exprese exogenní proteinkinázy ERK2 v čase v linii wt ERK2 MDCK. Vzorek s označením $t=0$ odpovídá počátečnímu stavu. Následně byla linie kultivována nepřetržitě po dobu 25 dní v médiu bez hygromycinu B. Každé 2-3 dny byla linie pasážována. Pro detekci exogenní proteinkinázy ERK2 byla použita protilátka proti značce FLAG, pro porovnání nanášky byla použita protilátka proti proteinkináze FAK. Označení p. MDCK označuje parentální linii MDCK buněk.

5. Výsledky:

5.1. Popis periferního aktinu v MDCK buňkách

Periferní aktin není na rozdíl od laterálního aktinu či stresových vláken dobře popsanou strukturou. Z tohoto důvodu jsme se jej rozhodli v MDCK buňkách funkčně a morfologicky charakterizovat.

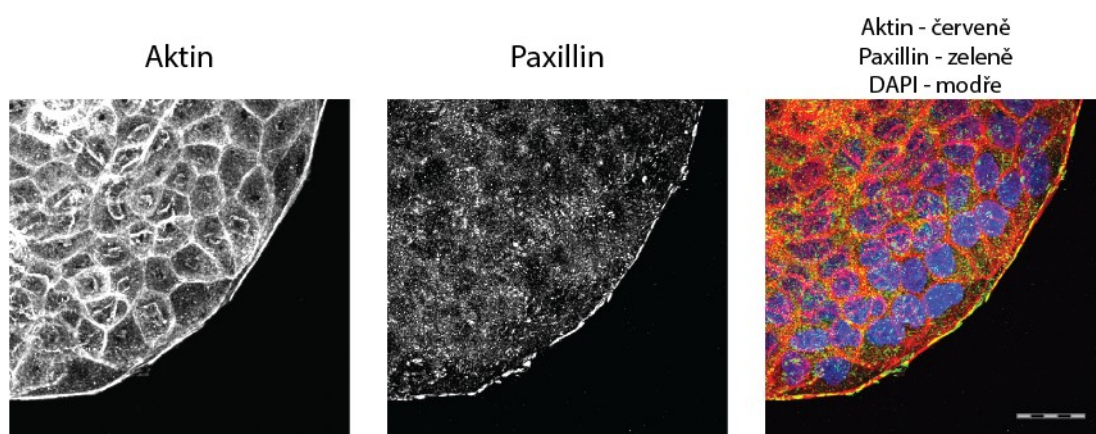
5.1.1. Periferní aktin asociuje s fokálními adhezemi

Abychom vizualizovali aktinové struktury v MDCK buňkách, byly buňky po dobu 48 hodin kultivovány na krycím sklíčku pokrytým fibronectinem. Za těchto podmínek vytváří buňky tubulární epitel s vyvinutými apikálními a baso-laterálními stranami (Caslavsky *et al.*, 2013). Takto polarizované buňky byly následně obarveny na aktin, E-cadherin a paxillin (používán jako marker fokálních adhezí) a analyzovány pomocí konfokální mikroskopie. Soustředili jsme se na analýzu bazální části buněk, která obsahuje periferní aktin (Ridley *et al.*, 1995).

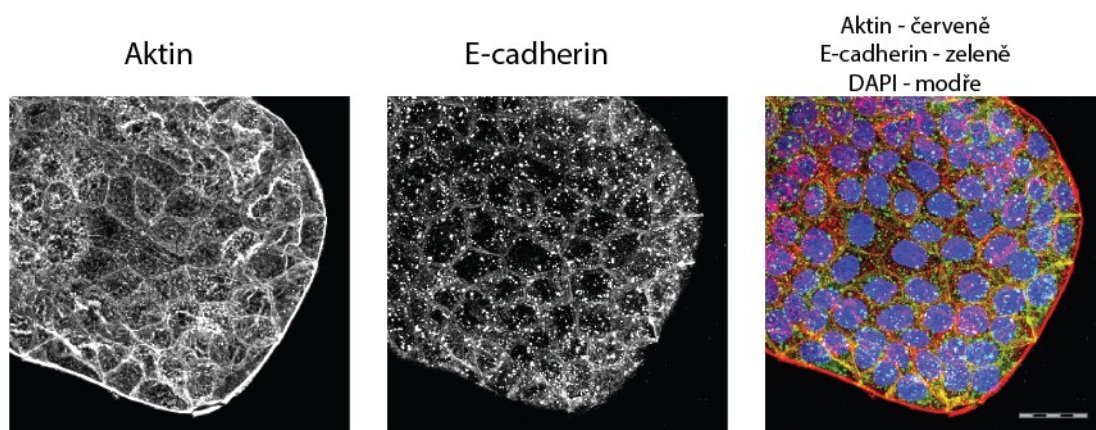
Periferní aktin kolokalizuje s velkým množstvím fokálních adhezí (Obr. 18A), ke kterým je pravděpodobně vázán. Na periferii kolonií se preferenčně nenachází E-cadherin. E-cadherin je v MDCK buňkách lokalizován zejména v oblastech mezibuněčných spojů a na bazální straně ve formě granulí (Obr. 18B). Na periferii kolonií není přítomen ani β -catenin (Caslavsky *et al.*, 2013).

Na XZ projekci kolonií MDCK buněk je vidět, že periferní aktin je organizován do silného aktinového svazku na bazální straně epitelu. Laterální aktin je pravděpodobně aktinová síť, která se rozprostírá po celé ploše laterální membrány (Obr. 18C).

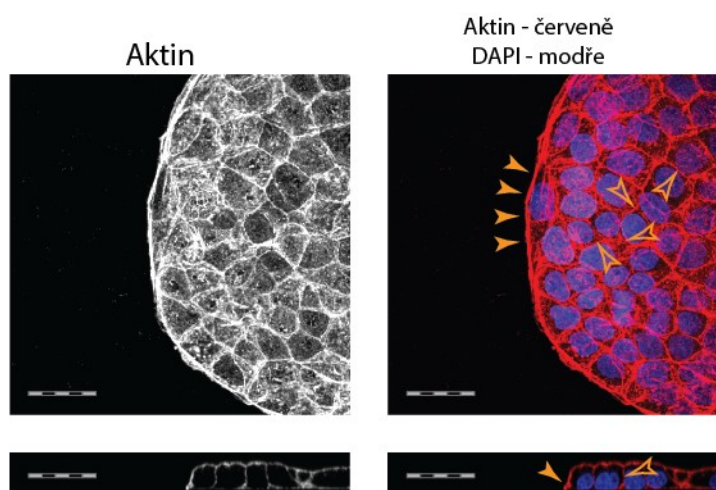
A



B



C

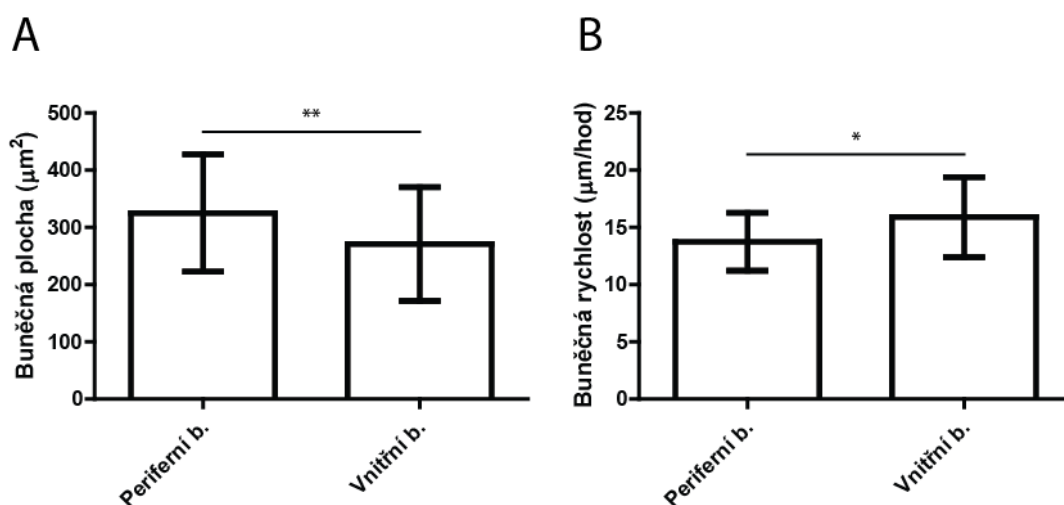


Obr. 18: Periferní a laterální aktin vytvářejí rozdílné struktury a kolokalizují s rozdílnými proteiny. MDCK buňky byly kultivovány po dobu 48 hodin na krycích sklíčkách, následně zafixovány a nabarveny. Aktin byl vizualizován pomocí faloidinu konjugovaným s rhodaminem, jádra pomocí DAPI. Dále byl detekován E-cadherin [A] a paxillin [B] pomocí specifických protilátek. [C] XY a XZ projekce kolonie MDCK buněk. Vyplněné oranžové šipky ukazují periferní aktin, nevyplněné oranžové šipky laterální aktin. Grafické měřítko odpovídá 25 μm .

5.1.2. Buňky na periférii kolonie mají stejnou plochu i rychlost, jako buňky v centrální části kolonie

Jednou z možných funkčních vlastností periferního aktinu mohlo být, že díky asociaci s velkým množstvím fokálních adhezí mění tvar či rychlost migrace buněk na okraji kolonie. Takto mohlo dojít k rozdělení na dvě rozdílné frakce. Abychom zjistili, jaký má význam periferní aktin na chování a morfologii buněk, rozhodli jsme se kolonie MDCK buněk sledovat v reálném čase. Zjistili jsme, že buňky nemají nijak omezen pohyb v rámci kolonie. Mohou zcela volně putovat z periferie kolonie do jejího středu a naopak z jejího středu na okraj.

Dále jsme porovnali plochu buněk, které se nacházejí po dobu osmi hodin buď na periférii kolonie, nebo v jejím centru. I když jsme v obou těchto parametrech naměřili statisticky významné rozdíly, nepřikládali jsme jim vyšší váhu (Obr. 19). Z toho usuzujeme, že pozice v rámci kolonie, struktura periferního aktinu a velké množství fokálních adhezí nemá vliv na buněčnou migraci a plochu buněk.



Obr. 19: Kvantifikace buněčné plochy a buněčné rychlosti MDCK buněk. MDCK buňky byly po dobu 48 hodin kultivovány na plastickém podkladu, následně byly buňky po dobu 8 hodin natáčeny (6 snímků za hodinu) a z pořízených videí byla provedena kvantifikace. Byly měřeny buňky, které byly po celou dobu na okraji nebo uvnitř buňky. [A] Vynesení plochy buněk (μm^2). [B] Vynesení průměrné rychlosti, které buňky dosáhly v časovém intervalu 8 hodin ($\mu\text{m}/\text{hod}$). Na obou grafech je zobrazen průměr se směrodatnou odchylkou. Pro každou frakci bylo kvantifikováno minimálně 25 buněk. („**“ $\approx p < 0,05$; „***“ $\approx p < 0,01$)

5.1.3. Shrnutí kapitoly

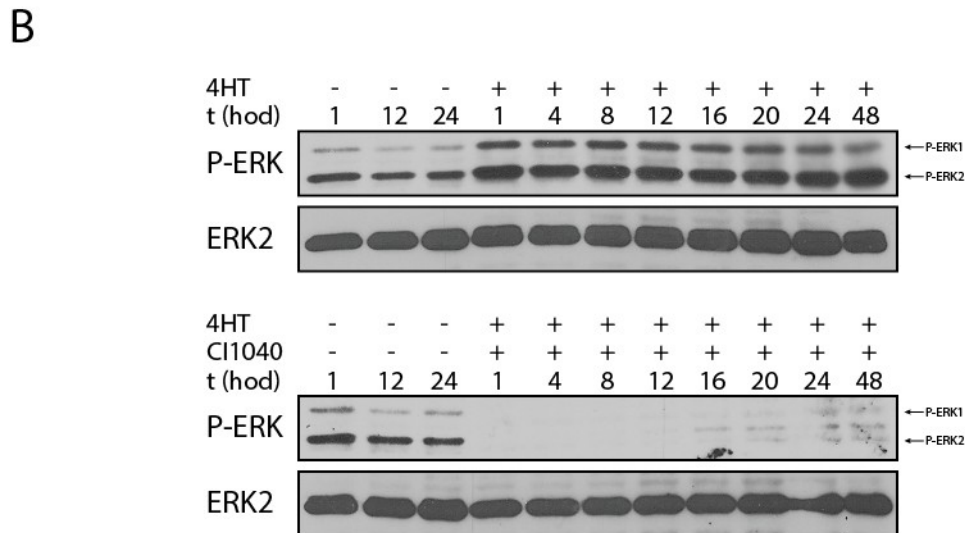
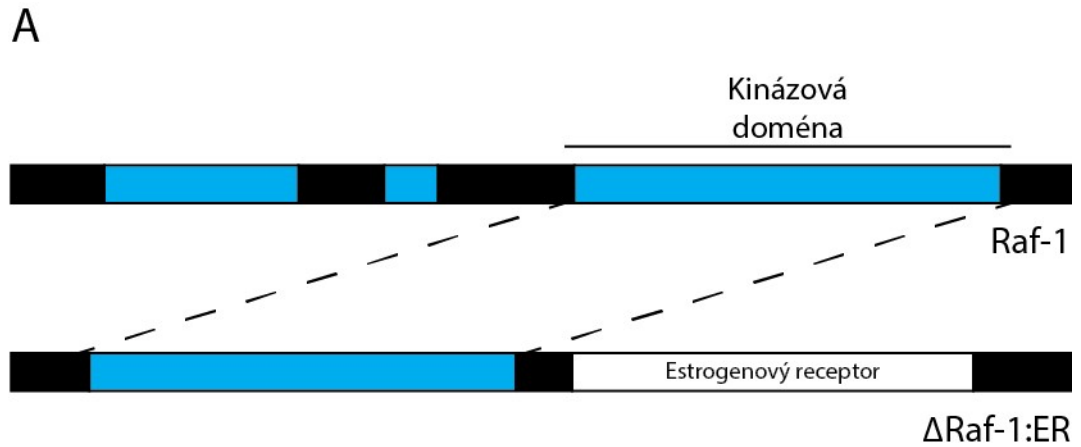
Kolonie MDCK buněk jsou ohraničeny periferním aktinem, který je tvořen silným aktinovým svazkem a kolokalizuje s fokálními adhezemi. Buňky s periferním aktinem nemají výrazně změněnou buněčnou plochu a rychlost v porovnání s buňkami uvnitř kolonie.

5.2. Regulace periferního aktinu signální kaskádou ERK v artifiálním systému Δ Raf-1:ER MDCK buněk

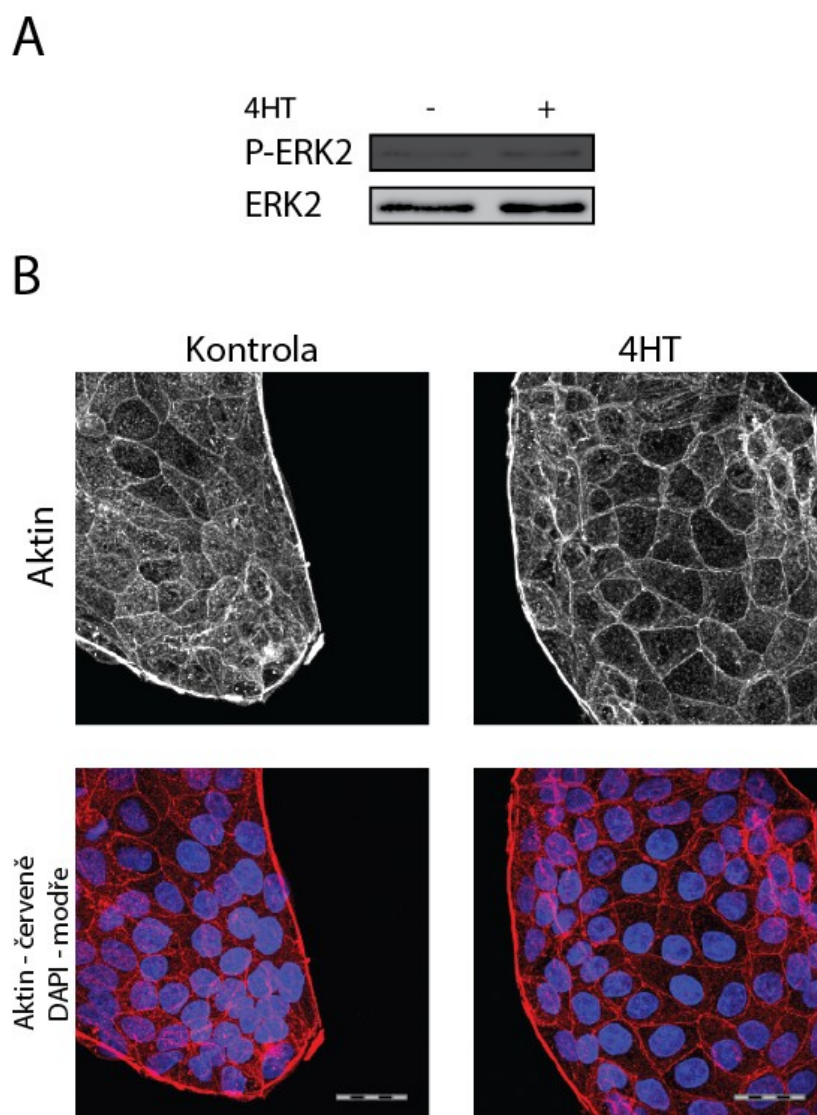
Pro sledování změn v periferním aktinu jsme využívali zejména MDCK buňky, které exprimovaly kondicionálně aktivní formu proteinkinázy Raf. MDCK buňky stabilně exprimovaly konstrukt Δ Raf-1:ER, který je aktivován pomocí 4-hydroxytamoxifenu (4HT) a následně dochází k aktivaci signální kaskády ERK. Systém založený na konstrukt Δ Raf-1:ER, který se skládá z kinázové domény lidské proteinkinázy Raf-1 fúzované s estrogenovým receptorem (ER; Obr. 20A), je robustní, snadno se s ním manipuluje a navíc 4HT má vysokou stabilitu (Doehn *et al.*, 2009; Samuels *et al.*, 1993).

5.2.1. Základní popis linie Δ Raf-1:ER MDCK buněk

Přidání 4HT do média k MDCK buňkám stabilně exprimující fúzní protein Δ Raf-1:ER způsobí dlouhodobou aktivaci signální kaskády ERK. Aktivita byla stanovena porovnáním hladiny fosforylace efektorové proteinkinázy ERK v čase (Obr. 20B). Vliv 4HT na stimulaci signální dráhy ERK a vlastní aktivitu proteinkinázy ERK může být blokován použitím specifického inhibitoru CI1040 proteinkinázy MEK (Obr. 20B). Používané koncentrace 4HT nemění aktivitu proteinkinázy ERK v parentální linii MDCK buněk (Obr. 21A). To ukazuje na specifický účinek 4HT v experimentálním modelu Δ Raf-1:ER MDCK. Používané koncentrace 4HT v parentální linii také nevyvolávají změny v aktinovém cytoskeletu (Obr. 21B).



Obr. 20: Schéma proteinového konstruktu Δ Raf-1:ER, aktivita signální kaskády ERK v Δ Raf-1:ER MDCK buňkách. [A] Schéma lidské proteinkinázy Raf-1 a od ní odvozeného konstruktu Δ Raf-1:ER. Na schématu je vyznačena kinázová doména proteinkinázy Raf-1, která byla následně fúzována s estrogenovým receptorem. [B] Aktivita proteinkinázy ERK v Δ Raf-1:ER MDCK buňkách po stimulaci 4HT (vrchní panel) nebo po stimulaci 4HT za současného použití inhibitoru CI1040 (dolní panel). Lyzáty byly získány z Δ Raf-1:ER MDCK buněk, které byly kultivovány minimálně po dobu 36 hodin. Poté byl k buňkám do média přidán 1 μ M 4HT s nebo bez 2 μ M CI1040 a sklizeny v časových intervalech 1 – 48 hodin. Aktivita proteinkinázy ERK byla stanovena protilátkou rozeznávající fosforylovaný TEY motiv proteinkinázy ERK (P-ERK). Identická nanáška proteinu byla potvrzena pomocí protilátky rozeznávající proteinkinázu ERK2.

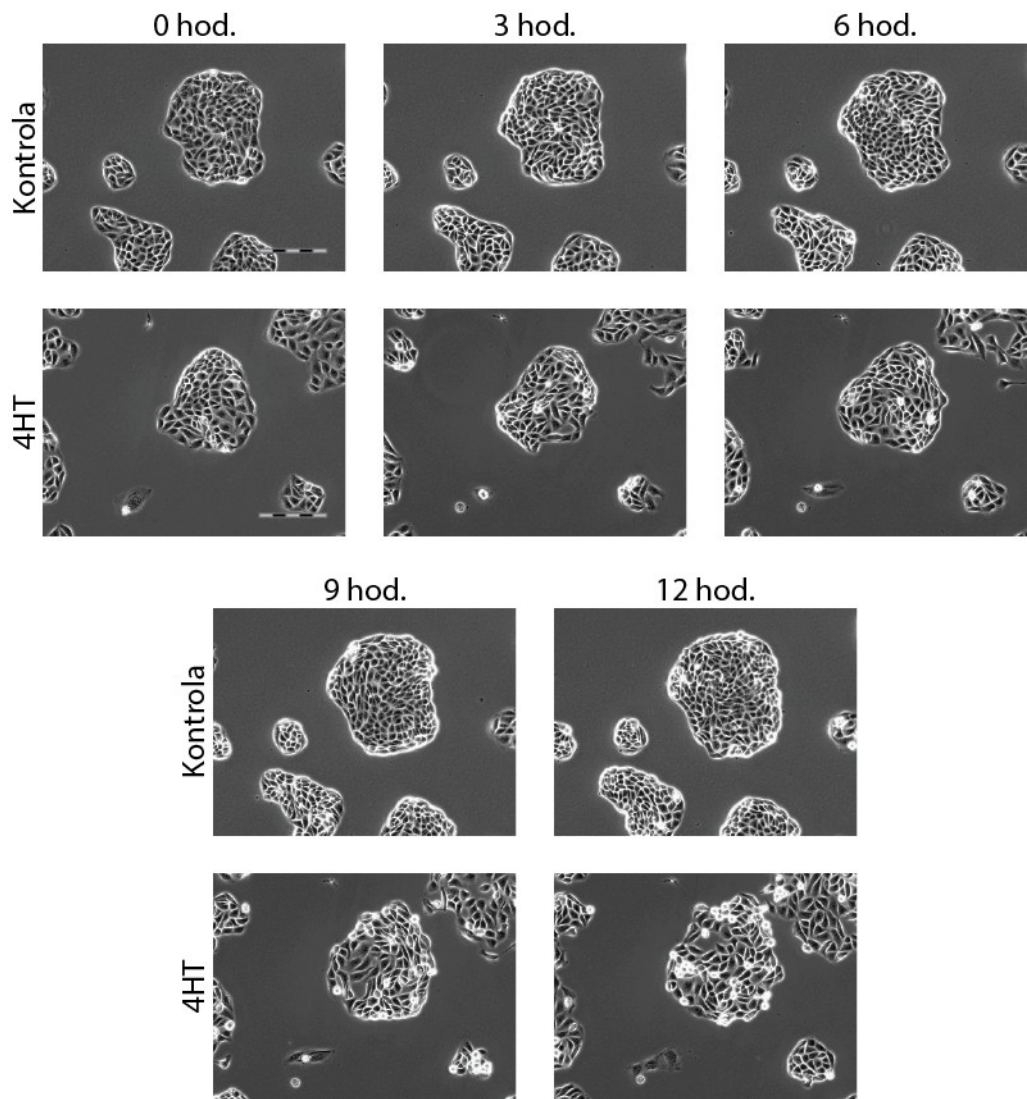


Obr. 21: Aktivita signální kaskády ERK a aktinový cytoskelet v parentální linii MDCK buněk v přítomnosti 4HT. MDCK buňky byly po dobu 48 hodin kultivovány na plastickém podkladu (pro přípravu lyzátů) nebo na krycích sklíčkách (pro imunofluorescenci). Následně byl k buňkám přidán 1 μM 4HT po dobu 16 hodin, poté byly buňky zlyzovány a metodou western blot analyzovány nebo zafixovány a nabarveny. [A] Porovnání aktivity proteinkinázy ERK2. 4HT neaktivuje proteinkinázu ERK2 v parentální linii MDCK buněk. [B] Barvení na aktinový cytoskelet (faloidin konjugovaný s rhodaminem) a jádra (DAPI). 4HT nemění aktinový cytoskelet v parentální linii MDCK buněk. Grafické měřítko odpovídá 25 μm .

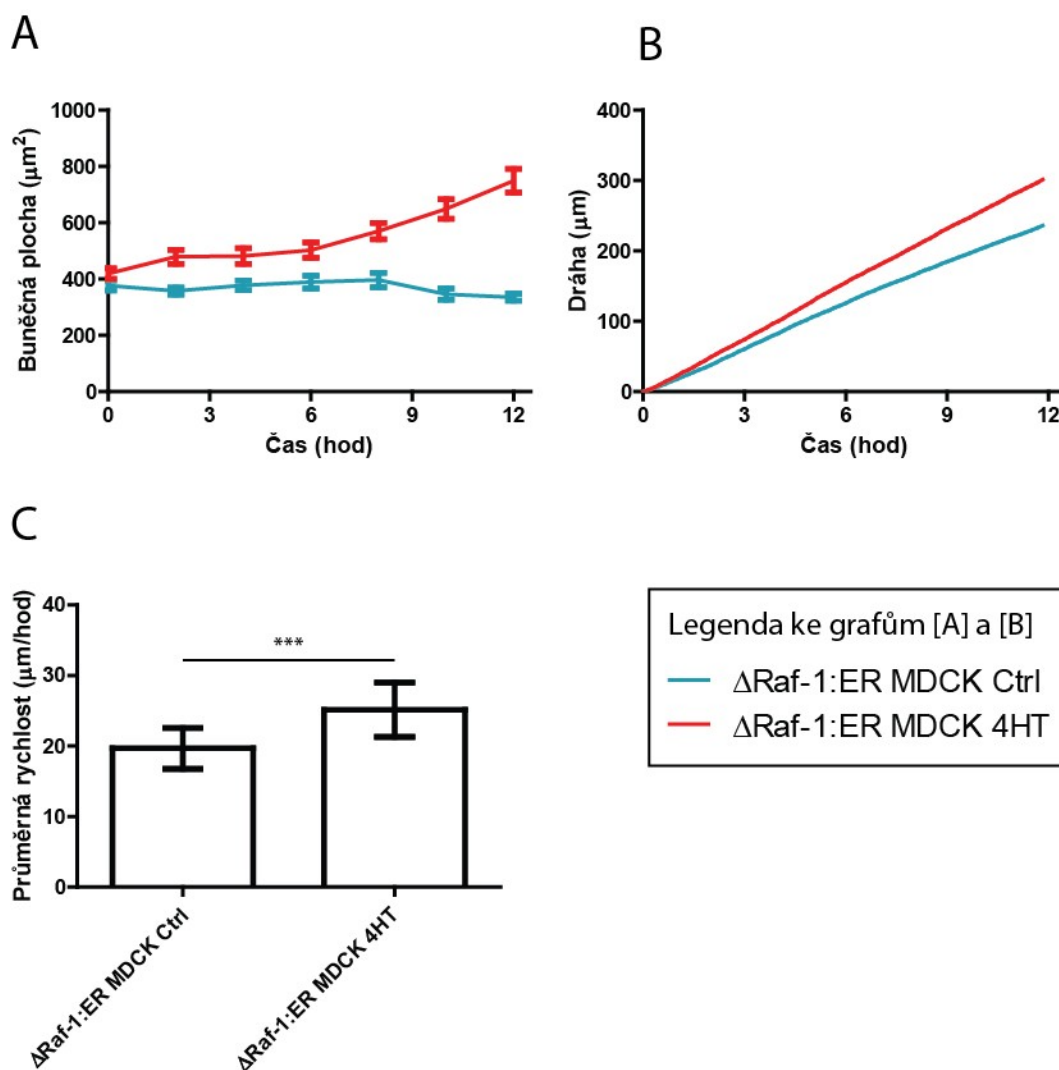
5.2.2. Δ Raf-1:ER MDCK buňky mění svou morfologii po stimulaci signální kaskády ERK

Aktivace signální kaskády ERK vede k rozpadu epiteliální architektury a následně k individuální migraci buněk (Caslavsky *et al.*, 2013). Z tohoto důvodu jsme předpokládali, že tento proces bude doprovázen remodelací periferního aktinu. Abychom zjistili, jaký vliv má aktivace signální kaskády ERK na periferní aktin, sledovali jsme nejprve morfologické změny Δ Raf-1:ER MDCK buněk stimulované 4HT pomocí mikroskopie v reálném čase po dobu dvanácti hodin. Aktivace signální kaskády ERK nejdříve vede k nárůstu buněčné plochy (Obr. 22, 23), který je doprovázen ztrátou epiteliální polarity (Caslavsky *et al.*, 2013). Také jsme pozorovali zvyšující se počet membránových protruzí na periferii kolonie. Při přetrvávající aktivitě signální kaskády ERK dochází k výraznému narušení mezibuněčných kontaktů a k porušení integrity kolonií (Obr. 22). Avšak z neznámých důvodů nedošlo k úplnému rozpadu buněčných kolonií, což je jinak jev běžně pozorovaný.

Abychom vyhodnotili změny v morfologii Δ Raf-1:ER MDCK buněk po stimulaci 4HT, měřili jsme změnu buněčné plochy a buněčné rychlosti v čase. Zvýšení buněčné plochy koreluje se ztrátou epiteliální polarity a změna buněčné rychlosti se ztrátou mezibuněčných spojů a s rozpadem epitelu. Tyto parametry proto nepřímou popisují morfologické změny epiteliálních buněk v průběhu aktivace signální kaskády ERK (Caslavsky *et al.*, 2013). Po šesté hodině od stimulace buněk 4HT jsme pozorovali výrazný nárůst buněčné plochy (Obr. 23A), která koresponduje se ztrátou epiteliální polarity buněk. Aktivace signální kaskády ERK vedla také k nárůstu buněčné rychlosti (Obr. 23B, C), nicméně jsme nepozorovali obdobný zlomový nárůst rychlosti jednotlivých buněk (Obr. 23B).



Obr. 22: Časový průběh morfologických změn v Δ Raf-1:ER MDCK buňkách po stimulaci 4HT. Buňky byly kultivovány po dobu 48 hodin na plastickém podkladu. Poté byly stimulovány 1 μ M 4HT a natáčeny po dobu 12 hodin (6 snímků za hodinu). Grafické měřítko odpovídá 200 μ m.



Obr. 23: Kvantifikace buněčné plochy a rychlosti Δ Raf-1:ER MDCK buněk po stimulaci 4HT. [A] Změna buněčné plochy v čase. [B] Změna dráhy v čase. Buněčná rychlost je v tomto případě prezentována jako celková dráha, kterou buňky urazily za daný časový interval. [C] Průměrná rychlost dosažená v časovém intervalu 48 hodin. Bylo změřeno minimálně 50 buněk pro kontrolní nebo stimulované buňky. Na grafech je zobrazen průměr se směrodatnou odchylkou (na grafu [B] není z důvodu přehlednosti směrodatná odchylka uvedena). Kvantifikace byla provedena z videí, jejichž metodika je popsána u Obr. 22. (, **** $\approx p < 0,001$)

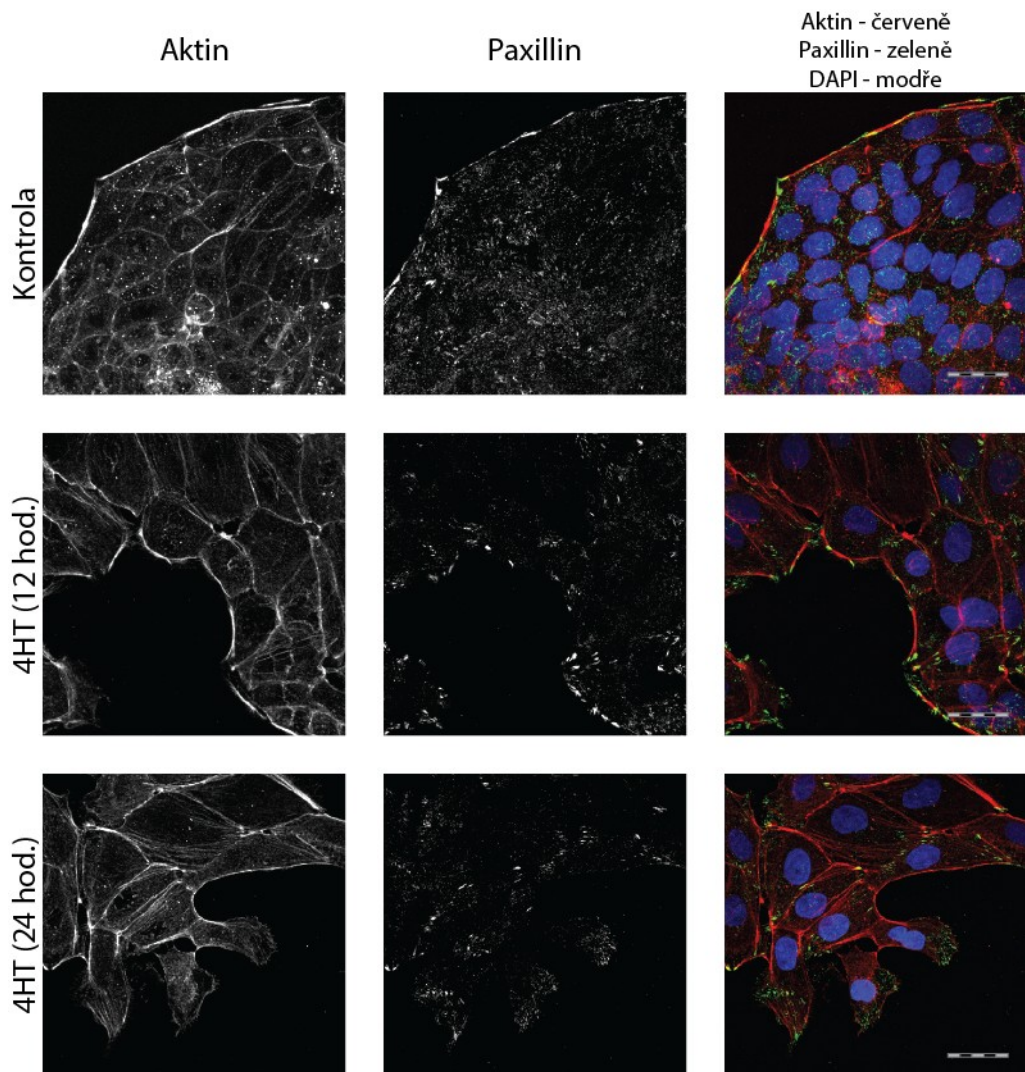
5.2.3. Reorganizace periferního aktinu Δ Raf-1:ER při stimulaci signální kaskády ERK

Dále jsme zjišťovali, zda jsou morfologické změny kolonií Δ Raf-1:ER MDCK buněk po aktivaci signální kaskády ERK doprovázeny reorganizací aktinového cytoskeletu na periférii kolonií. Pozorovali jsme, že aktivace signální kaskády ERK vede k významné přestavbě periferního aktinu (Obr. 24). V prvních fázích dochází k narušení a oslabení periferního aktinu. Lze také pozorovat řadu slabších, paralelně seřazených,

aktinových vláken na okraji kolonie. Po dlouhodobé stimulaci signální kaskády ERK může být struktura periferního aktinu nahrazena lamellipodiem. Buňky s lamellipodiem jsou polarizované a svým vedoucím koncem směřují ven z kolonie.

Periferní aktin je u nestimulovaných buněk pravděpodobně kotven do fokálních adhezí, které jsou organizovány paralelně s okrajem buněk. Naopak po stimulaci signální kaskády ERK a po reorganizaci periferního aktinu jsou fokální adheze uspořádány centripetálně. Také se zdá, že množství fokálních adhezí u buněk na periferii po aktivaci signální kaskády ERK pokleslo, nicméně kvantifikace nebyla provedena (Obr. 24).

Z důvodu vizualizace buněk a buněčných struktur pomocí imunofluorescenční mikroskopie nebyly buňky pěstovány na plastickém, ale na skleněném podkladu. Rozdíl matrice, na které byly MDCK buňky kultivovány, způsobila časovou prodlevu ve změně morfologie MDCK buněk při stimulaci signální kaskády ERK. Došlo ke všem výše popsaným změnám, ale s několikahodinovým zpožděním. Z tohoto důvodu byly buňky kultivované na skleněném podkladu fixovány po delší stimulaci signální kaskády ERK.

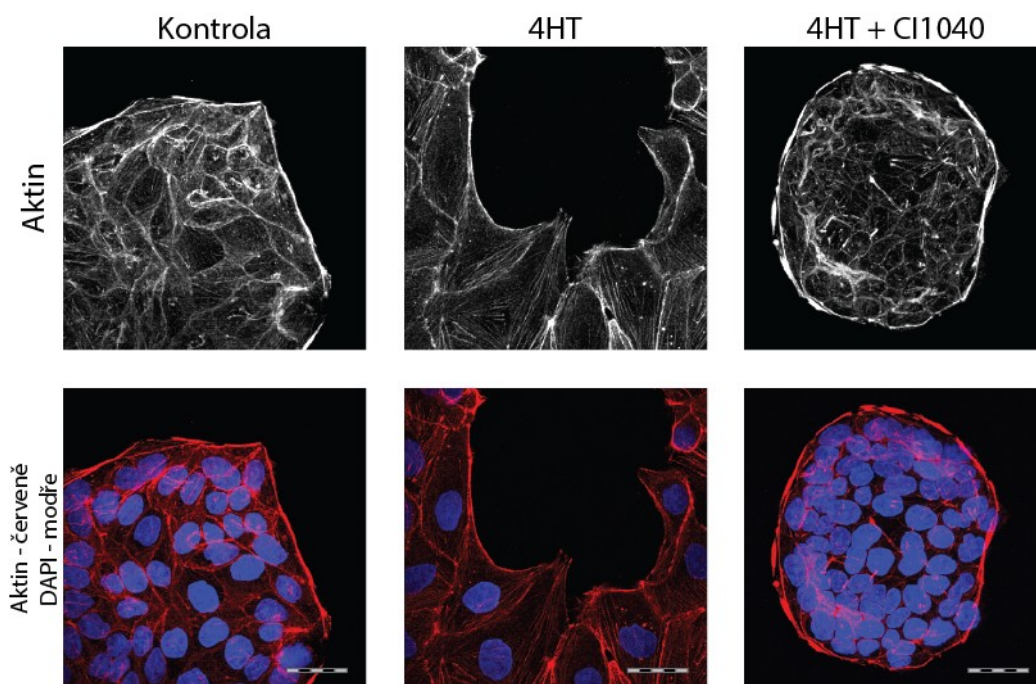


Obr. 24: Změny v aktinovém cytoskeletu Δ Raf-1:ER MDCK buněk během stimulace 4HT. Δ Raf-1:ER MDCK buňky byly kultivovány 48 hodin na krycích sklíčkách, následně 12 nebo 24 hodin stimulovány 1 μ M 4HT a zafixovány. U buněk byl detekován aktinový cytoskelet (faloidin konjugovaný s rhodaminem), fokální adheze (protilátka proti paxillinu) a jádra (DAPI). Grafické měřítko odpovídá 25 μ m.

5.2.4. Inhibice signální kaskády ERK zabrání přestavbě periferního aktinu v Δ Raf-1:ER MDCK buňkách.

Proteinkináza Raf je schopna kromě signální kaskády ERK aktivovat také jiné dráhy, které se mohou podílet na přestavbě aktinového cytoskeletu (Broustas *et al.*, 2002; Ding *et al.*, 2004; Tan *et al.*, 2001). Proto jsme MDCK buňky stimulovali 4HT a současně inhibovali proteinkinázu MEK jejím specifickým inhibitorem CI1040. Za těchto podmínek nebyl periferní aktin narušen či nahrazen dynamickými protruzivními aktinovými strukturami, naopak v některých případech byl silnější než u kontrolních

buněk (Obr. 25). To potvrzuje důležitou roli proteinkinázy ERK v regulaci periferního aktinu.



Obr. 25: Změny periferního aktinu při inhibici signální kaskády ERK v Δ Raf-1:ER MDCK buňkách. Buňky byly po dobu 48 hodin kultivovány na krycích sklíčkách. Následně byly po dobu 16 hodin stimulovány 1 μ M 4HT s nebo bez přítomnosti 2 μ M CI1040 inhibitoru, zafixovány a nabarveny na aktinový cytoskelet (faloidin konjugovaný s rhodaminem) a jádra (DAPI). Grafické měřítko odpovídá 25 μ m.

5.2.5. Shrnutí kapitoly

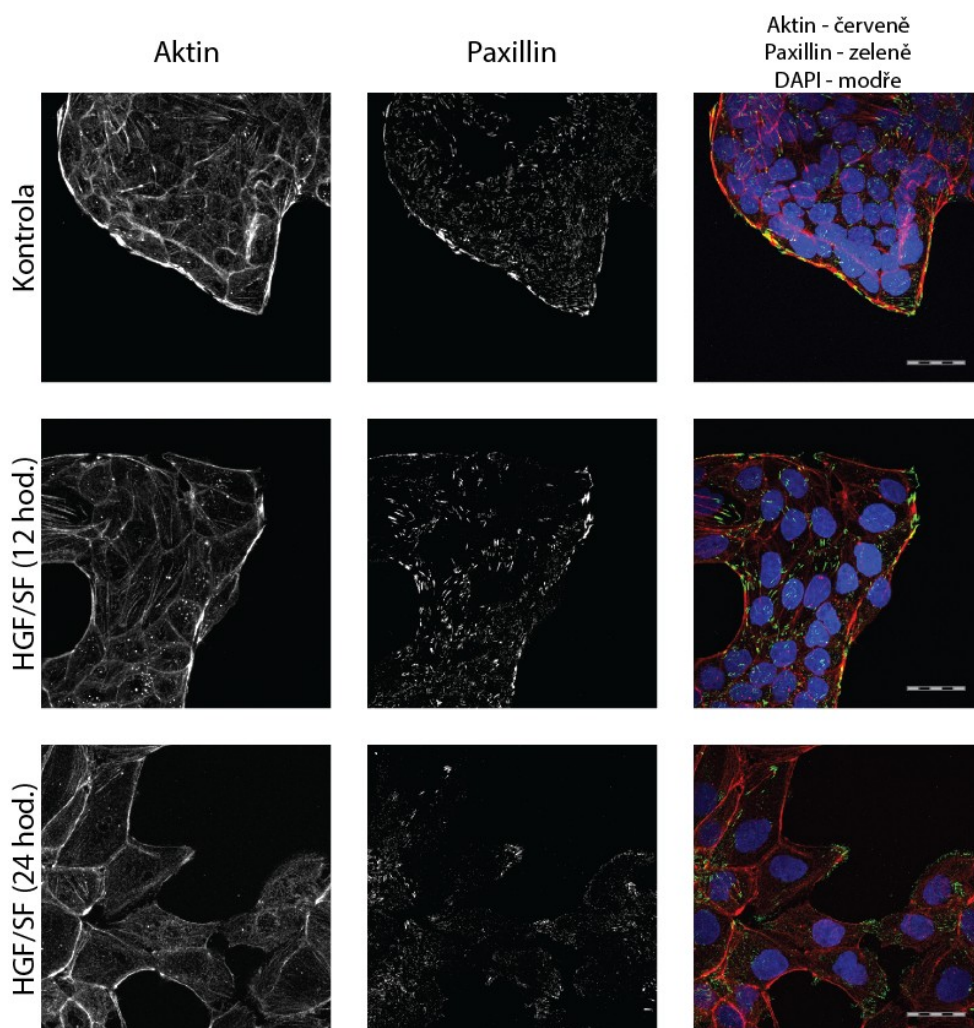
Během stimulace signální kaskády ERK pomocí 4HT dochází k morfologickým změnám buněk v kolonii MDCK buněk, které stabilně exprimují Δ Raf-1:ER. Ty jsou doprovázeny narušením a reorganizací periferních aktinových svazků a zformováním dynamické protruzivní struktury. Inhibice signální kaskády ERK u stimulovaných buněk zabrání přestavbě periferního aktinu.

5.3. Změny periferního aktinu v parentální linii MDCK buněk

V dalším kroku jsme se rozhodli zopakovat dílčí experimenty také v parentální linii MDCK buněk. Chtěli jsme si být jisti, že se nejedná o efekt umělého systému založeného na Δ Raf-1:ER konstrukt, a že je možné dosáhnout stejných změn v aktinovém cytoskeletu i za přirozených podmínek. Pro dlouhodobou stimulaci signální kaskády ERK jsme použili růstový faktor HGF/SF.

5.3.1. Stimulace MDCK buněk růstovým faktorem HGF/SF remodeluje periferní aktin

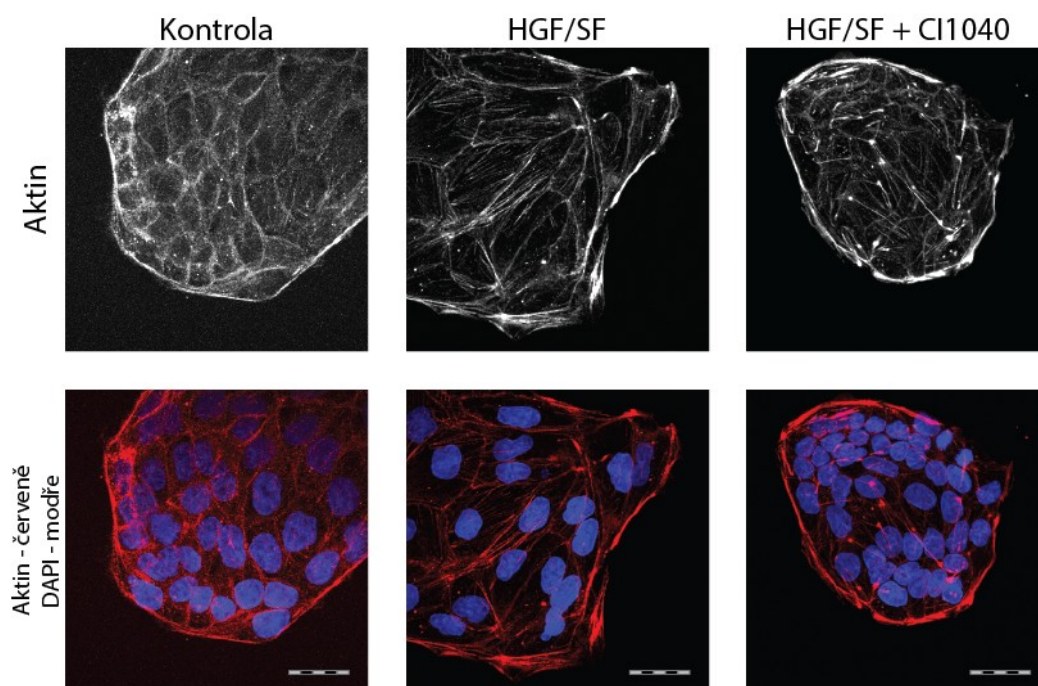
Stejně jako v případě stimulace MDCK buněk s Δ Raf-1:ER konstruktem jsme u parentální linie po stimulaci růstovým faktorem HGF/SF pozorovali změny v aktinovém cytoskeletu na periférii kolonií. Tato struktura se postupně rozpadá na menší části a je oslabena. V řadě případů periferní aktin téměř chybí nebo je nahrazen lamellipodiem. Také dochází k reorganizaci fokálních adhezí z paralelního uspořádání na centripetální. Zdá se, že fokální adheze u buněk na periférii kolonií jsou lokalizovány zejména v lamellipodiou nebo v ostatních buněčných protruzích (Obr. 26).



Obr. 26: Změny v aktinovém cytoskeletu v parentální linii MDCK buněk po stimulaci růstovým faktorem HGF/SF. MDCK buňky byly kultivovány 48 hodin na krycích sklíčkách, následně 12 nebo 24 hodin stimulovány 100 ng/μl HGF/SF a zafixovány. U buněk byl detekován aktinový cytoskelet (faloidin konjugovaný s rhodaminem), fokální adheze (protilátka proti paxillinu) a jádra (DAPI). Grafické měřítko odpovídá 25 μm.

5.3.2. Inhibice proteinkinázy MEK zabrání remodelaci periferního aktinu v parentální linii MDCK buněk

Jako důkaz, že signální kaskáda ERK je nezbytná pro remodelaci periferního aktinu při stimulaci růstovým faktorem HGF/SF, jsme se rozhodli současně stimulovat MDCK buňky růstovým faktorem HGF/SF a inhibovat kinázu MEK inhibitorem CI1040. I v tomto případě inhibice efektorové proteinkinázy zamezila přestavbě periferního aktinu a buňky si udrželi aktinové struktury srovnatelné s kontrolními buňkami (Obr. 27)

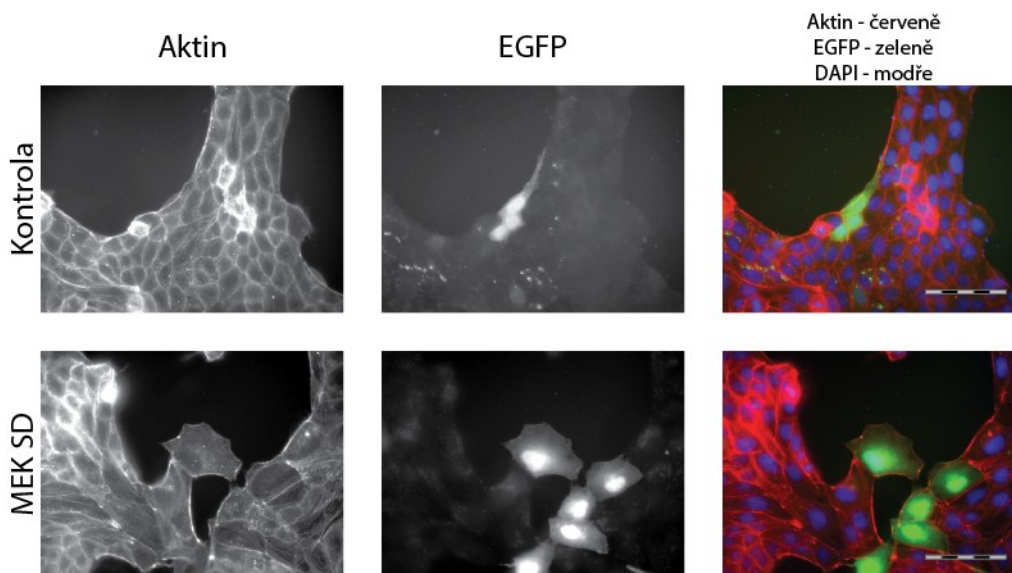


Obr. 27: Změny v periferním aktinu u parentální linie MDCK buněk při inhibici proteinkinázy MEK. Buňky byly po dobu 48 hodin kultivovány na krycích sklíčkách. Následně byly po dobu 16 hodin stimulovány 100 ng/μl HGF/SF s nebo bez 2 μM CI1040, zafixovány a nabarveny na aktinový cytoskelet (faloidin konjugovaný s rhodaminem) a jádra (DAPI). Grafické měřítko odpovídá 25 μm.

5.3.3. Konstitutivně aktivní proteinkináza MEK mění organizaci aktinového cytoskeletu v MDCK buňkách

Proteinkinázy ERK1 a ERK2 jsou jediným známým substrátem proteinkinázy MEK (Roberts a Der, 2007). Abychom jednoznačně prokázali, že aktivace proteinkináz ERK je nejen nutná, ale i dostatečná pro pozorované morfologické změny, vnesli jsme do MDCK buněk konstitutivně aktivní formu proteinkinázy MEK1 (MEK SD; mutantní lidská proteinkináza MEK1). Po transienční transfekci MDCK buněk konstitutivně aktivní proteinkinázou MEK1 jsme pozorovali změny v aktinovém cytoskeletu

srovnatelné s předchozími výsledky, dosažené pomocí 4HT nebo růstovým faktorem HGF/SF. Buňky ztratily epiteliální polaritu a staly se samostatnými. Periferní aktin byl oslaben a buňky na okraji kolonie vytvářely lamellipodium a ostatní membránové protruze (Obr. 28).



Obr. 28: Změny v aktinovém cytoskeletu MDCK buněk po transienční transfekci konstitutivně aktivní proteinkinázou MEK. MDCK buňky byly po dobu 36 hodin kultivovány na krycích sklíčkách, následně byly transfekovány plasmidem kódujícím konstitutivně aktivní proteinkinázu MEK a fluorescenční protein EGFP (MEK SD v pIRES plasmidu) a po 36 hodinách zafixovány. Buňky byly poté nabarveny na aktinový cytoskelet (faloidin konjugovaný s rhodaminem) a jádra (DAPI). Buňky exprimující MEK SD byly identifikovány pomocí exprese EGFP. Grafické měřítko odpovídá 100 μm .

5.3.4. Shrnutí kapitoly

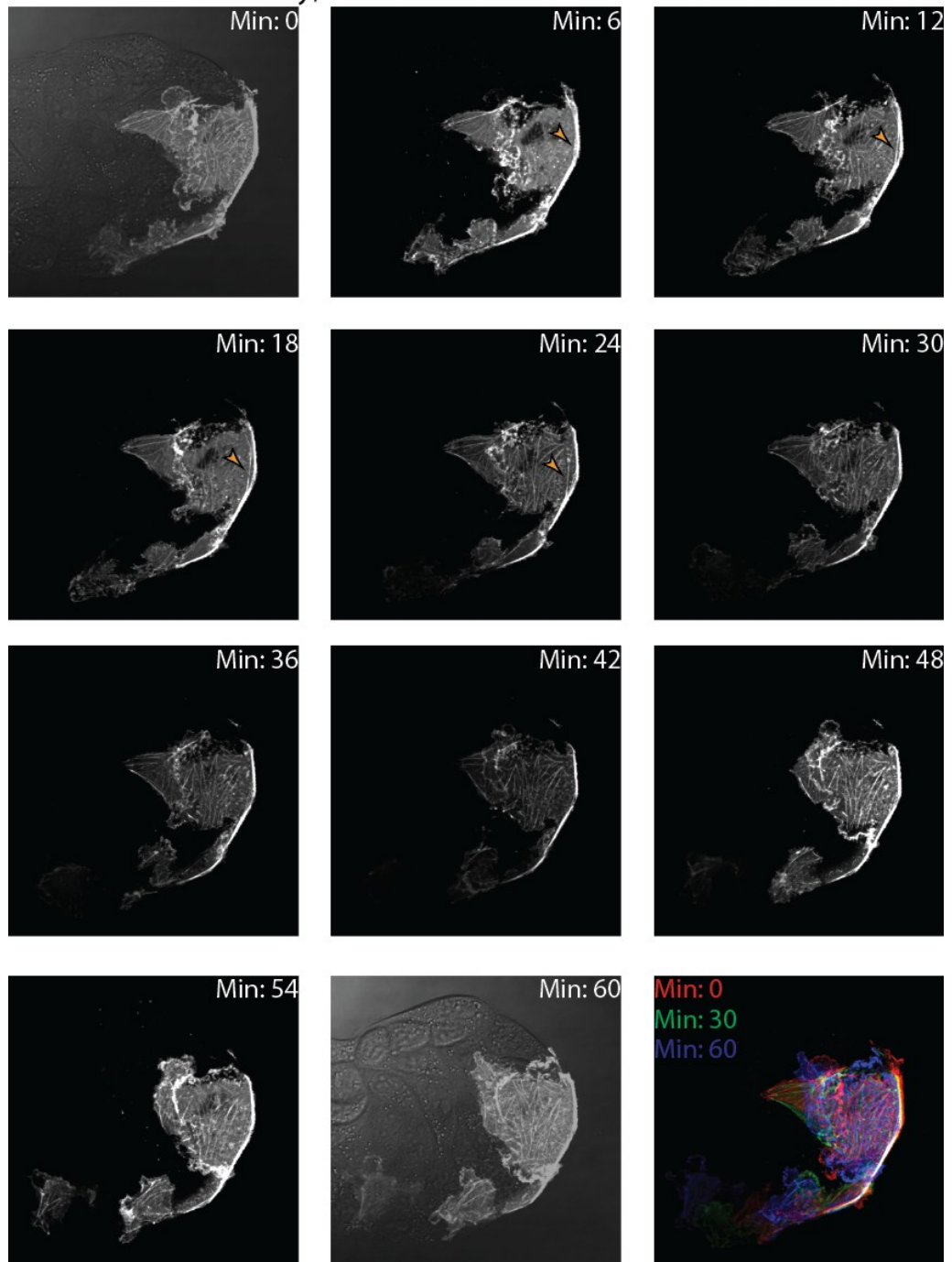
Stimulace MDCK buněk růstovým faktorem HGF/SF vyvolává u buněk oslabení a rozpad aktinového cytoskeletu na okraji kolonií a také v těchto oblastech dochází ke vzniku lamellipodia. Těmto změnám zabrání inhibice signální kaskády ERK. Stimulace parentální linie MDCK buněk pomocí růstového faktoru HGF/SF má na periferní aktin shodný efekt, jako stimulace linie $\Delta\text{Raf-1:ER}$ MDCK pomocí 4HT nebo exprese konstitutivně aktivní proteinkinázy MEK. Souhrně tyto výsledky ukazují, že aktivace signální kaskády ERK je nejen nutná, ale i dostatečná k remodelaci periferního aktinu a rozpadu epiteliální struktury MDCK buněk.

5.4. Periferní aktin se skládá z řady menších vláken

Dále jsme sledovali změny v periferním aktinu v čase v závislosti na aktivitě signální kaskády ERK. Do buněk jsme stabilně vložili konstrukt, který kóduje aktin fúzovaný s červeným fluorescenčním proteinem (RFP-actin MDCK; viz kap. 4.3. Příprava stabilních linií). Toto je jediná vytvořená stabilní linie použitá v této práci, ze které při přípravě nebyl izolován klon, proto buňky vykazují rozdílnou expresi.

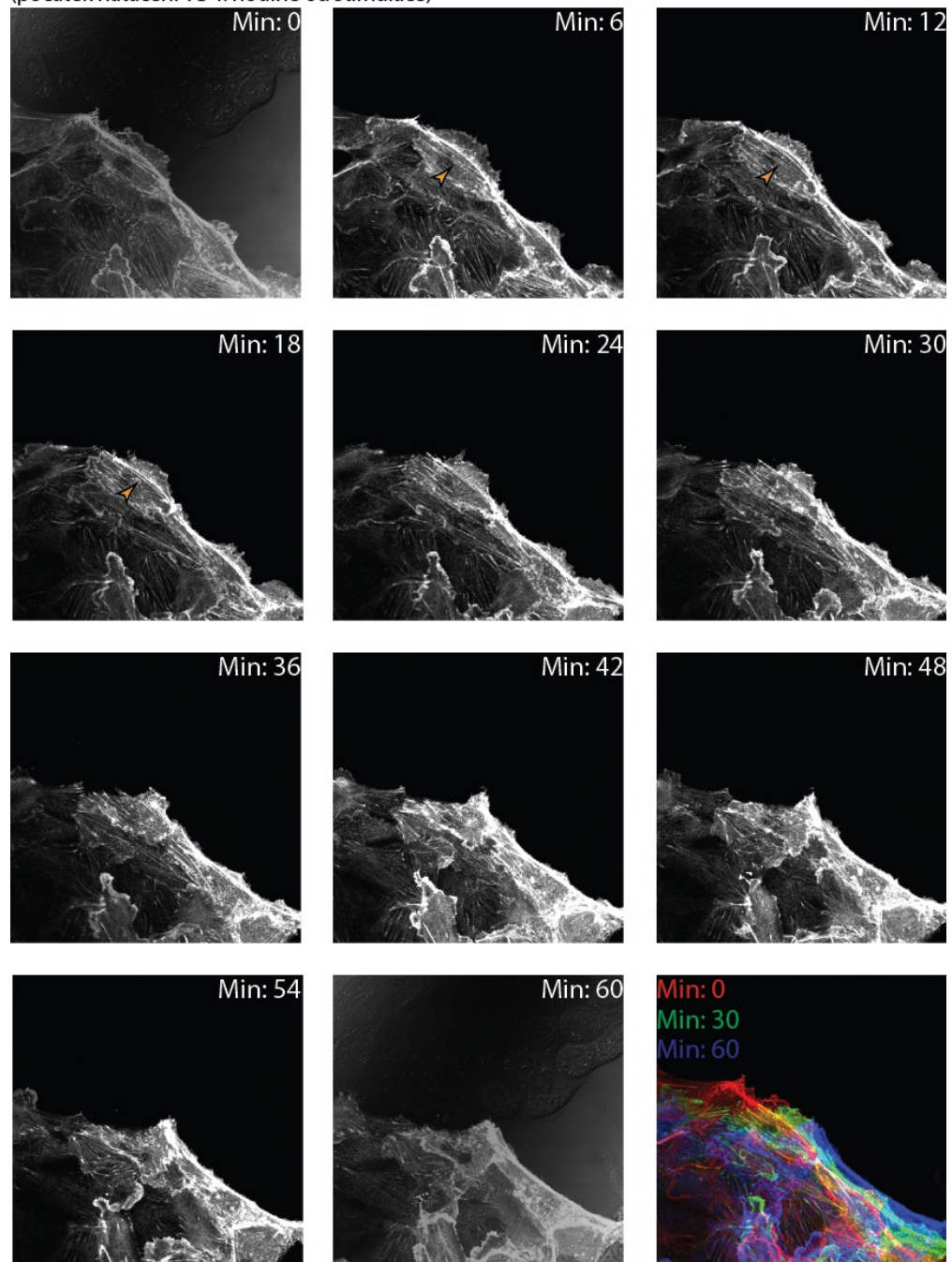
Živé MDCK buňky stabilně exprimující RFP-actin jsme sledovali pomocí konfokální mikroskopie a následně analyzovali změny v reorganizaci periferního aktinu. Zjistili jsme, že periferní aktin a stresová vlákna jsou v nestimulovaných buňkách málo dynamické struktury a v čase se reorganizují pouze při přemísťování buňky v rámci kolonie. Naopak dynamika nově formovaných protruzí mezi sousedními buňkami uvnitř kolonie je značná a je konzistentní s naším pozorováním, že buňky v rámci kolonie migrují (Obr. 29A). Pokud ale buňky stimulujeme růstovým faktorem HGF/SF, dochází k dynamickým změnám ve struktuře periferního aktinu. Ten se rozpadá na řadu slabších aktinových vláken, která se ale mohou formovat zpět do struktury silného periferního aktinového svazku (Obr. 29B). Rozpad nebo uvolňování vláken z periferního aktinu byly v omezené míře pozorovány také u nestimulovaných buněk. Tento proces je ale méně dynamický. Použitý postup je pro buňky náročný a změny v aktinovém cytoskeletu bylo možné sledovat pouze po dobu jedné hodiny. Nicméně získaná data naznačují, že lamellipodium či ostatní protruze by mohly vznikat přestavbou periferního aktinu.

RFP-actin MDCK buňky; Kontrola



Obr. 29 [A]; Legenda k tomuto obrázku je na následující straně.

RFP-actin MDCK buňky; stimulace HGF/SF
(počátek natáčení ve 4. hodině od stimulace)



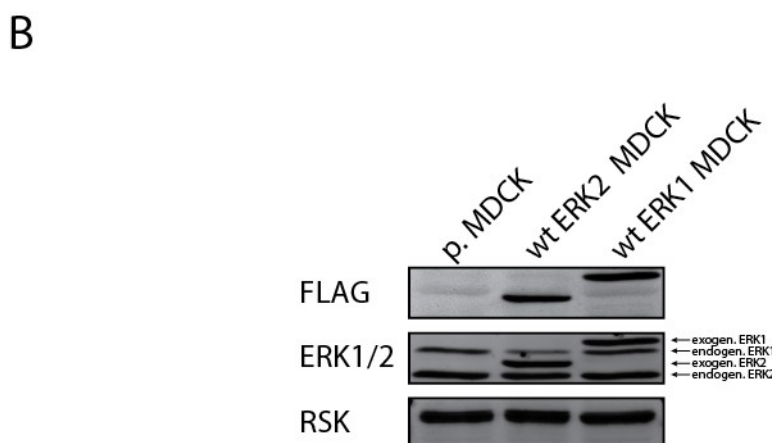
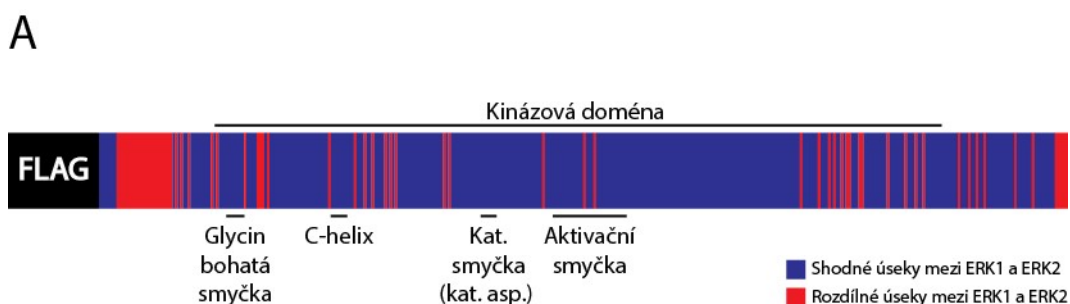
Obr. 29: Časový průběh změn v aktinovém cytoskeletu v MDCK buňkách po stimulaci růstovým faktorem HGF/SF. MDCK buňky exprimující fluorescenčně značený aktin byly kultivovány po dobu minimálně 36 hodin na skleněném podkladu. Poté byly buňky bez přítomnosti růstového faktoru HGF/SF [A] nebo s HGF/SF [B] po dobu 1 hodiny natáčeny na konfokálním mikroskopu (30 snímků za hodinu). Zachycené změny v aktinovém cytoskeletu v přítomnosti 100 ng/μl HGF/SF se odehrály mezi 4.-5. hodinou od začátku stimulace. Při natáčení byla snímána pouze tenká fokální rovina těsně u podložního sklíčka. První (t=0 min) a poslední (t=60 min) snímek v hodinovém intervalu je doplněn o fázové fotografie kolonie. Barevně (červeně, zeleně a modře) jsou zvýrazněny změny v aktinovém cytoskeletu během jedné hodiny (3 časové intervaly). Oranžovými šipkami jsou zvýrazněna vlákna, kterými je periferní aktin pravděpodobně tvořen.

5.5. Vliv efektorových proteinkináz ERK1 a ERK2 na morfologii MDCK buněk a přestavbu periferního aktinu

Proteinkinázy ERK1 a ERK2 jsou ko-exprimovány ve většině tkání, na daný podnět jsou obě izoformy paralelně aktivovány a mají řadu společných substrátů (Lefloch *et al.*, 2009; Yoon a Seger, 2006). Řada studií nerozlišuje mezi izoformami proteinkinázy ERK, a pokud mezi nimi rozlišuje, považuje je za ekvivalentní (Yoon a Seger, 2006). Ale v případě buněčné migrace se ukazuje, že proteinkináza ERK2 je esenciální, a naopak proteinkináza ERK1 zcela postradatelná (von Thun *et al.*, 2012). Dále bylo pozorováno, že ektopická exprese proteinkinázy ERK2 výrazně mění morfologii epiteliálních buněk, zatímco ektopická exprese proteinkinázy ERK1 znatelné změny v morfologii nevyvolá (Shin *et al.*, 2010). Proto jsme se rozhodli zjistit, zda i na přestavbu periferního aktinu je potřebná proteinkináza ERK2, nebo zda jsou obě izoformy v tomto ohledu ekvivalentní. Z tohoto důvodu, s ohledem na potřebnou uniformitu buněk a s ohledem na následující postup (použitý v kapitole 5.6.), jsme vytvořili linie MDCK buněk, do kterých byly stabilně vloženy geny pro proteinkinázu ERK1 nebo ERK2 obsahující FLAG-epitop na N-konci (na schématech jsou tyto linie označovány jako wt ERK1 MDCK a wt ERK2 MDCK; viz kap. 4.3 Příprava stabilních linií).

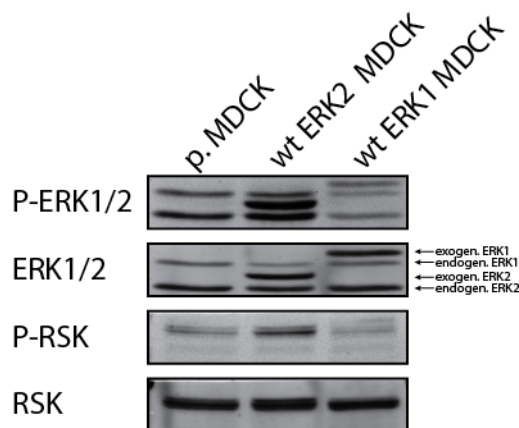
5.5.1. Biochemický popis linií MDCK buněk s ektopickou expresí proteinkinázy ERK1 a ERK2

Přítomnost sekvence FLAG na N-konci u vložených proteinkináz mění pohyblivost v akrylamidovém gelu, což nám umožnilo rozlišit endogenní a exogenní formy proteinkinázy ERK (Obr. 30A). Byly vybrány takové klony, kde je podobná exprese exogenních variant proteinkináz ERK1 a ERK2. Expres endogenních forem proteinkináz ERK1 a ERK2 nebyly ektopickou expresí proteinkinázy ERK ovlivněny (Obr. 30B; viz kap. 4.3. Příprava stabilních linií).



Obr. 30: Expresse exogenních forem proteinkináz ERK1 a ERK2 v MDCK buňkách. [A] Schéma vložených genů proteinkináz ERK1 a ERK2 do MDCK buněk. Na schématu jsou vyznačeny základní funkční domény proteinkinázy ERK a barevně jsou odlišeny rozdíly mezi proteinkinázou ERK1 a ERK2. Značka FLAG na N-konci není v měřítku se schematickým znázorněním proteinkinázy ERK1/2. [B] Porovnání exprese proteinkináz ERK1 a ERK2 v MDCK buňkách u používaných klonů. Pro porovnání nanášky byla použita detekce proti proteinkináze RSK. Označení „p. MDCK“ indikuje parentální linii MDCK buněk.

MDCK buňky s ektopickou expresí proteinkinázy ERK1 nebo ERK2, které rostly za stejných podmínek (tedy ve stejném složení média, teploty a množství CO₂ v atmosféře) přibližně ve stejné konfluenci a které nebyly ničím stimulovány, vykazovaly odlišnou aktivitu signální kaskády ERK (Obr. 31). Analýza buněčných lysátů ukázala, že aktivita endogenních proteinkináz ERK1 a ERK2 nebyla ektopickou expresí významně ovlivněna. Nicméně ektopicky trimovaná forma proteinkinázy ERK2 byla aktivována mnohem více než ERK1 (Obr. 31). Také jsme pozorovali odlišnou aktivitu proteinkináz RSK v připravených stabilních liniích (Obr. 31). Ektopická exprese proteinkinázy ERK1 snížila aktivaci proteinkinázy RSK, naopak vysoká exprese proteinkinázy ERK2 aktivitu proteinkinázy indukovala.

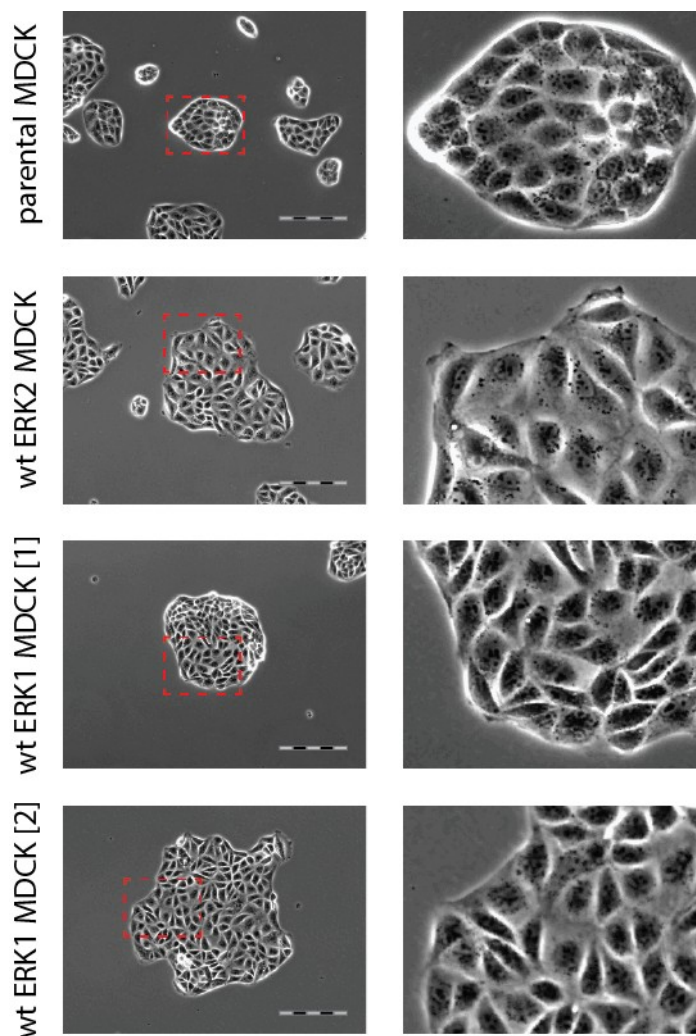


Obr. 31: Porovnání aktivity proteinkináz ERK1, ERK2 a RSK v MDCK buňkách. Lyzáty byly připraveny z buněk, které byly kultivovány po dobu 48 hodin na plastickém povrchu. Byla provedena detekce na proteinkinázy ERK1/2, P-ERK (TEY motiv), RSK a P-RSK (Ser221).

5.5.2. Morfologie MDCK buněk ektopicky exprimující proteinkinázu ERK1 a ERK2

Ektopická exprese proteinkináz ERK1 a ERK2 vedla k morfologickým změnám MDCK buněk (Obr. 32). MDCK buňky s ektopickou expresí proteinkinázy ERK2 jsou stále schopny formovat kolonie, avšak mezibuněčné spoje buněk v kolonii jsou velmi narušeny. V některých případech docházelo k úplné ztrátě kontaktu mezi buňkami. Bylo možné pozorovat buňky, které opustily kolonii a po několika desítkách minut se k ní opět připojily. Buňky zaujímaly větší plochu v porovnání s parentální linií a buňky na okraji kolonie měly většinou výrazné protruze (Obr. 32).

Výše popsání změny vyvolané ektopickou expresí proteinkinázy ERK2 bylo možné pozorovat u více než 90% buněk. V případě ektopické exprese proteinkinázy ERK1 jsme pozorovali dva odlišné fenotypy přibližně ve stejném poměru (Obr. 32). První subpopulace buněk (označovaná jako wt ERK1 MDCK [1]) byla porovnatelná s parentální linií. Buňky tvořily zaoblené kolonie, měly mezi sebou silné mezibuněčné spoje a okrajové buňky neměly žádné, nebo velice drobné protruze. Morfologie druhé subpopulace buněk (označovaná jako wt ERK1 MDCK [2]) byla více podobná morfologii buněk s ektopickou expresí proteinkinázy ERK2. Buňky vykazovaly částečnou ztrátu epiteliální polarity a formování protruzí na okraji kolonie.

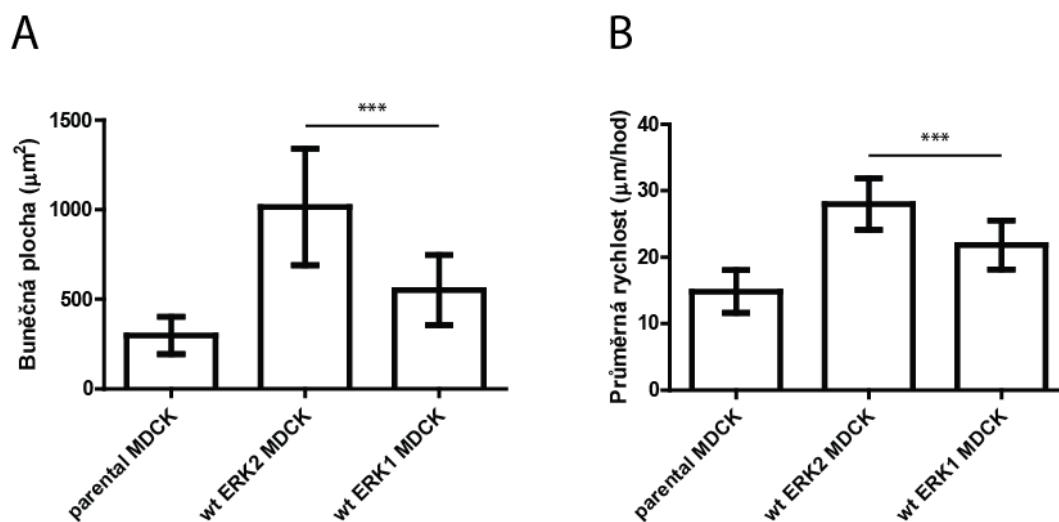


Obr. 32: Morfologické změny MDCK buněk vyvolané ektopickou expresí proteinkináz ERK1 a ERK2. Snímky kolonií parentální linie MDCK buněk a buněk s ektopickou expresí proteinkinázy ERK1 a ERK2 byly pořízeny po 48 hodinách kultivace za stejných podmínek. Na snímcích jsou zobrazeny obě pozorované subpopulace MDCK buněk s ektopickou expresí proteinkinázy ERK1. Grafické měřítko odpovídá 200 μm .

5.5.3. MDCK buňky s ektopickou expresí proteinkinázy ERK2 zaujímají vyšší plochu a jsou rychlejší než buňky s ektopickou expresí proteinkinázy ERK1

Pro porovnání změn ve vlastnostech buněk, které vyvolá ektopická exprese proteinkináz ERK1 a ERK2, jsme se rozhodli změřit buněčnou plochu a buněčnou rychlost. V případě buněk s ektopickou expresí proteinkinázy ERK1 byly kvantifikovány obě subpopulace buněk a naměřené hodnoty byly následně zprůměrovány. Protože buňky na periferii kolonií mohou mít protruze, které mohou výrazně zvýšit buněčnou plochu, byl při kvantifikaci ve všech liniích dodržen stejný poměr periferních buněk a buněk uvnitř kolonie.

Obě stabilní linie měly měřené parametry vyšší a statisticky významné v porovnání s parentální linií MDCK buněk (Obr. 33). Avšak ektopická exprese proteinkinázy ERK2 vyvolala také výraznější změny v morfologii, než proteinkináza ERK1.



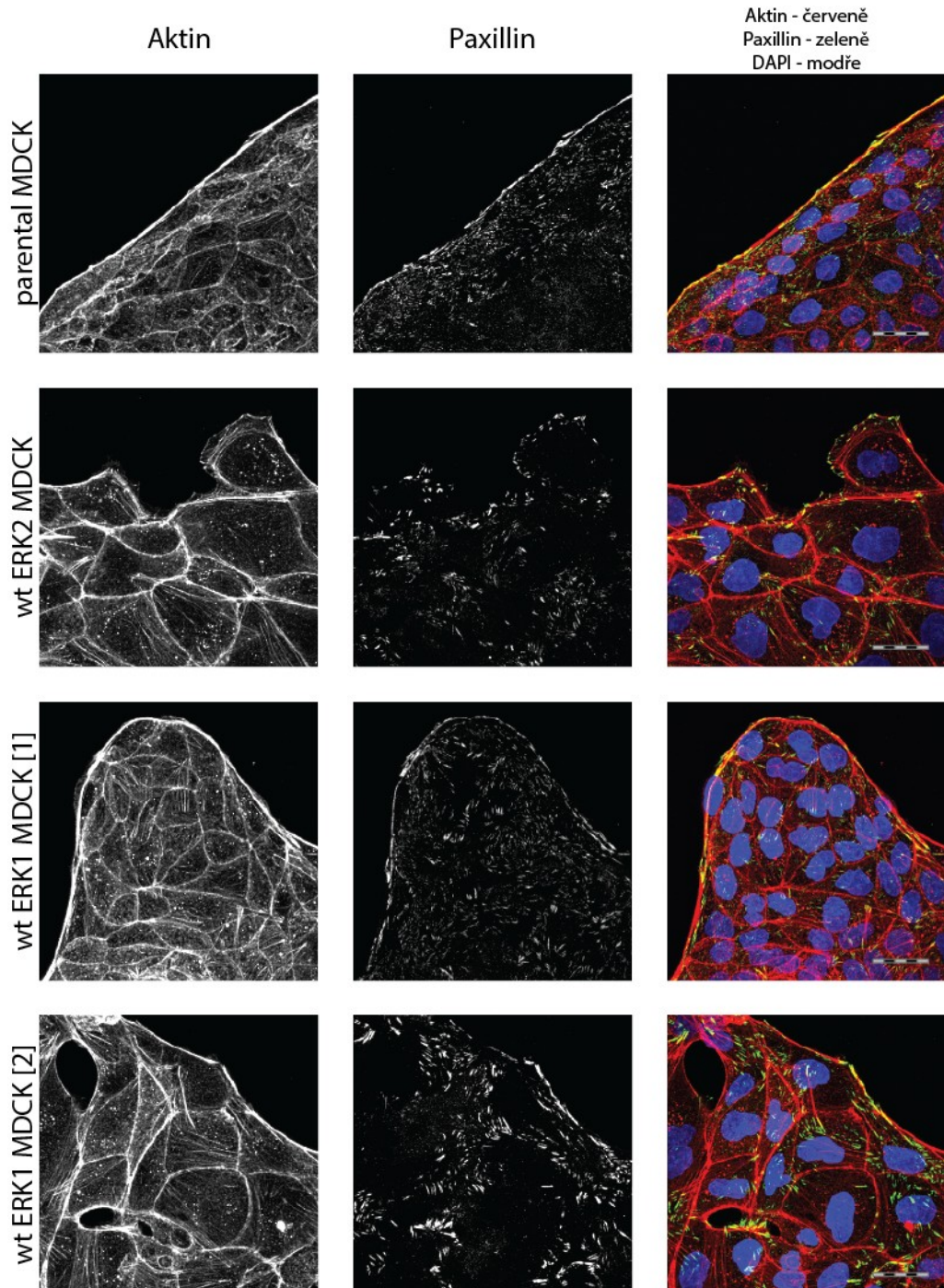
Obr. 33: Kvantifikace změny buněčné plochy a rychlosti v MDCK buňkách vyvolaných ektopickou expresí proteinkináz ERK1 a ERK2. Linie MDCK buněk byly kultivovány po dobu 48 hodin na plastickém podkladu a následně po dobu 8 hodin natáčeny (6 snímků za hodinu). Z pořízených videí byla provedena kvantifikace. [A] Kvantifikace buněčné plochy. [B] Kvantifikace buněčné rychlosti. Na obou grafech je vyneseno průměrné se směrodatnou odchylkou. Naměřené hodnoty pro každou linii byly získány z minimálně 50 buněk. (,**** ≈ p<0,001)

5.5.4. Proteinkináza ERK2 reorganizuje periferní aktinový cytoskelet v MDCK buňkách

Pozorované změny MDCK buněk s ektopickou expresí proteinkinázy ERK1 nebo ERK2 se projeví také na organizaci periferního aktinového cytoskeletu (Obr. 34). Vysoká exprese proteinkinázy ERK2 způsobila oslabení nebo rozpad periferního aktinu na řadu slabších aktinových vláken. V místech, kde byl periferní aktin oslaben, byly velice často formovány protruze. V některých případech struktura periferního aktinu chyběla a byla nahrazena lamellipodiem. Ektopická exprese proteinkinázy ERK2 také výrazně redukovala množství fokálních adhezí. Periferní buňky měli fokální adheze formovány především v buněčných protruzích a v lamellipodi.

Vysoká exprese proteinkinázy ERK1 nevyvolala v porovnání s proteinkinázou ERK2 výrazné změny v periferním aktinu (Obr. 34). Ten zůstal zpravidla srovnatelný s parentální linií a nedošlo u něj k výraznějším přestavbám. U buněk, které svou

morfologií byly bližší projevům proteinkinázy ERK2, byl periferní aktin slabší, ale stále ucelený. U obou subpopulací byl periferní aktin lemován velkým množstvím fokálních adhezí.

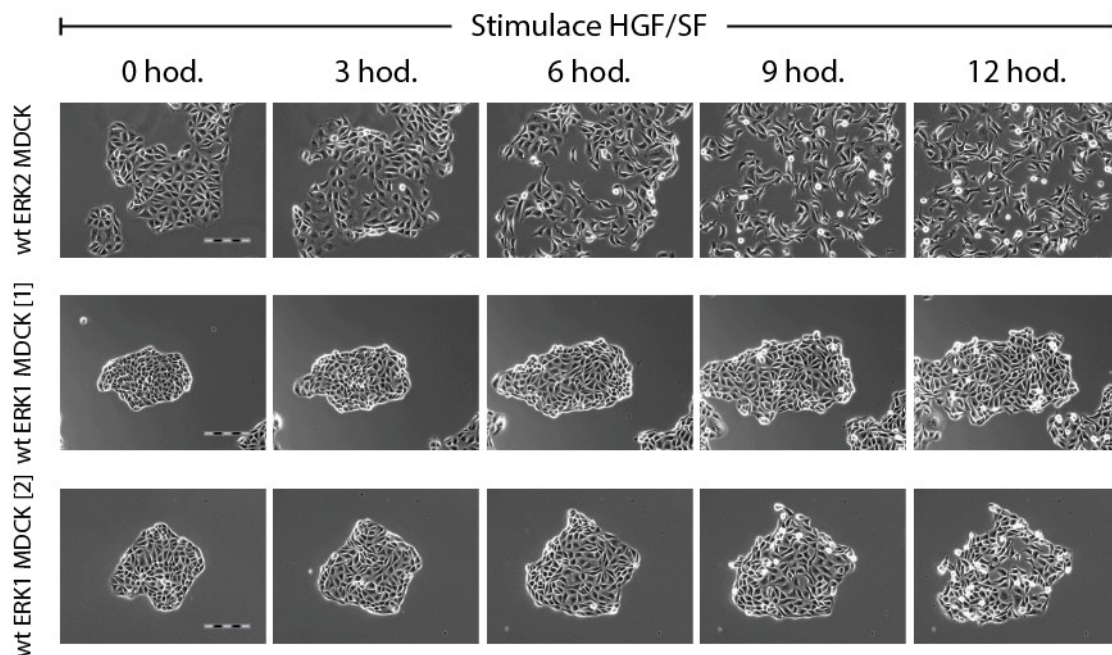


Obr. 34: Změny v aktinovém cytoskeletu MDCK buněk při ektopické expresi proteinkináz ERK1 a ERK2. Linie MDCK buněk byly po dobu 48 hodin kultivovány na skleněném podkladu, následně zafixovány a nabarveny na aktinový cytoskelet (faloidin konjugovaný s rhodaminem), fokální adheze (protilátka proti paxillinu) a jádra (DAPI). U linie s ektopickou expresí proteinkinázou ERK1 je zobrazen aktinový cytoskelet a fokální adheze obou subpopulací. Grafické měřítko odpovídá 25 μm .

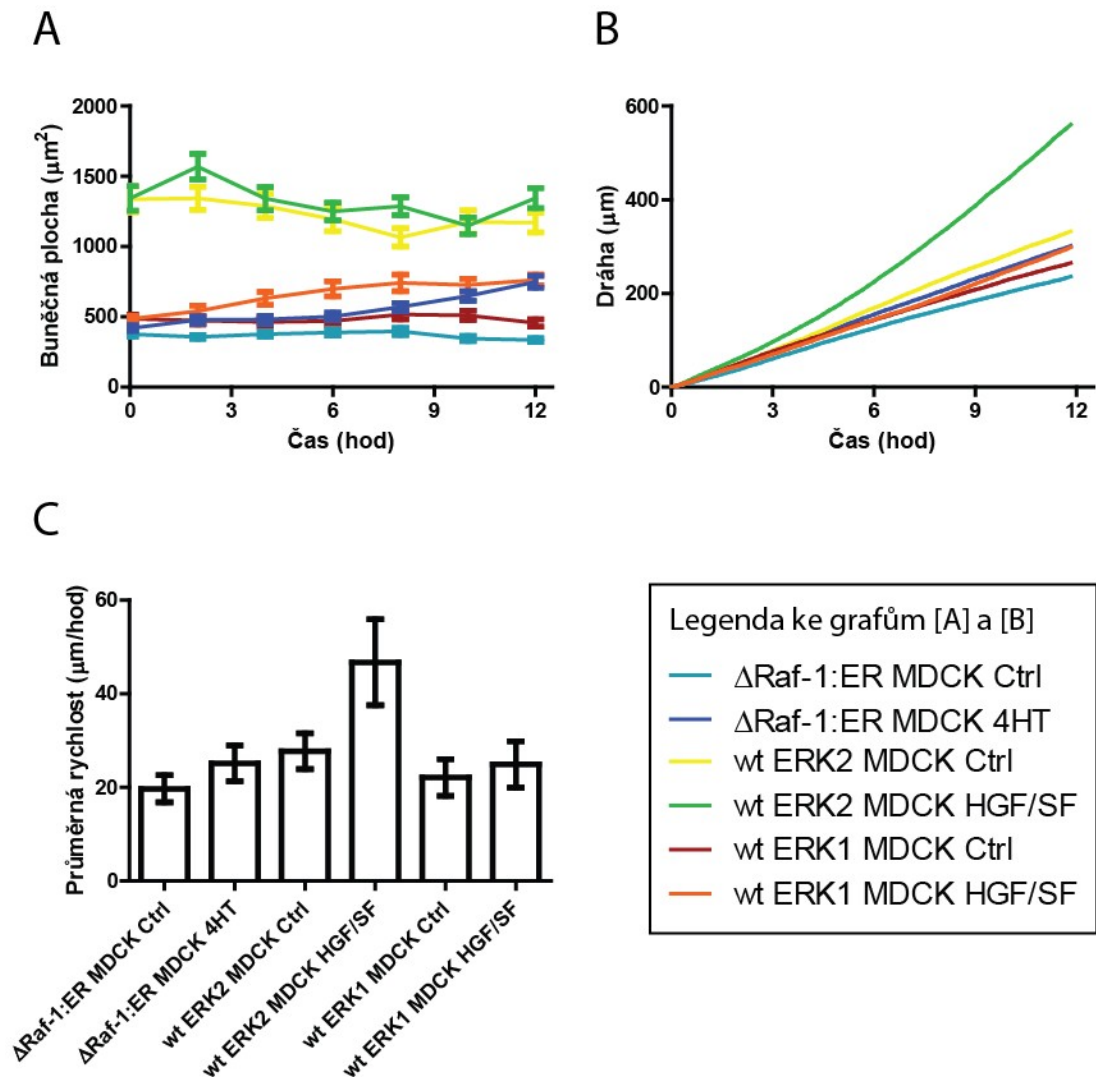
5.5.5. Linie MDCK buněk s ektopickou expresí proteinkinázy ERK2 reaguje na růstový faktor HGF/SF intenzivněji

Jelikož ektopická exprese proteinkinázy ERK1 nebo ERK2 nevede ke kompletnímu rozpadu kolonií, rozhodli jsme se připravené stabilní linie stimulovat růstovým faktorem HGF/SF a sledovat změny v morfologii buněk a buněčných kolonií. Růstový faktor HGF/SF neměl na buňky s ektopickou expresí proteinkinázy ERK1 vliv a zpravidla nedošlo k desintegraci mezibuněčných spojů a zisku autonomie. Výjimkou byly buňky, které byly svou morfologií bližší buňkám s ektopickou expresí proteinkinázy ERK2, kdy v pozdějších časových intervalech bylo možné pozorovat buňky, které se morfologicky podobaly buňkám mezenchymálním. Naopak MDCK buňky s ektopickou expresí proteinkinázy ERK2 výrazně reagovaly na přítomnost růstového faktoru HGF/SF a velice brzy po stimulaci došlo k zisku autonomie a změně morfologie na buňky podobné buňkám mezenchymu (Obr. 35).

Překvapivé je, že ani v jednom případě nedošlo k výraznějším změnám v buněčné ploše (Obr. 36A). Tato naměřená data naznačují, že proteinkináza ERK1 brání ztrátě epiteliální polarity. Naopak, pouhé zvýšení exprese proteinkinázy ERK2 vyvolá ztrátu epiteliální polarity. Dále jsme pozorovali rychlost stimulovaných a nestimulovaných MDCK buněk s ektopickou expresí proteinkinázy ERK1 a ERK2. Po stimulaci růstovým faktorem HGF/SF došlo k okamžitému a prudkému nárůstu migrace, která se při grafickém vynesení hodnot projevuje zlomem křivky (Obr. 36B). Naopak buňky s ektopickou expresí proteinkinázy ERK1 vykazovaly po stimulaci růstovým faktorem HGF/SF malý nárůst migrace (Obr. 36B, C) a nedošlo ke zlomu křivky po grafickém vynesení hodnot (Obr. 36B).



Obr. 35: Změny v morfolonii MDCK buněk s ektopickou expresí proteinkináz ERK1 a ERK2 po stimulaci růstovým faktorem HGF/SF. MDCK buňky ektopicky exprimující proteinkinázu ERK1 nebo ERK2 byly po dobu 48 hodin kultivovány na plastickém podkladu, následně stimulovány 100 ng/μl HGF/SF po dobu 12 hodin. Grafické měřítko odpovídá 200 μm.



Obr. 36: Kvantifikace buněčné plochy a rychlosti migrace MDCK buněk s ektopickou expresí proteinkináz ERK1 a ERK2 po stimulaci růstovým faktorem HGF/SF. Kvantifikace byla získána z videí pořízených za podmínek popsanych u Obr. 35. [A] Průměrná rychlost dosažená v časovém intervalu 12 hodin. [B] Změna dráhy v čase. [C] Změna buněčné plochy v čase. Na grafech je vyneseno průměr se směrodatnou odchylkou (u grafu [B] není z důvodu přehlednosti směrodatná odchylka uvedena). Hodnoty byly získány kvantifikací minimálně 50 buněk pro každé měření (≈ 100 buňkám pro každou linii). Pro porovnání byly všechny grafy doplněny o hodnoty pro linii $\Delta\text{Raf-1:ER}$, které byly uvedeny na Obr. 23 (Hodnoty pro linii $\Delta\text{Raf-1:ER MDCK}$ byly získány za stejných podmínek, jako hodnoty pro linie s ektopickou expresí proteinkinázy ERK1 a ERK2; výjimkou je použití 4HT místo růstového faktoru HGF/SF).

5.5.6. Shrnutí kapitoly

Zjistili jsme, že ektopická exprese proteinkinázy ERK2 je dostatečná k tomu, aby indukovala výrazné změny v periferním aktinu, buněčnou morfologii a migraci. Dále proteinkináza ERK2 je MDCK buňkami využívána pro rozpad kolonií MDCK

buněk. Naproti tomu u buněk s vysokou expresí proteinkinázy ERK1 byl periferní aktin stále zformován a buňky byly spíše podobné parentální linii. Zajímavým zjištěním je, že ektopická exprese proteinkinázy ERK1 blokuje nárůst migrace a rozpad buněčných kolonií po stimulaci růstovým faktorem HGF/SF. Protože ektopická exprese proteinkinázy ERK2 měla na změny v MDCK buňkách výraznější efekt, v dalších experimentech jsme využívali pouze proteinkinázu ERK2 a její mutované formy.

5.6. Role vazebných domén proteinkinázy ERK2 při přestavbě periferního aktinu v MDCK buňkách

V této práci jsme ukázali, že signální kaskáda ERK a zvláště pak proteinkináza ERK2 je schopna indukovat přestavbu periferního aktinu v buňkách. Abychom objasnili, jakým způsobem dochází k přenosu signálu z proteinkinázy ERK na cílové efektorové proteiny, využili jsme proteinkináz ERK2 mutovaných v doménách zodpovědných za vazbu substrátů. Proteinkináza ERK má dvě domény, kterými váže rozdílné aminokyselinové motivy na svých substrátech. Jsou jimi CD-doména a DBP-doména, kterými se váže na substrátovou D-doménu, respektive DEF-doménu. Zavedením bodových mutací ve vazebných místech proteinkinázy ERK lze efektivně zabránit interakci s příslušnými substráty a nenarušit kinázovou aktivitu nebo interakci pomocí druhého motivu (Burkhard *et al.*, 2011). Byly vytvořeny dvě linie MDCK buněk, do kterých byly stabilně zaneseny geny proteinkinázy ERK2 s mutací v DBP-doméně (L232 ERK2 MDCK) nebo CD-doméně (DDNN ERK2 MDCK; viz kap. 4.3. Příprava stabilních linií).

Chtěli jsme také zjistit, zda dimerizace proteinkinázy ERK2 je nutná pro přestavbu periferního aktinu. Zdá se, že dimerizace je nutná pro fosforylaci cytoplasmatických substrátů, ale není nutná pro fosforylaci jaderných substrátů (Casar *et al.*, 2008). Tvorbou stabilní linie, která nese dimerizačně defektní variantu proteinkinázy ERK2 (HL-ERK2 MDCK; viz kap. 4.3. Příprava stabilních linií) jsme chtěli více zpřesnit regulaci periferního aktinu.

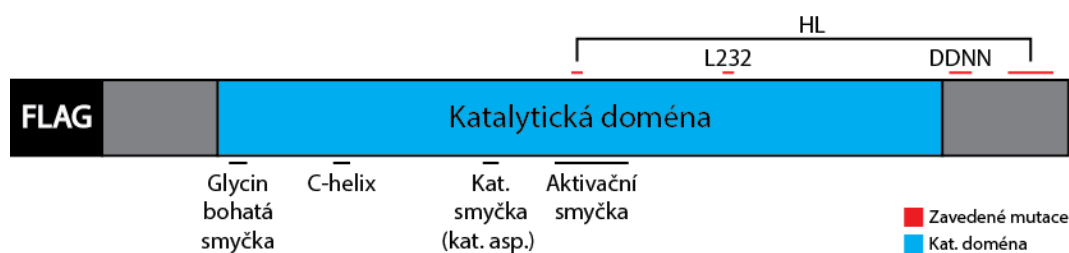
5.6.1. Biochemická charakteristika stabilních linií MDCK buněk s vloženými geny proteinkinázy ERK2

Do MDCK buněk byly stabilně vloženy geny odvozené od proteinkinázy ERK2 se značkou FLAG na N-konci a bodovými mutacemi v interakčních nebo dimerizačních

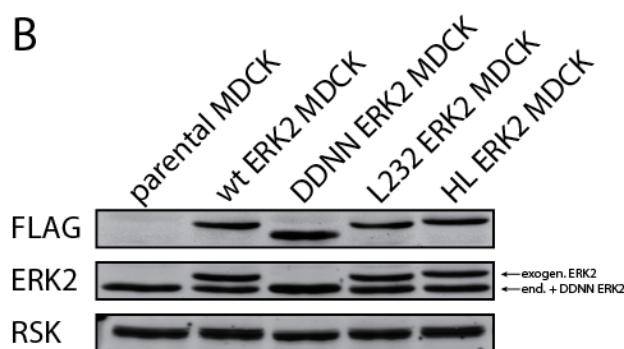
motivech (Obr. 37A). Z připravených klonů pro jednotlivé stabilní linie byly vybrány takové, které mají podobnou expresi vložených genů (Obr. 37B).

Všechny exogenní varianty proteinkinázy ERK2 jsou v MDCK buňkách při standardní kultivaci bez nutnosti stimulace aktivovány (Obr. 38). Protože proteinkináza DDNN ERK2 putuje na akryl-amidovém gelu ve stejné oblasti jako endogenní proteinkináza ERK2 a není tedy možné stanovit její aktivitu přímo v celkových buněčných lyzátech, byly jednotlivé formy exogenní proteinkinázy ERK2 imunoprecipitovány (Obr. 39). Abychom zabránili případné izolaci dimeru endogenní proteinkinázy ERK2 s DDNN ERK2, byl lyzáát před imunoprecipitací sonikován. Z výsledků jsme zjistili (Obr. 38, 39), že v největší míře je aktivována proteinkináza DDNN ERK2, následuje nemutovaná varianta proteinkinázy ERK2, následně proteinkináza L232 ERK2 a nejméně je aktivní HL ERK2. Sledovali jsme také aktivitu proteinkinázy ERK1 (Obr. 38, 39). Ta je aktivní ve všech liniích s výjimkou linie s expresí proteinkinázy DDNN ERK2, kde nebyla za standardní kultivace a bez stimulace aktivní proteinkináza ERK1 detekována.

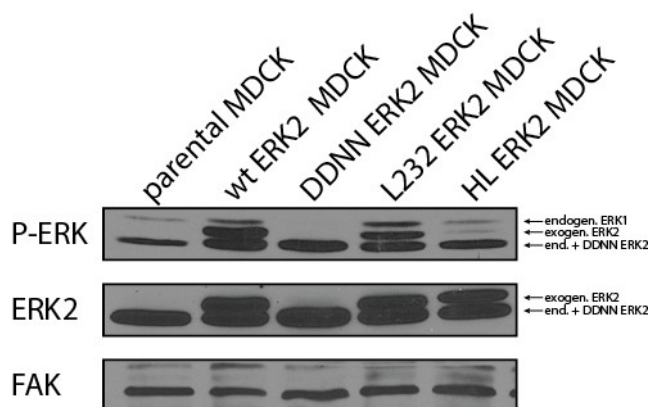
A



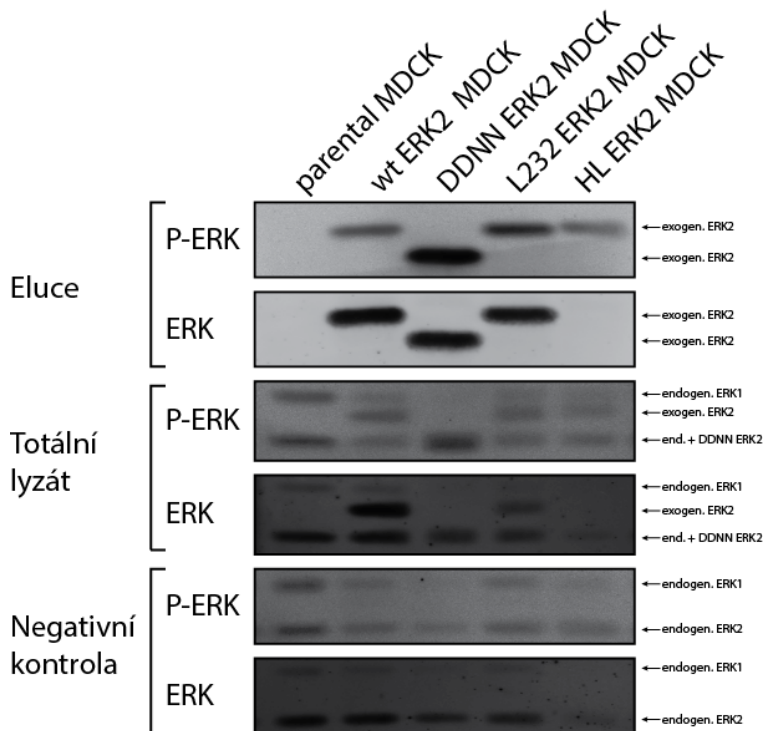
B



Obr. 37: Expese exogenních forem proteinkináz ERK2 v MDCK buňkách. [A] Schéma vložených genů proteinkinázy a ERK2 do MDCK buněk. Na schématu jsou vyznačeny základní domény proteinkinázy ERK a místa bodových mutací. Značka FLAG na N-konci není v měřítku se schematickým znázorněním proteinkinázy ERK2. [B] Porovnání exprese exogenních variant proteinkinázy ERK2 v MDCK buňkách u používaných klonů. Pro porovnání nanášky byla použita detekce proti proteinkináze RSK. Proteinkináza DDNN ERK2 putuje na SDS PAGE stejně jako endogenní proteinkináza ERK2.



Obr. 38: Porovnání aktivity mutantních variant proteinkinázy ERK2 v MDCK buňkách. Lyzáty byly připraveny z MDCK buněk po 48 hodinové kultivaci na plastickém podkladu. Byla provedena detekce na proteinkinázu ERK2 a P-ERK (TEY motiv). Pro porovnání nanášky byla použita detekce proti proteinkináze FAK. Proteinkináza DDNN ERK2 putuje na SDS PAGE stejně jako endogenní proteinkináza ERK2.



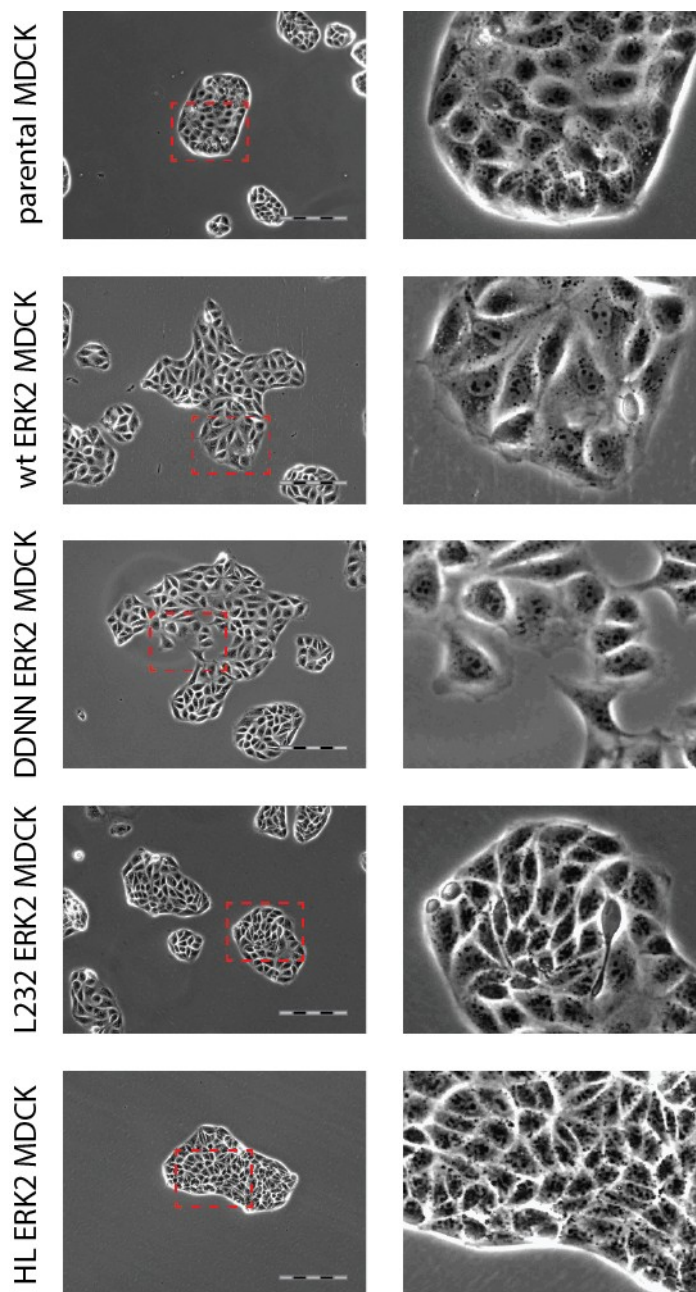
Obr. 39: Imunoprecipitace exogenních variant proteinkinázy ERK2 z MDCK buněk. Linie MDCK buněk byly kultivovány po dobu 48 hodin na plastickém podkladu a následně zlyzovány. Buněčná suspenze byla sonikována a následně z ní byly imunoprecipitovány exogenní varianty proteinkinázy ERK2 pomocí protilátky proti značce FLAG. Precipitované proteinkinázy ERK2 byly detekovány protilátkou rozpoznávající proteinkinázy ERK1/ERK2. Tato protilátka, na rozdíl od protilátky proti proteinkináze ERK2 (viz Obr. 38), nerozeznává proteinkinázu HL ERK2, pravděpodobně kvůli zavedené mutaci. Dále byla detekována fosforylovaná proteinkináza ERK (TEY motiv).

5.6.2. Ektopická exprese proteinkinázy ERK2 s mutací v DBP-doméně nevyvolá morfologické změny v MDCK buňkách

Porovnání jednotlivých buněčných linií ukázalo, že pouze u linie exprimující proteinkinázu DDNN ERK2 byla morfologie porovnatelná s linií s ektopickou expresí nemutované proteinkinázy ERK2 (Obr. 40). Buňky exprimující proteinkinázu DDNN ERK2 měly narušené mezibuněčné spoje, ale tyto buňky byly stále schopny formovat kolonie. Bylo možné pozorovat kolaps mezibuněčného kontaktu a narušení kolonie. Stejně jako u ektopické exprese proteinkinázy ERK2, zaujímaly buňky s expresí proteinkinázy DDNN ERK2 větší buněčnou plochu a okrajové buňky měly zpravidla výrazné protruze.

Exprese proteinkinázy L232 ERK2 výrazným způsobem nezměnila buněčnou morfologii a buňky byly srovnatelné s parentálním fenotypem (Obr. 40). Tato linie tvořila ucelené zaoblené kolonie a nepozorovali jsme jejich výrazné narušení. U buněk na okraji kolonií bylo možné pozorovat drobné protruze. Jelikož je proteinkináza L232 ERK2 exprimována ve stejné míře jako nemutovaná zanesená proteinkináza ERK2, tyto výsledky naznačují, že vazba DBP-domény s DEF-doménou je nutná k vyvolání sledovaných morfologických změn.

Exprese proteinkinázy HL ERK2 nevyvolala v MDCK buňkách žádné morfologické změny v porovnání s parentální linií (Obr. 40). Buňky tvořily zaoblené kolonie a na periferii kolonií ve většině případů nebyly protruze.



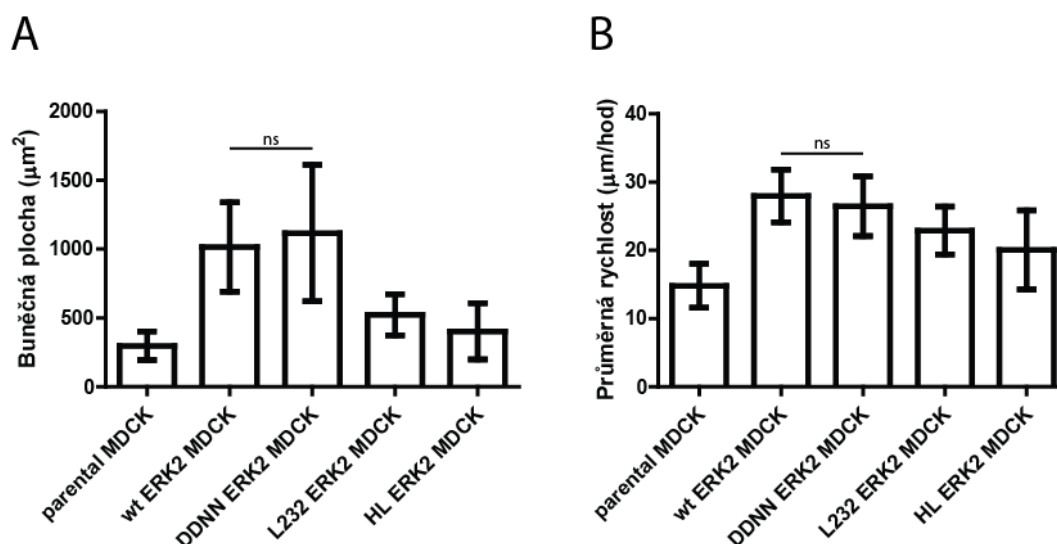
Obr. 40: Morfologie MDCK buněk s expresí mutantních variant proteinkinázy ERK2. Snímky jednotlivých linií MDCK buněk byly pořízeny po 48 hodinách kultivace na plastickém podkladu. Grafické měřítko odpovídá 200 μm .

5.6.3. Vliv mutantních variant proteinkinázy ERK2 na buněčnou plochu a rychlost migrace MDCK buněk

Abychom porovnali dopad mutací v proteinkináze ERK2 na fenotyp MDCK buněk, měřili jsme jejich buněčnou plochu a rychlost migrace. Expresí proteinkináz L232 ERK2, HL ERK2 vyvolala v buňkách 30-60% nárůst buněčné plochy v porovnání s parentální linií. Změny v ploše jsou statisticky významné, avšak linie s expresí

nemutované proteinkinázy nebo proteinkinázy DDNN ERK2 měly nárůst téměř čtyřnásobný. Rozdíly v rychlosti migrace byly mezi liniemi méně výrazné (Obr. 41).

Při porovnání naměřených hodnot způsobené vysokou expresí nemutované proteinkinázy ERK2 a její defektní varianty DDNN ERK2 jsme nezaznamenali žádné statisticky významné rozdíly (Obr. 41).

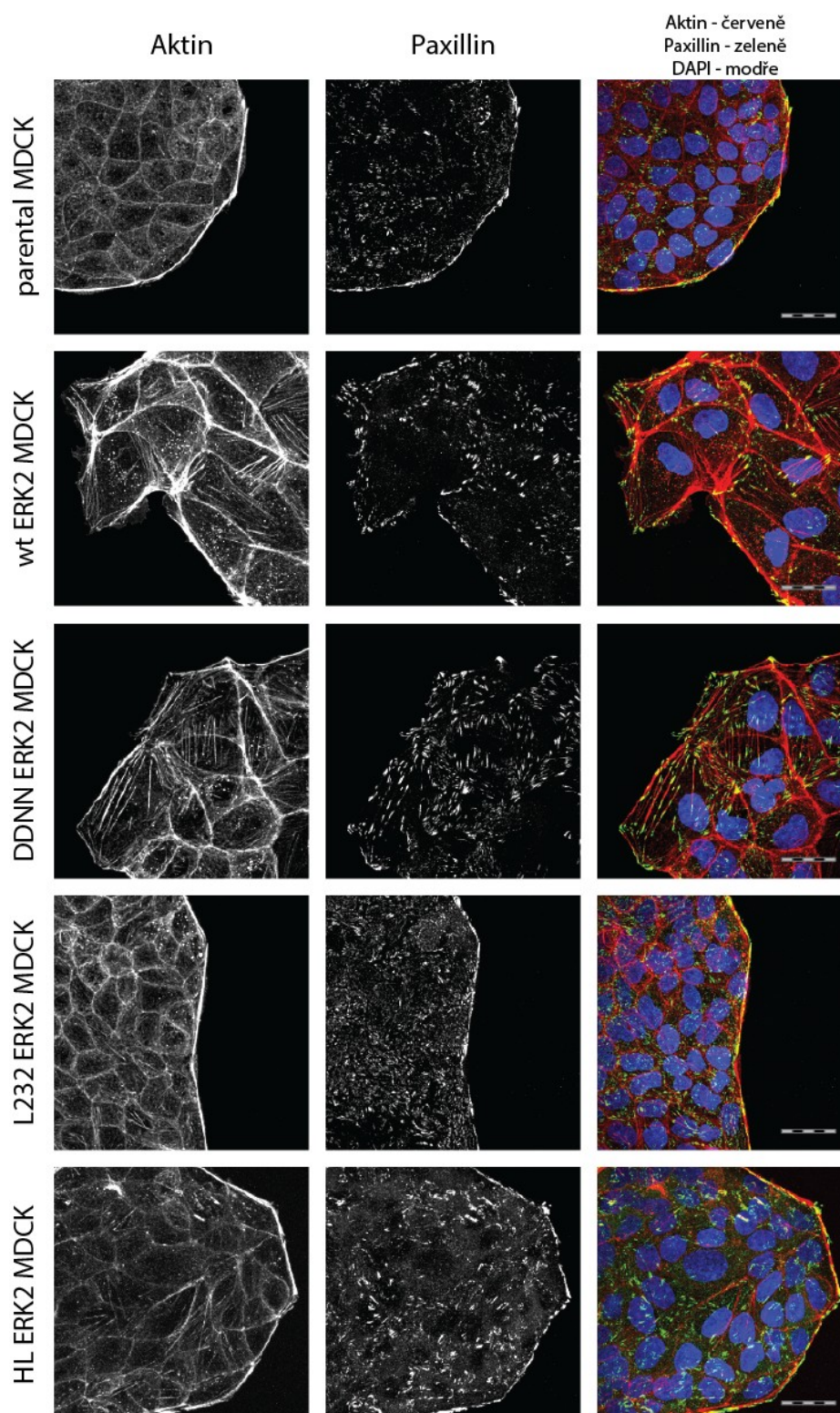


Obr. 41: Kvantifikace buněčné plochy a rychlosti linií MDCK buněk s expresí defektních variant proteinkinázy ERK2. Linie MDCK buněk byly kultivovány na plastickém podkladu po dobu 48 hodin a následně 8 hodin natáčeny (6 snímků/hod.). Z pořízených videí byla provedena kvantifikace. [A] Kvantifikace buněčné plochy. [B] Průměrná rychlost z časového úseku 8 hodin. Hodnoty byly získány kvantifikací minimálně 50 buněk pro každou linii. Na grafech je zobrazen průměr se směrodatnou odchylkou. („ns“ ≈ bez statistické významnosti)

5.6.4. Mutace v DBP-doméně zabrání v přestavbě periferního aktinu v MDCK buňkách

Celková aktivita proteinkinázy ERK2 byla v připravených stabilních liniích (kromě linie wt ERK1 MDCK) vyšší než v parentální. K přestavbě periferního aktinu došlo pouze ve dvou případech – u ektopické exprese proteinkinázy ERK2 a u linie s expresí proteinkinázy DDNN ERK2 (Obr. 42). Buňky na okraji těchto linií měly periferní aktin výrazně oslaben, nebo byl aktinový cytoskelet organizován do podoby lamellipodia. Spolu s přestavbou, popř. výrazným oslabením struktury periferního aktinu, došlo také k reorganizaci fokálních adhezí. Při expresi defektních proteinkináz L232 ERK2 a HL ERK2 nedošlo ke změnám aktinového cytoskeletu ani fokálních adhezí u periferních buněk (Obr. 42). To naznačuje, že pro změnu morfologie buněk

doprovázené změnami v aktinovém cytoskeletu je nezbytná DBP-doména proteinkinázy ERK.

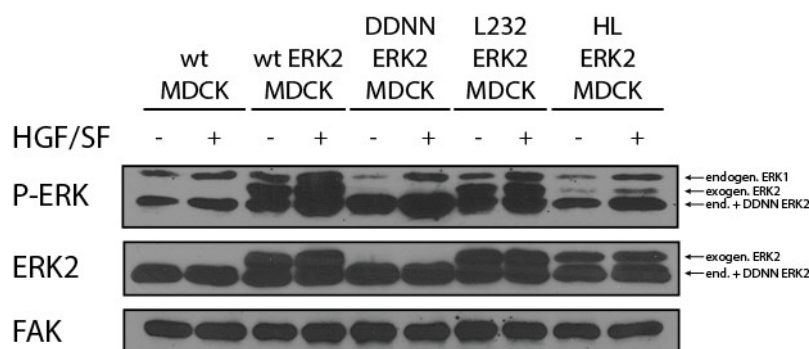


Obr. 42: Změny v aktinovém cytoskeletu MDCK buněk s expresí defektních variant proteinkinázy ERK2. Linie MDCK buněk byly kultivovány po dobu 48 hodin na krycích sklíčkách a následně zafixovány. Buňky byly nabarveny na aktinový cytoskelet (faloidin konjugovaný s rhodaminem), fokální adheze (protilátka proti paxillinu) a jádra (DAPI). Grafické měřítko odpovídá 25 μ m.

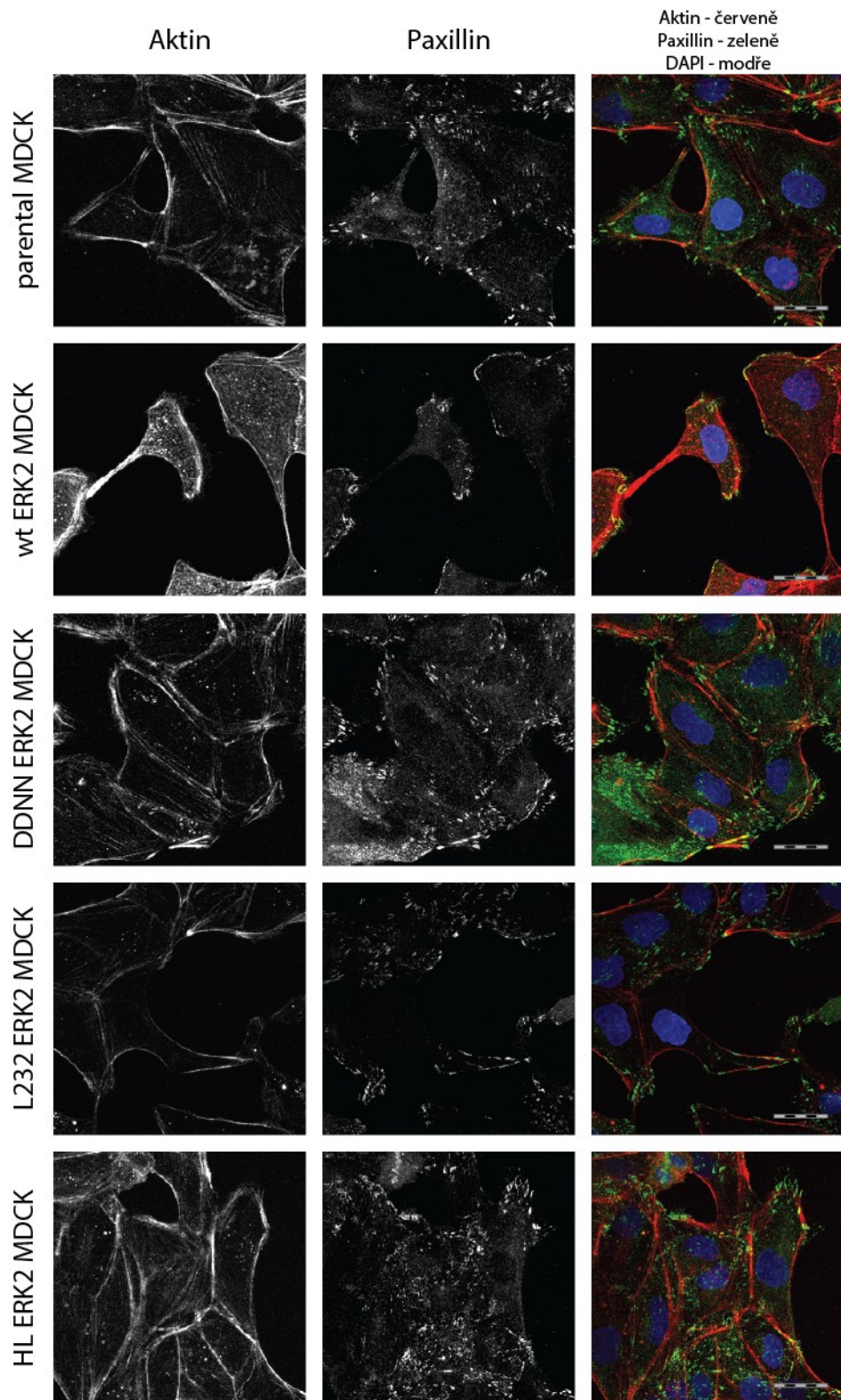
5.6.5. Ektopicky exprimované mutantní varianty proteinkinázy ERK2 neblokují morfologické změny MDCK buněk vyvolané růstovým faktorem HGF/SF

Po stimulaci růstovým faktorem HGF/SF dochází k paralelní aktivaci endogenní i exogenní proteinkinázy ERK2 (Obr. 43). Nicméně stimulované linie MDCK buněk nesoucí proteinkinázu L232 ERK2 nebo HL ERK2 mají organizaci aktinového cytoskeletu podobnou jako stimulovaná parentální linie. Výsledné změny v aktinovém cytoskeletu a také ve fokálních adhezích byly dány nárůstem aktivity endogenní proteinkinázy ERK2 (Obr. 44).

Morfologické změny buněk s expresí proteinkinázy DDNN ERK2 byly totožné s linií s ektopickou expresí nemutované proteinkinázy ERK2. Buňky obou linií se brzy po stimulaci stávaly zcela samostatnými a nebyly schopny utvářet kolonie (Obr. 44).



Obr. 43: Aktivita proteinkinázy ERK2 v MDCK buňkách stabilně exprimující nemutovanou a mutantní varianty proteinkinázy ERK2 po stimulaci růstovým faktorem HGF/SF. Linie MDCK buněk byly kultivovány po dobu 48 hodin, následně po dobu 1 hodiny stimulovány růstovým faktorem HGF/SF a zlyzovány. Byla provedena detekce na proteinkinázu ERK2 a P-ERK (TEY motiv). Pro porovnání nanášky byla použita detekce proteinkinázy FAK. Proteinkináza DDNN ERK2 putuje na SDS PAGE stejně jako endogenní proteinkináza ERK2.



Obr. 44: Změna aktinového cytoskeletu v MDCK buňkách s expresí nemutované a mutovaných variant proteinkinázy ERK2 po stimulaci růstovým faktorem HGF/SF. Linie MDCK buněk byly po dobu 48 hodin kultivovány na krycích sklíčkách, následně po dobu 16 hodin stimulovány růstovým faktorem HGF/SF a zafixovány. Buňky byly nabarveny na aktinový cytoskelet (faloidin konjugovaný s rhodaminem), fokální adheze (protilátka proti paxillinu) a jádra (DAPI). Grafické měřítko odpovídá 25 μm .

5.6.6. Shrnutí kapitoly

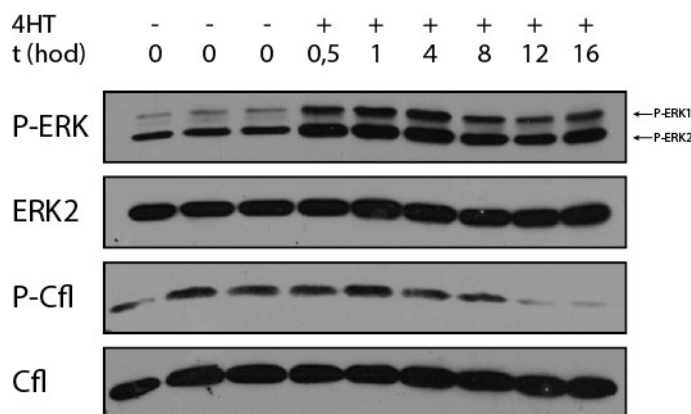
Expresí proteinkináz L232 ERK2 a HL ERK2 nevyvolala v buňkách výrazné morfologické změny a buňky byly porovnatelné s parentální linií. V buňkách nedošlo k přestavbě periferního aktinu. Dopad exprese proteinkinázy DDNN ERK2 byl stejný jako ektopická exprese nemutované proteinkinázy ERK2. Došlo k výrazné přestavbě aktinového cytoskeletu na periferii kolonií, doprovázené změnami ve fokálních adhezích. Tyto výsledky ukazují, že funkční DBP-doména a interakce proteinkinázy ERK2 s DEF-doménou zatím neznámého substrátu je nutná k remodelaci periferního aktinu a ztrátě epiteliální polarity.

5.7. Identifikace možných efektorových proteinů signální kaskády ERK pro přestavbu periferního aktinu MDCK buněk

Předchozí studie, jejichž tématem byl periferní aktin v epiteliálních buňkách, byly zaměřeny zejména na jeho regulaci Rho GTPázami (Ridley *et al.*, 1995; Royal *et al.*, 2000). Z tohoto důvodu jsme se pokusili propojit naše výsledky mezi periferním aktinem a signální kaskádou ERK s Rho GTPázami.

5.7.1. Aktivita signální kaskády ERK koreluje s aktivitou cofilinu v MDCK buňkách

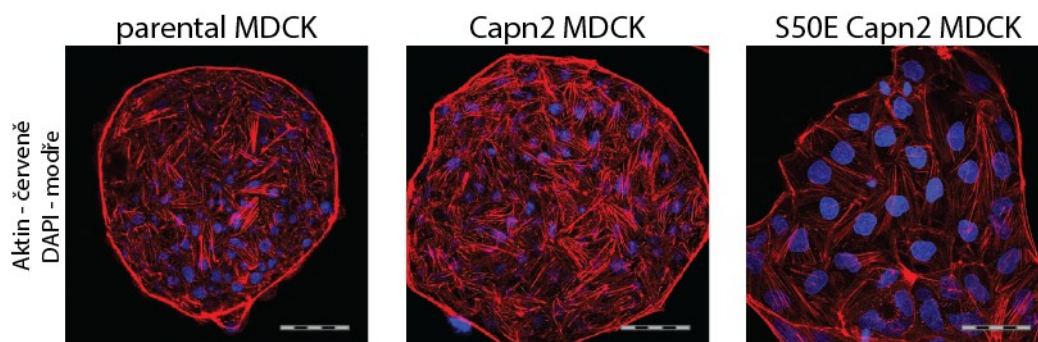
Abychom si ověřili, že signální kaskáda ERK reguluje Rho GTPázy v MDCK buňkách, sledovali jsme fosforylaci proteinu cofilin, jehož fosforylace je indukována malými GTPázami RhoA, Rac1 a Cdc42 a jejich efektorovou proteinkinázou LIMK. Fosforylace cofilinu na Ser3 inhibuje aktivitu cofilinu, který se následně nemůže vázat na aktinová vlákna a depolymerovat je (Bernstein a Bamburg, 2010). Během stimulace signální kaskády ERK za pomoci 4HT v linii Δ Raf-1:ER MDCK jsme pozorovali nárůst v aktivitě cofilinu. Tento výsledek ukazuje, že signální kaskáda ERK pravděpodobně během změn v epitelu reguluje aktivitu Rho-GTPáz (Obr. 45).



Obr. 45: Aktivita cofilinu po aktivaci signální kaskády ERK pomocí 4HT v Δ Raf-1:ER MDCK buňkách. Linie Δ Raf-1:ER MDCK buněk byla po dobu 48 hodin kultivována, následně po dobu 0,5-16 hodin stimulována $1\mu\text{M}$ 4HT a poté zlyzována. Byla provedena detekce na cofilin (Cfl), P-Cfl (Ser3), ERK a P-ERK (TEY motiv). Fosforylace cofilinu v pozici Ser3 je inhibiční.

5.7.2. Proteáza calpain2 může hrát roli prostředníka mezi proteinkinázou ERK a Rho GTPázami v MDCK buňkách

V předchozích výsledcích dosažených v naší laboratoři se podařilo zjistit, že rozrušení laterálního aktinu vyžaduje aktivaci calpainových proteáz (Caslavsky *et al.*, 2013). Proteáza calpain2 je fosforylována proteinkinázou ERK na serinovém zbytku v pozici 50 (Glading *et al.*, 2004) a představuje možného prostředníka mezi dráhou ERK a Rho GTPázami. Analyzovali jsme buněčné linie stabilně exprimující calpain2 a jeho mutantní formu. Tyto linie byly připraveny J. Časlavským, který stabilně zanesl geny pro nemutovanou proteázu calpain2 a pro proteázu calpain2 s mutací mimikující fosforylaci v pozici Ser50 do MDCK buněk (linie Capn2 MDCK a S50E Capn2 MDCK). Ektopická exprese proteázy calpain2 nevyvolala v MDCK buňkách změny v aktinovém cytoskeletu a jeho organizace je srovnatelná s parentální linií. Naopak linie MDCK buněk s expresí proteázy S50E calpain2 vedla k výrazným morfologickým změnám a přestavbě periferního aktinového cytoskeletu (Obr. 46). Došlo ke ztrátě silného aktinového svazku a je nahrazen řadou slabších, paralelně vedle sebe seřazených, aktinových vláken. Bylo možné pozorovat také buněčné protruze. Organizace periferního aktinu je srovnatelná s MDCK buňkami, které nesou buď divoký typ ERK2, nebo mutovanou proteinkinázu DDNN ERK2. To naznačuje, že CD-doména proteinkinázy ERK2 není nutná pro fosforylaci calpain2 v pozici Ser50.



Obr. 46: Změny v aktinovém cytoskeletu MDCK buněk ektopickou expresí proteázy calpain2 nebo S50E calpain2. Linie MDCK buněk byly kultivovány po dobu 36 hodin na krycích sklíčkách a následně zafixovány. Buňky byly nabarveny na aktinový cytoskelet (faloidin konjugovaný s rhodaminem) a jádra (DAPI). Grafické měřítko odpovídá 50 μm (použité zvětšení se liší od ostatních konfokálních snímků). Tyto výsledky byly získány J. Čáslavským.

5.7.3. Shrnutí kapitoly

Po aktivaci signální kaskády ERK dochází k defosforylaci cofilinu a k navýšení jeho aktivity, což indikuje, že aktivace dráhy ERK vede k potlačení aktivity Rho GTPáz. Ektopická exprese proteázy calpain2 nevyvolala změny v periferním aktinu, nicméně mutace v proteáze calpain2 v pozici Ser50, která mimikuje fosforylaci proteinkinázou ERK (S50E), vyvolala remodelaci periferního aktinu. Tyto výsledky naznačují, že proteinkináza ERK2 využívá calpain2 ke snížení aktivity Rho GTPáz, což má za následek rozrušení periferního aktinu.

6. Diskuze

V této práci jsme ukázali, že přestavba periferního aktinu je řízena signální kaskádou ERK. Jeho reorganizace se zdá být jedním z důležitých kroků při rozpadu epitelu na jednotlivé buňky a pro přechod epiteliálních buněk k individuální migraci. K přestavbě periferního aktinu je preferenčně využívána proteinkináza ERK2, která využívá svou DBP-doménu a interaguje s DEF-doménou efektorových proteinů. Identifikovali jsme proteázu calpain2 jako potenciální substrát proteinkinázy ERK, který reguluje přestavbu periferálního aktinu.

6.1. Proteinkináza ERK způsobuje morfologické změny epiteliálních buněk a rozpad periferního aktinu

V prvním kroku tohoto projektu jsme se zaměřili na změny v periferním aktinovém cytoskeletu v závislosti na aktivitě signální kaskády ERK. Je nutné podotknout, že signální kaskádu ERK není možné vždy chápat jako lineární dráhu pro přenos signálu. Mezi hlavní substrát proteinkinázy Raf patří proteinkináza MEK, nicméně proteinkináza Raf může mít další efektorové proteiny, které se účastní regulace a vlastností aktinového cytoskeletu. Např. proteinkináza Raf je schopna fosforylací aktivovat adenylát cyklázu, nebo fosforylací inhibovat myosin fosfatázu (MYPT) (Broustas *et al.*, 2002; Ding *et al.*, 2004). V případě adenylát cyklázy je efekt nepřímý, kdy dochází k aktivaci proteinkinázy PKA, která následně fosforyluje a aktivuje proteinkinázu LIMK (Nadella *et al.*, 2009; Pidoux a Tasken, 2010). Překvapivé je, že proteinkináza Raf nemusí regulovat jiné proteiny pouze jejich fosforylací. Tento způsob byl popsán u regulace proteinkinázy ROCK. Regulační část proteinkinázy Raf se může vázat na proteinkinázu ROCK a dochází k transinhibici proteinkinázy ROCK (Niault *et al.*, 2009).

Abychom prokázali roli proteinkinázy ERK v přestavbě periferního aktinového cytoskeletu v MDCK buňkách, aktivovali jsme signální dráhu ERK pomocí růstového faktoru HGF/SF nebo podmíněnou aktivací ektopicky exprimovaného fúzního proteinu Δ Raf-1:ER. Zatímco samotná aktivace signální kaskády ERK vedla k reorganizaci aktinového cytoskeletu na periferii kolonie, použití specifického MEK inhibitoru CII040 v kombinaci se stimulačními faktory reorganizaci periferního aktinu zabránilo. Jako komplementární pokus k farmakologické inhibici proteinkinázy MEK jsme zvolili ektopickou expresi konstitutivně aktivní proteinkinázy MEK, která vedla opět k významné přestavbě aktinu na periferii. Vzhledem k tomu, že proteinkináza MEK rozpoznává a fosforyluje pouze proteinkinázu ERK (Roberts a Der, 2007), tyto výsledky potvrzují, že přestavba periferního aktinu je řízena výhradně touto efektorovou proteinkinázou.

Naše výsledky ukazující na centrální úlohu signální kaskády ERK v přestavbě periferního aktinu jsou v souladu s předchozími studiemi a doplňují je o molekulární mechanismus. Ridley *et al.* ve své studii ukázali, že po stimulaci MDCK buněk růstovým faktorem HGF/SF dochází nejprve k nárůstu buněčné plochy a následně k rozpadu kolonií epiteliálních buněk. Popsali, že nárůst buněčné plochy je doprovázen přestavbou periferního aktinového cytoskeletu do podoby lamellipodia za využití

GTPázy Ras a Rac1 (Ridley *et al.*, 1995). Tento koncept není v rozporu s našimi poznatky o klíčové úloze signální dráhy ERK při reorganizaci periferního aktinu. Růstový faktor HGF/SF nebo GTPáza Ras totiž patří mezi aktivátory signální dráhy ERK (Gao a Vande Woude, 2005), a ta může regulovat malou GTPázu Rac1 (Tcherkezian *et al.*, 2005; Woodcock *et al.*, 2009).

Později na výše zmíněnou studii Ridley *et al.* navázala další publikace. Ta ukazuje, že lamellipodium je formováno na periférii kolonií za pomoci PI-3K kinázy, která následně reguluje Rac1 GTPázu. Použití specifického inhibitoru kinázy PI-3K vedlo k zabránění tvorby lamellipodia (Royal *et al.*, 2000). Signální kaskáda ERK, stejně jako signální dráha PI-3K kinázy, je regulována GTPázou Ras (Pylayeva-Gupta *et al.*, 2011). V kontextu s našimi výsledky to může ukazovat na dva paralelní mechanismy, které mohou vyvolat stejnou odpověď nebo se mohou vzájemně doplňovat. Jiným možným vysvětlením je, že kináza PI-3K aktivuje, nebo se podílí na aktivaci signální kaskády ERK během stimulace růstovým faktorem HGF/SF (Sipeki *et al.*, 1999). To by naznačovalo, že signální kaskáda ERK je efektorovým nástrojem PI-3K kinázové dráhy pro remodelaci periferního aktinu.

Naše výsledky dále ukazují, že přestavba periferního aktinu do podoby lamellipodia je nezávislá na proteinkináze RSK. Imunofluorescenční snímky ukazují, že exprese proteinkinázy DDNN ERK2 indukuje rozpad periferního aktinu a nezabrání remodelaci periferního aktinu. Mutace v CD-doméně brání interakci a aktivaci proteinkinázy RSK (Burkhard *et al.*, 2011) a naše výsledky ukazují, že k remodelaci periferního aktinu dochází během ztráty apikobazální polarity, tedy během první fáze EMT, kde se proteinkináza RSK nepodílí na morfologických změnách MDCK buněk (Caslavsky *et al.*, 2013). Tyto výsledky souhrně naznačují, že proteinkináza ERK hraje centrální úlohu při remodelaci periferního aktinu.

6.2. Proteinkináza ERK2 a nikoliv ERK1 reguluje rozpad periferního aktinu

Abychom objasnili vliv jednotlivých izoforem proteinkinázy ERK1 a ERK2 na regulaci periferního aktinového cytoskeletu, změnili jsme jejich expresní poměr ektopickou expresí jedné či druhé izoformy. Je známo, že na příslušný podnět dochází k aktivaci obou izoforem proteinkinázy ERK současně (Lefloch *et al.*, 2009). Zároveň proteinkinázy ERK1 a ERK2 jsou aktivovány na základě jejich expresního profilu a

nedochází k preferenční aktivaci pouze jedné z izoform (Lefloch *et al.*, 2008). Na základě těchto publikací a našich výsledků můžeme říci, že proteinkináza ERK2 reguluje remodelaci periferního aktinového cytoskeletu a tvorbu lamellipodia. Kompletní přestavba aktinového cytoskeletu včetně přestavby periferního aktinu je v souladu s předchozími publikacemi, které ukazují, že proteinkináza ERK2 indukuje morfologické změny a podporuje buněčnou migraci (Shin *et al.*, 2010; von Thun *et al.*, 2012). Navíc ektopická exprese proteinkinázy ERK2 a nikoliv ERK1 vede ke konverzi některých epitelilních buněk na individuálně migrující mezenchymální buňky (Shin *et al.*, 2010). Nicméně je třeba zmínit, že ektopicky exprimovaná proteinkináza ERK1 není aktivována do stejné úrovně jako proteinkináza ERK2. Plánujeme další experimenty, které by potvrdily úlohu proteinkinázy ERK1 a ERK2 v morfologických změnách MDCK buněk. Tyto experimenty budou zahrnovat snížení exprese jednotlivých izoform pomocí RNA interference a také expresi proteinkináz ERK1 a ERK2 z inducibilních promotorů, což by umožnilo lépe kontrolovat expresi těchto proteinkináz.

Zajímavé výsledky jsme získali po stimulaci MDCK buněk s ektopickou expresí proteinkinázy ERK1 nebo ERK2 růstovým faktorem HGF/SF. Pozorovali jsme dominantně negativní vliv proteinkinázy ERK1 na ztrátu epitelální polarity a rozpad epitelu, který jsme nepřímo kvantifikovali změřením buněčné plochy a buněčné rychlosti. Výsledky naší laboratoře ukazují, že změny v těchto parametrech korelují s výše popsanými morfologickými změnami epitelálních buněk během aktivace signální kaskády ERK (Caslavsky *et al.*, 2013). Proteinkináza ERK1 zřejmě brání ztrátě epitelální polarity, ztrátě mezibuněčných kontaktů, rozpadu buněčných kolonií a přestavbě periferního aktinu. Ačkoliv jsme nesledovali změny v aktinovém cytoskeletu po stimulaci růstovým faktorem HGF/SF, můžeme předpokládat, že periferní aktin nebude v linii s ektopickou expresí proteinkinázy ERK1 remodelován. Výše uvedené výsledky naznačují, že proteinkináza ERK1 má negativní vliv na přestavu periferního aktinu, popř. dalších aktinových struktur.

Bylo popsáno, že MDCK buňky, které exprimují konstitutivně aktivní formu proteinkinázy MEK1, ztrácejí nebo mají výrazně sníženou expresi proteinkinázy ERK1 a MEK2. Re-exprese proteinkináz ERK1 a MEK2 korelovala se ztrátou exprese konstitutivně aktivní proteinkinázy MEK1 a s návratem epitelálních znaků (Schramek *et al.*, 2003). To také podporuje hypotézu, že proteinkináza ERK2 musela provést zásadní změny v aktinovém cytoskeletu během procesu EMT a proteinkináza ERK1

figuruje v MDCK buňkách jako negativní regulátor přechodu epiteliálních buněk na mezenchymální fenotyp.

Překvapivé je, že proteinkináza ERK1 nemusí mít negativní efekt pouze na změnu aktinového cytoskeletu a podporu autonomní migrace epiteliálních buněk. Při ektopické expresi proteinkinázy ERK1 se ukazuje, že myší NIH3T3 fibroblasty mají narušenou proliferaci a zabrání onkogennímu potenciálu mutované GTPázy Ras. Naopak tomu je v případě ektopické exprese proteinkinázy ERK2, která onkogennímu potenciálu GTPázy Ras nezabrání (Ventaggiato *et al.*, 2006). To naznačuje, že dominantně negativní efekt proteinkinázy ERK1 na signalizaci nemusí být striktní pouze v jednom buněčném procesu.

6.3 Pro přestavbu periferního aktinu je esenciální DBP-doména proteinkinázy ERK2

Jelikož ektopická exprese ERK2 je dostatečná k indukci morfologických změn, otestovali jsme vliv jednotlivých domén účastnících se interakce se substráty proteinkinázy ERK2. Mutace v DBP-doméně proteinkinázy ERK2 efektivně zabránila morfologickým změnám epiteliálních buněk. To naznačuje, že substráty proteinkinázy ERK2, regulující morfologické změny v epitelu, musí mít přítomný DEF-motiv, pomocí kterého s proteinkinázou ERK2 interagují. Naše výsledky ukazují, že tato doména je nutná pro přestavbu periferního aktinového cytoskeletu a ztrátu epiteliální polaritu. Naopak mutace v CD-doméně reorganizaci periferního aktinu ani ztrátě epiteliální polaritu nezabránila. Naše pozorování jsou v souladu s již dříve publikovanou studií, kde funkčně stejná mutace v DBP-doméně (Y261A) zabránila ztrátě epiteliálních znaků a zabránila procesu EMT, naopak mutace v CD-doméně (při použití mutace D319N) vstupu buněk do procesu EMT nezabránila (Shin *et al.*, 2010). DEF-doména je součástí řady transkripčních faktorů. Jedním z nich, který by se podílel na regulaci periferního aktinu, by mohl být transkripční faktor Fra-1. Exprese proteinu Fra-1 a jeho stabilizace je úzce závislá na aktivitě signální kaskády ERK (Murphy *et al.*, 2004). Ektopická exprese proteinkinázy ERK2 zvyšuje množství Fra-1 v buňkách, které následně vede k rozpadu epiteliálních buněk (Shin *et al.*, 2010). Jedním z možných mechanismů účastnících se remodelace periferního aktinu může být jeho využití v regulaci Rho-GTPáz, přesněji ke snížení aktivity RhoA a navýšení aktivity Rac1, podpoře tvorby a extenze lamellipodia a podpoře migrace (Vial *et al.*, 2003). I když transkripční faktor

Fra1 a signální kaskáda ERK tvoří jednu signální dráhu (Chen *et al.*, 2009), signální kaskáda ERK bude pravděpodobně využívat také další způsoby signalizace.

Předpokládali jsme, že pouhá změna exprese genů, jako je Fra-1, nemůže zcela pokrýt námi pozorované změny v buněčné morfologii a v periferním aktinu. Ke změnám v aktinovém cytoskeletu dochází velice brzy po stimulaci signální kaskády ERK, v době, kdy změna expresního profilu buňky nemá pravděpodobně na tyto události vliv. Proto jsme hledali alternativní cytoplazmatické substráty proteinkinázy ERK s DEF motivem.

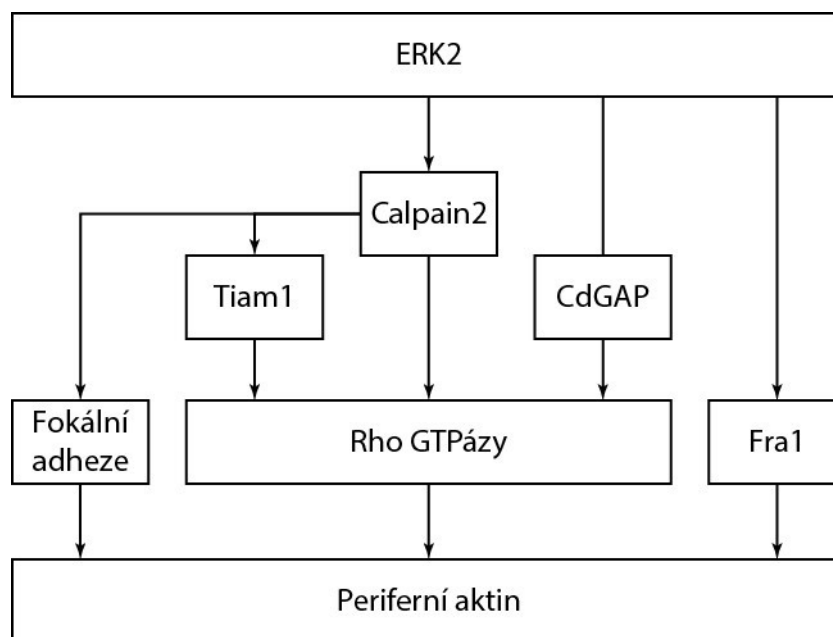
Jedním z těchto substrátů může být proteáza calpain2, která je fosforylována proteinkinázou ERK v pozici Ser50 (Glading *et al.*, 2004) a obsahuje ve své sekvenci DEF-motiv (Obr. 47). Po aktivaci calpain2 následně štěpí široké spektrum proteinů včetně komponent fokálních adhezí (Franco a Huttenlocher, 2005), jejichž rozpad, popř. změna jejich organizace, může také následně způsobit přestavbu periferního aktinu. Aktivita proteázy calpain není však omezena pouze na degradaci komponent fokálních adhezí, ale ukazuje se, že aktivita proteázy calpain hraje důležitou roli v regulaci laterálního aktinu a rozpadu epitelu (Caslavsky *et al.*, 2013). V souladu s tímto předpokladem doplňující výsledky J. Časlavského ukazují, že exprese mutované formy calpain2, která obsahuje mutaci S50E a mimikuje fosforylaci Ser50, naznačuje, že proteáza calpain2 je proteinkinázou ERK využíván k remodelaci periferního aktinu. Zároveň k možné interakci mezi proteázou calpain2 a proteinkinázou ERK by mohlo docházet za pomoci DEF-DBP interakce. Jelikož je calpain schopen degradovat aktivátor Rac1 GTPázy Tiam1 (Woodcock *et al.*, 2009) a v případě proteázy Calpain1 byla popsána také proteolytická degradace RhoA GTPázy (Kulkarni *et al.*, 2002), předpokládáme, že k ERK reguluje periferání aktin inhibice GTPáz Rac nebo Rho.



Obr. 47: Schematické znázornění proteázy calpain2. Na schématu je znázorněno fosforylační místo proteinkinázy ERK Ser50. Místo označené jako FXF obsahuje 2 překrývající se FXF motivy, proteáza calpain2 v tomto místě nese aminokyselinovou sekvenci GIFHFQFWQ. Dále jsou na schématu znázorněny základní funkční části proteázy calpain2: proteázová doména, „C2-like“ doména a „EF-hand“ doména. Při přípravě tohoto schématu byl použit následující zdroj: (Suzuki *et al.*, 2004).

Je třeba také zmínit, že proteinkináza ERK může zároveň negativně regulovat protein CdGAP, což má za následek aktivaci GTPázy Rac1 a podporu polymerace aktinu. Překvapivé je, že fosforylace proteinu CdGAP byla popsána v případě proteinkinázy ERK1 (Tcherkezian *et al.*, 2005). Nicméně fosforylační místa mezi proteinkinázou ERK1 a ERK2 se neliší a lze předpokládat, že této fosforylace bude schopná také proteinkináza ERK2.

Tyto výsledky souhrně ukazují, že DBP-doména proteinkinázy ERK2 je důležitá pro regulaci periferního aktinu. Ukazuje se, že za pomoci DBP-domény může proteinkináza ERK2 interagovat se specifickými substráty obsahujícími FXF motiv a regulovat tak jejich funkci. Domníváme se, že tyto substráty by měly mít spojitost s regulací Rho-GTPáz. Toto usuzujeme z faktu, že hladina aktivního cofilinu, který je regulován GTPázami Rac, Rho a Cdc42, ihned po stimulaci signální kaskády ERK narůstá. Tyto substráty ERK2 mohou regulovat Rho GTPázy a přestavbu periferního aktinu v lamellipodium jak na úrovni transkripční (Fra1), tak i na úrovni přímé fosforylace substrátů (Calpain, CdGAP). Model, který shrnuje výše uvedené modely regulace Rho GTPáz a periferního aktinu, je uveden na Obr. 48.



Obr. 48: Model regulace periferního aktinu signální kaskádou ERK. Proteinkináza ERK2 může inhibovat regulační proteiny Rho GTPáz, a to přímo jejich fosforylací, nebo nepřímo jejich degradací pomocí proteázy calpain2. Proteinkináza ERK2 aktivací proteázy calpain2 degraduje proteiny účastnících se struktury fokálních adhezí, což také může způsobit přestavbu periferního aktinu. Eventuálně může regulovat degradaci Rho GTPáz. Proteinkináza ERK2 po své ativaci mění expresní profil epiteliální buňky. Schematický model shrnuje potenciální mechanismus regulace periferního aktinu proteinkinázou ERK, který je diskutován v kapitole 6.

6.4 Role dimerizace proteinkinázy ERK v přestavbě periferního aktinu není jasná

Bohužel z našich výsledků nejsme schopni určit, zda je k procesu přestavby periferního aktinu nutná dimerizace proteinkinázy ERK. Hlavním problémem při interpretaci výsledků s dimerizační mutantou se jeví to, že nejsme schopni jednoznačně určit, zda je proteinkináza HL ERK2 aktivní, tedy zda je fosforylována v jejím TEY motivu v aktivační smyčce. Pětice mutací zavedených v proteinkináze HL ERK2 může bránit interakci s proteinkinázou MEK (Wolf *et al.*, 2001), což vede ke snížení fosforylace TEY motivu. Bohužel se nám nepodařilo vytvořit stabilní linii s alternativní dimerizačně defektní variantou proteinkinázy ERK2, která má deletovaný úsek Pro174-Asp177 (popisovaná jako $\Delta 4$ -ERK2). Nicméně úsek Pro174-Asp177 je také součástí aktivační smyčky a není jasné, zda by nenarušil fosforylaci TEY motivu. Dalším vysvětlením může být nedokonalá vazba protilátky rozpoznávající fosforylovaný TEY motiv proteinkinázy ERK. Vazbu protilátky může blokovat zavedená mutace H176E, která může změnit epitop rozpoznávaný protilátkou (Kaoud *et al.*, 2011; Philipova a Whitaker, 2005). Z tohoto důvodu si nemůžeme být jisti aktivitou proteinkinázy HL ERK2 a nemůžeme popřít nebo vyvrátit roli dimerizace proteinkinázy ERK2 v remodelaci periferního aktinu.

6.5. Význam a role periferního aktinu

Naše výsledky byly zaměřeny zejména na regulační mechanismus, kterým signální kaskáda ERK reguluje periferní aktin. Natáčení živých buněk stabilně exprimujících RFP-actin nám také poskytlo důležitou informaci o periferním aktinu, která doplňuje imunofluorescenční značení aktinového cytoskeletu na fixovaných preparátech. Ukázalo se, že periferní aktin je složen z řady paralelně poskládaných aktinových vláken, která jsou pravděpodobně zakotvena v mnoha fokálních adhezích na okraji kolonie. Domníváme se, že jeho přestavbou může vznikat lamellipodium nebo ostatní membránové protruze. To je zvláště patrné na sekvenčních snímcích živých buněk, které stabilně exprimují RFP-actin a které byly stimulovány růstovým faktorem HGF/SF.

Nedořešenou otázkou zůstává, jakou funkci má periferní aktin. Periferní aktin je kontraktilní akto-myosinová struktura. Po laserovém přeříznutí periferního aktinu dochází ke kontrakci zbývajících částí (Reffay *et al.*, 2014). To ukazuje na další

podobnost s laterálním aktinem. Kontraktilní síly generované laterálním aktinem jsou nutné pro udržení morfologických a funkčních vlastností epitelu (Wu a Yap, 2013). Zároveň se zdá, že kontraktilní síly laterálního aktinu, zakotveného v mezibuněčných spojích, působí proti tenzi stresových vláken a podílí se na udržení kuboidního tvaru epiteliálních buněk (Millan *et al.*, 2010; Prasain a Stevens, 2009). Periferní aktin není zakotven v mezibuněčných spojích, ale ve fokálních adhezích. Předpokládáme, že periferní aktin, zakotvený do fokálních adhezí na okraji buněčné kolonie, funkčně nahrazuje mezibuněčné spoje a umožňuje vzdorovat tlaku stresových vláken a tlaku laterálního aktinu. Tyto vlastnosti periferního aktinu zajišťují, že se buňka na okraji kolonie následně nehroučí směrem k centru kolonie. Některé výsledky dosažené v naší laboratoři tuto hypotézu potvrzují. Částečně proti tomuto tvrzení může jít výše zmíněná publikace Reffay *et al.*, kdy přerušení svazku periferního aktinu nevedlo ke kontrakci a zhroucení buňky směrem do centra kolonie. Naopak přerušení periferního aktinu vedlo k formování vedoucího konce buňky a ke stimulaci buněčné migrace (Reffay *et al.*, 2014). Pravděpodobným vysvětlením těchto odlišných výsledků může být to, že experimenty byly provedeny za odlišné hustoty buněk. Zatímco v našich experimentech pracujeme za podmínek individuálních kolonií čítajících řádově stovky buněk, experimenty zmíněné v práci Reffay *et al.* byly provedeny v konfluentní epiteliální vrstvě s uměle vytvořenou mezerou. Buněčná kolonie ve srovnání s rozsáhlejší epiteliální vrstvou může vykazovat odlišné rozložení sil, a tím pádem i odlišně reagovat na odstranění periferního aktinu.

Na základě našich výsledků a dostupné literatury se domníváme, že periferní aktin svou funkcí nahrazuje laterální aktin. Podílí se na tvaru buňky, kompenzaci sil působících v buňce nebo na buňku, a také jako struktura, jejíž remodelací následně vzniká lamellipodium. Obdoba periferního aktinu se podílí na migraci epiteliálních buněk, kdy dochází k zacelení mezer v epitelu. V tomto procesu hraje periferní aktin a jím generovaná kontraktilita nezastupitelnou úlohu při migraci epiteliálních buněk (Anon *et al.*, 2012; Bement *et al.*, 1993; Nobes a Hall, 1995). Zda je námi pozorovaný periferní aktin funkčně a strukturně identický s periferním aktinem migrujících buněk, zůstává nejasné.

7. Závěr

- Aktivace signální kaskády ERK vede k morfologickým změnám MDCK buněk, které jsou doprovázeny remodelací periferního aktinu
- Ektopická exprese proteinkinázy ERK2 vyvolá v porovnání s ektopickou expresí proteinkinázy ERK1 výraznější morfologické změny MDCK buněk
- K remodelaci periferního aktinu je pravděpodobně preferenčně využívána proteinkináza ERK2
- Pro regulaci periferního aktinového cytoskeletu využívá proteinkináza ERK svou DBP-doménu; mutace v CD-doméně nezabrání přestavbě periferního aktinu při ektopické expresi proteinkinázy ERK
- Změna struktury periferního aktinu je doprovázena změnami fokálních adhezí
- Periferní aktin nebrání buňkám v pohybu v rámci kolonie, ale jeho remodelace je nutná pro získání individuálního fenotypu MDCK buněk a samostatné migrace buněk
- Aktivace signální dráhy ERK vede ke zvýšení aktivity cofilinu

8. Seznam použité literatury

- Abraham D, Podar K, Pacher M, Kubicek M, Welzel N, Hemmings BA, Dilworth SM, Mischak H, Kolch W, Baccarini M (2000)** Raf-1-associated protein phosphatase 2A as a positive regulator of kinase activation. *Journal of Biological Chemistry* 275:22300-22304.
- Adachi M, Fukuda M, Nishida E (1999)** Two co-existing mechanisms for nuclear import of MAP kinase: passive diffusion of a monomer and active transport of a dimer. *Embo Journal* 18:5347-5358.
- Aebersold DM, Shaul YD, Yung YV, Yarom N, Yao Z, Hanoch T, Seger R (2004)** Extracellular signal-regulated kinase 1c (ERK1c), a novel 42-kilodalton ERK, demonstrates unique modes of regulation, localization, and function. *Molecular and Cellular Biology* 24:10000-10015.
- Aikawa R, Komuro I, Yamazaki T, Zou YZ, Kudoh S, Tanaka M, Shiojima I, Hiroi Y, Yazaki Y (1997)** Oxidative stress activates extracellular signal-regulated kinases through Src and ras in cultured cardiac myocytes of neonatal rats. *Journal of Clinical Investigation* 100:1813-1821.
- Alessi DR, Saito Y, Campbell DG, Cohen P, Sithanandam G, Rapp U, Ashworth A, Marshall CJ, Cowley S (1994)** Identification of the sites in MAP kinase kinase-1 phosphorylated by p74(Raf1). *Embo Journal* 13:1610-1619.
- Amano T, Tanabe K, Eto T, Narumiya S, Mizuno K (2001)** LIM-kinase 2 induces formation of stress fibres, focal adhesions and membrane blebs, dependent on its activation by Rho-associated kinase-catalysed phosphorylation at threonine-505. *Biochemical Journal* 354:149-159.
- Anderson JM, Van Itallie CM (2009)** Physiology and Function of the Tight Junction. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 1:16.
- Anon E, Serra-Picamal X, Hersen P, Gauthier NC, Sheetz MP, Trepas X, Ladoux B (2012)** Cell crawling mediates collective cell migration to close undamaged epithelial gaps. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109:10891-10896.
- Bement WM, Forscher P, Mooseker MS (1993)** A novel cytoskeletal structure involved in purse string wound closure and cell polarity maintenance. *Journal of Cell Biology* 121:565-578.
- Bernstein BW, Bamburg JR (2010)** ADF/Cofilin: a functional node in cell biology. *Trends in Cell Biology* 20:187-195.
- Bishop AL, Hall A (2000)** Rho GTPases and their effector proteins. *Biochemical Journal* 348:241-255.
- Broustas CG, Grammatikakis N, Eto M, Dent P, Brautigan DL, Kasid U (2002)** Phosphorylation of the myosin-binding subunit of myosin phosphatase by Raf-1 and inhibition of phosphatase activity. *Journal of Biological Chemistry* 277:3053-3059.
- Brunet A, Pages G, Pouyssegur J (1994)** Growth factor-stimulated MAP kinase induces rapid retrophosphorylation and inhibition of MAP kinase kinase (MEK1). *FEBS Letters* 346:299-303.
- Burack WR, Shaw AS (2005)** Live cell imaging of ERK and MEK. *Journal of Biological Chemistry* 280:3832-3837.
- Burkhard KA, Chen FM, Shapiro P (2011)** Quantitative Analysis of ERK2 Interactions with Substrate Proteins: Roles for kinase docking domains and activity in determining binding affinity. *Journal of Biological Chemistry* 286:2477-2485.
- Burton K, Park JH, Taylor DL (1999)** Keratocytes generate traction forces in two phases. *Molecular Biology of the Cell* 10:3745-3769.

- Bustelo XR, Sauzeau V, Berenjano IM (2007)** GTP-binding proteins of the Rho/Rac family: regulation, effectors and functions in vivo. *Bioessays* 29:356-370.
- Cargnello M, Roux PP (2011)** Activation and Function of the MAPKs and Their Substrates, the MAPK-Activated Protein Kinases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 75:50-83.
- Carragher NO, Westhoff MA, Fincham VJ, Schaller MD, Frame MC (2003)** A novel role for FAK as a protease-targeting adaptor protein: Regulation by p42 ERK and Src. *Current Biology* 13:1442-1450.
- Casar B, Pinto A, Crespo P (2008)** Essential role of ERK dimers in the activation of cytoplasmic but not nuclear substrates by ERK-scaffold complexes. *Molecular Cell* 31:708-721.
- Caslavsky J, Klimova Z, Vomastek T (2013)** ERK and RSK regulate distinct steps of a cellular program that induces transition from multicellular epithelium to single cell phenotype. *Cellular Signalling* 25:2743-2751.
- Catalanotti F, Reyes G, Jesenberger V, Galabova-Kovacs G, Simoes RD, Carugo O, Baccarini M (2009)** A Mek1-Mek2 heterodimer determines the strength and duration of the Erk signal. *Nature Structural & Molecular Biology* 16:294-303.
- Caunt CJ, Keyse SM (2013)** Dual-specificity MAP kinase phosphatases (MKPs): Shaping the outcome of MAP kinase signalling. *Febs Journal* 280:489-504.
- Chen HM, Zhu GF, Li Y, Padia RN, Dong Z, Pan ZK, Liu KB, Huang S (2009)** Extracellular Signal-Regulated Kinase Signaling Pathway Regulates Breast Cancer Cell Migration by Maintaining slug Expression. *Cancer Research* 69:9228-9235.
- Chen RH, Sarnecki C, Blenis J (1992)** Nuclear-localization and regulation of ERK-encoded and RSK-encoded protein-kinases. *Molecular and Cellular Biology* 12:915-927.
- Cherfils J, Zeghouf M (2013)** Regulation of small GTPases by GEFs, GAPs and GDIs. *Physiological Reviews* 93:269-309.
- Chong H, Lee J, Guan KL (2001)** Positive and negative regulation of Raf kinase activity and function by phosphorylation. *Embo Journal* 20:3716-3727.
- Christiansen JJ, Rajasekaran AK (2006)** Reassessing epithelial to mesenchymal transition as a prerequisite for carcinoma invasion and metastasis. *Cancer Research* 66:8319-8326.
- Chuderland D, Konson A, Seger R (2008)** Identification and characterization of a general nuclear translocation signal in signaling proteins. *Molecular Cell* 31:850-861.
- Cutler RE, Stephens RM, Saracino MR, Morrison DK (1998)** Autoregulation of the Raf-1 serine/threonine kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95:9214-9219.
- Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, Teague J, Woffendin H, Garnett MJ, Bottomley W, Davis N, Dicks N, Ewing R, Floyd Y, Gray K, Hall S, Hawes R, Hughes J, Kosmidou V, Menzies A, Mould C, Parker A, Stevens C, Watt S, Hooper S, Wilson R, Jayatilake H, Gusterson BA, Cooper C, Shipley J, Hargrave D, Pritchard-Jones K, Maitland N, Chenevix-Trench G, Riggins GJ, Bigner DD, Palmieri G, Cossu A, Flanagan A, Nicholson A, Ho JWC, Leung SY, Yuen ST, Weber BL, Siegler HF, Darrow TL, Paterson H, Marais R, Marshall CJ, Wooster R, Stratton MR, Futreal PA (2002)** Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 417:949-954.
- Dhillon AS, Hagan S, Rath O, Kolch W (2007)** MAP kinase signalling pathways in cancer. *Oncogene* 26:3279-3290.
- Dimitri CA, Dowdle W, MacKeigan JP, Blenis J, Murphy LO (2005)** Spatially separate docking sites on ERK2 regulate distinct signaling events in vivo. *Current Biology* 15:1319-1324.

- Ding QM, Gros R, Gray ID, Taussig R, Ferguson SSG, Feldman RD (2004)** Raf kinase activation of adenylyl cyclases: Isoform-selective regulation. *Molecular Pharmacology* 66:921-928.
- Doehn U, Hauge C, Frank SR, Jensen CJ, Duda K, Nielsen JV, Cohen MS, Johansen JV, Winther BR, Lund LR, Winther O, Taunton J, Hansen SH, Frodin M (2009)** RSK Is a Principal Effector of the RAS-ERK Pathway for Eliciting a Coordinate Promotile/Invasive Gene Program and Phenotype in Epithelial Cells. *Molecular Cell* 35:511-522.
- Dougherty MK, Muller J, Ritt DA, Zhou M, Zhou XZ, Copeland TD, Conrads TP, Veenstra TD, Lu KP, Morrison DK (2005)** Regulation of raf-1 by direct feedback phosphorylation. *Molecular Cell* 17:215-224.
- Downward J (2003)** Targeting ras signalling pathways in cancer therapy. *Nature Reviews Cancer* 3:11-22.
- Dumaz N, Marais R (2003)** Protein kinase A blocks Raf-1 activity by stimulating 14-3-3 binding and blocking Raf-1 interaction with Ras. *Journal of Biological Chemistry* 278:29819-29823.
- Eblen ST, Slack-Davis JK, Tarcsafalvi A, Parsons JT, Weber MJ, Catling AD (2004)** Mitogen-activated protein kinase feedback phosphorylation regulates MEK1 complex formation and activation during cellular adhesion. *Molecular and Cellular Biology* 24:2308-2317.
- Farooqui R, Fenteany G (2005)** Multiple rows of cells behind an epithelial wound edge extend cryptic lamellipodia to collectively drive cell-sheet movement. *Journal of Cell Science* 118:51-63.
- Ferrell JE, Bhatt RR (1997)** Mechanistic studies of the dual phosphorylation of mitogen-activated protein kinase. *Journal of Biological Chemistry* 272:19008-19016.
- Fischmann TO, Smith CK, Mayhoo TW, Myers JE, Reichert P, Mannarino A, Carr D, Zhu H, Wong J, Yang RS, Le HV, Madison VS (2009)** Crystal Structures of MEK1 Binary and Ternary Complexes with Nucleotides and Inhibitors. *Biochemistry* 48:2661-2674.
- Franco SJ, Huttenlocher A (2005)** Regulating cell migration: calpains make the cut. *Journal of Cell Science* 118:3829-3838.
- Friedl P (2004)** Prespecification and plasticity: shifting mechanisms of cell migration. *Current Opinion in Cell Biology* 16:14-23.
- Friedl P, Hegerfeldt Y, Tusch M (2004)** Collective cell migration in morphogenesis and cancer. *International Journal of Developmental Biology* 48:441-449.
- Fukuda M, Gotoh I, Gotoh Y, Nishida E (1996)** Cytoplasmic localization of mitogen-activated protein kinase kinase directed by its NH₂-terminal, leucine-rich short amino acid sequence, which acts as a nuclear export signal. *Journal of Biological Chemistry* 271:20024-20028.
- Gao CF, Vande Woude GF (2005)** HGF/SF-Met signaling in tumor progression. *Cell Research* 15:49-51.
- Gardner AM, Vaillancourt RR, Langecarter CA, Johnson GL (1994)** MEK-1 phosphorylation by MEK kinase, Raf, and mitogen activated protein-kinase – Analysis of phosphopeptides and regulation activity. *Molecular Biology of the Cell* 5:193-201.
- Garrod D, Chidgey M (2008)** Desmosome structure, composition and function. *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes* 1778:572-587.
- Ghosh SJ, Xie WQ, Quest AFG, Mabrouk GM, Strum JC, Bell RM (1994)** The cysteine-rich region of Raf-1 kinase contains zinc, translocates to liposomes, and is adjacent to a segment that binds GTP-Ras. *Journal of Biological Chemistry* 269:10000-10007.

- Glading A, Bodnar RJ, Reynolds IJ, Shiraha H, Satish L, Potter DA, Blair HC, Wells A (2004)** Epidermal growth factor activates m-calpain (calpain II), at least in part, by extracellular signal-regulated kinase-mediated phosphorylation. *Molecular and Cellular Biology* 24:2499-2512.
- Gonzalez FA, Raden DL, Davis RJ (1991)** Identification of substrate recognition determinants for human ERK1 and ERK2 protein-kinases. *Journal of Biological Chemistry* 266:22159-22163.
- Gonzalez FA, Raden DL, Rigby MR, Davis RJ (1992)** Heterogeneous expression of 4 MAP kinase isoforms in human tissues. *Febs Letters* 304:170-178.
- Gooding JM, Yap KL, Ikura M (2004)** The cadherin-catenin complex as a focal point of cell adhesion and signalling: new insights from three-dimensional structures. *Bioessays* 26:497-511.
- Guarino M (2010)** Src Signaling in Cancer Invasion. *Journal of Cellular Physiology* 223:14-26.
- Guo WJ, Giancotti FG (2004)** Integrin signalling during tumour progression. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 5:816-826.
- Halbleib JM, Nelson WJ (2006)** Cadherins in development: cell adhesion, sorting, and tissue morphogenesis. *Genes & Development* 20:3199-3214.
- Hall A (1998)** Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* 279:509-514.
- Hancock JF (2003)** Ras proteins: Different signals from different locations. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 4:373-384.
- Hanks SK, Quinn AM, Hunter T (1988)** The protein-kinase family – conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science* 241:42-52.
- Heidecker G, Huleihel M, Cleveland JL, Kolch W, Beck TW, Lloyd P, Pawson T, Rapp UR (1990)** Mutational activation of C-Raf-1 and definition of the minimal transforming sequence. *Molecular and Cellular Biology* 10:2503-2512.
- Hoshino R, Chatani Y, Yamori T, Tsuruo T, Oka H, Yoshida O, Shimada Y, Ari-i S, Wada H, Fujimoto J, Kohno M (1999)** Constitutive activation of the 41-/43-kDa mitogen-activated protein kinase signaling pathway in human tumors. *Oncogene* 18:813-822.
- Hu CD, Kariya K, Tamada M, Akasaka K, Shirouzu M, Yokoyama S, Kataoka T (1995)** Cysteine-rich region of Raf-1 interacts with activator domain of post-translationally modified Ha-Ras. *Journal of Biological Chemistry* 270:30274-30277.
- Huang LY, Li BX, Li WJ, Guo HB, Zou F (2009)** ATP-sensitive potassium channels control glioma cells proliferation by regulating ERK activity. *Carcinogenesis* 30:737-744.
- Huwiler A, Brunner J, Hummel R, Vervoordeldonk M, Stabel S, vandenBosch H, Pfeilschifter J (1996)** Ceramide-binding and activation defines protein kinase c-Raf as a ceramide-activated protein kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93:6959-6963.
- Jacobs D, Glossip D, Xing HM, Muslin AJ, Kornfeld K (1999)** Multiple docking sites on substrate proteins form a modular system that mediates recognition by ERK MAP kinase. *Genes & Development* 13:163-175.
- Kaoud TS, Devkota AK, Harris R, Rana MS, Abramczyk O, Warthaka M, Lee S, Girvin ME, Riggs AF, Dalby KN (2011)** Activated ERK2 Is a Monomer in Vitro with or without Divalent Cations and When Complexed to the Cytoplasmic Scaffold PEA-15. *Biochemistry* 50:4568-4578.
- Karin M, Liu ZG, Zandi E (1997)** AP-1 function and regulation. *Current Opinion in Cell Biology* 9:240-246.

- Khokhlatchev AV, Canagarajah B, Wilsbacher J, Robinson M, Atkinson M, Goldsmith E, Cobb MH (1998)** Phosphorylation of the MAP kinase ERK2 promotes its homodimerization and nuclear translocation. *Cell* 93:605-615.
- Kulkarni S, Goll DE, Fox JEB (2002)** Calpain cleaves RhoA generating a dominant-negative form that inhibits integrin-induced actin filament assembly and cell spreading. *Journal of Biological Chemistry* 277:24435-24441.
- Kuroda S, Fukata M, Fujii K, Nakamura T, Izawa I, Kaibuchi K (1997)** Regulation of cell-cell adhesion of MDCK cells by Cdc42 and Rac1 small GTPases. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 240:430-435.
- Kurokawa K, Itoh RE, Yoshizaki H, Ohba Y, Nakamura T, Matsuda M (2004)** Coactivation of Rad1 and Cdc42 at lamellipodia and membrane ruffles induced by epidermal growth factor. *Molecular Biology of the Cell* 15:1003-1010.
- Lamarche-Vane N, Hall A (1998)** CdGAP, a novel proline-rich GTPase-activating protein for Cdc42 and Rac. *Journal of Biological Chemistry* 273:29172-29177.
- Lamouille S, Xu J, Derynck R (2014)** Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 15:178-196.
- Lauffenburger DA, Horwitz AF (1996)** Cell migration: A physically integrated molecular process. *Cell* 84:359-369.
- Le Clainche C, Carlier MF (2008)** Regulation of actin assembly associated with protrusion and adhesion in cell migration. *Physiological Reviews* 88:489-513.
- Lebreton G, Casanova J (2014)** Specification of leading and trailing cell features during collective migration in the Drosophila trachea. *Journal of Cell Science* 127:465-474.
- Lee T, Hoofnagle AN, Kabuyama Y, Stroud J, Min XS, Goldsmith EJ, Chen L, Resing KA, Ahn NG (2004)** Docking motif interactions in MAP kinases revealed by hydrogen exchange mass spectrometry. *Molecular Cell* 14:43-55.
- Lefloch R, Pouyssegur J, Lenormand P (2008)** Single and combined silencing of ERK1 and ERK2 reveals their positive contribution to growth signaling depending on their expression levels. *Molecular and Cellular Biology* 28:511-527.
- Lefloch R, Pouyssegur J, Lenormand P (2009)** Total ERK1/2 activity regulates cell proliferation. *Cell Cycle* 8:705-711.
- Leighton IA, Dalby KN, Caudwell FB, Cohen PTW, Cohen P (1995)** Comparison of the specificities of p70 S6 kinase and MAPKAP kinase-1 identifies a relatively specific substrate for p70 S6 kinase – The N-terminal kinase domain of MAPKAP kinase-1 is essential for peptide phosphorylation. *Febs Letters* 375:289-293.
- Lidke DS, Huang F, Post JN, Rieger B, Wilsbacher J, Thomas JL, Pouyssegur J, Jovin TM, Lenormand P (2010)** ERK Nuclear Translocation Is Dimerization-independent but Controlled by the Rate of Phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry* 285:11.
- Lu X, Law BK, Chytil AM, Brown KA, Aakre ME, Moses HL (2004)** Activation of the Erk pathway is required for TGF-beta 1-induced EMT in vitro. *Neoplasia* 6:603-610.
- Maekawa M, Ishizaki T, Boku S, Watanabe N, Fujita A, Iwamatsu A, Obinata T, Ohashi K, Mizuno K, Narumiya S (1999)** Signaling from rho to the actin cytoskeleton through protein kinases ROCK and LIM-kinase. *Science* 285:895-898.
- Manning G, Whyte DB, Martinez R, Hunter T, Sudarsanam S (2002)** The protein kinase complement of the human genome. *Science* 298:1912-+.
- Mansour SJ, Matten WT, Hermann AS, Candia JM, Rong S, Fukasawa K, Vandewoude GF, Ahn NG (1994)** Transformation of mammalian-cells by constitutively active MAP kinase kinase. *Science* 265:966-970.

- Marais R, Wynne J, Treisman R (1993)** The Srf accessory protein Elk-1 contains a growth factor-regulated transcriptional activation domain. *Cell* 73:381-393.
- Matsubayashi Y, Ebisuya M, Honjoh S, Nishida E (2004)** ERK activation propagates in epithelial cell sheets and regulates their migration during wound healing. *Current Biology* 14:731-735.
- Mendoza MC, Er EE, Zhang WJ, Ballif BA, Elliott HL, Danuser G, Blenis J (2011)** ERK-MAPK Drives Lamellipodia Protrusion by Activating the WAVE2 Regulatory Complex. *Molecular Cell* 41:661-671.
- Millan J, Cain RJ, Reglero-Real N, Bigarella C, Marcos-Ramiro B, Fernandez-Martin L, Correas I, Ridley AJ (2010)** Adherens junctions connect stress fibres between adjacent endothelial cells. *Bmc Biology* 8.
- Mor A, Philips MR (2006)** Compartmentalized Ras/MAPK signaling. In: *Annual Review of Immunology. Annual Reviews: Palo Alto.* pp 771-800.
- Murphy LO, MacKeigan JP, Blenis J (2004)** A network of immediate early gene products propagates subtle differences in mitogen-activated protein kinase signal amplitude and duration. *Molecular and Cellular Biology* 24:144-153.
- Murphy LO, Smith S, Chen RH, Fingar DC, Blenis J (2002)** Molecular interpretation of ERK signal duration by immediate early gene products. *Nature Cell Biology* 4:556-564.
- Nadella KS, Saji M, Jacob NK, Pavel E, Ringel MD, Kirschner LS (2009)** Regulation of actin function by protein kinase A-mediated phosphorylation of Limk1. *Embo Reports* 10:599-605.
- Nagano M, Hoshino D, Koshikawa N, Akizawa T, Seiki M (2012)** Turnover of Focal Adhesions and Cancer Cell Migration. *International Journal of Cell Biology, ID 310616*
- Nassar M, Horn G, Herrmann C, Scherer A, McCormick F, Wittinghofer A (1995)** The 2.2-angstrom crystal-structure of the Ras-binding domain of the serine threonine kinase C-Raf-1 in complex with Rap1A and GTP analog. *Nature* 375:554-560.
- Niault T, Sobczak I, Meissl K, Weitsman G, Piazzolla D, Maurer G, Kern F, Ehrenreiter K, Hamerl M, Moarefi I, Leung T, Carugo O, Ng T, Baccarini M (2009)** From autoinhibition to inhibition in trans: the Raf-1 regulatory domain inhibits Rho-alpha kinase activity. *Journal of Cell Biology* 187:335-342.
- Nobes CD, Hall A (1995)** Rho, Rac, and Cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell* 81:53-62.
- Omelchenko T, Vasiliev JM, Gelfand IM, Feder HH, Bonder EM (2003)** Rho-dependent formation of epithelial "leader" cells during wound healing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100:10788-10793.
- Pages G, Guerin S, Grall D, Bonino FD, Smith A, Anjuere F, Auburger P, Pouyssegur J (1999)** Defective thymocyte maturation in p44 MAP kinase (Erk 1) knockout mice. *Science* 286:1374-1377.
- Pawlak G, Helfman DM (2002a)** MEK mediates v-Src-induced disruption of the actin cytoskeleton via inactivation of the Rho-ROCK-LIM kinase pathway. *Journal of Biological Chemistry* 277:26927-26933.
- Pawlak G, Helfman DM (2002b)** Post-transcriptional down-regulation of ROCK1/Rho-kinase through an MEK-dependent pathway leads to cytoskeleton disruption in Ras-transformed fibroblasts. *Molecular Biology of the Cell* 13:336-347.

- Pearson G, Robinson F, Gibson TB, Xu BE, Karandikar M, Berman K, Cobb MH (2001)** Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: Regulation and physiological functions. *Endocrine Reviews* 22:153-183.
- Pfleiderer P, Sumandea MP, Rybin VO, Wang CJ, Steinberg SF (2009)** Raf-1: a novel cardiac troponin T kinase. *Journal of Muscle Research and Cell Motility* 30:67-72.
- Philipova R, Whitaker M (2005)** Active ERK1 is dimerized in vivo: bisphosphodimers generate peak kinase activity and monophosphodimers maintain basal ERK1 activity. *Journal of Cell Science* 118:5767-5776.
- Pidoux G, Tasken K (2010)** Specificity and spatial dynamics of protein kinase A signaling organized by A-kinase-anchoring proteins. *Journal of Molecular Endocrinology* 44:271-284.
- Plotnikov A, Chuderland D, Karamansha Y, Livnah O, Seger R (2011)** Nuclear Extracellular Signal-Regulated Kinase 1 and 2 Translocation Is Mediated by Casein Kinase 2 and Accelerated by Autophosphorylation. *Molecular and Cellular Biology* 31:3515-3530.
- Pollard TD, Cooper JA (2009)** Actin, a Central Player in Cell Shape and Movement. *Science* 326:1208-1212.
- Prasain N, Stevens T (2009)** The actin cytoskeleton in endothelial cell phenotypes. *Microvascular Research* 77:53-63.
- Pritchard CA, Hayes L, Wojnowski L, Zimmer A, Marais RM, Norman JC (2004)** B-raf acts via the ROCKII/LIMK/cofilin pathway to maintain actin stress fibers in fibroblasts. *Molecular and Cellular Biology* 24:5937-5952.
- Pullikuth AK, Catling AD (2010)** Extracellular Signal-Regulated Kinase Promotes Rho-Dependent Focal Adhesion Formation by Suppressing p190A RhoGAP. *Molecular and Cellular Biology* 30:3233-3248.
- Pylayeva-Gupta Y, Grabocka E, Bar-Sagi D (2011)** RAS oncogenes: weaving a tumorigenic web. *Nature Reviews Cancer* 11:761-774.
- Ramstad C, Sundvold V, Johansen HK, Lea T (2000)** cAMP-dependent protein kinase (PKA) inhibits T cell activation by phosphorylating Ser-43 of Raf-1 in the MAPK/ERK pathway. *Cellular Signalling* 12:557-563.
- Reffay M, Parrini MC, Cochet-Escartin O, Ladoux B, Buguin A, Coscoy S, Amblard F, Camonis J, Silberzan P (2014)** Interplay of RhoA and mechanical forces in collective cell migration driven by leader cells. *Nature Cell Biology* 16:217-+.
- Ridley AJ, Comoglio PM, Hall A (1995)** Regulation of scatter factor hepatocyte growth-factor responses by Ras, Rac, and Rho in MDCK cells. *Molecular and Cellular Biology* 15:1110-1122.
- Roberts PJ, Der CJ (2007)** Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer. *Oncogene* 26:3291-3310.
- Robinson FL, Whitehurst AW, Raman M, Cobb MH (2002)** Identification of novel point mutations in ERK2 that selectively disrupt binding to MEK1. *Journal of Biological Chemistry* 277:14844-14852.
- Romeo Y, Zhang XC, Roux PP (2012)** Regulation and function of the RSK family of protein kinases. *Biochemical Journal* 441:553-569.
- Rottner K, Hall A, Small JV (1999)** Interplay between Rac and Rho in the control of substrate contact dynamics. *Current Biology* 9:640-648.
- Royal I, Lamarche-Vane N, Lamorte L, Kaibuchi K, Park M (2000)** Activation of Cdc42, Rac, PAK, and Rho-kinase in response to hepatocyte growth factor differentially regulates epithelial cell colony spreading and dissociation. *Molecular Biology of the Cell* 11:1709-1725.

- Rubinfeld H, Seger R (2005)** The ERK cascade - A prototype of MAPK signaling. *Molecular Biotechnology* 31:151-174.
- Rushworth LK, Hindley AD, O'Neill E, Kolch W (2006)** Regulation and role of Raf-1/B-Raf heterodimerization. *Molecular and Cellular Biology* 26:2262-2272.
- Sahai E, Marshall CJ (2002)** ROCK and Dia have opposing effects on adherens junctions downstream of Rho. *Nature Cell Biology* 4:408-415.
- Sahai E, Olson MF, Marshall CJ (2001)** Cross-talk between Ras and Rho signalling pathways in transformation favours proliferation and increased motility. *Embo Journal* 20:755-766.
- Saleem S, Li JM, Yee SP, Fellows GF, Goodyer CG, Wang RN (2009)** beta 1 integrin/FAK/ERK signalling pathway is essential for human fetal islet cell differentiation and survival. *Journal of Pathology* 219:182-192.
- Samuels ML, Weber MJ, Bishop JM, McMahon M (1993)** Conditional transformation of cells and rapid activation of the mitogen-activated protein-kinase cascade by an estradiol-dependent human Raf-1 protein kinase. *Molecular and Cellular Biology* 13:6241-6252.
- Sanchez-Tillo E, Liu YQ, de Barrios O, Siles L, Fanlo L, Cuatrecasas M, Darling DS, Dean DC, Castells A, Postigo A (2012)** EMT-activating transcription factors in cancer: beyond EMT and tumor invasiveness. *Cellular and Molecular Life Sciences* 69:3429-3456.
- Schramek H, Feifel E, Marschitz I, Golochtchapova N, Gstraunthaler G, Montesano R (2003)** Loss of active MEK1-ERK1/2 restores epithelial phenotype and morphogenesis in transdifferentiated MDCK cells. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 285:C652-C661.
- Shchemelinin I, Sefc L, Necas E (2006)** Protein kinases, their function and implication in cancer and other diseases. *Folia Biologica* 52:81-100.
- Sheridan DL, Kong Y, Parker SA, Dalby KN, Turk BE (2008)** Substrate discrimination among mitogen-activated protein kinases through distinct docking sequence motifs. *Journal of Biological Chemistry* 283:19511-19520.
- Shimizu M, Wang WF, Walch ET, Dunne PW, Epstein HF (2000)** Rac-1 and Raf-1 kinases, components of distinct signaling pathways, activate myotonic dystrophy protein kinase. *Febs Letters* 475:273-277.
- Shin K, Fogg VC, Margolis B (2006)** Tight junctions and cell polarity. In: *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. Annual Reviews: Palo Alto. pp 207-235.
- Shin S, Dimitri CA, Yoon SO, Dowdle W, Blenis J (2010)** ERK2 but Not ERK1 Induces Epithelial-to-Mesenchymal Transformation via DEF Motif-Dependent Signaling Events. *Molecular Cell* 38:114-127.
- Sipeki S, Bander E, Buday L, Farkas G, Bacsy E, Ways DK, Farago A (1999)** Phosphatidylinositol 3-kinase contributes to Erk1/Erk2 MAP kinase activation associated with hepatocyte growth factor-induced cell scattering. *Cellular Signalling* 11:885-890.
- Smith JA, Poteet-Smith CE, Malarkey K, Sturgill TW (1999)** Identification of an extracellular signal-regulated kinase (ERK) docking site in ribosomal S6 kinase, a sequence critical for activation by ERK in vivo. *Journal of Biological Chemistry* 274:2893-2898.
- Suzuki K, Hata S, Kawabata Y, Sorimachi H (2004)** Structure, activation, and biology of calpain. *Diabetes* 53:S12-S18.
- Takaishi K, Sasaki T, Kotani H, Nishioka H, Takai Y (1997)** Regulation of cell-cell adhesion by Rac and Rho small G proteins in MDCK cells. *Journal of Cell Biology* 139:1047-1059.
- Tan CM, Kelvin DJ, Litchfield DW, Ferguson SSG, Feldman RD (2001)** Tyrosine kinase-mediated serine phosphorylation of adenylyl cyclase. *Biochemistry* 40:1702-1709.

- Tanoue T, Adachi M, Moriguchi T, Nishida E (2000)** A conserved docking motif in MAP kinases common to substrates, activators and regulators. *Nature Cell Biology* 2:110-116.
- Tcherkezian J, Danek EI, Jenna S, Triki L, Lamarche-Vane N (2005)** Extracellular signal-regulated kinase 1 interacts with and phosphorylates Cdc42 at an important regulatory site. *Molecular and Cellular Biology* 25:6314-6329.
- Tojkander S, Gateva G, Lappalainen P (2012)** Actin stress fibers - assembly, dynamics and biological roles. *Journal of Cell Science* 125:1855-1864.
- Totsukawa G, Wu Y, Sasaki Y, Hartshorne DJ, Yamakita Y, Yamashiro S, Matsumura F (2004)** Distinct roles of MLCK and ROCK in the regulation of membrane protrusions and focal adhesion dynamics during cell migration of fibroblasts. *Journal of Cell Biology* 164:427-439.
- Vantaggiato C, Formentini I, Bondanza A, Bonini C, Naldini L, Brambilla R (2006)** ERK1 and ERK2 mitogen-activated protein kinases affect Ras-dependent cell signaling differentially. *Journal of Biology*,5:14
- Vasioukhin V, Bauer C, Yin M, Fuchs E (2000)** Directed actin polymerization is the driving force for epithelial cell-cell adhesion. *Cell* 100:209-219.
- Vial E, Sahai E, Marshall CJ (2003)** ERK-MAPK signaling coordinately regulates activity of Rac1 and RhoA for tumor cell motility. *Cancer Cell* 4:67-79.
- Vomastek T, Iwanicki MP, Schaeffer HJ, Tarcsafalvi A, Parsons JT, Weber MJ (2007)** RACK1 targets the extracellular signal-regulated kinase/mitogen-activated protein kinase pathway to link integrin engagement with focal adhesion disassembly and cell motility. *Molecular and Cellular Biology* 27:8296-8305.
- von Thun A, Birtwistle M, Kalna G, Grindlay J, Strachan D, Kolch W, von Kriegsheim A, Norman JC (2012)** ERK2 drives tumour cell migration in three-dimensional microenvironments by suppressing expression of Rab17 and liprin-beta 2. *Journal of Cell Science* 125:1465-1477.
- Wagle N, Emery C, Berger MF, Davis MJ, Sawyer A, Pochanard P, Kehoe SM, Johannessen CM, MacConaill LE, Hahn WC, Meyerson M, Garraway LA (2011)** Dissecting Therapeutic Resistance to RAF Inhibition in Melanoma by Tumor Genomic Profiling. *Journal of Clinical Oncology* 29:3085-3096.
- Wang S, Ghosh RN, Chellappan SP (1998)** Raf-1 physically interacts with Rb and regulates its function: a link between mitogenic signaling and cell cycle regulation. *Molecular and Cellular Biology* 18:7487-7498.
- Wang XT, Martindale JL, Holbrook NJ (2000)** Requirement for ERK activation in cisplatin-induced apoptosis. *Journal of Biological Chemistry* 275:39435-39443.
- Watanabe N (2010)** Inside view of cell locomotion through single-molecule: fast F-/G-actin cycle and G-actin regulation of polymer restoration. *Proceedings of the Japan Academy Series A-Mathematical Sciences* 86:62-83.
- Webb DJ, Donais K, Whitmore LA, Thomas SM, Turner CE, Parsons JT, Horwitz AF (2004)** FAK-Src signalling through paxillin, ERK and MLCK regulates adhesion disassembly. *Nature Cell Biology* 6:154-+.
- Whitmarsh AJ, Davis RJ (1996)** Transcription factor AP-1 regulation by mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways. *Journal of Molecular Medicine-Jmm* 74:589-607.
- Wolf I, Rubinfeld H, Yoon S, Marmor G, Hanoch T, Seger R (2001)** Involvement of the activation loop of ERK in the detachment from cytosolic anchoring. *Journal of Biological Chemistry* 276:24490-24497.
- Woodcock SA, Rooney C, Lontos M, Connolly Y, Zoumpourlis V, Whetton AD, Gorgoulis VG, Malliri A (2009)** Src-Induced Disassembly of Adherens Junctions Requires

Localized Phosphorylation and Degradation of the Rac Activator Tiam1. *Molecular Cell* 33:639-653.

Wu J, Dent P, Jelinek T, Wolfman A, Weber MJ, Sturgill TW (1993) Inhibition of the EFG-activated MAP kinase signaling pathway by adenosine-3',5'-monophosphate. *Science* 262:1065-1069.

Wu SK, Yap AS (2013) Patterns in Space: Coordinating Adhesion and Actomyosin Contractility at E-cadherin Junctions. *Cell Communication and Adhesion* 20:201-212.

Xiang XQ, Zang MW, Waelde CA, Wen R, Luo ZJ (2002) Phosphorylation of (SSYY341)-S-338 regulates specific interaction between Raf-1 and MEK1. *Journal of Biological Chemistry* 277:44996-45003.

Yao Y, Li W, Wu JW, Germann UA, Su MSS, Kuida K, Boucher DM (2003) Extracellular signal-regulated kinase 2 is necessary for mesoderm differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100:12759-12764.

Yazicioglu MN, Goad DL, Ranganathan A, Whitehurst AW, Goldsmith EJ, Cobb MH (2007) Mutations in ERK2 binding sites affect nuclear entry. *Journal of Biological Chemistry* 282:28759-28767.

Yoon S, Seger R (2006) The extracellular signal-regulated kinase: Multiple substrates regulate diverse cellular functions. *Growth Factors* 24:21-44.

Yung YV, Yao Z, Hanoch T, Seger R (2000) ERK1b, a 46-kDa ERK isoform that is differentially regulated by MEK. *Journal of Biological Chemistry* 275:15799-15808.

Zang MW, Gong J, Luo LQ, Zhou J, Xiang XQ, Huang W, Huang QR, Luo XX, Olbrot M, Peng YH, Chen CY, Luo ZJ (2008) Characterization of Ser(338) Phosphorylation for Raf-1 Activation. *Journal of Biological Chemistry* 283:31429-31437.

Zang MW, Hayne C, Luo ZJ (2002) Interaction between active Pak1 and Raf-1 is necessary for phosphorylation and activation of Raf-1. *Journal of Biological Chemistry* 277:4395-4405.

Zebisch A, Troppmair J (2006) Back to the roots: the remarkable RAF oncogene story. *Cellular and Molecular Life Sciences* 63:1314-1330.

Zhang FM, Strand A, Robbins D, Cobb MH, Goldsmith EJ (1994) Atomic structure of the MAP kinase ERK2 at 2.3-angstrom resolution. *Nature* 367:704-711.

Zhang JL, Zhou B, Zheng CF, Zhang ZY (2003) A bipartite mechanism for ERK2 recognition by its cognate regulators and substrates. *Journal of Biological Chemistry* 278:29901-29912.

Zhang W, Liu HT (2002) MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. *Cell Research* 12:9-18.

Zheng CF, Guan KL (1993) Properties of MEKs, the kinases that phosphorylate and activate the extracellular signal-regulated kinases. *Journal of Biological Chemistry* 268:23933-23939.

Zhou B, Wang ZX, Zhao Y, Brautigan DL, Zhang ZY (2002) The specificity of extracellular signal-regulated kinase 2 dephosphorylation by protein phosphatases. *Journal of Biological Chemistry* 277:31818-31825.

Zhou B, Zhang ZY (2002) The activity of the extracellular signal-regulated kinase 2 is regulated by differential phosphorylation in the activation loop. *Journal of Biological Chemistry* 277:13889-13899.

Zhou TJ, Sun LG, Humphreys J, Goldsmith EJ (2006) Docking interactions induce exposure of activation loop in the MAP kinase ERK2. *Structure* 14:1011-1019.

Zondag GCM, Evers EE, ten Klooster JP, Janssen L, van der Kammen RA, Collard JG (2000) Oncogenic Ras downregulates Rac activity, which leads to increased Rho activity and epithelial-mesenchymal transition. *Journal of Cell Biology* 149:775-781.

Zwick E, Bange J, Ullrich A (2001) Receptor tyrosine kinase signalling as a target for cancer intervention strategies. *Endocrine-Related Cancer* 8:161-173.