

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Molekulární a buněčná biologie, genetik a virologie



Mgr. Jan Kosla

Molekulární mechanizmy fenotypových přechodů fibroblastických buněk: dediferenciace myofibroblastů a ovlivnění invazivity a metastazování sarkomu

Molecular mechanisms of fibroblastoid cell phenotype transitions: dedifferentiation of myofibroblasts and influencing of invasiveness and metastasis of sarcoma

Dizertační práce

Akademie věd České republiky

Ústav molekulární genetiky, v.v.i.

Oddělení molekulární virologie

Školitel: RNDr. Michal Dvořák, CSc.

Praha, 2013

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně 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, 13. června 2013

Podpis

Obsah

Poděkování	6
Zkratky	7
Abstrakt	14
Abstract	15
1. Cíle	16
2. Úvod	17
2.1 Vznik a progresse rakoviny (Kancerogeneze)	17
2.2 Nádorové stroma v nádorovém mikroprostředí	19
2.3 Myofibroblasty	21
2.3.1 Role myofibroblastů v hojení ran	21
2.3.2 Role myofibroblastů ve fibróze	22
2.3.3 Role myofibroblastů ve vzniku a progresi rakoviny	24
2.3.3.1 Vztah myofibroblastů k mechanickým vlastnostem nádorového mikroprostředí	25
2.3.3.2 Remodelace ECM myofibroblasty	26
2.3.3.3 Sekrece rozpustných faktorů myofibroblasty	27
2.3.3.4 Myofibroblasty/ECM v efektu prekancerózního pole (tzv. field cancerization)	28
2.3.3.5 Role myofibroblastů v EMT rakovinných buněk	29
2.3.3.6 Role myofibroblastů v nádorové angiogenezi	30
2.3.3.7 Interakce myofibroblastů /ECM s imunitním systémem v nádorovém stroma	31
2.3.3.8 Myofibroblasty /ECM a selekce agresivních subtypů nádorových buněk	31
2.3.3.9 Role myofibroblastů /ECM v přípravě tkání pro metastazování /v přípravě metastatické niky	31
2.3.3.10 Rozdíly mezi myofibroblasty a fibroblasty spojenými s nádory (CAFs)	32
2.3.3.11 CAFs jako cíl protinádorové terapie	33
2.4 Role signalizace dráhou TGFβ v biologii myofibroblastů a progresi rakovinného bujení	34
2.5 Invazivita rakovinných buněk	36
2.6 Rodina transkripčních faktorů EGR	39
2.6.1 Struktura, vlastnosti a regulace aktivity proteinů rodiny EGR	39
2.6.2 Funkce proteinů rodiny EGR	40
3. Materiál a metody	43
3.1 Buněčné kultury a opusobení buněk <i>in vitro</i>	43

3.2 Konstrukce DNA vektorů	46
3.3 Izolace RNA, PCR, RT-PCR a qPCR	48
3.4 Mikročipová analýza	49
3.5 Příprava protilátek	50
3.6 Imunodetekce proteinů („Western blotting“) WB	50
3.7 Barvení kolagenu uloženého v ECM pomocí barviva Sirius červeň	52
3.8 Imunofluorescenční a fluorescenční mikroskopie	52
3.9 Test adhezivních vlastností buněk	53
3.10 Mikroskopické časosběrné snímání	53
3.11 Zymografie v želatinovém gelu	54
3.12 Test invazivity buněk v 3D kolagenu <i>in vitro</i>	54
3.13 Stanovení buněčné morfologie v 3D kolagenu	54
3.14 Matrix odvozená z dermis	55
3.15 Rastrovací elektronová mikroskopie	55
3.16 Experimentální zvířata	56
3.17 Hodnocení velikosti a četnosti nádorů a metastáz	56
4. Výsledky	57
4.1 Studium myofibroblastů	57
4.1.1 Buňky CEDM připravené z explantů kůže kuřecího embrya zjevně mají fenotyp myofibroblastů	57
4.1.2 Mikročipová analýza genů regulovaných signální dráhou TGFβ v buňkách CEDM ..	58
4.1.3 Ověření dat z mikročipové analýzy genů regulovaných signální dráhou TGFβ v buňkách CEDM	63
4.1.4 Dlouhodobý účinek inhibice signální dráhy TGFβ v buňkách CEDM	65
4.1.5 Trvalá exprese PDGFB, Ha-Ras(G12V) nebo EGR4 v buňkách CEDM vyvolává morfologické změny, sníženou schopnost produkovat ECM a ztrátu vláken αSMA...70	
4.1.6 Mikročipová analýza buněk CEDM s trvale exprimovaným EGR4 odhalila sníženou expresi genů kódujících komponenty ECM, proteiny spojené s aktinovou kontrakcí a známé negativní regulátory signalizace dráhou TGFβ	73
4.1.7 V buňkách CEDM s trvalou expresí EGR4 dochází k silné inhibici signální dráhy TGF- β	75
4.1.8 Trvalá exprese FOXG1 je dostatečná k potlačení fenotypu myofibroblastů	77
4.1.9 Nadexprese TGF-β3 obnovuje v buňkách CEDM s trvale exprimovaným EGR4 fenotyp myofibroblastů	80

4.1.10 Kombinované působení inhibitoru signální dráhy TGF- β MPPN a forbolového esteru TPA na buňky CEDM napodobuje změny vyvolané trvalou expresí genů PDGFB, Ha-Ras(G12V), EGR4 nebo FOXG1	81
4.2 Studium molekulární podstaty metastazování fibrosarkomových buněk	83
4.2.1 Unikátní model metastazování založený na buněčných liniích PR9692 a PR9692-E9	83
4.2.2 Mikročipová analýza genů odlišně exprimovaných v rodičovské metastazující linii PR9692 a v nemetastazující dceřiné linii PR9692-E9	83
4.2.3 Zvýšená hladina exprese genu EGR1 vede k obnovení metastazování buněk PR9692-E9	90
4.2.4 Adhezivní vlastnosti, charakteristika aktinového cytoskeletu a migrační chování buněk odvozených z PR9692	91
4.2.5 Analýza exprese genů buněk PR9692-E9-EGR1	92
4.2.6 Signalizace dráhou Rho/ROCK/MLC je kriticky důležitá pro améboidní pohyb silně metastazujících buněk PR9692 v trojrozměrné kolagenové matrix	96
4.2.7 Signalizace dráhou Rho/ROCK/MLC je kriticky důležitá pro améboidní pohyb krysích, silně metastazujících buněk A3 v trojrozměrné kolagenové matrix a bezbuněčné dermis	101
4.2.8 Signalizace dráhou Rho/ROCK/MLC je kriticky důležitá pro metastazování buněk PR9692	105
4.2.9 Aktivace RhoA v nemetastazujících buňkách PR9692-E9 vede k obnovení invazivních vlastností a metastazování těchto buněk	106
5. Diskuze	109
5.1 Studium myofibroblastů	109
5.2 Studium molekulární podstaty metastazování fibrosarkomových buněk	117
6. Závěry	122
7. Podíl autora na výsledcích obsažených v dizertační práci	126
8. Použitá literatura	127
9. Legendy elektronické přílohy	150

Poděkování:

Tímto bych chtěl poděkovat všem, kteří umožnili nebo usnadnili vznik této práce. Především mému školiteli Michalu Dvořákovi za všestrannou podporu a péči. Dále bych chtěl poděkovat Vladimírovi Čermákovi za jeho plodnou spolupráci a pomoc. Děkuji všem dalším spolupracovníkům, bez nichž by moje dizertační práce nemohla vzniknout v tomto rozsahu, jmenovitě Jiřímu Plachému, Janu Brábkovi, Daniele Paňkové, Ondřeji Toldemu, Martě Dvořákové, Kristýně Bicanové a Danielu Röselovi. Děkuji všem kolegům z Oddělení molekulární virologie za sdílení zkušeností a přátelskou atmosféru. Velice děkuji mé snoubence Silvii Jiménez Jiménez za její téměř nekonečnou trpělivost a všestrannou podporu. Dík za podporu patří i mé rodině a přátelům.

Tato práce vznikla za finanční podpory Akademie věd České republiky (granty AV0Z50520514, RVO68378050), Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy České republiky (grant LC06061) a Tomáše Hlavničky, Romana Minárika, Miroslava Navrátila, Leoše Navrátila, Vladimíra Pečenky, Karla Rybáčka, Miroslava Sobotky, Josefa Soukala a Petra Streitberga.

Zkratky

	česky	originální název
α SMA	alfa aktin hladkého svalstva	α smooth muscle actin
3D	trojrozměrný	three-dimensional
ACTA2	gen pro aktin hladkého svalstva , alfa 2	actin, alpha-2, smooth muscle
ACTG2	aktin, gama 2	actin, gamma 2
ADCY2	adenylyl cykláza 2	adenylyl cyclase 2
AGTR2	receptor pro angiotenzin II	angiotensin receptor 2
AK	aktinická keratóza	actinic keratosis
cAMP	3'-5' cyklický adenosinmonofosfát	3'-5'-cyclic adenosine monophosphate
AMT	améboidně-mezenchymový přechod	amoeboid-mesenchymal transition
APOA1	apolipoprotein A-I	apolipoprotein A-I
ASPN	asporin	asporin
AT1	receptor pro angiotenzin	angiotensin receptor 1
AT2	receptor pro angiotenzin II	angiotensin receptor 2
atd.	a tak dále	
BAMBI	membránově vázaný inhibitor BMP a aktivinu	BMP and activin membrane-bound inhibitor
BDNF	neurotrofní faktor pocházející z mozku	brain-derived neurotrophic factor
BF	světlé pole	bright field
bFGF	bazický fibroblastový růstový faktor	basic fibroblast growth factor
BMP	kostní morfogenetický protein	bone morphogenetic protein
BSA	telecí sérový albumin	bovine serum albumin
C16orf45	otevřený čtecí rámec 45 chromosomu 16	chromosome 16 open reading frame 45
CADM1	adhesní molekula buňky	cell adhesion molecule 1
cAMP	cyklický adenosin monofosfát	3'-5'-cyclic adenosine monophosphate
CBP	protein vážící CREB	CREB-binding protein
CCDC104	protein 104 obsahující doménu coiled-coil	coiled-coil domain containing 104
CCDC109B	protein 109B obsahující doménu coiled-coil	coiled-coil domain containing 109B
CCN	CYR61, CTGF, NOV	CYR61, CTGF, NOV
CD44	molekula diferenciační skupiny 44	cluster of differentiation 44
CD56	molekula diferenciační skupiny 56	cluster of differentiation 56
cDNA	komplementární DNA	complementary DNA
CEDM	kuřecí embryonální kožní myofibroblasty	chicken embryo dermal myofibroblast
CFI	faktor I komplementu	complement factor I
CLDN1	klaudin	claudin 1
c-Maf	buněčný homolog onkogenu muskuloaponeurotického fibrosarkomu	musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog
CMTM7	transmembránový protein s doménou MARVEL podobný CKLF	CKLF-like MARVEL transmembrane domain containing 7
c-Myc	buněčný homolog virového onkogenu myelocytomatózy	myelocytomatosis viral oncogene homolog

CNN1	bazický kalponin	calponin 1, basic
COL1A1	alfa 1 řetězec kolagenu typu I	collagen, type I, alpha 1
COL1A2	alfa 2 řetězec kolagenu typu I	collagen, type I, alpha 2
COL2A1	alfa 1 řetězec kolagenu typu II	collagen, type II, alpha 1
COL6A1	alfa 1 řetězec kolagenu typu IV	collagen, type IV, alpha 1
COL6A2	alfa 2 řetězec kolagenu typu IV	collagen, type IV, alpha 2
COL6A3	alfa 3 řetězec kolagenu typu IV	collagen, type IV, alpha 3
COMP	protein oligomerní matrix chrupavky	cartilage oligomeric matrix protein
CREB	protein vážící element odpovídající na cAMP	cAMP responsive element binding protein
CTGF	růstový faktor pojivové tkáně	connective tissue growth factor
CXCL12	chemokinový ligand 12 s C-X-C motivem	chemokine (C-X-C motif) ligand 12
CYR61	protein 61 bohatý cysteinem	cysteine-rich protein 61
DAPI	diamidinofenyлиндol	4',6-diamidino-2-phenylindole
DMEM	Eagleovo médium modifikované Dulbecco(em)	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	dimetylsulfoxid	dimethyl sulfoxide
DNA	kyselina deoxyribonukleová	deoxyribonucleic acid
DNER	protein obsahující repetici EGF podobný delta/notch	delta/notch-like EGF repeat containing
DSC2	desmokolin 2	desmocollin 2
DUSP	fosfatáza s duální specifitou	dual-specificity phosphatase
DUSP4	fosfatáza s duální specifitou 4	dual-specificity phosphatase 4
DUSP5	fosfatáza s duální specifitou 5	dual-specificity phosphatase 5
ECM	extracelulární matrix	extracellular matrix
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová	ethylenediaminetetraacetic acid
EGF	epidermální růstový faktor	epidermal growth factor
EGFL6	6. člen superrodiny proteinů s EGF repeticí	EGF-like-domain, multiple 6
EGR	časná růstová odpověď	early growth response
EMT	epitelo-mezenchymový přechod	epithelial-mesenchymal transition
EPC	prekurzory endotelových buněk	endothelial precursor cells
ERK	kináza regulovaná extracelulárním signálem	extracellular-signal-regulated kinase
EST	označená exprimovaná sekvence	expressed sequence tag
FABPs	proteiny vážící mastné kyseliny	fatty acid binding proteins
FACS	fluorescenční průtoková cytometrie	fluorescence-activated cell sorting
FAK	kináza fokálních adhezí	focal adhesion kinase
FAM180A	člen A rodiny proteinů 180 se sekvenční podobností	family with sequence similarity 180, member A
FAP	protein aktivace fibroblastů	fibroblast activation protein
FGF	růstový faktor fibroblastů	fibroblast growth factor
FGF7	růstový faktor fibroblastů 7	fibroblast growth factor 7
FGFs	růstové faktory fibroblastů	fibroblast growth factors
FIBIN	homolog genu pro tvorbu základu ploutví	fin bud initiation factor homolog

FITC	isothiokyanát fluoresceinu	fluorescein isothiocyanate
FOXP1	protein G1 s motivem forkhead	forkhead box G1
FSP-1	protein 1 specifický pro fibroblasty	fibroblast specific protein 1
GATA6	6. člen rodiny proteinů vážících GATA	GATA binding protein 6
GFP	zelený fluorescenční protein	green fluorescent protein
GPR1	receptor 1 vázaný s G-proteinem	G protein-coupled receptor 1
GPR160	receptor 160 vázaný s G-proteinem	G protein-coupled receptor 160
GTP	guanozintrifosfát	guanosine triphosphate
HAS2	syntetáza hyaluronanu 2	hyaluronan synthase 2
HBSS	Hankův vyvážený solný roztok	Hank's Balanced Salt Solution
HCC	hepatocelulární karcinom	hepatocellular carcinoma
HGF	hepatocytární růstový faktor	hepatocyte growth factor
HHIP	protein interagující s hedgehog	hedgehog interacting protein
hm	mapa hybridizačních intenzit	heatmap
HTR4	receptor 4 hydroxytryptaminu	5-hydroxytryptamine receptor 4
ID2	protein inhibující vazbu na DNA	inhibitor of DNA binding 2
IF	impaktní faktor	impact factor
IGF	růstový faktor podobný inzulinu	insulin-like growth factor
IGSF4	4. člen superrodiny imunoglobulinů	immunoglobulin superfamily, member 4
IL1b	interleukin 1b	interleukin 1b
IL16	interleukin 16	interleukin 16
IL6	interleukin 6	interleukin 6
IMEM	Dulbecco(vo) minimální základní medium modifikované Iscove(m)	Iscove's modified Dulbecco's minimal essential medium
IPTG	isopropyl-β-D-thiogalaktosid	
IRX1	homeotický protein irokéz 1	iroquois homeobox protein 1
ITGA11	integrin, alfa 11	integrin, alpha 11
ITGA4	integrin, alfa 4	integrin, alpha 4
ITGB3	integrin, beta 3	integrin, beta 3
ITGB5	integrin, beta 5	integrin, beta 5
JNK	kináza N-konce proteinu c-jun	c-jun N-terminal kinase
KLF15	faktor 15 podobný faktoru kruppel	kruppel-like factor 15
KRT14	keratin 14	keratin 14
KRT19	keratin 19	keratin 19
LAP	peptid zodpovědný za latentní formu TGFβ	latency associated peptide
LHX8	homeotický protein 8 s doménou LIM	LIM homeobox 8
LOX	lyzyl oxidáza	lysyl oxidase
LPL	lipoprotein lipáza	lipoprotein lipase
LRRN4	neuronální protein 4 s repeticí bohatou na leucin	leucine rich repeat neuronal 4
LTBP1	protein 1 vážící latentní TGFβ	latent transforming growth factor beta binding protein 1
LTR	dlouhá koncová repetice	long terminal repeat
LUM	lumikan	lumican

MafB	homolog onkogenu muskuloaponeurotického fibrosarkomu	musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog B
MAPK	protein kináza aktivovaná mitogenem	mitogen-activated protein kinase
MAT	mezenchymově-améboidní přechod	mesenchymal-amoeboid transition
ME	epitop proteinu myc	myc epitope
MEOX2	mesenchymový homeotický protein 2	mesenchyme homeobox 2
MKP2	fosfatáza 2 MAPkinázy	MAPK phosphatase 2
MLC	lehký řetězec myozinu	myosin, light chain
MLC2	lehký řetězec myozinu 2	myosin, light chain 2
MLCK	kináza lehkého řetězce myozinu	myosin light chain kinase
MMP3	matrixová metalopeptidáza 3	matrix metalloproteinase 3
MMPs	matrixové metaloproteinázy	matrix metalloproteinases
MPPN	2-(3-(6-methylpyridin-2-yl)-1H-pyrazol-4-yl)-1,5-naftyridin	2-(3-(6-methylpyridin-2-yl)-1H-pyrazol-4-yl)-1,5-naphthyridine
MRLC	regulační lehký řetězec myozinu	myosin, regulatory light chain
MRTF	transkripční faktor podobný myokardinu	myocardin-related transcription factor
MSRB3	metionin sulfoxid reduktáza B3	methionine sulfoxide reductase B3
Msx1	homolog homeotického proteinu	muscle segment homeobox homolog 1
MT1-MMP	matrixová metaloproteináza vázaná na membránu	membrane-type matrix metalloproteinase 1
MTUS1	tumor supresorový protein 1 asociovaný s mikrotubuly	microtubule associated tumor suppressor 1
MYL9	regulační lehký polypeptid 9 myozinu	myosin, light polypeptide 9, regulatory
MYO10	myozin X	myosin X
MYOCD	myokardin	myocardin
n.a.	neaplikovatelné	
NAB1	protein 1 vážící NGFI-A	NGFI-A binding protein 1
NAB2	protein 2 vážící NGFI-A	NGFI-A binding protein 2
NCAM1	adhesní molekula 1 neurálních buněk	neural cell adhesion molecule 1
NF-κB	jaderný faktor enhanceru lehkého řetězce kapa v B lymfocytech	nuclear factor of kappa light chain gene enhancer in B cells
NGF	nervový růstový faktor	nerve growth factor
NGFI-A	protein A indukovaný nervovým růstovým faktorem	nerve growth factor-induced protein A
NK	přirozený zabíječ	natural killer
NOV	gen nadexprimovaný v nefroblastómu	nephroblastoma overexpressed gene
n.p.	neproveditelné	
NPR3	receptor 3 natriuretického peptidu	natriuretic peptide receptor 3
NR4A3	3. člen skupiny A 4. podrodiny jaderných receptorů	nuclear receptor subfamily 4, group A, member 3
obr.	obrázek	
PACE4	proprotein konvertáza 4 štěpící v místě s párovými basickými aminokyselinami	paired basic amino acid cleaving enzyme 4
PBS	fosfátový pufr	phosphate buffered saline
PCR	polymerázová řetězová reakce	polymerase chain reaction

PCSK6	konvertáza proproteinů subtilisin/kexin 6	proprotein convertase subtilisin/kexin type 6
PDE1A	fosfodiesteráza 1A	phosphodiesterase 1A
PDE4B	fosfodiesteráza 4B	phosphodiesterase 4B
PDE4D	fosfodiesteráza 4D	phosphodiesterase 4D
PDGF	růstový faktor odvozený od krevních destiček	platelet-derived growth factor
PGF	placentální růstový faktor	placental growth factor
PKIG	inhibitor gama proteinkinázy závislé na cAMP	protein kinase (cAMP-dependent) inhibitor gamma
POSTN	periostin	periostin
PPARA	receptor alfa aktivovaný proliferátorem peroxizomů	peroxisome proliferator-activated receptor alpha
PRDM4	protein 4 obsahující PR doménu	PR domain containing 4
p-s	sady oligonukleotidových sond	probe-set
PTN	pleiotrofin	pleiotrophin
qPCR	kvantitativní PCR	quantitative polymerase chain reaction
Rap1	protein 1 příbuzný proteinu Ras	Ras-related protein 1
RARRES1	protein 1 odpovídající na signalizaci receptorem pro kyselinu retinovou	retinoic acid receptor responder 1
Ras	homolog virového onkogenu krysího sarkomu	rat sarcoma viral oncogene homolog
RET	protoonkogen přestavěný během transfekce	rearranged during transfection protooncogene
RhoA	homolog genové rodiny Ras, člen A	Ras homolog gene family, member A
RIAM	adaptorová molekula interagující s Rap1	Rap1-interacting adaptor molecule
RNA	kyselina ribonukleová	ribonucleic acid
ROCK	protein kináza s motivem coiled-coil asociovaná s Rho	Rho-associated, coiled-coil containing protein kinase
RSV	virus Rousova sarkomu	Rous sarcoma virus
RTK	receptorová tyrosinová kináza	receptor tyrosine kinase
RT-PCR	polymerázová řetězová reakce vázaná na reverzní transkripci	reverse transcription PCR
SB	vzorkový pufr	sample buffer
SCC	karcinom dlaždicových buněk	Squamous Cell Carcinoma
SCF	faktor kmenových buněk	stem cell factor
SCG2	sekretogranin II	Secretogranin II
SD	standardní odchylka	standard deviation
SDC1	syndekan 1	syndecan 1
SDF1	faktor 1 uvolňovaný stromálními buňkami	stromal cell-derived factor 1
SDS	dodecylsulfát sodný	sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	elektroforéza proteinů na polyakrylamidovém gelu v přítomnosti SDS	SDS polyacrylamide gel electrophoresis
SEC14L1	gen 1 podobný SEC14	SEC14-like 1

SEM	rastrovací elektronová mikroskopie	scanning electron microscopy
SEPP1	selenoprotein P, plazma, 1	selenoprotein P, plasma, 1
SFRP4	sekretovaný protein podobný frizzled	secreted frizzled-related protein 4
SMAD2	2. člen rodiny genů homologických s Sma a MAD	Sma and mothers against decapentaplegic homolog 2
SMAD3	3. člen rodiny genů homologických s Sma a MAD	Sma and mothers against decapentaplegic homolog 3
SMURF2	ubikvitin protein ligáza E3 specifická pro SMAD	SMAD specific E3 ubiquitin protein ligase 2
SOD3	superoxid dismutáza	superoxide dismutase 3
SPON2	spondin 2	spondin 2
SRE	DNA element zprostředkující odpověď na sérum	serum response element
SRF	faktor odpovědi na sérum	serum response factor
tab.	tabulka	
TAGLN	transgelin	transgelin
TBX15	15. člen rodiny transkričních faktorů obsahujících T-box	T-box 15
TBX2	2. člen rodiny transkričních faktorů obsahujících T-box	T-box 2
TCF3	transkripční faktor 3	transcription factor 3
TGFβ	transformující růstový faktor β	transforming growth factor-β
TGFB3	gen pro transformující růstový faktor β	transforming growth factor beta 3 gene
TGFB3 ^{CSCS}	gen TGFB3 s mutacemi C227S a C229S	transforming growth factor beta 3 gene encoding C227S and C229S mutations
TGFB3 ^{WT}	divoká alela genu TGFB3	transforming growth factor beta 3 gene, wild type
TGFBI	gen/protein indukovaný TGFβ	transforming growth factor beta-induced
TGFBR1	receptor 1 pro TGFβ	transforming growth factor beta receptor 1
TGFBR2	receptor 2 pro TGFβ	transforming growth factor beta receptor 2
TGM2	transglutamináza 2	transglutaminase 2
THBS1	trombospondin 1	thrombospondin 1
THBS2	trombospondin 2	thrombospondin 2
TIMP3	tkáňový inhibitor metaloproteináz 3	tissue inhibitor of metalloproteinase 3
TIMPs	tkáňové inhibitory metaloproteináz	tissue inhibitors of metalloproteinases
TMEM45A	transmembránový protein 45A	transmembrane protein 45A
TNF-α	faktor nádorové nekrózy alfa	tumor necrosis factor alpha
TPA	12-O-tetradecanoylforbol-13-acetát	12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate
TPM1	tropomyozin 1	tropomyosin 1
TRITC	tetrametylrhodamin isothiokyanát	tetramethylrhodamine isothiocyanate
TRPC4	receptor tranzientního kationtového kanálu, superrodina C, člen 4	transient receptor potential cation channel, subfamily C, member 4
TSCL1	tumor supresorový protein 1 plicního nádoru	tumor suppressor in lung cancer 1

tzv.	takzvaný	
UV	ultrafialové	ultraviolet
VEGFA	Vaskulární endotelový růstový faktor A	vascular endothelial growth factor A
VEGFC	Vaskulární endotelový růstový faktor C	vascular endothelial growth factor C
VTN	vitronektin	vitronectin
WB	proteiny vázané na membráně stylem "Western blotting"	Western blot
WNT		wingless-type murine mammary tumor virus integration site family
ZEB1	homeotický protein1 se zinkovým prstem vážící E-box	zinc finger E-box binding homeobox 1
ZEB2	homeotický protein 2 se zinkovým prstem vážící E-box	zinc finger E-box binding homeobox 2
ZIC1	protein 1 mozečku s motivem zinkového prstu	zinc finger protein of cerebellum 1
ZNF423	protein 423 s motivem zinkového prstu	zinc finger protein 423

Abstrakt

Fibroblasty jsou základní buněčnou složkou pojivové tkáně. Jedná se o různorodou skupinu buněk, která se svojí schopností produkovat extracelulární matrix (ECM) podílí na architektuře pojivových tkání a na hojení ran. Fibroblasty a od nich odvozené buňky se však účastní i mnoha patologických procesů – tvorby zhoubných nádorů a fibrózy. Progrese nádorů, končící tvorbou metastáz, je závažný biomedicínský problém. V poslední době se stále více ukazuje, že v tomto procesu hraje důležitou roli interakce mezi rakovinnými buňkami a nádorovým stroma.

Nádorové stroma je tvořeno především myofibroblasty a jejich produkty, konkrétně ECM a také rozpustnými faktory a enzymy. Myofibroblasty se více či méně podílí na všech krocích nádorové progresie. Myofibroblasty navíc hrají klíčovou roli ve fibróze, dalším dosud prakticky neléčitelném, závažném lidském onemocnění, které úzce souvisí s nádorovou progresí. Proto jsme hledali molekulární nástroje, kterými je možné myofibroblastický fenotyp odstranit. V nově zavedeném kuřecím modelu se podařilo zcela dediferencovat primární myofibroblasty pomocí inhibice signální dráhy TGF β a současného narušení signální dráhy MAPK.

Maligně transformované fibroblasty tvoří sarkomy. ECM je první překážkou při migraci rakovinných buněk primárního sarkomu do dalších orgánů, kde tvoří metastázy. Proto jsme studovali molekulární mechanismy, které ovlivňují schopnost sarkomových buněk účinně migrovat, prostupovat ECM a tvořit metastázy. V kuřecích fibrosarkomových buňkách jsme identifikovali transkripční program a jeho regulátor EGR1, který je potřebný pro jejich migraci i metastazování. Také jsme zjistili, že améboidní způsob pohybu a signalizace dráhou Rho/ROCK/MLC hrají zásadní roli v metastazování sarkomových buněk kuřecího i krysího experimentálního modelu. Evoluční zachování odhalených molekulárních mechanismů mezi ptáky a savci, v těchto biomedicínsky významných buněčných procesech, poukazuje na jejich obecný význam pro invazivitu sarkomových buněk.

Abstract

Fibroblasts are the principal cellular component of the connective tissue. They are a heterogeneous group of cells which contribute to the structure of connective tissue and wound healing by their ability to produce extracellular matrix (ECM). Fibroblasts and cells derived from them are involved in many pathological processes such as formation of malignant tumors and fibrosis. Tumor progression which finally leads to metastasis is a serious biomedical problem. There is a growing body of the recent evidence showing an important role of the tumor stroma and its interaction with cancer cells in cancer progression.

Tumor stroma comprises mainly of myofibroblasts and their products, namely ECM, soluble factors, and enzymes. Myofibroblasts contribute more or less to all steps of cancer progression. Furthermore myofibroblasts play a key role in fibrosis, another serious human disease which is not efficiently treatable and which is associated with cancer progression. These facts made us to search for molecular means capable of eliminating the myofibroblastic phenotype. We succeeded to entirely dedifferentiate primary myofibroblasts by concomitant inhibition of TGF β signaling and perturbation of MAPK signaling in a chick model that we have introduced.

Malignant fibroblasts form sarcomas. ECM is the first barrier interfering with the migration of primary tumor cells and sarcoma metastasis. We have identified an expression profile and its regulator EGR1 which are necessary for fibrosarcoma cells migration and metastasis. Furthermore, we have shown that the amoeboid mode of invasion and the Rho/ROCK/MLC signaling play a crucial role in metastasis of both experimental chicken and rat sarcoma cells. The evolutionary conservation of these molecular mechanisms in birds and mammals suggests their general importance for invasiveness of sarcoma cells.

1. Cíle

Cílem práce bylo přispět k odhalování molekulárních regulačních schémat, které ovládají změnu fenotypu fibroblast-myofibroblast, neboť tyto změny jsou významné jednak pro tvorbu nádorového stroma podporujícího progresi nádoru a rovněž pro rozvoj fibróz. Dalším cílem bylo studium molekulárních mechanismů sarkomových buněk, vedoucích k účinné migraci, prostupování ECM a tvorbě metastáz.

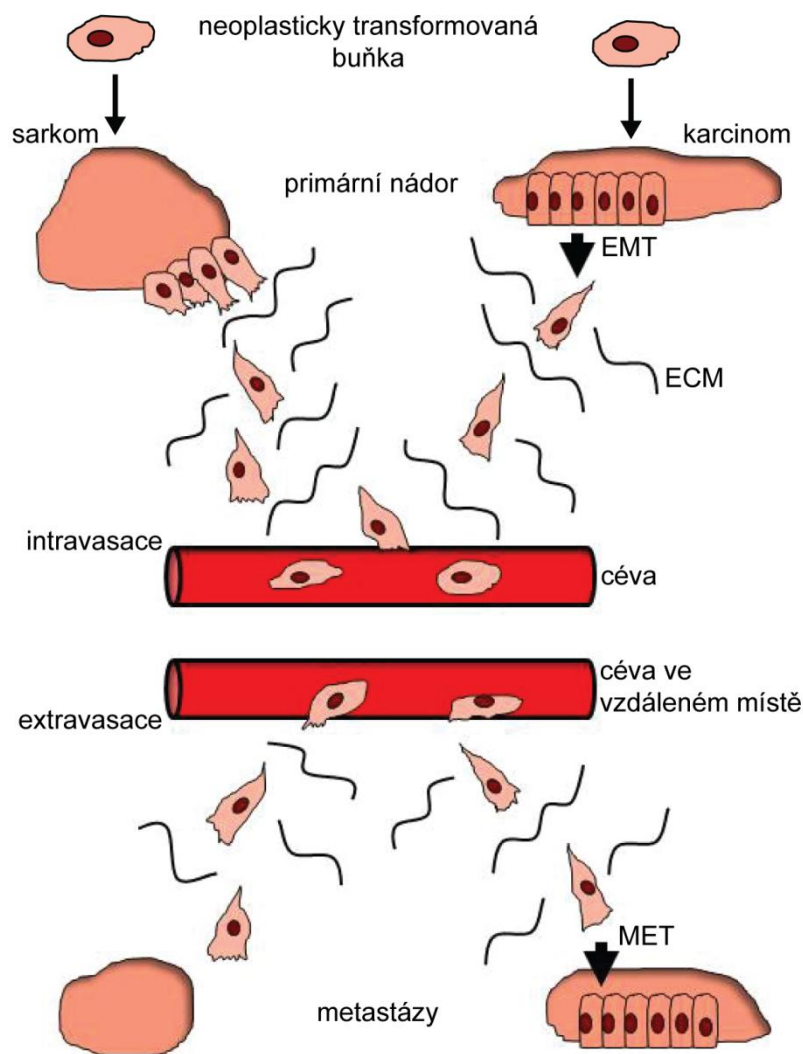
Specifické cíle této práce:

- 1) Zavést na pole studia myofibroblastů nový, snadno dostupný, nesavčí model a tento model (CEDM) charakterizovat.
- 2) Zjistit roli signalizace dráhou TGF β v udržení fenotypu buněk CEDM, nově zavedeného modelu biologie myofibroblastů.
- 3) Nalézt buněčné a farmaceutické regulátory, které by byly schopné dediferencovat buňky CEDM.
- 4) Identifikovat molekulární mechanismy zodpovědné za invazivitu a metastazování modelových sarkomových buněk PR9692 a PR9692-E9.

2 Úvod

2.1 Vznik a progres rakoviny (Kancerogeneze)

Vznik a progres rakoviny, jejichž důsledkem je tvorba metastáz, jsou velmi komplexní procesy, které se skládají z mnoha kroků. Během těchto procesů se normální tělní buňky transformují v buňky rakovinné a společně s buňkami nádorového stroma dávají vzniknout primárním nádorům. Primární nádor se dále rozsévá do vzdálených orgánů a dává vzniknout sekundárním nádorům, metastázám, v procesu nazývaném metastazování. Prvním klíčovým krokem kancerogeneze je změna normální buňky v buňku nádorovou a tento proces je nazýván maligní (též neoplastická) transformace buňky. Rakovinné buňky vznikající z epitelových buněk dávají vzniknout karcinomům, buňky pocházející z buněk mezenchymových dávají vzniknout sarkomům. Transformované buňky, spolu s buňkami stroma obklopujícími transformované buňky, proliferují a vytváří specifické nádorové prostředí. Takové prostředí usnadňuje tvorbu nových cév (angiogeneze), které často nemají normální stavbu. Cévy vzniklé v nádorovém prostředí umožňují nádorům dále růst a metastazovat. Zvláštní nádorové prostředí podporuje invazivitu (schopnost invaze) nádorových buněk do dalších tkání a metastazování, což je pravděpodobně důsledek snahy nádorových buněk opustit nevlídné prostředí primárního nádoru. Epitelové buňky musejí nejdříve získat vlastnosti migrujících buněk, typické pro buňky mezenchymové, tak zvaným epitelo-mezenchymovým přechodem (EMT). Invazivní rakovinné buňky migrují/invadují skrz ECM, která je obklopuje a vstupují do krevních nebo lymfatických cév takzvanou intravasací. Když se nádorové buňky pohybují v krevním řečišti, jsou vystaveny mnoha pro ně nezvyklým stresům, se kterými se musí vyrovnat. Velký tlak a různá rychlost proudící tekutiny v řečišti například klade velké nároky na mechanickou odolnost buněk. Rakovinné buňky opouští krevní řečiště extravasací v místě i velmi vzdáleném od primárního nádoru a tvoří nejdříve mikrometastázy, které mohou vyrůst v makrometastázy. V tvorbě mikro- a makrometastáz jsou zapojené v zásadě stejné nebo obdobné procesy (migrace skrz ECM, stromatogeneze, angiogeneze a případně i proces obrácený k EMT - totiž mezenchymo-epitelový přechod, MET), které byly potřeba pro vznik primárního nádoru (obr. 1). V průběhu všech výše zmíněných procesů musí nádorové buňky také unikat imunitnímu systému. Vysoká komplexita celého procesu vedoucího ke vzniku metastáz činí tento proces velmi neúčinný a nutí nádorové buňky k neustálému přizpůsobování a získání (alespoň u některých nádorových buněk) vlastností nádorových kmenových buněk (přehledně (Kopfstein & Christofori, 2006; Steeg & Theodorescu, 2008)).



Obr. 1 Zjednodušené schematické zobrazení nádorové progresy zaměřené na rakovinné buňky.

Hned od počátku rakovinné progresy hraje zcela zásadní roli nádorové mikroprostředí. Nádorové mikroprostředí, které v mnoha aspektech připomíná prostředí hojící se rány, je utvářeno specifikou interakcí mezi rakovinnými buňkami a okolní tkání, nazývanou nádorové stroma. Zatímco se výzkum rakoviny po velmi dlouhou dobu zaměřoval na rakovinné buňky samotné, během posledních let na sebe čím dál větší pozornost strhává nádorové stroma a jeho interakce s rakovinnými buňkami. Přibývá stále více důkazů o klíčové úloze nádorového stroma a jeho interakci s rakovinnými buňkami při vzniku rakoviny a její progresi. Navíc se ukazuje, že analýza nádorového stroma zásadně přispívá ke klasifikaci a prognóze některých rakovin (např. u rakoviny prsu (Labiche et al, 2010; Planche et al, 2011) a rakoviny vaječníků (Finak et al, 2008). V některých případech mají pro kategorizaci a prognózu rakovinných onemocnění markery nádorového stroma větší význam, než markery samotných nádorových buněk.

Velmi významnou buněčnou složkou nádorového stroma představují myofibroblasty, které se zásadně podílí na tvorbě nádorového stroma, např. produkcí a remodelací extracelulární matrix (ECM), nebuněčné složky nádorového stroma. ECM obklopuje rakovinné buňky primárního nádoru a představuje první překážku rozšiřování rakovinných buněk po těle. Z toho vyplývá, že schopnost invadovat/migrovat skrz ECM je pro rakovinné buňky první a zásadní podmínkou, kterou tyto buňky musejí splnit v procesu vedoucím k tvorbě metastáz. Zatímco děje způsobující neoplastickou transformaci buněk a tvorbu primárních nádorů byly intenzivně studovány po dlouhou dobu a nahromadili jsme o nich velké množství poznatků, víme jen relativně málo o mechanismech, které stojí za procesem metastazování. Většina (90%, (Sporn, 1996)) pacientů se solidními nádory umírá kvůli tvorbě metastáz, což činí metastatický proces v současné době jedním z nejdůležitějších témat ve výzkumu zaměřenému na lidskou medicínu. Navzdory obrovskému množství úsilí a peněz, které byly do výzkumu vedoucího k léčbě rakoviny investovány, léčba rakoviny je v mnoha případech neúčinná. Vzhledem k faktu, že metastazování je hlavní příčinou smrti pacientů s rakovinou, hlubší porozumění procesům, které stojí za rozséváním primárních nádorů po těle, by mělo vést k účinnější léčbě rakoviny a celkově většímu přežívání pacientů. Z těchto důvodů jsme se v našem výzkumu zaměřili na molekulární mechanismy vedoucí k dediferenciaci klíčových buněk nádorového stroma, myofibroblastů a mechanismy dovolující rakovinným buňkám účinně invadovat nejenom skrz nádorové stroma, ale i do ostatních tkání.

2.2 Nádorové stroma v nádorovém mikroprostředí

Nádorové mikroprostředí je vytvářeno interakcí rakovinných buněk s okolní tkání, která dává vzniknout nádorovému stroma v procesu nazývaném stromatogeneze. Vývoj nádorových buněk k malignějším stádiím je doprovázen neustálou stromatogenezí, při které se neustále mění složení i struktura stroma obklopujícího nádorové buňky (Menon & Beningo, 2011). Relativní poměr stroma k rakovinným buňkám v nádoru se liší u různých typů rakovin, ale stroma může tvořit dokonce většinu nádorové tkáně. Například u pokročilé rakoviny vaječníků tvoří stroma mezi 7% a 83% nádorové hmoty, s mediánem 50% hmoty (Strauli et al, 1983). Nádorové stroma je velmi specifické a skládá se jak z buněčné (CAFs/myofibroblasty, endoteliální buňky, imunitní buňky, atd.), tak nebuněčné složky (ECM, cytokiny, proteázy a jejich inhibitory, atd.). Charakteristickými rysy mikroprostředí pevných nádorů jsou např.: deregulované pH, změny v buněčném metabolismu („Warburgův efekt“), hypoxie, tvorba abnormálních cév, zánětlivé prostředí a zvýšená tuhost daná ECM.

Deregulované pH je adaptivní odpovědí většiny nádorů. Rakovinné buňky mají, bez ohledu na jejich původ, obrácený gradient pH. To znamená, že vnitrobuněčné pH je neustále vyšší než pH extracelulární (Webb et al, 2011). V normálních buňkách dospělého jedince se vnitrobuněčné pH pohybuje kolem 7.2 a extracelulární pH kolem 7.4. Rakovinné buňky mají naopak vnitrobuněčné pH vyšší než 7.4 a extracelulární pH nižší než 6.7-7.1 (Gallagher et al, 2008). Tento obrácený pH gradient vede u rakovinných buněk ke zvláštním vlastnostem, jako jsou proliferace bez přítomnosti růstových faktorů, únik z apoptózy, navození zvláštního metabolismu, migrace a invazivity, které nakonec vedou k metastazování. Kyselé pH v okolí rakovinných buněk je důsledkem metabolické adaptace na hypoxické nádorové prostředí. Hypoxie, nižší hladina kyslíku v tkáni než je obvyklé, je výsledkem intenzivní proliferace buněk nádoru. S intenzivní proliferací se totiž zvětšuje vzdálenost mezi buňkami a cévami krevního řečiště, které kyslík dodávají (Brahimi-Horn et al, 2007a; Brahimi-Horn et al, 2007b; Brahimi-Horn & Pouyssegur, 2007). Nedostatek kyslíku uvnitř nádorové masy vede k omezení mitochondriální respirace a nutí nádorové buňky získávat energii především pomocí glykolytické dráhy. Je zajímavé, že rakovinné buňky používají glykolytickou dráhu jako zdroj energie i v případě, že mají dostatečný přísun kyslíku (aerobní glykolýza nebo „Warburgův efekt“) (Guppy, 2002; Warburg, 1956; Xu et al, 2005). Glykolýza se tedy stává nezbytnou pro přežití nádorových buněk (Bartrons & Caro, 2007). Tato adaptace rakovinných buněk na hypoxii vede k zvýšené produkci kyselin, v důsledku zvýšeného přijímání glukózy a jejího metabolizování na kyselinu mléčnou i nedostatečného odstraňování kyseliny mléčné a CO₂ cévami, nedostupnými uvnitř nádorové masy (Brahimi-Horn et al, 2007a; Brahimi-Horn et al, 2007b; Brahimi-Horn & Pouyssegur, 2007). Hypoxické prostředí, společně s dalšími faktory uvolňovanými rakovinnými buňkami vede k zapojení stromálních buněk do tvorby abnormálních cév, které mají nedokonalé stěny (jsou děravé neboli fenestrované) a usnadňují případný vstup nádorových buněk do krevního řečiště při metastazování (Merlo et al, 2006; Nagy et al, 2009). Stromální buňky (především myofibroblasty a buňky imunitního systému) se vedle buněk rakovinných podílejí na tvorbě zánětlivého mikroprostředí. Myofibroblasty jsou hlavním buněčným typem zodpovědným za charakteristické zvýšení tuhosti místa pevného nádoru (Levental et al, 2009).

V této dizertační práci jsem se zaměřil na interakci mezi nádorovými buňkami, myofibroblasty a produkty myofibroblastů, protože tato interakce hraje zásadní roli v utváření nádorového stromatu a prostupováním nádorových buněk stromatem, tím tedy i v progresi nádorů a je předpokladem metastazování. Navíc myofibroblasty, více než jiné buněčné typy, hrají důležitou roli v určení celkového klinického výsledku v některých typech rakovin (Zhang

et al, 2011). Interakce mezi nádorovými buňkami, myofibroblasty a produkty myofibroblastů se v posledních letech stává stále důležitějším tématem ve výzkumu rakoviny. Dá se očekávat, že lepší pochopení a narušení této interakce povede k významnému zlepšení v léčbě rakoviny.

2.3 Myofibroblasty

Myofibroblasty jsou buňky, které hrají zásadní roli v homeostázi tkání, hojení ran za fyziologických podmínek a ve vážných lidských patologiích jako jsou fibróza a rakovina. Původně fyziologický proces hojení ran není jak u fibrózy, tak rakoviny (tedy za patologických podmínek) ukončen. Navíc rakovinná onemocnění jsou často spojena s fibrotickým stavem nazývaným dezmodplázie a rakovinné buňky mají tendenci metastázovat do fibrotické tkáně (Barkan et al, 2010; O'Connell et al, 2011). Fibroblasty a myofibroblasty jsou z molekulárního hlediska poměrně špatně charakterizované a zřejmě proto neexistuje účinná léčba jimi způsobených onemocnění (Kalluri & Zeisberg, 2006). Abychom lépe pochopili maligní roli myofibroblastů v rakovině, je třeba je lépe charakterizovat a porozumět úlohám myofibroblastů v procesu hojení ran i tvorbě fibróz (fibrogenezi), které jsou popsány níže.

2.3.1 Role myofibroblastů v hojení ran

Myofibroblasty hrají klíčovou roli v procesu hojení ran. Když dojde k poškození tkáně, v důsledku sražení krevních destiček se v místě zranění aktivuje diferenciací buněk na fenotyp myofibroblastů. Krevní destičky se přichycují k exponovanému subendotelium v místě zraněných cév a uvolňují jejich biologický aktivní náklad (např. TGF- β 1, PDGF, IL1-B, MMPs, TIMPs), především z α -granulí (Barrientos et al, 2008). Degranulace krevních destiček vede k degradaci bazální membrány, indukci buněčné proliferace i migrace a rekrutování buněk imunitního systému a také buněk, které dají vzniknout myofibroblastům (Nurden, 2011). Rekrutované imunitní buňky pak dále ovlivňují cytokinové prostředí hojící se rány, pro diferenciaci myofibroblastů je zásadní produkce TGF- β 1 makrofágy. Jak se hojící proces vyvíjí, různé buněčné typy diferencují na myofibroblasty, ve kterých dochází k vytvoření autokrinní smyčky, vedoucí ke stálé tvorbě cytokinů TGF- β 1 a 3 (Demirci et al, 1996). Myofibroblasty secernují velké množství extracelulární matrix (ECM) a rozpustných faktorů, které přispívají k remodelaci ECM, komunikaci s ostatními buňkami (např. imunitního systému, endotelií, nervového systému, atd.) (přehledně (Werner & Grose, 2003)). Myofibroblasty také tvoří

vlákna z alfa aktinu hladkého svalstva (α SMA), která umožňují kontrakci myofibroblastů a uzavření rány. Místně specifická kontrakce je zprostředkována fokálními adhezemi mezi myofibroblasty a ECM (přehledně (Gabbiani, 2003)). Jakmile se rána uzavře, změní se rovnováha mezi MMPs a TIMPs (secernovanými myofibroblasty) ve prospěch degradace ECM a populace myofibroblastů z rány vymizí. K vymizení dochází programovanou buněčnou smrtí, apoptózou anebo nemózou (angl. nemosis), která má řadu společných rysů s nekrózou spíše než s apoptózou (Desmouliere et al, 1995; Rasanen & Vaheri, 2010). Nakonec v místě zhojené rány zůstávají pouze dormantní fibroblasty. Za patologických podmínek (fibróza, rakovina) k vymizení myofibroblastů nedochází.

Zajímavé je, že myofibroblasty mohou vzniknout z mnoha různých typů buněk. Mezi takové buněčné typy patří typicky lokální (dormantní) fibroblasty (Hinz et al, 2001). Dalším zdrojem myofibroblastů jsou cirkulující progenitory fibrocytů (buňky odvozené z monocytů pocházejících z kostní dřeně) (Abe et al, 2001), které migrují z krevního oběhu do místa zranění. Z progenitorů fibrocytů může překvapivě pocházet 30-50% myofibroblastů podílejících se na hojení ran (Direkze et al, 2003; Mori et al, 2005). Třetí zdroj se skládá z buněčných typů, které transdiferencují do myofibroblastů. Mezi buňky třetího zdroje patří pericyty (Rajkumar et al, 2005), ale i myoepitelové, endoepitelové buňky (viz. kapitola 2.3.2). Pro diferenciaci různých buněčných typů na myofibroblasty hraje zásadní roli signalizace TGF- β 1 zmíněná v předchozím odstavci, které je navíc věnována zvláštní kapitola 2.4 a mechanické vlastnosti mikroprostředí (Tomasek et al, 2002).

2.3.2 Role myofibroblastů ve fibróze

Při fibróze, též nazývané fibrotickým nebo fibroproliferativním onemocněním, dochází k proliferaci myofibroblastů a postupnému hromadění ECM, často doprovázenému chronickým zánětem, které vedou k nevratnému poškození postižené tkáně. Pokročilé stádium fibrózy vede k nevratnému poškození postiženého orgánu, jeho selhání a často i ke smrti pacienta. Poškozeny mohou být všechny životně důležité orgány, často játra, plíce, ledviny, srdce a kůže (Lopez-Novoa & Nieto, 2009; Pohlars et al, 2009). Odhaduje se, že chronická ztráta funkce orgánů (jako jsou kostní dřeň, srdce, střeva, ledviny, játra plíce a kůže) spojená s fibrózou přispívá po celém světě k jedné třetině přirozených úmrtí. Přitom neexistuje účinná léčba, která by zabránila vzniku fibróz nebo dokonce zvrátila již existující fibrotické onemocnění, ani u jednoho orgánu (Zeisberg & Kalluri, 2013).

Myofibroblasty, někdy též nazývané „aktivované fibroblasty“ kvůli jejich zvýšeným biosyntetickým a proliferačním aktivitám, jsou ve fibróze hlavními producenty ECM bohaté na kolageny. Pro tyto buňky je typické výrazné drsné endoplazmatické retikulum, velké jádro a kontraktilní aktinová vlákna složená z α SMA (Gabbiani et al, 1971; Majno et al, 1971). Neexistuje však marker, který by byl specifický pro všechny myofibroblasty. Myofibroblasty jsou totiž různorodým buněčným typem, jehož variabilita odráží pravděpodobně původ vzniku těchto buněk. Proto je pro rozlišení subpopulací myofibroblastů potřeba dalších specifických markerů, stejně jako u rozlišování fibroblastů spojených s nádory (CAFs), které jsou uvedeny níže. Myofibroblasty se liší nejenom mezi jednotlivými orgány, ale mají různorodé fenotypy i v rámci jednotlivých orgánů (Dvorak, 1986).

Myofibroblasty fibrotických tkání pocházejí ze stejných buněčných typů jako normální myofibroblasty při hojení ran. Do prvního zdroje myofibroblastů patří lokální buňky normálních tkání jako fibroblasty nebo mezenchymové kmenové buňky (Marsh et al, 2013). Druhý zdroj představují buňky, jako jsou cirkulující progenitory fibrocytů (Haemmerli et al, 1985; Hashimoto et al, 2004; Strauli et al, 1983), buňky odvozené z kostní dřeně, které migrují z krevního oběhu do místa nádoru, kde pak diferencují. U některých typů fibróz tvoří buňky odvozené z kostní dřeně až 20-40% myofibroblastů fibrotických lezí (Direkze et al, 2004; Ishii et al, 2005; Walker et al, 2011). Třetí zdroj se skládá z buněčných typů, které transdiferencují na myofibroblasty. Mezi buňky třetího zdroje patří pericyty, myoepitelové, endoepitelové buňky (Dulauroy et al, 2012; Humphreys et al, 2010; Rajkumar et al, 2005; Zeisberg et al, 2007).

Ve většině případů je fibróza doprovázená zánětem, podobně jako je tomu u hojení ran a nádorové stromatogeneze. Zánět může být u fibróz důsledkem původní infekce, ale prototypická fibróza je spojená se sterilním zánětem, vyvolaným pravděpodobně smrtí buněk v místě fibrózy. Fibrózy doprovází virové infekce (např. jaterní hepatitidy), bakteriální infekce (např. pyelonefritida ledvin) a infekce mnohobuněčnými organizmy (např. schistomiázy jater) (Zeisberg & Kalluri, 2013). Pozoruhodné je, že protizánětlivá léčba fibrotické tkáně většinou není v klinické praxi schopná zastavit fibrogenézi. Taková fakta naznačují, že zánětlivá reakce a fibrogenéze jsou dva nezávislé procesy. Zatím není dostupná účinná léčba, která by zabránila vzniku fibróz nebo dokonce napravila již existující fibrotické onemocnění, ani u jednoho orgánu. Protože však fibrózy všech orgánů sdílejí velmi podobné histomorfologické rysy, nabízí se lákavá představa, že existují signální dráhy a regulace specifické pro všechny fibrózy (Zeisberg & Kalluri, 2013). Stále se doufá, že mechanistické porozumění obecným fibrotickým signálním dráhám povede v budoucnu k vývoji protifibrotických léků, které budou účinné ve

všech orgánech (Wynn & Ramalingam, 2012). Největší naděje jsou v současné době vkládány do inhibice signální dráhy TGF β , protože v experimentálních modelech se této inhibici podařilo alespoň zlepšit stav mnoha různých typů fibróz (viz. kapitola 2.4).

2.3.3 Role myofibroblastů ve vzniku a progresi rakoviny

Takzvané fibroblasty spojené s nádory (CAFs) mají většinou vlastnosti myofibroblastů a CAFs s fenotypem myofibroblastů jsou také často nazývány jako aktivované CAFs. Myofibroblasty představují hlavní buněčnou složku nádorového stroma a jsou to převážně tyto buňky, které produkují a remodelují nebuněčné složky nádorového stroma. Jak buněčné, tak nebuněčné složky stroma hrají klíčovou roli v promoci vzniku rakoviny a její progresi.

Aktivované CAFs/ myofibroblasty přítomné v nádorové tkáni mohou vzniknout z různých zdrojů, což velmi připomíná situaci při hojení ran a fibróze. Nádorové mikroprostředí s hojící se ránou sdílí mnoho rysů a proto jsou nádory popisovány jako nehojící se rány (Dvorak, 1986). Ukázalo se, že aktivované CAFs/ nádorové myofibroblasty opět pocházejí ze tří hlavních zdrojů. Prvním zdrojem myofibroblastů jsou lokální buňky normálních tkání jako fibroblasty nebo mezenchymové kmenové buňky (Marsh et al, 2013), rekrutované rakovinnými buňkami. Tyto lokální buňky asi jako první reagují na narušení vyvolané rakovinnými buňkami. Druhý zdroj představují buňky, jako jsou cirkulující progenitory fibrocytů (Haemmerli et al, 1985; Strauli et al, 1983), buňky odvozené z kostní dřeně, které migrují z krevního oběhu do místa nádoru, kde pak diferencují. Třetí zdroj se skládá z buněčných typů, které transdiferencují na myofibroblasty. Mezi buňky třetího zdroje patří pericyty, myoepitelové, endoepitelové buňky a dokonce samotné rakovinné epitelové buňky (Marsh et al, 2013; Ronnov-Jessen et al, 1995).

CAFs jsou, stejně jako myofibroblasty účastníci se fibróz a hojení ran, velmi heterogenním buněčným typem, jejichž variabilita zřejmě odráží rozličný původ CAFs a tkáňové prostředí, ve kterém se vyvíjí. Nejtypičtějším markerem CAFs jsou vlákna tvořená α SMA, která jsou charakteristickým rysem myofibroblastů a buněk hladkého svalstva. Ačkoliv existují i další markery buněk CAFs, jako jsou: vimentin, PDGF receptor alfa (PDGFR- α), PDGF receptor beta (PDGFR- β), protein specifický pro fibroblasty (FSP-1) a protein aktivace fibroblastů (FAP) (Anderberg et al, 2009; Micke & Ostman, 2004; Paulsson et al, 2009; Sugimoto et al, 2006), neexistuje jediný marker specificky značící všechny CAFs a jasně odlišující CAFs od normálních myofibroblastů nebo blízkce příbuzných buněčných typů. Proto se v praxi obvykle používá kombinace několika markerů.

Pozoruhodné je, že mnoho rakovin je spojené s dezmozplázií. Dezmozplázie je fibrotický stav, charakteristický akumulací kolagenů typu I a III a degradací kolagenu typu IV (typický pro bazální laminu) (Huijbers et al, 2010; Kauppila et al, 1998) a dezmozplázie byla pozorována i v místech vzniku metastáz (Kaplan et al, 2005). Špatná prognóza rakovinných onemocnění je obecně spojována s nádorovou dezmozplázií (Hasebe et al, 2002).

Důkazy z poslední doby naznačují, že CAFs hrají velmi důležitou roli v celém procesu vzniku a progresu rakoviny a to od velmi časného, preneoplastického, stádia až do konečné fáze nádorové progresu, metastazování. Myofibroblasty produkují ECM i rozpustné faktory a současně ECM remodelují. Ovlivňují tak chování a vlastnosti buněk ve svém okolí, vytváří prostor pro růst nádoru i nádorově specifické cytokinové prostředí a přispívají tak k rekrutování buněk imunitního systému, angiogenezi, EMT karcinomů, přípravě tkání pro metastazování a ve výsledku rozsévání rakoviny do dalších orgánů, přičemž mnohé z vyjmenovaných procesů spolu vzájemně úzce souvisí.

2.3.3.1 Vztah myofibroblastů k mechanickým vlastnostem nádorového mikroprostředí

Myofibroblasty výrazně mění jak biochemické tak i mechanické vlastnosti mikroprostředí nádorů, které následně působí na rakovinné buňky a přispívá k výběru agresivních podtypů nádorových buněk, jejich invazivitě a metastazování, jak je podrobněji uvedeno v následujících kapitolách. Během progresu nádorů vzrůstá rigidita jejich mikroprostředí (viz. kapitola 2.3.3.2). Právě zvýšená tuhost matrix v nádorovém mikroprostředí může usnadnit výběr velmi invazivních podtypů rakovinných buněk. Pravděpodobně se tak děje podobným způsobem, jako při diferenciaci mezenchymových kmenových buněk na různé linie (Engler et al, 2006). Mechanické vlastnosti ECM, konkrétně její tuhost, jsou důležité v regulaci diferenciaci, proliferaci a buněčných funkcí nejen rakovinných buněk, ale i kmenových buněk a fibroblastů (De Wever et al, 2008; Hotary et al, 2006; Levental et al, 2009; Provenzano et al, 2009). Například epitelové buňky reagují odlišně na signalizaci cytokinem TGF- β 1 v závislosti na tuhosti ECM, která je podkládá (viz. kapitola 2.4) a pravděpodobně proto tuhost ECM hraje roli i v EMT karcinomů (viz. kapitola 2.3.3.5). Hustá, rigidní kolagenová síť zase vede ke zvýšené signalizaci prostřednictvím kinázy fokálních adhezí (FAK) a p130Cas (Levental et al, 2009). FAK jednak signalizuje dráhou RhoA a ovlivňuje tím kontraktilitu aktinomyozinového cytoskeletu (tvorbu fokálních adhezí a kontraktilních vláken) a tedy i migraci buněk (viz. kapitola 2.5) (Chen, 2008). Zadruhé FAK zesiluje signalizaci dráhou ERK a Akt, čímž reguluje proliferaci a motilitu buněk (Manning & Cantley, 2007).

2.3.3.2 Remodelace ECM myofibroblasty

ECM se skládá ze sítě biopolymerů, které jsou tvořeny proteiny, proteoglykany a glykosaminoglykany. Složení a struktura ECM je mezi různými místy odlišná. Velikost vláken biopolymerů a hustota sítě, kterou biopolymery tvoří, určují mechanické vlastnosti ECM. Záleží tedy na množství kolagenových vláken, jejich tloušťce a vzájemném propojení, které dohromady určují porozitu ECM (Shoulders & Raines, 2009). V nádorovém mikroprostředí prochází ECM jak kvalitativními tak kvantitativními změnami, které následně ovlivňují přežití, proliferaci a migraci nádorových buněk (Chun et al, 2006; Paszek et al, 2005). ECM v nádorovém mikroprostředí je remodelována převážně CAFs, které jsou zodpovědné za produkci proteinů ECM (např. kolageny a fibronektin) i proteáz a dalších enzymů, které se podílí na posttranskripční modifikaci proteinů tvořících ECM. U solidních nádorů dochází v jejich mikroprostředí k zvýšenému ukládání ECM a s tím spojeným tuhnutím (zvýšení rigidity) ECM. Jak již bylo zmíněno, mnoho nádorů je spojeno s dezmoplázií, tedy fibrózou. Při dezmoplázii dochází k akumulaci kolagenů typu I a III a degradaci kolagenu typu IV (typický pro bazální lamínu) (Huijbers et al, 2010; Kaupila et al, 1998). Dezmoplázie byla navíc pozorována i v místech vzniku metastáz (Kaplan et al, 2005). Tuhnutí nádorové ECM souvisí s kovalentním provázáním kolagenových molekul lyzyl oxidázou (LOX). Z počátku karcinogeneze (u nádoru prsu) je LOX tvořena hlavně myo/fibroblasty, ale v pozdějších fázích ji tvoří i hypoxické karcinomové buňky (Levental et al, 2009; Santhanam et al, 2010). Remodelace způsobená LOX následně podporuje migraci a invazivitu nádorových buněk a tedy obecně progresi nádoru (Levental et al, 2009). Zvýšená tuhost nádorové matrix spolu se špatným cévním a lymfatickým zásobením vede ke zvýšení tlaku tkáňového moku, což brání doručení chemoterapeutických látek dovnitř nádoru. Bylo ukázáno, že experimentální odstranění CAFs (způsobujících ztuhlost ECM) vedlo k lepším výsledkům chemoterapie u adenokarcinomů a (Olive et al, 2009). Vedle tuhosti ECM působí v mikroprostředí nádoru mechanickou silou i tok tkáňového moku. Tok tkáňového moku uvnitř nádoru působí invazi fibroblastů dovnitř nádoru a remodelaci ECM, které následně usnadňují invazivitu nádorových buněk. Taková aktivace fibroblastů k migraci je aktivována TGF- β 1 a remodelace ECM souvisí především s degradací kolagenových vláken pomocí MMPs. Uvolněnou cestou skrz ECM pak mohou rakovinné buňky migrovat (Shieh et al, 2011). Ostatně byla také pozorována společná migrace CAFs a rakovinných buněk skrz ECM. CAFs opět vytvářely cestu, kterou migrovaly rakovinné buňky (Gaggioli et al, 2007). CAFs kromě kolagenů ve velkém množství produkují

další dvě důležité složky ECM nádorů, totiž fibronektin a hyaluronan. CAFs vedle fibronektinu produkují i jeho variantu ED-A, která je typicky vyráběna myofibroblasty (Kalluri & Zeisberg, 2006). Fibronektin, který reguluje strukturu kolagenových vláken (Velling et al, 2002), je ligandem velkého množství rodiny integrinových receptorů (Gaggioli et al, 2007) a proto je důležitý v adhezi, růstu a migraci buněk (Pankov & Yamada, 2002). Přítomnost fibronektinu ve stromatu nádorů pozitivně koreluje se sekrecí MMPs a s metastazováním lidských nádorů (Kaplan et al, 2005). Vysoká produkce hyaluronanu v nádorové ECM vede k rekrutování makrofágů spojených s nádory, které následně hrají významnou roli v tvorbě nových cév (Kobayashi et al, 2010).

Důležitou nebuněčnou složkou, jejíž sekrecí CAFs remodelují ECM, jsou matrixové metaloproteinázy (MMPs) a jejich inhibitory (TIMPs). MMPs totiž vedou k degradaci ECM, čímž zaprvé vytváří prostor pro expanzi nádorových buněk, nově vznikající cévy anebo cesty pro migrující rakovinné buňky. Zadruhé uvolňují membránově a jinak vázané růstové faktory a zatřetí štěpí adhezivní molekuly, jako jsou kadheriny, čímž podporují EMT a motilitu buněk (DeClerck & Elble, 2010; Heddleston et al, 2010). CAFs typicky secernují MMP-2, MMP-3 a MMP-9, ale i další MMPs (Simian et al, 2001; Taddei et al, 2013). Například MMP-9, secernovaná CAFs, indukovala u buněk karcinomu prostaty EMT (Shoulders & Raines, 2009) nebo MMP-13, secernovaná CAFs, uvolňuje VEGF z ECM, čímž podporuje angiogenezi a invazivitu melanomových buněk nebo karcinomu dlaždicových buněk (Wheaton & Chandel, 2011).

2.3.3.3 Sekrece rozpustných faktorů myofibroblasty

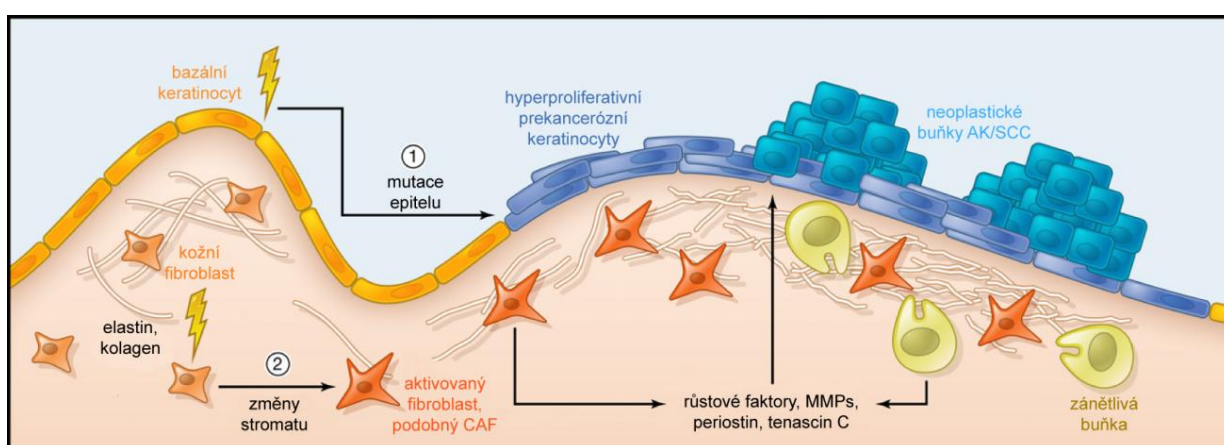
Důležitou složkou nádorového mikroprostředí, kterou do značné míry ovlivňují CAFs, jsou rozpustné faktory. Rozpustné faktory uvolňované CAFs se tedy podílí na interakci mezi CAFs a nádorovými buňkami, přičemž tyto faktory významně ovlivňují proliferaci a invazivitu nádorových buněk. Mezi tyto rozpustné faktory patří například růstové faktory HGF, TGF- β 1, bFGF, EGF, VEGF, IGF, NGF a cytokiny SDF1 i IL6. HGF aktivuje v rakovinných buňkách signální dráhu spouštěnou receptorem c-Met, která indukuje růst nádorových buněk i jejich invazivitu, metastazování (Jedeszko et al, 2009; Peters & Adjei, 2012) a rezistenci nádorových buněk ke konvenčním inhibitorům receptorů EGF (Cirri & Chiarugi, 2012; Wang et al, 2009b). TGF- β 1 se věnuje kapitola 2.4. VEGF je zásadně důležitý pro tvorbu nových cév (angiogeneze a lymfangiogeneze), které slouží nejen pro zásobování nádorů živinami, ale usnadňují i metastazování nádorů. VEGF totiž zvyšuje propustnost cév, čímž usnadňuje intravasaci i

extravasaci nádorových buněk (Carmeliet & Jain, 2011; Nagy et al, 2009). Důsledkem propustnějších cév se také zvyšuje tlak tkáňového moku v místě nádoru (Nagy et al, 2009). Z faktorů FGF secernovaných CAFs například FGF1 zvyšují migrační a invazní vlastnosti buněk kolorektálního karcinomu přes signalizaci receptorem FGFR3 (Henriksson et al, 2011). Prozánětlivé mikroprostředí nádorů je spoluvytvářeno CAFs i rakovinnými buňkami sekrecí interleukinů, interferonů a členů cytokinové rodiny TNF (Rasanen & Vaheri, 2010). CAFs secernují cytokiny a chemokiny, které vedou k infiltraci místa nádoru imunitními buňkami a spolu podporují vznik nových cév a ve výsledku metastazování (Gerber et al, 2009). Produkce takových faktorů (SDF1, IL-6, IL-1 β) je v CAFs do značné míry spouštěná transkripčním faktorem NF- κ B (Erez et al, 2010). V případě rakoviny slinivky břišní kombinace faktorů SDF1 a IL-8 vede u rekrutovaných endotelových buněk k aktivaci angiogenního programu (Matsuo et al, 2009). Produkce SDF1 může být kromě NF- κ B řízena i transkripčním faktorem HIF1, který je aktivován hypoxickými podmínkami (Toullec et al, 2010). SDF1, uvolňované CAFs, nejen podporuje angiogenezi mobilizací prekursorů endotelových buněk z kostní dřeně, ale indukuje i růst rakovinných buněk (Orimo et al, 2005) a zprostředkovaně i mezenchymově-améboidní přechod rakovinných buněk, čímž usnadňuje jejich invazivní vlastnosti a metastazování (viz. kapitola 2.5). Jiným chemokinem, který mohou CAFs produkovat a podporovat jím angiogenezi, růst a infiltraci nádorů makrofágy, je CXCL14 (Augsten et al, 2009). Další růstové faktory produkované myofibroblasty jako bFGF, EGF, IGF, NGF stimulují růst karcinomových buněk (Bhowmick et al, 2004).

2.3.3.4 Myofibroblasty/ECM v efektu prekancerózního pole (tzv. field cancerization)

Podle klasického pojetí kancerogeneze vznikne nejdříve rakovinná buňka a její interakcí s okolní tkání vznikají buňky nádorového stroma. Bez rakovinných buněk tedy buňky nádorového stroma nevzniknou. Nedávno však bylo ukázáno, že v některých případech může prekancerózní stroma vést ke vzniku rakoviny. Konkrétně epigenetické změny v kožních fibroblastech mohou vést ke vzniku karcinomu dlaždicových buněk. Epigenetické změny nebo mutace (způsobené například UV zářením) inaktivující signální dráhu Notch vedou ke změnám kožních fibroblastů, které tím získávají vlastnosti aktivovaných CAFs (myofibroblastů). Takové buňky se vyznačují expresí α SMA a jiných markerů aktivovaných CAFs, zvýšenou produkcí FGFs a matrixových metaloproteináz, stejně jako sekrecí tenascin C a periostinu (Hu et al, 2012). Zajímavé je, že o tenascin C a periostinu je známo, že se podílejí na tvorbě niky rakovinných buněk (Oskarsson & Massague, 2012) a nádorové angiogenezi (viz. kapitola

2.3.3.6). Přilehlé epidermální keratinocyty, buňky tvořící vnější vrstvu kůže, následně extrémě proliferují (hyperproliferují), což je stav vedoucí k rozvoji rakoviny. Aktivované fibroblasty podobné CAFs mohou dále způsobovat genetickou nestabilitu okolních buněk prostřednictvím reaktivních kyslíkových intermediátů (Radisky et al, 2005). Dále je pozoruhodné, že v okolí nejsilnější epidermální proliferace se hojně vyskytují zánětlivé buňky. Ty mohou přispět ke kancerogenezi uvolňováním reaktivních kyslíkových intermediátů, zvyšujících riziko další mutagenese a také navozením zvláštního prostředí bohatého na určité cytokiny a růstové faktory. Tento čerstvý příklad dokazuje, že aktivace fenotypu myofibroblastů může za určitých okolností vést i ke vzniku rakovinných buněk.



Obr. 2 Dvě cesty indukované UV zářením vedoucí ke karcinomu dlaždicových buněk. V dobře prostudovaném procesu (1) UV záření způsobuje mutace v bazálních keratinocytech, vedoucí k rakovině. V lézích tvořených prekancerózními keratinocyty (tzv. aktinická keratóza, AK) často dochází k mutaci p53. S přibývajícemi mutacemi v genech, jako jsou NOTCH1 a NOTCH2, se aktinická keratóza vyvíjí na karcinom dlaždicových buněk (SCC). V druhém modelu (2) navrženém Hu et al. (2012) UV záření inaktivuje epigenetickými mechanismy signální dráhu Notch v kožních fibroblastech. Takové změny vedou k tvorbě buněk podobných CAFs, které produkují více růstových faktorů, proteinů ECM a proteáz, jejichž působením se zvyšuje proliferace přilehlých epidermálních keratinocytů. Oblasti zvýšené epidermální proliferace jsou postupně stále bohatší na zánětlivé buňky (CD45⁺), které přispívají k proliferaci keratinocytů a vytvoření aktinické keratózy, která se dále vyvíjí na karcinom dlaždicových buněk (SCC). Podle (Vanharanta & Massague, 2012), upraveno.

2.3.3.5 Role myofibroblastů v EMT rakovinných buněk

Epitelově-mezenchymový přechod (EMT) je proces epigenetických změn, kterým epitelové buňky získávají migrační a jiné vlastnosti buněk mezenchymových. Tento proces je zásadní pro progresi karcinomů a CAFs se podílí na jeho navození hned několika způsoby (Kalluri, 2009; Thiery et al, 2009). CAFs konkrétně secernují řadu rozpustných faktorů i složek ECM a remodelují ECM, čímž EMT přímo navozují anebo usnadňují (viz. kapitoly 2.3.3.2,

2.3.3.3 a 2.4). Bylo ukázáno, že hladina proteinů E-kadherinu (adhezní molekula) a Slug (transkripční faktor), důležitých v EMT, souvisí s rigiditou mikroprostředí nádorů (Parsons et al, 2010). Pro získání mezenchymového fenotypu je, mimo jiné, potřeba aktivovat transkripční program řízený proteinem Slug a rozvolnit pevné kontakty mezi epitelovými buňkami (zprostředkovaných E-kadherinem). Hladina E-kadherinu je vyšší u buněk na měkkém podkladu, zatímco na tužším podkladu klesá. Naopak hladina proteinů Slug je v karcinomových buňkách nižší na měkkém podkladu. S rigiditou mikroprostředí nádorů souvisí i reakce epitelových buněk na signalizaci TGFβ (viz. kapitola 2.4), která se významně podílí na EMT karcinomů.

2.3.3.6 Role myofibroblastů v nádorové angiogenezi

Angiogeneze hraje důležitou roli v progresi nádorů, protože umožňuje nejen zásobování nádorů živinami a odstraňování toxických metabolitů, ale usnadňuje i metastazování nádorů. Cévy nádorů jsou totiž abnormální, nedokonalé a kvůli tomu i mnohem propustnější, což usnadňuje intravasaci i extravasaci nádorových buněk. Důsledkem propustnějších cév se také zvyšuje tlak tkáňového moku v místě nádoru, který přispívá k specifickému mikroprostředí nádorů. Není tedy divu, že tvorba abnormálních cév nádorů slouží jako prognostický marker nádorové progresie a jejího konečného důsledku, metastazování. (Nagy et al, 2009). Rakovinné buňky sice mohou produkovat proangiogenní faktory, u mnoha nádorů ale mnohem větší množství proangiogenních faktorů tvoří buňky nádorového stroma (Thijssen et al, 2004). Hypoxické mikroprostředí nádoru ovlivňuje vedle rakovinných buněk i buňky stroma a vede k profibrogennímu a proangiogennímu chování CAFs. Takové chování může být u CAFs indukováno rozpustnými faktory (jako je PDGF), produkovány rakovinnými buňkami velkého množství různých nádorů, i bez ohledu na obsah kyslíku v okolí (Pietras & Ostman, 2010). CAFs se na angiogenezi podílí mnoha různými aktivitami. Jsou to už zmíněná sekrece růstových faktorů (VEGF, ale i bFGF), proteáz (MMP-13), složek ECM (tenascin C, periostin) i rekrutování různých buněčných typů a následné ovlivnění chování rekrutovaných buněk (Vong & Kalluri, 2011). Rekrutované buněčné typy se podílí na tvorbě specifického cytokinového prostředí (např. imunitní buňky) nebo se přímo podílí na tvorbě nových cév (např. endotelové buňky a jejich prekurzory, pericyty,...). Celkem vzato, CAFs hrají v angiogenezi nádorů prominentní roli a je třeba s ní počítat např. v antiangiogenní terapii nádorů.

2.3.3.7 Interakce myofibroblastů /ECM s imunitním systémem v nádorovém stroma

Nádorové buňky ovlivňují reakce imunitního systému ve většině nebo možná dokonce všech rakovinách (Hanahan & Weinberg, 2011). CAFs ovlivňují zánětlivé mikroprostředí nádorů dvěma principiálně odlišnými mechanismy. V prvním mechanismu CAFs produkují prozánětlivé proteiny a látky, kterými rekrutují makrofágy, neutrofilů a jiné stimulační imunitní buňky. Rekrutované buňky pak podporují různé aspekty nádorové progresy (Boersma et al, 2008; Elkabets et al, 2011; Silzle et al, 2003). V druhém mechanismu CAFs produkují faktory, které brání buňkám imunitního systému v nalezení a napadení nádorových buněk (Stover et al, 2007). Například CAFs melanomů brání cytotoxickému působení buněk NK jak přímým mezibuněčným (buňka - buňka) kontaktem, tak uvolňováním PGE2 (Balsamo et al, 2009). U adenokarcinomů CAFs zase potlačují imunitní reakce produkcí proteinu FAP (Kraman et al, 2010). V souladu s rolí CAFs, coby negativních modulátorů imunitní reakce v mikroprostředí nádorů, je pozorování, ve kterém odstranění CAFs z experimentálního nádoru prsu (odstraněním FAP) vede k potlačení metastazování nádorů. Toto potlačení bylo způsobeno přeměnou imunitního mikroprostředí z Th2 odpovědi na Th1 (Liao et al, 2009).

2.3.3.8 Myofibroblasty /ECM a selekce agresivních subtypů nádorových buněk

CAFs přispívají k selekci agresivních subtypů nádorových buněk. Získání vlastností kmenových buněk buňkami rakovinnými vede k jejich zvýšené agresivitě a metastazování (Tu et al, 2002) Bylo ukázáno, že CAFs způsobením EMT u karcinomových buněk prostaty navodí vlastnosti typické pro kmenové buňky. Takové rakovinné buňky pak mnohem více metastazovaly (Giannoni et al, 2010). Vlastnosti kmenových buněk získaly i buňky rakoviny slinivky břišní (pankreas) kokultivací s hvězdicovitými buňkami pankreatu (hlavním profibrogenním buněčným typem slinivky břišní) (Hamada et al, 2012). K selekci agresivních podtypů nádorových buněk CAFs přispívají také remodelací ECM (změny biochemických i mechanických vlastností), která může způsobit EMT (viz. kapitola 2.3.3.5) nebo určitý typ invazivity (viz. kapitola 2.5).

2.3.3.9 Role myofibroblastů /ECM v přípravě tkání pro metastazování /v přípravě metastatické niky

Myofibroblasty se podílí i na přípravě tkání vzdálených orgánů pro metastazování nádorových buněk, připravují takzvanou metastatickou niku. Podle Pagetovy hypotézy

„semínka a půdy“ (angl. „seed and soil“), dochází k metastazování do míst, kde je příznivé („úrodné“) prostředí (Paget, 1989). Podle jiné hypotézy dochází k tvorbě metastáz v místech, která jsou svými biomechanickými vlastnostmi velmi podobná místu primárního nádoru (často ztuhlému, fibrotickému). Nedávno bylo ukázáno, že buňky nádorového stroma lidského karcinomu uvolňují určité mikrovezikuly (mikrováčky) obsahující např. nukleové kyseliny (DNA, mRNA, microRNA), které slouží ke komunikaci mezi buňkami stroma, buňkami rakovinnými i vzdálenými buňkami jiných orgánů, kde se tyto vezikuly podílejí na přípravě pre-metastatické niky (Grange et al, 2011). CAFs experimentálních nádorů prsu produkují faktor S100A4, který způsobuje zvýšenou infiltraci T lymfocytů do plic ještě před metastazováním. T lymfocyty následně navozují cytokinové podmínky, které jsou příznivé pro vznik metastáz (Grum-Schwensen et al, 2010). Rakovinné buňky mají tendenci metastázovat do fibrotické tkáně (Barkan et al, 2010; O'Connell et al, 2011). Bylo ukázáno, že cytokinové mikroprostředí obecně vytvářené myofibroblasty obsahuje např. IL1b, TNF- α a SDF1 stimuluje adhezi a následnou transendoteliální migraci rakovinných buněk (Kukreja et al, 2005; Rahn et al, 2005). Periostin, součást ECM je zase důležitý pro udržení vlastností rakovinných kmenových buněk a tedy je zásadní pro vznik metastáze (Malanchi et al, 2012).

V místě metastázy následně myofibroblasty podporují proliferaci rakovinných buněk (Olaso et al, 2003).

Dále bylo ukázáno, že metastazující buňky si mohou s sebou do místa vznikající metastáze přinést jejich „vlastní půdu“, konkrétně stromální komponenty z primárního nádoru. Buňky nádorového stroma (konkrétně CAFs) v takovém případě putují spolu s metastazujícími rakovinnými buňkami, chrání rakovinné buňky v krevním řečišti před smrtí vyvolanou neuchycením k podkladu (anoikis) a zajišťují tak rakovinným buňkám dlouhodobé přežití a proliferační výhodu v metastatických nodulech (Duda et al, 2010). V souladu s přinášením vlastního stroma do míst tvorby metastáz je i pozorování, ve kterém CAFs a rakovinné buňky migrují společně skrz ECM, přičemž CAFs pomocí proteáz vytváří cesty, kterými se následně pohybují buňky rakovinné (Gaggioli et al, 2007). V jiném modelu bylo ukázáno, že injekce rakovinných buněk spolu s buňkami stroma (CAFs) vede k výrazně vyšší tvorbě metastáz, než když byly injikovány samotné rakovinné buňky (Giannoni et al, 2010).

2.3.3.10 Rozdíly mezi myofibroblasty a fibroblasty spojenými s nádory (CAFs)

Do jaké míry se CAFs odlišují od myofibroblastů účastnících se hojení ran není stále jasné. Faktem je, že fibroblasty izolované z deseti různých anatomických oblastí a následně

aktivované sérem (napodobuje reakci aktivovanou při hojení ran) měly společný transkripční profil s buňkami CAFs, izolovanými z různých karcinomů. Tento společný transkripční profil je u CAFs spojený s rozvojem metastáz u pacientů s rakovinou prsu, plic a žaludku (Tchou et al, 2012). Zatím neexistuje jednotný názor na to, jestli se u CAFs vyskytují genetické anebo epigenetické změny obecného charakteru. Jsou práce, které u CAFs dokládají obecné genetické změny jako např. mutace tumorsupresorových genů PTEN a p53, ztrátu heterozygoty anebo změny počtu kopií alel (Fukino et al, 2007; Kiaris et al, 2005; Kurose et al, 2002; Moinfar et al, 2008; Patocs et al, 2007; Weber et al, 2007) a zároveň jsou práce, které těmto závěrům odporují (Qiu et al, 2008; Wallace et al, 2011; Walter et al, 2008; Weinberg, 2008). U rakovin prsu a prostaty byly pozorovány epigenetické změny v metylaci promotorů, které souvisely se špatnými klinickými výsledky. Řada prací tedy dokládá, že u CAFs ke genetickým a epigenetickým změnám dochází. Tyto změny mohou být způsobené vlivem mutagenů a faktorů z vnějšího prostředí (Hu et al, 2012) anebo je mohou přímo vyvolávat rakovinné buňky. Například buňky karcinomu prostaty byly v myším modelu schopné parakrinním mechanismem vyvíjet selekční tlak na CAFs, vedoucí ke zvýšené proliferaci buněk s nízkou hladinou p53 (Hill et al, 2005) nebo mohou rakovinné buňky působit na CAFs prostřednictvím uvolňovaných exozómů (mikrovezikulů), které umožňují přenos genetické informace i např. miRNA působící epigeneticky. Přenos miRNA byl pozorován i prostřednictvím mezerových spojů (angl. gap junctions) mezi buňkami nádorového stroma a buňkami rakovinnými (Lim et al, 2011). CAFs s genetickými anebo epigenetickými změnami mohou následně reagovat na podněty z okolí jiným způsobem než myofibroblasty účastníci se hojení ran a více přispívat k rozvoji nádorových onemocnění (viz. např. (Mensing et al, 1983; Patocs et al, 2007)). Je třeba nashromáždit více důkazů, aby bylo možné říci jak se CAFs od myofibroblastů účastnících se hojení ran liší a jakou roli hrají případné rozdíly v rozvoji nádorových onemocnění. Taková zjištění by mohla ovlivnit případné terapeutické přístupy, které se zaměřují na interakci mezi CAFs a rakovinnými buňkami.

2.3.3.11 CAFs jako cíl protinádorové terapie

CAFs jsou v posledních několika letech považovány za slibný cíl v protinádorové léčbě z následujících důvodů. Za prvé jsou CAFs v porovnání s rakovinnými buňkami mnohem stabilnější, čímž se snižuje riziko vytvoření rezistence k terapeutickým látkám. Za druhé jsou to především CAFs, které jsou zodpovědné za vlastnosti nádorové ECM, bránící difuzi protinádorových látek solidními nádory. Za třetí CAFs podporují přežívání, proliferaci a

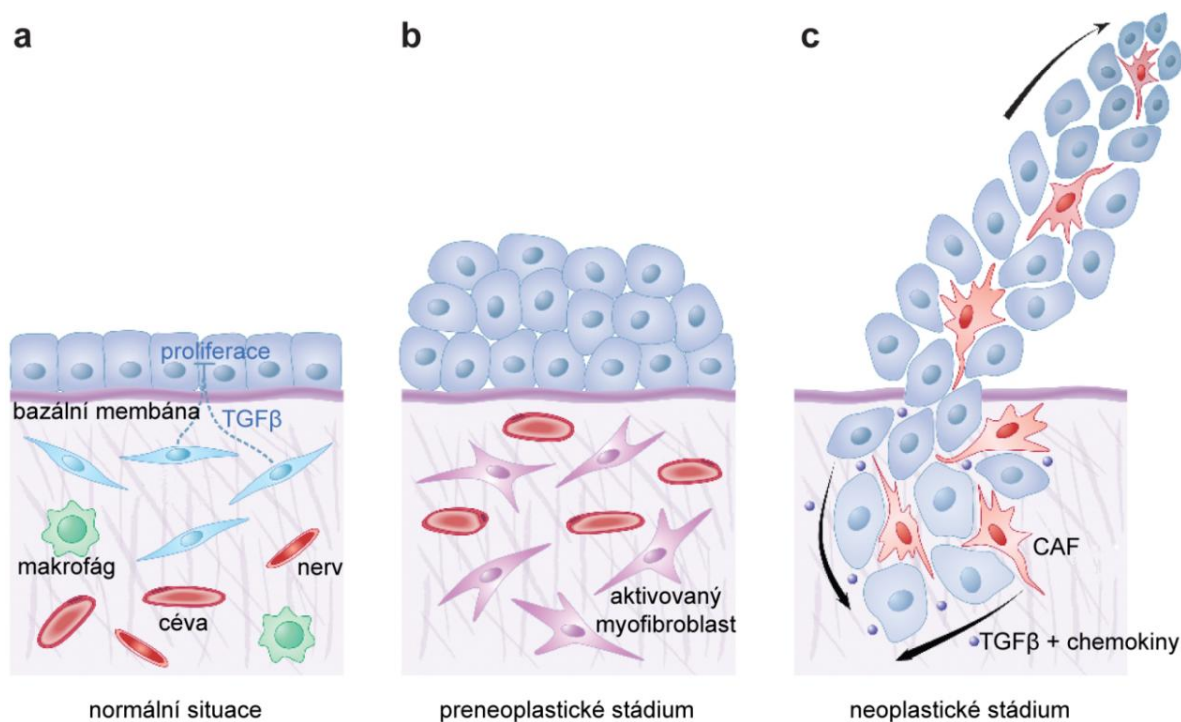
invazivitu rakovinných buněk (Cirri & Chiarugi, 2012). Nejedna práce ukázala, že odstranění CAFs a dalších komponent nádorového stroma vedla k výrazně lepšímu účinku protinádorových látek (Muerkoster et al, 2004; Olive et al, 2009). CAFs také zprostředkovávají rezistenci k anti-angiogenní léčbě nádorů (Crawford & Ferrara, 2009). V budoucnu by tedy kombinovaná léčba zaměřená proti CAFs (nebo nádorovému stroma obecně) a současně rakovinným buňkám mohla vést k lepším klinickým výsledkům. Přestože se v současné době klinicky testuje několik nadějných přístupů (Cat et al, 2006; Mann et al, 2007; Scott et al, 2003), zacílených na CAFs a jimi zprostředkované působení na mikroprostředí nádorů, momentálně nejsou léky interferující s účinky CAFs v praxi dostupné. Protože myofibroblasty/CAFs mohou vzniknout mnoha různými způsoby a hrají různým způsobem roli ve velkém množství procesů nádorové progresi, nelze očekávat, že by účinná protinádorová léčba zacílená na CAFs byla založená na zabránění vzniku CAFs nebo interferencí s jednou konkrétní rolí CAFs v řadě procesů podílejících se na nádorové progresi. Proto je třeba nadále intenzivně studovat obecné mechanismy důležité v udržení funkcí myofibroblastů/CAFs i interakce mezi rakovinnými buňkami a CAFs.

2.4 Role signalizace dráhou TGF β v biologii myofibroblastů a progresi rakovinného bujení

Signalizace dráhou TGF β zásadním způsobem ovlivňuje fenotyp myofibroblastů jak při hojení ran, tak u fibróz a stromatogeneze nádorů. Signalizace dráhou TGF β hraje důležitou roli v progresi rakoviny, neboť reguluje diferenciaci myofibroblastů, proliferaci epitelových buněk a fungování imunitního systému, tedy reguluje prakticky všechny složky nádoru. Signalizace dráhou TGF β má profibrotickou roli ve fibrogenezi všech orgánů a TGF- β 1 je prototypickým fibrotickým růstovým faktorem (Zeisberg & Kalluri, 2013). TGF β byl původně identifikován jako faktor způsobující růst embryonálních ledvinných fibroblastů nezávisle na přichycení k podkladu (Roberts et al, 1982). Ústřední role TGF- β 1 ve fibrogenezi byla objevena při indukci fibrotických lezí, vytvořených v důsledku injekce purifikovaného TGF- β 1 do podkoží. Velmi silná exprese TGF- β 1, pozorovaná ve všech fibrotických tkáních, vede k produkci kolagenů fibroblasty, bez ohledu na jejich původ (Abraham et al, 2000; Hogaboam et al, 2000; Kim et al, 1998; Romanelli et al, 1997). TGF- β 1 zároveň aktivuje expresi SMA a dalších komponent kontraktálního aparátu myofibroblastů (Malmstrom et al, 2004). Zásadní roli TGF- β 1 ve fibrogenezi potvrdilo pozorování, že neutralizace antisérem vedla k zlepšení stavu experimentálních zvířat s fibrózou kůže, ledvin, jater, plic i srdce (Border et al, 1990; Denis, 1994; Kuwahara et al, 2002; Roberts et al, 1986). Protože zásadní role TGF- β 1 ve fibróze tkání

doposud nebyla v žádném orgánu zpochybněna, je TGF- β 1 a jím spouštěná signalizace považována za hlavní cíl případné léčby fibrotických onemocnění (Leask & Abraham, 2004). V dnešní době běží klinické pokusy, ve kterých se sleduje účinek neutralizujících protilátek proti TGF- β 1 v systémové skleróze, myelofibróze a diabetické nefropatii (Wynn & Ramalingam, 2012).

V počátečních fázích vývoje karcinomů TGF β působí spíše jako tumor supresor, protože inhibuje proliferaci epitelových buněk a navozuje jejich apoptózu. Poté se ale role TGF β mění a TGF β začíná kancerogenezi podporovat indukcí EMT a zvýšené buněčné motility (Massague, 2008) (obr. 3). Ve změně role TGF β ve vývoji nádorů hrají důležitou úlohu mechanické vlastnosti mikroprostředí, které výrazně ovlivňují myofibroblasty. Různá tuhost ECM reguluje funkční odpověď buněk na TGF β . Při nízké tuhosti mikroprostředí TGF- β 1 indukuje apoptózu, zatímco zvýšená tuhost vede k EMT (Leight et al, 2012).



Obr. 3 Rozličná role signalizace TGF β a role myofibroblastů ve vzniku karcinomů.

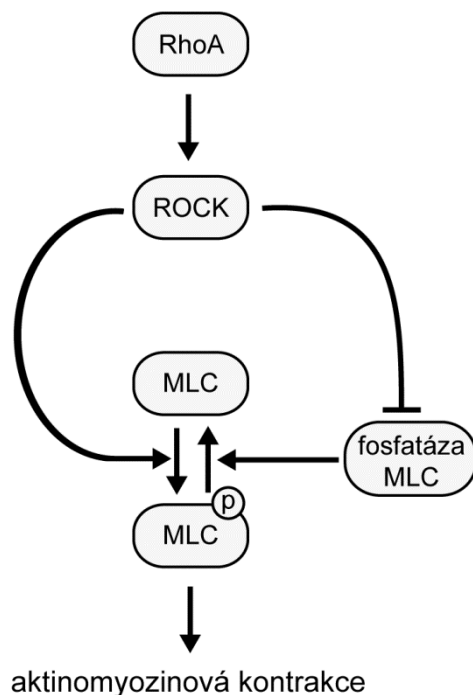
(a) v blízkosti normální epitelové tkáně se nachází dormantní fibroblasty a ostatní podpůrné mezenchymové buněčné typy, které společně potlačují nevhodnou nebo preneoplastickou proliferaci epitelových buněk. Uvolňovaný cytokin TGF β brání proliferaci a může navodit i apoptózu epitelových buněk. (b) Přeměna normálního epitelového mikroprostředí na preneoplastické nebo neoplastické souvisí s aktivitou myofibroblastů. (c) Progrese karcinomů závisí na vzájemné signalizaci mezi rakovinnými buňkami a CAFs. TGF β secernovaný CAFs, spolu s dalšími faktory vede k EMT buněk karcinomu a rakovinné buňky tak získávají nové vlastnosti (vedle migračních i vlastnosti kmenových buněk), které jim usnadňují metastazování. Upraveno podle Schauer et al., 2011.

2.5 Invazivita rakovinných buněk

Interakce ECM (produkovanou převážně myofibroblasty) a nádorových buněk silně ovlivňuje schopnost nádorových buněk invadovat do okolních tkání, což je předpokladem pro metastazování nádorů. Invaze matrix nádorovými buňkami je jedním z nejčasnějších a klíčových kroků procesu metastazování. Vlastnosti ECM určují strategii a účinnost buněčné migrace. Rakovinné buňky mohou migrovat skrz ECM: 1) cestami (dírami, tunely), které v ECM vytvořily jiné buněčné typy, 2) dírami/tunely, které si tvoří samotné rakovinné buňky pomocí vlastních MMPs (zásadní roli hraje MT1-MMP) při tzv. mezenchymovém způsobu pohybu (Sabeh et al, 2009) a 3) protahováním a protlačováním se skrz ECM améboidním způsobem bez degradace ECM. Díry v ECM mohou vytvářet buňky nádorového stroma, jako jsou CAFs/myofibroblasty, buňky hladkého svalstva nebo buňky endotelové, procesem závislým na MMPs (Filippov et al, 2005; Gaggioli et al, 2007; Hiraoka et al, 1998; Chun et al, 2004; Sabeh et al, 2004). Jak již bylo zmíněno, rakovinné buňky mohou spolupracovat např. s CAFs a migrovat společně, přičemž rakovinné buňky využívají schopnosti CAFs degradovat ECM (Gaggioli et al, 2007). Cesta uvolněná pro migrující rakovinné buňky se může nacházet i v místech poškozených krevních a lymfatických cév a v nekrotické tkáni MMPs (Nagano et al, 2008).

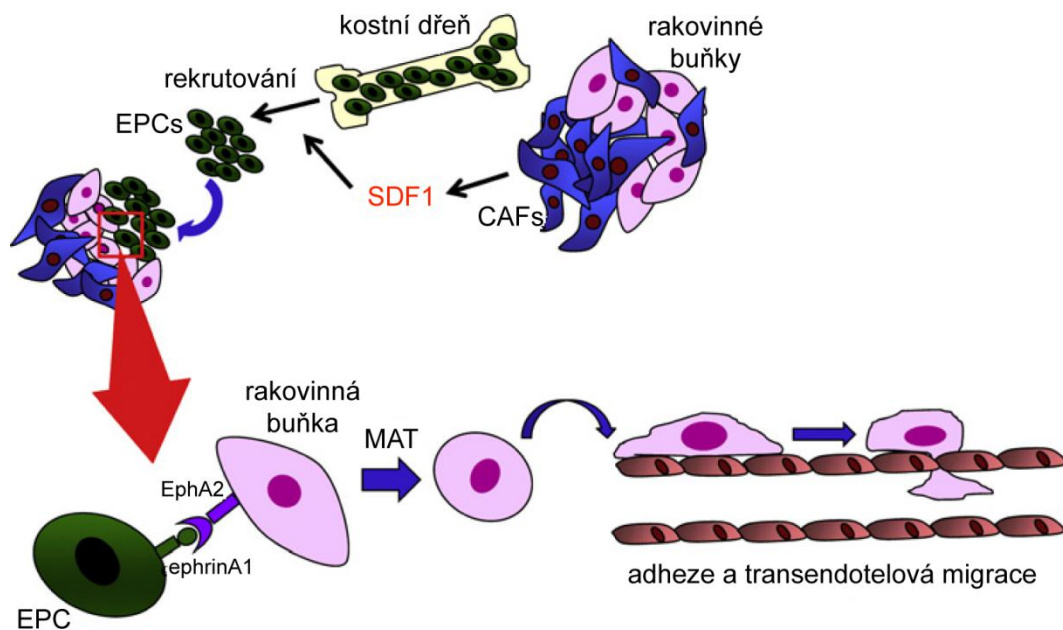
Při améboidním pohybu mají migrující buňky zakulacenou morfologii a spíše se skrz ECM protahují anebo protlačují, než aby ji degradovaly (pomocí MMPs) (Rosel et al, 2008). Z tohoto důvodu mohou být protinádorové látky cílené na proteázy a integriny neúčinné (Friedl, 2004; Pani et al, 2009; Yilmaz & Christofori, 2010). Při améboidním způsobu pohybu hraje důležitou roli kontrakce kortikálního aktinomyozinového cytoskeletu (Sahai & Marshall, 2003). Ta umožňuje buňkám protahovat se skrz již existující mezery v ECM a přizpůsobovat tvar buňky volnému prostoru. V regulaci aktinomyozinového cytoskeletu obecně hrají důležitou roli molekuly RhoA, ROCK a MLC, které jsou součástí jedné regulační dráhy (obr. 4) a při améboidním způsobu pohybu byla pozorována jejich zvýšená aktivita (Rosel et al, 2008; Sahai & Marshall, 2003; Wyckoff et al, 2006). RhoA je malý GTPázový (jeho aktivita je řízená vazbou GTP) protein z proteinové superrodiny Ras, jehož aktivita reguluje aktinový cytoskelet. RhoA aktivuje Rho kinázu ROCK, která fosforyluje lehký řetězec myozinu (MLC) a fosfatázu MLC (Amano et al, 2010). Fosforylace fosfatázy MLC vede k její inaktivaci a tedy zvýšení hladiny fosforylovaného MLC. Fosforylace MLC aktivuje ATPázovou aktivitu myozinu II, důsledkem čehož dojde ke kontrakci aktinomyozinového aparátu. Při améboidním pohybu dochází také ke snížené tvorbě integrinů $\alpha 2\beta 1$ a snížení fosforylace kinázy fokálních

adhezi (FAK) (Carragher et al, 2006; Rosel et al, 2008) , což naznačuje menší nebo žádné požadavky na tvorbu fokálních adhezí a jimi zprostředkovanou signalizaci. Nízká adheze buněk k podkladu podporuje jejich zakulacení a dovoluje améboidním buňkám relativně rychlý pohyb trojrozměrným (3D) prostředím. Přestože se o améboidní invazivitě a její závislosti na signalizaci dráhou Rho/ROCK/MLC za podmínek *in vitro* ví poměrně dost (Friedl & Wolf, 2010; Sahai & Marshall, 2003), stále není dostatek důkazů o její skutečné roli a potřebné signalizaci *in vivo*, obzvláště při metastazování (Pankova et al, 2010; Sahai, 2007; Wyckoff et al, 2006). Některé práce naznačují, že přepínání mezi améboidním a mezenchymovým způsobem záleží na hustotě sítě ECM (Brabek et al, 2010; Harley et al, 2008; Sabeih et al, 2009), přičemž améboidní způsob migrace se uplatňuje především v prostředí s menší hustotou ECM, zatímco v prostředí husté sítě tuhé ECM se spíše uplatňuje mezenchymový způsob migrace, závislý na degradaci ECM pomocí MMPs. Zvýšenou tuhost prostředí buňky vnímají fokálními adhezemi zprostředkovanými integriny a proteiny jako jsou např. vinkulin, talin, FAK, p130Cas a filamin A (Gehler et al, 2009; Geiger et al, 2001; Giannone & Sheetz, 2006; Mohl et al, 2009). Pokud je prostředí příliš tuhé a nedovoluje améboidní pohyb, dojde k AMT, který souvisí s obnovením zvýšené tvorby fokálních adhezí, tvorbě buněčných výběžků a tedy protažené buněčné morfologii, typické pro mezenchymový způsob pohybu (Peyton et al, 2008). V experimentálních 3D podmínkách mají mezenchymově se pohybující buňky typicky protažený tvar (morfologii) (Polyak & Weinberg, 2009). Je pravděpodobné, že nádorové buňky přepínají způsoby pohybu podle podmínek, ve kterých se nalézají. Při mezenchymově-améboidnímu přechodu (MAT) se aktivuje epigenetický program, vedoucí k améboidnímu způsobu pohybu buněk a při AMT se aktivuje mezenchymový způsob pohybu.



Obr. 4 Zjednodušené schematické zobrazení regulační signální kaskády proteinů **RhoA, ROCK a MLC** v regulaci kontrakce aktinomyozinového cytoskeletu. RhoA aktivuje Rho kinázu ROCK, která fosforyluje lehký řetězec myozinu (MLC) a fosfatázu MLC. Fosforylace fosfatázy MLC vede k její inaktivaci a tedy zvýšení hladiny fosforylovaného MLC. Fosforylace MLC aktivuje ATPázovou aktivitu myozinu II, důsledkem čehož dojde ke kontrakci aktinomyozinového aparátu.

CAFs mohou pomocí secernovaných faktorů nepřímo aktivovat améboidní invazivitu a s ní spojené metastazování rakovinných buněk, jak bylo ukázáno u rakoviny prostaty (obr. 5). CAFs totiž secernováním SDF1 stimulují rekrutování prekursorů endotelových buněk (EPCs) do místa nádoru. Interakce buněk EPCs a rakovinných buněk prostřednictvím povrchových molekul ephrinA1 a EphA2 vede u rakovinných buněk k MAT, nádorové angiogenezi a indukované adhezi rakovinných buněk k endotelům a migraci skrz ně a nakonec k účinnému metastazování (Taddei et al, 2011; Taddei et al, 2009). Obdobně interakce prostřednictvím EphA2 pravděpodobně vede k MAT (závislé na aktivitě RhoA) i u rakovinných buněk melanomů (Parri et al, 2009), což naznačuje obecnou platnost tohoto mechanismu.



Obr. 5 CAFs nepřímou aktivují améboidní invazivitu a s ní spojené metastazování rakoviny prostaty. CAFs secernováním SDF1 stimuluji rekrutování prekurzorů endotelových buněk (EPCs) do místa nádoru. Interakce buněk EPCs a rakovinných buněk prostřednictvím povrchových molekul ephrinA1 a EphA2 vede u rakovinných buněk k mezenchymově-améboidnímu přechodu (MAT), nádorové angiogenezi, indukované adhezi rakovinných buněk k endotelům i migraci skrz ně a nakonec k účinnému metastazování. Podle Taddei et al., 2013, upraveno.

2.6 Rodina transkripčních faktorů EGR

Rodina transkripčních faktorů EGR má čtyři členy, konkrétně EGR1, EGR2, EGR3 a EGR4. Název rodiny je zkratkou anglického názvu Early Growth Response, který odráží fakt, že tyto proteiny byly objeveny jako produkty genů, jejichž exprese byla rychle aktivována po stimulaci buněčné proliferace sérem (Hallahan et al, 1991; Chavrier et al, 1988; Lemaire et al, 1990; Mages et al, 1993; Milbrandt, 1987; Muller et al, 1991; Ouellette et al, 1990). Všichni čtyři členové sdílejí kromě mechanismu regulace transkripce i některé strukturní prvky. Dva členové této rodiny, EGR1 a EGR4, hrají důležitou roli v procesech, které jsou předmětem studia této práce, a proto je jim věnována v této části pozornost.

2.6.1 Struktura, vlastnosti a regulace aktivity proteinů rodiny EGR

Všichni členové rodiny EGR mají vysoce homologní DNA vazebnou doménu umístěnou na C-konci proteinu (Elrod-Erickson et al, 1998; Miller & Pabo, 2001; Nardelli et al, 1992; Pavletich & Pabo, 1991). DNA vazebná doména obsahuje tři typické motivy zinkových prstů (Cys2-His2) (obr. 6a) a u všech členů rozeznává sekvenční motiv DNA: GCG G/TGG

GCG (Christy & Nathans, 1989a; Lemaire et al, 1990). Další homologní doménou je tzv. R1 doména, konzervovaná u všech členů rodiny EGR, kromě EGR4. R1 doména se nachází v blízkosti motivu prvního zinkového prstu a přímo zprostředkovává interakci s korepresory NAB. Ostatní části proteinů rodiny EGR jsou mezi jednotlivými členy poměrně variabilní.

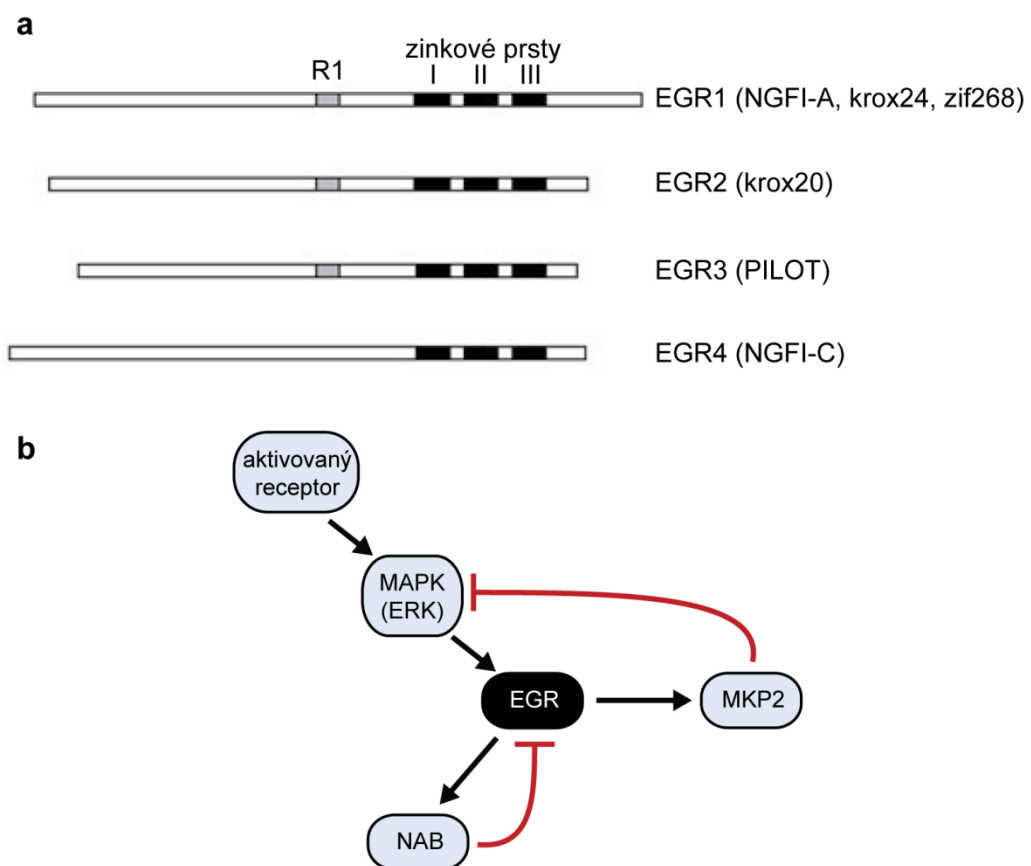
Proteiny rodiny EGR interagují s jinými proteiny, které interagují s dalšími proteiny a dohromady vytváří komplexy regulující transkripci (Dillon et al, 2007; Luciano & Wilson, 2003; Silverman et al, 1998; Vo & Goodman, 2001). Důležitou roli ve funkci proteinů EGR1-3 hraje interakce s dvěma členy rodiny transkripčních korepresorů NAB (NAB1 a NAB2). Proteiny NAB totiž rekrutují komplex histondeacetyláz, které následně brání transkripci regulované transkripčními faktory EGR (Srinivasan et al, 2006; Swirnoff et al, 1998), přesto v některých případech mohou proteiny NAB transkripci i aktivovat (Sevetson et al, 2000). Zajímavé je, že proteiny EGR aktivují transkripci a syntézu proteinů NAB, čímž se vytváří smyčka negativní zpětné vazby (Mechta-Grigoriou et al, 2000) (obr. 6b). Transkripce genů kódujících proteiny EGR je do značné míry pod kontrolou signální dráhy MAPK. Signalizace dráhou MAPK vede k aktivaci první vlny transkripce, transkripce velmi časných genů (angl. „immediate early genes“), do které patří i geny kódující proteiny EGR (Chavrier et al, 1989; Christy & Nathans, 1989b). Proteiny EGR následně řídí transkripci určitých genů, mezi jinými však aktivují transkripci negativních regulátorů signalizace dráhou MAPK, fosfatáz MKP2/DUSP5 (Berasi et al, 2006; Zhang et al, 2001), čímž se vytváří smyčka negativní zpětné vazby regulující signalizaci dráhou MAPK (obr. 6b).

2.6.2 Funkce proteinů rodiny EGR

Proteiny EGR mohou být součástí různorodých komplexů regulujících transkripci v různých typech buněk a mohou tedy hrát i různou roli. Například EGR1 je potřebný pro plodnost samic (reprodukční systém) (Lee et al, 1996; Topilko et al, 1998) a zároveň hraje roli v paměti (centrální nervový systém) (Jones et al, 2001). Všichni členové rodiny EGR jsou zapojeni ve vývoji a fungování mozku (O'Donovan et al, 1999; Perez-Cadahia et al, 2011). Zároveň se ukázalo, že některé role členů rodiny EGR jsou pravděpodobně redundantní (Boyle et al, 2009; Chen et al, 2005). Bude potřeba mnoho další práce, abychom dobře pochopili role proteinů EGR ve složité transkripční regulaci rozličných typů buněk. Pro tuto práci je podstatná především role proteinu EGR1 v udržení fenotypu myofibroblastů a jeho účast v rozličných nádorových onemocněních.

Role EGR1 v biologii myofibroblastů a rozvoji fibróz se věnovala již řada prací (přehledně (Bhattacharyya et al, 2013; Bhattacharyya et al, 2011)). Z nich vyplývá, že v lidských kožních fibroblastech aktivní signalizace dráhou vede k tvorbě EGR1, který následně aktivuje syntézu kolagenu typu I (Chen et al, 2006). U myši bez genu kódujícího EGR1 docházelo ke špatnému hojení ran kůže a fibroblasty z takových myši hůře migrovaly a diferencovaly v myofibroblasty (Wu et al, 2009). Vysoká hladina EGR1 byla pozorována u řady fibrotických onemocnění, např. ve sklerodermě (Bhattacharyya et al, 2008) nebo plicní sarkoidóze (Bihl et al, 2006). Zvýšená hladina EGR1 byla pozorována u lidských nádorů, jako jsou karcinom prostaty (Eid et al, 1998), melanom (Seykora et al, 2003) nebo rakovina jícnu (Wang et al, 2009a). EGR1 ve spolupráci s dalšími transkripčními faktory (TBX2, β -katenin) podporuje proliferaci buněk rakoviny prsu (Redmond et al, 2010) a rozvoj hepatocelulárního karcinomu (Lu et al, 2012). U lidských buněk karcinomu prostaty hraje EGR1 roli v regulaci růstu nádorových buněk jak *in vitro*, tak *in vivo* (Yang et al, 2006). Zvýšená hladina EGR1 souvisí i s aktivním metastazováním karcinomů žaludku, močového měchýře a meduloblastomů (Egerod et al, 2009; Chopra et al, 2003; Kobayashi et al, 2002; Zheng et al, 2010). EGR1 také může podporovat nádorovou progresi melanomů tím, že prostřednictvím HGF (jehož tvorbu aktivuje) indukuje tvorbu fibronektinu a CD44 (Damm et al, 2010; Gaggioli et al, 2005; Recio & Merlino, 2003). V různých typech nádorů EGR1 pravděpodobně přispívá k metastazování aktivací transkripce genu kódujícího heparanázu, enzym štěpící heparan sulfát (složku ECM) (de Mestre et al, 2005; Ogishima et al, 2005). Existuje však i práce ukazující protirakovinné účinky EGR1. EGR1 může aktivovat expresi genu kódujícího tumorsupresor p53, který brání buňkám s poškozeným genomem pokračovat v buněčném dělení (Krones-Herzig et al, 2003).

Druhým členem rodiny EGR podstatným pro tuto práci je EGR4. O funkci proteinu EGR4 je známo jen velmi málo, nebyl totiž prakticky studován. O EGR4 bylo publikováno, že hraje důležitou roli v časně fázi meiózy při vzniku spermií, jak odhalila analýza myši s mutovaným genem EGR4. Mutovaná zvířata byla fenotypicky normální, pouze samci byli neplodní (Tourtellotte et al, 1999).



Obr. 6 Struktura a regulace aktivity proteinů rodiny EGR

a) Struktura proteinů rodiny EGR podle O'Donovan et al., 1999, upraveno. U každého proteinu jsou v závorce uvedeny alternativní názvy. **b)** Zjednodušené schématické zobrazení regulací aktivity proteinů EGR.

3. Materiál a metody

3.1 Buněčné kultury a opůsobení buněk *in vitro*

Kuřecí primární kožní myofibroblasty (CEDM, z anglického Chicken Embryo Dermal Myofibroblasts) byly získány z kožních explantátů připravených z desetidenních embryí kuřat (*Gallus gallus*) plemene Brown Leghorn. CEDM migrovaly z rozstříhaných kousků kůže oddělených z embrya a umístěných na kultivační misku s růstovým médiem. Po dvou následujících pasážích byly získány kultury homogenních a fenotypicky stabilních buněk CEDM, které byly použity pro transfekce. Stabilně transfekované buňky CEDM byly připraveny kotransfekcí arteficiálním, replikačně nekompetentním retrovirovým plazmidem SFCV a pomocným virovým plazmidem RCAS-BPA v poměru 3:1. Kotransfekované plazmidy, dávající vzniknout příslušným buňkám CEDM, jsou uvedeny v tabulce 1 (buňky, replikačně nekompetentní plazmid, pomocný virový plazmid. Transfekce byla provedena podle instrukcí výrobce transfekčním činidlem Lipofectamine 2000 (Invitrogen). 48 hodin po transfekci byly buňky pasážovány a selektovány po jeden týden v přítomnosti G418 (500 µg/ml). Buňky DF1-RCAS, DF1-RCAS-TGFB3^{WT} a DF1-RCAS-TGFB3^{CSCS} byly připraveny transfekcí kuřecí (*Gallus gallus*) buněčné linie DF1 (Himly et al, 1998) příslušným rekombinantním replikačně kompetentním retrovirovým plazmidem RCAS (tab. 1). Retrovirus RCAS proinfikoval buněčnou kulturu během tří následujících pasáží.

buňky	replikačně nekompetentní plazmid	pomocný plazmid	virový
CEDM SFCV	SFCV-LE	RCAS-BPA	
CEDM SFCV-EGR4 RCAS	SFCV-EGR4	RCAS-BPA	
CEDM SFCV-EGR4 RCAS-TGFB3 ^{WT}	SFCV-EGR4	RCAS-TGFB3 ^{WT}	
CEDM SFCV-EGR4 RCAS-TGFB3 ^{CSCS}	SFCV-EGR4	RCAS-TGFB3 ^{CSCS}	
CEDM SFCV-BAMBI RCAS	SFCV-BAMBI	RCAS-BPA	
CEDM SFCV-FOXG1 RCAS	SFCV-FOXG1	RCAS-BPA	
CEDM SFCV-Ha-Ras(G12V) RCAS	SFCV-Ha-Ras(G12V)	RCAS-BPA	
CEDM SFCV-NAB1 RCAS	SFCV-NAB1	RCAS-BPA	
CEDM SFCV-PDGFB	SFCV-PDGFB	RCAS-BPA	
CEDM SFCV RCAS-PDGFB	SFCV-LE	RCAS-PDGFB	
DF1-RCAS		RCAS-BPA	
DF1-RCAS-TGFB3 ^{CSCS}		RCAS-TGFB3 ^{CSCS}	
DF1-RCAS-TGFB3 ^{WT}		RCAS-TGFB3 ^{WT}	
PR9692-dnMLC2	SFCV-dnMLC-GFP		
PR9692-dnRhoA	SFCV-GFP-dnRho		
PR9692-mock	SFCV-LE		
PR9692-E9-caRhoA	SFCV-GFP-caRhoA		
PR9692-E9-ME-EGR1	SFCV-ME-EGR1		
PR9692-E9-mock	SFCV-LE		

Tab. 1 Kombinace retrovirových vektorů použitých pro přípravu jednotlivých typů buněk s exogenně exprimovanými geny.

Buněčná linie PR9692 je odvozena z nádoru, který vznikl po injekci DNA konstruktů KF6K4cl2 do vnější části prsního svalu experimentálního kuřete číslo 9692. Konstrukt KF6K4cl2 obsahoval cDNA kódující v-src, umístěnou mezi sekvencemi LTR viru RSV (LTR - v-SRC – LTR) (Plachy & Vilhelmova, 1984). Buňky pocházející z kousků nádoru kuřete č.9692 byly kultivovány v tkáňové kultuře a pasážovány do doby, kdy se samovolně immortalizovaly. Immortalizované buňky byly následně pasážovány v buněčné kultuře přes deset let (více než 500 zdvojení za 200 pasáží).

Buňky rostou konstantní rychlostí a jsou klonogenní. Schopnost tvořit kolonie je asi 50%. Klon PR9692-E9 byl připraven limitním ředěním linie PR9692 v 175. pasáži. Testované geny byly do buněk PR9692 a PR9692-E9 vnášeny prostřednictvím replikačně nekompetentního retroviru SFCV-LE. Retrovirové částice vznikly v obalovací (pakážovací) linii KUNDRA po transfekci buněk KUNDRA replikačně nekompetentním retrovirovým plazmidem SFCV-LE. Kontrolní buňky PR9692-mock a PR9692-E9-mock byly připraveny infekcí příslušných buněk prázdným retrovirem SFCV-LE. Buněčné linie PR9692-dnMLC a PR9692-dnRhoA byly připraveny stejným způsobem jako buňky PR9692-mock, pouze místo prázdného viru SFCV-LE byl použit příslušný rekombinantní vektor SFCV, jak je uvedeno v tabulce 1. Buněčné linie PR9692-E9-caRhoA a PR9692-E9-ME-EGR1 byly připraveny stejným způsobem jako buňky PR9692-E9-mock, pouze místo prázdného viru SFCV-LE byl použit příslušný rekombinantní vektor SFCV, tab. 1. Infikované buňky byly selektovány po jeden týden v přítomnosti G418 (500 µg/ml). Selektované klony byly spojeny do jediné buněčné kultury. Vznik krysích buněk A3 (celým jménem A337/311RP) a RsK4 a jejich vlastnosti byly popsány již dříve (Cavanna et al, 2007; Vesely et al, 1968). Buněčná linie A3dnRhoA byla připravena tak, aby buněčná linie A3 stabilně exprimovala dominantně negativní variantu RhoA (inaktivující mutace T19N; (Conrad et al, 2007)) fúzovanou s GFP z integrovaného plazmidu pEGFP-dnRhoA. Buněčná linie A3dnMLC byla připravena tak, aby buněčná linie A3 stabilně exprimovala dominantně negativní (nefosforylovatelnou) variantu MLC (mutace T18A, S19A; (Croft et al, 2005)) fúzovanou s GFP z integrovaného plazmidu pEGFP-dnMLC. Buňky byly selektovány v přítomnosti G418 (400 µg/ml) a z přeživších klonů byly vybrány buňky pozitivní na GFP pomocí FACS (FACSVantage SE, BD Biosciences).

Jak buňky CEDM, tak buňky DF1 byly kultivovány v médiu DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium, D5546, Sigma), doplněném glukózou (4.5g/l), L-glutaminem, penicilinem, streptomycinem, 4% fetálním telecím sérem (PAA) a 2% kuřecím sérem (Sigma). Buňky PR9692 a všechny buňky z nich odvozené byly kultivovány v médiu IMDM (Iscove's modified Dulbecco's medium), doplněném penicilinem, streptomycinem, 8% fetálním telecím

sérem a 2% kuřecím sérem. Při testování možného vlivu proteinů TGF β z kultivačního média (konkrétně séra) na aktivitu signální dráhy TGF β v buňkách CEDM bylo použito bezproteinové médium BioWhittaker® UltraDOMA™-PF (Lonza) doplněné penicilinem a streptomycinem. Krysí buňky A3 a RSK4 byly kultivovány v médiu DMEM (Gibco), doplněném glukózou (4.5g/l), L-glutaminem, pyruvátém, penicilinem, streptomycinem, 1% MEM neesenciálními aminokyselinami (Gibco) a 10% fetálním telecím sérem (Sigma). Buňky CEDM, DF1, A3 a K4 byly kultivovány při 37°C ve vlhké atmosféře s 5% CO₂. Buňky PR9692 a PR9692-E9 byly kultivovány při 41°C ve vlhké atmosféře s 5% CO₂.

Čas zdvojení buněčných linií byl určen jako průměrná hodnota tří časů zdvojení, spočítaných při za sebou jdoucích pasážích buněk v exponenciální fázi růstu.

Pro inhibici signální dráhy TGF- β byl v experimentech použit inhibitor kinázové aktivity TGFBR1 - receptoru I pro TGF β - II (2-(3-(6-Methylpyridin-2-yl)-1H-pyrazol-4-yl)-1,5-naftyridin) od firmy Calbiochem rozpuštěný v DMSO. Ve všech experimentech byla použita 500 nM koncentrace tohoto inhibitoru. Při krátkodobých kultivacích (pro mikročipovou analýzu a semikvantitativní PCR) byly buňky kultivovány v přítomnosti inhibitoru po 48 hodin a následně sklizeny. Při dlouhodobých (15 dní) kultivacích buněk CEDM s inhibitorem pro analýzu proteinů byl inhibitor nahrazen novým inhibitorem společně s kultivačním médiem při každé pasáži nebo každých 48 hodin. Buňky CEDM byly také inkubovány v přítomnosti látek TPA a U0126. TPA (12-O-tetradecanoylforbol-13-acetát) od firmy Sigma byl rozpuštěn v DMSO a použit v 10 nM koncentraci ve všech experimentech. Látka U0126 (Sigma) byla také rozpuštěna v DMSO a použita v 10 μ M koncentraci ve všech experimentech.

3.2 Konstrukce DNA vektorů

Plazmid SFCV-EGR4 byl připraven vpravením cDNA kódující kompletní kuřecí EGR4 mezi restrikční místa HindIII a XbaI vektoru SFCV-LE (Fuerstenberg & Vennstrom, 1993). Plazmid SFCV- BAMBI byl připraven vpravením cDNA kódující kompletní kuřecí BAMBI mezi restrikční místa EcoRV a XbaI vektoru SFCV-LE. Plazmid SFCV-FOXG1 byl připraven vpravením cDNA kódující kompletní kuřecí FOXG1 mezi restrikční místa EcoRV a ClaI vektoru SFCV-LE. Plazmid SFCV-Ha-Ras(G12V) byl připraven vpravením cDNA kódující kompletní lidský Ha-Ras(G12V) s bodovou mutací měnící glycin 12 na valin (konstitutivně aktivní varianta) mezi restrikční místa HindIII a XbaI vektoru SFCV-LE. Plazmid SFCV-NAB1 byl připraven vpravením cDNA kódující kompletní kuřecí NAB1 mezi restrikční místa HindIII a XbaI vektoru SFCV-LE. Plazmid SFCV-PDGFB byl připraven vpravením cDNA

kódující kompletní kuřecí PDGFB mezi restrikční místa HindIII a XbaI vektoru SFCV-LE. Plazmid SFCV-GFP-dnRhoA byl připraven přenesením úseku kódujícího fúzní rekombinantní protein GFP-dnRhoA (mezi restrikčními místy EcoRI a NheI) z vektoru pEGFP-dnRhoA (nesoucí RhoA stabilizující mutaci F25N a inaktivující mutaci T19N) (Conrad et al, 2007) do vektoru SFCV-LE (mezi restrikční místa HindIII a XbaI). Plazmid SFCV-GFP-caRhoA byl zkonstruován stejným způsobem jako SFCV-GFP-dnRhoA, ale jako výchozí vektor posloužil pEGFP-caRhoA (nesoucí RhoA stabilizující mutaci F25N a aktivující mutaci G14V) (Conrad et al, 2007). Plazmid SFCV-dnMLC-GFP byl připraven přenesením úseku kódujícího fúzní rekombinantní protein dnMLC-GFP (mezi restrikčními místy HindIII a NotI, NotI kohézní konec byl zatupen pomocí polymerázy Pfu) z vektoru pEGFP-dnMLC (Croft et al, 2005) do vektoru SFCV-LE (mezi restrikční místa HindIII a EcoRV). Plazmid SFCV-ME-EGR1 byl připraven vpravením cDNA kódující kompletní kuřecí BAMB1 spojené se sekvencí kódující epitop proteinu myc (ME) mezi restrikční místa HindIII a XbaI vektoru SFCV-LE. Sekvence kódující (AEEQKLISEEDLL) a připojující ME na 3'konec cDNA BAMB1 je dlouhá 50 nukleotidů.

Plazmid RCAS-TGFB3^{WT} byl připraven vpravením cDNA kódující kuřecí TGFB3 celé délky mezi restrikční místa Not I a Cla I vektoru RCAS-c-qin vector (Chang et al, 1996) a tedy výměnou úseku kódujícího c-qin (FOXG1) za úsek kódující TGFB3^{WT}. cDNA kódující kuřecí TGFB3 celé délky byla získána pomocí RT-PCR a vpravena mezi volné konce vektoru pBlueScript SK, získané štěpením vektoru restrikčním enzymem EcoRV. Pro RT-PCR byla použita celková RNA z buněk CEDM a pro amplifikaci cDNA kódující TGFB3 byly použity primery 5'-CATGAAGATGTACGCGCAAAGG a 5'-GACTGCCAGACCCTAAGCCACA. Plazmid RCAS-TGFB3^{CSCS} byl zkonstruován stejným způsobem, cDNA pro TGFB3 ale obsahuje dvě bodové mutace. Tyto mutace kódují substituce cysteinů za seriny (C227S a C229S) a byly do cDNA vneseny pomocí primerů 5'-GTATACACAGCCCTAGCCATACTTTTCAGCCCAATG a 5'-GTATACTGATTTCCAGGCCGAG.

Přesnost amplifikace DNA pomocí PCR při konstrukci plazmidů byla pokaždé ověřena sekvenováním.

Konstrukce fágové DNA KF6K4cl2, použité pro indukci nádoru v kuřeti PR9692, byla popsána již dříve (Svoboda et al, 1986).

Plazmid p6H-EGR4, použitý pro stabilní expresi rekombinantního proteinu EGR4 v bakteriích *E.coli* pro následnou imunizaci králíků vzniklým proteinem, byl vytvořen nahrazením sekvence kódující GST ve vektoru pGEX-5X3 (Amersham Pharmacia Biotech)

sekvencí fragmentu cDNA EGR4 spolu se sekvencí kódující šest histidinů na N-konci. Fragment cDNA odpovídal sekvenci kódující aminokyseliny 58-256 proteinu EGR4. Plazmid pVL1393-EGR1, pro expresi rekombinantního proteinu NAB1 v systému bakulovirus – hmyzí buňka, byl připraven vpravením cDNA kódující kuřecí NAB1 celé délky mezi volné konce upraveného vektoru pVL1393, získané štěpením vektoru restrikcí enzymem NdeI. Úprava vektoru pVL1393 spočívala ve vnesení sekvence kódující šest histidinů před restrikcí místo NdeI.

3.3 Izolace RNA, PCR, RT-PCR a qPCR

Celková RNA byla izolována z buněk, sklizených těsně před dosažením konfluency, za použití lyzačního roztoku Trizol reagent (Invitrogen). Sklizené lyzáty byly zpracovány podle návodu výrobce roztoku Trizol reagent (Invitrogen). cDNA byla připravena z 1.5 µg celkové RNA použitím 200 U M-MLV reverzní transkriptázy (Promega) v reakci o objemu 15 µl. Výsledná cDNA byla vodou bez nukleáz (Nuclease-Free Water, Ambion) naředěna do 70 µl a použita pro PCR (1.2 µl/20µl reakci). Semikvantitativní PCR byla provedena použitím DNA polymerázy Taq (New England Biolabs) a primery pro specifický gen o koncentraci 250 nM. Kompletní seznam primerů a zvláštních podmínek pro amplifikaci jednotlivých genů je uvedena v tabulce EP1 (v elektronické příloze této práce). Produkty amplifikace byly rozděleny na 1,3% nebo 1,8% agarózovém gelu. Kvantitativní PCR (qPCR) byla provedena v technických triplicátech za použití reakční směsi založené na FastStart SYBR Green Master (Roche) a detekčním systémem MiniOpticon real-time PCR (Bio-Rad) nebo Chromo 4 (Bio-Rad). Data byla vyhodnocena za použití softwaru Bio-Rad CFX Manager 2.1 (Bio-Rad) a Microsoft Excel 2007 (Microsoft). Účinnost amplifikace byla odvozena z lineární regrese hodnot relativní fluorescence v log₂ škále vynesných proti počtu cyklů (účinnost = $2^{\text{směrnice}}$). Relativní hodnoty exprese byly vypočítány z hodnot C_q a normalizovány na hodnoty GAPDH příslušného vzorku. Statistická významnost rozdílů v genové expresi byla zjištěna pomocí t-testů za použití kombinovaných standardních odchylek (technických a biologických). PCR metodu jsme použili kromě analýzy genové exprese i pro odhalení sekvencí cDNA celé délky několika kuřecích genů, které mají zásadní nebo potenciální vztah k biologii myofibroblastů a jejichž sekvence byly známy jen z části. Tyto námi identifikované sekvence byly uloženy do databáze GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) a jsou nyní veřejně přístupné: FAM180A/HWKM1940 (GenBank: JN032743), NAB1 (AY035386), NAB2 (JQ423908), SRF/serum response factor (GenBank: JF803302) a TGFB1/TGF-β1 (GenBank: JQ423909).

3.4 Mikročipová analýza

Celková RNA byla izolována ze tří nezávislých buněčných kultur (způsobem popsaným výše) a po kontrole kvantity (spektrofotometricky na Nanodrop) a kvality (kapilární elektroforézou Bioanalyser) značena podle technického návodu pro analýzu exprese (Affymetrix, 2001) a hybridizována na mikročipu GeneChip Chicken Genome Array (Affymetrix). Přesněji 5 μg celkové RNA bylo reverzní transkripcí převedeno na dvouřetězcovou cDNA pomocí oligo(dT)-primerů značených sekvencí pro promotor polymerázy T7. Dvouřetězcová cDNA byla následně použita jako templát a amplifikována RNA polymerázou T7. Polymeráza dala v transkripční reakci vzniknout mnoha kopiím antimediatorové (antisense) cRNA, značené inkorporací biotinylovaných nukleotidů. 20 μg značené cRNA bylo fragmentováno a hybridizováno na mikročipu po 16 hodin při 45°C. Poté byly čipy opláchnuty a barveny v přístroji Affymetrix Fluidics Station 450. Změření signálů bylo provedeno pomocí přístroje Affymetrix GeneChip Scanner 3000. Získaná data byla zpracována softwarem Partek Genomics Suite (Partek Inc.), za použití normalizace algoritmem GC-RMA (Irizarry et al, 2003). Data byla testována na rozdíly v expresi metodou ANOVA. Jako rozdílně exprimované geny byly vybrány geny, jejichž exprese se změnila více než dvakrát a opůsobení buněk vedlo k hodnotě p (p -value) $<0,05$. Zobrazení hybridizačních aktivit - *hm* (heatmap) bylo vytvořeno počítačovým programem Microsoft Excel 2007. Barevná škála *hm* představuje normalizovanou intenzitu signálu. Protože velká část standardní anotace kuřecího mikročipu byla jen čísla EST klonů, pokusili jsme se tyto ESTy (v případě významné změny exprese) přiřadit bioinformatickými metodami k příslušným genům. V mnoha případech jsme byli schopni jednoznačně přiřadit daný EST k 3' nepřekládané oblasti známého genu. V těchto případech jsme následně manuálně změnili anotaci sady oligonukleotidových sond *p-s* (probe-set), jak je zobrazeno v obr. 8 a 15. Data z mikročipové analýzy byla uložena do databáze GEO, GEO: GSE28634, GEO: GSE15143 a GEO: GSE15141. Všechna data vyhovují pravidlům MIAME.

3.5 Příprava protilátek

Byly připraveny polyklonální protilátky proti proteinům EGR4 a Nab1. Protein EGR4 byl exprimován v bakteriích *E. coli* (BL21 DE3 RIL), transformovaných plazmidem p6H-EGR4. Exprese byla indukována v exponenciálně rostoucí kultuře bakterií pomocí 1 mM IPTG v průběhu čtyřhodinové inkubace (30°C, míchání při 250 rpm). Rekombinantní protein Nab1 (antigen) byl exprimován v systému bakulovirus – hmyzí buňka, protože bakterie *E. coli* nebyly schopné tento rekombinantní protein účinně exprimovat. Pro expresi byly použity hmyzí buňky Sf9 a bakulovirová DNA „BD BaculoGold Bright“ (BD Biosciences Pharmingen) a bylo postupováno podle návodu výrobce.

Oba rekombinantní proteiny (Egr4 i Nab1) byly purifikovány pomocí afinitní chromatografie (Talon Metal Affinity Resin, Clontech) podle návodu výrobce.

Imunizace králíků a příprava séra byla provedena stejným způsobem, jak bylo popsáno dříve (Bartunek et al, 1996). Protože sérum s protilátkami proti Egr4 vykazovalo při technice WB příliš velké pozadí, provedli jsme afinitní purifikaci protilátek. Purifikace byla provedena stejným způsobem, jako bylo popsáno dříve (Bar-Peled & Raikhel, 1996) s tím rozdílem, že protilátky byly zachyceny na rekombinantní protein GST-Egr4.

3.6 Imunodetekce proteinů („Western blotting“) WB

Buňky dorostlé do konfluency na 100-mm kultivačních miskách byly krátce opláchnuty PBS, lyzovány 500 μ l lyzačního roztoku LysBuf (20 mM Tris pH 6.8, 1% Triton X-100, 0.3% SDS, 5 mM EDTA, 10% glycerol, směs inhibitorů proteáz Complete - EDTA-free od firmy Roche) a lyzáty steklé ke kraji nakloněné kultivační misky přemístěny do 1.5 ml zkumavek. Tento způsob sklizně zajišťuje, že lyzát neobsahuje ECM. Z lyzátů byly odstraněny nerozpuštěné zbytky centrifugací při 17 000 \times g po 20min. Koncentrace proteinů byla stanovena pomocí metody založené na kyselině bicinchoninové (BCATM Protein Assay Kit, Pierce) podle návodu výrobce. Koncentrace lyzátů byla sjednocena vyrovnáním lyzačním roztokem, lyzáty byly smíchány s 5 \times SB (300 mM Tris pH 6.8, 5% SDS, 360 mM 2-merkapt ethanol, 50% glycerol, 0.05% bromfenolová modř) a inkubovány při 99°C po 10 min.

Proteiny (40 μ g na linku standardně, výjimečně 80 μ g na linku) byly rozděleny na 9%, 10% nebo 12% (podle velikosti detekovaného proteinu) polyakrylamidovém gelu metodou SDS-PAGE a elektroforeticky přeneseny z polyakrylamidového gelu na nitrocelulosovou membránu (Hybond ECL, Amersham Biosciences) za laboratorní teploty na přístroji Gel Destainer GD-4 firmy Pharmacia v přenašecím pufru (153.6 mM glycin, 20% methanol, 20

mM Tris, pH 8,3). Aplikován byl konstantní proud 200 mA po dobu 14 hodin. Volná vazebná místa na nitrocelulóзовé membráně byla vysycena inkubací s 5% odtučněným mlékem nebo 3% BSA (pouze při detekci MT-MMP1) v TBST (150 mM NaCl, 0,16% Tween 20, 20 mM Tris pH 7,5) po 1 hodinu. Membrány byly přes noc při 5°C inkubovány s primárními protilátkami proti ARHGAP15 (GTX119660, GeneTex, 1:1,000), Bambi (# HPA010866, Sigma, 1:500), calponinu 1 (klon CP-93, Sigma, 1:2,000), EGR1 (sc-110, Santa Cruz Biotechnology, 1:2,000), EGR4 (anti-Egr4 protilátka vzniklá způsobem popsáným výše, 1:1,000), fosfo-ERK1,2 (V8031, Promega, 1:1000), ERK1,2 (V1141, Promega, 1:1000), FoxG1 (AV38595, Sigma, 1:1,000), GFP (sc-9996, Santa Cruz Biotechnology, 1:1,000), HAS2 (sc-66916, Santa Cruz Biotechnology, 1:2,000), HHIP (GTX112584, GeneTex, 1:1,000), fosfo-JNK (G9, Cell Signaling Technology, 1:100), JNK (56G8, Cell Signaling Technology, 1:200), LPL (GTX101125, GeneTex, 1:1,000), MT-MMP1 (sc-12366, Santa Cruz Biotechnology, 1:1,000), Nab1 (anti-Nab1 protilátka vzniklá způsobem popsáným výše, 1:5,000), NCAM1 (5e-a, Developmental Studies Hybridoma Bank, 1:1,000), NPR3 (GTX110023, GeneTex, 1:1,000), NPTII (#06-747, Millipore, 1:2,000), fosfo-p38MAPK (28B10, Cell Signalling Technology, 1:400), p38MAPK (#9212, Cell Signalling Technology, 1:200), α SMA (klon 1A4, Sigma, 1:10,000), fosfo-Smad2 (138D4, Cell Signaling Technology, 1:1,000), Smad2/3 (#3102, Cell Signaling Technology, 1:2,000), fosfo-Smad3 (ab51451, Abcam, 1:10,000), Smad3 (ab28379, Abcam, 1:2,000) a TGFBI (GTX100744S, GeneTex, 1:1,000). Membrány byly následně třikrát opláchnuty TBST a inkubovány s příslušnými sekundárními protilátkami s kovalentně vázanou křenovou peroxidázou (Jackson ImmunoResearch Laboratories) jednu hodinu. Po trojitém oplachu v TBST byly membrány vyvolány vyvolávacím roztokem SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate (Pierce). Luminiscenční záření vzniklé při vyvolání membrán bylo zachyceno na rentgenový film (Agfa). Pro několikanásobnou detekci proteinů protilátkami byly z membrán odstraněny navázané protilátky použitím roztoku Re-Blot Plus Mild Antibody Stripping Solution (Millipore) podle návodu výrobce. Kontrola stejnoměrné nanášky proteinů byla prováděna na každé membráně barvením barvivem Ponceau-S a detekcí proteinu GAPDH protilátkou (GTX30666, GeneTex, 1:2,000). Výsledky v obrázcích jsou reprezentativním vzorkem minimálně tří nezávislých experimentů.

3.7 Barvení kolagenu uloženého v ECM pomocí barviva Sirius červeň

Kultivační misky s buňkami byly po lýze buněk lyzačním pufrem (LysBuf) ještě opláchnuty třikrát lyzačním pufrem, dvakrát deionizovanou vodou, dvakrát methanolem a znovu dvakrát deionizovanou vodou. Následně byly misky inkubovány s roztokem pikro-sirius červeň (0.1 g Direct Red 80 ve 100 ml saturovaného vodního roztoku kyseliny pikrové, obojí od firmy Fluka) jednu hodinu při pokojové teplotě. Inkubace byla následována třemi oplachy okyselenou vodou (5 ml 100% kyseliny octové v 1 l deionizované vody). Snímky byly zachyceny v jasném poli (BF) v mikroskopu DMIRB, s použitím kamery DFC480 a počítačového programu IM500 (Leica Microsystems). Získané snímky byly nakonec zpracovány počítačovým programem Adobe Photoshop (Adobe Systems). Snímky v obrázcích jsou reprezentativním vzorkem minimálně tří nezávislých experimentů.

3.8 Imunofluorescenční a fluorescenční mikroskopie

Pro detekci aktinových vláken tvořených α SMA byly buňky CEDM (ještě před dosažením konfluence) třikrát krátce opláchnuty PBS a fixovány 4% paraformaldehydem (rozpuštěným v PBS) po 20 minut při pokojové teplotě. Fixované buňky byly permeabilizovány 10 minut ve studeném (-20°C) methanolu, blokovány 10% fetálním telecím sérem (PAA) po dobu 30 minut a inkubovány s primární protilátkou proti α SMA (klon 1A4, Sigma) ředěnou 1:250 v PBS po 1 hodinu. Následovaly tři oplachy oplachovacím roztokem (PBS + 0.1% Tween20) a buňky byly inkubovány 1 hodinu se sekundární protilátkou konjugovanou s fluorescenční značkou Alexa488 (Invitrogen) ředěnou 1:800 v PBS. Po dalších třech oplachích oplachovacím roztokem byly buňky zamontovány v roztoku Mowiol s DAPI 1 μ g/ml (Vector Laboratories). Obrázky fluorescenčně značených proteinů a jader buněk byly snímány na mikroskopu Leica DM6000B, s použitím kamery DFC490 a počítačového programu LAS AF (Leica Microsystems).

Pro porovnání organizace aktinového cytoskeletu bylo provedeno barvení faloidinem. Buňky (100,000/ 60-mm kultivační misku) byly vysety na misky pokryté kolagenem typu I (z krysího ocasu, Sigma C3867-1VL) a nechány adherovat přes noc. Kultivační misky byly pokryty kolagenem podle návodu výrobce. Buňky byly opláchnuty PBS a fixovány paraformaldehydem stejným způsobem, jako při detekci vláken α SMA popsané výše. Následně byly buňky inkubovány s roztokem (50 μ g/ml v PBS) faloidinu konjugovaného s fluorescenční značkou TRITC (Sigma P1951) po 40 minut a dvakrát opláchnuty PBS. Aktinový cytoskelet

buněk značený fluorescenčním faloidinem byl snímán konfokálním mikroskopem Leica DMI6000/TCS SP5 AOBS TANDEM a kamerou Leica DFC420C.

Buňky na epidermální straně matrix odvozené z dermis byly fixovány 4% paraformaldehydem a permeabilizovány pomocí 0.5% Triton X-100. Následně byly třikrát opláchnuty PBS, barveny faloidinem konjugovaným s fluorescenční značkou Alexa594 (Molecular Probes), třikrát opláchnuty PBS a zamontovány v roztoku Mowiol s DAPI 1µg/ml (Vector Laboratories). Snímky byly zachyceny v konfokálním mikroskopu Leica TCS SP2. Všechny získané imunofluorescenční a fluorescenční snímky byly nakonec zpracovány počítačovým programem Adobe Photoshop (Adobe Systems). Snímky v obrázcích jsou reprezentativním vzorkem minimálně tří nezávislých experimentů.

3.9 Test adhezivních vlastností buněk

Buňky (100,000/ 60-mm kultivační misku) byly vysety na misky pokryté kolagenem typu I (z krysího ocasu, Sigma C3867-1VL) a nechány adherovat přes noc. Kultivační misky byly pokryty kolagenem podle návodu výrobce. Zorná pole zobrazující asi 300 buněk byla zachycena kamerou (Leica DFC420). Ze získaných fotografií byly buňky spočítány a rozděleny do tří kategorií podle stupně adheze na kolagenem pokrytý povrch. Výsledky v obrázcích jsou reprezentativním vzorkem minimálně tří nezávislých experimentů.

3.10 Mikroskopické časosběrné snímání

Buňky (100,000) byly vysety na šestijamkovou destičku, jejíž dno bylo pokryté kolagenem typu I (z krysího ocasu, Sigma C3867-1VL) a inkubovány v kultivační teplotě (40°C) po 2 hodiny. Kultivační jamky destičky byly pokryty kolagenem podle návodu výrobce. Plovoucí materiál byl odstraněn třemi oplachy kultivačním médiem o teplotě 40°C. Kultivační destička byla následně umístěna do inkubátoru BL109 (PeCon GmbH) připevněného na mikroskopu DMI6000B. Inkubátor i stolek mikroskopu byly předehřáty na kultivační teplotu 40°C. Mikrofotografie byly snímány v intervalu jedné minuty po 26 hodin kamerou Leica DFC360 FX. V téměř stejné chvíli bylo fotografováno mnoho míst kultivační destičky. Z mikrofotografií byly vytvořeny video-soubory pomocí počítačového programu VirtualDub 1.9.8., které zobrazují 20 snímků za sekundu. Konečná komprese byla vytvořena použitím kodeku mpeg-2. Přiložená videa jsou reprezentativním vzorkem minimálně tří nezávislých experimentů.

3.11 Zymografie v želatinovém gelu

Na jednu jamku dvacetičtyřjamkové destičky bylo vyseto 2×10^5 buněk. Po šestnácti hodinách inkubace byly buňky opláchnuty PBS a dalších 72 hodin byly inkubovány v 300 μ l média bez séra, aby vytvořily kondicionované médium. Kondicionované médium (25 μ l/jamku) bylo následně použito pro zymografii v želatinovém gelu (10% SDS-PAGE gel obsahující 1 mg/ml želatinu). Proteiny z kondicionovaného média byly elektroforeticky rozděleny a proteinové gely byly následně oplachovány 1 hodinu v roztoku o složení: 50 mmol/l Tris-HCl (pH 7.5), 0.1 mol/l NaCl a 2.5% Triton X-100. Poté byly gely inkubovány 17 hodin při 37°C v roztoku o složení: 50 mmol/l Tris-HCl (pH 7.5), 10 mmol/l CaCl_2 a 0.02% azid sodný. Gely byly nakonec obarveny barvivem Coomassie blue a odbarveny v roztoku tvořeném 7% kyselinou octovou a 5% methanolem. Výsledky zobrazeny v obrázcích jsou reprezentativním vzorkem minimálně tří nezávislých experimentů.

3.12 Test invazivity buněk v 3D kolagenu *in vitro*

Invazivita (schopnost invadovat) buněk v 3D kolagenu *in vitro* byla analyzována stejným způsobem, jako je popsáno v (Janostiak et al, 2011). Suspenze buněk (2×10^5 buněk/ml) byla přidána na svrchní část kolagenového gelu v několikajamkové destičce a po 48 hodinách byla vyhodnocena míra invazivity jako průměr hloubky kolagenového gelu, které byly invadující buňky schopné dosáhnout v zorném poli. K vyhodnocení hloubky byl použit mikroskop Nikon-Eclipse TE2000-S (objektiv 20 \times /0.40 HMC) a počítačový program NIS-Elements. Při každém experimentu byly pro jednotlivý typ buněk analyzovány 3 jamky a v každé jamce 6 zorných polí. Aby bylo možné porovnávat jednotlivé experimenty mezi sebou, průměrná hloubka reflektující invazivitu byla normalizována na hloubku neopůsobených buněk. Pro každé jednotlivé podmínky byly analyzovány tři nezávislé experimenty. Při statistickém vyhodnocení dat byl použit Studentův t-test pro získání hodnot p.

3.13 Stanovení buněčné morfologie v 3D kolagenu

Buňky, u nichž byla zjišťována morfologie v 3D kolagenu, byly nejdříve uvolněny z kultivačních misek. Pokud byly buňky uvolněny trypsinem, byly ihned opláchnuty kompletním kultivačním médiem. 10^5 buněk bylo smícháno s 500 μ l kolagenu R (Collagen R) o koncentraci 3 mg/ml v kompletním kultivačním médiu. Vzniklá suspenze buněk v kolagenu (500 μ l) byla pipetována na dno jamky dvanáctijamkové destičky a směs byla ponechána ztuhnout v gel při 37 °C ve vlhké atmosféře s 5% CO_2 po dobu 1 hodiny. Ztuhlý gel byl opatrně převrstven

kompletním kultivačním médiem. Po 48 hodinové inkubaci byla analyzována morfologie buněk v 3D kolagenu za použití mikroskopu Nikon Eclipse TE2000-S (objektiv 20×/0.40 HMC). Buněčná morfologie byla klasifikována na základě elongačního indexu. Elongačního index byl počítán jako podíl délky a šířky buňky. Buňky, jejichž elongační index byl vyšší než 3 byly považovány za protažené. Intermediální buňky měly elongační index mezi 2 a 3 a zakulacené buňky měly elongační index v rozmezí 1 a 2. Dělicí se buňky byly vyloučeny z analýzy. Pro každé jednotlivé podmínky byly analyzovány tři nezávislé experimenty. V každém experimentu bylo vyhodnoceno nejméně 300 buněk. Při statistickém vyhodnocení dat byl použit Studentův t-test pro získání hodnot p.

3.14 Matrix odvozená z dermis

Matrix odvozená z dermis (XeDerma®; BIO SKIN a.s.) byla 2 dny před použitím pro imunofluorescenční barvení nastříhána na kousky o rozměrech asi 1×1cm a umístěna na dno jamky dvanáctijamkové destičky s pufrům HBSS. Těsně před použitím byly kousky matrix dvakrát opláchnuty médiem DMEM a experimentální buňky byly umístěny na její povrch. Po inkubaci s buňkami byla matrix opláchnuta PBS a fixována. Matrix byla před značením fluorescenční značkou FITC dva dny inkubována v pufru HBSS. Navázání FITC (1 µg/ml, Molecular Probes) bylo provedeno v pufru uhličitanu sodného (pH=9) po dobu 30 minut a nenavázaná značka byla odmyta trojitým oplachem PBS a dvojitým oplachem médiem DMEM.

3.15 Rastrovací elektronová mikroskopie

Buňky byly kultivovány v plnohodnotném kultivačním médiu (DMEM) na matrix odvozené z dermis po 24 hodin a po dalších 24 hodin v kultivačním médiu DMEM bez séra. Matrix odvozená z dermis byla dvakrát opláchnuta PBS, fixována 2.5% glutaraldehydem a poté třikrát opláchnuta PBS. Následovala dehydratace vzrůstající koncentrací ethanolu (30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 95 a 100%, 10 minut pro každou koncentraci) a poté sušení pomocí CPD 030 (BAL TEC). Nakonec byly vzorky pozlaceny 3 nm zlatem pomocí Sputter Coater SCD 050 (BAL TEC) a zobrazeny rastrovací elektronovou mikroskopií (SEM) na přístroji JEOL 6380 LV. Krysí fascie čerstvě vypreparovaná z dospělé krysy byla imobilizována v rámečku, umístěna v jamce šestijamkové destičky a experimentální buňky byly umístěny na její povrch. Po dvou dnech byl celý rámeček fixován a zpracován stejným způsobem jako při zpracování matrix odvozené z dermis.

3.16 Experimentální zvířata

Experimenty *in vivo* byly provedeny na Pražských inbredních kuřatech (*Gallus gallus*) linie CC.R1 (Plachy & Vilhelmova, 1984). Všechny procedury byly provedeny v souladu s vyhláškou (č.207/2004 sb.) o ochraně, chovu a využití pokusných zvířat, podle projektu pokusu schváleného rezortní komisí Akademie věd České republiky. Kuřata byla chována za standardních laboratorních podmínek s volným přístupem k vodě a potravě.

3.17 Hodnocení velikosti a četnosti nádorů a metastáz

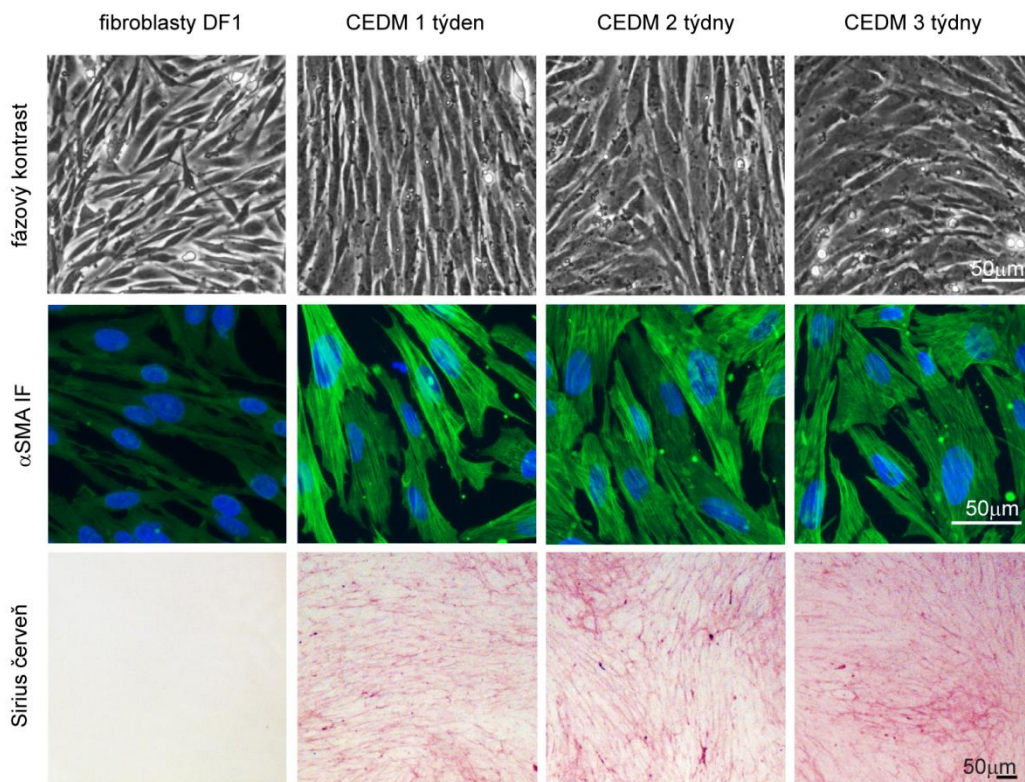
Kuřata byla inokulována injekcí do vnější oblasti prsního svalu ve věku tří týdnů u pokusů týkajících se aktivity signální dráhy Rho/ROCK/MLC a šesti týdnů u pokusů týkajících se vlivu transkripčního faktoru EGR1 na metastazování sarkomů. Inokulováno bylo 5×10^5 nádorových buněk, které byly čerstvě sklizeny z buněčné kultury a resuspendovány v 0.2 ml kultivačního média. Oblast primárního nádoru v oblasti prsního svalu byla měřena přiložením průhledné folie a obkreslením kontur nádoru. Kontury nádorů byly následně přeneseny na milimetrový papír a byla spočítána plocha primárního nádoru v mm^2 (Plachy & Vilhelmova, 1984). Rychlosti růstu primárních nádorů byly statisticky vyhodnoceny pro různé buněčné linie pomocí jednosměrného testu ANOVA v softwaru Excel (Microsoft). Váha primárních nádorů spolu s množstvím a velikostí metastáz byla vyhodnocena při pitvě. Pitvy byly provedeny mezi 21 a 35 dnem života kuřat inokulovaných buňkami PR9692 a mezi 28 a 45 u kuřat inokulovaných buňkami PR9692-E9 při pokusech týkajících se aktivity signální dráhy Rho/ROCK/MLC. Čas pitvy odrážel zdravotní stav experimentálních kuřat. Při pokusech týkajících se vlivu transkripčního faktoru EGR1 na metastazování sarkomů byla pitva provedena po 35 dnech života kuřete. Pokusy byly provedeny několikrát. V pokusech týkajících se aktivity signální dráhy Rho/ROCK/MLC bylo pro každou buněčnou linii prozkoumáno nejméně 33 zvířat. Pouze v kontrolní skupině (mock) byly počty sníženy (na 26). V pokusech týkajících se vlivu transkripčního faktoru EGR1 na metastazování sarkomů bylo pro každou buněčnou linii prozkoumáno nejméně 50 zvířat. Počty v kontrolní skupině (PR9692-E9-mock) byly opět sníženy.

4. Výsledky

4.1 Studium myofibroblastů

4.1.1 Buňky připravené z explantů kůže kuřecího embrya zjevně mají fenotyp myofibroblastů

Základními rysy myofibroblastů jsou: za prvé sekrece a ukládání ECM bohaté na kolagen a za druhé přítomnost kontraktilních vláken tvořených hladkosvalovým aktinem α (α SMA). Kvůli fenotypovému překryvu myofibroblastů s fibroblasty a buňkami hladkého svalstva musí být k jasnému určení fenotypu použito kombinace imunochemické detekce markerů a biochemických testů. Znalost jak přítomnosti vláken α SMA, tak produkce ECM je dostatečná pro odlišení myofibroblastů (mají výrazná vlákna α SMA a produkují velké množství ECM) od fibroblastů (nemají vlákna α SMA a produkují menší množství ECM) a buněk hladkého svalstva (mají výrazná vlákna α SMA, ale produkují žádné nebo jen velmi malé množství ECM). α SMA musí být v myofibroblastech nejen exprimován, ale musí být především uspořádán do kontraktilních vláken. Abychom zjistili fenotyp buněk vyputovaných z kožních explantátů desetidenních kuřecích embryí, byla u buněk během čtyřtýdenní kultivace každý týden sledována přítomnost vláken α SMA a produkce a ukládání ECM na povrch kultivačních misek. Přítomnost vláken α SMA byla pozorována pomocí imunofluorescenční mikroskopie a produkce ECM pomocí barvení kolagenů obsažených v ECM barvivem Sirius červeň. Jak ukazuje obrázek 7, téměř 100% kultivovaných buněk má výrazná vlákna α SMA a produkuje velké množství ECM ve všech sledovaných časových bodech. Pro srovnání, fibroblasty kuřecí linie DF1 nemají detekovatelná vlákna α SMA a neprodukují téměř žádnou ECM. Tyto výsledky (spolu s expresními profily – viz. dále) prokazují, že buňky získané z kuřecí embryonální kůže mají fenotyp myofibroblastů. Homogenní a v čase stabilní fenotyp těchto buněk ospravedlňuje jejich použití coby experimentálního modelu při studiu biologie myofibroblastů. V celé mojí práci byla pro tyto buňky použita zkratka CEDM (z anglického „Chicken Embryo Dermal Myofibroblasts“).



Obr. 7 Buňky odvozené z kůže kuřecích embryí mají rysy myofibroblastů. Imunofluorescenční detekce hladkého svalového aktinu α (α SMA) odhaluje výrazná vlákna v téměř všech buňkách (prostřední řada). Současně tyto buňky produkují velké množství ECM, jak dokládá barvení kolagenů po lyzi buněk barvivem Sirius červeně (spodní řada). Stabilita fenotypu buněk CEDM je dokumentována po dobu tří týdnů.

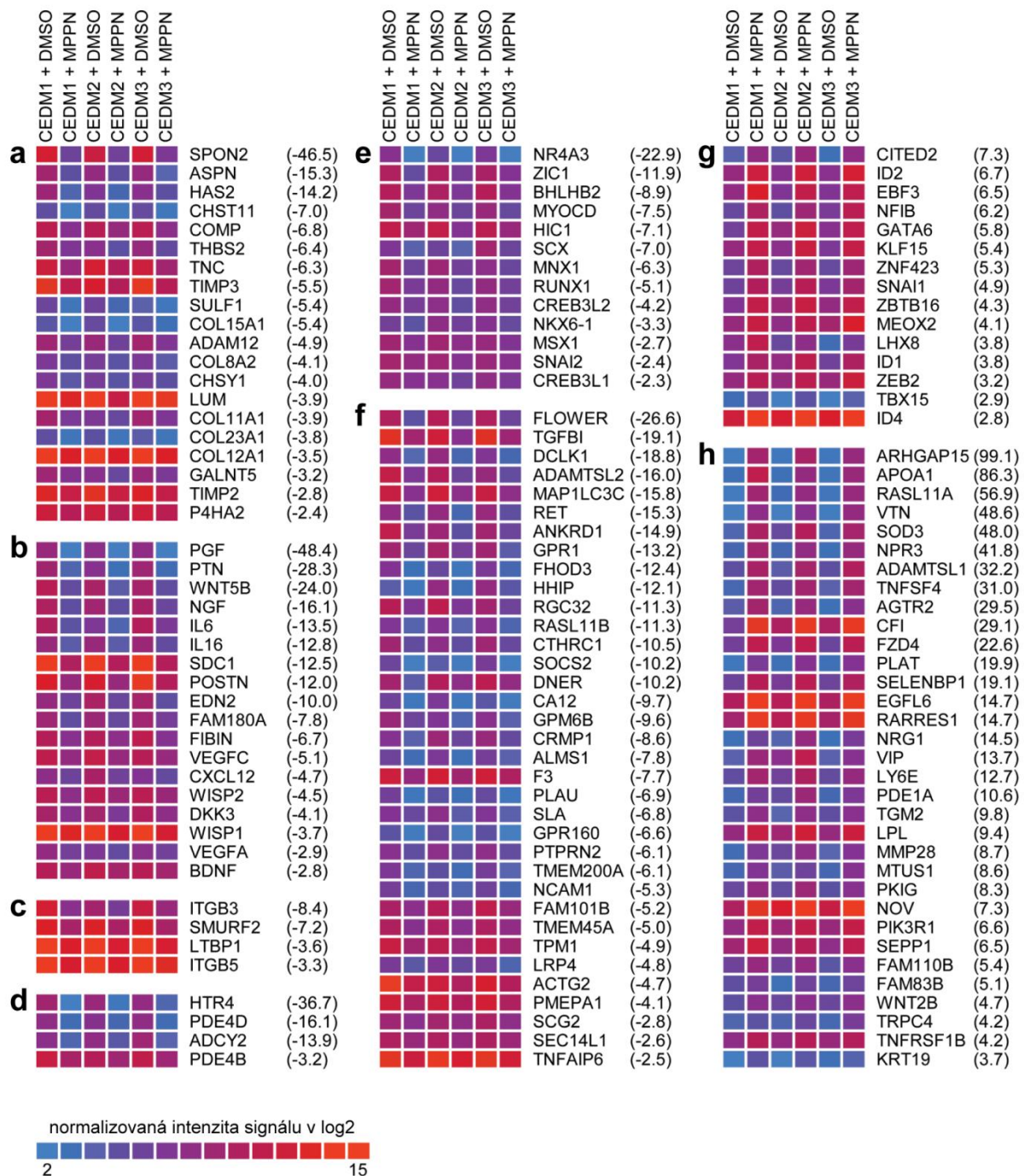
4.1.2 Mikročipová analýza genů regulovaných signální dráhou TGF β v buňkách CEDM

V současné době převažuje představa, že ústřední úlohu v diferenciaci myofibroblastů (často nazývaná jako „aktivace fibroblastů“) hraje signální dráha a ligand TGF β . Je také známo, že v diferencovaných myofibroblastech dochází k ustanovení autokrinní smyčky vedoucí k sekreci cytokinu TGF β (dále jen TGF β). TGF β se váže na svůj receptor, skládající se ze dvou podjednotek (TGFBR1 a TGFBR2) a vazbou na receptor spouští fosforylaci proteinů SMAD2 a SMAD3. Fosforylované proteiny SMAD2/3 jsou následně přemístěny do buněčného jádra a specifickou vazbou na promotorové oblasti cílových genů spouští jejich transkripci (Massague & Gomis, 2006). Protože geny regulované TGF β by měly hrát hlavní úlohu v diferenciaci a udržení fenotypu myofibroblastů, rozhodli jsme se tyto geny identifikovat. Pro identifikaci genů regulovaných TGF β v buňkách CEDM jsme použili velmi specifický inhibitor kinázové aktivity TGFBR1-II (2-(3-(6-Methylpyridin-2-yl)-1H-pyrazol-4-yl)-1,5-naftyridin), dále označovaný zkratkou MPPN a expresní profilování pomocí kuřecího

mikročipu. Předpoklad, že buňky CEDM mají autokrinní smyčku TGF β , byl založen na detekci relativně vysokých hladin exprese izoforem TGF- β 1 i TGF- β 3 na úrovni mRNA (zjištěno pomocí qPCR), stabilní fosforylací proteinů SMAD2 a nakonec byl potvrzen reakcí CEDM na inhibici signální dráhy TGF β (viz. níže). Možný vliv proteinů TGF β z kultivačního média (konkrétně séra) v pozorované stabilní aktivaci signální dráhy byl vyloučen kultivací buněk CEDM v bezproteinovém kultivačním médiu po 3 dny. Následná imunochemická detekce fosforylované formy proteinu SMAD2 ukázala, že kultivace v bezproteinovém kultivačním médiu neměla vliv na aktivitu signální dráhy TGF β ve srovnání s buňkami kultivovanými ve standardním kultivačním médiu DMEM doplněným sérem (obr. 9a).

Buňky CEDM byly v biologických triplicátech kultivovány v přítomnosti 500 nM MPPN (rozpuštěného v DMSO) nebo DMSO po 48 hodin a expresní profily takto opůsobených buněk byly porovnány. Za významné změny v expresi genů byly považovány pouze takové změny, jejichž rozdíl v normalizované intenzitě byl nejméně dvojnásobný a hodnota *p* (*p*-value) byla rovna 0.05 nebo nižší. Účinnost inhibice signální dráhy TGF β byla analyzována imunochemickou detekcí (WB) fosforylované formy proteinu SMAD2, přímým substrátem kinázové aktivity TGFBR1. Působení inhibitoru MPPN vedlo k úplné ztrátě fosforylace proteinu SMAD2, zatímco působení DMSO nemělo na zmíněnou fosforylacii žádný účinek (obr. 9b). Srovnání profilů genové exprese odhalilo značné množství genů, jejichž exprese byla snížena (421 *p*-s) nebo zvýšena (421 *p*-s) v reakci na inhibici signální dráhy TGF β (obr. 8 a tab. EP2 v elektronické příloze této práce), kompletní data jsou přístupná v databázi GEO pod kódem GSE28634). Podle očekávání a v souladu s analýzou fenotypu byla snížena exprese genů kódujících složky ECM, enzymů produkujících a modifikujících ECM a mnohých růstových faktorů. Snížena byla i exprese rozličných genů známých i neznámých funkcí. Mnoho z pozorovaných změn odpovídajících regulaci signální dráhou TGF β bylo již pozorováno v savcích buňkách. Seznam takových genů a příslušných odkazů na literaturu je v tab. EP3 (v elektronické příloze této práce). Kromě dobře známých a námi ověřených expresí VEGFA, NGF, BDNF, IL6, IL16 a CXCL12/SDF1, naše práce poprvé ukazuje závislost exprese genů pro PGF a na signální dráze TGF β . PGF a VEGFC pravděpodobně hrají podpůrnou roli v angiogenezi a vzniku lymfatických cév. Placentální růstový faktor PGF (známý též jako PlGF), je růstový faktor blízce příbuzný VEGFA, jehož působení vede k účinnému vzniku cév. Bylo prokázáno na PGF $^{-/-}$ myši, že PGF hraje zásadní roli v angiogenezi ve zraněné tkáni (Carmeliet et al, 2001) a tedy obecně v hojení ran. Důležitou a nedávno popsanou roli v hojení ran savců mají i produkty genů SDC1 a POSTN (Maeda et al, 2004;

Zhou et al, 2010), regulovaných také signální dráhou TGF β . Dalším shodně regulovaným genem, jehož produkt (pleiotrophin) se podílí na mezibuněčné komunikaci v prostředí hojící se rány je PTN (Fang et al, 1992). Exprese genu WNT5B, kódujícího ligand aktivující nekanonickou signální dráhu wnt, je zvýšena také v primárních lidských plicních fibroblastech aktivovaných TGF β 1 (Baarsma et al, 2011). Inhibice signální dráhy TGF β ovlivnila v buňkách CEDM i další regulátory signální dráhy wnt, konkrétně DKK3 (snížená exprese), FZD4 a WNT2B (zvýšená hladina u obou). Exprese genu HHIP, jehož proteinový produkt (hedgehog interacting protein 1) negativně reguluje signální dráhu hedgehog, byla snížena. O tomto membránově vázaném regulátoru je známo, že jeho exprese je aktivována i samotnou signální dráhou hedgehog (Chuang et al, 2003). Mezi geny, jejichž exprese byla působením MPPN snížena patří i geny kódující regulátory signální dráhy TGF β , konkrétně ITGB3, ITGB5 a LTBP1. Ligand TGF β je normálně secernován v neaktivní formě, v komplexu s peptidem TGF β -LAP (z anglického „TGF β - latency associated peptide“). Podle dnešních představ dochází k uvolnění ligandu z neaktivního komplexu silami, které vznikají současnou interakcí TGF β -LAP s LTBP1 ukotveného v ECM na straně jedné a interakcí (vazbou) integriny α V β 3, α V β 5, α V β 6 nebo α V β 8 na povrchu buňky na straně druhé (Sheppard, 2005). Tyto výsledky dokládají, že v buňkách CEDM funguje pozitivní zpětná vazba mezi ligandy a molekulárnímašinerií, která je aktivuje. Námi získaná data také ukazují na negativní zpětné vazby působící na signální dráhu TGF β . Gen SMURF2 kóduje E3 ubikvitin ligázu, která specifickou vazbou peptidu ubikvitinu na protein SMAD2 určuje SMAD2 k degradaci v proteozomu (Lin et al, 2000). Pokles exprese SMURF2 v buňkách CEDM po inhibici signální dráhy TGF β ukazuje na jeho pozitivní regulaci signální dráhou TGF β a tento pokles je s nejvyšší pravděpodobností také zodpovědný za zvýšené hladiny proteinu SMAD2 v buňkách opůsobených MPPN (obr. 9b). Opačný efekt, tedy zvýšení exprese SMURF2 při aktivaci signální dráhy TGF β je asi zodpovědný za snížení hladin proteinu SMAD2 v buňkách DF1 se silnou exogenní expresí TGF β 3, které byly použity jako kontroly v níže popsaném experimentu (obr. 9b a 10). Signalizace cyklickým adenosinmonofosfátem (cAMP) hraje roli také v diferenciaci a funkci myofibroblastů (Swaney et al, 2005). Hladiny exprese čtyř genů (ADCY2, HTR4, PDE4B a PDE4D) úzce spjatých se signalizací přes cAMP byly působením MPPN na buňky CEDM sníženy a hladiny dvou zvýšeny (PDE1A a PKIG). Vzhledem k faktu, že jak exprese negativních, tak exprese pozitivních regulátorů syntézy a hydrolýzy cAMP byly ovlivněny působením MPPN, signalizace přes dráhu TGF β má pravděpodobně vliv na regulaci hladiny této důležité signální molekuly (cAMP) v myofibroblastech. Je také pravděpodobné, že změny



Obr. 8 Profily genové exprese buněk CEDM kultivovaných s MPPN. Zobrazeny jsou skupiny vybraných genů, utříděné podle biologické funkce jejich proteinových produktů: **(a)** produkce ECM. **(b)** růstové faktory a jiné secernované ligandy. **(c)** geny spojené se signalizací dráhou TGF- β . **(d)** geny spojené se signalizací řízenou cAMP. **(e a g)** transkripční faktory. **(f a h)** ostatní geny. Do skupin **a – f** patří geny, jejichž exprese byla působením MPPN snížena. Do skupin **g – h** patří geny, jejichž exprese byla působením MPPN zvýšena. Čísla v závorkách udávají průměrnou hodnotu násobků změn exprese v lineární škále. Barvy představují hladiny genové exprese detekovaných jako signály při mikročipové analýze (převedených do log2 škály).

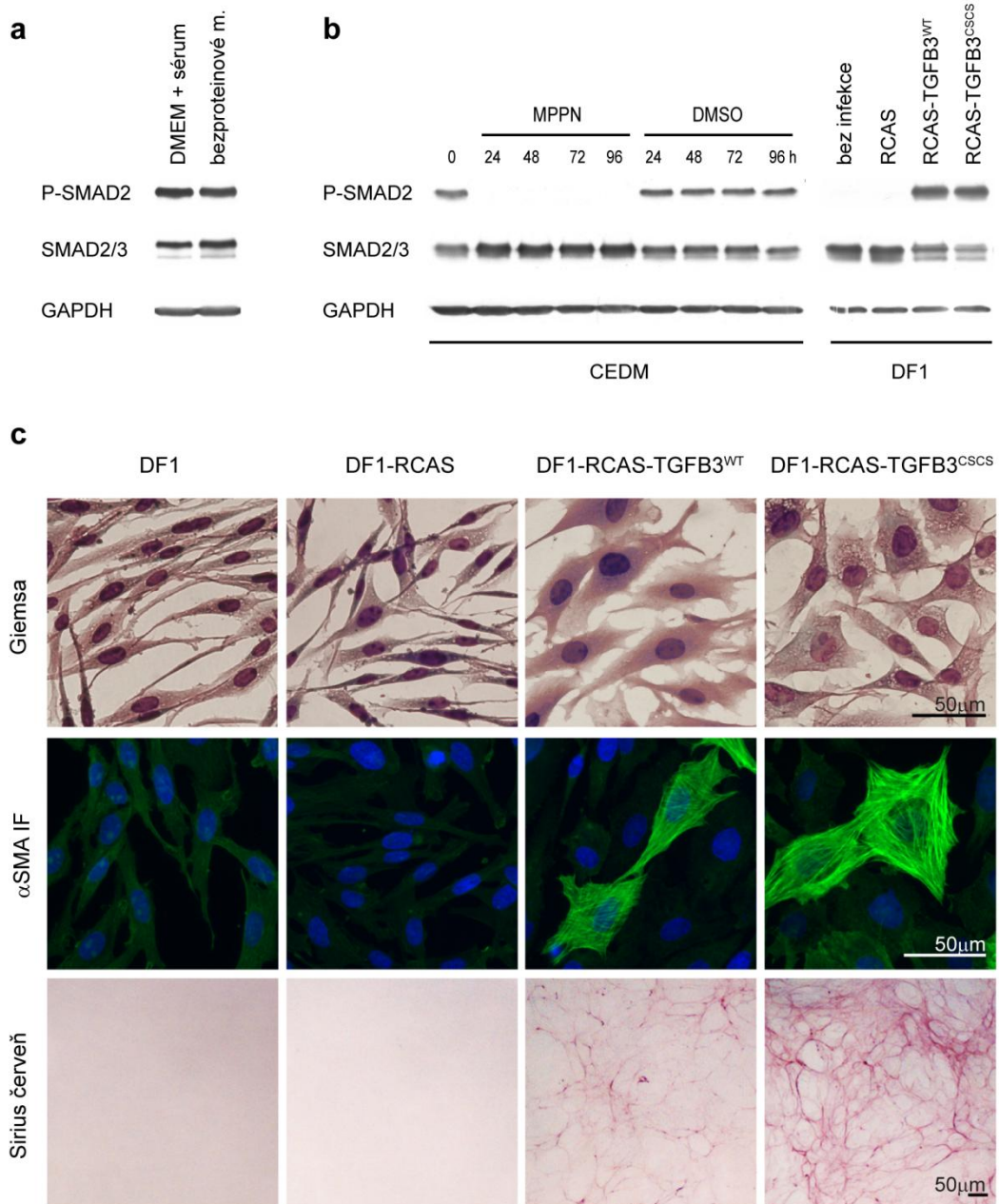
exprese některých genů (pozorovaných po působení MPPN) nebyly přímým efektem inhibitoru, ale důsledkem regulací zpětných vazeb souvisejících se signalizací přes cAMP. Do skupiny genů, jejichž exprese byla snížena působením MPPN na buňky CEDM patří i více než dvacet genů kódujících transkripční faktory. Mezi nimi nejcitlivěji reagoval gen NR4A3, jehož exprese je pod přímou kontrolou signální dráhy MAPK (Darragh et al, 2005). Více než sedmkrát byla snížena hladina exprese genu MYOCD, který kóduje protein myokardin. Myokardin je dobře známým a důležitým regulátorem transkripce genů specifických pro buňky srdce, hladké svalstvo a myofibroblasty (Wang & Olson, 2004). Myokardinem regulované geny kódují celou řadu aktinových izoform a proteinů vážících aktin. Tento výrazný pokles v hladině exprese MYOCD je však pouze přechodný (viz. obr. 13a) a poněkud překvapivě není dostatečný k tomu, aby významně poklesly hladiny exprese známých, myokardinem regulovaných genů jako jsou ACTA2 (kódující α SMA), CNN1 (kódující kalponin 1) nebo TAGLN (kódující transgelin) a to ani po dvou týdenní kultivaci buněk CEDM s MPPN (viz. níže). Redundantní role myokardinu příbuzných proteinů MKL1 a MKL2 pravděpodobně dokáží kompenzovat pokles hladiny myokardinu v buňkách CEDM po inhibici signální dráhy TGF β . Po působení MPPN poklesly i hladiny genů, kódujících transkripční faktory CREB3L1 a CREB3L2, které řídí expresi mnoha součástí sekreční dráhy (Fox et al, 2010). Dva geny (SCG2 a SEC14L1) kódující právě komponenty sekreční dráhy patří také do skupiny genů, jejichž hladina byla snížena MPPN. Do skupiny genů se sníženou hladinou exprese po inhibici signální dráhy TGF β v buňkách CEDM patří i celá řada dosud necharakterizovaných genů. Mezi takové geny patří například FAM180A (též dříve označovaný jako HWKM1940), který by měl podle odhadů kódovat malý protein dosud neznámé funkce. My jsme sekvenováním zjistili sekvenci cDNA celé délky, uložili ji do databáze (GenBank: JN032743) a zjistili, že má poměrně vysokou podobnost (67% identita) s lidským ortologem. Výše uvedená data podporují naši hypotézu, že signalizace TGF β obecně podporuje sekreční funkci myofibroblastů.

Hladina exprese asi poloviny genů, jejichž exprese byla v buňkách CEDM ovlivněna inhibicí kinázové aktivity TGFBR1, byla zvýšena (obr. 8g, h). Do takové skupiny patří geny (KRT19, CFI, GATA6, RARRES1, TRPC4 a TGM2), jejichž transkripční vzorec jako celek tvoří nedávno popsáný transkripční vzorec typický pro mezenchymové kmenové buňky (Kubo et al, 2009). Také exprese genů (APOA1, EGFL6, LPL, LHX8, MEOX2, ZNF423, EBF3) souvisejících s adipogenezí byla v buňkách CEDM aktivována přítomností MPPN, ale ani po dvou týdnech inkubace s MPPN buňky CEDM nevykazovaly rysy typické pro diferenciaci adipocytů a zachovávaly si charakter myofibroblastů (viz. níže) (Lowe et al, 2011; Oberauer et al, 2010; Timmons et al, 2007). Tato data asi nejlépe vysvětluje představa, že se buňky CEDM

po inhibici signální dráhy TGF β dostávají do stavu mezenchymové diferenciacní plasticity, který ovšem za daných podmínek *in vitro* nevede ke změně fenotypu. Mezi zajímavé geny, jejichž hladina byla po působení MPPN na buňky CEDM zvýšena, patří gen NPR3, AGTR2 a MTUS1. Gen NPR3 kóduje jeden ze tří receptorů pro tzv. natriuretic peptide. Zajímavé je, že natriuretic peptide typu „b“ působí jako antifibrotický faktor v srdci (Kapoun et al, 2004). Gen AGTR2 kóduje receptor AT2 pro angiotenzin II, který při hojení ran působí proti profibrotické aktivitě receptoru AT1 a inhibuje aktivitu signální dráhy TGF β - ERK (Habashi et al, 2011; Takeda et al, 2004). V této inhibici hraje úlohu i proteinový produkt genu MTUS1, který fyzicky reaguje s AT2 (Nouet et al, 2004). Naše data tedy ukazují dosud nepopsanou společnou regulaci AGTR2 a MTUS1. Zvýšená exprese po působení MPPN je i u některých genů, které kódují secernované proteiny. Například o secernovaných produktech genů SOD3 a NOV bylo publikováno, že hrají antagonistickou roli při diferenciaci myofibroblastů a stejnou roli lze očekávat i o dalších (kódované VTN, SEPP1) (Gao et al, 2008; Riser et al, 2009; Sampson et al, 2011).

4.1.3 Ověření dat z mikročipové analýzy genů regulovaných signální dráhou TGF β v buňkách CEDM

Abychom potvrdili a ještě rozšířili výsledky mikročipového profilování exprese, analyzovali jsme genovou expresi pomocí PCR a hladiny vybraných proteinů pomocí WB. Také nás zajímalo, zda exprese genů, snížené inhibicí signální dráhy TGF β v myofibroblastech, budou aktivovány ve fibroblastech se stimulovanou signalizací TGF β . K tomuto účelu jsme použili kuřecí buňky netransformované, ale imortalizované linie DF1 (Himly et al, 1998), které nemají rysy fenotypu myofibroblastů (obr. 7). Buňky DF1 po infekci virovým vektorem, který nese cDNA genu kódujícího TGF- β 3, prošly nápadnými fenotypickými změnami, začaly produkovat ECM bohatou na kolageny a v některých buňkách došlo k tvorbě vláken α SMA (obr. 9c). Pro aktivaci signální dráhy TGF β ve fibroblastech DF1 jsme použili TGF- β 3 místo běžně používaného TGF- β 1 hned z několika důvodů. Za prvé, TGF- β 3 je nejsilněji exprimovanou izoformou v buňkách CEDM (obr. 11c). Za druhé, exprese TGF- β 3 je na rozdíl od exprese TGF- β 1 v buňkách CEDM regulována pozitivní zpětnou vazbou a je citlivá na inhibici MPPN (obr. 11c). Tato fakta naznačují, že právě exprese TGF- β 3 je spojená s fenotypem myofibroblastů. Za třetí, v době, kdy jsme prováděli naše experimenty, byla známa jenom část sekvence kuřecí mRNA pro TGF- β 1. Později jsme tuto sekvenci určili v celé délce

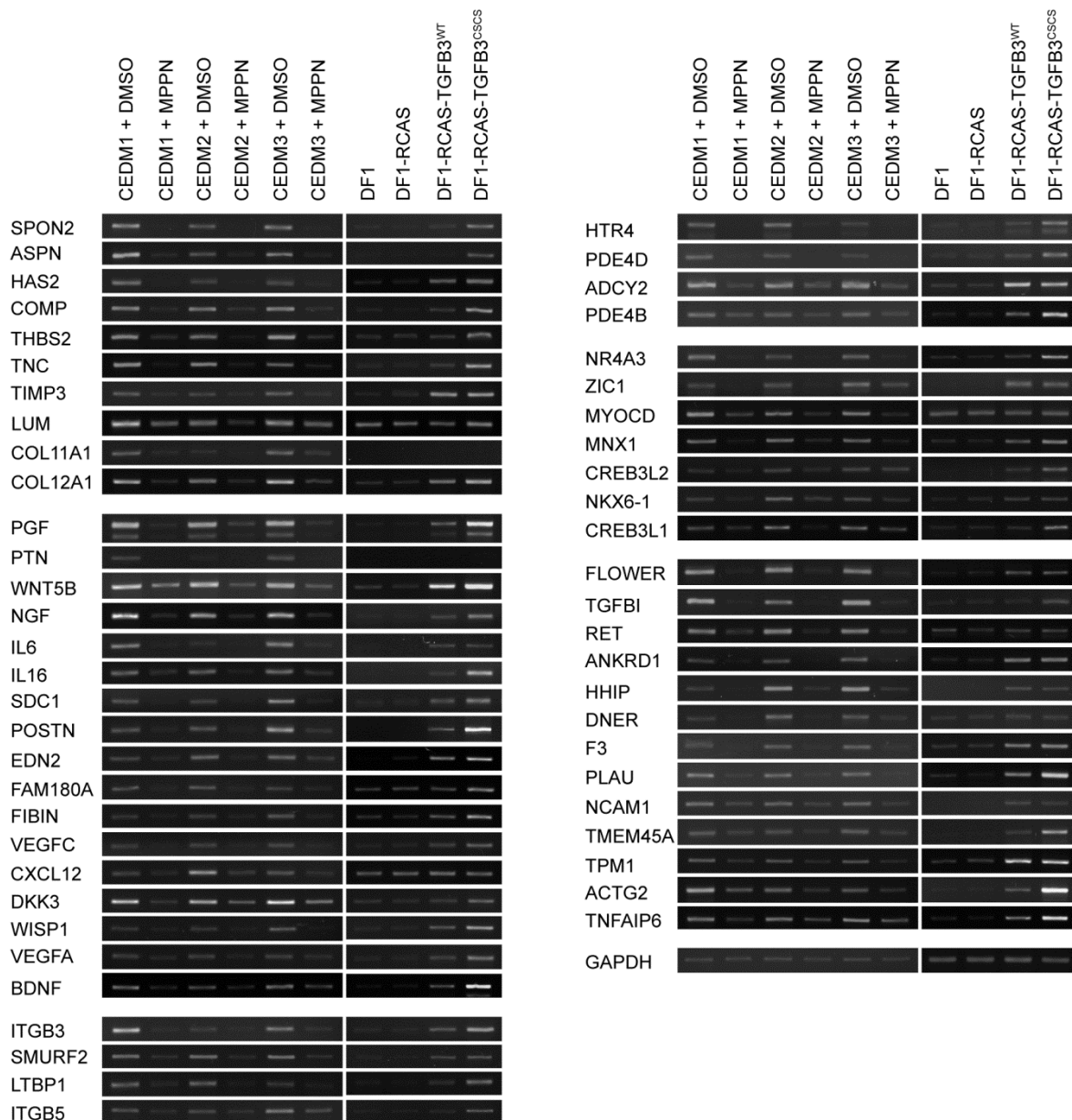


Obr. 9 Stabilní autokrinní stimulace TGF- β 3 vyvolává v buňkách DF1 částečnou diferenciaci v myofibroblasty. **(a)** Imunochemická detekce fosforylovaných proteinů SMAD2 v buňkách DF1 odhaluje silnou aktivaci signalizace dráhou TGF- β po transdukcii buněk retrovirovými vektory nesoucími cDNA genu kódujícího TGF- β 3. Celkové hladiny proteinů SMAD2 a SMAD3 ukazují na destabilizující efekt silné stimulace dráhy TGF- β , uskutečněný pravděpodobně zpětnou vazbou. Detekce proteinů GAPDH byla použita jako kontrola rovnoměrné nanášky proteinů. Hladiny stejných proteinů byly analyzovány také u buněk CEDM, které byly inkubovány s inhibitorem MPPN po uvedené dobu (v hodinách). Tímto způsobem byl ověřen inhibiční účinek MPPN na signalizaci dráhou TGF- β . **(b)** Charakteristické rysy myofibroblastů byly v buňkách DF1 analyzovány imunofluorescenční detekcí vláken α SMA a barvením kolagenů v ECM barvivem Sirius červeně.

a zveřejnili (GeneBank: JQ423909). Srovnání změn v expresi vybraných genů buněk CEDM kultivovaných s MPPN a buněk DF1 se stále secernovaným TGF- β 3 by mělo vyloučit možnost, že pozorované změny v expresi nejsou způsobené specifickou inhibicí signální dráhy TGF β a že by se tedy mohlo jednat o vedlejší účinky chemické látky MPPN. Pro srovnání jsme použili dvě verze TGF- β 3. První verze je divoký typ „wild type“ (TGF β 3^{w^t}) a druhá verze je konstitutivně aktivní (TGF β 3^{CSCS}). Konstitutivně aktivní verze obsahuje dvě mutace (obě mění Cys na Ser), které znemožňují dimerizaci latentního peptidu a tvorbu latentního a biologicky neaktivního komplexu (Brunner et al, 1989). Data získaná pomocí PCR ukazují (obr. 10), že exprese velkého množství genů, snížených účinkem MPPN v buňkách CEDM, byla ve fibroblastech DF1 v důsledku stimulace TGF- β 3 aktivována. Tímto byla potvrzena účinnost a specifická inhibice MPPN a prokázána relevance identifikovaných genů. V dalším kroku byly pomocí semikvantitativní RT-PCR analyzovány exprese vybraných genů, jejichž hladiny byly účinkem MPPN zvýšeny (obr. 11a). Byly tím potvrzeny výsledky mikročipové analýzy. Abychom získali také kvantitativní data o expresi vybraných genů ovlivněných působením MPPN a TGF- β 3, byla provedena analýza pomocí qPCR (tab. 2). Nakonec byla provedena imunochemická (WB) analýza vybraných proteinů, které odpovídají odlišně (sníženě i zvýšeně) exprimovaným genům, identifikovaným při mikročipové analýze. Výběr detekovaných proteinů byl určen především dostupností protilátek interagujících s kuřecími proteiny. Výsledky WB potvrdily výsledky získané mikročipovou analýzou i PCR (obr. 11b).

4.1.4 Dlouhodobý účinek inhibice signální dráhy TGF β v buňkách CEDM

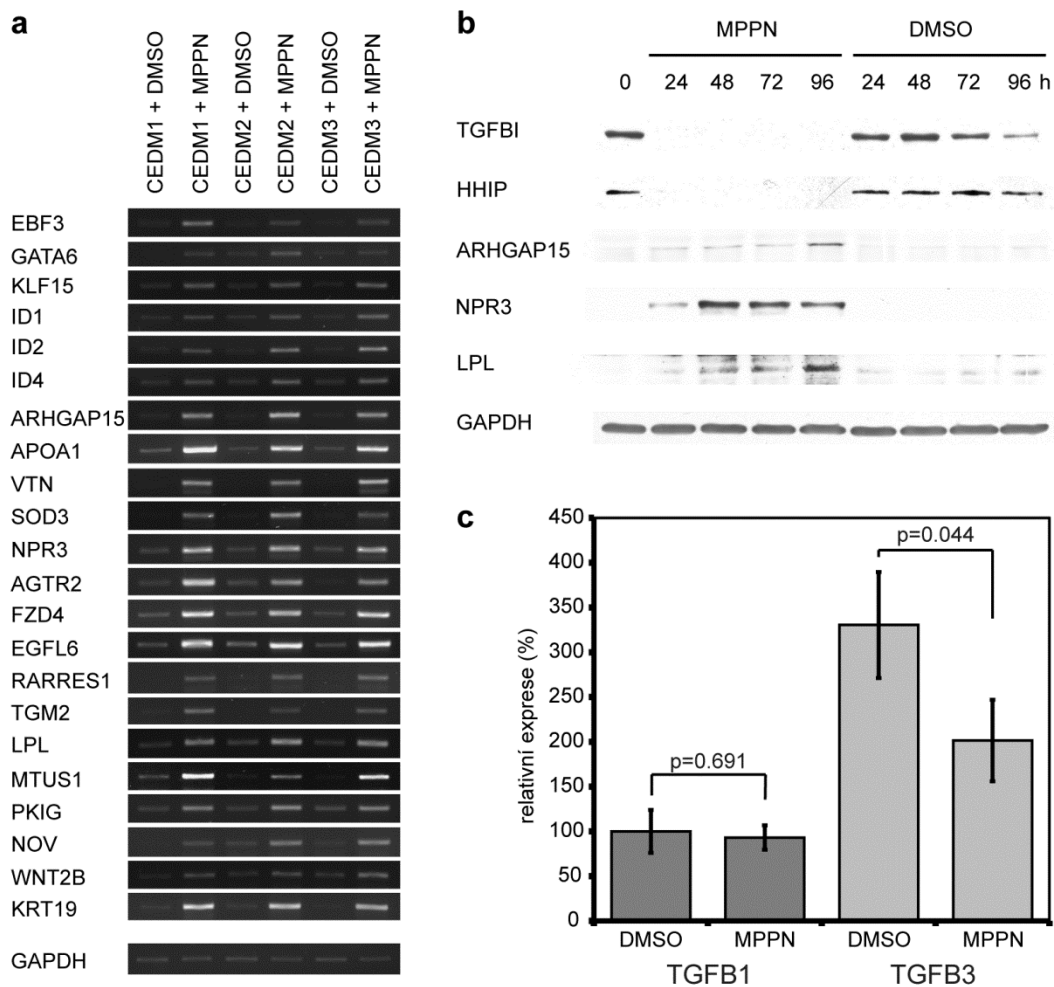
Inhibice signální dráhy TGF β se v poslední době dostává značné pozornosti, protože by se mohla stát možnou léčbou fibrotických onemocnění (Gharaee-Kermani et al, 2009). Proto nás zajímalo, zda dlouhodobá inhibice signální dráhy TGF β inhibitorem MPPN povede k dediferenciaci buněk CEDM na fibroblasty. Překvapivě ani po dvou týdnech kultivace buněk CEDM s MPPN nedošlo u CEDM ke ztrátě všech rysů myofibroblastů. Po týdnu kultivace buněk CEDM s MPPN došlo k jejich protažení a morfologicky začaly připomínat fibroblasty (např. DF1), ale při delší kultivaci s MPPN se již neměnily (obr. 12). Takové morfologicky změněné buňky produkovaly sice méně ECM, ale stále ji produkovaly a účinek MPPN na tvorbu vláken α SMA byl také jen částečný (obr. 12). Vlákna α SMA detekovaná fluorescenční mikroskopií byla tenčí a méně výrazná, přesto stále přítomná. Analýza pomocí PCR a WB odhalila snížení exprese genů kódujících některé složky ECM, růstové faktory a proteiny spjaté



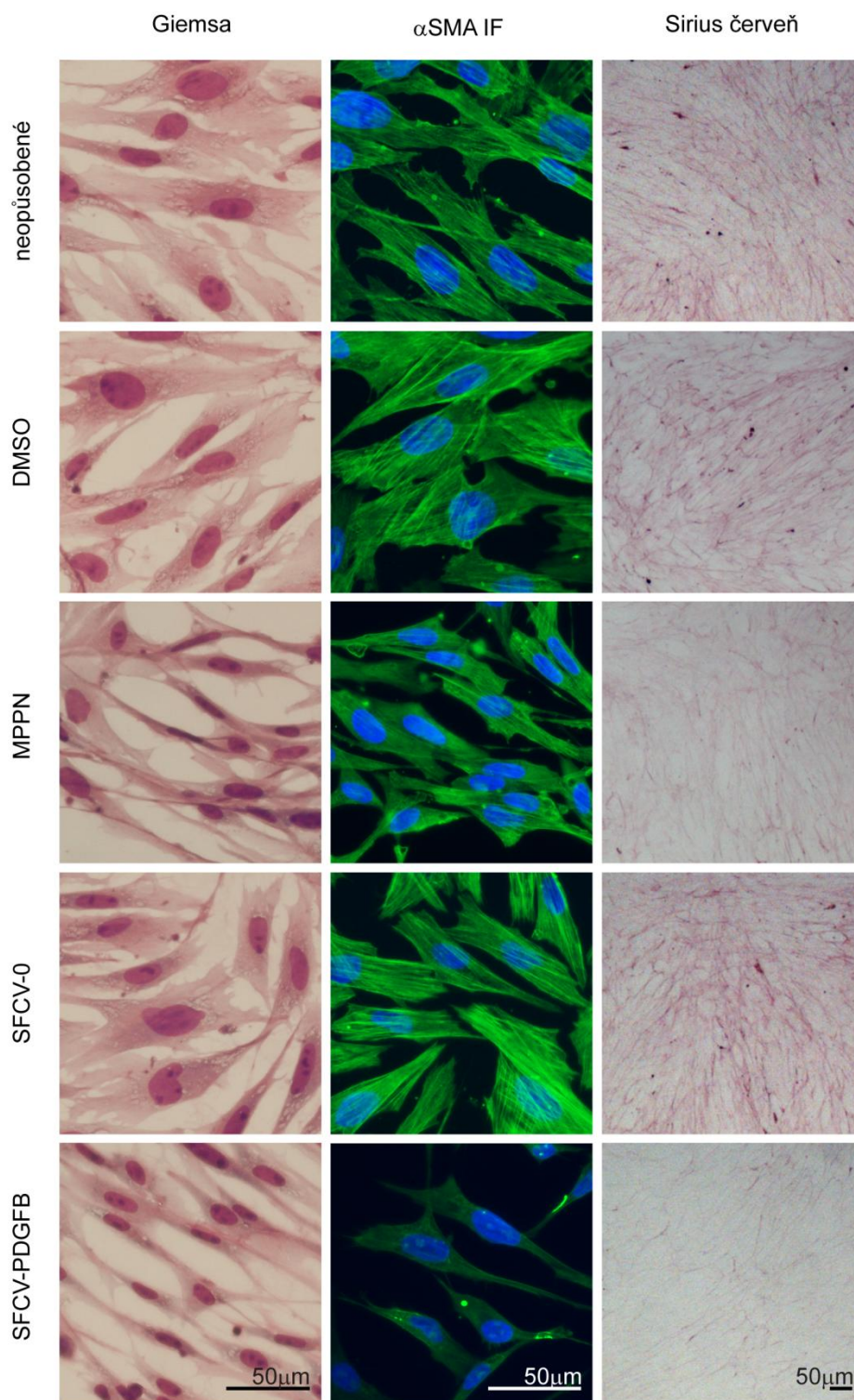
Obr. 10 Ověření změn genové exprese detekovaných na mikročipu v buňkách CEDM po inkubaci s MPPN pomocí semikvantitativní PCR. Účinek inhibitoru MPPN na buňky CEDM je pro porovnání ukázán spolu s účinkem trvalé signalizace dráhou TGF- β v buňkách DF1. Jako kontrola byl použit gen GAPDH.

gen	CEDM, MPPN vs. DMSO			DF1, RCAS-TGFB3 ^{cscs} vs. RCAS		
	násob. Δ expr.	geom. SD	hodnota p	násob. Δ expr.	geom. SD	hodnota p
HAS2	-6,5	1,5	0,0119	7,9	1,1	0,0001
COMP	-4,6	1,4	0,0002	9,7	1,1	0,0001
TIMP3	-3,3	1,2	0,0042	6,5	1,1	0,0000
NGF	-6,4	1,1	0,0025	19,2	1,2	0,0003
IL6	-5,8	1,4	0,0046	>100	n. p.	n. p.
VEGFC	-3,0	1,1	0,0002	14,2	1,2	0,0004
SDC1	-6,7	1,1	<0.0001	6,2	1,1	0,0003
ITGB3	-4,3	1,6	0,0514	29,7	1,1	0,0003
SMURF2	-4,0	1,1	<0.0001	16,4	1,1	0,0001
ADCY2	-4,5	1,3	0,0006	27,4	1,1	0,0002
ZIC1	-9,8	1,5	0,0001	>100	n. p.	n. p.
CREB3L2	-1,6	1,1	0,0008	4,5	1,1	0,0001
HHIP	-15,0	2,2	0,0413	>100	n.p.	n.p.
TPM1	-2,3	1,2	0,0001	22,0	1,1	0,0003
NPR3	21,9	1,6	0,0038	n. p.	n. p.	n. p.
AGTR2	11,0	1,6	0,0370	n. p.	n. p.	n. p.
MTUS1	4,2	1,2	0,0001	n. p.	n. p.	n. p.
NOV	8,5	1,2	0,0249	n. p.	n. p.	n. p.

Tab. 2 Ověření změn genové exprese detekovaných na mikročipu v buňkách CEDM po inkubaci s MPPN pomocí qPCR. Srovnání exprese vybraných genů ve vzorcích z buněk inkubovaných 48hodin s MPPN a buněk DF1 s trvale aktivovanou signalizací dráhou TGF-β. V případě genů IL6, ZIC1 a HHIP jsme nebyli schopni detekovat expresi u kontrolního vzorku z buněk DF1 s prázdným vektorem RCAS a proto byla změna exprese vyjádřena jako více než stonásobná (>100). Statistická analýza v takových případech nemohla být provedena. Většina genů, jejichž exprese byla zvýšena působením inhibitoru MPPN na buňky CEDM, nebyla v buňkách DF1 významně exprimována. Zkratky: násob. Δ expr. - násobek změny exprese, Geom. SD – geometrická standartní odchylka, n.a. – neaplikovatelné, n.p. - neproveditelné



Obr. 11 Ověření změn genové exprese získaných analýzou mikročipů v buňkách CEDM po inkubaci s MPPN na úrovni RNA a proteinů. **(a)** Exprese genů, jejichž exprese byla působením MPPN zvýšena byla analyzována semikvantitativně pomocí RT-PCR. **(b)** Účinek inkubace buněk CEDM s inhibitorem MPPN po uvedené době (v hodinách) na hladinu vybraných proteinů byl analyzován imunochemicky. Detekce proteinů GAPDH byla použita jako kontrola rovnoměrné nanášky proteinů. **(c)** Hladiny mRNA genů kódujících TGF- β 1 a TGF- β 3 byly u buněk inkubovaných s MPPN analyzovány pomocí qPCR. Hodnoty byly normalizovány tak, že hladina exprese mRNA pro TGF- β 1 v buňkách CEDM inkubovaných pouze s rozpouštědlem DMSO představuje 100%. Chybové úsečky vyznačují kombinované standardní odchylky (technické i biologické).

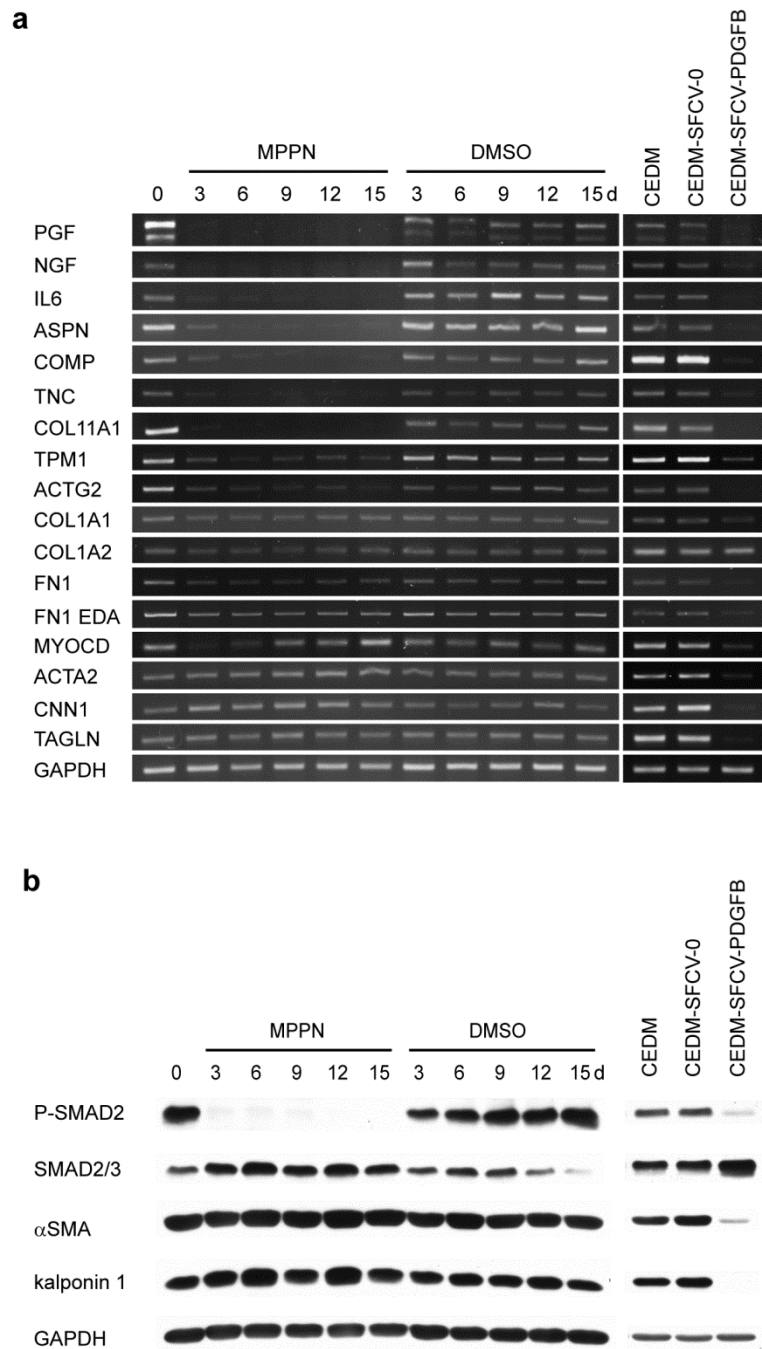


Obr. 12 Vzhled a charakteristika fenotypu buněk CEDM inkubovaných s MPPN po dva týdny nebo trvale exprimujících PDGFB. Buněčná morfologie byla zvládněna Giemsovým barvením. Charakteristické rysy myofibroblastů byly analyzovány imunofluorescenční detekcí vláken α SMA a barvením kolagenů v ECM barvivem Sirius červeň.

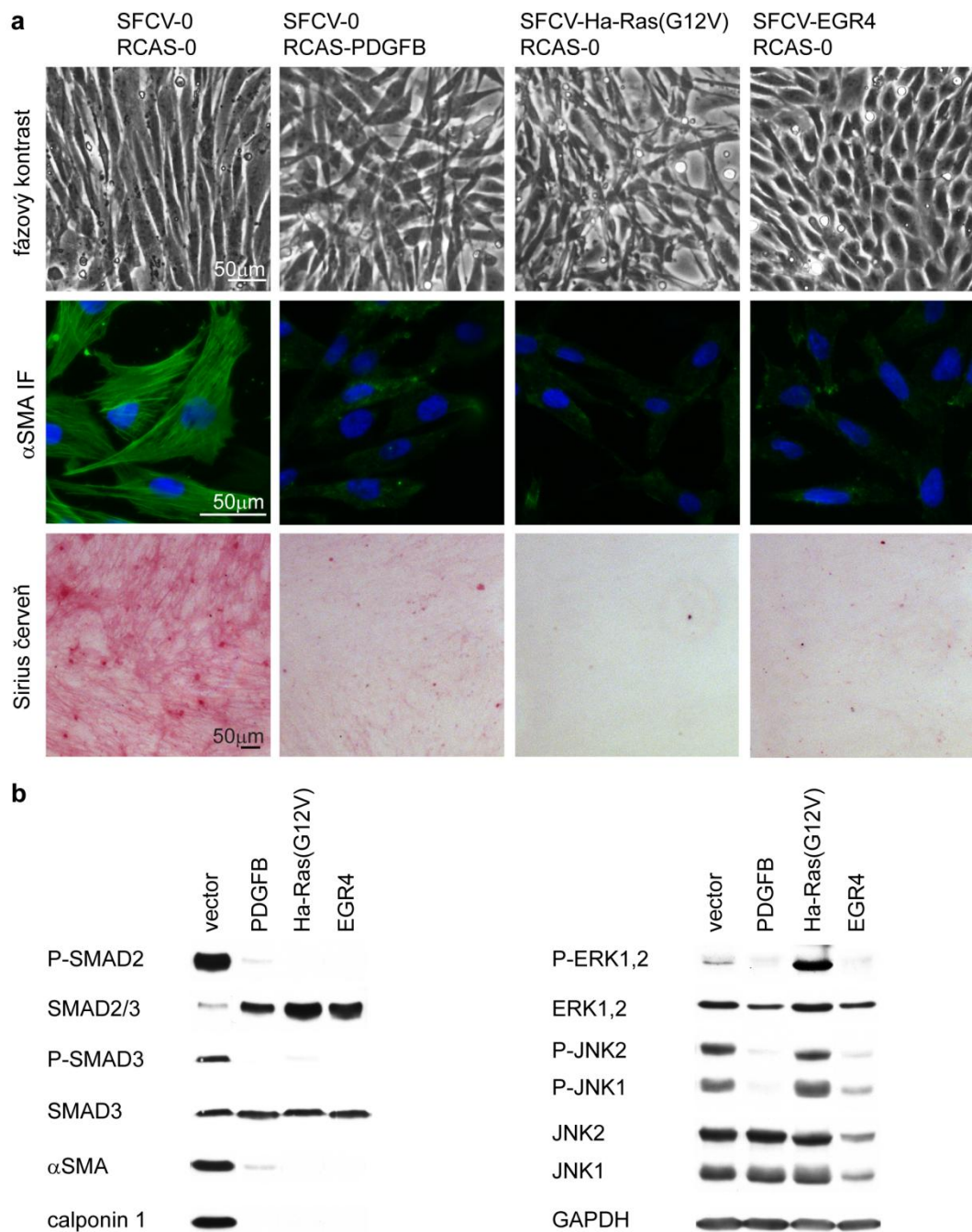
s cytoskeletem (ACTG2 a TPM1). Ke změně exprese genů (ACTA2, CNN1 a TAGLN) kódujících proteiny zodpovědné za vznik a kontraktilitu vláken α SMA v podstatě nedošlo (obr. 13). Také exprese genů kódujících některé podstatné složky ECM (kolagen typu I a fibronektin) zůstaly dlouhodobou inkubací buněk CEDM s MPPN nezměněny. Zatímco inhibice signalizace dráhy TGF β chemickým inhibitorem MPPN nezpůsobila v našem experimentálním uspořádání u buněk CEDM účinnou ztrátu fenotypu myofibroblastů, mnohem lepší dediferenciace buněk CEDM bylo dosaženo stálou stimulací těchto buněk ligandem PDGF-BB (dále označováno už jen jako PDGFB). Ligand PDGFB byl exprimován z integrovaného retrovirového vektoru a stimulace tímto ligandem vedla, kromě ztráty sekrece ECM, také ke ztrátě tvorby vláken α SMA a změnám v expresi genů odrážejících tyto ztráty (obr. 12 a 13). Zajímavé a nijak překvapivé je, že molekulární mechanismy vedoucí ke ztrátě fenotypu myofibroblastů stimulací ligandem PDGFB v našem uspořádání v sobě zahrnují i inhibici signalizace dráhou TGF β , jak vyplývá z fosforylace proteinu SMAD2 (obr. 13). Přestože naše experimentální podmínky vyvolávající stimulaci ligandem PDGFB jsou arteficiální a aplikace velmi vysoké hladiny PDGFB na fibrotickou tkáň by vedla k mnoha vedlejším efektům, naše výsledky ukazují, že fenotyp myofibroblastů může být zcela odstraněn. Takové zjištění je důležité z terapeutického hlediska.

4.1.5 Trvalá exprese PDGFB, Ha-Ras(G12V) nebo EGR4 v buňkách CEDM vyvolává morfologické změny, sníženou schopnost produkovat ECM a ztrátu vláken α SMA

V předchozích pokusech jsme ukázali, že trvalá exprese PDGFB z integrovaného retrovirového vektoru vedla, na rozdíl od trvalé inhibice signální dráhy TGF- β , v buňkách CEDM ke kompletní dediferenciaci (obr. 13 a 14). Abychom poodhalili molekulární mechanismy stojící za úspěšnou dediferenciací myofibroblastů, studovali jsme několik dalších proteinů, které by měly být regulovány PDGFB a obecně signální dráhou MAPK (PDGFB ji aktivuje). Zjistili jsme, že stabilní exprese genů kódujících aktivovanou formu signálního proteinu Ha-Ras a transkripční faktor EGR4 v buňkách CEDM také indukují dediferenciaci (obr. 14). Jak je patrné z obrázku 14, stabilní exprese genů PDGFB, HRAS(G12V) a EGR4 vyvolávala v buňkách CEDM morfologické změny specifické pro každý gen (obr. 14a, horní řada), ztrátu zjevných vláken α SMA (obr. 14a, střední řada) a silně redukovala množství ECM bohaté na kolageny, ukládané na dno kultivační misky (obr. 14a, spodní řada). Imunochemická analýza vybraných proteinů odhalila ztrátu fosforylace proteinu SMAD2 a



Obr. 13 Změny hladin RNA a proteinů v buňkách CEDM vyvolané dlouhodobým působením MPPN nebo trvalou expresí PDGFB. **(a)** Expres vybraných genu byla analyzována pomocí RT-PCR. Zatímco působení jak MPPN tak PDGFB vyvolávalo snížení exprese růstových faktorů, několika genů spojených s produkcí ECM a genů ACTG2 a TPM1 spojených s cytoskeletem, pouze stabilní exprese PDGFB byla schopná snížit expresi COL1A1, FN1, ACTA2, CNN1 a TAGLN. **(b)** Imunochemická analýza proteinů αSMA a kalponinu 1 potvrdila změny pozorované na úrovni RNA. Detekce fosforylovaných proteinů SMAD2 u buněk silně stimulovaných PDGFB ukázala výrazný inhibiční účinek této stimulace na signalizaci dráhou TGF-β. Detekce proteinů GAPDH byla použita jako kontrola rovnoměrné nanášky proteinů. Čas působení inhibitoru je uveden ve dnech.

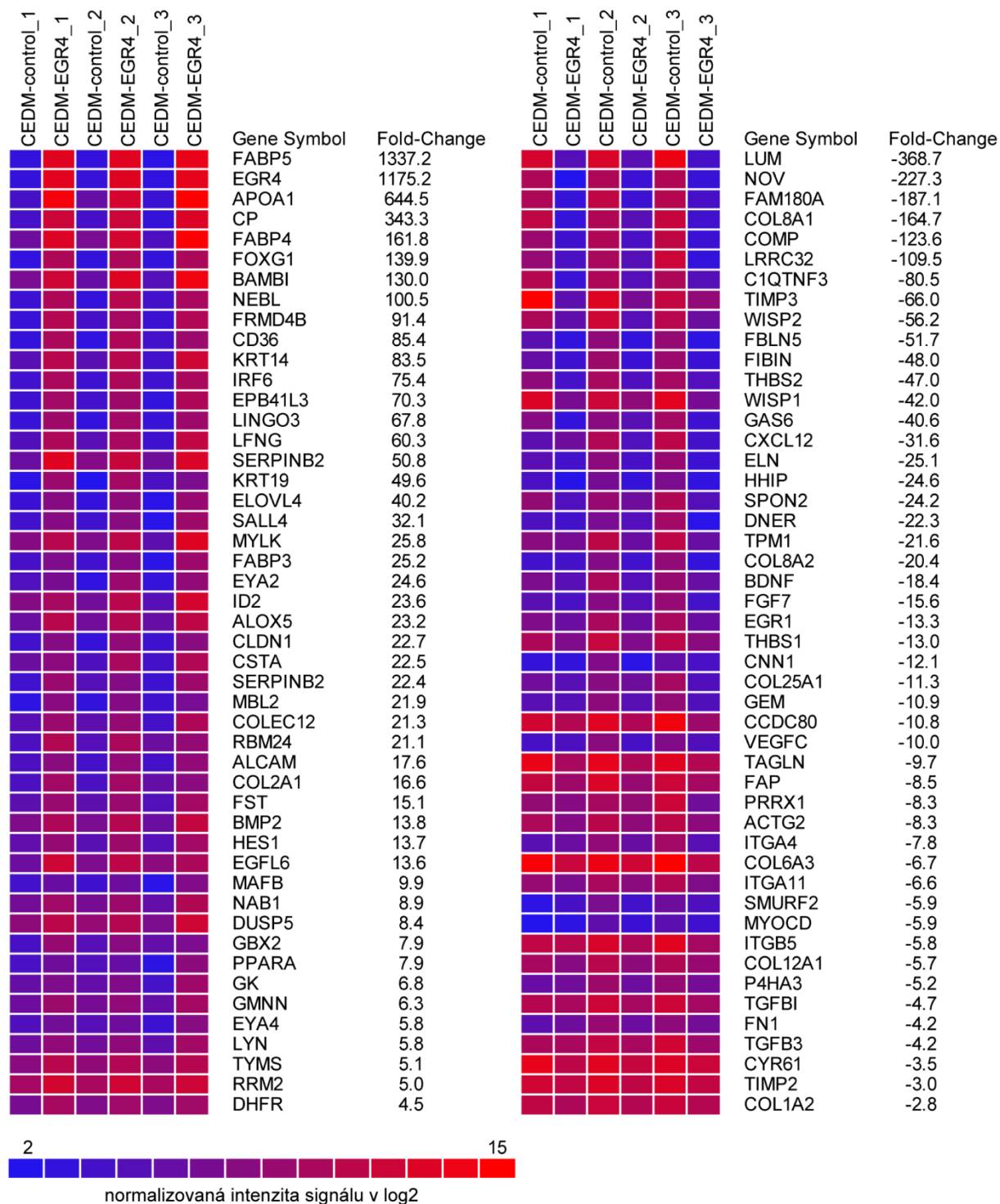


Obr. 14 Trvalá exprese PDGFB, Ha-Ras(G12V) nebo EGR4 potlačuje fenotyp myofibroblastů buněk CEDM. (a) Buněčná morfologie byla kontrolována ve fázovém kontrastu. Charakteristické rysy myofibroblastů byly analyzovány imunofluorescenční detekcí vláken α SMA a barvením kolagenů v ECM barvivem Sirius červeně. **(b)** Imunodetekce proteinů odhalila snížení fosforylace proteinů SMAD2 (ukazující na ztrátu autokrinní signalizace dráhou TGF- β) a snížení hladin proteinů α SMA a kalponin 1. Všechny trvale exprimované geny ovlivňovaly aktivity signálních drah ERK a JNK, ale s různými způsoby.

SMAD3, což vypovídá o ztrátě autokrinní signalizace dráhou TGF- β . Dále došlo k výraznému snížení hladin proteinů α SMA a kalponin 1, což ukazuje a potvrzuje ztrátu kontraktálního aparátu vláken α SMA.

4.1.6 Mikročipová analýza buněk CEDM s trvale exprimovaným EGR4 odhalila sníženou expresi genů kódujících komponenty ECM, proteiny spojené s aktinovou kontrakcí a známé negativní regulátory signalizace dráhou TGF β

V naší práci jsme se dále zaměřili na EGR4, protože PDGFB (neboli c-sis) i Ha-Ras jsou známé onkogeny a povaha jejich dediferenčních schopností může být zastřena celkovým narušením buněčné signalizace, doprovázející neoplastickou transformaci. Buňky s trvale exprimovaným EGR4 nejsou podle obecně přijímaných kritérií transformované, neboť nevykazují morfologické známky transformace, zachovávají si kontaktní inhibici a netvoří fokusy v měkkém agaru (data nejsou ukázána). Pro odhalení molekulární podstaty změn, vyvolaných stabilní expresí genu EGR4 v buňkách CEDM, jsme použili analýzu genové exprese pomocí kuřecího mikročipu. Mikročipová analýza buněk s trvale exprimovaným EGR4, v porovnání s kontrolními buňkami, odhalila významné (více než dvojnásobné) snížení a zvýšení exprese stovek genů, přičemž snížení exprese trochu převažovalo (tab. EP4 v elektronické příloze této práce). Výběr z těchto genů je v obrázku 15. Extrémní (více než tisícinásobné) zvýšení exprese EGR4 je velmi nadhodnocené, protože tato metoda detekovala veškerou retrovirovou mRNA coby signál odpovídající expresi EGR4. Z celkové retrovirové mRNA jsou totiž do proteinu EGR4 překládány pouze molekulárně sestříhané mRNA. Extrémní nárůst exprese genu EGR4 je do značné míry způsoben také porovnáním s kontrolními buňkami, v nichž je exprese EGR4 téměř nedetekovatelná. Jak vyplývá z mikročipové analýzy, nejvýraznějším efektem trvalé exprese EGR4 je snížení exprese genů specifických pro myofibroblasty. Mezi geny se sníženou expresí, specifické pro myofibroblasty, patří geny kódující: strukturní (kolageny, proteoglykany, fibronectin) i regulační (např. TIMP3, THBS2) složky ECM, proteiny spojené s aktinovou kontrakcí (CNN1, TAGLN, TPM1, ACTA2) a různé secernované ligandy (NOV, CXCL12, BDNF, FGF7, VEGFC atd.). Mezi geny se zvýšenou expresí patřilo i několik genů kódující negativní regulátory signalizace dráhou TGF- β a regulátory profibrotických dráh (FOXG1, BAMBI, NAB1 a DUSP5). Transkripční faktor FOXG1 interferuje s aktivitou proteinů SMAD2/3 (Rodriguez et al, 2001). BAMBI (z anglického „BMP and activin membrane-bound inhibitor“) kóduje transmembránový protein, který má schopnost inhibovat signalizaci všech izoforem



Obr. 15 Profil genové exprese buněk CEDM exprimujících EGR4 z integrovaného retrovirového vektoru.

Vybrané geny, jejichž exprese byla snížena (levý panel) nebo zvýšena (pravý panel), demonstrují rozsáhlý dopad trvalé exprese EGR4 na expresní profil buněk CEDM. Barvy představují hladiny genové exprese, detekovaných jako signály při mikročipové analýze (převedených do log₂ škály). Uvedené hodnoty násobků změn exprese jsou průměrem tří párů vzorků.

TGF- β , aktivinu a BMP. Protein BAMBI totiž ovlivňuje svojí vnitrobuněčnou doménou komplexy receptorů pro transformující růstový faktor β (TGFBR) (Onichtchouk et al, 1999). NAB1 je známý svou schopností reprimovat transkripci závislou na transkripčním faktoru EGR1, přičemž taková transkripce je důležitou součástí fenotypu myofibroblastů (Wu et al, 2009). Gen DUSP5 (z anglického „dual specificity phosphatase 5“) kóduje fosfatázu s dvojitou specifitou, která defosforyluje kinázy MAP, se silnou preferencí pro ERK1 a ERK2 (Mandl et al, 2005). Právě signalizace dráhou MAPK hraje zásadní úlohu v regulační síti řízenou signalizací TGF- β (Reimann et al, 1997). Výsledky mikročipové analýzy jsme na vybraných genech ověřili pomocí qPCR (tab. 3). Při ověření qPCR byly použity stejné vzorky jako pro mikročipovou analýzu. Pomocí qPCR jsme analyzovali také expresi genů NAB2 a COL1A1, jejichž p-s nebyly přítomné na použitém kuřecím mikročipu. Jak se ukázalo, exprese obou genů byla trvalou expresí EGR4 významně ovlivněna. Abychom zjistili závislost exprese ověřovaných genů na aktivitě signální dráhy řízené TGF- β , zahrnuli jsme do analýzy pomocí qPCR i vzorky buněk CEDM inkubovaných s MPPN. Exprese genů kódujících lumikan (LUM), tzv. cartilage oligomeric matrix protein (COMP), tkáňový inhibitor metaloproteináz 3 (TIMP3), thrombospondin 2 (THBS2), tzv. stromal cell-derived factor 1 (CXCL12), thrombospondin 1 (THBS1), kolagen typu VI, alfa 3 (COL6A3), E3 ubikvitin ligázu 2 specifickou pro proteiny SMAD (SMURF2), myokardin (MYOCD) a TGF- β 3 (TGFB3) významně a obdobně reagovaly jak na trvalou expresi EGR4, tak na inhibici signální dráhy TGF- β 3 v buňkách CEDM (tab. 3). Působení trvalé exprese EGR4 bylo u několika vybraných genů (TGFBI, HHIP, CNN1, ACTA2 a EGR1) ověřeno imunochemicky (WB) i na úrovni proteinů (obr. 17a).

4.1.7 V buňkách CEDM s trvalou expresí EGR4 dochází k silné inhibici signální dráhy TGF- β

Signalizace TGF- β hraje dominantní roli v diferenciaci myofibroblastů a sekreci ECM, jak už bylo zmíněno dříve a je dobře experimentálně doloženo. Protože trvalá exprese EGR4 v buňkách CEDM aktivovala expresi několika genů, jejichž proteinové produkty inhibují signální dráhu TGF- β , rozhodli jsme se tuto dráhu podrobněji analyzovat imunochemicky (WB). Zatímco v kontrolních buňkách CEDM (neinfikovaných anebo infikovaných prázdným retrovirovým vektorem SFCV-LE) byl dobře detekovatelný signál hlavních zprostředkovatelů signalizace TGF- β , fosforylovaných forem SMAD2 a SMAD3, v buňkách CEDM s trvale exprimovaným EGR4 fosforylované formy SMAD2/3 prakticky vymizely (obr. 17a). Hladina celkového množství proteinů SMAD2/3 naopak v buňkách s trvale exprimovaným EGR4

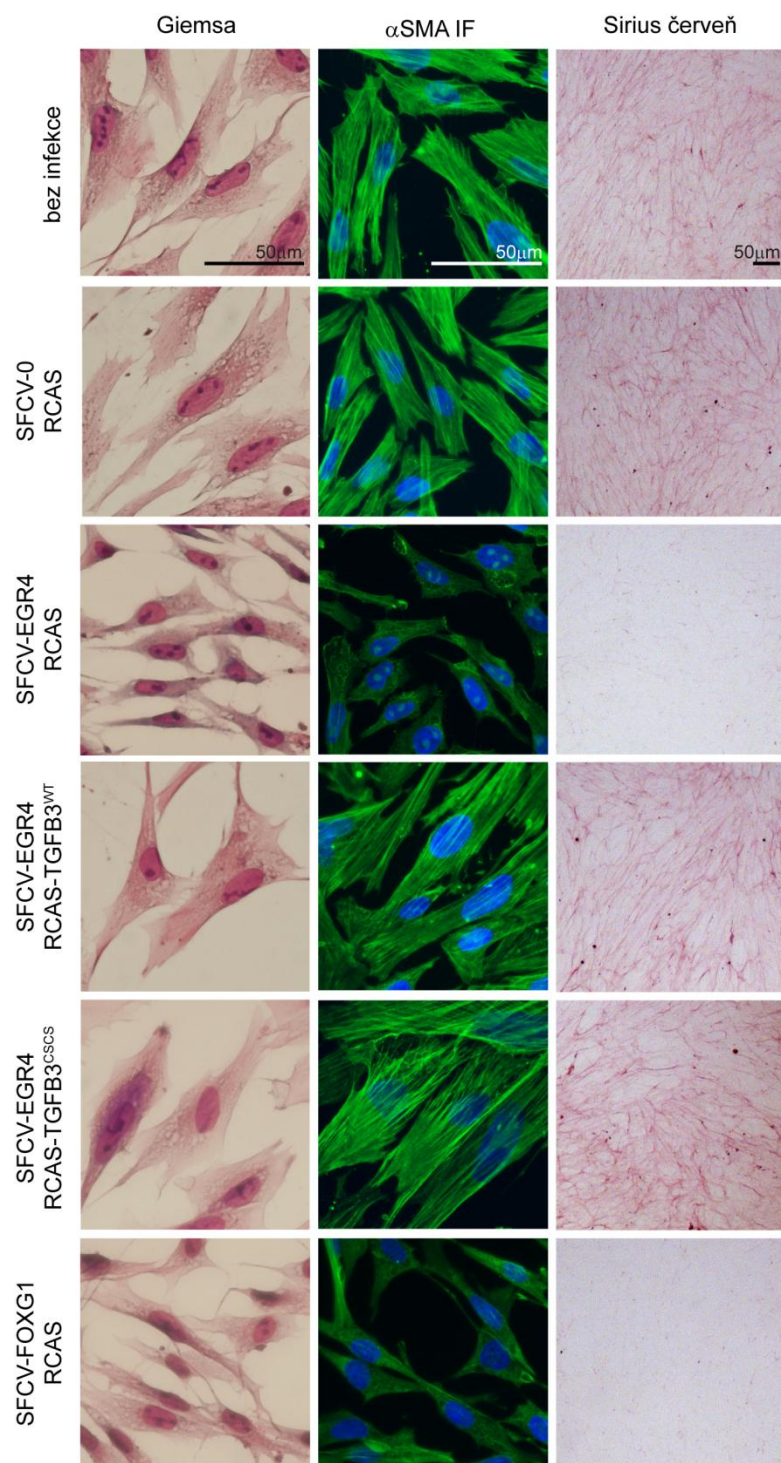
gen	EGR4 vs. kontrola			MPPN vs. DMSO		
	násob. Δ expr.	SEM	hodnota p	násob. Δ expr.	SEM	hodnota p
FOXC1	153,94	51,29	0,002	-	-	-
BAMBI	39,69	8,62	0,002	-	-	-
DUSP5	2,54	0,95	0,010	-	-	-
NAB1	4,02	1,08	0,008	-	-	-
NAB2	18,36	3,73	0,000	-	-	-
LUM	-372,43	74,49	0,003	-4,02	0,99	0,022
COL8A1	-58,08	20,41	0,020	1,12	0,57	0,423
COMP	-64,17	28,18	0,040	-4,44	0,28	0,000
TIMP3	-12,42	4,27	0,026	-3,38	0,51	0,004
THBS2	-35,74	14,07	0,028	-4,22	0,72	0,005
CXCL12	-24,32	9,62	0,033	-2,95	1,18	0,083
HHIP	-842,28	200,43	0,005	-9,33	3,72	0,041
EGR1	-10,42	2,98	0,013	-1,56	0,13	0,032
THBS1	-12,01	3,87	0,019	-1,75	0,05	0,005
CNN1	-4,95	2,19	0,062	1,19	0,31	0,299
TAGLN	-23,34	10,10	0,042	1,10	0,13	0,268
PRRX1	-5,21	1,25	0,013	1,45	0,07	0,001
SMURF2	-5,33	1,56	0,023	-3,96	0,11	0,000
COL6A3	-7,64	1,13	0,002	-1,69	0,20	0,019
MYOCD	-23,45	6,16	0,009	-3,68	0,80	0,009
ACTA2	-7,32	1,84	0,011	1,43	0,23	0,041
TGFBI	-4,73	0,37	0,000	-11,55	2,71	0,008
TGFB3	-4,66	1,11	0,014	-1,64	0,17	0,014
FN1	-3,03	1,10	0,065	-1,47	0,28	0,076
COL1A1	-3,15	0,44	0,003	-1,12	0,15	0,272
TGFB1	-1,75	0,38	0,041	-1,07	0,15	0,297

Tab. 3 Ověření změn genové exprese detekovaných na mikročipu v buňkách CEDM s trvale exprimovaným EGR4 a po inkubaci s MPPN pomocí qPCR. Expresi vybraných genů ve vzorcích z buněk infikovaných virem kódujícím EGR4 nebo prázdným virem byla analyzována pomocí qPCR. Hodnoty normalizované na příslušnou hodnotu GAPDH a relativní hladiny exprese byly spočítány podle určených účinností amplifikace. Tabulka ukazuje průměrné hodnoty násobků změn společně se standardní chybou měření (SEM) a hodnotami p odpovídajících t-testů. V případě genů, jejichž exprese byla snížena, byl porovnán účinek trvalé exprese EGR4 s účinkem chemického inhibitoru (MPPN) signální dráhy TGF-β. Geny, které signifikantně odpovídaly jak na expresi EGR4 tak na inhibici signalizace dráhou TGF-β jsou uvedeny tučnou kurzívou.

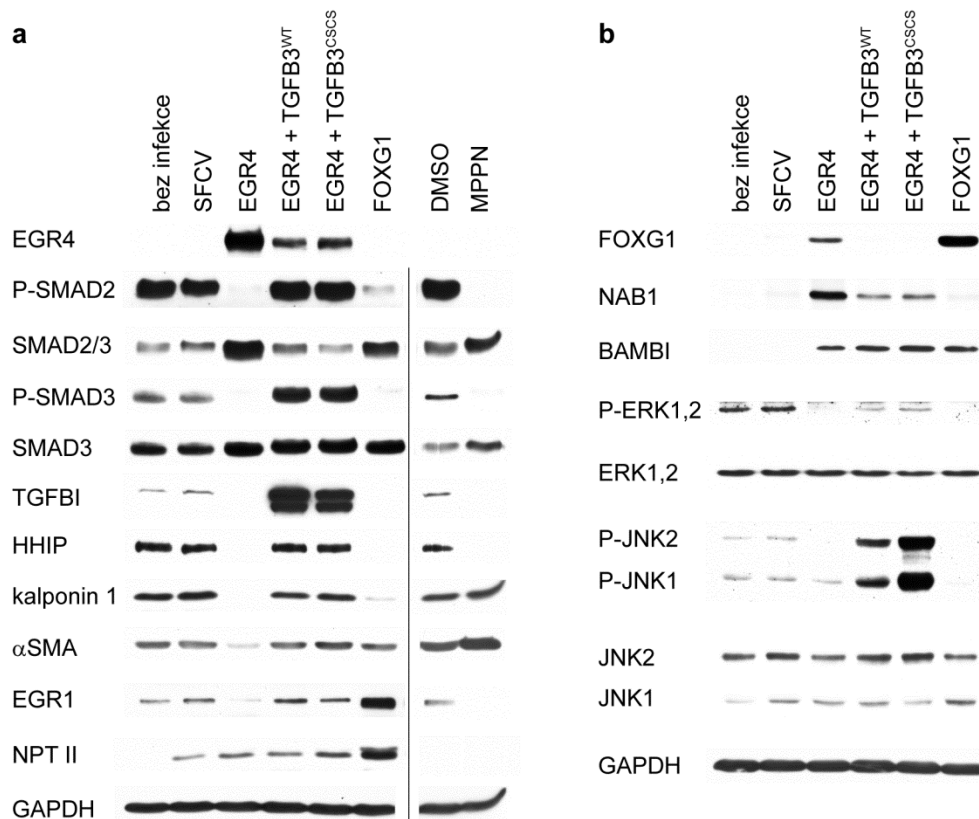
výrazně vzrostla (obr. 17a), což je pravděpodobně důsledek kompenzačního mechanismu způsobeného poklesem exprese genu pro SMAD2 specifickou ubikvitin ligázu SMURF2 (obr. 15). Dále jsme potvrdili očekávaný (podle hladiny mRNA) nárůst hladiny proteinů FOXG1, BAMBI a NAB1 (obr. 17b), které by mohly být zprostředkovateli fenotypu vyvolaného trvalou expresí EGR v buňkách CEDM. Je dobře známé, že dráha MAPK je nedílnou součástí signální sítě řízené TGF- β . Proto se nabízí, že výše uvedená aktivace exprese DUSP5 by mohla zprostředkovat EGR4-řízené potlačení fenotypu myofibroblastů (který je pod kontrolou signální dráhy TGF- β). Abychom zjistili stav signalizace dráhou MAPK v buňkách s trvale exprimovaným EGR4, imunochemicky jsme detekovali fosforylované formy i celkové množství forem ERK, JNK a p38 kináz MAP. Jak ukazuje obr. 17b, trvalá exprese EGR4 inhibovala fosforylaci ERK a JNK2, zatímco celkové množství těchto kináz zůstalo nezměněné. Fosforylovaná forma p38 nebyla detekována ani u jednoho vzorku (není ukázáno).

4.1.8 Trvalá exprese FOXG1 je dostatečná k potlačení fenotypu myofibroblastů

Dále jsme analyzovali možnou úlohu jednotlivých vytipovaných proteinů (jejichž hladiny zvýšila trvalá exprese EGR4), v inhibici dráhy TGF- β a potlačení fenotypu myofibroblastů. Za tímto účelem jsme zkonstruovali retrovirové plazmidy nesoucí geny FOXG1, BAMBI a NAB1 a následně analyzovali rysy myofibroblastů v buňkách CEDM, které vytipované geny stabilně exprimovaly. Ukázalo se, že pouze trvalá exprese genu pro FOXG1 byla schopná účinně potlačit produkci ECM a tvorbu vláken α SMA (obr. 16), zatímco exprese BAMBI a NAB1 byla bez zjevného efektu (není ukázáno). Expresí FOXG1 v buňkách CEDM také vedla k silnému snížení fosforylace proteinů SMAD2/3, srovnatelné se snížením způsobeným expresí EGR4 (obr. 17a). Stejně tak došlo i ke stabilizaci celkového množství proteinů SMAD2 (obr. 17a). Expresí FOXG1, podobně jako exprese EGR4, snížila fosforylaci kináz ERK a JNK2 (obr. 17b). Tyto výsledky jsou poněkud překvapivé, protože schopnost FOXG1 interferovat se signalizací dráhou TGF- β je podle dostupné literatury svázána s aktivitami na nižších úrovních této signální dráhy a nikoliv s kinázovou aktivitou (Rodriguez et al, 2001). Z našich výsledků vyplývá, že FOXG1 má v myofibroblastech pravděpodobně i další aktivity, které mohou zahrnovat i schopnost reprimovat transkripci některých genů. Důležitou částí molekulárního mechanismu, kterým trvalá exprese FOXG1 ovlivňuje aktivitu celé signální dráhy TGF- β , může být narušení smyčky pozitivní zpětné vazby, smyčky trvale udržující autokrinní stimulaci myofibroblastů ligandy TGF- β . Jak bylo ukázáno v předchozích



Obr. 16 Vzhled a charakteristika fenotypu buněk CEDM trvale exprimujících EGR4 nebo FOXG1. Buněčná morfologie byla zvýrazněna Giemsovým barvením. Charakteristické rysy myofibroblastů byly analyzovány imunofluorescenční detekcí vláken α SMA a barvením kolagenů v ECM barvivem Sirius červeň. V popisu jsou uvedeny retroviry použité k infekci buněk. U buněk trvale exprimujících EGR4 nebo FOXG1 dochází ke ztrátě nebo redukci charakteristických rysů myofibroblastů, totiž výrazných vláken α SMA a intenzivní produkce ECM bohaté na kolageny. Exprese TGF- β 3 obnovuje fenotyp myofibroblastů buněk CEDM s trvale exprimovaným EGR4.



Obr. 17 Imunochemická analýza proteinů ovlivněných stálou expresí EGR4 anebo FOXG1 v buňkách CEDM. (a) Hladiny vybraných proteinů, odpovídajících genům se sníženou expresí na mikročipu, byly analyzovány. Byly porovnány účinky trvalé exprese EGR4 a inhibice signalizace dráhou TGF- β (poslední dvě linky). Jako kontrola při působení MPPN (rozpuštěné v DMSO) byl použito pouze působení DMSO. Protein NPTII kódovaný všemi konstrukty SFCV byl detekován pro porovnání rozsahu integrace a exprese retrovirových vektorů. Detekce proteinů GAPDH byla použita jako kontrola rovnoměrné nanášky proteinů. **(b)** Hladiny vybraných proteinů, odpovídajících genům se zvýšenou expresí na mikročipu, byly ověřeny imunochemickou detekcí. Analyzovali jsme hladiny celkových a fosforylovaných forem proteinů ERK, abychom zjistili vliv trvalé exprese EGR4 v buňkách CEDM na signalizaci dráhou MAPK. Detekce proteinů GAPDH byla použita jako kontrola rovnoměrné nanášky proteinů.

pokusech, tato smyčka aktivuje transkripci ligandu TGF- β 3 a genů (např. ITGB3, ITGB5 a LTBP1) kódujících aparát aktivující TGF- β 3 z jeho neaktivní (latentní) formy. Tuto hypotézu dokládá i čtyřnásobné snížení exprese genu TGFB3 v buňkách CEDM trvale exprimujících EGR4 (obr. 15).

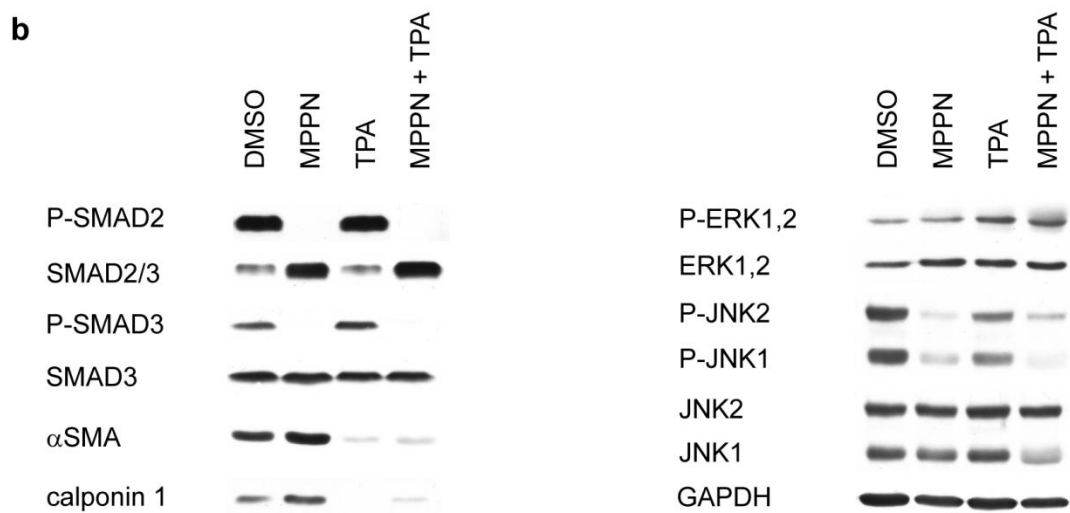
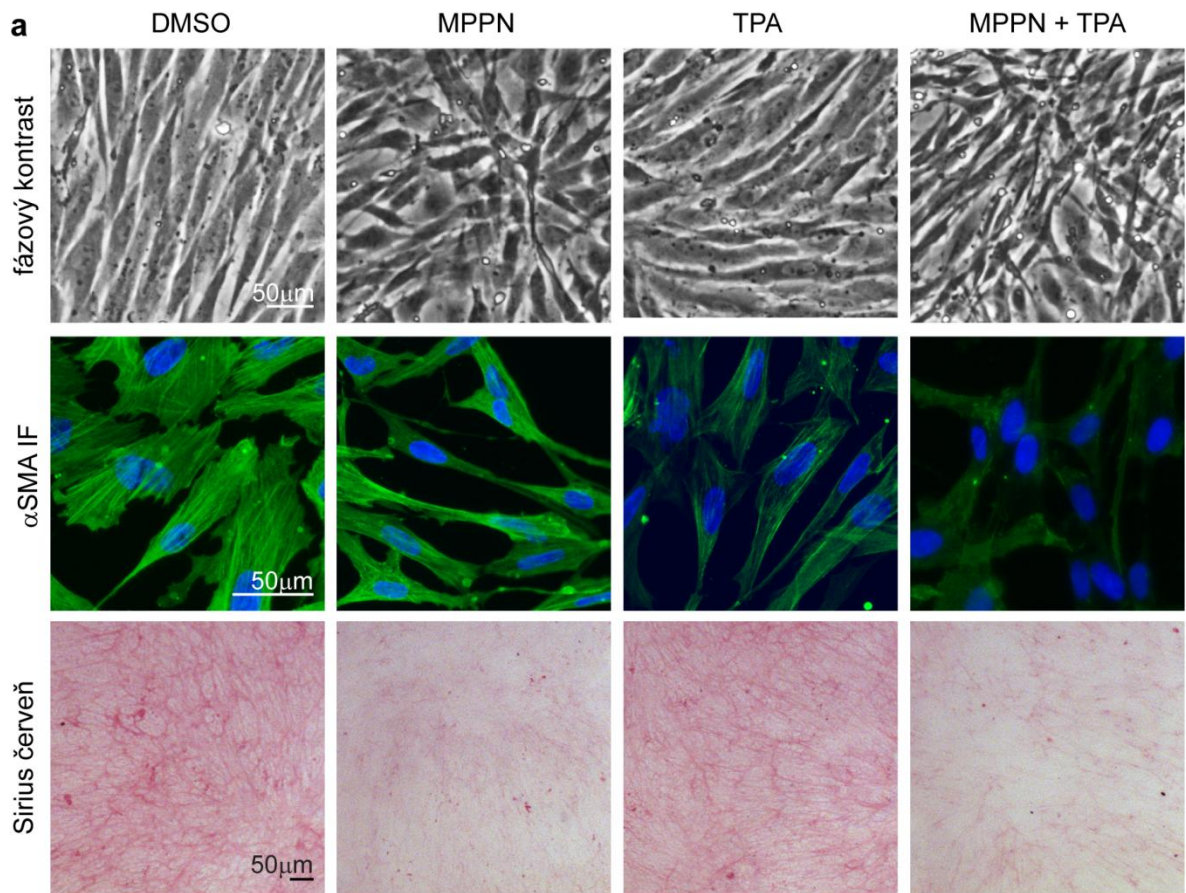
4.1.9 Nadexprese TGF- β 3 obnovuje v buňkách CEDM s trvale exprimovaným EGR4 fenotyp myofibroblastů

Protože trvalá exprese EGR4 je arteficiální experimentální situace, která by pravděpodobně *in vivo* podmínkách nenastala (ale mohla by být indukována farmaceutickými přístupy), zajímalo nás, zda by mohl být fenotyp fibroblastů v buňkách CEDM s nadexprimovaným EGR4 obnoven hyperstimulací ligandem TGF- β . Z důvodů zmíněných dříve (kapitola 4.1.3) a protože dediferenciace buněk CEDM stabilní expresí EGR4 souvisela s razantním poklesem hladiny TGF- β 3 (obr. 15, tab. 3) a nikoliv TGF- β 1, jsme opět použili ligand TGF- β 3 (jak TGF- β 3^{WT} tak TGF- β 3^{CSCS}). Kuřecí geny TGFB3^{WT} a mutovaná verze TGFB3^{CSCS} byly exprimovány z retrovirových vektorů RCAS-BPA, sloužících normálně (bez vložené cDNA) jako pomocný virus ve všech dosud zmíněných experimentech. Toto experimentální uspořádání nám dovolilo trvale exprimovat v buňkách CEDM dva geny současně. Jeden z retrovirového, replikačně nekompetentního vektoru SFCV a druhý z retrovirového (a replikačně kompetentního) vektoru sloužícího jako pomocný virus. Připravili jsme tedy buňky CEDM exprimující jak EGR4 tak TGF- β 3 a kontrolní kombinace expresí pouze jednoho z těchto dvou genů. V připravených buňkách jsme analyzovali rysy myofibroblastů a expresi relevantních proteinů. Jak ukazuje obrázek 16, konstitutivní nadexprese TGF- β 3 potlačuje všechny efekty vyvolané samotnou expresí EGR4 a vynucuje u buněk CEDM typický fenotyp myofibroblastů (produkující velké množství ECM a mající výrazná vlákna α SMA). V souladu s fenotypem, také hladiny proteinů snížených trvalou expresí EGR4 se navrátily k normálním hladinám, typickým pro buňky CEDM (obr. 17b). Jedinou výjimku tvoří fosforylovaná forma ERK MAP kinázy, jejíž hladina se v buňkách hyperstimulovaných TGF- β 3 navrátila jen částečně (obr. 17b). Zato v hyperstimulovaných buňkách došlo k obrovskému nárůstu hladiny fosforylované formy JNK MAP kinázy (obr. 17b). Zajímavé je, že hladina proteinu EGR4, daná expresí z integrovaného retrovirového vektoru, je v buňkách hyperstimulovaných TGF- β 3 snížena (obr. 17a). Tento pokles musí být způsoben destabilizací proteinu EGR4, protože hladina proteinu NPTII není ovlivněna (obr. 17a). Protein NPTII dává buňkám rezistenci ke G418 a je kódován genem, který leží ve stejném vektoru jako gen kódující EGR4. mRNA pro NPTII je transkribována z promotoru

společného pro geny EGR4 i NPTII. Protein EGR4 je totiž překládán ze sestříhané formy mRNA, která před sestříháním kóduje jak EGR4, tak NPTII. Toto uspořádání tedy vylučuje možné ovlivnění stability mRNA. Výše uvedené výsledky ukazují na možný vzájemný antagonismus mezi signalizací dráhou TGF- β a EGR4, který by se mohl vyskytovat i v kontextu fyziologických podmínek.

4.1.10 Kombinované působení inhibitoru signální dráhy TGF- β MPPN a forbolového esteru TPA na buňky CEDM napodobuje změny vyvolané trvalou expresí genů PDGFB, Ha-Ras(G12V), EGR4 nebo FOXG1

Protože dediferenciace buněk CEDM způsobená stálou expresí genů PDGFB, Ha-Ras(G12V), EGR4 nebo FOXG1 byla vždy spojena se ztrátou autokrinní signalizace dráhou TGF- β a různým typem narušení signalizace dráhou MAPK, pokusili jsme se ovlivnit obě signální dráhy pomocí chemických látek. K inhibici signalizace dráhou TGF- β jsme opět použili inhibitor, který sám o sobě nebyl schopen navodit kompletní dediferenciaci myofibroblastů (kapitola 4.1.4). Protože neznáme přesnou povahu narušení signalizace dráhou MAPK, použili jsme jak aktivátor, tak inhibitor signalizace dráhou MAPK. Jako aktivátor byl použit forbolester (TPA) a jako inhibitor sloužila látka U0126 (specifická pro MEK1,2). Kompletní dediferenciaci myofibroblastů (CEDM) jsme se pokusili navodit kombinací působení MPPN s TPA nebo U0126. Buňky CEDM byly nejdříve kultivovány po jeden týden v přítomnosti 0.5 μ M MPPN a pak byl na tři nebo více dní přidán 10 nM TPA nebo 10 μ M U0126. Následně jsme analyzovali morfologii buněk, přítomnost vláken α SMA, produkci ECM a hladiny vybraných relevantních proteinů. Zatímco kombinace působení MPPN s U0126 nevedla ve srovnání s působením samotného MPPN k žádným změnám (není ukázáno), kombinace působení MPPN s TPA vedla k účinné dediferenciaci myofibroblastů. Po působení MPPN s TPA došlo u buněk CEDM k morfologickým změnám, ztrátě vláken α SMA a silnému potlačení produkce ECM bohaté na kolageny (obr. 18a). Tyto výsledky byly dále podpořeny pozorováním silného snížení hladin proteinů α SMA a kalponinu 1 (obr. 18b). Zajímavé je, že působení samotného TPA na buňky CEDM také vyvolávalo účinné snížení hladin proteinů spojených s kontraktilitou vláken α SMA (obr. 18b).



Obr. 18 Kombinované působení MPPN a TPA vyvolává účinnou dediferenciaci buněk CEDM. (a) Buněčná morfologie sledovaná ve fázovém kontrastu se nápadně změnila u buněk CEDM kultivovaných s MPPN a TPA. Navíc imunofluorescenční detekce vláken α SMA a barvení kolagenů v ECM barvivem Sirius červeň ukázaly potlačení charakteristických rysů myofibroblastů těchto buněk. **(b)** Imunodetekce proteinů odhalila snížení hladin proteinů α SMA and kalponin 1. Detekce proteinů GAPDH byla použita jako kontrola rovnoměrné nanášky proteinů.

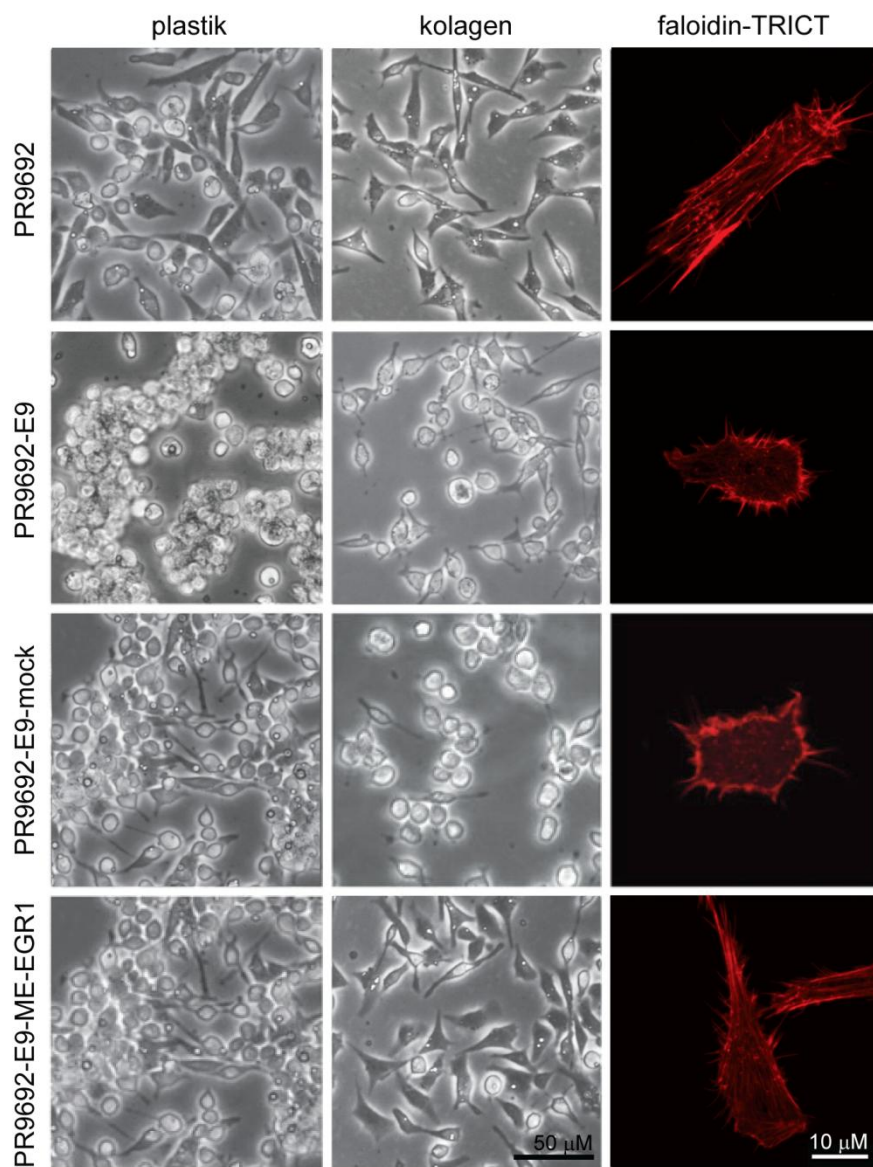
4.2 Studium molekulární podstaty metastazování sarkomových buněk

4.2.1 Unikátní model metastazování založený na buněčných liniích PR9692 a PR9692-E9

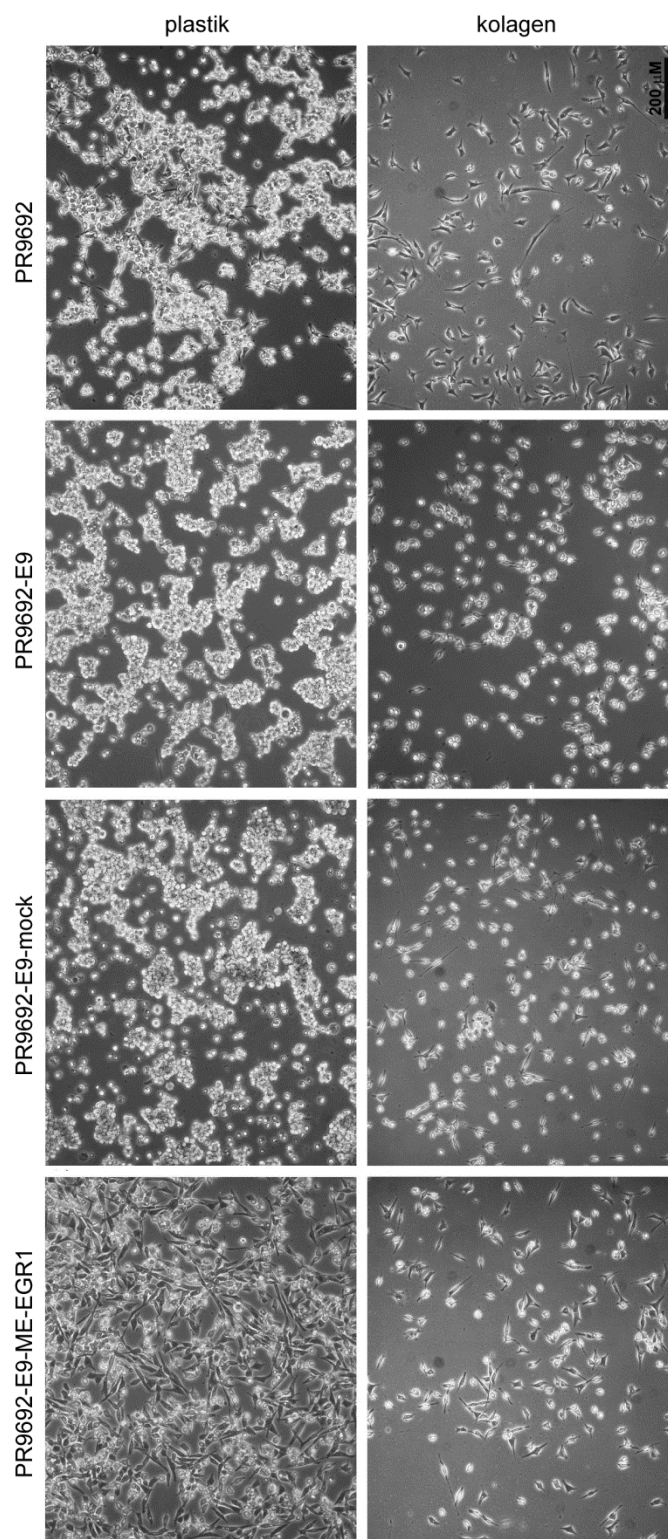
Ke studiu genů regulujících metastazování sarkomů jsme použili unikátní kuřecí linie fibrosarkomových buněk PR9692 a PR9692-E9. Tyto buňky byly odvozeny ze sarkomu prsního svalu experimentálního kuřete, vzniklého v místě vpichu přímé injekce DNA konstruktů nesoucího LTR – v-src – LTR. Analýza předešlá této práci ukázala, že buňky PR9692 a PR9692-E9 v sobě nesou pouze jednu kopii proviru LTR – v-src – LTR a gen v-src je z tohoto proviru účinně exprimován. Bylo také identifikováno místo integrace proviru a sledováno udržení proviru v buňkách během *in vitro* pasážování ((Cosset et al, 1990), Plachý J., nepublikované výsledky). Buňky rodičovské linie PR9692 adherují k holým plastickým kultivačním nádobám (pro adherentní buňky) a mají jak protažený, tak kulatý tvar (obr. 19 a 20). Po inokulaci do prsního svalu experimentálních zvířat dávají tyto buňky v místě injekce vzniknout rychle rostoucím sarkomům, které účinně metastazují do plic. Na rozdíl od linie PR9692, buňky PR9692-E9 (subklon buněk PR9692) rostou v buněčné kultuře v plovoucích agregátech a téměř neadherují k plastiku kultivačních nádob (obr. 19 a 20). Buňky PR9692-E9 účinně (stejně jako PR9692) tvoří v kuřatech sarkomy, které ale (na rozdíl od PR9692) nikdy nemetastazují. Růstové kinetiky primárních nádorů a charakteristické metastazování jsou zobrazeny na obr. 23 a, c. Příklady klasifikace plicních metastáz do tří kategorií podle jejich množství a velikosti je na obr. 22. Ačkoliv mezi jednotlivými zvířaty je značná variabilita, statistická analýza ukázala, že primární nádory indukované buňkami PR9692 rostou trochu rychleji (hodnota $p < 0.02$) než nádory vzniklé z buněk PR9692-E9 a buněk odvozených z PR9692-E9.

4.2.2 Mikročipová analýza genů odlišně exprimovaných v rodičovské metastazující linii PR9692 a v nemetastazující dceřiné linii PR9692-E9

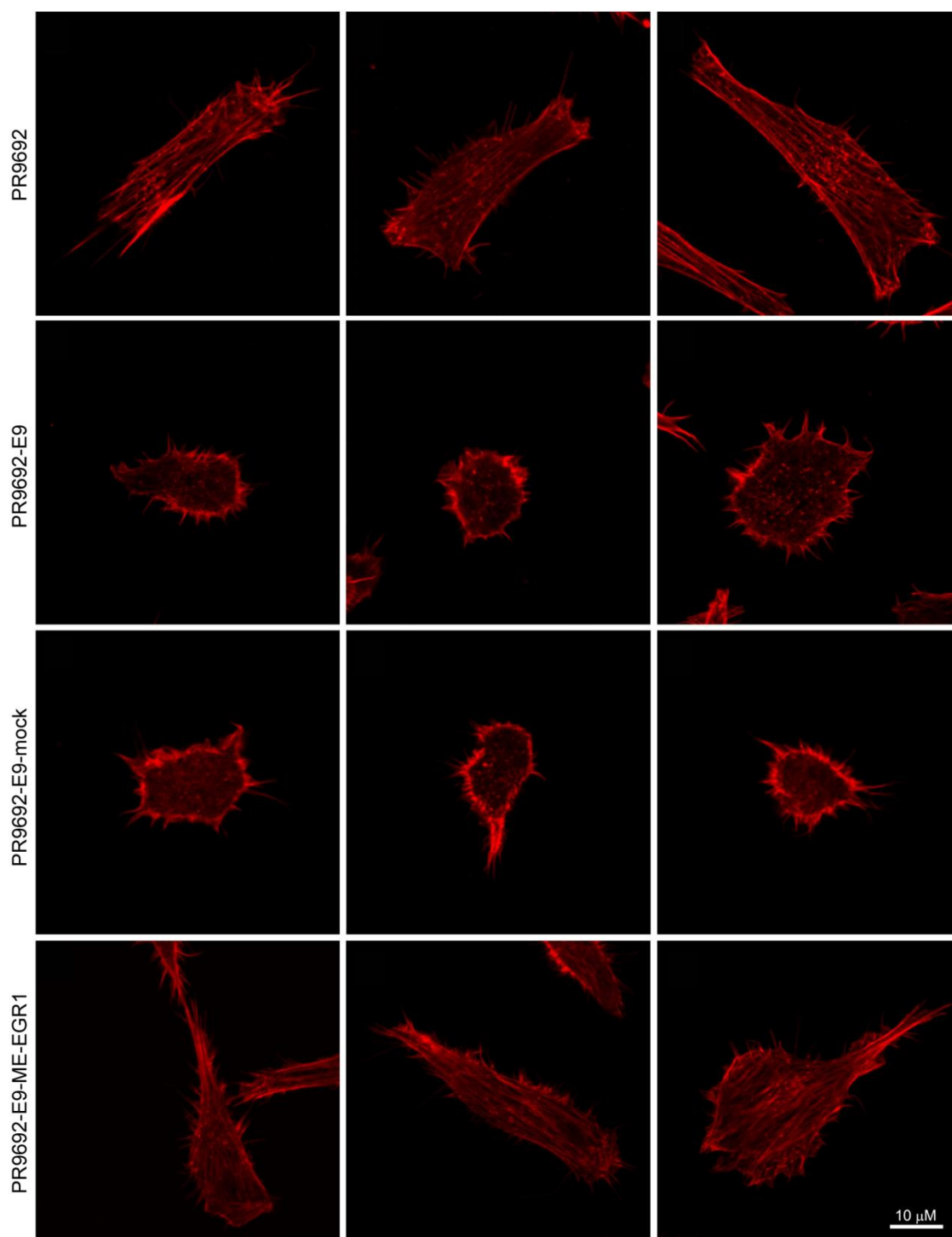
Rozdíl ve schopnostech účinně tvořit metastázy mezi buňkami PR9692 a PR9692-E9 by se měly projevit rozdílnou expresí genů v těchto buňkách. Abychom rozdíly v expresi genů zjistili, provedli jsme mikročipovou analýzu exprese genů. Výsledná data jsou přístupná v databázi GEO pod kódem GSE15141. Seznam vybraných genů, jejichž exprese vykazovala největší rozdíly, je uveden v tab. 4. Kompletní seznam rozdílně (více než dvakrát) exprimovaných genů je v tab. EP5 v elektronické příloze této práce. Z mikročipové analýzy vyplývá, že v buňkách PR9692-E9 došlo ke snížení exprese některých genů kódujících proteiny



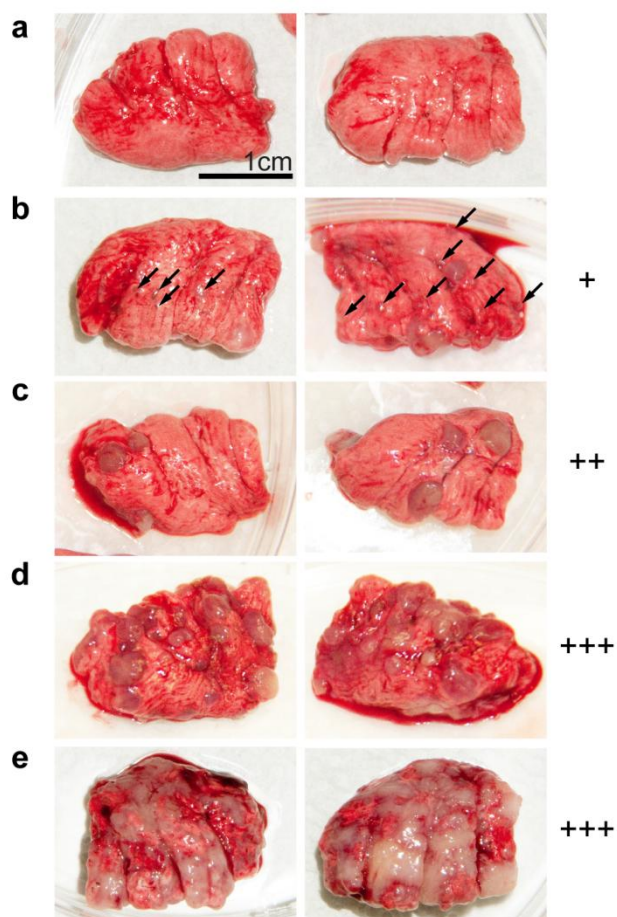
Obr. 19 Charakteristický vzhled buněčných kultur linií na nepokrytém povrchu plastických kultivačních misek i na povrchu pokrytém kolagenem typu I a charakter uspořádání aktinového cytoskeletu detekovaného pomocí fluorescenčně značeného faloidinu (faloidin-TRITC) buněk fixovaných na povrchu pokrytém kolagenem typu I.



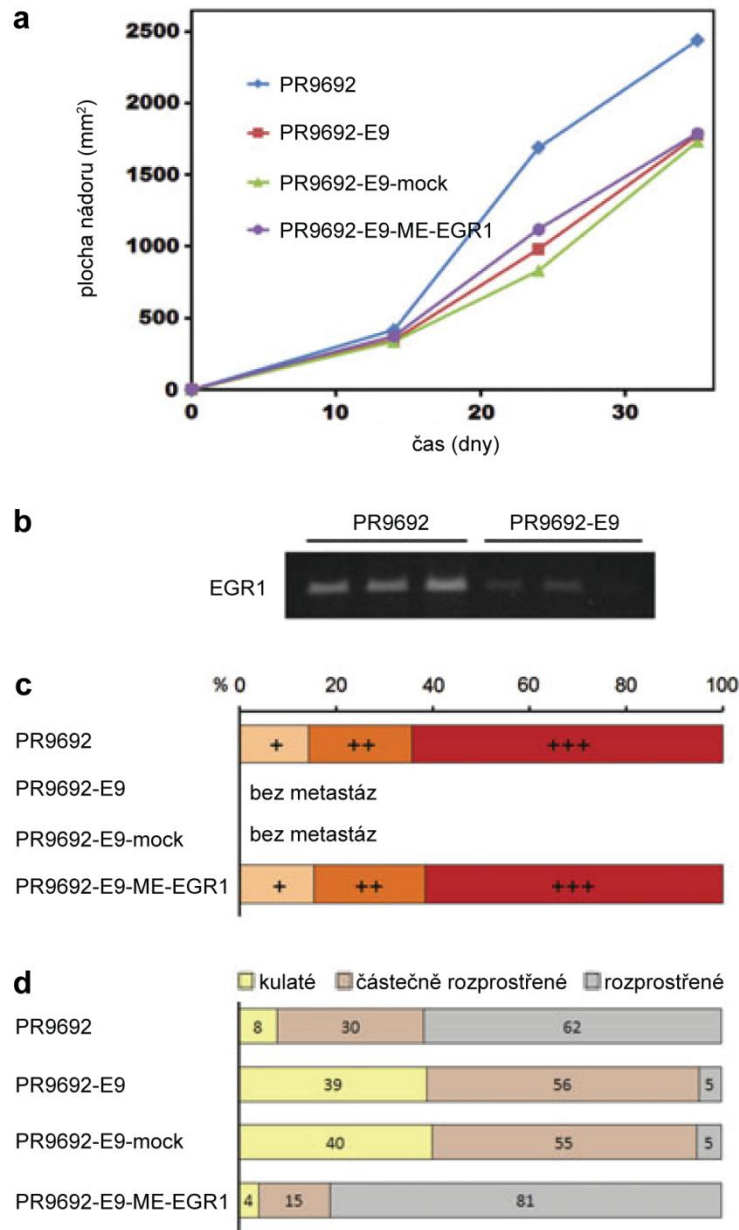
Obr. 20 Charakteristický vzhled buněčných kultur linií na nepokrytém povrchu plastických kultivačních misek i na povrchu pokrytém kolagenem typu I. Buňky PR9692-E9 a PR9692-E9-mock tvoří při kultivaci na nepokrytých plastických kultivačních miskách plovoucí shluky buněk, zatímco buňky PR9692 a PR9692-E9-ME-EGR1 za stejných podmínek adheují na plastický povrch. Mikrofotografie jsou stejné jako v obr. 19, ale jsou zde zobrazeny v menším zvětšení.



Obr. 21 Charakter uspořádání aktinového cytoskeletu detekovaného pomocí fluorescenčně značeného faloidinu (faloidin-TRITC) buněk fixovaných na povrchu pokrytém kolagenem typu I. Nemetastazující buňky PR9692-E9 a PR9692-E9-mock neobsahují organizovaná aktinová vlákna a tvoří jenom krátké a tlustší vystupující hroty, zatímco metastazující buňky PR9692 a PR9692-E9-ME-EGR1 mají polarizovanou morfologii s výraznými kontraktilními vlákny táhnoucími se přes celou délku buňky a lze u nich pozorovat i dlouhá tenká filopodia. První mikrofotografie ze tří zobrazených příkladů pro každou buněčnou linii je stejná jako v obr. 19, ale jsou zde zobrazeny ve větším rozlišení.



Obr. 22 Kategorie plicních metastáz vzhledem k jejich počtu a velikosti. (a) Žádné metastázy. **(b)** +, několik (>10) malých (označené šípkami) a 1-3 středně (3–4 mm) velkých metastáz. **(c)** ++, několik malých a více než 3 středně velké metastázy anebo 1–3 velké (4–5 mm) izolované metastázy. **(d)** +++, plíce prorostlé středně velkými až velkými metastázami srůstajícími dohromady, často tvoří nádorová hmota více než 50% objemu plic. **(e)** V některých kuřatech zabírají metastázy většinu objemu plic.



Obr. 23 Tvorba primárních nádorů a metastáz buňkami PR9692, PR9692-E9, PR9692-E9-mock i PR9692-E9-ME-EGR1 a jejich adhezivní vlastnosti. (a) Růstová kinetika primárních nádorů tvořených buňkami PR9692 a buňkami z této linie odvozených. Plocha primárního nádoru byla měřena v průběhu 35 dní po inokulaci buněk nádorové linie. Pro jednotlivou linii byla do grafu vynášena průměrná hodnota plochy nádoru od šesti zvířat proti času. (b) Hladiny mRNA EGR1 detekované pomocí RT-PCR v původních dvou liniích. Odpovídající detekce GAPDH je zobrazena v obr. 24c. (c) Množství a velikost metastáz určených 5 týdnů po inokulaci nádorových buněk do zvířat. (d) Adhezivní vlastnosti buněk PR9692 a buněk z této linie odvozených na povrchu pokrytém kolagenem typu I.

symbol genu	mezinárodní (anglicky) jméno genu	změna log ₂
<u>Zvýšená exprese v PR9692-E9 v porovnání s PR9692</u>		
CACNA2D1	calcium channel, voltage-dependent, alpha 2/delta subunit 1	6,1
LIP1	lipase, member 1	5,9
FABP1	fatty acid binding protein 1, liver	5,2
EYA2	eyes absent homolog 2	5,1
SLITRK6	SLIT and NTRK-like family, member 6	4,7
SCN2A	sodium channel, voltage-gated, type II, alpha 2	4,6
IRX1	iroquois homeobox 1	4,4
NMU	neuromedin U	4,4
SEPP1	selenoprotein P, plasma, 1	4,4
CADM1	cell adhesion molecule 1	4,0
AQP9	aquaporin 9	3,9
CPEB1	cytoplasmic polyadenylation element binding protein 1	3,8
FGFBP1	fibroblast growth factor binding protein 1	3,8
ARHGAP12	Rho GTPase activating protein 12	3,7
PTGER4	prostaglandin E receptor 4 (subtype EP4)	3,7
TSPAN7	tetraspanin 7	3,4
RICS	Rho GTPase-activating protein RICS	3,3
CTSD	cathepsin D	3,2
CD36	thrombospondin receptor CD36	3,2
SFRP4	secreted frizzled-related protein 4	2,9
<u>Snížená exprese v PR9692-E9 v porovnání s PR9692</u>		
COL6A3	collagen, type VI, alpha 3	-10,4
COL5A1	collagen, type V, alpha 1	-8,8
COL6A2	collagen, type VI, alpha 2	-8,3
ITGA4	integrin, alpha 4	-8,1
COL1A2	collagen, type I, alpha 2	-7,3
COL6A1	collagen, type VI, alpha 1	-7,3
RARRES2	retinoic acid receptor responder (tazarotene induced) 2	-6,8
MGAT3	mannosyl (beta-1,4-)-glycoprotein beta-1,4-N-acetylglucosaminyltransferase	-6,5
NCAM1	neural cell adhesion molecule 1	-5,7
ITGA11	integrin, alpha 11	-5,6
PCSK6	proprotein convertase subtilisin/kexin type 6	-5,5
PRKCH	protein kinase C, eta	-5,2
MYL9	myosin, light chain 9, regulatory	-5,1
CMTM7	CKLF-like MARVEL transmembrane domain containing 7	-4,7
AQP1	aquaporin 1	-4,6
EGR1	early growth response 1	-4,3
HAS2	hyaluronan synthase 2	-4,1
MSRB3	methionine sulfoxide reductase B3	-3,9
CBY1	chibby homolog 1	-3,6
LASS6	LAG1 homolog, ceramide synthase 6	-3,5

Tab. 4 Seznam vybraných genů, odlišně exprimovaných mezi liniemi buněk PR9692 a PR9692-E9.

zapojené v procesech svázaných s metastazováním. Tyto procesy zahrnují buněčnou adhezivitu (ITGA4, ITGA11, NCAM1), motilitu (MYL9) a degradaci ECM (PCSK6). Zejména rozdíly v expresi genů, podílejících se na produkci ECM (např. HAS2, CIL1A2, všechny tři typy kolagenů VI), jsou obzvláště velké. Je dobře známé, že rozdíly v hladinách mRNA mohou být obecně způsobené několika mechanismy, které zahrnují působení transkripčních faktorů, metylace a demethylace promotorů, mutace genů stejně jako posttranskripční mechanismy ovlivňující stabilitu mRNA (např. RNA interference, regulace proteiny, atd.). My jsme se v naší práci zaměřili na možný vliv transkripčních faktorů. Zevrubné vyhodnocení dat mikročipové analýzy odhalilo snížení hladiny exprese transkripčního faktoru EGR1 (více než dvacetinásobné u mikročipu a asi třináásobné při analýze qPCR) v nemetastazujících buňkách PR9692-E9. Snížení exprese EGR1 (zřetelné též na obr. 23b) naznačovalo možnou roli EGR1 v metastazování. Tato hypotéza je navíc podpořena již popsanou rolí EGR1 coby efektoru různých signálních drah, včetně dráhy TGF- β (Bhattacharyya et al, 2009; Chen et al, 2006), známé pro její důležitou úlohu v progresi různých typů nádorů. Navíc vysoká exprese EGR1 souvisí s rozvojem metastáz karcinomu žaludku (Kobayashi et al, 2002) a exprese blízkého příbuzného genu EGR3 reguluje invazivní chování karcinomu prsu (Suzuki et al, 2007). Uvedené publikované údaje nás inspirovaly k experimentu, testujícího schopnost zvýšené hladiny exprese EGR1 v buňkách PR9692-E9 obnovit metastazování těchto buněk.

4.2.3 Zvýšená hladina exprese genu EGR1 vede k obnovení metastazování buněk PR9692-E9

Abychom zvýšili expresi genu EGR1 v buňkách PR9692-E9, připravili jsme replikačně nekompetentní retrovirový plazmid SFCV-ME-EGR1, který nese gen kódující rekombinantní protein EGR1 značený na N-konci epitopem myc (ME) a gen kódující rezistenci k neomycinu (G418). Plazmid SFCV-ME-EGR1 jsme transfekovali do buněk linie KUNDRA a vzniklým virem, neschopným samostatné reprodukce, jsme poté infikovali buňky PR9692-E9. Následně byly infikované buňky selektovány G418, přeživší klony byly spojeny do společné kultury a několikrát pasážovány před použitím v pokusech *in vivo*. U takto vzniklých buněk PR9692-E9-EGR1 byla imunochemicky potvrzena přítomnost rekombinantního proteinu EGR1 značeného epitopem myc (ME-EGR1) (obr. 23c). Kontrolní buňky (PR9692-E9-mock) infikované retrovirem SFCV-LE byly připraveny stejným způsobem.

Kuřata inokulovaná buňkami PR9692, PR9692-E9, PR9692-E9-mock a PR9692-E9-EGR1 byla zabita 5 týdnů po injekci buněk a velikosti i počet primárních nádorů stejně jako

metastáz byly určeny při pitvě. Příklady klasifikace plicních metastáz do tří kategorií podle jejich množství a velikosti je zobrazena na obr. 22. Ve všech zvířatech inokulovaných jak PR9692 tak PR9692-E9-EGR1 bylo pozorováno velmi výrazné metastazování, zatímco inokulace buněk PR9692-E9 a PR9692-E9-mock nevedla k tvorbě metastáz. Důležité je, že velikost i počet metastáz vzniklých ve zvířatech inokulovaných buňkami PR9692-E9-EGR1 byly srovnatelné s metastázami indukovanými buňkami PR9692 (obr. 23c).

4.2.4 Adhezivní vlastnosti, charakteristika aktinového cytoskeletu a migrační chování buněk odvozených z PR9692

Analýza morfologie buněk PR9692-E9-EGR1 ukázala, že tyto buňky s buňkami PR9692 sdílejí nejenom schopnost metastazovat, ale i podobnou morfologii na povrchu kultivačních plastických nádob pokrytých kolagenem. Obě linie sdílejí také schopnost adherovat na ničem nepokrytý kultivační plastik (obr. 19), na kterém se část buněk dokonce rozprostře. Naopak nemetastazující buňky PR9692-E9 a PR9692-E9-mock byly schopné adherovat pouze na povrch kultivačních plastických nádob pokrytým buď kolagenem nebo fibronectinem. Abychom detailněji prozkoumali adhezivní vlastnosti každé buněčné linie, porovnali jsme jejich morfologii a stupeň rozptření na kultivačních miskách pokrytých kolagenem typu I. Provedli jsme tedy analýzu fotografií populace každé buněčné linie a buňky rozdělili podle stupně rozptření do tří kategorií na 1) nerozptřené (kulaté), 2) částečně rozptřené (kulaté s úzkými výběžky) a 3) plně rozptřené (ploché a prodloužené nebo hvězdčovitě) (obr. 23d). Zatímco buňky obou metastazujících linií (PR9692, PR9692-E9-EGR1) měly tendenci se rozptřit na kolagenem pokrytém povrchu, většina nemetastazujících (PR9692-E9, PR9692-E9-mock) buněk zůstala zakulacená, ačkoliv patrně přichycená k povrchu. Abychom uviděli rozdíly v uspořádání aktinového cytoskeletu buněk přichycených ke kolagenu, barvili jsme všechny buňky faloidinem s konjugovanou fluorescenční značkou TRITC (faloidin-TRITC). Toto barvení odhalilo značné rozdíly v buněčné polaritě, ve tvorbě aktinových kontraktálních vláken („stress fibers“) a také menší rozdíly ve tvorbě filopodií. Zatímco obě metastazující linie mají polarizovanou morfologii s výraznými kontraktálními vlákny a (u části populace) s dlouhými tenkými filopodií, nemetastazující buňky mají typicky zakulacenou, nepolarizovanou morfologii s kratičkými aktinovými výběžky na povrchu buňky a jen s menším množstvím krátkých a tlustých filopodií (obr. 19 a 21). Abychom dále zjistili, zda jsou rozdíly v adhezivních vlastnostech studovaných buněk spojené s rozdíly ve schopnosti migrovat *in vitro*, natočili jsme pomocí časosběrného

mikroskopického snímání videa jednotlivých buněčných linií po dobu kultivace asi 24 hodin (videa 1, 2, 3 a 4 jsou umístěna v elektronické příloze této práce a také na <http://www.img.cas.cz/mv/supplements>). Z vizuálního porovnání videí je zjevné, že část populace buněk PR9692 a PR9692-E9-EGR1 se pohybuje způsobem typickým pro mezenchymové buňky, se snadno rozeznatelným lamelipodiem na předním okraji buňky a uropodem zadního konce, který se během pohybu stahuje zpět k tělu buňky. Ačkoliv je část populace buněk PR9692-E9 a PR9692-E9-mock schopná dobře adherovat na povrch pokrytý kolagenem a vystrkovat i stahovat výběžky, pohybují se tyto buňky odlišným způsobem, který je spíše nedokonalý a bez zjevné předozadní buněčné polariry.

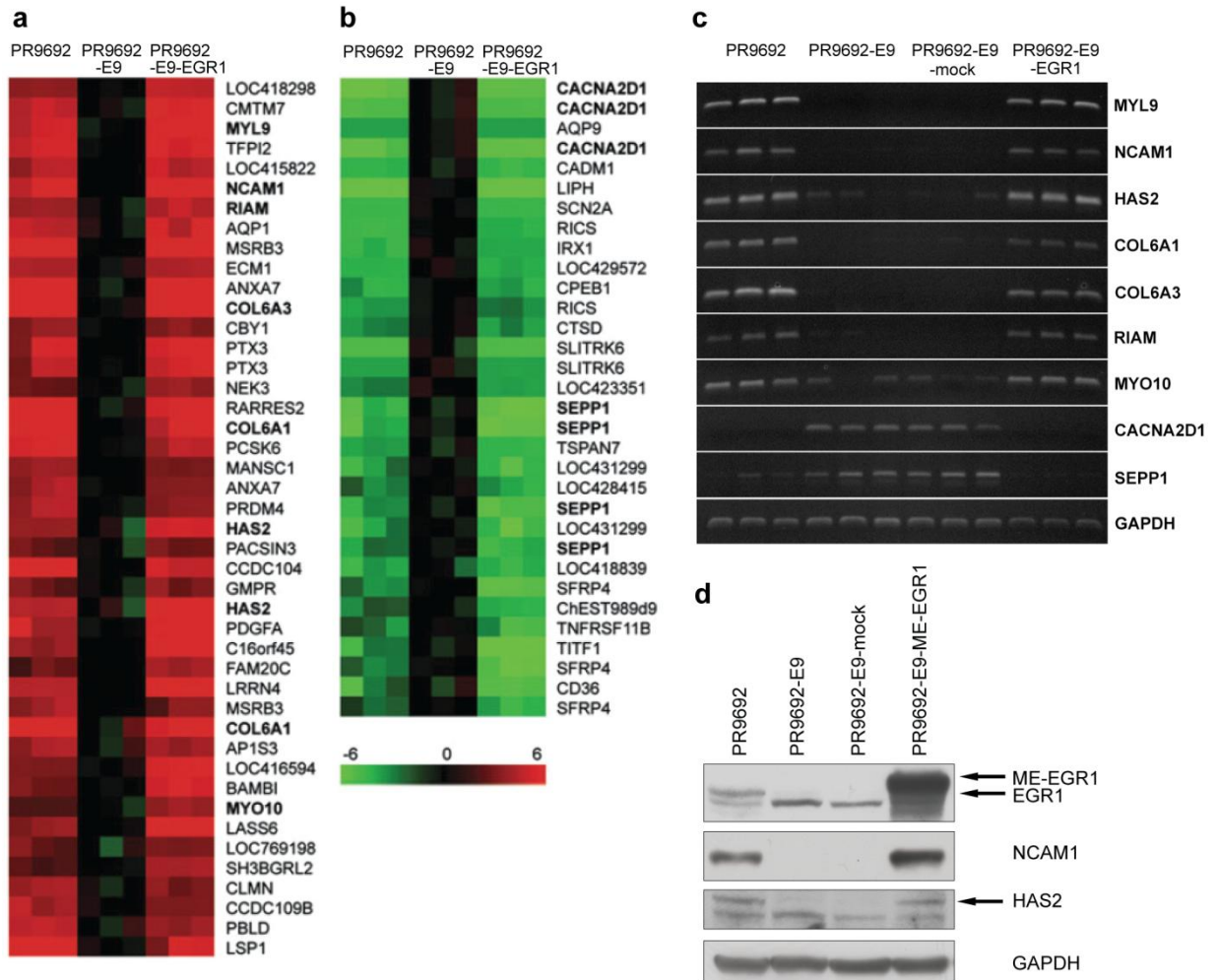
4.2.5 Analýza exprese genů buněk PR9692-E9-EGR1

Abychom identifikovali geny, které jsou regulované transkripčním faktorem EGR1 a zároveň souvisí s regulací metastazování, provedli jsme mikročipovou analýzu exprese genů buněk PR9692-E9-EGR1. Získaný profil exprese genů byl následně porovnán s daty o expresi genů v buňkách PR9692 a PR9692-E9. Seznam vybraných genů, jejichž exprese vykazovala největší rozdíly, je uveden v tab. 5. Kompletní seznam rozdílně (více než dvakrát) exprimovaných genů je v tab. EP6 v elektronické příloze této práce. Z porovnání vyplynulo, že exogenní exprese EGR1 v nemetastazující linii obnovila expresi celé řady genů na úroveň srovnatelnou s úrovní exprese v mateřské metastazující linii PR9692. Ovšem exprese některých genů, odlišně exprimovaných mezi liniemi PR9692 a PR9692-E9, zůstala exogenní expresí EGR1 neovlivněna. Nakonec jsme určili i geny (např. RBM24), jejichž transkripce nebyla v linii PR9692 aktivní, ale byla spuštěna v linii PR9692-E9-EGR1. To může být důsledek toho, že exprese EGR1 v buňkách PR9692-E9-EGR1 je výrazně vyšší než endogenní exprese EGR1 v buňkách PR9692 (obr. 24d).

Nejdůležitějším bodem této části práce je identifikace genů, které by měly hrát roli v předpokládaném metastatickém transkripčním programu. Mezi takové geny by měly patřit geny, jejichž exprese je obdobná v obou metastazujících liniích (PR9692, PR9692-E9-EGR1), ať už je míra jejich exprese ve srovnání s PR9692-E9 snižená nebo zvýšená. Abychom tyto geny mohli identifikovat, provedli jsme klastrovací analýzu (clustering analysis) pomocí algoritmu QT_Clust (Saeed et al, 2003) v programu MeV v4.3 (Heyer et al, 1999). Medián hodnot PR9692-E9 sloužil jako referenční hodnota. Výsledek je zobrazen v obr. 24a, b a v tab. EP7 v elektronické příloze této práce. Z obou výsledných klastrů jsme si vybrali několik genů

symbol genu	mezinárodní (anglicky) jméno genu	změna log2
<u>Zvýšená exprese v PR9692-E9-EGR1 v porovnání s PR9692-E9</u>		
RBM24	RNA binding motif protein 24	10,5
COL6A3	collagen, type VI, alpha 3	9,0
PDGFA	platelet-derived growth factor alpha polypeptide	6,8
HAS2	hyaluronan synthase 2	6,7
SERPINB2	serpin peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 2	6,3
MYL9	myosin, light chain 9, regulatory	6,3
COL6A1	collagen, type VI, alpha 1	6,3
NCAM1	neural cell adhesion molecule 1	6,2
INHBA	inhibin, beta A	6,1
SERPINB10	serpin peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 10	6,0
CMTM7	CKLF-like MARVEL transmembrane domain containing 7	5,9
RARRES2	retinoic acid receptor responder (tazarotene induced) 2	5,7
TFPI2	tissue factor pathway inhibitor 2	5,5
BAMBI	BMP and activin membrane-bound inhibitor homolog	5,4
RDH10	retinol dehydrogenase 10 (all-trans)	5,1
AQP1	aquaporin 1	5,1
CCDC104	coiled-coil domain containing 104	4,8
TAGLN	transgelin	4,5
LSP1	lymphocyte-specific protein 1	4,4
PCSK6	proprotein convertase subtilisin/kexin type 6	4,4
<u>Snížená exprese v PR9692-E9-EGR1 v porovnání s PR9692-E9</u>		
ALDOB	aldolase B, fructose-bisphosphate	-7,2
CALML4	calmodulin-like 4	-6,9
TMEM26	transmembrane protein 26	-6,8
NKX2-1	NK2 homeobox 1	-6,5
KLF15	Kruppel-like factor 15	-6,3
LIPI	lipase, member I	-5,9
ARHGDI3	Rho GDP dissociation inhibitor (GDI) beta	-5,9
CACNA2D1	calcium channel, voltage-dependent, alpha 2/delta subunit 1	-5,9
SFRP4	secreted frizzled-related protein 4	-5,7
SEPP1	selenoprotein P, plasma, 1	-5,7
RASGRP3	RAS guanyl releasing protein 3 (calcium and DAG-regulated)	-5,5
CD36	thrombospondin receptor CD36	-5,3
ZBTB16	Zinc finger and BTB domain containing 16	-5,3
SLITRK6	SLIT and NTRK-like family, member 6	-4,7
TNFRSF11B	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 11b (osteoprotegerin)	-4,5
CADM1	cell adhesion molecule 1	-4,2
TTC8	tetratricopeptide repeat domain 8	-4,2
TSPAN7	tetraspanin 7	-4,0
IRX1	iroquois homeobox 1	-4,0
RAB30	RAB30, RAS oncogene family	-4,0

Tab. 5 Seznam vybraných genů, odlišně exprimovaných mezi liniemi buněk PR9692-E9-ME-EGR1 a PR9692-E9.



Obr. 24 Geny spojené s metastatickým fenotypem buněk a ověření jejich exprese v metastazujících liniích PR9692 a PR9692-E9-ME-EGR1 na úrovni mRNA a proteinů. (a) Skupina genů, jejichž exprese je podle mikročipu zvýšená v metastazujících liniích oproti nemetastazující linii PR9692-E9. **(b)** Skupina genů, jejichž exprese je podle mikročipu snížena v metastazujících liniích oproti nemetastazující linii. Mnohonásobný výskyt některých genů v profilu je důsledkem redundance p-s na mikročipu. Geny následně analyzované pomocí PCR a qPCR jsou zvýrazněny tučným písmem. **(c)** Ověření výsledků z mikročipů pomocí semikvantitativní PCR. **(d)** Ověření výsledků z mikročipů na úrovni vybraných proteinů imunodetekcí. ME-EGR1 označuje rekombinantní fúzní protein EGR1 s epitomem c-myc.

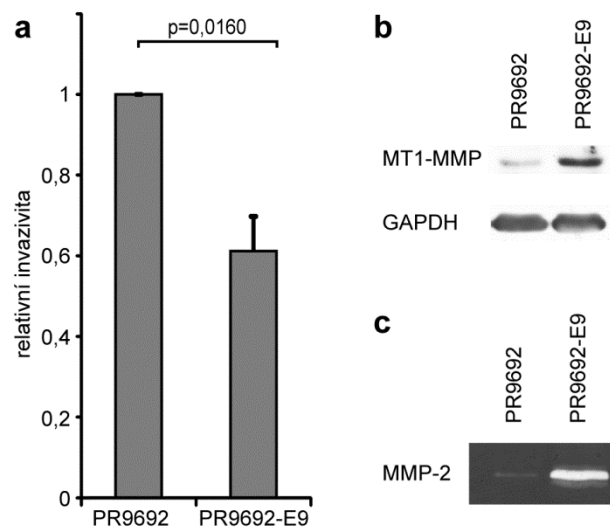
(tučným písmem v obr. 24a, b) a ověřili rozdíly v jejich expresi pomocí PCR a qPCR (obr. 24c). Při ověření qPCR byly použity jak stejné vzorky RNA jako pro mikročipovou analýzu (z buněk kultivovaných na holém plastiku) tak vzorky z buněk kultivovaných na povrchu pokrytém kolagenem. Porovnáním výsledků qPCR ze vzorků buněk kultivovaných na různých površích jsme chtěli zjistit, zda odlišné adhezní podmínky ovlivňují expresi vybraných genů. Ukázalo se, že výsledky qPCR jsou v souladu s daty z mikročipové analýzy (obr. EP1 v elektronické příloze této práce). Ačkoliv byly absolutní hodnoty transkripce některých genů u buněk kultivovaných na různých površích ovlivněny, relativní rozdíly v transkripci se nijak významně neměnily od rozdílů v buňkách kultivovaných na nepokrytém („holém“) plastiku. Abychom dále potvrdili výsledky z mikročipů a qPCR, imunochemicky (WB) jsme detekovali hladiny proteinů NCAM a HAS2. Rozdíly v množství detekovaných proteinů dobře odrážely rozdíly v hladinách mRNA a poskytly tak další důkaz platnosti výsledků mikročipové analýzy (obr. 24d).

Seznam genů vykazujících obdobnou míru exprese v buňkách PR9692 a PR9692-E9-EGR1 a současně sníženou hladinu exprese v buňkách PR9692-E9 zahrnuje známé a důležité regulátory metastazování nádorů i geny, které ještě v souvislosti s metastazováním nebyly popsány nebo jejich funkce není vůbec známá. Gen MYL9 kóduje lehký řetězec myozinu (MLC), regulační protein, který je přímým cílem fosforylace kinázy lehkého řetězce myozinu (MLCK) a je též regulován kinázou ROCK (viz. obr. 5) (Totsukawa et al, 2000), jak již bylo zmíněno v úvodu. Tato regulační fosforylace řídí kontrakce aktinového cytoskeletu a je důležitá v procesu adheze, ustanovení polarity a následné migrace buněk (Gutjahr et al, 2005; Vicente-Manzanares et al, 2008). MLC je nezbytným regulačním prvkem ve všech procesech, ve kterých musí aktinový cytoskelet působit mechanickou silou. Mezi takové procesy patří například nedávno popsáný améboidní způsob migrace skrz ECM, který nevyžaduje produkci proteolytických enzymů (Sahai & Marshall, 2003; Wolf et al, 2003a). Některé nádorové buňky používají améboidní způsob migrace jako výchozí pohyb, u jiných buněk může být aktivován zvláštními podmínkami (Rosel et al, 2008). Každopádně MLC hraje zásadní roli jak v mezenchymovém, tak améboidním způsobu pohybu nádorových buněk. Gen RIAM kóduje adaptorový protein, který zprostředkovává buněčnou adhezi indukovanou proteinem Rap1 (Lafuente et al, 2004). Nedávno bylo ukázáno, že RIAM přináší talin k plazmatické membráně a tím aktivuje integriny (Lee et al, 2009). Myozin X, produkt exprese genu MYO10, je důležitou součástí molekulárního aparátu zodpovědného za tvorbu filopodií (Berg & Cheney, 2002; Bohil et al, 2006; Tokuo & Ikebe, 2004). Filopodia, vláskovité výběžky aktinového cytoskeletu, jsou důležité pro adhezi buněk k podkladu a následnou migraci (Mattila &

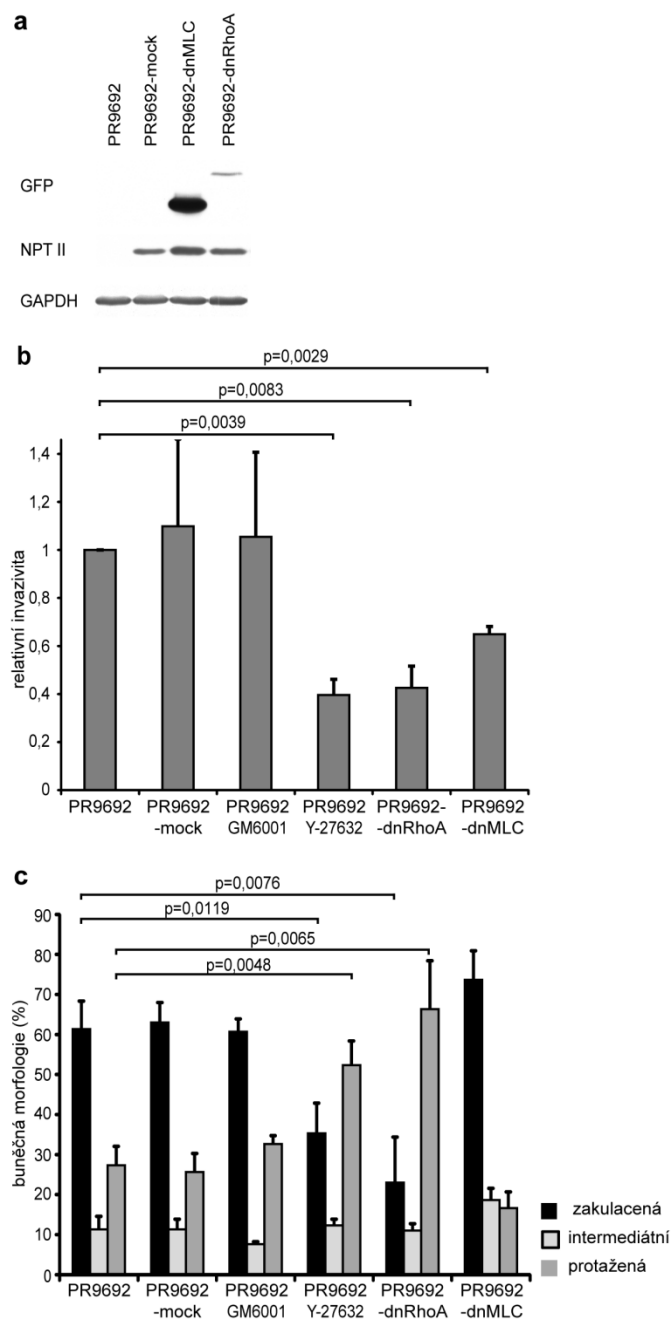
Lappalainen, 2008). Konvertáza proproteinů subtilisin/kexin 6 (PCSK6 neboli PACE4) je proteáza blízce příbuzná furinu, která štěpením aktivuje MMP3, MT1-MMP a řadu dalších molekul, které jsou zapojeny v progresi nádorů (Bassi et al, 2000). Zvýšená aktivita PCSK6 vedla k větší invazivitě karcinomů (Hubbard et al, 1997). NCAM1 (neboli NCAM anebo CD56) hraje roli nejen ve zprostředkování adheze nádorových buněk k endotelu, ale nedávne práce ukazují i přímější úlohu tohoto proteinu ve tvorbě fokálních adhezí, buněčném rozprostření a invazivním chování (Lehembre et al, 2008; Zocchi et al, 1993). Syntetáza hyaluronanu 2 (kódovaná genem HAS2), je enzym produkující hyaluronan, důležitou polysacharidovou složku ECM, která je produkována myo-/fibroblasty a jinými mezenchymovými buňkami. Role produkce hyaluronanu rakovinnými buňkami v jejich invazivním chování byla popsána již několika pracemi (Cook et al, 2006; Simpson et al, 2002; Udabage et al, 2005). Zajímavé je, že kolagen typu VI by měl spolupracovat s hyaluronanem při tvorbě nádorového mikroprostředí, které podporuje specifickou tvorbu nových cév (angiogenezi), dále podporujících rozsívání nádorů (popsáno u melanomů) (Daniels et al, 1996). Kolagen typu VI je tvořen třemi peptidy, kódovanými geny COL6A1, COL6A2 a COL6A3, jejichž exprese je podle naší mikročipové analýzy také součástí metastatického transkripčního programu.

4.2.6 Signalizace dráhou Rho/ROCK/MLC je kriticky důležitá pro améboidní pohyb silně metastazujících buněk PR9692 v trojrozměrné kolagenové matrix

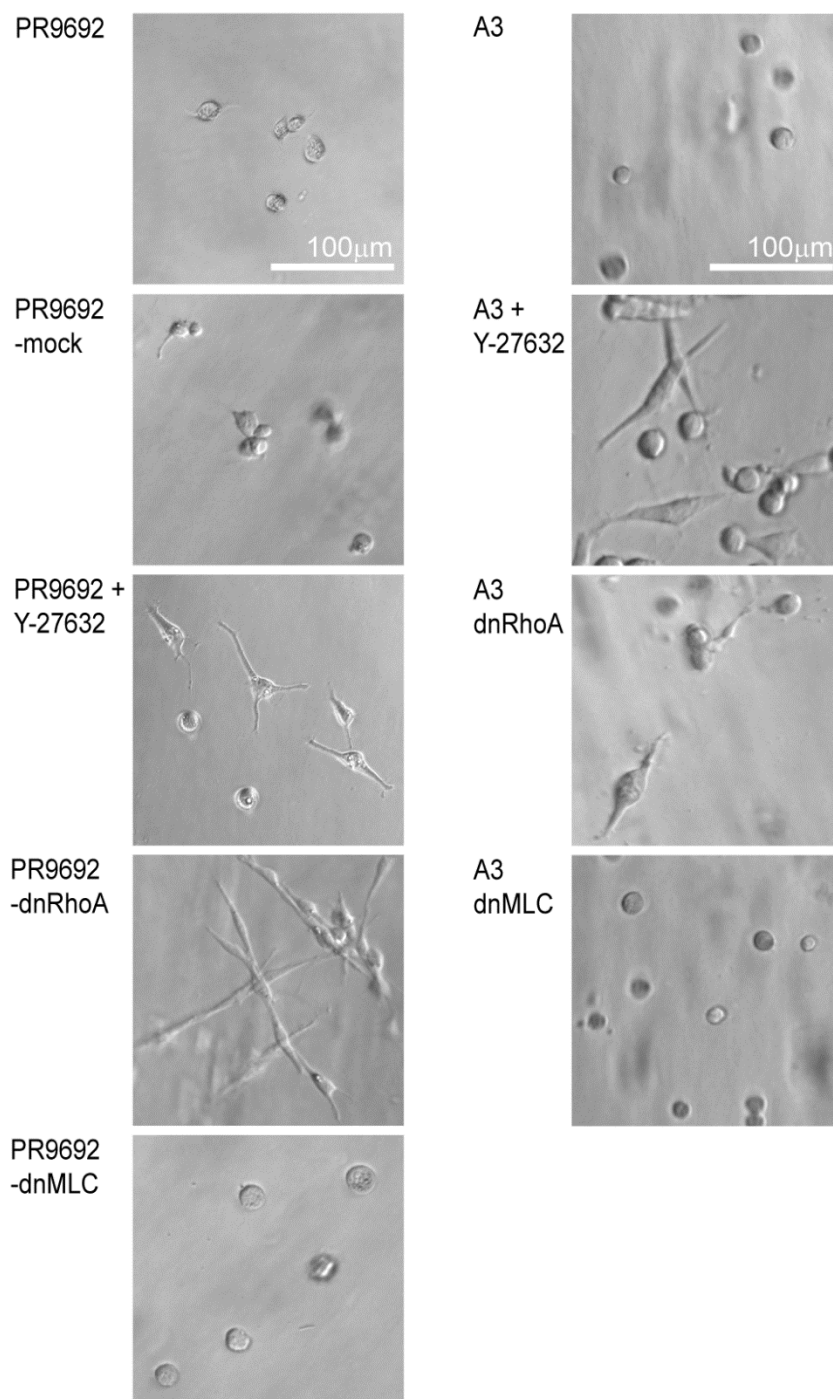
Abychom lépe porozuměli invazivním vlastnostem efektivně metastazujících buněk PR9692, analyzovali jsme způsob, kterým tyto buňky invadují v trojrozměrném prostředí (blízkém situaci *in vivo*). Mikročipová analýza srovnávající metastazující buňky PR9692 s nemetastazujícími buňkami PR9692-E9 odhalila téměř osmdesátkrát sníženou hladinu exprese genu MYL9 (kuřecí MLC2) u nemetastazující linie. Tento výsledek naznačuje zapojení aktinomyozinové kontraktility řízené regulačními proteiny Rho/ROCK/MLC v procesu metastazování. Nedávno publikované práce ukazují rozhodující roli některých komponent regulační dráhy spouštěné Rho ve způsobu invazivního pohybu v trojrozměrném (3D) prostředí. Nejdříve jsme pomocí testu invazivity v 3D kolagenu zjistili, že metastazující buňky PR9692 v 3D prostředí invadují rychleji než nemetastazující buňky PR9692-E9 (obr. 25a). Následná analýza morfologie buněk v 3D kolagenu odhalila, že buňky PR9692 mají v 3D prostředí zakulacenou morfologii, typickou pro buňky pohybující se améboidním způsobem (obr. 26c a 27). Abychom potvrdili améboidní fenotyp buněk PR9692, otestovali jsme jejich



Obr. 25 Metastazující buňky PR9692 invadují améboidním způsobem zatímco nemetastazující buňky PR9692-E9 invadují způsobem mezenchymovým. (a) Invazivita buněk do 3D kolagenu *in vitro*. (b) Imunodetekce hladin proteináz MT1-MMP (MMP14). (c) Detekce aktivity metaloproteináz MMP-2 pomocí zymografie v želatinovém gelu.



Obr. 26 Účinek inhibice signalizace jednotlivých složek regulační dráhy Rho/ROCK/MLC na invazivitu a morfologii buněk PR9692. (a) Imunodetekce rekombinantních proteinů dnRhoA, dnMLC a NPTII v buňkách PR9692. Detekce proteinů GAPDH byla použita jako kontrola rovnoměrné nanášky proteinů. (b) Invazivita buněk do 3D kolagenu *in vitro*. Přítomnost širokospektrálního inhibitoru metaloproteináz GM6001 neměla významnější vliv na invazivitu buněk PR9692. Inhibice ROCK inhibitorem Y-27632, stejně jako inhibice RhoA v buňkách PR9692-dnRhoA a MLC v buňkách PR9692-dnMLC vedly k významně snížené schopnosti těchto buněk invadovat 3D kolagen. (c) Stanovení morfologie buněk v 3D kolagenu *in vitro*. Aktivita RhoA je potřebná pro udržení zakulacené morfologie buněk PR9692. Inhibice ROCK inhibitorem Y-27632 a inhibice RhoA v buňkách PR9692-dnRhoA vedly k améboidně-mezenchymovému přechodu v 3D kolagenu. Inhibice metaloproteináz inhibitorem GM6001 v buňkách PR9692 a inhibice MLC v buňkách PR9692-dnMLC neměly významnější vliv na morfologii těchto buněk.



Obr. 27 Účinek inhibice jednotlivých složek regulační dráhy Rho/ROCK/MLC na morfologii améboidních sarkomových buněk PR9692 a A3. Reprezentativní obrázky buněčné morfologie v 3D kolagenu *in vitro*.

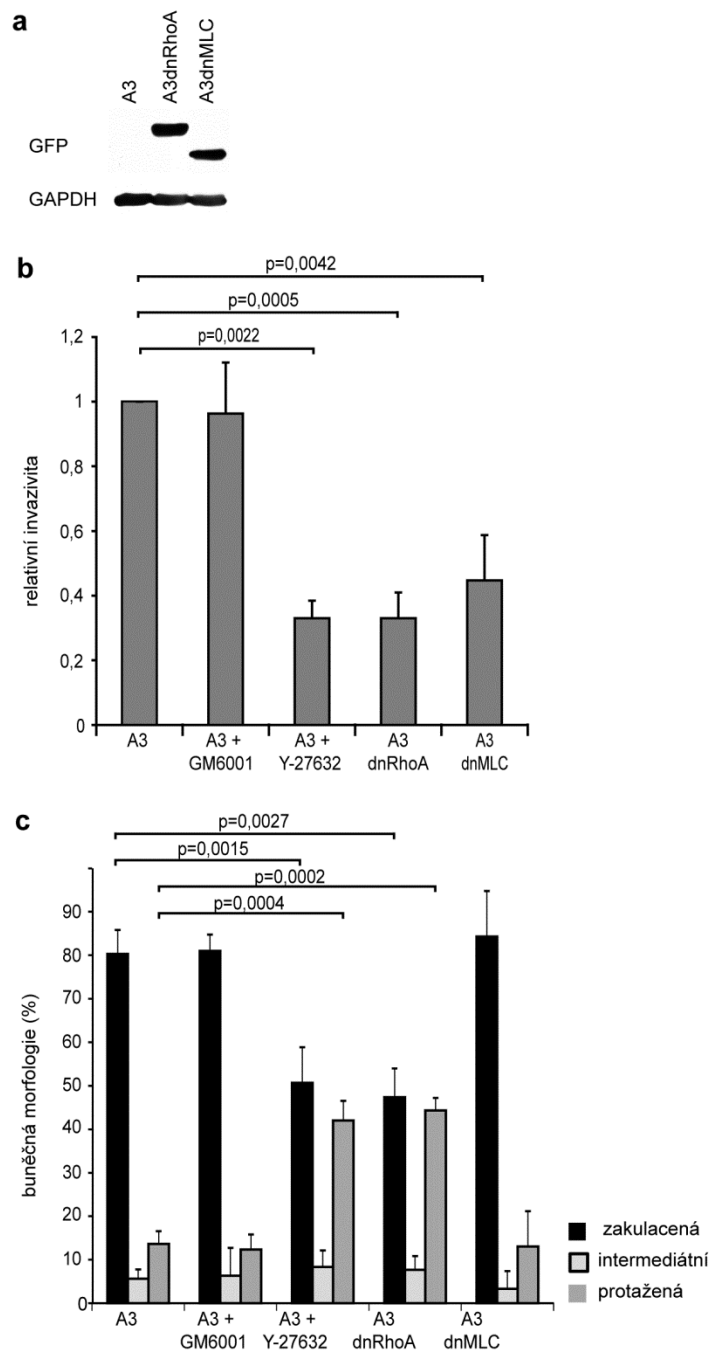
citlivost k inhibitoru ROCK, produkci proteáz MT1-MMP a schopnost degradovat ECM (obr. 25b, c). Přidání inhibitoru kinázy ROCK (inhibitor Y-27632) k buňkám PR9692 značně inhibovalo jejich invazivní vlastnosti, dokonce ještě pod úroveň invazivní kapacity buněk PR9692-E9 (obr. 25a a 26b) a způsobilo účinný améboidně-mezenchymový přechod (obr. 26c a 27). Naopak buňky nijak nereagovaly na inkubaci se širokospektrálním inhibitorem proteáz GM6001 (obr. 26c). Imunodetekcí (WB) jsme zjistili, že buňky PR9692 produkují méně proteáz MT1-MMP (MMP14). Zymografické určení degradace ECM (želatinu) proteázami MMP-2 spolu s WB naznačují, že buňky PR9692 ve srovnání s PR9692-E9 nebudou k pohybu potřebovat proteázy. Celkem vzato, tyto výsledky dokládají améboidní povahu buněk PR9692.

Abychom lépe prozkoumali úlohu regulační dráhy začínající Rho a končící MLC v améboidní invazivitě buněk PR9692, inhibovali jsme aktivitu těchto molekul silnou expresí jejich dominantně negativních variant z replikačně nekompetentních retrovirových vektorů SFCV. K inhibici aktivity RhoA jsme použili dominantně negativní variantu Rho (dnRho) s inaktivující mutací T19N a k inhibici aktivity MLC jsme použili nefosforylovatelnou variantu MLC (dnMLC) s mutacemi T18A, S19A. Oba mutované geny kódují fúzní proteiny dominantně negativních variant proteinů s GFP. Imunochemickou (WB) detekcí proteinů dnRho a dnMLC, označených GFP, jsme zjistili, že v infikovaných a vyselektovaných buňkách skutečně dochází k expresi těchto variant. Detekované hladiny proteinů dnRho a dnMLC se od sebe lišily, což pravděpodobně odráží buněčnou regulaci stability těchto proteinů, protože rozsah virové integrace i exprese je u všech infikovaných buněk velmi podobný, jak ukazuje imunodetekce neomycin fosfotransferázy II (NPTII) (obr. 26a). Poté jsme prozkoumali účinek inhibice aktivit RhoA a MLC v buňkách PR9692 na buněčnou invazivitu v 3D kolagenu. Zjistili jsme, že inhibice aktivit Rho i MLC vedly k velkému poklesu schopnosti buněk PR9692 invaze v 3D kolagenu (obr. 26b). V dalším kroku jsme analyzovali účinek inhibice regulační dráhy Rho/ROCK/MLC na morfologii buněk v 3D kolagenu. Zatímco inhibice aktivity RhoA anebo inhibice ROCK (pomocí inhibitoru Y-27632) vedly k améboidně-mezenchymovému přechodu, inhibice MLC anebo inkubace s inhibitorem metaloproteináz GM6001 nevedly k významnějším změnám morfologie buněk PR9692 v 3D kolagenu (obr. 26c a 27). Tyto výsledky ukazují na důležitou roli aktivit RhoA, ROCK a MLC v invazivitě metastazujících sarkomových buněk PR9692 do 3D kolagenu.

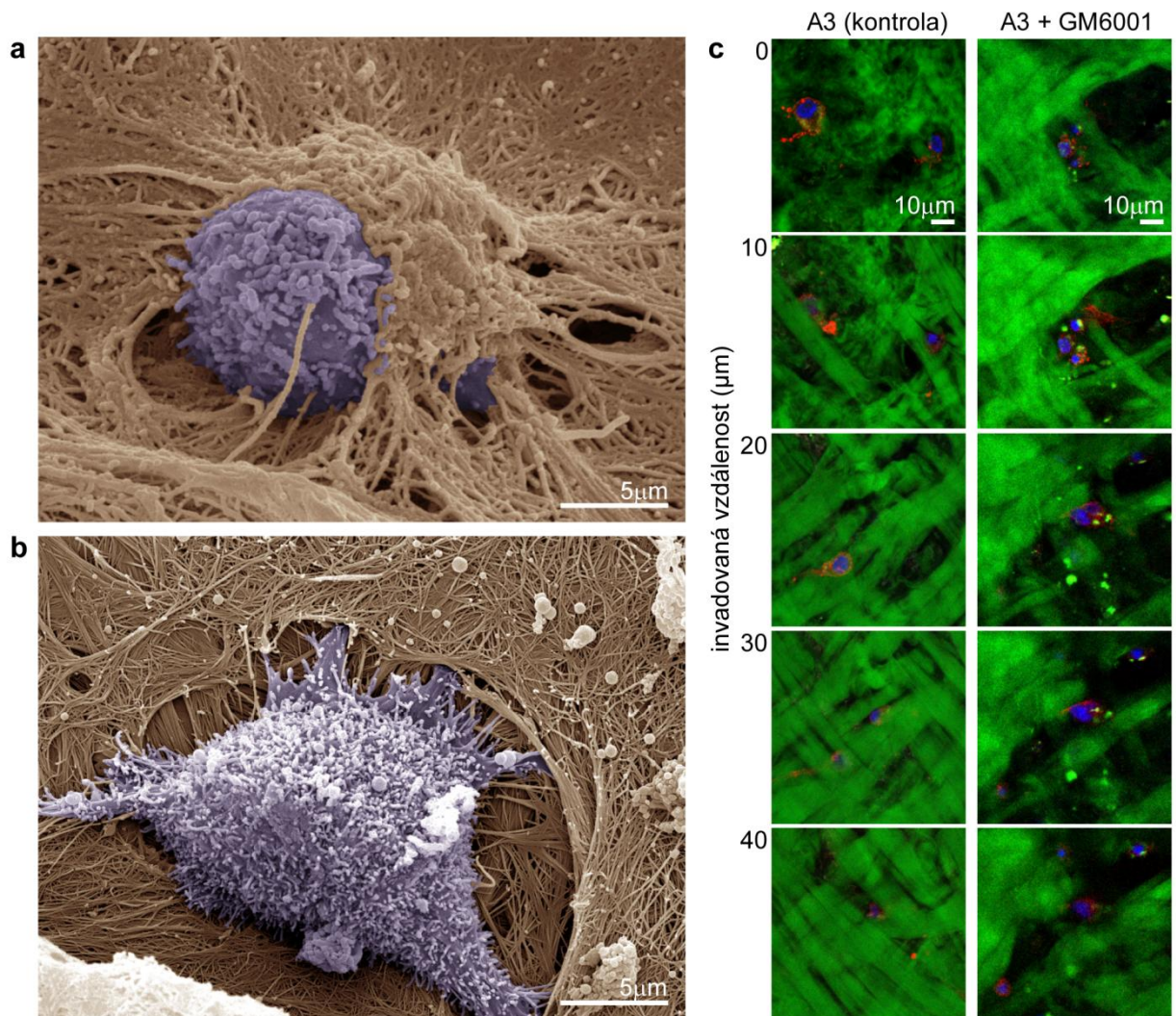
4.2.7 Signalizace dráhou Rho/ROCK/MLC je kriticky důležitá pro améboidní pohyb kryších, silně metastazujících buněk A3 v trojrozměrné kolagenové matrix a bezbuněčné dermis

Abychom ověřili a rozšířili naše poznatky o améboidní invazivitě kuřecích buněk linie PR9692, analyzovali jsme také savčí (kryší), rovněž silně metastazující buňky linie A3. Buňky A3 jsou ve studiu améboidní invazivity již zavedeným modelem a je o nich známo, že používají améboidní pohyb, závislý na Rho/ROCK regulaci jako jejich výchozí způsob invazivity (Rosel et al, 2008). Dále u nich bylo ukázáno, že aktivace signalizace přes Rho/ROCK vede ke zvýšené invazivitě do Matrigelu, spojené se zvýšenou aktivací RhoA a zvýšeným množstvím fosforylovaného MLC na vedoucím okraji buňky. Abychom objasnili role jednotlivých složek signalizace přes Rho/ROCK/MLC a potvrdili výsledky získané u buněk PR9692, připravili jsme také buňky A3 stabilně exprimující dnRhoA (buňky A3dnRhoA, inaktivující mutace T19N) a dnMLC (buňky A3dnMLC, mutace T18A, S19A) spolu s GFP. Přítomnost rekombinantních proteinů obsahujících GFP byla opět potvrzena imunodetekcí (WB) (obr. 28a). U nově připravených linií buněk A3 s dominantně negativními variantami proteinů byla analyzována invazivita a morfologie v 3D kolagenu. V souladu s již publikovanými daty (Rosel et al, 2008) invazivita buněk A3 velmi výrazně poklesla v přítomnosti inhibitoru ROCK (inhibitor Y-27632) a nebyla ovlivněna přítomností širokospektrálního inhibitoru metaloproteináz (inhibitor GM6001). Expresí dominantně negativních variant RhoA i MLC vedly k výraznému snížení schopnosti buněk A3 invaze do 3D kolagenového gelu. Stejně jako v případě buněk PR9692, inhibice aktivity MLC (expresí dnMLC) nevedla k významnější změně morfologie buněk A3 v 3D kolagenu, ale vedla k inhibici invazivity do 3D kolagenu (obr. 28c a 27).

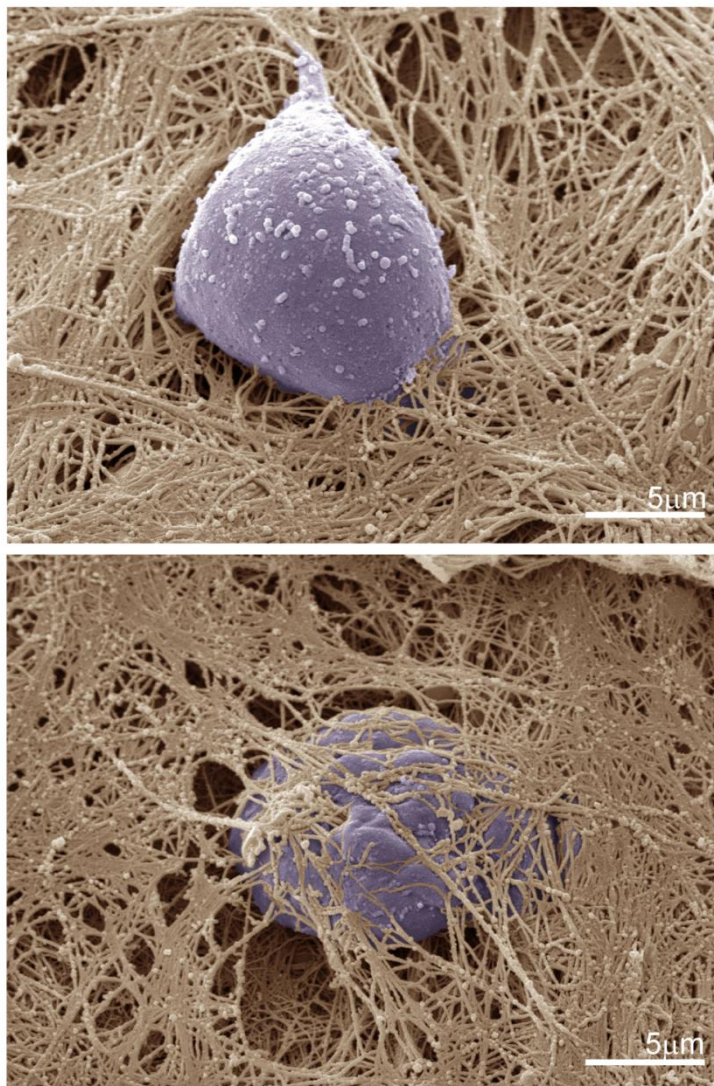
Abychom viděli tvar buněk a interakce mezi buňkami a extracelulární matrix detailněji, buňky byly vysety na matrix odvozenou z dermis a zobrazeny rastrovacím elektronovým mikroskopem (SEM). Matrix odvozená z dermis je substrát, který je biochemicky a biomechanicky blízký matrix v živé tkáni a byl již dříve úspěšně použit za podobným účelem, totiž k objasnění struktury invadopodií (Tolde et al, 2010) a struktury a dynamiky fokálních adhezí (Tolde et al, 2012) v komplexním 3D prostředí. Buňky A3, zobrazené pomocí SEM při začátku invaze do matrix odvozené z dermis, měly zakulacenou morfologii a zjevně neštěpily kolagenová vlákna. Spíše se mezi kolagenovými vlákny protlačovaly (obr. 29a). Obdobně byla tato zakulacená morfologie buněk a invazivita bez štěpení kolagenových vláken pozorována u buněk A3 při invazi do fascie z kryší bránice (obr. 30). Velmi odlišně se chovaly buňky RsK4, které jsou buňkám A3 blíže příbuzné, ale invadují primárně mezenchymovým způsobem.



Obr. 28 Účinek inhibice signalizace jednotlivých složek regulační dráhy Rho/ROCK/MLC na invazivitu a morfologii kryších buněk A3. (a) Imunodetekce rekombinantních proteinů dnRhoA, dnMLC a NPTII v buňkách A3. Detekce proteinů GAPDH byla použita jako kontrola rovnoměrné nanášky proteinů. **(b)** Invazivita buněk do 3D kolagenu *in vitro*. Přítomnost širokospektrálního inhibitoru metaloproteináz GM6001 neměla významnější vliv na invazivitu buněk A3. Inhibice ROCK inhibitorem Y-27632, stejně jako inhibice RhoA v buňkách A3dnRhoA a MLC v buňkách A3dnMLC vedly k významně snížené schopnosti těchto buněk invadovat 3D kolagen. **(c)** Stanovení morfologie buněk v 3D kolagenu *in vitro*. Aktivita RhoA je potřebná pro udržení zakulacené morfologie buněk A3. Inhibice ROCK inhibitorem Y-27632 a inhibice RhoA v buňkách A3dnRhoA vedly k améboidně-mezenchymovému přechodu v 3D kolagenu. Inhibice metaloproteináz inhibitorem GM6001 v buňkách A3 a inhibice MLC v buňkách A3dnMLC neměly významnější vliv na morfologii těchto buněk.



Obr. 29 Buňky A3 invadují améboidním způsobem. Počáteční fáze invaze buněk do matrix odvozené z dermis byly zobrazeny rastrovací elektronovou mikroskopií. **(a)** Buňky A3 si udržovaly zakulacenou morfolonii a během invaze se spíše protlačovaly mezi kolagenovými vlákny. **(b)** Buňky RsK4 byly v dermis umístěny částečně v dutině, která je obklopena smršťenými vlákny. **(c)** Invazivní schopnosti buněk A3 nebyly ovlivněny přítomností 20 μM inhibítozem metaloproteináz GM6001. Buňky A3 byly vysety na dermis označenou FITC (zeleně), po třech dnech kultivace byly fixovány a F-aktin byl obarven faloidinem (červeně) a jádra buněk byly obarveny DAPI (modře). Série optických řezů byla zachycena po vzdálenosti 10 μm.



Obr. 30 Améboidní způsob invaze buněk A3, testovaný na krysí fascii. Buňky A3 si udržovaly zakulacenou morfolologii. Okolí těchto buněk neneso známky degradační aktivity, nenacházejí se tam přerušená vlákna. Ukázány jsou dva reprezentativní obrázky.

Buňky RsK4 byly v dermis typicky umístěny částečně v dutině, která vznikla zjevným štěpením vláken matrix (obr. 29b). Pozorování matrix odvozené z dermis v 3D pomocí konfokálního mikroskopu dále odhalilo, že buňky A3 úspěšně invadovaly do matrix dokonce i v přítomnosti širokospektrálního inhibitoru metaloproteináz (inhibitor GM6001) bez zjevné degradace kolagenových vláken (obr. 29c). Toto pozorování je v souladu s výsledky ze SEM (obr. 29b) a v kontrastu s chováním výše zmíněných buněk RsK4. Je totiž popsáno, že buňky RsK4 výrazně degradují matrix odvozenou z dermis bez přítomnosti inhibitoru GM6001, zatímco v přítomnosti tohoto inhibitoru metaloproteináz nejsou do matrix téměř vůbec schopné invadovat a nechávají ji prakticky neporušenou (Tolde et al, 2010).

4.2.8 Signalizace dráhou Rho/ROCK/MLC je kriticky důležitá pro metastazování buněk PR9692

Abychom zjistili roli aktivace RhoA a fosforylace MLC v metastazování buněk PR9692, inokulovali jsme kuřata buňkami PR9692-mock, PR9692-dnMLC a PR9692-dnRhoA. Zvířata byla zabita 21, 28 a 35 dní od inokulace buněčnými liniemi a přítomnost metastáz v plicích byla vyhodnocena při následující pitvě. Příklady klasifikace plicních metastáz do tří kategorií podle jejich množství a velikosti jsou zobrazeny na obrázku 22. Velikost primárních nádorů nekorelovala s počtem a velikostí metastáz anebo proliferační rychlostí buněk *in vitro*, protože vložení caRhoA, dnRhoA nebo dnMLC do buněk (infekcí) v podstatě nemělo žádný vliv na růst buněk *in vitro* ve srovnání s MOCK. Rozdíl v proliferaci infikovaných (MOCK, caRhoA, dnRhoA a dnMLC) a neinfikovaných buněk byl zanedbatelný (maximálně 7% času zdvojení neinfikovaných buněk) (tab. EP8 a EP9 v elektronické příloze této práce). Ukázalo se, že inhibice signalizace přes RhoA v buňkách PR9692-dnRhoA a inhibice aktivity MLC v buňkách PR9692-dnMLC (obě inhibice vedly k snížené invazivitě do 3D kolagenu) vedly k významnému poklesu tvorby metastáz těmito buňkami. Redukce metastazování byla zaznamenána ve většině zvířat inokulovaných at' už buňkami PR9692-dnRhoA nebo buňkami PR9692-dnMLC, srovnávaných s kontrolními buňkami PR9692-mock nebo PR9692. Zatímco buňky PR9692-mock a PR9692 tvoří metastázy ve 100% případů, buňky PR9692-dnRhoA a PR9692-dnMLC dávají vzniknout metastázám jen u asi 50% inokulovaných zvířat. Důležitý je také fakt, že velikosti a množství metastáz byly u zvířat inokulovaných buňkami PR9692-dnRhoA menší než ty indukované inokulací buněk PR9692-mock nebo PR9692 (tab. 6). Celkem vzato, výše uvedené výsledky ukazují na důležitou roli aktivit regulačních molekul RhoA, ROCK a MLC v metastazování sarkomových buněk PR9692.

4.2.9 Aktivace RhoA v nemetastazujících buňkách PR9692-E9 vede k obnovení invazivních vlastností a metastazování těchto buněk

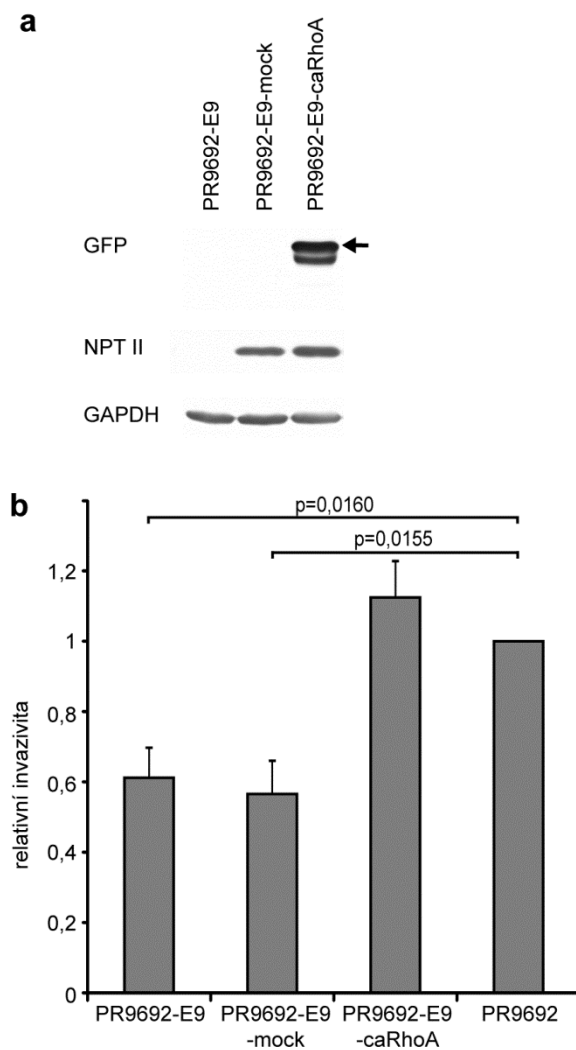
Nakonec nás zajímalo, jestli aktivace signalizace přes regulační proteiny Rho/ROCK/MLC spuštěná expresí konstitutivně aktivní RhoA (caRhoA, aktivující mutace G14V) povede k obnovení metastazování buněk PR9692-E9. Buňky PR9692-E9 jsme za tímto účelem infikovali replikačně nekompetentními retroviry, které kódovaly rekombinantní fúzní proteiny caRhoA s GFP. U takto vzniklých buněk PR9692-E9-caRhoA, rezistentních k neomycinu, jsme imunodetekcí (WB) potvrdili přítomnost rekombinantních proteinů caRhoA značených GFP a ověřili rozsah virové integrace i exprese detekcí neomycin fosfotransferázy II (NPTII) (obr. 31a). Jako kontrolní buňky byly opět používány buňky PR9692-E9-mock a PR9692-E9. Imunodetekce NPTII ukázala, že rozsah virové integrace i exprese je u obou infikovaných buněk velmi podobný. Nejdříve jsme porovnali schopnost invaze buněk PR9692-E9-caRhoA, kontrolních buněk PR9692-E9 i PR9692-E9-mock a buněk PR9692 do 3D kolagenu *in vitro*. Zjistili jsme, že buňky PR9692-E9-caRhoA invadují do 3D kolagenu ještě trochu účinněji než buňky PR9692 a tedy výrazně účinněji než buňky PR9692-E9 anebo PR9692-E9-mock (obr. 31b). Pak jsme porovnali metastazování buněk PR9692-E9, PR9692-E9-mock a PR9692-E9-caRhoA. Zvířata inokulovaná testovanými buňkami byla zabita 28, 35 a 45 dní od inokulace a přítomnost metastáz v plicích byla vyhodnocena při následující pitvě. Ukázalo se, že aktivace signalizace proteinem RhoA v buňkách PR9692-E9-caRhoA vedla k obnovení metastazování buněk PR9692-E9. Tvorba metastáz všech tří kategorií (+, ++, +++) byla zaznamenána u asi 55% zvířat inokulovaných buňkami PR9692-E9-caRhoA, zatímco u zvířat inokulovaných kontrolními buňkami PR9692-E9 anebo PR9692-E9-mock nebyly pozorovány žádné metastázy (tab. 7). Celkem vzato, tyto výsledky ukazují, že aktivace regulační signalizace dráhou RhoA/ROCK/MLC expresí konstitutivně aktivní RhoA je dostatečná k obnovení invazivity a metastazování jinak nemetastazujících sarkomových buněk PR9692-E9.

rakovinné buňky	21 dní po inokulaci			28 dní po inokulaci			35 dní po inokulaci					
	kuřata s metastázami/ inokulovaná kuřata	počet a velikost metastáz			kuřata s metastázami/ inokulovaná kuřata	počet a velikost metastáz			kuřata s metastázami/ inokulovaná kuřata	počet a velikost metastáz		
		+	++	+++		+	++	+++		+	++	+++
PR9692	15/15	20,0	20,0	60,0	16/16	12,5	18,8	68,8	8/8		37,5	62,5
PR9692-mock	2/2		100,0		21/21	28,6	38,1	33,3	3/3		33,3	66,7
PR9692-dnRhoA					7/18	42,9	57,1		10/15	50,0	40,0	10,0
PR9692-dnMLC	1/4			100,0	3/8		66,7	33,3	11/21	27,3	45,5	27,3

Tab. 6 Účinek inhibice signalizace molekulami RhoA a MLC na metastazování buněk PR9692. Inhibice signalizace RhoA v buňkách PR9692-dnRhoA a inhibice aktivity MLC v buňkách PR9692-dnMLC vedly k významnému snížení metastazování těchto buněk. Procenta jednotlivých kategorií plicních metastáz byla počítána pouze u zvířat, která vytvořila metastázy.

rakovinné buňky	28 dní po inokulaci			35 dní po inokulaci			45 dní po inokulaci					
	kuřata s metastázami/ inokulovaná kuřata	počet a velikost metastáz			kuřata s metastázami/ inokulovaná kuřata	počet a velikost metastáz			kuřata s metastázami/ inokulovaná kuřata	počet a velikost metastáz		
		+	++	+++		+	++	+++		+	++	+++
PR9692-E9	0/6				0/17				0/5			
PR9692-E9-mock	0/2				0/15				0/9			
PR9692-E9-caRhoA	5/9	80,0	20,0		13/24	38,5	30,8	30,8	6/11	33,3	16,7	50,0

Tab. 7 Zvýšená aktivace RhoA v buňkách PR9692-E9 vedla k obnovení metastazování těchto buněk. Procenta jednotlivých kategorií plicních metastáz byla počítána pouze u zvířat, která vytvořila metastázy.



Obr. 31 Zvýšená aktivace RhoA v buňkách PR9692-E9 vede k zvýšení invazivních vlastností těchto buněk v 3D kolagenu. **(a)** Imunodetekce rekombinantních proteinů caRhoA v buňkách PR9692-E9-caEhoA. Proteiny celé délky jsou označeny šipkou. Detekce proteinů GAPDH byla použita jako kontrola rovnoměrné nanášky proteinů. **(b)** Invazivita buněk do 3D kolagenu *in vitro*. Aktivace RhoA v buňkách A3caRhoA vedla k významně zvýšené schopnosti těchto buněk invadovat 3D kolagen, dokonce invadují ještě trochu účinněji než buňky PR9692.

5. Diskuze

Naše práce se dotýká studia závažných lidských onemocnění (fibróza a rakovina), na která v současné době neexistuje účinná léčba. Právě v případech, kdy selhává léčba založená na poznatcích z převážně savčích modelů (používaných primárně, z pochopitelných důvodů), je vhodné využít pro vyhledání obecně platných molekulárních mechanismů i jiné druhy. Srovnání výsledků z různých živočišných druhů (od sebe různě evolučně vzdálených) umožňuje ve studovaných buněčných procesech (v některých druzích zjednodušených) odhalit ty zásadní molekulární mechanismy, na které by se měly terapeutické přístupy zaměřit. My jsme pro studium použili kuřecí model (*Gallus gallus*), protože se již jedná o jinou živočišnou třídu (ptáci, *Aves*), ale stále patřící mezi teplokrevné a blanaté (*amniota*) živočichy, která se od společného předka s třídou savců (*Mammalia*) oddělila před asi 300 milióny lety (Hedges et al, 2006). Kuřecí model byl navíc v minulosti použit pro objevení a poznání mnoha, pro lidskou medicínu zcela zásadních molekulárně-biologických procesů.

5.1 Studium myofibroblastů

V první části mé dizertační práce jsme se snažili připravit kuřecí model pro studium myofibroblastů, pochopit mechanismy udržující fenotyp myofibroblastů a nakonec tento fenotyp různými prostředky potlačit. Protože myofibroblasty hrají klíčovou úlohu v některých závažných lidských onemocněních, nalezení molekulárních mechanismů vedoucích k odstranění myofibroblastů (dediferenciací nebo vyvoláním buněčné smrti) by mohlo zásadním způsobem ovlivnit léčbu fibrotických onemocnění a možná i rakoviny.

Naše práce uvádí na pole studia molekulární biologie myofibroblastů nový, nesavčí buněčný model, zakládající se na kuřecích primárních kožních myofibroblastech (CEDM, z anglického Chicken Embryo Dermal Myofibroblasts). Buňky CEDM jsou vhodným modelem, protože se jedná o buňky primární, které vykazují výrazný a v čase stabilní fenotyp myofibroblastů (obr. 7).

V tomto modelu jsme studovali fenotyp i genovou expresi myofibroblastů před i po zablokování signální dráhy TGF- β . Převažuje totiž názor, že signální dráha TGF- β hraje ústřední roli v diferenciaci myofibroblastů a nás zajímalo, jak se bude fenotyp myofibroblastů zablokováním signální dráhy TGF- β měnit a zda budeme tímto způsobem schopní myofibroblasty dediferencovat. Výsledky získané zablokováním signální dráhy TGF- β jsme ověřili aktivací signalizace dráhou TGF- β v kuřecích fibroblastech DF1 pomocí ligandu TGF- β 3. Avšak o roli TGF- β 3 v myofibroblastech a fibróze byly publikovány protichůdné výsledky.

Několik publikací dokonce ukazuje, že izoformy TGF- β 1 a TGF- β 3 mají opačný účinek, přičemž působení TGF- β 3 přikládají antifibrotický účinek (Serini and Gabbiana, 1996). Nicméně nebyl předložen molekulární mechanismus, který by vysvětloval tato pozorování, která jsou navíc v rozporu s intuitivním očekáváním. Zralé peptidy TGF- β 1 a TGF- β 3 totiž vykazují vysoký stupeň sekvenční podobnosti (77% u člověka, 72% u kuřete) a aktivují stejné receptory a aktivovanými receptory spouštěnou stejnou signalizaci. Jiné práce dokládají, že aktivity obou izoform jsou ve spouštění exprese a diferenciaci myofibroblastů velmi podobné a to jak *in vitro*, tak *in vivo* (Jobling et al, 2009; Lanning et al, 2000). Nakonec i námi vyvolaná dediferenciaci buněk CEDM stabilní expresí EGR4 souvisela s razantním poklesem hladiny TGF- β 3 (obr. 15 a tab. 3), nikoliv s významnější změnou hladiny exprese TGF- β 1 a silná exprese TGF- β 3 dokázala zrušit dediferenciaci buněk CEDM vyvolanou expresí EGR4 (obr. 16). TGF- β 3 je současně silněji exprimovanou izoformou v buňkách CEDM (obr. 11c) a její exprese je citlivá na inhibici signální dráhy TGF- β (obr. 11c), potvrzující teorii o autoregulační smyčce. Naše výsledky ukazují, že exprese mnoha genů, která je v savčích buňkách regulovaná signální dráhou TGF- β , je obdobně regulovaná i v buňkách CEDM (tab. EP3). Tato data dokládají rozsáhlé uchování základních regulačních mechanismů týkajících se hojení ran a fibróz mezi dvěma nepřilíživě vzdálenými třídami živočichů.

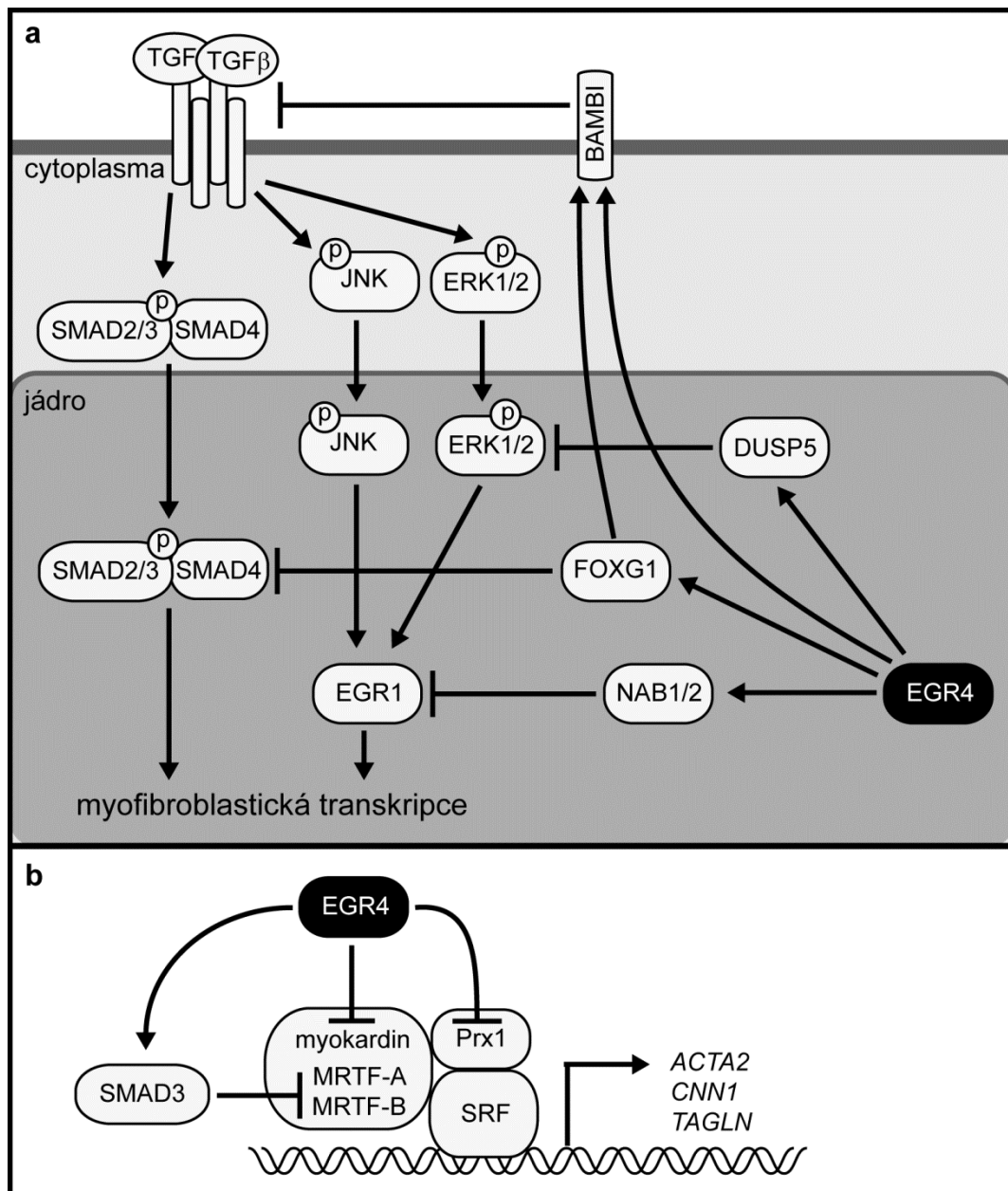
Expresní profilování buněk CEDM odhalilo celou řadu genů, jejichž regulace signální dráhou TGF- β nebyla v myofibroblastech dosud popsána. Některé z takových genů (např. FAM180A, TMEM45A) byly zatím jenom předpovězené z genomových sekvencí a naše práce jako první nastiňuje jejich funkci. Např. role produktu genu FAM180A je doposud neznámá, ale mělo by se jednat o relativně malý secernovaný protein. Vzhledem k faktu, že je jeho exprese v buňkách CEDM řízená signální dráhou TGF β , je velmi pravděpodobné, že bude hrát (coby mimobuněčný signál) roli v hojení ran. Relativně vysoká identita cDNA s lidským ortologem a velmi vysoká identita regulačních elementů (data neukázána) v odhadované promotorové oblasti tohoto genu z něj činí velmi zajímavý cíl dalšího zkoumání. Naše výsledky potvrzují centrální úlohu myofibroblastů v hojení ran a v některých detailech prohlubují její molekulární pochopení. Myofibroblasty se sekrecí růstových faktorů patrně významně podílí na koordinaci angiogeneze prostřednictvím PGF a VEGFA, lymfangiogeneze pomocí VEGFC, proliferace epitelů přes SDF1 a PTN, regenerace nervů prostřednictvím NGF a modulace imunitního systému přes sekreci IL-6 a IL-16. Produkce těchto růstových faktorů, stejně jako mnoha různých komponent ECM (obr. 8a, b a 10) jsou podle našich zjištění v myofibroblastech pod kontrolou signální dráhy TGF β . Některé z těchto aktivit myofibroblastů, které za

fyziologických podmínek slouží k hojení ran, se za patologických podmínek podílí na vzniku fibrotických a nádorových onemocnění a potvrzují názor, že nádor je rána která se nikdy nezahojí (Dvorak, 1986). Mezi další geny, jejichž exprese je v buňkách CEDM regulována signální dráhou TGF β , patří geny kódující transkripční faktory CREB3L1 a CREB3L2 i geny SCG2 a SEC14L1. Skutečnost, že tyto transkripční faktory řídí expresi mnoha součástí sekreční dráhy a geny SCG2 a SEC14L1 kódující komponenty sekreční dráhy, jen dále dokládá hypotézu, že signální dráha TGF β obecně stimuluje sekreční funkci myofibroblastů. Mezi geny kódující transkripční faktory, jejichž exprese je regulována signální dráhou TGF β , patří i ZIC1. Nedávno bylo publikováno, že tento transkripční faktor je součástí regulační sítě zajišťující vnímání mechanických vlastností okolí v osteoklastech (Kalogeropoulos et al, 2010). Bylo by zajímavé zjistit, jestli hraje podobnou úlohu i u myofibroblastů, protože vnímání mechanických vlastností okolí jistě silně ovlivňuje fenotyp myofibroblastů (Hinz et al, 2007). Výsledky naší práce také dokládají závislost exprese klíčových regulačních proteinů signálních drah hedgehog, wnt a cAMP na autokrinní stimulaci dráhou TGF- β a prohlubují tak pochopení regulační sítě, která udržuje fenotyp myofibroblastů. Role uvedených drah v této regulační síti by si jistě zasloužila další výzkum. Fakt, že jsme expresi genu HHIP nyní identifikovali jako cíl regulace signální dráhou TGF β v buňkách CEDM naznačuje, že součástí fenotypu myofibroblastů může být určitá úroveň rezistence k aktivaci signální dráhy hedgehog jejími ligandy. Regulátory celé sítě signalizace molekulou cAMP jsou potenciálně zajímavé z terapeutického hlediska, protože aktivita takových regulátorů může být ovlivněna již dostupnými a klinicky ověřenými látkami. Změny v hladině cAMP by následně mohly mít vliv na fenotyp myofibroblastů. Také hladiny jiných genů, jejichž produkty (protein tyrozinová kináza RET, receptory spojené s proteinem-G GPR1 a GPR160) je možné ovlivnit prověřenými látkami, byly ve skupině genů se sníženou expresí po působení MPPN. Nejcitlivěji reagovala na působení MPPN exprese genu NR4A3, která je pod přímou kontrolou signální dráhy MAPK. Dopad farmaceutické regulace proteinů těchto signálních drah na fenotyp myofibroblastů by si zasloužil další pozornost, protože může mít důsledky v klinické praxi. Data z mikročipové analýzy exprese genů a jejich následné potvrzení různými molekulárně biologickými/biochemickými technikami silně podporují představu, že diferenciaci myofibroblastů a udržení jejich fenotypu je složitý a komplexní proces, během kterého dochází jak k aktivaci, tak i snížení exprese značného množství genů v závislosti na aktivitě signální dráhy TGF β . Tato představa je nadále podpořena transkripčním vzorcem typickým pro mezenchymové kmenové buňky, aktivovaným v buňkách CEDM po inhibici signální dráhy

TGF β . Naše výsledky tedy popírají tradiční a ještě přetrvávající představu, že myofibroblasty vznikají především tak zvanou „aktivací“ dormantních fibroblastů. Z tradiční představy totiž vyplývá, že při aktivaci signální dráhy TGF β bude docházet hlavně k aktivaci transkripce genů. Navíc inhibice signální dráhy TGF β vede k aktivaci exprese skupin genů jako NPR3, AGTR2 a MTUS1 nebo genů SOD3, NOV, VTN a SEPP1 (kódujících secernované proteiny), o nichž bylo publikováno nebo se dá odvodit, že hrají antagonistickou roli při diferenciaci myofibroblastů. Nabízí se tedy představa, že myofibroblasty kultivované v přítomnosti inhibitoru signální dráhy TGF β započaly specifický a řízený proces dediferenciace. Detailní pochopení takového procesu a úloh v něm zapojených molekul by mohlo v budoucnu vést k účinné léčbě fibrotických anebo nádorových onemocnění. Právě výše uvedené secernované molekuly by (v rekombinantní formě) mohly být kandidáty na léčebné látky. Nicméně i dlouhodobá inhibice signální dráhy TGF β vedla v buňkách CEDM pouze ke snížení sekrečních funkcí a nikoliv ke ztrátě charakteristických rysů myofibroblastů (obr. 12 a 13). Výše uvedená data tedy naznačují, že signální dráha TGF β řídí v buňkách CEDM především produkci některých složek ECM a některých secernovaných faktorů, není však jediným a určujícím regulátorem celého fenotypu myofibroblastů. Především kontrola exprese genů souvisejících s tvorbou a kontraktilitou vláken α SMA je převážně nezávislá na signální dráze TGF β . V souladu s našimi výsledky byla nedávno popsána obdobná neschopnost potlačit expresi α SMA inhibováním signální dráhy TGF β v lidských diferencovaných myofibroblastech (Hecker et al, 2011). Jejich experimentální model používal lidské plicní fibroblasty IMR-90, které po inkubaci s TGF- β 1 diferencují na myofibroblasty. Inhibitor TGFBR1 (konkrétně inhibitor SB431542) sice blokoval expresi α SMA a diferenciaci fibroblastů IMR-90 na myofibroblasty indukovanou TGF- β 1, pokud byla ale nejdříve indukována diferenciací (vyvolaná inkubací s TGF- β 1), inhibitor již neměl na expresi α SMA vliv. Naše data a výsledky z laboratoře Dr.Thannickala (Hecker et al, 2011) tedy ukazují, že signalizace dráhou TGF β není jediným a klíčovým regulátorem již diferencovaného fenotypu myofibroblastů buněk CEDM. Je vhodné podotknout, že naše výsledky nejsou v protikladu s publikovanými pozorováními, která ukazují schopnost TGF β spustit plnohodnotnou diferenciaci myofibroblastů za různých experimentálních a dokonce i *in vivo* podmínek. Naše data spíše poukazují na možnost, že jakmile buňky dodiferencují do stádia myofibroblastů, některé fenotypické rysy myofibroblastů mohou být zachovány i bez přítomnosti signalizace přes dráhu TGF β . Na zachování rysů by mohly mít podíl nitrobuňčné regulační pozitivní zpětné vazby anebo autokrinně secernované faktory odlišné od TGF β . Také signální dráhy spojené s adhezí

buněk a stavem cytoskeletu zajišťující vnímání mechanických vlastností okolí (tzv. “mechanosensing”) mohou podle literatury hrát zásadní roli v udržení vlastností myofibroblastů (Hinz et al, 2007). Je tedy třeba dále hledat ostatní molekulární mechanismy, které by vedly ke ztrátě obou (sekrece ECM a růstových faktorů i tvorba α SMA) charakteristických rysů myofibroblastů.

Při hledání molekulárních mechanismů, které by dokázaly zcela potlačit charakteristické rysy myofibroblastů jsme se zaměřili na signální dráhu MAPK, která je spouštěná ligandem PDGFB. Schopnost ligandu PDGFB potlačit charakteristické rysy myofibroblastů totiž byla nedávno popsána v lidském modelovém systému (Hecker et al, 2011). Výsledky prezentované v této práci ukazují, že trvalá exprese PDGFB, Ha-Ras(G12V) nebo transkripčního faktoru EGR4 vyvolávají v myofibroblastech (CEDM) ztrátu rysů typických pro fenotyp myofibroblastů a působí tedy jejich kompletní dediferenciaci. V případě EGR4 je tato interpretace ještě dále podpořena daty o genové expresi (obr. 15), která ukazují známky začínající adipogení (FABPs, EGFL6, APOA1, PPARA) a chondrogení (COL2A1) diferenciací. V buňkách CEDM trvale exprimujících EGR4 také dochází k aktivaci exprese některých epiteliových markerů (KRT14, KRT19, CLDN1, DSC2). Přesto buňky CEDM trvale exprimující EGR4 nevykazují zjevné známky terminální diferenciací, neboť nedošlo ke zkrácení limitu dělení („life-span“) těchto buněk: buňky proliferují po dobu asi 6 týdnů a vypadají jako homogenní populace nediferencovaných mezenchymových buněk. Ukazujeme, že trvalá exprese EGR4 v myofibroblastech (CEDM) extrémně potlačuje signalizaci dráhou TGF- β a zároveň jsme našli několik možných zprostředkovatelů tohoto účinku (viz. hypotetické schématické shrnutí v obr. 32a). Mezi těmito zprostředkovateli zřejmě hraje hlavní roli transkripční faktor FOXG1, jehož trvalá exprese z retrovirového vektoru vyvolává fenotypické změny srovnatelné se změnami vyvolanými expresí EGR4. Trvalá exprese ostatních možných zprostředkovatelů nebyla schopná vyvolat obdobné změny. Zajímavé je, že jsme patrně jako první zaznamenali expresi FOXG1 mimo kraniofaciální oblast a v mezenchymových buňkách. Role proteinů BAMBI, NAB1, NAB2 a DUSP5 se tedy zdá méně důležitá, ale zajisté ji nelze vyloučit. Vzhledem k tomu, že hladina proteinů FOXG1 v buňkách s trvale exprimovaným EGR4 nedosahuje úrovně, kterou má FOXG1 po expresi z integrovaného retrovirového vektoru, FOXG1 pravděpodobně potřebuje pro navození účinků způsobených expresí EGR4 ještě spolupráci dalších proteinů a sám o sobě by nestačil. Nedávno bylo publikováno, že ektopická exprese NAB2 (korepresor transkripčních faktorů EGR1, EGR2 a EGR3) ve fibroblastech blokovala jejich diferenciaci na myofibroblasty indukovanou TGF- β 1. My jsme pozorovali podobný účinek u proteinu NAB1, kdy trvale exprimovaný



Obr. 32 Hypotetický mechanismus působení trvalé exprese EGR4 v buňkách CEDM. (a) Uspořádání signálních drah zapojených v diferenciaci myofibroblastů a způsob, jakým EGR4 pravděpodobně interferuje s těmi to drahami. FOXG1 interferuje s aktivitou proteinů SMAD, BAMB1 negativně reguluje signalizaci přes receptory TGF- β , DUSP5 inaktivuje kinázy ERK, proteiny NAB1 a NAB2 reprimují transkripci genů spojených s fenotypem myofibroblastů, řízených proteinem EGR1. **(b)** Imunodetekce Za schopností EGR4 snížit expresi genů spojených s kontrakcí vláken α SMA může být hned několik regulací. Nepřímá stabilizace proteinů SMAD2/3 může vyvolat represi aktivit proteinů MRTF. Snížení exprese myokardinu a Prx1 vede k snížení aktivace transkripce genů, řízených aktivitou transkripčního faktoru SRF.

NAB1 v linii fibroblastů DF1 bránil diferenciaci na myofibroblasty indukovanou TGF- β 3 (V. Čermák, nepublikováno). Stálá exprese EGR4 vyvolává v buňkách CEDM velké zvýšení exprese jak NAB1, tak i NAB2 (tab. 3 a obr. 17a, b). Je také známo, že EGR1 se podílí na transdukci signálu spuštěného TGF- β 1 v savčích myofibroblastech a přímo aktivuje transkripci některých genů (např. COL1A2, FN1, PAI1 a také TGFB1) regulovaných signální dráhou TGF- β v těchto buňkách (Chen et al, 2006; Liu et al, 1999). Schopnost EGR4 inhibovat expresi a aktivitu EGR1 přes potlačení signalizace dráhou MAPK (ERK a JNK) a zvýšení hladiny NAB korepresorů by tak mohla být důležitou částí komplexního procesu, vedoucího k dediferenciaci myofibroblastů. Fakt, že samotný, trvale exprimovaný NAB1 není schopen potlačit fenotyp myofibroblastů u buněk CEDM, může poukazovat na velkou stabilitu fenotypu myofibroblastů po jeho kompletní diferenciaci. Tento stabilní, plně diferencovaný fenotyp by mohl být méně citlivý k narušení aktivity jednotlivých regulátorů, zatímco počáteční fáze diferenciaci myofibroblastů by mohla být narušitelná snadněji.

Zajímavým aspektem působení exprese EGR4 v myofibroblastech je jeho schopnost snížit expresi genů spojených s kontrakcí aktinového cytoskeletu (např. ACTA2, CNN1 a TAGLN). Výsledky v tab. 3 a obr. 17a ukazují, že samotná inhibice signalizace TGF- β (pomocí inhibitoru MPPN) není v buňkách CEDM dostatečná k významnému snížení exprese těchto genů. Zjistili jsme, že působení MPPN vede u buněk CEDM pouze k dočasnému snížení exprese myokardinu (MYOCD) (obr. 13a), ale nedojde k žádnému snížení exprese ACTA2, CNN1 nebo TAGLN (tab. 3 a 17a). Z toho vyplývá, že EGR4 používá jiný mechanismus, ačkoliv stále pětinasobné snížení exprese MYOCD (obr. 15) pravděpodobně také bude hrát roli. Je velmi pravděpodobné, že myokardinu příbuzné transkripční faktory MRTF-A a MRTF-B jsou na promotorech obsahujících CARG sekvence v buňkách CEDM stejně důležité koaktivátory SRF jako v savčích myofibroblastech a mohou zastoupit sníženou hladinu myokardinu (Crider et al, 2011). V buňkách CEDM s trvale exprimovaným EGR4 by zvýšená stabilizace proteinů SMAD2/3 (obr. 17a) mohla potlačovat transkripci z promotorů (např. pro ACTA2, kódující α SMA), na kterých je potřeba koaktivace transkripce proteiny MRTF a SRF. Bylo totiž ukázáno, že SMAD3 fyzicky interaguje s MRTF a negativně ovlivňuje transkripci, na které se MRTF podílí (Masszi et al). Další částí mechanismu může být snížení exprese genu PRRX1 (obr. 15), jehož exprese je snížena v buňkách CEDM exprimujících EGR4, ale není ovlivněna inhibicí signalizace dráhou TGF- β . Gen PRRX1 kóduje transkripční faktor Prx1, který spolupracuje na promotoru se SRF a myokardinem při spouštění transkripce genu ACTA2 v buňkách hladkého svalstva (Yoshida et al, 2004). Všechny možné mechanismy,

kterými trvalá exprese EGR4 může v buňkách CEDM snižovat expresi genů spojených s kontrakcí vláken α SMA je schematicky zobrazena na obr. 31.

V současné době je účinná léčba fibrotických onemocnění stále ještě nereálná, ale existuje několik léčebných přístupů, které se zaměřují na myofibroblasty a jejichž cílem je dosažení alespoň zpomalení těchto závažných onemocnění. Primárním cílem léčby je, kvůli důležité roli v biologii myofibroblastů, signalizace spouštěná TGF- β 1. Mezi možné strategie, kterými by mohla být potlačena patologická aktivace signalizace dráhou TGF- β v myofibroblastech patří např. blokování povrchových molekul aktivujících latentní formu TGF- β , blokování receptorů pro TGF- β (TGFBR1/ALK5), blokování ligandu (TGF- β) protilátkami specifickými pro všechny izoformy TGF- β nebo blokování signalizace ligandem (TGF- β) pomocí rekombinantních rozpustných receptorů pro TGF- β anebo proteinů spojených s latentní formou TGF- β (Asano; Leask, 2008; Leask, 2010). Naše data prezentovaná v této práci ale ukazují, že samotná inhibice signalizace dráhou TGF- β není dostatečná k potlačení fenotypu myofibroblastů buněk CEDM a k podobnému závěru došla také práce provedená na lidských buňkách (Hecker et al, 2011). Potlačení fenotypu myofibroblastů buněk CEDM může být dosaženo kombinací chemických látek, které inhibují signalizaci dráhou TGF- β a současně narušují signalizaci dráhou MAPK pomocí forbolového esteru (TPA). Výraz „narušení“ vyjadřuje skutečnost, že výsledný stav signalizace dráhou MAPK nemůže být jednoduše popsán jako aktivace nebo inhibice. Jak ukazují obr. 14b, 17b a 18b, hladiny aktivovaných (fosforylovaných) proteinů ERK a JNK se výrazně liší mezi buňkami se stálou expresí PDGFB, Ha-Ras(G12V), EGR4 nebo opůsobených TPA. Důvodem těchto nesrovnalostí může být odlišná rovnováha mezi stálou aktivací signální dráhy ERK (v případě PDGFB, Ha-Ras a TPA) a složitým systémem mocných zpětnovazebných smyček. Aktivace zpětnovazebných smyček následně ovlivňuje nejen signalizaci dráhou ERK, ale i ostatních drah MAPK. Přesný molekulární mechanismus zodpovědný za potlačení exprese genů spojených s kontrakcí vláken α SMA po narušení signalizace dráhou MAPK v myofibroblastech je neznámý, ale jeho objasnění představuje lákavou výzvu pro budoucí výzkum. Přestože se nám podařilo různými způsoby dediferencovat myofibroblasty *in vitro*, nevíme, jestli lze myofibroblasty obdobným způsobem bez vážných vedlejších následků dediferencovat i za podmínek *in vivo*. Jak použití inhibitoru, tak použití forbolového esteru TPA by totiž mohlo za různých podmínek vést k nechtěným a nepříjemným důsledkům (obě látky mohou za určitých podmínek fungovat jako silné aktivátory proliferace buněk). Dále je potřeba zjistit, zda se savcí (především lidské) buňky budou chovat stejným způsobem. Naše výsledky dokládají značné evoluční zachování

mechanizmů regulujících fenotyp myofibroblastů dávají velkou naději, že se ptačí i savčí buňky budou chovat obdobně.

5.2 Studium molekulární podstaty metastazování fibrosarkomových buněk

V druhé části mé dizertační práce jsme se snažili odhalit alespoň některé molekulární mechanismy, které vedou k metastazování agresivní fibrosarkomové linie PR9692. Zároveň jsme chtěli pro vědeckou komunitu lépe charakterizovat model metastazujících buněk PR9692 a z nich klonálně odvozených nemetastazujících buněk PR9692-E9, protože byl popsán pouze jedinou prací (Plachy & Vilhelmova, 1984).

Transkripční kontrola stojící za metastazováním transformovaných epitelových (karcinomových) buněk byla a je intenzivně studována. Transkripční faktory (např. twist, ZEB1, ZEB2, snail, slug, TCF3), které se této kontrole účastní, jsou téměř vždy regulátory nastolení a udržení mezenchymového fenotypu (Peinado et al, 2007; Yang et al, 2004). Ačkoliv transformované mezenchymové (sarkomové) buňky exprimují všechny tyto transkripční faktory, ne všechny nádory mezenchymového původu metastazují. Tento fakt naznačuje existenci další úrovně regulace, která řídí transkripci genů důležitou v metastazování. Vzhledem ke komplexnosti celého procesu metastazování, exprese genů řízená (nejen) takovou transkripční regulací bude důležitá pro celou řadu buněčných aktivit, jako jsou invazivita (schopnost invadovat) do tkání obecně (zahrnující buněčnou motilitu a degradaci ECM), přežití v krevním řečišti, adheze k endotelu atd..

Podrobnou analýzou expresních profilů metastazujících buněk PR9692 a nemetastazujících buněk PR9692-E9 jsme vytipovali transkripční faktor EGR1, jako možný regulátor transkripčního profilu spojeného s metastazováním. Trvalá exprese EGR1 v buňkách PR9692-E9 vedla k plnému obnovení schopnosti metastazovat. Porovnáním expresních profilů metastazujících buněk PR9692 a PR9692-E9-ME-EGR1 s profilem nemetastazujících buněk PR9692-E9 jsme odhalili řadu genů, jejichž exprese souvisí s metastazováním a současně je řízená EGR1. Exprese genů, jejichž transkripce je podle našich výsledků řízená transkripčním faktorem EGR1, se podílí na celé řadě procesů, které jsou zjevně potřebné pro metastazování buněk. Např. produkty genů MYL9 a MYO10 hrají roli v motilitě, RIAM v adhezi buněk a tedy i signalizaci z míst jejich adheze, PCSK6 v aktivaci mimobuněčných proteáz degradujících ECM a NCAM v adhezi buněk k endotelu. Pravděpodobně nejzajímavějším genem, jehož transkripce byla ovlivněna expresí EGR1 je MYL9 (MLC2). Exprese MLC2 umožňuje kontrakce aktinomyozinového cytoskeletu, které jsou nezbytným předpokladem pro

všechny typy buněčné motility nádorových buněk. Bylo popsáno, že exprese MLC2 je řízena komplexem MRTF – SRF buněčných nádorových liniích lidského karcinomu prsu a myšího melanomu (Medjkane et al, 2009). Jak již bylo dříve zmíněno, transkripční faktor SRF ve spolupráci s koaktivátory z rodiny proteinů příbuzných myokardinu, regulují expresi genů souvisejících s kontrakcí aktinového cytoskeletu v buňkách hladkého svalstva a myofibroblastech (Miano et al, 2007). V buňkách PR9692 a buňkách z nich odvozených ale geny související s kontrakcí aktinového cytoskeletu nejsou významněji exprimovány. Na základě těchto faktů usuzujeme, že v rakovinných buňkách může EGR1 regulovat expresi MLC2 nezávisle na SRF. Navíc analýza promotorové oblasti kuřecího genu MLC2 (MYL9) odhalila přítomnost kanonického vazebného místa pro EGR1 (GMGGGGGCG) (data neukázána).

Předchozí práce charakterizující geny, jejichž exprese je spojena s metastazováním, používaly k porovnání expresních profilů buněčné linie odvozené ze stejného typu nádoru, ale vzniklé různým způsobem, s rozdílným genetickým pozadím. Jen vzácně využívaly dvojice linií (jako je PR9692 a PR9692-E9, které by vznikly klonálním způsobem (vycházející z jedné nádorové buňky) jedna z druhé a tudíž by byly potlačeny rozdíly dané odlišným genetickým pozadím. Naše práce, na rozdíl od předešlých studií, odhalila rozdíly v expresi genů, jejichž produkty jasně souvisí s mechanistickou stránkou procesu metastazování.

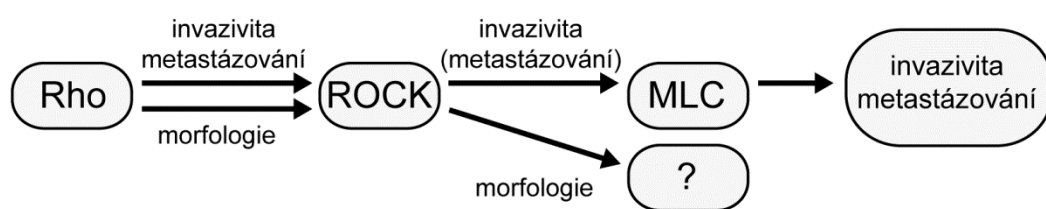
Abychom ještě lépe porozuměli migračním/invazivním vlastnostem agresivních buněk PR9692 a spojitosti takových vlastností s metastazováním, analyzovali jsme pohyb buněk PR9692 v trojrozměrném (3D) prostředí. Buňky se totiž v 3D prostředí mohou pohybovat buď mezenchymovým způsobem nebo améboidním způsobem. Améboidní invazivita *in vitro* byla poprvé popsána teprve v roce 2003 (Sahai & Marshall, 2003; Wolf et al, 2003b) a od té doby byla intenzivně studována. Význam toho způsobu invazivity v procesu metastazování však stále není jasný. Sabeh et al. naznačili, že améboidní invazivita nádorových buněk pozorovaná *in vivo* se objevuje pouze za zvláštních podmínek a asi není účinným a alternativním způsobem k migraci nádorových buněk závislé na proteolýze ECM (Sabeh et al, 2009). Přesto již několik prací poskytlo důkazy o hodnověrnosti améboidní invazivity *in vivo* a metastazování závislém na signalizaci dráhou Rho/ROCK.

Původně přišel nepřímý důkaz podporující zapojení améboidní invazivity do procesu metastazování z klinických studií s inhibitory kinázy ROCK (shrnuto v (Micuda et al, 2010)). Fasudil, inhibitor kinázy ROCK omezoval rozsévání nádoru (hepatomu) v břišní dutině, metastazování fibrosarkomových a melanomových buněk do plic a bránil tvorbě nádoru prsu v tukovém tělese (angl. mammary fat pad) mléčné žlázy (Ying et al, 2006). Podobně Y-27632,

jiný inhibitor kinázy ROCK, bránil růstu nádorů a tvorbě nitrojaterních metastáz hepatocelulárního karcinomu (Xue et al, 2008). Nicméně v žádné z těchto uvedených studií nebyly použity buňky, jejichž invazivita by byla jasně améboidní a tedy nezávislá na proteolýze. Přinejmenším dvě nezávislé práce spojovaly změny v signalizaci vedoucí k destabilizaci mikrotubulů, k zakulacené morfologii a zvýšené invazivitě i metastazování. Bylo popsáno, že umlčení DIAPH3 v lidských nádorových buňkách vedlo k destabilizaci mikrotubulů, zakulacené morfologii a zesílené fosforylaci MYPT1, spojené se zvýšenou schopností invaze a metastázy v myších (Hager et al, 2012). Jiná skupina zjistila, že statmin stimuluje buněčnou motilitu skrz ECM *in vitro* a zvyšuje metastazování sarkomových buněk. V souladu s tímto pozorováním, bodová mutace statminu bránící jeho fosforylaci postihla stabilizaci mikrotubulů indukovanou ECM, vedla k větší invazivitě buněk a zakulacené morfologii spojené s améboidním pohybem v trojrozměrném prostředí (Belletti et al, 2008). Ani v jedné z těchto studií však autoři neukázali, že invazivita studovaných buněk byla nezávislá na štěpení proteinů anebo na signalizaci dráhou Rho/ROCK. Nejpřesvědčivější důkaz o roli invazivity nezávislé na proteolýze v procesu metastazování poskytly studie analyzující roli EphA2 v metastazování melanomů (Parri et al, 2009) a karcinomu prostaty (Taddei et al, 2011), vypracované v laboratoři profesorky Chiarugi. V těchto studiích bylo ukázáno, že re-exprese EphA2 v myších melanomových buňkách B16 mění jejich způsob migrace z mezenchymového na améboidní, nezávislý na proteolýze a vedoucí k úspěšnému metastazování těchto buněk do plic a lymfatických uzlin peritonea (Parri et al, 2009). Také exprese EphA2 v buňkách karcinomu prostaty vedla k zakulacené morfologii buněk závislé na signalizaci Rho, pohybu nezávislém na aktivitě metaloproteináz a zvýšenému metastazování (Taddei et al, 2011). V zatím jediné práci analyzující vliv přímé manipulace signalizace přes dráhu Rho/ROCK na invazivitu a metastazování buněk, autoři zkoumali získání a molekulární regulaci invazivní kapacity neoplasticky transformovaných lidských fibroblastů, které byly po vpíchnutí do myši s narušenou imunitou schopné vytvořit metastazující sarkomy. Tyto transformované fibroblasty zaujímaly v 3D prostředí zakulacenou morfologii a jejich invazivita byla citlivá k inhibici ROCK, ale nikoliv k inhibitoru proteáz. Zvýšená invazivita těchto buněk byla svázána se sníženou expresí RhoE, buněčného inhibitoru ROCK. Exogenní exprese RhoE zase snižovala invazivní schopnosti těchto buněk *in vitro*, stejně jako jejich schopnost metastazovat (Belgiovine et al, 2010).

V naší práci zkoumající invazivní a metastatické vlastnosti buněk jsme použili dvě sarkomové a metastazující buněčné linie, každá pocházející z jiného a evolučně poměrně vzdáleného organismu (savec, pták). Jak jsme zjistili, obě použité linie v 3D prostředí invadují

primárně améboidním způsobem bez detekovatelné želatinázové aktivity (obr. 28, 29 a (Rosel et al, 2008)). Invazivita buněk PR9692 i A3, nezávislá na proteolýze a zároveň závislá na signalizaci přes ROCK, byla demonstrována v 3D kolagenu *in vitro*. Abychom potvrdili naše pozorování invazivity sarkomových buněk v komplexním 3D prostředí, analyzovali jsme améboidní pohyb našich buněk v bezbuněčné dermis. Bezbuněčná dermis je substrát, který je svými biochemickými a biomechanickými vlastnostmi velmi blízký skutečné tkáni. Kryší buňky A3, které se vlastnostmi v ostatních námi provedených testech chovají stejně jako buňky PR9692 (srovnání výsledků v obr. 26, 27 a 28), byly schopné účinně invadovat do bezbuněčné dermis a kryší fascie nehledě na přítomnost širokospektrálního inhibitoru metaloproteináz (testováno pouze u bezbuněčné dermis) a udržovaly si přitom zakulacenou morfologii (obr. 29 a 30). Dále tato práce ukazuje, že metastazování améboidně invadujících sarkomových buněk je závislé nejen na aktivitě RhoA, ale také na fosforylačním stavu MLC. Patrně zde předkládáme první přímý důkaz o důležitosti fosforylace MLC v metastazování nádorových buněk. Naše data ukazují, že aktivace Rho, ROCK a fosforylace MLC jsou potřebné pro účinnou invazivitu obou sarkomových linií PR9692 a A3 a že aktivace RhoA a fosforylace MLC jsou potřebné pro účinné metastazování buněk linie PR9692 (tab. 6 a 7). Naše výsledky také naznačují, že aktivace RhoA a ROCK, ale nikoliv fosforylace MLC je potřebná pro udržení zakulacené morfologie obou sarkomových linií v 3D prostředí (obr. 26 a 28). Celkem vzato naše výsledky naznačují model, který je schematicky vyjádřen v obr. 33 a podle kterého signalizace vedoucí k udržení zakulacené morfologie je alespoň z části odlišná od signalizace umožňující účinnou améboidní invazivitu. Jiná dráha (např. zahrnující LIMK) regulovaná kinázou ROCK by mohla být důležitá pro udržení zakulacené morfologie.



Obr. 33 Signalizace řízená RhoA v udržení améboidní morfologie a invazivitě/metastazování sarkomových buněk.

6. Závěry

Naše práce uvádí na pole studia molekulární biologie myofibroblastů nový buněčný model, zakládající se na kuřecích primárních kožních myofibroblastech (CEDM, z anglického Chicken Embryo Dermal Myofibroblasts). V tomto modelu jsme studovali fenotyp i genovou expresi myofibroblastů po zablokování signální dráhy TGF- β . Protože převažuje názor, že signální dráha TGF- β hraje ústřední roli v diferenciaci myofibroblastů, zajímalo nás, zda budeme schopni myofibroblasty dediferencovat. Navození dediferenciace myofibroblastů by zásadním způsobem pomohlo při léčbě smrtelných lidských onemocnění, jako jsou fibrózy a rakovina, jejichž dosavadní léčba je v řadě případů velmi neúčinná (především u fibróz).

Data uvedená v této práci dokládají rozsáhlé uchování základních regulačních mechanismů týkajících se hojení ran a fibróz mezi dvěma nepříliš vzdálenými třídami živočichů (savci, ptáci), neboť mnoho genů, jejichž exprese je regulovaná signální dráhou TGF- β v savcích buňkách je obdobně regulována i v buňkách CEDM. Expresní profilování buněk CEDM odhalilo celou řadu genů, jejichž regulace signální dráhou TGF- β nebyla v myofibroblastech dosud popsána. Některé z takových genů byly zatím jenom předpovězené z genomových sekvencí a naše práce jako první nastiňuje jejich funkci. Mezi námi identifikovanými geny s expresí regulovanou signální dráhou TGF- β bylo i několik genů, jejichž proteinové produkty jsou součástí diferenciačního programu myofibroblastů a mohou být ovlivňovány farmaceuticky. Dopad regulace takových proteinů na fenotyp myofibroblastů by si zasloužil další pozornost, protože může mít důsledky v klinické praxi. Expresní profilování uvedené v této práci potvrzují představu o důležité regulační úloze myofibroblastů v jednotlivých procesech (angiogeneze, lymfangiogeneze, regenerace nervů, modulace imunitního systému) podílejících se na hojení ran za fyziologických podmínek i tvorbě fibrotických a nádorových (prostřednictvím stroma) onemocnění za patologických podmínek a v některých detailech prohlubují molekulární pochopení této role. Naše výsledky jsou v soulase s představou nádoru jako nehojící se rány. Výsledky naší práce dokládají závislost exprese klíčových regulačních proteinů signálních drah hedgehog, wnt a cAMP na autokrinní stimulaci dráhou TGF- β a prohlubují tak pochopení regulační sítě, která udržuje fenotyp myofibroblastů a která by si v budoucnu, s ohledem na námi ukázané signální dráhy, zasloužila další pozornost. Asi nejprovokativnější hypotézou, která by mohla vyplývat z našich dat, je možnost, že existuje specifický a řízený proces dediferenciace myofibroblastů, jehož součástí je zvláštní program genové exprese, spuštěný poklesem signalizace dráhou TGF- β . Bude však potřeba dalších důkazů, které by tuto hypotézu potvrdily nebo vyvrátily a také otestovaly její

univerzální platnost jak u kuřete, tak i člověka. Teoreticky by regulační proteiny takového dediferenciačního programu mohly být cílem účinné léčby fibrotických anebo nádorových onemocnění. Nicméně i dlouhodobá inhibice signální dráhy TGF β vedla v buňkách CEDM pouze ke snížení sekrečních funkcí (sekrece ECM a růstových faktorů) a nikoliv ke ztrátě charakteristických rysů myofibroblastů, kam patří i tvorba vláken α SMA. Signalizace dráhou TGF β tedy není jediným a klíčovým regulátorem již diferencovaného fenotypu myofibroblastů buněk CEDM.

Ukázali jsme, že trvalá aktivace některých složek signální dráhy MAPK (konkrétně PDGFB, Ha-Ras(G12V) a transkripční faktor EGR4) vede k úplné ztrátě fenotypu myofibroblastů buněk CEDM. Tato schopnost byla doposud známa pouze u PDGFB z modelu, který využíval lidské buňky. Protože EGR4 jako jediný z testovaných složek signální dráhy MAPK nepůsobí neoplastickou transformaci buněk, analyzovali jsme hlouběji molekulární mechanismy, kterými trvalá exprese EGR4 vyvolává dediferenciaci myofibroblastů. Analýzou profilů exprese genů jsme zjistili, že trvalá exprese EGR4 vede k aktivaci exprese genů typických pro mezenchymové kmenové buňky a našli jsme i celou řadu genů, jejichž produkt s nejvyšší pravděpodobností zprostředkovávají účinky vyvolané EGR4. Mezi těmito zprostředkovateli se vyjímá transkripční faktor FOXG1, protože jeho trvalá exprese v buňkách CEDM dokáže dediferencovat myofibroblasty stejně účinně jako exprese EGR4. Trvalá exprese EGR4 i FOXG1 spíná mechanismy, které vedou k potlačení signalizace jak dráhou TGF- β , tak i dráhou MAPK. Protože analýza buněk s aktivovanými složkami (PDGFB, Ha-Ras(G12V) a EGR4) signální dráhy MAPK ve všech testovaných případech prokázala potlačení signalizace dráhou TGF- β a narušení signalizace dráhou MAPK, navodili jsme tuto situaci pomocí chemických látek. Kombinace látek inhibujících signalizaci dráhou TGF- β a aktivujících signální dráhu MAPK vedla k úspěšnému odstranění fenotypu myofibroblastů buněk CEDM *in vitro*. Otázkou stále zůstává, jestli lze myofibroblasty obdobným způsobem bez vážných vedlejších následků dediferencovat i za podmínek *in vivo* a zda se savčí (především lidské) buňky budou chovat stejným způsobem.

Naše práce dobře charakterizovala unikátní model dvou sarkomových linií PR9692 a PR9692-E9. Fakt, že nemetastazující linie PR9692-E9 je spontánně vzniklým klonem metastazující linie PR9692, vyloučil při naší analýze rozdíly dané odlišným genetickým pozadím, které jsou častým problémem při interpretaci dat ostatních obdobných prací. Podrobnou analýzou expresních profilů metastazujících buněk PR9692 a nemetastazujících buněk PR9692-E9 jsme vytipovali transkripční faktor EGR1, jako možný regulátor

transkripčního profilu spojeného s metastazováním. Trvalá exprese EGR1 v buňkách PR9692-E9 skutečně vedla k plnému obnovení schopnosti metastázovat. Porovnáním expresních profilů metastazujících buněk PR9692 a PR9692-E9-ME-EGR1 s profilem nemetastazujících buněk PR9692-E9 jsme odhalili řadu genů, jejichž exprese souvisí s metastazováním a současně je řízená EGR1. Exprese genů, jejichž transkripce je podle našich výsledků řízená transkripčním faktorem EGR1 se podílí na celé řadě procesů, které jsou zjevně potřebné pro metastazování buněk. Je možné, že EGR1 není důležitý pro metastazování jiných sarkomů, ale naším cílem bylo především odhalit skupiny genů, které jsou v integrované signální síti buněk spojené s metastázou a jsou tedy zřejmě zodpovědné za nastolení určitého komplexu vlastností nezbytných pro metastazování. Tyto vlastnosti by již se značnou pravděpodobností mohly být společné pro většinu metastazujících sarkomových buněk. Další analýzy ukázaly, že metastazující buňky PR9692 se od těch nemetastazujících odlišují schopností migrovat (motilita) a adherovat. Obě tyto schopnosti souvisí s aktinovým cytoskeletem, který má u nemetastazujících buněk odlišné uspořádání. Naše práce, na rozdíl od předešlých studií, odhalila rozdíly v expresi genů, jejichž produkty jasně souvisí s mechanistickou stránkou procesu metastazování.

Tato práce dále jako první ukazuje účinnou améboidní invazivitu, pravděpodobně spojenou s metastazováním, v jiném systému než savčím, což jen podporuje důležitost fenoménu améboidní invazivity obecně a otvírá dveře ostatním zajímavým modelům na pole studia typů invazivity. Zároveň odhalila důležitou roli signální dráhy Rho/ROCK/MLC v invazitě a metastazování sarkomů. Domníváme se, že naše pozorování společně s předešlými pracemi z laboratoří profesorek Mondello a Chiarugi poskytují zatím nejsilnější důkaz o schopnostech améboidních nádorových buněk účinně invadovat tkáněmi a dát nakonec vzniknout metastázám.

Tato práce jako celek ukazuje a potvrzuje relevantnost kuřecího (*Gallus gallus*) modelu při vyhledávání obecně platných molekulárních mechanismů používaných napříč blanatými (*amniota*) obratlovčími druhy, zvláště při studiu lidských onemocnění, na která zatím neexistuje účinná léčba (fibrózy, rakovina). Naše výsledky ukazují na užitečnost kuřecích modelů při studiu myofibroblastů a metastazování sarkomů, buněk CEDM a buněk sarkomové linie PR9692, neboť jsme jejich pomocí byli schopni potvrdit a významně rozšířit poznatky získané v savčích modelech. Pomocí buněk CEDM se nám podařilo blíže pochopit roli signální dráhy TGF- β v myofibroblastech, odhalit molekulární mechanismy vedoucí k dediferenciaci myofibroblastů a identifikovat možné nové cíle pro léčbu fibrotických onemocnění a potenciálně i rakoviny. Pomocí buněk PR9692 a buněk z nich odvozených jsme identifikovaly

transkripční profil spojený s metastazováním a transkripční faktor EGR1, který je v buňkách PR9692 potřebný pro jeho udržení. Pomocí buněk PR9692 jsme též ukázali spojitost mezi rolí regulační dráhy Rho/ROCK/MLC v améboidní invazivitě a její rolí v metastazování sarkomů.

7. Podíl autora na výsledcích obsažených v dizertační práci

Autoři výsledků prezentovaných v této práci prohlašují, že Jan Kosla se na výsledcích jednotlivých projektů podílel následující částí vyjádřenou v procentech:

1. Molekulární analýza expresního programu řízeného TGF β v kuřecích primárních kožních myofibroblastech. Kapitoly výsledků 4.1.1 - 4.1.4: 85%
2. Účinná dediferenciace myofibroblastů současnou inhibicí signalizace TGF β a narušením signalizace MAPK. Kapitoly výsledků 4.1.5 - 4.1.10: 80%
3. Transkripční faktor EGR1 reguluje metastazování fibrosarkomových buněk transformovaných v-src. Kapitoly výsledků 4.2.1 - 4.2.5: 36%
4. Metastazování agresivních améboidních fibrosarkomových buněk je závislé na signalizaci dráhou Rho/ROCK/MLC. Kapitoly výsledků 4.2.6 - 4.2.9: 33%

Jménem autorů: RNDr. Michal Dvořák, CSc.

8. Použitá literatura

- Abe R, Donnelly SC, Peng T, Bucala R, Metz CN (2001) Peripheral blood fibrocytes: differentiation pathway and migration to wound sites. *Journal of immunology* **166**: 7556-7562
- Abraham DJ, Shiwen X, Black CM, Sa S, Xu Y, Leask A (2000) Tumor necrosis factor alpha suppresses the induction of connective tissue growth factor by transforming growth factor-beta in normal and scleroderma fibroblasts. *The Journal of biological chemistry* **275**: 15220-15225
- Amano M, Nakayama M, Kaibuchi K (2010) Rho-kinase/ROCK: A key regulator of the cytoskeleton and cell polarity. *Cytoskeleton (Hoboken)* **67**: 545-554
- Anderberg C, Li H, Fredriksson L, Andrae J, Betsholtz C, Li X, Eriksson U, Pietras K (2009) Paracrine signaling by platelet-derived growth factor-CC promotes tumor growth by recruitment of cancer-associated fibroblasts. *Cancer research* **69**: 369-378
- Asano Y Future treatments in systemic sclerosis. *J Dermatol* **37**: 54-70
- Augsten M, Hagglof C, Olsson E, Stolz C, Tsagozis P, Levchenko T, Frederick MJ, Borg A, Micke P, Egevad L, Ostman A (2009) CXCL14 is an autocrine growth factor for fibroblasts and acts as a multi-modal stimulator of prostate tumor growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**: 3414-3419
- Baarsma HA, Spanjer AI, Haitsma G, Engelbertink LH, Meurs H, Jonker MR, Timens W, Postma DS, Kerstjens HA, Gosens R (2011) Activation of WNT/beta-catenin signaling in pulmonary fibroblasts by TGF-beta is increased in chronic obstructive pulmonary disease. *PLoS One* **6**: e25450
- Balsamo M, Scordamaglia F, Pietra G, Manzini C, Cantoni C, Boitano M, Queirolo P, Vermi W, Facchetti F, Moretta A, Moretta L, Mingari MC, Vitale M (2009) Melanoma-associated fibroblasts modulate NK cell phenotype and antitumor cytotoxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**: 20847-20852
- Bar-Peled M, Raikhel NV (1996) A method for isolation and purification of specific antibodies to a protein fused to the GST. *Anal Biochem* **241**: 140-142
- Barkan D, Green JE, Chambers AF (2010) Extracellular matrix: a gatekeeper in the transition from dormancy to metastatic growth. *European journal of cancer* **46**: 1181-1188
- Barrientos S, Stojadinovic O, Golinko MS, Brem H, Tomic-Canic M (2008) Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society* **16**: 585-601
- Bartrons R, Caro J (2007) Hypoxia, glucose metabolism and the Warburg's effect. *Journal of bioenergetics and biomembranes* **39**: 223-229
- Bartunek P, Pichlikova L, Stengl G, Boehmelt G, Martin FH, Beug H, Dvorak M, Zenke M (1996) Avian stem cell factor (SCF): production and characterization of the recombinant His-tagged SCF of chicken and its neutralizing antibody. *Cytokine* **8**: 14-20
- Bassi DE, Mahloogi H, Klein-Szanto AJ (2000) The proprotein convertases furin and PACE4 play a significant role in tumor progression. *Molecular carcinogenesis* **28**: 63-69
- Belgiovine C, Frapolli R, Bonezzi K, Chiodi I, Favero F, Mello-Grand M, Dei Tos AP, Giulotto E, Taraboletti G, D'Incalci M, Mondello C (2010) Reduced expression of the ROCK inhibitor Rnd3 in

associated with increased invasiveness and metastatic potential in mesenchymal tumor cells. *PloS one* **5**: e14154

Belletti B, Nicoloso MS, Schiappacassi M, Berton S, Lovat F, Wolf K, Canzonieri V, D'Andrea S, Zucchetto A, Friedl P, Colombatti A, Baldassarre G (2008) Stathmin activity influences sarcoma cell shape, motility, and metastatic potential. *Molecular biology of the cell* **19**: 2003-2013

Berasi SP, Huard C, Li D, Shih HH, Sun Y, Zhong W, Paulsen JE, Brown EL, Gimeno RE, Martinez RV (2006) Inhibition of gluconeogenesis through transcriptional activation of EGR1 and DUSP4 by AMP-activated kinase. *J Biol Chem* **281**: 27167-27177

Berg JS, Cheney RE (2002) Myosin-X is an unconventional myosin that undergoes intrafilopodial motility. *Nature cell biology* **4**: 246-250

Bhattacharyya S, Fang F, Tourtellotte W, Varga J (2013) Egr-1: new conductor for the tissue repair orchestra directs harmony (regeneration) or cacophony (fibrosis). *J Pathol* **229**: 286-297

Bhattacharyya S, Chen SJ, Wu M, Warner-Blankenship M, Ning H, Lakos G, Mori Y, Chang E, Nihijima C, Takehara K, Feghali-Bostwick C, Varga J (2008) Smad-independent transforming growth factor-beta regulation of early growth response-1 and sustained expression in fibrosis: implications for scleroderma. *Am J Pathol* **173**: 1085-1099

Bhattacharyya S, Ishida W, Wu M, Wilkes M, Mori Y, Hinchcliff M, Leof E, Varga J (2009) A non-Smad mechanism of fibroblast activation by transforming growth factor-beta via c-Abl and Egr-1: selective modulation by imatinib mesylate. *Oncogene* **28**: 1285-1297

Bhattacharyya S, Wu M, Fang F, Tourtellotte W, Feghali-Bostwick C, Varga J (2011) Early growth response transcription factors: key mediators of fibrosis and novel targets for anti-fibrotic therapy. *Matrix Biol* **30**: 235-242

Bhowmick NA, Neilson EG, Moses HL (2004) Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. *Nature* **432**: 332-337

Bihl MP, Laule-Kilian K, Bubendorf L, Rutherford RM, Baty F, Kehren J, Eryuksel E, Staedtler F, Yang JQ, Goulet S, Gilmartin JJ, Tamm M, Brutsche MH (2006) Progressive pulmonary sarcoidosis--a fibroproliferative process potentially triggered by EGR-1 and IL-6. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis* **23**: 38-50

Boersma BJ, Reimers M, Yi M, Ludwig JA, Luke BT, Stephens RM, Yfantis HG, Lee DH, Weinstein JN, Ambs S (2008) A stromal gene signature associated with inflammatory breast cancer. *International journal of cancer Journal international du cancer* **122**: 1324-1332

Bohil AB, Robertson BW, Cheney RE (2006) Myosin-X is a molecular motor that functions in filopodia formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**: 12411-12416

Border WA, Okuda S, Languino LR, Sporn MB, Ruoslahti E (1990) Suppression of experimental glomerulonephritis by antiserum against transforming growth factor beta 1. *Nature* **346**: 371-374

Boyle KB, Hadaschik D, Virtue S, Cawthorn WP, Ridley SH, O'Rahilly S, Siddle K (2009) The transcription factors Egr1 and Egr2 have opposing influences on adipocyte differentiation. *Cell Death Differ* **16**: 782-789

Brabek J, Mierke CT, Rosel D, Vesely P, Fabry B (2010) The role of the tissue microenvironment in the regulation of cancer cell motility and invasion. *Cell communication and signaling : CCS* **8**: 22

- Brahimi-Horn MC, Chiche J, Pouyssegur J (2007a) Hypoxia and cancer. *Journal of molecular medicine* **85**: 1301-1307
- Brahimi-Horn MC, Chiche J, Pouyssegur J (2007b) Hypoxia signalling controls metabolic demand. *Current opinion in cell biology* **19**: 223-229
- Brahimi-Horn MC, Pouyssegur J (2007) Oxygen, a source of life and stress. *FEBS letters* **581**: 3582-3591
- Brunner AM, Marquardt H, Malacko AR, Lioubin MN, Purchio AF (1989) Site-directed mutagenesis of cysteine residues in the pro region of the transforming growth factor beta 1 precursor. Expression and characterization of mutant proteins. *J Biol Chem* **264**: 13660-13664
- Carmeliet P, Jain RK (2011) Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature* **473**: 298-307
- Carmeliet P, Moons L, Luttun A, Vincenti V, Compernelle V, De Mol M, Wu Y, Bono F, Devy L, Beck H, Scholz D, Acker T, DiPalma T, Dewerchin M, Noel A, Stalmans I, Barra A, Blacher S, Vandendriessche T, Ponten A, Eriksson U, Plate KH, Foidart JM, Schaper W, Charnock-Jones DS, Hicklin DJ, Herbert JM, Collen D, Persico MG (2001) Synergism between vascular endothelial growth factor and placental growth factor contributes to angiogenesis and plasma extravasation in pathological conditions. *Nat Med* **7**: 575-583
- Carragher NO, Walker SM, Scott Carragher LA, Harris F, Sawyer TK, Brunton VG, Ozanne BW, Frame MC (2006) Calpain 2 and Src dependence distinguishes mesenchymal and amoeboid modes of tumour cell invasion: a link to integrin function. *Oncogene* **25**: 5726-5740
- Cat B, Stuhlmann D, Steinbrenner H, Alili L, Holtkotter O, Sies H, Brenneisen P (2006) Enhancement of tumor invasion depends on transdifferentiation of skin fibroblasts mediated by reactive oxygen species. *Journal of cell science* **119**: 2727-2738
- Cavanna T, Pokorna E, Vesely P, Gray C, Zicha D (2007) Evidence for protein 4.1B acting as a metastasis suppressor. *Journal of cell science* **120**: 606-616
- Cirri P, Chiarugi P (2012) Cancer-associated-fibroblasts and tumour cells: a diabolic liaison driving cancer progression. *Cancer metastasis reviews* **31**: 195-208
- Conrad S, Genth H, Hofmann F, Just I, Skutella T (2007) Neogenin-RGMA signaling at the growth cone is bone morphogenetic protein-independent and involves RhoA, ROCK, and PKC. *The Journal of biological chemistry* **282**: 16423-16433
- Cook AC, Chambers AF, Turley EA, Tuck AB (2006) Osteopontin induction of hyaluronan synthase 2 expression promotes breast cancer malignancy. *The Journal of biological chemistry* **281**: 24381-24389
- Cosset FL, Legras C, Chebloune Y, Savatier P, Thoraval P, Thomas JL, Samarut J, Nigon VM, Verdier G (1990) A new avian leukosis virus-based packaging cell line that uses two separate transcomplementing helper genomes. *Journal of virology* **64**: 1070-1078
- Crawford Y, Ferrara N (2009) Tumor and stromal pathways mediating refractoriness/resistance to anti-angiogenic therapies. *Trends in pharmacological sciences* **30**: 624-630
- Crider BJ, Risinger GM, Jr., Haaksma CJ, Howard EW, Tomasek JJ (2011) Myocardin-related transcription factors A and B are key regulators of TGF-beta1-induced fibroblast to myofibroblast differentiation. *J Invest Dermatol* **131**: 2378-2385

- Croft DR, Coleman ML, Li S, Robertson D, Sullivan T, Stewart CL, Olson MF (2005) Actin-myosin-based contraction is responsible for apoptotic nuclear disintegration. *The Journal of cell biology* **168**: 245-255
- Damm S, Koefinger P, Stefan M, Wels C, Mehes G, Richtig E, Kerl H, Otte M, Schaidler H (2010) HGF-promoted motility in primary human melanocytes depends on CD44v6 regulated via NF-kappa B, Egr-1, and C/EBP-beta. *J Invest Dermatol* **130**: 1893-1903
- Daniels KJ, Boldt HC, Martin JA, Gardner LM, Meyer M, Folberg R (1996) Expression of type VI collagen in uveal melanoma: its role in pattern formation and tumor progression. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* **75**: 55-66
- Darragh J, Soloaga A, Beardmore VA, Wingate AD, Wiggin GR, Peggie M, Arthur JS (2005) MSKs are required for the transcription of the nuclear orphan receptors Nur77, Nurr1 and Nor1 downstream of MAPK signalling. *Biochem J* **390**: 749-759
- de Mestre AM, Rao S, Hornby JR, Soe-Htwe T, Khachigian LM, Hulett MD (2005) Early growth response gene 1 (EGR1) regulates heparanase gene transcription in tumor cells. *J Biol Chem* **280**: 35136-35147
- De Wever O, Demetter P, Mareel M, Bracke M (2008) Stromal myofibroblasts are drivers of invasive cancer growth. *International journal of cancer Journal international du cancer* **123**: 2229-2238
- DeClerck K, Elble RC (2010) The role of hypoxia and acidosis in promoting metastasis and resistance to chemotherapy. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* **15**: 213-225
- Demirci G, Nashan B, Pichlmayr R (1996) Fibrosis in chronic rejection of human liver allografts: expression patterns of transforming growth factor-TGFbeta1 and TGF-beta3. *Transplantation* **62**: 1776-1783
- Denis M (1994) Neutralization of transforming growth factor-beta 1 in a mouse model of immune-induced lung fibrosis. *Immunology* **82**: 584-590
- Desmouliere A, Redard M, Darby I, Gabbiani G (1995) Apoptosis mediates the decrease in cellularity during the transition between granulation tissue and scar. *The American journal of pathology* **146**: 56-66
- Dillon RL, Brown ST, Ling C, Shioda T, Muller WJ (2007) An EGR2/CITED1 transcription factor complex and the 14-3-3sigma tumor suppressor are involved in regulating ErbB2 expression in a transgenic-mouse model of human breast cancer. *Mol Cell Biol* **27**: 8648-8657
- Direkze NC, Forbes SJ, Brittan M, Hunt T, Jeffery R, Preston SL, Poulson R, Hodivala-Dilke K, Alison MR, Wright NA (2003) Multiple organ engraftment by bone-marrow-derived myofibroblasts and fibroblasts in bone-marrow-transplanted mice. *Stem cells* **21**: 514-520
- Direkze NC, Hodivala-Dilke K, Jeffery R, Hunt T, Poulson R, Oukrif D, Alison MR, Wright NA (2004) Bone marrow contribution to tumor-associated myofibroblasts and fibroblasts. *Cancer research* **64**: 8492-8495
- Duda DG, Duyverman AM, Kohno M, Snuderl M, Steller EJ, Fukumura D, Jain RK (2010) Malignant cells facilitate lung metastasis by bringing their own soil. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**: 21677-21682

- Dulauroy S, Di Carlo SE, Langa F, Eberl G, Peduto L (2012) Lineage tracing and genetic ablation of ADAM12(+) perivascular cells identify a major source of profibrotic cells during acute tissue injury. *Nature medicine*
- Dvorak HF (1986) Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *The New England journal of medicine* **315**: 1650-1659
- Egerod FL, Bartels A, Frstrup N, Borre M, Orntoft TF, Oleksiewicz MB, Brunner N, Dyrskjot L (2009) High frequency of tumor cells with nuclear Egr-1 protein expression in human bladder cancer is associated with disease progression. *BMC Cancer* **9**: 385
- Eid MA, Kumar MV, Iczkowski KA, Bostwick DG, Tindall DJ (1998) Expression of early growth response genes in human prostate cancer. *Cancer Res* **58**: 2461-2468
- Elkabets M, Gifford AM, Scheel C, Nilsson B, Reinhardt F, Bray MA, Carpenter AE, Jirstrom K, Magnusson K, Ebert BL, Ponten F, Weinberg RA, McAllister SS (2011) Human tumors instigate granulysin-expressing hematopoietic cells that promote malignancy by activating stromal fibroblasts in mice. *The Journal of clinical investigation* **121**: 784-799
- Elrod-Erickson M, Benson TE, Pabo CO (1998) High-resolution structures of variant Zif268-DNA complexes: implications for understanding zinc finger-DNA recognition. *Structure* **6**: 451-464
- Engler AJ, Sen S, Sweeney HL, Discher DE (2006) Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell* **126**: 677-689
- Erez N, Truitt M, Olson P, Arron ST, Hanahan D (2010) Cancer-Associated Fibroblasts Are Activated in Incipient Neoplasia to Orchestrate Tumor-Promoting Inflammation in an NF-kappaB-Dependent Manner. *Cancer cell* **17**: 135-147
- Fang W, Hartmann N, Chow DT, Riegel AT, Wellstein A (1992) Pleiotrophin stimulates fibroblasts and endothelial and epithelial cells and is expressed in human cancer. *J Biol Chem* **267**: 25889-25897
- Filippov S, Koenig GC, Chun TH, Hotary KB, Ota I, Bugge TH, Roberts JD, Fay WP, Birkedal-Hansen H, Holmbeck K, Sabeh F, Allen ED, Weiss SJ (2005) MT1-matrix metalloproteinase directs arterial wall invasion and neointima formation by vascular smooth muscle cells. *The Journal of experimental medicine* **202**: 663-671
- Finak G, Bertos N, Pepin F, Sadekova S, Souleimanova M, Zhao H, Chen H, Omeroglu G, Meterissian S, Omeroglu A, Hallett M, Park M (2008) Stromal gene expression predicts clinical outcome in breast cancer. *Nature medicine* **14**: 518-527
- Fox RM, Hanlon CD, Andrew DJ (2010) The CrebA/Creb3-like transcription factors are major and direct regulators of secretory capacity. *J Cell Biol* **191**: 479-492
- Friedl P (2004) Prespecification and plasticity: shifting mechanisms of cell migration. *Current opinion in cell biology* **16**: 14-23
- Friedl P, Wolf K (2010) Plasticity of cell migration: a multiscale tuning model. *The Journal of cell biology* **188**: 11-19
- Fuerstenberg SM, Vennstrom B (1993) Versatile avian retrovirus vectors. *Analytical biochemistry* **209**: 375-376

- Fukino K, Shen L, Patocs A, Mutter GL, Eng C (2007) Genomic instability within tumor stroma and clinicopathological characteristics of sporadic primary invasive breast carcinoma. *JAMA : the journal of the American Medical Association* **297**: 2103-2111
- Gabbiani G (2003) The myofibroblast in wound healing and fibrocontractive diseases. *The Journal of pathology* **200**: 500-503
- Gabbiani G, Ryan GB, Majne G (1971) Presence of modified fibroblasts in granulation tissue and their possible role in wound contraction. *Experientia* **27**: 549-550
- Gaggioli C, Deckert M, Robert G, Abbe P, Batoz M, Ehrenguber MU, Ortonne JP, Ballotti R, Tartare-Deckert S (2005) HGF induces fibronectin matrix synthesis in melanoma cells through MAP kinase-dependent signaling pathway and induction of Egr-1. *Oncogene* **24**: 1423-1433
- Gaggioli C, Hooper S, Hidalgo-Carcedo C, Grosse R, Marshall JF, Harrington K, Sahai E (2007) Fibroblast-led collective invasion of carcinoma cells with differing roles for RhoGTPases in leading and following cells. *Nature cell biology* **9**: 1392-1400
- Gallagher FA, Kettunen MI, Day SE, Hu DE, Ardenkjaer-Larsen JH, Zandt R, Jensen PR, Karlsson M, Golman K, Lerche MH, Brindle KM (2008) Magnetic resonance imaging of pH in vivo using hyperpolarized ¹³C-labelled bicarbonate. *Nature* **453**: 940-943
- Gao F, Kinnula VL, Myllarniemi M, Oury TD (2008) Extracellular superoxide dismutase in pulmonary fibrosis. *Antioxid Redox Signal* **10**: 343-354
- Gehler S, Baldassarre M, Lad Y, Leight JL, Wozniak MA, Riching KM, Eliceiri KW, Weaver VM, Calderwood DA, Keely PJ (2009) Filamin A-beta1 integrin complex tunes epithelial cell response to matrix tension. *Molecular biology of the cell* **20**: 3224-3238
- Geiger B, Bershadsky A, Pankov R, Yamada KM (2001) Transmembrane crosstalk between the extracellular matrix--cytoskeleton crosstalk. *Nature reviews Molecular cell biology* **2**: 793-805
- Gerber PA, Hippe A, Buhren BA, Muller A, Homey B (2009) Chemokines in tumor-associated angiogenesis. *Biological chemistry* **390**: 1213-1223
- Gharaee-Kermani M, Hu B, Phan SH, Gyetko MR (2009) Recent advances in molecular targets and treatment of idiopathic pulmonary fibrosis: focus on TGFbeta signaling and the myofibroblast. *Curr Med Chem* **16**: 1400-1417
- Giannone G, Sheetz MP (2006) Substrate rigidity and force define form through tyrosine phosphatase and kinase pathways. *Trends in cell biology* **16**: 213-223
- Giannoni E, Bianchini F, Masieri L, Serni S, Torre E, Calorini L, Chiarugi P (2010) Reciprocal activation of prostate cancer cells and cancer-associated fibroblasts stimulates epithelial-mesenchymal transition and cancer stemness. *Cancer research* **70**: 6945-6956
- Grange C, Tapparo M, Collino F, Vitillo L, Damasco C, Deregibus MC, Tetta C, Bussolati B, Camussi G (2011) Microvesicles released from human renal cancer stem cells stimulate angiogenesis and formation of lung premetastatic niche. *Cancer research* **71**: 5346-5356
- Grum-Schwensen B, Klingelhofer J, Grigorian M, Almholt K, Nielsen BS, Lukanidin E, Ambartsumian N (2010) Lung metastasis fails in MMTV-PyMT oncomice lacking S100A4 due to a T-cell deficiency in primary tumors. *Cancer research* **70**: 936-947

- Guppy M (2002) The hypoxic core: a possible answer to the cancer paradox. *Biochemical and biophysical research communications* **299**: 676-680
- Gutjahr MC, Rossy J, Niggli V (2005) Role of Rho, Rac, and Rho-kinase in phosphorylation of myosin light chain, development of polarity, and spontaneous migration of Walker 256 carcinosarcoma cells. *Experimental cell research* **308**: 422-438
- Habashi JP, Doyle JJ, Holm TM, Aziz H, Schoenhoff F, Bedja D, Chen Y, Modiri AN, Judge DP, Dietz HC (2011) Angiotensin II type 2 receptor signaling attenuates aortic aneurysm in mice through ERK antagonism. *Science* **332**: 361-365
- Haemmerli G, Muller-Glauser W, Bruckner P, Hauser-Urfer I, Strauli P (1985) Tumor-associated desmoplasia in the rabbit mesentery characterized by morphological, biochemical and cytophotometric methods. *International journal of cancer Journal international du cancer* **35**: 527-534
- Hager MH, Morley S, Bielenberg DR, Gao S, Morello M, Holcomb IN, Liu W, Mouneimne G, Demichelis F, Kim J, Solomon KR, Adam RM, Isaacs WB, Higgs HN, Vessella RL, Di Vizio D, Freeman MR (2012) DIAPH3 governs the cellular transition to the amoeboid tumour phenotype. *EMBO molecular medicine* **4**: 743-760
- Hallahan DE, Sukhatme VP, Sherman ML, Virudachalam S, Kufe D, Weichselbaum RR (1991) Protein kinase C mediates x-ray inducibility of nuclear signal transducers EGR1 and JUN. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**: 2156-2160
- Hamada S, Masamune A, Takikawa T, Suzuki N, Kikuta K, Hirota M, Hamada H, Kobune M, Satoh K, Shimosegawa T (2012) Pancreatic stellate cells enhance stem cell-like phenotypes in pancreatic cancer cells. *Biochemical and biophysical research communications* **421**: 349-354
- Hanahan D, Weinberg RA (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**: 646-674
- Harley BA, Kim HD, Zaman MH, Yannas IV, Lauffenburger DA, Gibson LJ (2008) Microarchitecture of three-dimensional scaffolds influences cell migration behavior via junction interactions. *Biophysical journal* **95**: 4013-4024
- Hasebe T, Sasaki S, Imoto S, Mukai K, Yokose T, Ochiai A (2002) Prognostic significance of fibrotic focus in invasive ductal carcinoma of the breast: a prospective observational study. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* **15**: 502-516
- Hashimoto N, Jin H, Liu T, Chensue SW, Phan SH (2004) Bone marrow-derived progenitor cells in pulmonary fibrosis. *The Journal of clinical investigation* **113**: 243-252
- Hecker L, Jagirdar R, Jin T, Thannickal VJ (2011) Reversible differentiation of myofibroblasts by MyoD. *Exp Cell Res* **317**: 1914-1921
- Heddleston JM, Li Z, Lathia JD, Bao S, Hjelmeland AB, Rich JN (2010) Hypoxia inducible factors in cancer stem cells. *British journal of cancer* **102**: 789-795
- Hedges SB, Dudley J, Kumar S (2006) TimeTree: a public knowledge-base of divergence times among organisms. *Bioinformatics* **22**: 2971-2972
- Henriksson ML, Edin S, Dahlin AM, Oldenborg PA, Oberg A, Van Guelpen B, Rutegard J, Stenling R, Palmqvist R (2011) Colorectal cancer cells activate adjacent fibroblasts resulting in FGF1/FGFR3 signaling and increased invasion. *The American journal of pathology* **178**: 1387-1394

- Heyer LJ, Kruglyak S, Yooseph S (1999) Exploring expression data: identification and analysis of coexpressed genes. *Genome research* **9**: 1106-1115
- Hill R, Song Y, Cardiff RD, Van Dyke T (2005) Selective evolution of stromal mesenchyme with p53 loss in response to epithelial tumorigenesis. *Cell* **123**: 1001-1011
- Himly M, Foster DN, Bottoli I, Iacovoni JS, Vogt PK (1998) The DF-1 chicken fibroblast cell line: transformation induced by diverse oncogenes and cell death resulting from infection by avian leukosis viruses. *Virology* **248**: 295-304
- Hinz B, Mastrangelo D, Iselin CE, Chaponnier C, Gabbiani G (2001) Mechanical tension controls granulation tissue contractile activity and myofibroblast differentiation. *The American journal of pathology* **159**: 1009-1020
- Hinz B, Phan SH, Thannickal VJ, Galli A, Bochaton-Piallat ML, Gabbiani G (2007) The myofibroblast: one function, multiple origins. *Am J Pathol* **170**: 1807-1816
- Hiraoka N, Allen E, Apel IJ, Gyetko MR, Weiss SJ (1998) Matrix metalloproteinases regulate neovascularization by acting as pericellular fibrinolysins. *Cell* **95**: 365-377
- Hogaboam CM, Blease K, Mehrad B, Steinhilber ML, Standiford TJ, Kunkel SL, Lukacs NW (2000) Chronic airway hyperreactivity, goblet cell hyperplasia, and peribronchial fibrosis during allergic airway disease induced by *Aspergillus fumigatus*. *The American journal of pathology* **156**: 723-732
- Hotary K, Li XY, Allen E, Stevens SL, Weiss SJ (2006) A cancer cell metalloprotease triad regulates the basement membrane transmigration program. *Genes & development* **20**: 2673-2686
- Hu B, Castillo E, Harewood L, Ostano P, Reymond A, Dummer R, Raffoul W, Hoetzenecker W, Hofbauer GF, Dotto GP (2012) Multifocal epithelial tumors and field cancerization from loss of mesenchymal CSL signaling. *Cell* **149**: 1207-1220
- Hubbard FC, Goodrow TL, Liu SC, Brilliant MH, Basset P, Mains RE, Klein-Szanto AJ (1997) Expression of PACE4 in chemically induced carcinomas is associated with spindle cell tumor conversion and increased invasive ability. *Cancer research* **57**: 5226-5231
- Huijbers IJ, Irvani M, Popov S, Robertson D, Al-Sarraj S, Jones C, Isacke CM (2010) A role for fibrillar collagen deposition and the collagen internalization receptor endo180 in glioma invasion. *PLoS one* **5**: e9808
- Humphreys BD, Lin SL, Kobayashi A, Hudson TE, Nowlin BT, Bonventre JV, Valerius MT, McMahon AP, Duffield JS (2010) Fate tracing reveals the pericyte and not epithelial origin of myofibroblasts in kidney fibrosis. *The American journal of pathology* **176**: 85-97
- Chang HW, Li J, Vogt PK (1996) Domains of the qin protein required for oncogenic transformation. *Oncogene* **13**: 441-444
- Chavrier P, Janssen-Timmen U, Mattei MG, Zerial M, Bravo R, Charnay P (1989) Structure, chromosome location, and expression of the mouse zinc finger gene Krox-20: multiple gene products and coregulation with the proto-oncogene c-fos. *Mol Cell Biol* **9**: 787-797
- Chavrier P, Zerial M, Lemaire P, Almendral J, Bravo R, Charnay P (1988) A gene encoding a protein with zinc fingers is activated during G0/G1 transition in cultured cells. *EMBO J* **7**: 29-35
- Chen CS (2008) Mechanotransduction - a field pulling together? *Journal of cell science* **121**: 3285-3292

- Chen SJ, Ning H, Ishida W, Sodin-Semrl S, Takagawa S, Mori Y, Varga J (2006) The early-immediate gene EGR-1 is induced by transforming growth factor-beta and mediates stimulation of collagen gene expression. *The Journal of biological chemistry* **281**: 21183-21197
- Chen Z, Torrens JI, Anand A, Spiegelman BM, Friedman JM (2005) Krox20 stimulates adipogenesis via C/EBPbeta-dependent and -independent mechanisms. *Cell Metab* **1**: 93-106
- Chopra A, Brown KM, Rood BR, Packer RJ, MacDonald TJ (2003) The use of gene expression analysis to gain insights into signaling mechanisms of metastatic medulloblastoma. *Pediatr Neurosurg* **39**: 68-74
- Christy B, Nathans D (1989a) DNA binding site of the growth factor-inducible protein Zif268. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**: 8737-8741
- Christy B, Nathans D (1989b) Functional serum response elements upstream of the growth factor-inducible gene zif268. *Mol Cell Biol* **9**: 4889-4895
- Chuang PT, Kawcak T, McMahon AP (2003) Feedback control of mammalian Hedgehog signaling by the Hedgehog-binding protein, Hip1, modulates Fgf signaling during branching morphogenesis of the lung. *Genes Dev* **17**: 342-347
- Chun TH, Hotary KB, Sabeh F, Saltiel AR, Allen ED, Weiss SJ (2006) A pericellular collagenase directs the 3-dimensional development of white adipose tissue. *Cell* **125**: 577-591
- Chun TH, Sabeh F, Ota I, Murphy H, McDonagh KT, Holmbeck K, Birkedal-Hansen H, Allen ED, Weiss SJ (2004) MT1-MMP-dependent neovessel formation within the confines of the three-dimensional extracellular matrix. *The Journal of cell biology* **167**: 757-767
- Irizarry RA, Bolstad BM, Collin F, Cope LM, Hobbs B, Speed TP (2003) Summaries of Affymetrix GeneChip probe level data. *Nucleic acids research* **31**: e15
- Ishii G, Sangai T, Sugiyama K, Ito T, Hasebe T, Endoh Y, Magae J, Ochiai A (2005) In vivo characterization of bone marrow-derived fibroblasts recruited into fibrotic lesions. *Stem cells* **23**: 699-706
- Janostiak R, Tolde O, Bruhova Z, Novotny M, Hanks SK, Rosel D, Brabek J (2011) Tyrosine phosphorylation within the SH3 domain regulates CAS subcellular localization, cell migration, and invasiveness. *Molecular biology of the cell* **22**: 4256-4267
- Jedezsko C, Victor BC, Podgorski I, Sloane BF (2009) Fibroblast hepatocyte growth factor promotes invasion of human mammary ductal carcinoma in situ. *Cancer research* **69**: 9148-9155
- Jobling AI, Gentle A, Metlapally R, McGowan BJ, McBrien NA (2009) Regulation of scleral cell contraction by transforming growth factor-beta and stress: competing roles in myopic eye growth. *J Biol Chem* **284**: 2072-2079
- Jones MW, Errington ML, French PJ, Fine A, Bliss TV, Garel S, Charnay P, Bozon B, Laroche S, Davis S (2001) A requirement for the immediate early gene Zif268 in the expression of late LTP and long-term memories. *Nat Neurosci* **4**: 289-296
- Kalluri R (2009) EMT: when epithelial cells decide to become mesenchymal-like cells. *The Journal of clinical investigation* **119**: 1417-1419
- Kalluri R, Zeisberg M (2006) Fibroblasts in cancer. *Nature reviews Cancer* **6**: 392-401

Kalogeropoulos M, Varanasi SS, Olstad OK, Sanderson P, Gautvik VT, Reppe S, Francis RM, Gautvik KM, Birch MA, Datta HK (2010) Zic1 transcription factor in bone: neural developmental protein regulates mechanotransduction in osteocytes. *FASEB J* **24**: 2893-2903

Kaplan RN, Riba RD, Zacharoulis S, Bramley AH, Vincent L, Costa C, MacDonald DD, Jin DK, Shido K, Kerns SA, Zhu Z, Hicklin D, Wu Y, Port JL, Altorki N, Port ER, Ruggero D, Shmelkov SV, Jensen KK, Rafii S, Lyden D (2005) VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche. *Nature* **438**: 820-827

Kapoun AM, Liang F, O'Young G, Damm DL, Quon D, White RT, Munson K, Lam A, Schreiner GF, Protter AA (2004) B-type natriuretic peptide exerts broad functional opposition to transforming growth factor-beta in primary human cardiac fibroblasts: fibrosis, myofibroblast conversion, proliferation, and inflammation. *Circ Res* **94**: 453-461

Kaupilla S, Stenback F, Risteli J, Jukkola A, Risteli L (1998) Aberrant type I and type III collagen gene expression in human breast cancer in vivo. *The Journal of pathology* **186**: 262-268

Kiaris H, Chatzistamou I, Trimis G, Frangou-Plemmenou M, Pafiti-Kondi A, Kalofoutis A (2005) Evidence for nonautonomous effect of p53 tumor suppressor in carcinogenesis. *Cancer research* **65**: 1627-1630

Kim Y, Ratziu V, Choi SG, Lalazar A, Theiss G, Dang Q, Kim SJ, Friedman SL (1998) Transcriptional activation of transforming growth factor beta1 and its receptors by the Kruppel-like factor Zf9/core promoter-binding protein and Sp1. Potential mechanisms for autocrine fibrogenesis in response to injury. *The Journal of biological chemistry* **273**: 33750-33758

Kobayashi D, Yamada M, Kamagata C, Kaneko R, Tsuji N, Nakamura M, Yagihashi A, Watanabe N (2002) Overexpression of early growth response-1 as a metastasis-regulatory factor in gastric cancer. *Anticancer research* **22**: 3963-3970

Kobayashi N, Miyoshi S, Mikami T, Koyama H, Kitazawa M, Takeoka M, Sano K, Amano J, Isogai Z, Niida S, Oguri K, Okayama M, McDonald JA, Kimata K, Taniguchi S, Itano N (2010) Hyaluronan deficiency in tumor stroma impairs macrophage trafficking and tumor neovascularization. *Cancer research* **70**: 7073-7083

Kopfstein L, Christofori G (2006) Metastasis: cell-autonomous mechanisms versus contributions by the tumor microenvironment. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **63**: 449-468

Kraman M, Bambrough PJ, Arnold JN, Roberts EW, Magiera L, Jones JO, Gopinathan A, Tuveson DA, Fearon DT (2010) Suppression of antitumor immunity by stromal cells expressing fibroblast activation protein-alpha. *Science* **330**: 827-830

Krones-Herzig A, Adamson E, Mercola D (2003) Early growth response 1 protein, an upstream gatekeeper of the p53 tumor suppressor, controls replicative senescence. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 3233-3238

Kubo H, Shimizu M, Taya Y, Kawamoto T, Michida M, Kaneko E, Igarashi A, Nishimura M, Segoshi K, Shimazu Y, Tsuji K, Aoba T, Kato Y (2009) Identification of mesenchymal stem cell (MSC)-transcription factors by microarray and knockdown analyses, and signature molecule-marked MSC in bone marrow by immunohistochemistry. *Genes Cells* **14**: 407-424

Kukreja P, Abdel-Mageed AB, Mondal D, Liu K, Agrawal KC (2005) Up-regulation of CXCR4 expression in PC-3 cells by stromal-derived factor-1alpha (CXCL12) increases endothelial adhesion and transendothelial migration: role of MEK/ERK signaling pathway-dependent NF-kappaB activation. *Cancer research* **65**: 9891-9898

- Kurose K, Gilley K, Matsumoto S, Watson PH, Zhou XP, Eng C (2002) Frequent somatic mutations in PTEN and TP53 are mutually exclusive in the stroma of breast carcinomas. *Nature genetics* **32**: 355-357
- Kuwahara F, Kai H, Tokuda K, Kai M, Takeshita A, Egashira K, Imaizumi T (2002) Transforming growth factor-beta function blocking prevents myocardial fibrosis and diastolic dysfunction in pressure-overloaded rats. *Circulation* **106**: 130-135
- Labiche A, Heutte N, Herlin P, Chasle J, Gauduchon P, Elie N (2010) Stromal compartment as a survival prognostic factor in advanced ovarian carcinoma. *International journal of gynecological cancer : official journal of the International Gynecological Cancer Society* **20**: 28-33
- Lafuente EM, van Puijenbroek AA, Krause M, Carman CV, Freeman GJ, Berezovskaya A, Constantine E, Springer TA, Gertler FB, Boussiotis VA (2004) RIAM, an Ena/VASP and Profilin ligand, interacts with Rap1-GTP and mediates Rap1-induced adhesion. *Developmental cell* **7**: 585-595
- Lanning DA, Diegelmann RF, Yager DR, Wallace ML, Bagwell CE, Haynes JH (2000) Myofibroblast induction with transforming growth factor-beta1 and -beta3 in cutaneous fetal excisional wounds. *J Pediatr Surg* **35**: 183-187; discussion 187-188
- Leask A (2008) Targeting the TGFbeta, endothelin-1 and CCN2 axis to combat fibrosis in scleroderma. *Cell Signal* **20**: 1409-1414
- Leask A (2010) Potential therapeutic targets for cardiac fibrosis: TGFbeta, angiotensin, endothelin, CCN2, and PDGF, partners in fibroblast activation. *Circ Res* **106**: 1675-1680
- Leask A, Abraham DJ (2004) TGF-beta signaling and the fibrotic response. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **18**: 816-827
- Lee HS, Lim CJ, Puzon-McLaughlin W, Shattil SJ, Ginsberg MH (2009) RIAM activates integrins by linking talin to ras GTPase membrane-targeting sequences. *The Journal of biological chemistry* **284**: 5119-5127
- Lee SL, Sadovsky Y, Swirnoff AH, Polish JA, Goda P, Gavrilina G, Milbrandt J (1996) Luteinizing hormone deficiency and female infertility in mice lacking the transcription factor NGFI-A (Egr-1). *Science* **273**: 1219-1221
- Lehembre F, Yilmaz M, Wicki A, Schomber T, Strittmatter K, Ziegler D, Kren A, Went P, Derksen PW, Berns A, Jonkers J, Christofori G (2008) NCAM-induced focal adhesion assembly: a functional switch upon loss of E-cadherin. *The EMBO journal* **27**: 2603-2615
- Leight JL, Wozniak MA, Chen S, Lynch ML, Chen CS (2012) Matrix rigidity regulates a switch between TGF-beta1-induced apoptosis and epithelial-mesenchymal transition. *Molecular biology of the cell* **23**: 781-791
- Lemaire P, Vesque C, Schmitt J, Stunnenberg H, Frank R, Charnay P (1990) The serum-inducible mouse gene Krox-24 encodes a sequence-specific transcriptional activator. *Mol Cell Biol* **10**: 3456-3467
- Levental KR, Yu H, Kass L, Lakins JN, Egeblad M, Erler JT, Fong SF, Csiszar K, Giaccia A, Weninger W, Yamauchi M, Gasser DL, Weaver VM (2009) Matrix crosslinking forces tumor progression by enhancing integrin signaling. *Cell* **139**: 891-906

- Liao D, Luo Y, Markowitz D, Xiang R, Reisfeld RA (2009) Cancer associated fibroblasts promote tumor growth and metastasis by modulating the tumor immune microenvironment in a 4T1 murine breast cancer model. *PloS one* **4**: e7965
- Lim PK, Bliss SA, Patel SA, Tabora M, Dave MA, Gregory LA, Greco SJ, Bryan M, Patel PS, Rameshwar P (2011) Gap junction-mediated import of microRNA from bone marrow stromal cells can elicit cell cycle quiescence in breast cancer cells. *Cancer research* **71**: 1550-1560
- Lin X, Liang M, Feng XH (2000) Smurf2 is a ubiquitin E3 ligase mediating proteasome-dependent degradation of Smad2 in transforming growth factor-beta signaling. *J Biol Chem* **275**: 36818-36822
- Liu C, Yao J, de Belle I, Huang RP, Adamson E, Mercola D (1999) The transcription factor EGR-1 suppresses transformation of human fibrosarcoma HT1080 cells by coordinated induction of transforming growth factor-beta1, fibronectin, and plasminogen activator inhibitor-1. *J Biol Chem* **274**: 4400-4411
- Lopez-Novoa JM, Nieto MA (2009) Inflammation and EMT: an alliance towards organ fibrosis and cancer progression. *EMBO molecular medicine* **1**: 303-314
- Lowe CE, O'Rahilly S, Rochford JJ (2011) Adipogenesis at a glance. *J Cell Sci* **124**: 2681-2686
- Lu D, Han C, Wu T (2012) Microsomal prostaglandin E synthase-1 promotes hepatocarcinogenesis through activation of a novel EGR1/beta-catenin signaling axis. *Oncogene* **31**: 842-857
- Luciano RL, Wilson AC (2003) HCF-1 functions as a coactivator for the zinc finger protein Krox20. *J Biol Chem* **278**: 51116-51124
- Maeda T, Alexander CM, Friedl A (2004) Induction of syndecan-1 expression in stromal fibroblasts promotes proliferation of human breast cancer cells. *Cancer Res* **64**: 612-621
- Mages HW, Stamminger T, Rilke O, Bravo R, Kroczeck RA (1993) Expression of PILOT, a putative transcription factor, requires two signals and is cyclosporin A sensitive in T cells. *Int Immunol* **5**: 63-70
- Majno G, Gabbiani G, Hirschel BJ, Ryan GB, Statkov PR (1971) Contraction of granulation tissue in vitro: similarity to smooth muscle. *Science* **173**: 548-550
- Malanchi I, Santamaria-Martinez A, Susanto E, Peng H, Lehr HA, Delaloye JF, Huelsken J (2012) Interactions between cancer stem cells and their niche govern metastatic colonization. *Nature* **481**: 85-89
- Malmstrom J, Lindberg H, Lindberg C, Bratt C, Wieslander E, Delander EL, Sarnstrand B, Burns JS, Mose-Larsen P, Fey S, Marko-Varga G (2004) Transforming growth factor-beta 1 specifically induce proteins involved in the myofibroblast contractile apparatus. *Molecular & cellular proteomics : MCP* **3**: 466-477
- Mandl M, Slack DN, Keyse SM (2005) Specific inactivation and nuclear anchoring of extracellular signal-regulated kinase 2 by the inducible dual-specificity protein phosphatase DUSP5. *Mol Cell Biol* **25**: 1830-1845
- Mann J, Oakley F, Akiboye F, Elsharkawy A, Thorne AW, Mann DA (2007) Regulation of myofibroblast transdifferentiation by DNA methylation and MeCP2: implications for wound healing and fibrogenesis. *Cell death and differentiation* **14**: 275-285
- Manning BD, Cantley LC (2007) AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell* **129**: 1261-1274

- Marsh T, Pietras K, McAllister SS (2013) Fibroblasts as architects of cancer pathogenesis. *Biochimica et biophysica acta* **1832**: 1070-1078
- Massague J (2008) TGFbeta in Cancer. *Cell* **134**: 215-230
- Massague J, Gomis RR (2006) The logic of TGFbeta signaling. *FEBS Lett* **580**: 2811-2820
- Masszi A, Speight P, Charbonney E, Lodyga M, Nakano H, Szaszi K, Kapus A Fate-determining mechanisms in epithelial-myofibroblast transition: major inhibitory role for Smad3. *J Cell Biol* **188**: 383-399
- Matsuo Y, Ochi N, Sawai H, Yasuda A, Takahashi H, Funahashi H, Takeyama H, Tong Z, Guha S (2009) CXCL8/IL-8 and CXCL12/SDF-1alpha co-operatively promote invasiveness and angiogenesis in pancreatic cancer. *International journal of cancer Journal internationale du cancer* **124**: 853-861
- Mattila PK, Lappalainen P (2008) Filopodia: molecular architecture and cellular functions. *Nature reviews* **9**: 446-454
- Medjkane S, Perez-Sanchez C, Gaggioli C, Sahai E, Treisman R (2009) Myocardin-related transcription factors and SRF are required for cytoskeletal dynamics and experimental metastasis. *Nature cell biology* **11**: 257-268
- Mechta-Grigoriou F, Garel S, Charnay P (2000) Nab proteins mediate a negative feedback loop controlling Krox-20 activity in the developing hindbrain. *Development* **127**: 119-128
- Menon S, Beningo KA (2011) Cancer cell invasion is enhanced by applied mechanical stimulation. *PloS one* **6**: e17277
- Mensing H, Pontz BF, Muller PK, Gauss-Muller V (1983) A study on fibroblast chemotaxis using fibronectin and conditioned medium as chemoattractants. *European journal of cell biology* **29**: 268-273
- Merlo LM, Pepper JW, Reid BJ, Maley CC (2006) Cancer as an evolutionary and ecological process. *Nature reviews Cancer* **6**: 924-935
- Miano JM, Long X, Fujiwara K (2007) Serum response factor: master regulator of the actin cytoskeleton and contractile apparatus. *American journal of physiology* **292**: C70-81
- Micke P, Ostman A (2004) Tumour-stroma interaction: cancer-associated fibroblasts as novel targets in anti-cancer therapy? *Lung cancer* **45 Suppl 2**: S163-175
- Micuda S, Rosel D, Ryska A, Brabek J (2010) ROCK inhibitors as emerging therapeutic candidates for sarcomas. *Current cancer drug targets* **10**: 127-134
- Milbrandt J (1987) A nerve growth factor-induced gene encodes a possible transcriptional regulatory factor. *Science* **238**: 797-799
- Miller JC, Pabo CO (2001) Rearrangement of side-chains in a Zif268 mutant highlights the complexities of zinc finger-DNA recognition. *J Mol Biol* **313**: 309-315
- Mohl C, Kirchgessner N, Schafer C, Kupper K, Born S, Diez G, Goldmann WH, Merkel R, Hoffmann B (2009) Becoming stable and strong: the interplay between vinculin exchange dynamics and adhesion strength during adhesion site maturation. *Cell motility and the cytoskeleton* **66**: 350-364
- Moinfar F, Beham A, Friedrich G, Deutsch A, Hrzenjak A, Luschin G, Tavassoli FA (2008) Macro-environment of breast carcinoma: frequent genetic alterations in the normal appearing skins of patients

with breast cancer. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* **21**: 639-646

Mori L, Bellini A, Stacey MA, Schmidt M, Mattoli S (2005) Fibrocytes contribute to the myofibroblast population in wounded skin and originate from the bone marrow. *Experimental cell research* **304**: 81-90

Muerkoster S, Wegehenkel K, Arlt A, Witt M, Sipos B, Kruse ML, Sebens T, Kloppel G, Kalthoff H, Folsch UR, Schafer H (2004) Tumor stroma interactions induce chemoresistance in pancreatic ductal carcinoma cells involving increased secretion and paracrine effects of nitric oxide and interleukin-1beta. *Cancer research* **64**: 1331-1337

Muller HJ, Skerka C, Bialonski A, Zipfel PF (1991) Clone pAT 133 identifies a gene that encodes another human member of a class of growth factor-induced genes with almost identical zinc-finger domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**: 10079-10083

Nagano S, Perentes JY, Jain RK, Boucher Y (2008) Cancer cell death enhances the penetration and efficacy of oncolytic herpes simplex virus in tumors. *Cancer research* **68**: 3795-3802

Nagy JA, Chang SH, Dvorak AM, Dvorak HF (2009) Why are tumour blood vessels abnormal and why is it important to know? *British journal of cancer* **100**: 865-869

Nardelli J, Gibson T, Charnay P (1992) Zinc finger-DNA recognition: analysis of base specificity by site-directed mutagenesis. *Nucleic Acids Res* **20**: 4137-4144

Nouet S, Amzallag N, Li JM, Louis S, Seitz I, Cui TX, Alleaume AM, Di Benedetto M, Boden C, Masson M, Strosberg AD, Horiuchi M, Couraud PO, Nahmias C (2004) Trans-inactivation of receptor tyrosine kinases by novel angiotensin II AT2 receptor-interacting protein, ATIP. *J Biol Chem* **279**: 28989-28997

Nurden AT (2011) Platelets, inflammation and tissue regeneration. *Thrombosis and haemostasis* **105 Suppl 1**: S13-33

O'Connell JT, Sugimoto H, Cooke VG, MacDonald BA, Mehta AI, LeBleu VS, Dewar R, Rocha RM, Brentani RR, Resnick MB, Neilson EG, Zeisberg M, Kalluri R (2011) VEGF-A and Tenascin-C produced by S100A4+ stromal cells are important for metastatic colonization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**: 16002-16007

O'Donovan KJ, Tourtellotte WG, Millbrandt J, Baraban JM (1999) The EGR family of transcription-regulatory factors: progress at the interface of molecular and systems neuroscience. *Trends Neurosci* **22**: 167-173

Oberauer R, Rist W, Lenter MC, Hamilton BS, Neubauer H (2010) EGFL6 is increasingly expressed in human obesity and promotes proliferation of adipose tissue-derived stromal vascular cells. *Mol Cell Biochem* **343**: 257-269

Ogishima T, Shiina H, Breault JE, Tabatabai L, Bassett WW, Enokida H, Li LC, Kawakami T, Urakami S, Ribeiro-Filho LA, Terashima M, Fujime M, Igawa M, Dahiya R (2005) Increased heparanase expression is caused by promoter hypomethylation and up-regulation of transcriptional factor early growth response-1 in human prostate cancer. *Clin Cancer Res* **11**: 1028-1036

Olaso E, Salado C, Egilegor E, Gutierrez V, Santisteban A, Sancho-Bru P, Friedman SL, Vidal-Vanaclocha F (2003) Proangiogenic role of tumor-activated hepatic stellate cells in experimental melanoma metastasis. *Hepatology* **37**: 674-685

- Olive KP, Jacobetz MA, Davidson CJ, Gopinathan A, McIntyre D, Honess D, Madhu B, Goldgraben MA, Caldwell ME, Allard D, Frese KK, Denicola G, Feig C, Combs C, Winter SP, Ireland-Zecchini H, Reichelt S, Howat WJ, Chang A, Dhara M, Wang L, Ruckert F, Grutzmann R, Pilarsky C, Izeradjene K, Hingorani SR, Huang P, Davies SE, Plunkett W, Egorin M, Hruban RH, Whitebread N, McGovern K, Adams J, Iacobuzio-Donahue C, Griffiths J, Tuveson DA (2009) Inhibition of Hedgehog signaling enhances delivery of chemotherapy in a mouse model of pancreatic cancer. *Science* **324**: 1457-1461
- Onichtchouk D, Chen YG, Dosch R, Gawantka V, Delius H, Massague J, Niehrs C (1999) Silencing of TGF-beta signalling by the pseudoreceptor BAMBI. *Nature* **401**: 480-485
- Orimo A, Gupta PB, Sgroi DC, Arenzana-Seisdedos F, Delaunay T, Naeem R, Carey VJ, Richardson AL, Weinberg RA (2005) Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. *Cell* **121**: 335-348
- Oskarsson T, Massague J (2012) Extracellular matrix players in metastatic niches. *The EMBO journal* **31**: 254-256
- Ouellette AJ, Malt RA, Sukhatme VP, Bonventre JV (1990) Expression of two "immediate early" genes, Egr-1 and c-fos, in response to renal ischemia and during compensatory renal hypertrophy in mice. *J Clin Invest* **85**: 766-771
- Paget S (1989) The distribution of secondary growths in cancer of the breast. 1889. *Cancer metastasis reviews* **8**: 98-101
- Pani G, Giannoni E, Galeotti T, Chiarugi P (2009) Redox-based escape mechanism from death: the cancer lesson. *Antioxid Redox Signal* **11**: 2791-2806
- Pankov R, Yamada KM (2002) Fibronectin at a glance. *Journal of cell science* **115**: 3861-3863
- Pankova K, Rosel D, Novotny M, Brabek J (2010) The molecular mechanisms of transition between mesenchymal and amoeboid invasiveness in tumor cells. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **67**: 63-71
- Parri M, Taddei ML, Bianchini F, Calorini L, Chiarugi P (2009) EphA2 reexpression prompts invasion of melanoma cells shifting from mesenchymal to amoeboid-like motility style. *Cancer research* **69**: 2072-2081
- Parsons JT, Horwitz AR, Schwartz MA (2010) Cell adhesion: integrating cytoskeletal dynamics and cellular tension. *Nature reviews Molecular cell biology* **11**: 633-643
- Paszek MJ, Zahir N, Johnson KR, Lakins JN, Rozenberg GI, Gefen A, Reinhart-King CA, Margulies SS, Dembo M, Boettiger D, Hammer DA, Weaver VM (2005) Tensional homeostasis and the malignant phenotype. *Cancer cell* **8**: 241-254
- Patocs A, Zhang L, Xu Y, Weber F, Caldes T, Mutter GL, Platzer P, Eng C (2007) Breast-cancer stromal cells with TP53 mutations and nodal metastases. *The New England journal of medicine* **357**: 2543-2551
- Paulsson J, Sjoblom T, Micke P, Ponten F, Landberg G, Heldin CH, Bergh J, Brennan DJ, Jirstrom K, Ostman A (2009) Prognostic significance of stromal platelet-derived growth factor beta-receptor expression in human breast cancer. *The American journal of pathology* **175**: 334-341
- Pavletich NP, Pabo CO (1991) Zinc finger-DNA recognition: crystal structure of a Zif268-DNA complex at 2.1 Å. *Science* **252**: 809-817

- Peinado H, Olmeda D, Cano A (2007) Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype? *Nat Rev Cancer* **7**: 415-428
- Perez-Cadahia B, Drobic B, Davie JR (2011) Activation and function of immediate-early genes in the nervous system. *Biochem Cell Biol* **89**: 61-73
- Peters S, Adjei AA (2012) MET: a promising anticancer therapeutic target. *Nature reviews Clinical oncology* **9**: 314-326
- Peyton SR, Kim PD, Ghajar CM, Seliktar D, Putnam AJ (2008) The effects of matrix stiffness and RhoA on the phenotypic plasticity of smooth muscle cells in a 3-D biosynthetic hydrogel system. *Biomaterials* **29**: 2597-2607
- Pietras K, Ostman A (2010) Hallmarks of cancer: interactions with the tumor stroma. *Experimental cell research* **316**: 1324-1331
- Plachy J, Vilhelmova M (1984) Syngeneic lines of chickens. VII. The lines derived from the recombinants at the B complex (MHC) of Rous sarcoma regressor and progressor inbred lines of chickens. *Folia biologica* **30**: 189-201
- Planche A, Bacac M, Provero P, Fusco C, Delorenzi M, Stehle JC, Stamenkovic I (2011) Identification of prognostic molecular features in the reactive stroma of human breast and prostate cancer. *PloS one* **6**: e18640
- Pohlert D, Brenmoehl J, Löffler I, Müller CK, Leipner C, Schultze-Mosgau S, Stallmach A, Kinne RW, Wolf G (2009) TGF-beta and fibrosis in different organs - molecular pathway imprints. *Biochimica et biophysica acta* **1792**: 746-756
- Polyak K, Weinberg RA (2009) Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits. *Nature reviews Cancer* **9**: 265-273
- Provenzano PP, Inman DR, Eliceiri KW, Keely PJ (2009) Matrix density-induced mechanoregulation of breast cell phenotype, signaling and gene expression through a FAK-ERK linkage. *Oncogene* **28**: 4326-4343
- Qiu W, Hu M, Sridhar A, Opeskin K, Fox S, Shipitsin M, Trivett M, Thompson ER, Ramakrishna M, Gorringer KL, Polyak K, Haviv I, Campbell IG (2008) No evidence of clonal somatic genetic alterations in cancer-associated fibroblasts from human breast and ovarian carcinomas. *Nature genetics* **40**: 650-655
- Radisky DC, Levy DD, Littlepage LE, Liu H, Nelson CM, Fata JE, Leake D, Godden EL, Albertson DG, Nieto MA, Werb Z, Bissell MJ (2005) Rac1b and reactive oxygen species mediate MMP-3-induced EMT and genomic instability. *Nature* **436**: 123-127
- Rahn JJ, Chow JW, Horne GJ, Mah BK, Emerman JT, Hoffman P, Hugh JC (2005) MUC1 mediates transendothelial migration in vitro by ligating endothelial cell ICAM-1. *Clinical & experimental metastasis* **22**: 475-483
- Rajkumar VS, Howell K, Csiszar K, Denton CP, Black CM, Abraham DJ (2005) Shared expression of phenotypic markers in systemic sclerosis indicates a convergence of pericytes and fibroblasts to a myofibroblast lineage in fibrosis. *Arthritis research & therapy* **7**: R1113-1123
- Rasanen K, Vaheri A (2010) Activation of fibroblasts in cancer stroma. *Experimental cell research* **316**: 2713-2722

- Recio JA, Merlino G (2003) Hepatocyte growth factor/scatter factor induces feedback up-regulation of CD44v6 in melanoma cells through Egr-1. *Cancer Res* **63**: 1576-1582
- Redmond KL, Crawford NT, Farmer H, D'Costa ZC, O'Brien GJ, Buckley NE, Kennedy RD, Johnston PG, Harkin DP, Mullan PB (2010) T-box 2 represses NDRG1 through an EGR1-dependent mechanism to drive the proliferation of breast cancer cells. *Oncogene* **29**: 3252-3262
- Reimann T, Hempel U, Krautwald S, Axmann A, Scheibe R, Seidel D, Wenzel KW (1997) Transforming growth factor-beta1 induces activation of Ras, Raf-1, MEK and MAPK in rat hepatic stellate cells. *FEBS Lett* **403**: 57-60
- Riser BL, Najmabadi F, Perbal B, Peterson DR, Rambow JA, Riser ML, Sukowski E, Yeger H, Riser SC (2009) CCN3 (NOV) is a negative regulator of CCN2 (CTGF) and a novel endogenous inhibitor of the fibrotic pathway in an in vitro model of renal disease. *Am J Pathol* **174**: 1725-1734
- Roberts AB, Anzano MA, Lamb LC, Smith JM, Frolik CA, Marquardt H, Todaro GJ, Sporn MB (1982) Isolation from murine sarcoma cells of novel transforming growth factors potentiated by EGF. *Nature* **295**: 417-419
- Roberts AB, Sporn MB, Assoian RK, Smith JM, Roche NS, Wakefield LM, Heine UI, Liotta LA, Falanga V, Kehrl JH, et al. (1986) Transforming growth factor type beta: rapid induction of fibrosis and angiogenesis in vivo and stimulation of collagen formation in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **83**: 4167-4171
- Rodriguez C, Huang LJ, Son JK, McKee A, Xiao Z, Lodish HF (2001) Functional cloning of the proto-oncogene brain factor-1 (BF-1) as a Smad-binding antagonist of transforming growth factor-beta signaling. *J Biol Chem* **276**: 30224-30230
- Romanelli RG, Caligiuri A, Carloni V, DeFranco R, Montalto P, Ceni E, Casini A, Gentilini P, Pinzani M (1997) Effect of pentoxifylline on the degradation of procollagen type I produced by human hepatic stellate cells in response to transforming growth factor-beta 1. *British journal of pharmacology* **122**: 1047-1054
- Ronnov-Jessen L, Petersen OW, Kotliansky VE, Bissell MJ (1995) The origin of the myofibroblasts in breast cancer. Recapitulation of tumor environment in culture unravels diversity and implicates converted fibroblasts and recruited smooth muscle cells. *The Journal of clinical investigation* **95**: 859-873
- Rosel D, Brabek J, Tolde O, Mierke CT, Zitterbart DP, Raupach C, Bicanova K, Kollmannsberger P, Pankova D, Vesely P, Folk P, Fabry B (2008) Up-regulation of Rho/ROCK signaling in sarcoma cells drives invasion and increased generation of protrusive forces. *Mol Cancer Res* **6**: 1410-1420
- Sabeh F, Ota I, Holmbeck K, Birkedal-Hansen H, Soloway P, Balbin M, Lopez-Otin C, Shapiro S, Inada M, Krane S, Allen E, Chung D, Weiss SJ (2004) Tumor cell traffic through the extracellular matrix is controlled by the membrane-anchored collagenase MT1-MMP. *The Journal of cell biology* **167**: 769-781
- Sabeh F, Shimizu-Hirota R, Weiss SJ (2009) Protease-dependent versus -independent cancer cell invasion programs: three-dimensional amoeboid movement revisited. *The Journal of cell biology* **185**: 11-19
- Saeed AI, Sharov V, White J, Li J, Liang W, Bhagabati N, Braisted J, Klapa M, Currier T, Thiagarajan M, Sturn A, Snuffin M, Rezantsev A, Popov D, Ryltsov A, Kostukovich E, Borisovsky I, Liu Z, Vinsavich A, Trush V, Quackenbush J (2003) TM4: a free, open-source system for microarray data management and analysis. *BioTechniques* **34**: 374-378

- Sahai E (2007) Illuminating the metastatic process. *Nature reviews Cancer* **7**: 737-749
- Sahai E, Marshall CJ (2003) Differing modes of tumour cell invasion have distinct requirements for Rho/ROCK signalling and extracellular proteolysis. *Nature cell biology* **5**: 711-719
- Sampson N, Koziel R, Zenzmaier C, Bubendorf L, Plas E, Jansen-Durr P, Berger P (2011) ROS signaling by NOX4 drives fibroblast-to-myofibroblast differentiation in the diseased prostatic stroma. *Mol Endocrinol* **25**: 503-515
- Santhanam AN, Baker AR, Hegamyer G, Kirschmann DA, Colburn NH (2010) Pcd4 repression of lysyl oxidase inhibits hypoxia-induced breast cancer cell invasion. *Oncogene* **29**: 3921-3932
- Scott AM, Wiseman G, Welt S, Adjei A, Lee FT, Hopkins W, Divgi CR, Hanson LH, Mitchell P, Gansen DN, Larson SM, Ingle JN, Hoffman EW, Tanswell P, Ritter G, Cohen LS, Bette P, Arvay L, Amelsberg A, Vlock D, Rettig WJ, Old LJ (2003) A Phase I dose-escalation study of sibtrotuzumab in patients with advanced or metastatic fibroblast activation protein-positive cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **9**: 1639-1647
- Sevetson BR, Svaren J, Milbrandt J (2000) A novel activation function for NAB proteins in EGR-dependent transcription of the luteinizing hormone beta gene. *J Biol Chem* **275**: 9749-9757
- Seykora JT, Jih D, Elenitsas R, Horng WH, Elder DE (2003) Gene expression profiling of melanocytic lesions. *Am J Dermatopathol* **25**: 6-11
- Sheppard D (2005) Integrin-mediated activation of latent transforming growth factor beta. *Cancer Metastasis Rev* **24**: 395-402
- Shieh AC, Rozansky HA, Hinz B, Swartz MA (2011) Tumor cell invasion is promoted by interstitial flow-induced matrix priming by stromal fibroblasts. *Cancer research* **71**: 790-800
- Shoulders MD, Raines RT (2009) Collagen structure and stability. *Annual review of biochemistry* **78**: 929-958
- Schauer IG, Sood AK, Mok S, Liu J (2011) Cancer-associated fibroblasts and their putative role in potentiating the initiation and development of epithelial ovarian cancer. *Neoplasia* **13**: 393-405
- Silverman ES, Du J, Williams AJ, Wadgaonkar R, Drazen JM, Collins T (1998) cAMP-response-element-binding-protein-binding protein (CBP) and p300 are transcriptional co-activators of early growth response factor-1 (Egr-1). *Biochem J* **336 (Pt 1)**: 183-189
- Silzle T, Kreutz M, Dobler MA, Brockhoff G, Knuechel R, Kunz-Schughart LA (2003) Tumor-associated fibroblasts recruit blood monocytes into tumor tissue. *European journal of immunology* **33**: 1311-1320
- Simian M, Hirai Y, Navre M, Werb Z, Lochter A, Bissell MJ (2001) The interplay of matrix metalloproteinases, morphogens and growth factors is necessary for branching of mammary epithelial cells. *Development* **128**: 3117-3131
- Simpson MA, Wilson CM, Furcht LT, Spicer AP, Oegema TR, Jr., McCarthy JB (2002) Manipulation of hyaluronan synthase expression in prostate adenocarcinoma cells alters pericellular matrix retention and adhesion to bone marrow endothelial cells. *The Journal of biological chemistry* **277**: 10050-10057
- Smyth GK (2004) Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Statistical applications in genetics and molecular biology* **3**: Article3

- Sporn MB (1996) The war on cancer. *Lancet* **347**: 1377-1381
- Srinivasan R, Mager GM, Ward RM, Mayer J, Svaren J (2006) NAB2 represses transcription by interacting with the CHD4 subunit of the nucleosome remodeling and deacetylase (NuRD) complex. *J Biol Chem* **281**: 15129-15137
- Steege PS, Theodorescu D (2008) Metastasis: a therapeutic target for cancer. *Nature clinical practice Oncology* **5**: 206-219
- Stover DG, Bierie B, Moses HL (2007) A delicate balance: TGF-beta and the tumor microenvironment. *Journal of cellular biochemistry* **101**: 851-861
- Strauli P, In-Albon A, Haemmerli G (1983) Morphological studies on V2 carcinoma invasion and tumor-associated connective tissue changes in the rabbit mesentery. *Cancer research* **43**: 5403-5410
- Sugimoto H, Mundel TM, Kieran MW, Kalluri R (2006) Identification of fibroblast heterogeneity in the tumor microenvironment. *Cancer biology & therapy* **5**: 1640-1646
- Suzuki T, Inoue A, Miki Y, Moriya T, Akahira J, Ishida T, Hirakawa H, Yamaguchi Y, Hayashi S, Sasano H (2007) Early growth responsive gene 3 in human breast carcinoma: a regulator of estrogen-mediated invasion and a potent prognostic factor. *Endocrine-related cancer* **14**: 279-292
- Svoboda J, Dvorak M, Guntaka R, Geryk J (1986) Transmission of (LTR, v-src, LTR) without recombination with a helper virus. *Virology* **153**: 314-317
- Swaney JS, Roth DM, Olson ER, Naugle JE, Meszaros JG, Insel PA (2005) Inhibition of cardiac myofibroblast formation and collagen synthesis by activation and overexpression of adenylyl cyclase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 437-442
- Swirnoff AH, Apel ED, Svaren J, Sevetson BR, Zimonjic DB, Popescu NC, Milbrandt J (1998) Nab1, a corepressor of NGFI-A (Egr-1), contains an active transcriptional repression domain. *Mol Cell Biol* **18**: 512-524
- Taddei ML, Giannoni E, Comito G, Chiarugi P (2013) Microenvironment and tumor cell plasticity: An easy way out. *Cancer letters*
- Taddei ML, Parri M, Angelucci A, Bianchini F, Marconi C, Giannoni E, Raugei G, Bologna M, Calorini L, Chiarugi P (2011) EphA2 induces metastatic growth regulating amoeboid motility and clonogenic potential in prostate carcinoma cells. *Molecular cancer research : MCR* **9**: 149-160
- Taddei ML, Parri M, Angelucci A, Onnis B, Bianchini F, Giannoni E, Raugei G, Calorini L, Rucci N, Teti A, Bologna M, Chiarugi P (2009) Kinase-dependent and -independent roles of EphA2 in the regulation of prostate cancer invasion and metastasis. *The American journal of pathology* **174**: 1492-1503
- Takeda H, Katagata Y, Hozumi Y, Kondo S (2004) Effects of angiotensin II receptor signaling during skin wound healing. *Am J Pathol* **165**: 1653-1662
- Thiery JP, Acloque H, Huang RY, Nieto MA (2009) Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* **139**: 871-890
- Thijssen VL, Brandwijk RJ, Dings RP, Griffioen AW (2004) Angiogenesis gene expression profiling in xenograft models to study cellular interactions. *Experimental cell research* **299**: 286-293

- Tchou J, Kossenkov AV, Chang L, Satija C, Herlyn M, Showe LC, Pure E (2012) Human breast cancer associated fibroblasts exhibit subtype specific gene expression profiles. *BMC medical genomics* **5**: 39
- Timmons JA, Wennmalm K, Larsson O, Walden TB, Lassmann T, Petrovic N, Hamilton DL, Gimeno RE, Wahlestedt C, Baar K, Nedergaard J, Cannon B (2007) Myogenic gene expression signature establishes that brown and white adipocytes originate from distinct cell lineages. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 4401-4406
- Tokuo H, Ikebe M (2004) Myosin X transports Mena/VASP to the tip of filopodia. *Biochemical and biophysical research communications* **319**: 214-220
- Tolde O, Rosel D, Janostiak R, Vesely P, Brabek J (2012) Dynamics and Morphology of Focal Adhesions in Complex 3D Environment. *Folia biologica* **58**: 177-184
- Tolde O, Rosel D, Vesely P, Folk P, Brabek J (2010) The structure of invadopodia in a complex 3D environment. *European journal of cell biology* **89**: 674-680
- Tomasek JJ, Gabbiani G, Hinz B, Chaponnier C, Brown RA (2002) Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nature reviews Molecular cell biology* **3**: 349-363
- Topilko P, Schneider-Maunoury S, Levi G, Trembleau A, Gourdji D, Driancourt MA, Rao CV, Charnay P (1998) Multiple pituitary and ovarian defects in Krox-24 (NGFI-A, Egr-1)-targeted mice. *Mol Endocrinol* **12**: 107-122
- Totsukawa G, Yamakita Y, Yamashiro S, Hartshorne DJ, Sasaki Y, Matsumura F (2000) Distinct roles of ROCK (Rho-kinase) and MLCK in spatial regulation of MLC phosphorylation for assembly of stress fibers and focal adhesions in 3T3 fibroblasts. *The Journal of cell biology* **150**: 797-806
- Toullec A, Gerald D, Despouy G, Bourachot B, Cardon M, Lefort S, Richardson M, Rigai G, Parrini MC, Lucchesi C, Bellanger D, Stern MH, Dubois T, Sastre-Garau X, Delattre O, Vincent-Salomon A, Mechta-Grigoriou F (2010) Oxidative stress promotes myofibroblast differentiation and tumour spreading. *EMBO molecular medicine* **2**: 211-230
- Tourtellotte WG, Nagarajan R, Auyeung A, Mueller C, Milbrandt J (1999) Infertility associated with incomplete spermatogenic arrest and oligozoospermia in Egr4-deficient mice. *Development* **126**: 5061-5071
- Tu SM, Lin SH, Logothetis CJ (2002) Stem-cell origin of metastasis and heterogeneity in solid tumours. *Lancet Oncol* **3**: 508-513
- Udabage L, Brownlee GR, Waltham M, Blick T, Walker EC, Heldin P, Nilsson SK, Thompson EW, Brown TJ (2005) Antisense-mediated suppression of hyaluronan synthase 2 inhibits the tumorigenesis and progression of breast cancer. *Cancer research* **65**: 6139-6150
- Vanharanta S, Massague J (2012) Field cancerization: something new under the sun. *Cell* **149**: 1179-1181
- Velling T, Risteli J, Wennerberg K, Mosher DF, Johansson S (2002) Polymerization of type I and III collagens is dependent on fibronectin and enhanced by integrins alpha 11beta 1 and alpha 2beta 1. *The Journal of biological chemistry* **277**: 37377-37381
- Vesely P, Donner L, Cinatl J, Sovova V (1968) Interaction of Rous sarcoma virus with rat embryo fibroblasts of inbred Lewis strain in vitro. *Folia biologica* **14**: 457-465

- Vicente-Manzanares M, Koach MA, Whitmore L, Lamers ML, Horwitz AF (2008) Segregation and activation of myosin IIB creates a rear in migrating cells. *The Journal of cell biology* **183**: 543-554
- Vo N, Goodman RH (2001) CREB-binding protein and p300 in transcriptional regulation. *J Biol Chem* **276**: 13505-13508
- Vong S, Kalluri R (2011) The role of stromal myofibroblast and extracellular matrix in tumor angiogenesis. *Genes & cancer* **2**: 1139-1145
- Walker N, Badri L, Wettlaufer S, Flint A, Sajjan U, Krebsbach PH, Keshamouni VG, Peters-Golden M, Lama VN (2011) Resident tissue-specific mesenchymal progenitor cells contribute to fibrogenesis in human lung allografts. *The American journal of pathology* **178**: 2461-2469
- Wallace JA, Li F, Leone G, Ostrowski MC (2011) Pten in the breast tumor microenvironment: modeling tumor-stroma coevolution. *Cancer research* **71**: 1203-1207
- Walter K, Omura N, Hong SM, Griffith M, Goggins M (2008) Pancreatic cancer associated fibroblasts display normal allelotypes. *Cancer biology & therapy* **7**: 882-888
- Wang B, Khachigian LM, Esau L, Birrer MJ, Zhao X, Parker MI, Hendricks DT (2009a) A key role for early growth response-1 and nuclear factor-kappaB in mediating and maintaining GRO/CXCR2 proliferative signaling in esophageal cancer. *Mol Cancer Res* **7**: 755-764
- Wang DZ, Olson EN (2004) Control of smooth muscle development by the myocardin family of transcriptional coactivators. *Curr Opin Genet Dev* **14**: 558-566
- Wang W, Li Q, Yamada T, Matsumoto K, Matsumoto I, Oda M, Watanabe G, Kayano Y, Nishioka Y, Sone S, Yano S (2009b) Crosstalk to stromal fibroblasts induces resistance of lung cancer to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **15**: 6630-6638
- Warburg O (1956) On the origin of cancer cells. *Science* **123**: 309-314
- Webb BA, Chimenti M, Jacobson MP, Barber DL (2011) Dysregulated pH: a perfect storm for cancer progression. *Nature reviews Cancer* **11**: 671-677
- Weber F, Xu Y, Zhang L, Patocs A, Shen L, Platzer P, Eng C (2007) Microenvironmental genomic alterations and clinicopathological behavior in head and neck squamous cell carcinoma. *JAMA : the journal of the American Medical Association* **297**: 187-195
- Weinberg RA (2008) Coevolution in the tumor microenvironment. *Nature genetics* **40**: 494-495
- Werner S, Grose R (2003) Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiological reviews* **83**: 835-870
- Wheaton WW, Chandel NS (2011) Hypoxia. 2. Hypoxia regulates cellular metabolism. *American journal of physiology Cell physiology* **300**: C385-393
- Wolf K, Mazo I, Leung H, Engelke K, von Andrian UH, Deryugina EI, Strongin AY, Bocker EB, Friedl P (2003a) Compensation mechanism in tumor cell migration: mesenchymal-amoeboid transition after blocking of pericellular proteolysis. *The Journal of cell biology* **160**: 267-277
- Wolf K, Muller R, Borgmann S, Bocker EB, Friedl P (2003b) Amoeboid shape change and contact guidance: T-lymphocyte crawling through fibrillar collagen is independent of matrix remodeling by MMPs and other proteases. *Blood* **102**: 3262-3269

- Wu M, Melichian DS, de la Garza M, Gruner K, Bhattacharyya S, Barr L, Nair A, Shahrara S, Sporn PH, Mustoe TA, Tourtellotte WG, Varga J (2009) Essential roles for early growth response transcription factor Egr-1 in tissue fibrosis and wound healing. *Am J Pathol* **175**: 1041-1055
- Wyckoff JB, Pinner SE, Gschmeissner S, Condeelis JS, Sahai E (2006) ROCK- and myosin-dependent matrix deformation enables protease-independent tumor-cell invasion in vivo. *Current biology : CB* **16**: 1515-1523
- Wynn TA, Ramalingam TR (2012) Mechanisms of fibrosis: therapeutic translation for fibrotic disease. *Nature medicine* **18**: 1028-1040
- Xu RH, Pelicano H, Zhou Y, Carew JS, Feng L, Bhalla KN, Keating MJ, Huang P (2005) Inhibition of glycolysis in cancer cells: a novel strategy to overcome drug resistance associated with mitochondrial respiratory defect and hypoxia. *Cancer research* **65**: 613-621
- Xue F, Takahara T, Yata Y, Xia Q, Nonome K, Shinno E, Kanayama M, Takahara S, Sugiyama T (2008) Blockade of Rho/Rho-associated coiled coil-forming kinase signaling can prevent progression of hepatocellular carcinoma in matrix metalloproteinase-dependent manner. *Hepatology research : the official journal of the Japan Society of Hepatology* **38**: 810-817
- Yang J, Mani SA, Donaher JL, Ramaswamy S, Itzykson RA, Come C, Savagner P, Gitelman I, Richardson A, Weinberg RA (2004) Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. *Cell* **117**: 927-939
- Yang SZ, Eltoum IA, Abdulkadir SA (2006) Enhanced EGR1 activity promotes the growth of prostate cancer cells in an androgen-depleted environment. *J Cell Biochem* **97**: 1292-1299
- Yilmaz M, Christofori G (2010) Mechanisms of motility in metastasizing cells. *Mol Cancer Res* **8**: 629-642
- Ying H, Biroc SL, Li WW, Alicke B, Xuan JA, Pagila R, Ohashi Y, Okada T, Kamata Y, Dinter H (2006) The Rho kinase inhibitor fasudil inhibits tumor progression in human and rat tumor models. *Molecular cancer therapeutics* **5**: 2158-2164
- Yoshida T, Hoofnagle MH, Owens GK (2004) Myocardin and Prx1 contribute to angiotensin II-induced expression of smooth muscle alpha-actin. *Circ Res* **94**: 1075-1082
- Zeisberg EM, Tarnavski O, Zeisberg M, Dorfman AL, McMullen JR, Gustafsson E, Chandraker A, Yuan X, Pu WT, Roberts AB, Neilson EG, Sayegh MH, Izumo S, Kalluri R (2007) Endothelial-to-mesenchymal transition contributes to cardiac fibrosis. *Nature medicine* **13**: 952-961
- Zeisberg M, Kalluri R (2013) Cellular mechanisms of tissue fibrosis. 1. Common and organ-specific mechanisms associated with tissue fibrosis. *American journal of physiology Cell physiology* **304**: C216-225
- Zhang T, Wolfe MW, Roberson MS (2001) An early growth response protein (Egr) 1 cis-element is required for gonadotropin-releasing hormone-induced mitogen-activated protein kinase phosphatase 2 gene expression. *J Biol Chem* **276**: 45604-45613
- Zhang Y, Tang H, Cai J, Zhang T, Guo J, Feng D, Wang Z (2011) Ovarian cancer-associated fibroblasts contribute to epithelial ovarian carcinoma metastasis by promoting angiogenesis, lymphangiogenesis and tumor cell invasion. *Cancer letters* **303**: 47-55

Zheng L, Pu J, Jiang G, Weng M, He J, Mei H, Hou X, Tong Q (2010) Abnormal expression of early growth response 1 in gastric cancer: association with tumor invasion, metastasis and heparanase transcription. *Pathol Int* **60**: 268-277

Zhou HM, Wang J, Elliott C, Wen W, Hamilton DW, Conway SJ (2010) Spatiotemporal expression of periostin during skin development and incisional wound healing: lessons for human fibrotic scar formation. *J Cell Commun Signal* **4**: 99-107

Zocchi MR, Vidal M, Poggi A (1993) Involvement of CD56/N-CAM molecule in the adhesion of human solid tumor cell lines to endothelial cells. *Experimental cell research* **204**: 130-135

9. Legendy elektronické přílohy

Obr. EP1 Ověření změn genové exprese detekovaných na mikročipu v buňkách PR9692 a buňkách z nich odvozených pomocí qPCR. Hladina mRNA v buňkách kultivovaných na nepokrytých plastických kultivačních miskách představuje u každé ověřované exprese genu hodnotu 100% a relativní hladiny mRNA v ostatních vzorcích byly vyjadřovány jako procenta z této hodnoty. Každý sloupec představuje průměrnou hodnotu z biologického i technického triplikátu. Chybové úsečky, standardní odchylky a hodnoty p (p1 pro PR9692 vs. PR9692-E9 a p2 pro PR9692-E9-EGR1 vs. PR9692-E9) byly získány Welchovým t-testem.

Tab. EP1 Primery použité pro PCR reakce. Sekvence a technické detaily použitých PCR reakcí. U řádků bez vyznačeného počtu cyklů se jedná o podmínky použité pro qPCR.

Tab. EP2 Geny ovlivněné působením MPPN na buňky CEDM. Detailní výsledky včetně hodnot násobků změn, hodnot p účinku působení a intenzity normalizované GC-RMA.

Tab. EP3 Geny regulované signalizací dráhou TGF- β v kuřecích myofibroblastech a různých savčích buňkách. Geny, jejichž exprese byla působením MPPN snížena by měla být působením TGF- β zvýšena a naopak. Data shrnutá v této tabulce potvrzují tento předpoklad.

Tab. EP4 Geny ovlivněné trvalou expresí EGR4 v buňkách CEDM. Detailní výsledky včetně hodnot násobků změn exprese, hodnot p účinku působení a intenzity normalizované GC-RMA.

Tab. EP5 Seznam genů odlišně exprimovaných mezi liniemi buněk PR9692 a PR9692-E9. Detailní výsledky včetně hodnot násobků změn exprese, hodnot p a intenzity normalizované GC-RMA.

Tab. EP6 Seznam genů odlišně exprimovaných mezi liniemi buněk PR9692-E9 a PR9692-E9-ME-EGR1. Detailní výsledky včetně hodnot násobků změn exprese, hodnot p a intenzity normalizované GC-RMA.

Tab. EP7 Detailní informace o genech prezentovaných v obr. V16a, b (výsledky klastrovací analýzy).

Tab. EP8 Detailní popis experimentů *in vivo* s buňkami PR9692 a buňkami z nich odvozenými. Detailní výsledky zahrnující váhu primárních nádorů a k nim příslušnou kategorii plicních metastáz a časy zdvojení experimentálních buněčných linií.

Tab. EP9 Detailní popis experimentů *in vivo* s buňkami PR9692-E9 a buňkami z nich odvozenými. Detailní výsledky zahrnující váhu primárních nádorů a k nim příslušnou kategorii plicních metastáz a časy zdvojení experimentálních buněčných linií.

Video 1 Pohyb buněk PR9692 na povrchu pokrytém kolagenem typu I. Mikrofotografie byly snímány v intervalu jedné minuty po dobu kultivace 24 hodin a video zobrazuje 20 snímků za sekundu (každá sekunda videa představuje 20 minut).

Video 2 Pohyb buněk PR9692-E9 na povrchu pokrytém kolagenem typu I. Mikrofotografie byly snímány v intervalu jedné minuty po dobu kultivace 24 hodin a video zobrazuje 20 snímků za sekundu (každá sekunda videa představuje 20 minut).

Video 3 Pohyb buněk PR9692-E9-mock na povrchu pokrytém kolagenem typu I. Mikrofotografie byly snímány v intervalu jedné minuty po dobu kultivace 24 hodin a video zobrazuje 20 snímků za sekundu (každá sekunda videa představuje 20 minut).

Video 4 Pohyb buněk PR9692-E9-ME-EGR1 na povrchu pokrytém kolagenem typu I. Mikrofotografie byly snímány v intervalu jedné minuty po dobu kultivace 24 hodin a video zobrazuje 20 snímků za sekundu (každá sekunda videa představuje 20 minut).