



**MASARYKOVA UNIVERZITA**  
**Přírodovědecká fakulta**

**Lucia KNOPFOVÁ**

**Funkce proteinu c-Myb ve vybraných aspektech kancerogeneze**

Disertační práce

Školitel: prof. RNDr. Jan Šmarda, CSc.

Brno, 2013

## Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora: **Lucia Knopfová**

Název disertační práce: **Funkce proteinu c-Myb ve vybraných aspektech  
kancerogeneze**

Název disertační práce anglicky: **Function of the c-Myb protein in selected aspects of  
cancerogenesis**

Studijní program: Biologie

Studijní obor (směr), kombinace oborů: Molekulární a buněčná biologie

Školitel: prof. RNDr. Jan Šmarda, CSc.

Rok obhajoby: 2013

Klíčová slova v češtině: c-Myb, prsní karcinom, migrace, invazivita, metastáza,  
extravazace, matrixová metaloproteináza, katepsin D,  
extracelulární matrix

Klíčová slova v angličtině: c-Myb, breast cancer, migration, invasion, metastasis,  
extravasation, matrix metalloproteinase, cathepsin D,  
extracellular matrix



## PODĚKOVÁNÍ

Tato práce vznikala v Laboratoři buněčné diferenciaci Ústavu experimentální biologie Přírodovědecké fakulty MU, proto díky patří všem jejím členům současným i minulým, kteří vždy tvořili skvělý kolektiv, byla s nimi radost a čest spolupracovat. Děkuji prof. RNDr. Janu Šmardovi, CSc. za vynikající vedení, za zajištění výborného zázemí pro experimentální práci, za důvěru a za poskytnutí mnoha příležitostí k získání cenných zkušeností. Děkuji také Mgr. Petru Benešovi, PhD. za neobyčejně cenné rady, inspirativní nápady, nevyčerpatelnou ochotu a za laskavé komentáře a soudy, které významně přispěly k této práci.

Dále děkuji doc. RNDr. Stanislavu Kozubkovi, DrSc., vedoucímu Oddělení molekulární cytologie a cytometrie Biofyzikálního ústavu Akademie věd, za vlídnou pomoc s videomikroskopickou analýzou chemokinetické migrace, RNDr. Michalu Masaříkovi, PhD. z Ústavu patologické fyziologie Lékařské fakulty MU za zajištění experimentů *in vivo*, prof. MUDr. Markétě Hermanové, PhD. a jejím kolegům z I. patologicko-anatomického ústavu Fakultní nemocnice U Svaté Anny za histologickou analýzu, Mgr. Karlu Součkovi, PhD., Mgr. Zuzaně Pernicové a RNDr. Aleně Hyršlové Vaculové, PhD. z Oddělení cytokinetiky Biofyzikálního ústavu Akademie věd za cenné konzultace a pomoc s experimentální prací, Mgr. Květoslavě Liškové a všem dalším členům Ústavu patologie Fakultní nemocnice Brno za ochotnou pomoc s přípravou vzorků pro patologickou analýzu. Děkuji také Ing. Viktoru Horvathovi, PhD. za asistenci s xCELLigence RTCA, Mgr. Lukáši Kubalovi, PhD. za poskytnutí buněčné linie HUVEC a Ing. Ivě Pipalové a Ing. Janu Vernerovi, PhD. za umožnění pokusů v Chovném a uživatelském zařízení laboratorních zvířat MU.

Tato práce byla podporována granty č. 301/09/1115 a 204/08/H054 Grantové agentury České republiky, CZ.1.05/2.1.00/03.0101 RECAMO Evropského fondu pro regionální rozvoj a státní rozpočet České republiky, NT 13441-4/2012 Interní grantové agentury Ministerstva zdravotnictví, CZ.1.07/2.3.00/20.0183 a CZ.1.07/2.4.00/31.0155 ESF a MUNI/C/0099/2009 rektora MU.



## ABSTRAKT

Protein c-Myb je klíčový transkripční faktor pro fyziologickou regulaci kmenových a progenitorových buněk v kostní dřeni, střevních kryptách a v neurogenních oblastech mozku. Jeho deregulace a aberantní funkce je spojena s různými typy nádorových onemocnění, včetně prsních karcinomů. Funkce proteinu c-Myb v nádorech prsu je však rozporuplná - byl klasifikován jako onkoprotein nezbytný pro mamární tumorigenezi i jako nádorový supresor. Tato práce se zabývá proteinem c-Myb v kontextu prsních karcinomů se zaměřením na jeho význam pro invazivitu a metastázování těchto nádorů.

Pro studium funkce proteinu c-Myb v prsních karcinomech jsme jako modelový systém vytvořili varianty dvou buněčných linií odvozených z mamárních nádorů MDA-MB-231 a 4T1, které exprimují exogenní c-Myb (MYBup). Zkoumali jsme proliferaci, migrační a invazivní aktivitu těchto buněk *in vitro*, jejich tumorigenní a metastatický potenciál *in vivo* a vyhledávali jsme efekторы proteinu c-Myb v pozorovaných procesech. Zjistili jsme, že účinek ektopické exprese c-Myb na migraci a invazivitu buněk prsních nádorů *in vitro* je závislý na podmínkách, konkrétně na (ne)přítomnosti chemoatraktantu a složení extracelulární matrix. Protein c-Myb stimuluje chemotaktickou migraci a invazivitu buněk prsních nádorů v Matrigelu, ale neovlivňuje chemokinetickou motilitu a penetraci kolagenu I. Ortotopicky implantované buňky 4T1MYBup tvoří v myších BALB/c pomaleji rostoucí nádory, které spontánně metastázuje do kostí a jater, nikoli do plic, na rozdíl od nádorů kontrolních, které zakládají metastázy v kostech, játrech i plicích. Snížená frekvence plicních metastáz nádorů MYBup může být důsledkem omezené schopnosti cirkulujících nádorových buněk exprimujících exogenní MYB vstupovat přes cévní stěnu s kontinuální bazální membránou do plicního parenchymu. Zjistili jsme, že buňky MDA-MB-231MYBup mají ve srovnání s kontrolními buňkami sníženou schopnost transendoteliální migrace *in vitro*. Identifikovali jsme několik genů, jejichž exprese je deregulovaná v buňkách MYBup. Katepsin D, matrixová metaloproteináza 1 a 9 (MMP1/9) jsou spolu se signální dráhou JNK (c-Jun NH2-terminální kináza) pravděpodobně určujícími faktory zprostředkujícími účinek proteinu c-Myb na migraci a invazivitu buněk MDA-MB-231 *in vitro*. Myb-řízená represe *Mmp1a* a *Msn* v buňkách 4T1 by mohla být alespoň částečně příčinou selektivní inhibice plicních metastáz nádorů MYBup v myším modelu *in vivo*. Analýza expresních dat klinických vzorků prsních karcinomů uložených v databázích Oncomine a GEO naznačila relevanci pozorované inhibice *MMP1/MSN* proteinem c-Myb pro prognózu a metastázování karcinomů prsu onkologických pacientek.

Výsledky této práce přispívají k poznání funkce proteinu c-Myb v biologii prsních karcinomů, nabízejí nový pohled na jeho rozporuplné působení jako onkoproteinu/nádorového supresoru v těchto nádorech a představují c-Myb jako protein, jehož funkce podléhá regulaci kontextem mikroprostředí s důsledky pro matrix-dependentní invazivitu, extravazaci a organotropismus buněk prsních karcinomů.

## ABSTRACT

The c-Myb transcription factor is essential for the maintenance of stem-progenitor cells in bone marrow, colon epithelia, and neurogenic niches. c-Myb malfunction contributes to several types of malignancies including breast cancer. However, the function of c-Myb in the mammary tumorigenesis and progression of breast carcinomas is controversial, as both oncogenic and tumor suppressive effects of c-Myb have been reported. The aim of this study is to clarify the role of c-Myb in invasion and metastatic spread of breast tumor cells.

To gain insight into this process, we generated variants of mammary carcinoma cell lines MDA-MB-231 and 4T1 overexpressing *MYB* (MYBup cells). We investigated their proliferation rates, migratory/invasive activity *in vitro* and tumorigenic and metastatic capabilities *in vivo*. In addition, we intended to identify molecular targets of the c-Myb protein mediating its effects. We observed that *MYB* overexpression affected cell migration and invasion *in vitro* in a context-dependent manner, depending on the presence of chemoattractant or composition of matrix. c-Myb promoted chemotactic migration and invasion through Matrigel-coated membrane, but affected neither the motility in the chemokinetic setting nor collagen I gel penetration. Surprisingly, the growth of tumors resulting from injection of *Myb*-overexpressing 4T1 cells into the mammary fat pads of BALB/c mice was delayed and formation of spontaneous pulmonary metastases did not occur, though formation of the bone and liver metastases was not affected. The selective disadvantage of these cells in lung colonization might result from their inability to penetrate a vessel wall and underlying basement membrane in lung parenchyma. We demonstrated that capacity of transendothelial migration of MDA-MB-231MYBup cells was impaired. We identified several genes with deregulated expression in MYBup cells, including *CTSD*, *MMP1* and *MMP9*. The proteins coded by these genes (cathepsin D, matrix metalloproteinase 1 and 9) together with components of JNK (c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase) signaling pathway may represent the key determinants of the Myb-induced effects on cell migration and invasion *in vitro*. On the other hand, the Myb-driven suppression of *Mmp1a* and *Msn* expression in 4T1 cells may explain the failure of the *Myb*-overexpressing tumors in lung colonization. The expression profiles of human breast carcinoma specimens deposited in Oncomine and GEO databases indicate that the Myb-mediated repression of *MMP1/MSN* might be of clinical relevance for breast carcinoma patients.

Results of this study provided new insight into the c-Myb function in breast cancerogenesis and brought new clues to understand its controversial status as an oncogene/tumor suppressor in breast cancer. In addition, the conclusions offer a new concept of the microenvironment-dependent function of c-Myb represented by matrix-specific invasion, extravasation and site-selective metastases of breast carcinomas.

# OBSAH

1	ÚVOD	10
1.1	Invazivita a metastázování nádorů	10
1.1.1	Metastatická kaskáda	10
1.1.1.1	Epiteliálně-mezenchymální plasticita nádorových buněk	11
1.1.1.2	Migrace nádorových buněk	14
1.1.1.3	Invazivita nádorů	15
1.1.1.4	Premetastatické "niche"	16
1.1.1.5	Mikrovezikuly/exozomy	18
1.1.1.6	Intravazace/extravazace	19
1.1.1.7	Orgánově-specifické metastázování	20
1.2	Traskripční faktor c-Myb	21
1.2.1	c-Myb a migrace/invazivita nádorových buněk	22
1.3	Karcinomy prsu	23
1.3.1	c-Myb a prsní karcinomy	24
2	CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE	26
3	MATERIÁL A METODY	27
3.1	Materiál	27
3.1.1	Buňky	27
3.1.1.1	Nádorové linie	27
3.1.1.2	Linie lidských endoteliálních buněk	27
3.1.1.3	Bakterie	27
3.1.2	Myši	27
3.1.3	Další materiál	27
3.1.3.1	Plazmidy	27
3.1.3.2	Protilátky	28
3.1.3.3	siRNA	28
3.1.3.4	Fluorescenční sondy	28
3.1.3.5	Proteiny extracelulární matrix	29
3.1.3.6	Další chemikálie	29
3.2	Metody	29
3.2.1	Příprava plazmidu pGL2-MMP9	29
3.2.2	Stabilní transfekce	30
3.2.3	Transaktivační testy	30
3.2.3.1	$\beta$ -galaktozidázová assay	30
3.2.3.2	Luciferázová assay	30
3.2.4	Detekce mRNA	31
3.2.4.1	Izolace celkové RNA (qRT-PCR)	31
3.2.4.2	Izolace celkové RNA (PCR array)	31
3.2.4.3	Reverzní transkripce	31
3.2.4.4	Kvantitativní PCR v reálném čase (qRT-PCR)	31
3.2.4.5	PCR array	32
3.2.5	Detekce proteinů	32
3.2.5.1	Příprava buněčných lysátů	32
3.2.5.2	Příprava kondiciovaných médií	32
3.2.5.3	Elektroforetická separace proteinů polyakrylamidovou gelovou elektroforézou (SDS-PAGE)	32
3.2.5.4	Imunobloting	32
3.2.5.5	Stanovení enzymatické aktivity katepsinu D	33
3.2.6	Analýza buněčné proliferace	33
3.2.7	Analýza buněčné migrace/invazivity <i>in vitro</i>	33

3.2.7.1	„Transwell“ migrační/invazivní test.....	33
3.2.7.2	Selekce migračně aktivních buněk linie MDA-MB-231 <i>in vitro</i> .....	34
3.2.7.3	Analýza buněčné migrace/invazivity v reálném čase pomocí xCELLigence „Real-Time Cell Analyzer“ (Roche).....	34
3.2.7.4	Analýza chemokinetické motility buněk („wound healing assay“) v reálném čase.....	35
3.2.7.5	Transendoteliální migrace .....	35
3.2.8	Analýza buněčné adheze pomocí xCELLigence „Real-Time Cell Analyzer“ (Roche).....	35
3.2.9	Analýza metastatické aktivity nádorových buněk 4T1 <i>in vivo</i> .....	36
3.2.10	Přechodná transfekce siRNA .....	36
3.2.11	Analýza expresních profilů vybraných genů v prsních karcinomech z databází Oncomine a GEO (Gene Expression Omnibus).....	36
3.2.12	Statistická analýza.....	37
4	VÝSLEDKY .....	38
4.1	Ektopická exprese genu <i>MYB</i> v buňkách MDA-MB-231 a 4T1 .....	38
4.1.1	Vytvoření stabilních linií MDA-MB-231MYBup a 4T1MYBup.....	38
4.1.2	Protein c-Myb neovlivňuje proliferaci buněk MDA-MB-231 a 4T1 <i>in vitro</i> .....	38
4.1.3	Protein c-Myb reguluje migraci/invazivitu buněk MDA-MB-231 a 4T1 <i>in vitro</i> .....	40
4.1.3.1	Exogenní protein c-Myb zvyšuje chemotaktickou migrační aktivitu buněk MDA-MB-231 a 4T1 <i>in vitro</i> .....	40
4.1.3.2	c-Myb aktivuje buňky MDA-MB-231 a 4T1 k penetraci Matrigelu <i>in vitro</i> .....	43
4.1.3.3	c-Myb nepodporuje penetraci matrix tvořené kolagenem I buňkami MDA-MB-231 a 4T1 <i>in vitro</i> .....	45
4.1.3.4	c-Myb nezvyšuje chemokinetickou motilitu aktivitu buněk MDA-MB-231 <i>in vitro</i> .....	47
4.2	Expresní profil buněk MDA-MB-231MYBup: geny regulující invazivitu/metastázování nádorů .....	48
4.2.1	Expres panelu genů zapojených do metastázování nádorů v buňkách MDA-MB-231MYBup.....	48
4.2.2	c-Myb dereguluje v buňkách MDA-MB-231 proteázy degradující složky extracelulární matrix .....	49
4.2.2.1	Deregulace <i>MMP1</i> , <i>MMP9</i> a <i>CTSD</i> mRNA v buňkách MDA-MB-231MYBup .....	49
4.2.2.2	c-Myb zvyšuje intra- a extracelulární množství proteinů MMP9 a katepsinu D a snižuje hladinu proteinu MMP1 .....	50
4.2.2.3	c-Myb aktivuje reportérový gen z promotoru <i>CTSD</i> , nikoli <i>MMP9</i> a <i>MMP1</i> .....	51
4.2.2.4	c-Myb reguluje expresi katepsinu D nezávisle na transkripčním faktoru Slug...51	51
4.3	Efektory migrace a invazivity indukované proteinem c-Myb .....	54
4.3.1	Selekce subpopulace linie MDA-MB-231 s vysokou migrační aktivitou <i>in vitro</i> .....	54
4.3.2	Inhibice <i>MYB</i> , <i>CTSD</i> a JNK zastavuje migraci buněk MDA-MB-231MYBup.....	54
4.3.3	Schopnost buněk MDA-MB-231MYBup pronikat Matrigelem je senzitivní k inhibici <i>MYB</i> , <i>CTSD</i> a MMP, genetické vypnutí <i>CTSD</i> a inhibice JNK blokuje jejich invazivitu v kolagenu I.....	57
4.4	Protein c-Myb reguluje metastázování prsních nádorů .....	58
4.4.1	c-Myb zpomaluje růst nádorů mléčné žlázy a brání vzniku plicních metastáz v syngenním 4T1-BALB/c modelu .....	58
4.4.2	c-Myb způsobuje deregulaci <i>Mmp1a</i> (intersticiální kolagenáza) a <i>Msn</i> (moesin) v buňkách a nádorech 4T1MYBup .....	62
4.4.3	Ektopická exprese c-Myb poškozují transendoteliální migraci buněk MDA-MB-231.....	62

4.4.4	Expresní profily genu <i>MYB</i> a vybraných Myb-cílových genů v klinických vzorcích prsních karcinomů z dat cDNA microarrays uložených v databázích Oncomine a GEO.....	64
4.4.4.1	<i>MYB</i> a <i>MMP1/MSN</i> mRNA v prsních karcinomech lumenálních a bazálních subtypů vykazuje opačný expresní profil.....	64
4.4.4.2	Negativní korelace mezi <i>MYB</i> a <i>MMP1/MSN</i> mRNA v prsních karcinomech ...	66
4.4.4.3	Nádory prsu s různým organotropismem metastáz se liší v relativní expresi <i>MYB</i> , <i>MMP1</i> , <i>MSN</i> a <i>MMP9</i> mRNA .....	67
4.4.4.4	Metastázy prsních nádorů v plicích a mimo plíce se liší v relativní expresi <i>MYB</i> a <i>MMP1</i> mRNA .....	70
5	DISKUSE.....	72
5.1	c-Myb aktivuje chemotaktickou migraci buněk prsního karcinomu, nikoli jejich chemokinetickou motilitu .....	72
5.1.1	Cílové efekty chemotaktické migrace aktivované proteinem c-Myb .....	72
5.1.1.1	Katepsin D.....	73
5.1.1.2	MMP1/9 .....	74
5.1.1.3	Slug a kadherin 11 .....	75
5.1.1.4	Signální dráha JNK/Jun.....	76
5.1.1.5	Další potenciální efekty .....	77
5.2	c-Myb reguluje invazivitu buněk prsního karcinomu <i>in vitro</i> v závislosti na složení ECM .....	78
5.2.1	Cílové efekty Myb-regulované penetrace ECM bariér <i>in vitro</i> .....	78
5.3	c-Myb neovlivňuje proliferaci buněk prsních karcinomů <i>in vitro</i> , ale zpomaluje růst mamárních nádorů <i>in vivo</i> .....	79
5.4	c-Myb ovlivňuje metastázování prsních nádorů orgánově-specificky .....	80
5.4.1	Cílové efekty Myb-řízené inhibice plicních metastáz .....	82
5.4.1.1	Moesin.....	82
5.4.1.2	Intersticiální kolagenáza Mmp1a .....	83
6	ZÁVĚR .....	85
7	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....	86
8	SEZNAM ZKRATEK.....	109
9	PŘÍLOHY .....	113

# 1 ÚVOD

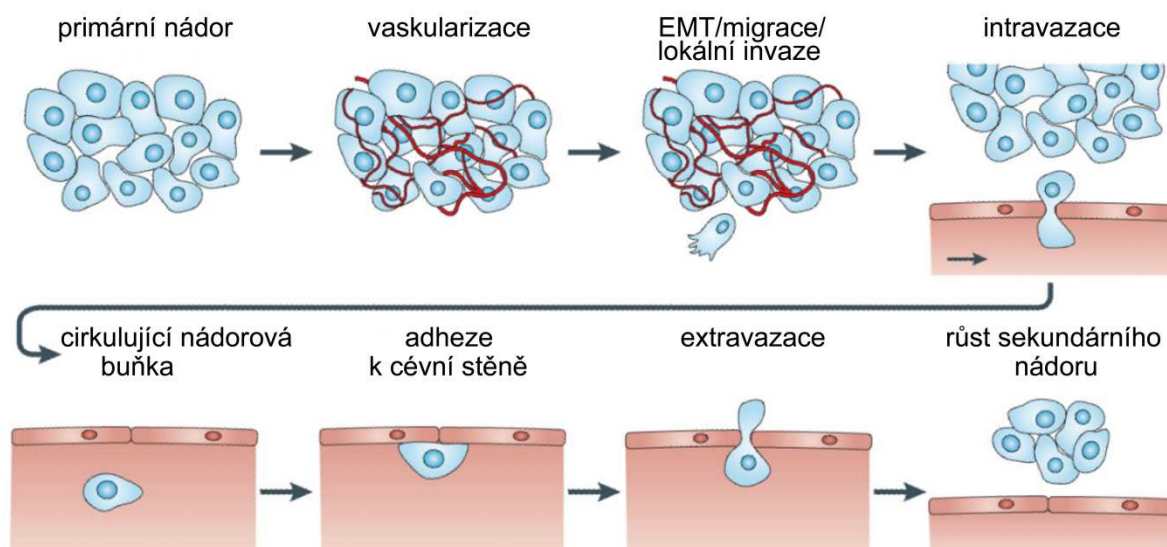
## 1.1 Invazivita a metastázování nádorů

### 1.1.1 Metastatická kaskáda

Termín „metastáza“ pochází z řeckých slov μετά (meta), které znamená „další“, a στάσις (stasis), což znamená „umístění“, spolu tedy „přemístění“ nebo „změna místa“. V nádorové biologii se tímto rozumí založení sekundárního ložiska nádoru vzdáleného od původního místa nádorové transformace. Metastázování je tedy rozsev nádorových buněk do jiných míst v těle, než je to, kde vznikl primární nádor. Tento rozsev může zprostředkovat cirkulace tělních tekutin, tehdy hovoříme o tzv. metastázách hematogenních (šířených krevním systémem) a lymfogenních (šířených lymfatickými cévami), nebo se nádor šíří přímo tělními dutinami. Různé nádory přitom využívají těchto cest s odlišnou preferencí., např. karcinomy využívají jak hematogenní, tak lymfogenní šíření, sarkomy se šíří téměř výhradně krevní cestou. Mezi orgány nejčastěji zasažené sekundárním nádorovým bujením patří plíce, játra, kosti, mozek a lymfatické uzliny, přitom pravděpodobnost výskytu metastáz v těchto orgánech je u různých nádorů různá. Schopností zakládat metastázy disponují nádory maligní, přičemž se jednotlivé maligní nádory od sebe výrazně odlišují mírou, jíž jsou šíření schopny.

Metastázování je složitý mnohastupňový proces s velmi nízkou efektivitou, hodnotíme-li pravděpodobnost, se kterou buňka uvolněná z nádoru dá vznik život ohrožující makrometastáze. Tato účinnost byla vyčíslena experimentálně: pouhých 0,02% buněk melanomu injikovaných do cévního systému myšního modelu tvoří makrometastázy, 2% buněk založí mikrometastatická ložiska a 36% z nich přetrvává v cílové tkáni jako samostatné dormantní buňky (Luzzi et al., 1998). Přesto zůstávají metastázy nejčastější příčinou úmrtí onkologických pacientů, a tím i stálým předmětem intenzivního vědeckého zkoumání. Odpovědi na dnes často kladené otázky po původu/identitě buněk zakládajících sekundární nádory, by mohly vést k nalezení nástrojů pro cílenou eliminaci metastatických buněk, a tedy významnému zlepšení perspektivy pacientů s nádorovým onemocněním.

Metastatická kaskáda je řada na sebe navazujících kroků, které předcházejí a podmiňují vznik sekundárního nádoru. Schematicky načrtnuto na modelu karcinomu s hematogenním šířením sestává tato kaskáda z epiteliálně mezenchymální tranzice (EMT), tj. procesu, během kterého získává epiteliální buňka mezenchymální charakteristiky, což doprovází uvolnění jednotlivé nádorové buňky z vazeb na jiné buňky nádorové tkáně, migrace, resp. lokální invaze a prostup mimobuněčnou hmotou a cévní stěnou do krevního systému (intravazace), zachycení a průnik stěnou kapiláry v cílové tkáni (extravazace), přežití a zahájení proliferace, následované indukci angiogeneze a progresivním růstem cévně zásobených metastáz (Obr. 1). Další kapitoly budou věnovány bližšímu popisu vybraných kroků této kaskády.



Obr. 1. Metastatická kaskáda. Epiteliální nádorová buňka se uvolňuje z primárního nádoru, získává schopnost migrovat a invadovat okolní tkáň (procesy spojené s epiteliálně-mezenchymálním přechodem - EMT) a vstupuje do cévy (intravazace). Nádorová buňka v krevním řečišti adhezuje k endotelu, prochází přes stěnu cévy do cílové tkáň (extravazace) a zakládá sekundární nádor. Převzato z Wirtz et al., 2011, upraveno.

#### 1.1.1.1 Epiteliálně-mezenchymální plasticita nádorových buněk

EMT je jeden z klíčových vývojových procesů, který je rekapitulován v kancerogenezi. EMT, tedy změna epiteliálního charakteru buňky karcinomu na fenotyp mezenchymální, je často řazen na první místa v souboru procesů patřících do metastatické kaskády, nicméně význam epiteliálně mezenchymální plasticity nádorových buněk se projevuje během různých fází metastázování. Přestože přeměna epiteliálních buněk karcinomu na mezenchymální byla doložena *in vitro*, dlouho chybělo dostatečné potvrzení tohoto fenoménu *in vivo*. Dnes jsou známy studie dokazující EMT u různých nádorů v myších modelech *in vivo* (Trimboli et al., 2008; Rhim et al., 2012), nicméně data o výskytu EMT v klinických vzorcích jsou stále nedostatečná (Prall, 2007; Thiery et al., 2009). To může být dáno tím, že pouze minoritní populace buněk v nádoru podstupuje EMT a pravděpodobně jen částečně se posunuje směrem k mezenchymálnímu fenotypu, nebo je přítomnost těchto buněk obtížně detekovatelná v sousedství mezenchymálních buněk stromálních, např. fibroblastů asociovaných s nádory (Foroni et al., 2012).

Mezi určující znaky EMT patří ztráta mezibuněčné adheze, což buňce umožňuje vymanit se z vazby na sousední buňky epiteliální tkáň, dále reorganizace cytoskeletu, která vede ke ztrátě apikálně-bazální polarizace epiteliální buňky a nabytí lokomoční (předo-zadní) polarizace, zvýšená produkce extracelulárních proteáz (např. MMP), které umožňují průnik bazální membránou, případně intersticiální matrix, a také deregulovaná exprese proteinů extracelulární matrix a adhezivních molekul, což umožňuje změnu orientace a směřování buňky vzhledem k extracelulární matrix. Kromě motility a invazivity je důsledkem EMT rezistence buňky k apoptóze a senescenci a schopnost zahájit sekundární růst nádoru, což patří mezi charakteristiky nádorových kmenových (nebo tumor-iniciujících) buněk (Ansieau et al., 2008; Morel et al., 2008; Kurrey et al., 2009; Thiery et al., 2009).

Jako markery EMT se používají adhezivní molekuly, cytoskeletální proteiny a proteiny extracelulární matrix (ECM). V důsledku EMT dochází k potlačení epiteliálních markerů, jako je E-kadherin, cytokeratiny 8, 18 a 19, desmoplakin, okcludin a klaudin, naopak

se navyšuje množství proteinů typických pro mezenchymální buňky, např. N-kadherin, OB-kadherin, vimentin, fibronectin (Foroni et al., 2012). Mezi hlavní signály spouštějící EMT patří růstové faktory TGF $\beta$ , HGF, FGF, EGF, PDGF, Wnt, Shh (viz seznam zkratk), hypoxie, složky extracelulární matrix a další stromální faktory (Thiery et al., 2009). Další signalizaci během EMT zajišťují zejména signální dráhy TGF $\beta$ , Wnt, Notch a Hedgehog, přičemž všechny signální dráhy se vzájemně ovlivňují a vytváří spolu s dalšími molekulárními regulátory složitou síť obsahující řadu pozitivních a negativních regulačních smyček (Foroni et al., 2012). Transkripční faktory, ke kterým směřují uvedené signální dráhy a které jsou zapojené do indukce či represe markerů a efektorů EMT, zahrnují Snail, Slug, ZEB1/2, Smad, Goosecoid, FOX2, KLF8, E47 a Twist (Wang et al., 2007; Peinado et al., 2007). Zdá se, že transkripční faktor Snail se uplatňuje především během iniciace EMT, zatímco proteiny Slug, ZEB1/2, E47 a Twist se následně podílejí na udržení mezenchymálního fenotypu (Thiery et al., 2009).

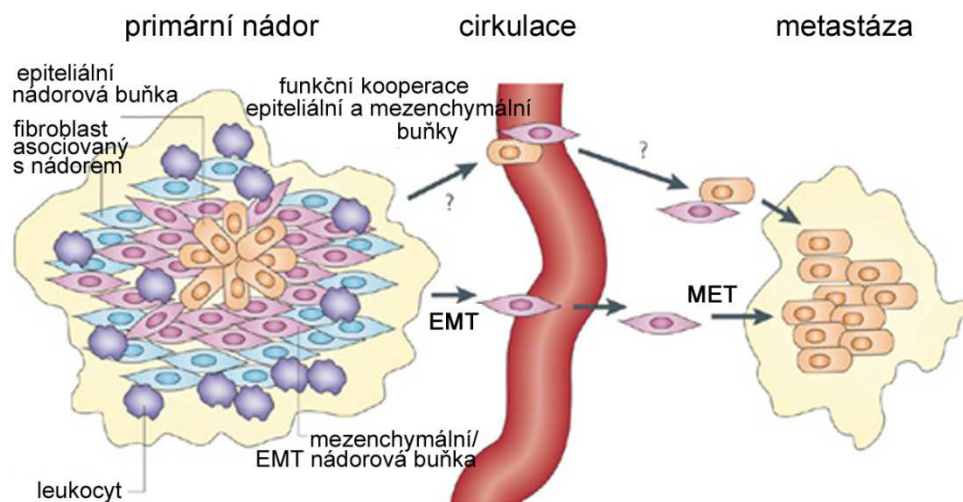
Mezi další významné molekulární regulátory EMT patří miRNA, malé nekódující RNA, interferující s translací specifických mRNA. Rodina miR-200 se účastní negativní regulace EMT postranskripční represí ZEB1/2 (Korpál et al., 2008), zatímco miR-27 zasahuje do exprese APC, aktivuje signalizaci Wnt/ $\beta$ -katenin a EMT tedy reguluje pozitivně (Zhang et al., 2011). V průběhu roku 2012 se objevila celá řada publikací identifikujících další miRNA a jejich cílové geny podílejících se na regulaci EMT: miR-124 inhibuje *SNAI2* (Liang et al., 2012), miR-153 zasahuje do exprese *SNAI1* a *ZEB2* (Xu et al., 2012), miR-197 reguluje expresi p120 kateninu (Hamada et al., 2012), expresi *ZEB1* inhibuje miR-150 (Yokobori et al., 2012), miR-23a působí jako represor E-kadherinu (Cao et al., 2012) a mnoho dalších (viz souhrnný článek D'Amato et al., 2012).

EMT je reverzibilní proces, který může být následován zpětnou přeměnou mezenchymálního fenotypu na epiteliální (MET nebo MER<sub>T</sub> „Mesenchymal-Epithelial Reverting Transition“), přitom mezi jednotlivými extrémními stavy existuje celé spektrum stavů přechodných, někdy nazývaných hybridní nebo metastabilní. Subpopulace nádorových buněk v metastabilním stavu se vyznačuje přítomností epiteliálních i mezenchymálních znaků, ať už to je exprese cytoskeletálních proteinů (vimentin, cytokeratin) nebo lokalizace proteinů regulujících adhezi/migraci (Rac,  $\beta$ -katenin). Tento hybridní fenotyp poukazující na epiteliálně-mezenchymální plasticitu je někdy označován jako metastabilní fenotyp nebo aktivovaný epitel (Klymkowsky, Savagner, 2009) a zdá se v populacích nádorových buněk podstupujících EMT převažovat nad čistě mezenchymálními buňkami. Uvažuje se o tom, že by metastabilní buňky mohly být díky možnosti pohotového přepínání mezi epiteliálním a mezenchymálním stavem zvláště dobře přizpůsobené k metastázování, protože tato plasticita umožňuje buňkám jak disociaci z primárního nádoru (nutnost EMT), tak založení sekundárních nádorů ve vzdálené tkáni, kde probíhá obrácený proces, tedy MET (Wells et al., 2008; Dykxhoorn et al., 2009; Armstrong et al., 2011). Někdy se hovoří o přechodném výskytu mezenchymálního fenotypu v nádorech, protože EMT markery nejsou obvykle detekovatelné v metastatických nádorech a tyto nádory se v histopatologických charakteristikách podobají primárním (Yao et al., 2011). Například metastázy kolorektálních karcinomů v játrech se morfogenezi podobají střevnímu epitelu (Brabletz et al., 2005), metastaticky aktivní linie nádorů močového měchýře mají více epiteliálních znaků než jejich méně metastatické protějšky (Chaffer et al., 2006) a jaterní metastázy prostatických nádorů reexprimují E-kadherin (Yates et al., 2007), podobně primární nádory pankreatu s vypnutou expresí E-kadherinu zakládají v mízních uzlinách E-kadherin-pozitivní metastázy (Kurahara et al., 2012). Množství experimentálních dat dokládajících důležitost epiteliálního fenotypu pro formování metastatických nádorů stále narůstá. Gao et al. prokázali, že injekce prsních buněk s mezenchymálním fenotypem do krevního systému myši má za následek tvorbu metastatických ložisek v plicích vykazujících expresi E-kadherinu (Gao et al., 2012). Pokusy



s nádorovými buňkami křečka geneticky modifikovanými tak, že získaly fenotyp mezenchymálních buněk (EMT fenotyp), ukázaly, že zatímco EMT i kontrolní buňky zakládají po subkutánní injekci primární nádor, pouze EMT buňky jsou schopny intravazace do krevního systému. Nicméně pokud se buňky injikují přímo do cévy modelového organismu, pouze kontrolní buňky zakládají nádorová ložiska v plicích, nikoli buňky s EMT fenotypem (Tsuji et al., 2008). Z toho plyne, že ne všechny nádorové buňky s mezenchymálním fenotypem jsou schopny aktivovat v cílovém místě program MET. Pokud se však subkutánně injikovala směs buněk EMT a buněk kontrolních, nádorové buňky vstupovaly do cirkulace a tvořily také metastatická ložiska (Tsuji et al., 2008). Je proto možné, že dochází k funkční kooperaci mezi epiteliálními a mezenchymálními buňkami během procesu metastázování (Obr. 2).

EMT i MET jsou tedy kritické pro různé fáze nádorové progresy a epiteliálně mezenchymální plasticita je předpokladem úspěšného metastatického rozsevu karcinomů. Regulace EMT/MET mikroprostředím, v němž se nádorová buňka aktuálně nachází, zajišťuje adaptaci buňky z hlediska její epiteliálně-mezenchymální identity. Kromě hypoxie kontrolují EMT/MET programy také interakce nádorových a stromálních buněk. Myeloidní buňky z kostní dřeně infiltrující primární nádor byly označeny za zdroj TGF $\beta$ 1 (indukujícího EMT) v primárním nádoru (Toh et al., 2011), podobně jako makrofágy asociované s tumory (TAM, „Tumor-Associated Macrophage“; Bonde et al., 2012). Aktivace MET v metastatických buňkách byla považována za důsledek nedostatku faktorů indukujících EMT, nicméně objevují se studie dokumentující, že nikoli absence faktorů přítomných v mikroprostředí primárního nádoru, ale interakce s mikroprostředím sekundárního místa indukuje program vedoucí k MET (Chao et al., 2010; Aokage et al., 2011; Yao et al., 2011). Nedávno byla objevena dosud nepopsaná funkce CD11b+ Gr1+ myeloidních buněk v premetastatických „niche“ spočívající ve spuštění MET v infiltrovaných nádorových buňkách produkcí proteoglykanu versican (Gao et al., 2012; premetastatické „niche“ viz dále).



Obr. 2. Epiteliálně-mezenchymální (EMT) a reverzní tranzice (MET) v kancerogenezi. Některé epiteliální buňky v primárním karcinomu procházejí EMT a získávají vlastnosti mezenchymálních buněk usnadňující diseminaci. Makrometastázy v cílovém orgánu mají často fenotyp epiteliálních buněk, což se vysvětluje indukcí obráceného procesu (MET) po vstupu nádorových buněk do sekundárního místa, nebo funkční kooperací mezi mezenchymálními a epiteliálními buňkami nádoru. Převzato z Polyak, Weinberg, 2009, upraveno.

### 1.1.1.2 Migrace nádorových buněk

Jak bylo zmíněno, EMT produkuje migračně aktivní buňky schopné procházet mimobuněčnou hmotou do tkání sousedících s nádorem. Nicméně existují i jiné, na EMT nezávislé způsoby, kterými nádorové buňky nabývají migrační potenciál. Například podoplanin, transmembránový glykoprotein podobný mucinu, aktivuje nádorové buňky k migraci, aniž by byly rozrušeny mezibuněčné kontakty zprostředkované E-kadherinem (Wicki et al., 2006). Podoplanin mění uspořádání cytoskeletu buňky interakcí s adaptorovými proteiny ERM (ezrin, radixin, moesin), které spojují transmembránové proteiny s vlákny aktinu, a ovlivňuje aktivitu kinázy RhoA (Wicki, Christofori, 2007). Rodina Rho GTPáz má v buněčné motilitě klíčovou úlohu, zejména RhoA, Rac1 a Cdc42 jsou v tomto ohledu nejvíce studovány. V aktivní formě interagují se svými cílovými efekty, kterými jsou například kináza lehkého řetězce myosinu a p21-aktivované kinázy 1-3 (v případě Rac1), p21-aktivované kinázy 1-6, WASP, N-WASP (substráty Cdc42) a kinázy ROCK I a II, Citron, Dia1 (cíle RhoA) a mění organizaci aktinových vláken. Indukují tvorbu membránových struktur, jako jsou lamelopodia, filopodia, mikrovily, invadopodia a také regulují endo - a exocytózu (Ridley, 2006). Filopodia jsou stejně jako mikrovily tvořena uspořádaným souborem vláken F-aktinu a tvoří tyčinkovité struktury vybíhající laterálně (filopodia) nebo dorsálně (mikrovily) z buňky. Lamelopodia jsou širší obloukovité struktury tvořené F-aktinem, které se rozprostírají po dvourozměrném substrátu (Olson, Sahai, 2009). Na 3D substrátech tvořené proteiny ECM tvoří nádorové buňky struktury odvozené z aktinového cytoskeletu tzv. invadopodia. Tyto invazivní výběžky se podílejí na proteolytické remodelaci ECM, viz dále (Olson, Sahai, 2009). Invadopodia se strukturně i funkčně podobají podozómům, které tvoří např. makrofágy a osteoklasty (Saltel et al., 2008).

Takový způsob migrace, kdy se buňky pohybují v blocích stmelených mezibuněčnými adhezivními molekulami, se nazývá kolektivní migrace. Buňky určitých typů nádorů jsou schopny kolektivní migrace ve shlucích nebo řetězově, ale obecně se nádorové buňky mohou se pohybovat jednotlivě (Wicki, Christofori, 2007). Přesněji bychom měli v případě pohybu v ECM hovořit o buněčné invazi (viz níže). Nádorové buňky se uvolňují z mezibuněčných vazeb a pohybují se dynamicky a neuspořádaně. Byly popsány dva způsoby migrace, které jsou využívány disociovanými nádorovými buňkami a které jsou definovány rozdíly ve využití extracelulárních proteáz, v adhezích k mezibuněčné hmotě, v organizaci cytoskeletu a v polaritě buňky (Yilmaz, Christofori, 2010). Jedním je mezenchymální migrace, kdy se buňka protahuje na předním konci tvorbou výběžků bohatých na F-aktin a silných fokálních adhezí a uvolňuje vazbu k podkladu na opačném konci buňky. Mezenchymální migrace je závislá na aktivitě GTPázy Rac1 a pohyb v ECM je zprostředkován aktivitou proteáz, jako jsou MMP (Sanz-Moreno et al., 2008). Druhým typem pohybu jednotlivých buněk je améboidní migrace, kdy buňky využívají kontrakci kortikálního aktinu a myosinu regulovanou GTPázami RhoA/ROCK, vytvářejí transientní fokální komplexy a pro průnik mimobuněčnou hmotou nepotřebují proteolytickou aktivitu, neboť procházejí póry mezi vlákny matrix (Sahai, Marshall, 2003). Na rozdíl od protáhlých mezenchymálních buněk, améboidní buňky jsou více kulaté a vyznačují se „pučením“ membrány. Tyto způsoby migrace se mohou střídat v závislosti na podmínkách a genové expresi buňky. Kromě výše uvedených buněčných determinantů způsobu migrace (Rac vs Rho/ROCK aktivita, proteolýza, síla adheze) určuje migraci také architektura ECM, konkrétně hustota, orientace a pevnost sítě ECM molekul (Friedl, Wolf, 2010). Populace nádorových buněk *in vitro* je heterogenní, obsahuje buňky améboidního i mezenchymálního typu migrace. Nicméně intravitální zobrazovací metody ukázaly, že v mamárních nádorech *in vivo* je většina motilních buněk améboidního typu (Condeelis, Segall, 2003).

Z jiného hlediska rozlišujeme pohyb chemotaktický a chemokinetický. Chemokineze je motilita v přítomnosti rovnoměrně distribuovaných rozpustných faktorů, chemotaxe je

motilita, jejíž směr je dán koncentračním gradientem rozpustných faktorů. Během progresu nádoru se uplatňuje jak chemokineze, náhodný pohyb, tak chemotaxe, to je směřovaná migrace buněk (Tchou-Wong et al., 2006). Zvýšená bazální motilita umožňuje nádorovým buňkám účinněji unikat z místa primárního tumoru, chemotaktický pohyb směrem k chemoatraktantům uvolňovaných z krevního systému navádí nádorovou buňku mimo jiné k místu intravazace (Yamaguchi et al., 2005).

### 1.1.1.3 Invazivita nádorů

Lokální invaze, tedy průnik nádoru do tkání s ním sousedících, předpokládá uvolnění buňky z mezibuněčných vazeb, motilitu a schopnost degradovat komponenty extracelulární matrix. Invazivní nádory jsou k penetraci epiteliální bazální membrány (karcinomy), vaskulární bazální membrány a intersticiální matrix vybaveny spektrem enzymů s proteolytickou aktivitou. Přestože proteázy obecně plní komplexní funkce a v určitých kontextech mohou působit jako nádorové supresory, jejich účast na remodelaci ECM z nich činí významnou funkční skupinu proteinů přispívajících na více úrovních k invazivitě a metastázování nádorů. Jednou z nejvýznamnějších a nejpočetnějších rodin proteáz funkčně asociovaných s metastázováním jsou matrixové metaloproteinázy (MMP). Do této rodiny endopeptidáz, jejichž katalytická aktivita je závislá na iontech Zn, patří více než 20 členů. Podle substrátové specifity a lokalizace se dělí na kolagenázy, želatinázy, stromelyziny, membránové MMP a nezařazené MMP. Degradují různé složky ECM i další bioaktivní molekuly. Jsou syntetizovány jako neaktivní proenzymy, které se aktivují proteolytickou degradací propeptidu. Další významnou skupinou proteáz spojovaných s invazivitou nádorů jsou katepsiny, lysozomální enzymy, které mohou být sekretovány mimo buňku. Více než deset genů v lidském genomu kóduje katepsiny. Mezi jejich substráty patří různé buněčné i extracelulární proteiny, jako je fibronectin, tenascin C nebo laminin (Gocheva, Joyce, 2007; Benes et al., 2008). Štěpením jiných proteáz spouštějí proteolytické kaskády, čímž také mohou přispívat k invazivitě nádorů (Gocheva, Joyce, 2007). Také serinové proteázy (např. urokináza; uPA), spolu se svými regulačními proteiny (receptor urokinázy, inhibitor aktivátoru plazminogenu PAI1) se účastní invaze, angiogeneze a metastázování různých typů solidních nádorů (Dass et al., 2008).

Dnes se více než jednotlivé proteázy a jejich vliv na invazivitu nádorů studují kaskády komplexních proteolytických interakcí umožňujících regulaci a/nebo amplifikaci proteolýzy v nádorech, hovoří se o „degradomu“, to je o souboru všech proteáz a jejich substrátů produkovaných buňkou nebo tkání za definovaných podmínek (Overall et al., 2004). Aby se zajistila důkladná kontrola nad proteolytickou aktivitou buňky, jsou proteázy obvykle regulovány na několika úrovních: na úrovni transkripce, proteolytické aktivace prekurzorů a interakce s endogenními inhibitory, jako jsou cystatiny (pro cysteinové proteázy), serpiny (pro serinové proteázy) a tkáňové inhibitory metaloproteináz (Mason, Joyce, 2011).

Podobně jako v případě buněčné migrace i invazi můžeme dělit na kolektivní nebo individuální. Jak bylo uvedeno výše, pohyb v ECM, tedy invaze, je v případě „mezenchymální“ strategie závislý na proteolýze, v případě améboidních buněk je na proteolýze nezávislý. Kolektivní invaze má také dva typy (Yilmaz et al., 2007). Jedním je koordinovaná invaze skupiny buněk, které si udržují mezibuněčné kontakty s primárním nádorem, přičemž buňky v první invazivní linii produkují proteázy a zajišťují remodelaci ECM (podobně invadují buňky během embryonální morfogeneze). Druhým typem je kolektivní invaze shluku buněk odděleného od primárního nádoru (Yilmaz et al., 2007). Zajímavé zjištění publikovali Giampieri et al., kteří zjistili, že nádory omezené na kolektivní formu invaze zakládají metastázy v lymfatických uzlinách, nikoli však hematogenní metastázy v distálních orgánech (Giampieri et al., 2009).

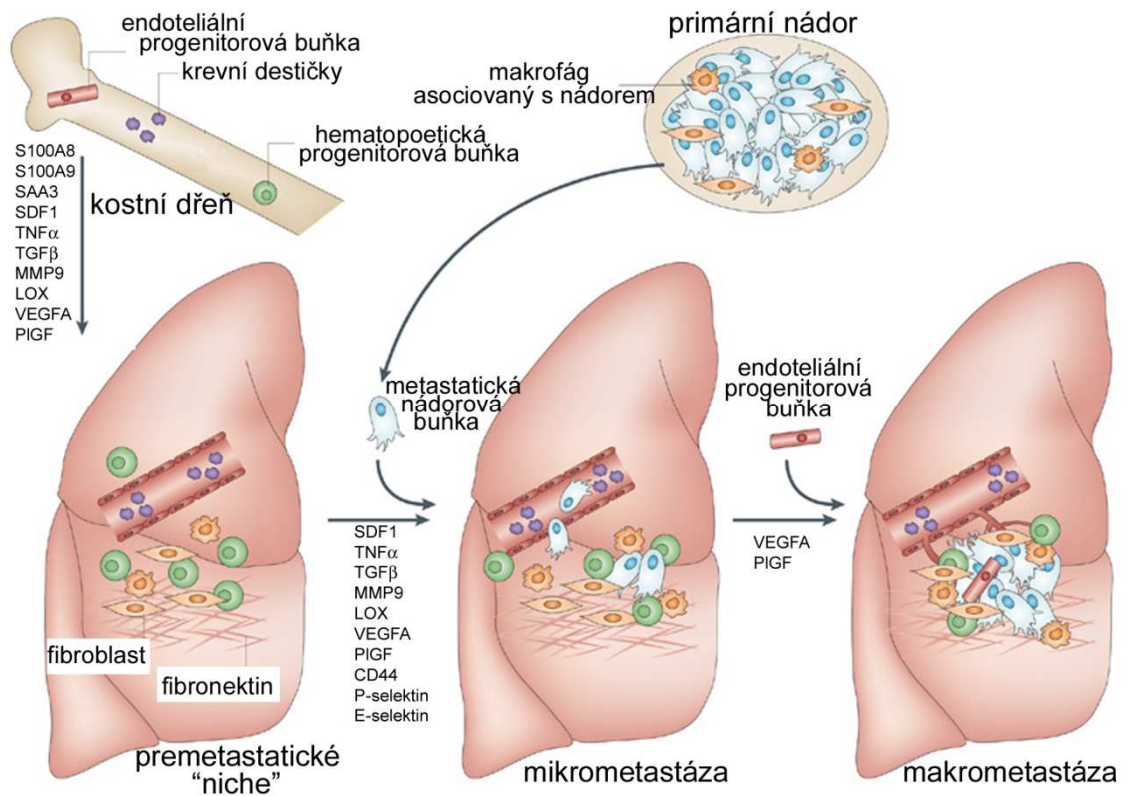
Jak bylo zmíněno výše, pericelulární remodelaci ECM zajišťují v nádorových buňkách také specializované struktury označované jako invadopodia. Jsou to ventrálně orientované výběžky membrány, úzké struktury o průměru 0,8  $\mu\text{m}$  až 1  $\mu\text{m}$  a délce 2  $\mu\text{m}$  a více. Jejich jádro tvoří molekuly F-aktinu, které obklopují proteiny asociované s aktinem (kortaktin,  $\alpha$ -aktinin, tensin, Arp2/3, WASP, N-WASP, kofilin, talin, vinkulin, ankyrin), adaptorové a regulační proteiny (Tks-5), proteázy a další molekuly (Flynn et al., 2008). Mezi proteolytické enzymy asociované s plně funkčními invadopodii patří MMP (MT1-MMP, MMP2, MMP9, ADAM rodina proteáz), katepsiny, „Seprase“ („Surface Expressed Protease“), urokináza (Buccione et al., 2009) a další. Kortaktin spolu s F-aktinem, MT1-MMP, N-WASP, Arp2/3, Tks-5 a fokální degradací ECM se používají jako markery pro identifikaci invadopodií (Yamaguchi, 2012). Invadopodia jsou dynamické struktury, jejichž iniciace, sestavení a zrání je regulováno sítí signálních molekul (mimo jiné kinázy Src, PKD, PAK, Rho GTPázy, integriny, kyslíkové radikály a miRNA) (Murphy, Courtneidge, 2011). Více studií poukázalo na souvislost mezi schopností nádorových buněk formovat invadopodia a jejich invazivní/metastatickou aktivitou. Řada proteinů účastnících se tvorby těchto struktur je v invazivních nádorech různých typů deregulována (shrnutí v publikaci Yamaguchi, 2012), nicméně přímých důkazů funkční souvislosti invadopodií a metastázování je nemnoho. Schoumacher et al. dokumentovali perforaci nativní bazální membrány *ex vivo* zprostředkovanou invadopodii kolorektálních nádorových buněk (Schoumacher et al., 2010). Existence podobných struktur byla odhalena díky intravitálním zobrazovacím technikám během intravazace nádorových buněk mamárních xenograftů (Yamaguchi et al., 2005). Aktuální studie skupiny J. Condeelis sděluje, že blokování tvorby invadopodií inhibicí proteinu N-WASP vede k snížené schopnosti nádorových buněk myších xenograftů vstupovat do cévního systému a zakládat metastázy (Gligorijevic et al., 2012). Někdy se používá termín invadosom pro označení všech adhezivních struktur buňky s proteolytickou funkcí (Saltel et al., 2011).

#### 1.1.1.4 Premetastatické "niche"

Usídlení nádorových buněk v cílové tkáni předchází příprava tzv. premetastatického "niche", tj. lokálně pozměněného mikroprostředí v místě vzniku budoucí metastázy. Lokální buněčný a nebuněčný kontext v místě metastatických lézí se stal předmětem intenzivního vědeckého bádání až nedávno. Bylo zjištěno, že primární nádor mobilizuje stromální buňky hostitelského organismu k formování podmínek požadovaných pro metastatický rozsev (Obr. 3). Buňky odvozené z kostní dřene („bone marrow-derived cells“; BMDCs) byly identifikovány jako klíčové komponenty a regulátory premetastatického „niche“ (Kaplan et al., 2005), připravující premetastatické orgány pro usazení nádorových buněk. Nezralé myeloidní prekurzory exprimující VEGFR1 receptor (VEGFR1+) a další markery hematopoetických progenitorových buněk (CD11b, CD34, c-Kit) se při reakci na růstové a jiné faktory (VEGF, PlGF, FGF, TNF $\alpha$ , TGF $\beta$ , LOX) sekretované nádorem aktivují k migraci do periferních tkání, k osídlení míst bohatých na fibronectin, kde se akumulují a interakcí se stromálními buňkami vytvářejí permisivní podmínky pro usazení a růst nádorových buněk (Kaplan et al., 2005; Erler et al., 2009; Kim et al., 2009b; Peinado et al., 2011). Receptivitu prostředí buňky BMDCs upravují mimo jiné remodelací mimobuněčné matrix (MMP9, MMP2) (Hiratsuka et al., 2002; Rucci et al., 2011), prozánětlivou signalizací (CXCL1, IL12) (Yamamoto et al., 2008) a také produkcí adhezivních molekul, složek ECM a chemokinů (VLA-4, versican, SDF-1, S100A8, S100A9), které usnadňují přilnutí, přežití a růst nádorových buněk po vstupu do cílového místa (Hiratsuka et al., 2006; Hiratsuka et al., 2008; Kaplan et al., 2005; Gao et al., 2012). Cirkulující nádorové buňky tedy nezakládají sekundární ložiska náhodně, jsou směřovány do již definovaného místa premetastatického „niche“, které



je indukováno a spoluurčeno primárním nádorem, resp. faktory jím sekretovanými nebo přímým působením diseminovaných nádorových buněk v kostní dřeni (Psaila et al., 2006).



Obr. 3. Premetastatické a metastatické „niche“. Krevní destičky, endoteliální a hematopoetické progenitorové buňky v kostní dřeni jsou růstovými a dalšími faktory sekretovanými primárním nádorem (VEGFA, PIGF, S100A8, S100A9 a další) mobilizovány k usazení v cílových místech premetastických orgánů, kde produkují chemokiny a enzymy (TNF $\alpha$ , TGF $\beta$ , SDF1, MMP9) modifikující lokální mikroprostředí. Spolu s aktivovanými fibroblasty, endoteliálními buňkami a složkami ECM (fibronektin, P-selektin, E-selektin) vytvářejí permissivní podmínky pro vstup metastatické nádorové buňky, která je interakcí se stromálními buňkami lokálního mikroprostředí aktivovaná k formování mikro- a makrometastázy. Převzato z Psaila, Lyden, 2009, upraveno.

Na tvorbě plně aktivovaného metastatického mikroprostředí se podílejí také endoteliální VEGFR2+ progenitory (BM-EPCs) uvolněné z kostní dřene, jejichž přítomnost v metastatickém „niche“ usnadňuje vaskulogenezi po implantaci nádorových buněk, tedy progresi cévně zásobených metastatických ložisek (Gao et al., 2008). Význam hematopoetických a endoteliálních progenitorových buněk z kostní dřene pro metastázování nádorů prokázaly experimenty s inhibicí receptorů VEGFR1, resp. VEGFR2: Protilátky neutralizující VEGFR1 znemožňují vznik premetastatických „niche“, to je zabraňují usídlení BMDCs a tím i vstupu nádorových buněk, zatímco inhibice VEGFR2 umožňuje vznik mikrometastáz, ale zabraňuje neoangiogenezi a tím rozvoji makrometastatických lézí (Kaplan et al., 2005; Kaplan et al., 2006). Ačkoli přímá účast BM-EPCs na tvorbě cév metastatických nádorů je stále předmětem debat (Spring et al. 2005; Nolan et al., 2007; Wickersheim et al., 2009), korelace mezi množstvím cirkulujících VEGFR2+ BM-EPC a metastatickým potenciálem byla potvrzena u různých nádorů (Naik et al., 2008; Taylor et al., 2009).

Metastatické „niche“, tedy chráněné mikroprostředí nápomocné růstu sekundárních tumorů, je formováno také prostřednictvím stromálních fibroblastů a proteinů ECM, které tyto fibroblasty produkují v reakci na signály přicházející z primárního nádoru (Obr. 3). Periostin, tenascin C a fibronectin jsou komponenty ECM, jejichž produkce je v místech budoucích sekundárních tumorů indukovaná cytokiny produkovanými nádorem (TGF $\beta$ ) a jejichž přítomnost je klíčová pro vstup a zahájení proliferace buněk iniciujících metastázy (Malanchi et al., 2011). Například deplece periostinu nebo tenascin C ve stromálních fibroblastech brání růstu sekundárních tumorů v myších modelech (O'Connell et al., 2011; Oskarsson, Massagué, 2011). Hlubší pochopení molekulárních mechanismů zodpovědných za vytváření (pre)metastatických „niche“ by mohlo nabídnout strategie, kterými by bylo možno cíleně zabránit kolonizaci orgánů nádorovými buňkami, případně přinést nové prognostické možnosti (Psaila et al., 2006).

### 1.1.1.5 Mikrovezikuly/exozomy

Donedávna se jako mediátory komunikace mezi nádorovými buňkami a buňkami hostitele v rámci mikroprostředí primárního nádoru i při zakládání požadovaných „niche“ ve vzdálených orgánech uvažovaly pouze rozpustné růstové faktory a cytokiny/chemokiny. Objev vezikulárního přenosu informací podstatně rozšířil paletu mezibuněčných signalizací během progresu nádorů. Membránové vezikuly byly původně pomíjeny jako inertní buněčný odpad, nicméně bylo prokázáno, že tyto sférické fragmenty buněčných membrán specificky interagují s cílovými buňkami vazbou ligandu na receptor a mění tyto buňky nejen přímou stimulací, ale i předáním vezikulárního nákladu tvořeného jak funkčními proteiny, tak mRNA a miRNA (Ratajczak et al., 2006). Podle původu rozlišujeme vezikuly velké až 1  $\mu$ m uvolňované z buněčných membrán v reakci na různé podněty („shedding vesicles“) a exozomy, což jsou menší částice (30-100 nm) konstitutivně uvolňované fúzí buněčné membrány a multivezikulárních tělísek (pozdních endozómů) (Cocucci et al., 2009).

Molekulární podstata a regulace tvorby mikrovezikul/exozomů však není dosud zcela objasněna. Je známo, že jsou to významné extracelulární signální entity zajišťující horizontální přenos bioaktivních molekul. Nádory sekretují velké množství mikrovezikulů a exozomů nejen do lokálního mikroprostředí, ale i do krve. Lokální i systémové působení těchto membránových struktur pravděpodobně přispívá ke kancerogenezi a metastázování na více úrovních (Dolo et al., 1999; Kim et al., 2002; Valenti et al., 2007; Muralidharan-Chari et al., 2010). Speciální mikrovezikuly, nazvané onkozomy, uvolňované některými nádory umožňují sdílet onkoproteiny mezi buňkami heterogenní nádorové populace (Al-Nedawi et al., 2008). Uvažuje se, že mikrovezikuly se spolu s výše uvedenými rozpustnými faktory (růstovými faktory a chemokiny) podílejí na navádění specifické populace buněk kostní dřene do míst budoucích metastatických ložisek a směřují, případně potencují diseminaci nádoru (Peinado et al., 2011). Hood et al. ukázali, že buňky melanomu jsou směřovány do určitých míst sentinelové mízní uzliny, kde kopírují distribuci exozomů. Obsazují specificky místa bohatá na exozomy, které pravděpodobně upravují lokální mikroprostředí lymfatických uzlin a umožňují místně-specifickou infiltraci nádorových buněk (Hood et al., 2011). Aktuální publikace skupiny D. Lydena dokazuje, že exozomy buněk melanomu ovlivňují populaci progenitorových buněk v kostní dřeni, modifikují jejich chování přenosem receptorové tyrozin kinázy Met, posilují tak metastatický potenciál primárního nádoru (Peinado et al., 2012). Zvyšují permeabilitu cév v premetastatických „niche“ a navádí tím BMDCs do míst formovaných pro sekundární nádory (Peinado et al., 2012). Mikrovezikuly/exozomy byly tedy rozpoznány jako další nástroj nádoru pro manipulaci vzdálených míst hostitelského organismu a jejich přeměně na prostředí vítané nádorovými infiltráty.

### 1.1.1.6 Intravazace/extravazace

Vstup nádorové buňky přes cévní stěnu do krevní nebo lymfatické cirkulace se označuje jako intravazace, extravazace je pak opačný přechod z dutiny cévy přes vrstvu endotelu a vaskulární bazální membránu do sekundární tkáně. Protože neovaskulatura nádorů je často neorganizovaná a netěsná a umožňuje snazší průnik nádorových buněk do krve nebo lymfy než neporušená cévní stěna v cílovém místě, je pro nádorové buňky kritická extravazace v cílovém místě (Pink et al., 2012). Netěsná cévní stěna vaskulatury primárního nádoru umožňuje nejen snazší intravazaci, ale i extravazaci cirkulujících nádorových buněk zpět do místa primárního růstu. Preferenční osídlování primárního nádoru určuje nejen snadno propustná vaskulatura, ale i příznivé mikroprostředí nádoru, jemuž se nádorové buňky nemusí adaptovat, jako je tomu v případě kolonizace vzdálených orgánů (Kim et al., 2009a). Objev procesu zpětného osazování nádoru buňkami uvolněnými do cirkulace znamenal změnu paradigmatu o metastázování jako o jednosměrném ději.

Přestože mechanismus migrace nádorových buněk přes vrstvu endotelu není dosud přesně známý, má se za to, že vyžaduje dynamickou interakci nádorových a endoteliálních buněk, které v tomto procesu nefigurují jen jako pasivní bariéra pohybu nádorových buněk (Stoletov et al., 2010). Extravazace nádorové buňky podobně jako extravazace leukocytů v místě zánětu sestává z adheze k endoteliálním buňkám v cílovém místě, diapedéze neboli transendoteliální migrace a následné remodelace subendoteliální ECM (Miles et al., 2008). V závislosti na typu nádoru a charakteru kapilár v sekundárním místě mohou být nádorové buňky mechanicky zachyceny v úzkých kapilárách nebo mohou specificky adherovat k endotelu cév širších než je průměr nádorové buňky zakládáním interakcí s molekulami exprimovanými na povrchu endoteliálních buněk (Miles et al., 2008; Schlüter et al., 2006). Tuto adhezi zprostředkovávají mimo jiné interakce integrinu  $\alpha 4\beta 1$  (nebo  $\alpha 6\beta 4$ ) na nádorových buňkách s adhezivními molekulami VCAM1 (nebo vápníkem aktivovaného chloridového kanálu CLCA1) na endotelu (Klemke et al., 2007; Abdel-Ghany et al., 2003). Také transmembránový glykoprotein mucin 1 produkovaný některými nádorovými buňkami slouží jako interakční partner adhezivní molekule ICAM1 přítomné na endoteliálních buňkách (Rahn et al., 2005). K zajímavému zjištění dospěli Stoletov et al. při intravitálním pozorování extravazace: nádorové buňky zachycené v kapilárách mohou migrovat podél cévních stěn i proti směru toku krve a uvažuje se, že takto vyhledávají vhodné místo extravazace (Stoletov et al., 2010). Bylo popsáno, že nádorové buňky adherující k endotelu parakrinně stimulují změny v organizaci cytoskeletu endoteliálních buněk například pomocí VEGF, CCL2 nebo 12(S)-HETE (kyselina hydroxyeicosatetraenová, metabolit kyseliny arachidonové) a napomáhají jejich rozestoupení (Honn et al., 1994; Lee et al., 2003; Wolf et al., 2012). Destabilizaci vaskulatury a tedy její zvýšenou permeabilitu pro nádorové buňky indukují také například angiopoetin 2, MMP3, MMP10, proteiny produkované v premetastatických orgánech v důsledku stimulace cytokiny (TGF $\beta$ , TNF $\alpha$ ) sekretovanými primárním nádorem (Huang et al., 2009a). TGF $\beta$  stimuluje také autokrinní produkci proteinu Angptl4 („Angiopoetin-like 4“) nádorovými buňkami, což také vede k zvýšené propustnosti cévní stěny a její účinné penetraci nádorovou buňkou (Padua et al., 2008). Reorganizace cytoskeletu regulovaná GTPázami Rho spolu s expanzí cytoplazmatických protruzí nádorové buňky pravděpodobně usnadňuje penetraci meziendoteliálních spojů. Bylo zjištěno, že GTPázy Rho, Rac, Cdc42 jsou v nádorových buňkách aktivovány například v důsledku interakce chemokinového receptoru CXCR4 s ligandem CXCL12 exprimovaným některými endoteliálními buňkami (Gassmann et al., 2009). Následuje adheze nádorové buňky k subendoteliální bazální membráně, jejíž obsah může být orgánově specifický, a její proteolytická remodelace umožňuje průnik nádorové buňky do tkáňového parenchymu (Miles et al., 2008). Ačkoli důležitost MMP pro transendoteliální migraci nádorových buněk obecně je kontroverzní (Deryugina, Quigley, 2006), bylo zjištěno, že pro extravazaci prsních

nádorových buněk v plicích je vyžadována koordinovaná funkce čtyř proteinů podílejících se na remodelaci vaskulatury: receptoru epidermálního růstového faktoru epiregulinu, MMP1, MMP2 a cyklooxygenázy 2 (Gupta et al., 2007).

#### 1.1.1.7 Orgánově-specifické metastázování

Termín diseminace nebo český výraz „rozsev“ implicitně obsahuje jednu ze základních teorií vzniku metastáz. Je známa jako teorie „seed and soil“, formuloval ji Stephen Paget už v roce 1889 (znovu publikováno v roce 1989; Paget, 1989) jako vysvětlení svého pozorování, že nádory se liší účinností, s níž kolonizují různé orgány. Podstatu této teorie tvoří stále aktuální myšlenka, že k založení sekundárního nádoru je nutná jak nádorová buňka s určitou kapacitou („seed“), tak vhodné permissivní podmínky v cílovém orgánu („soil“), a že kompetence diseminované buňky i faktory určující příznivost cílového prostředí jsou dány typem nádoru a jeho interakcí s hostitelským organismem.

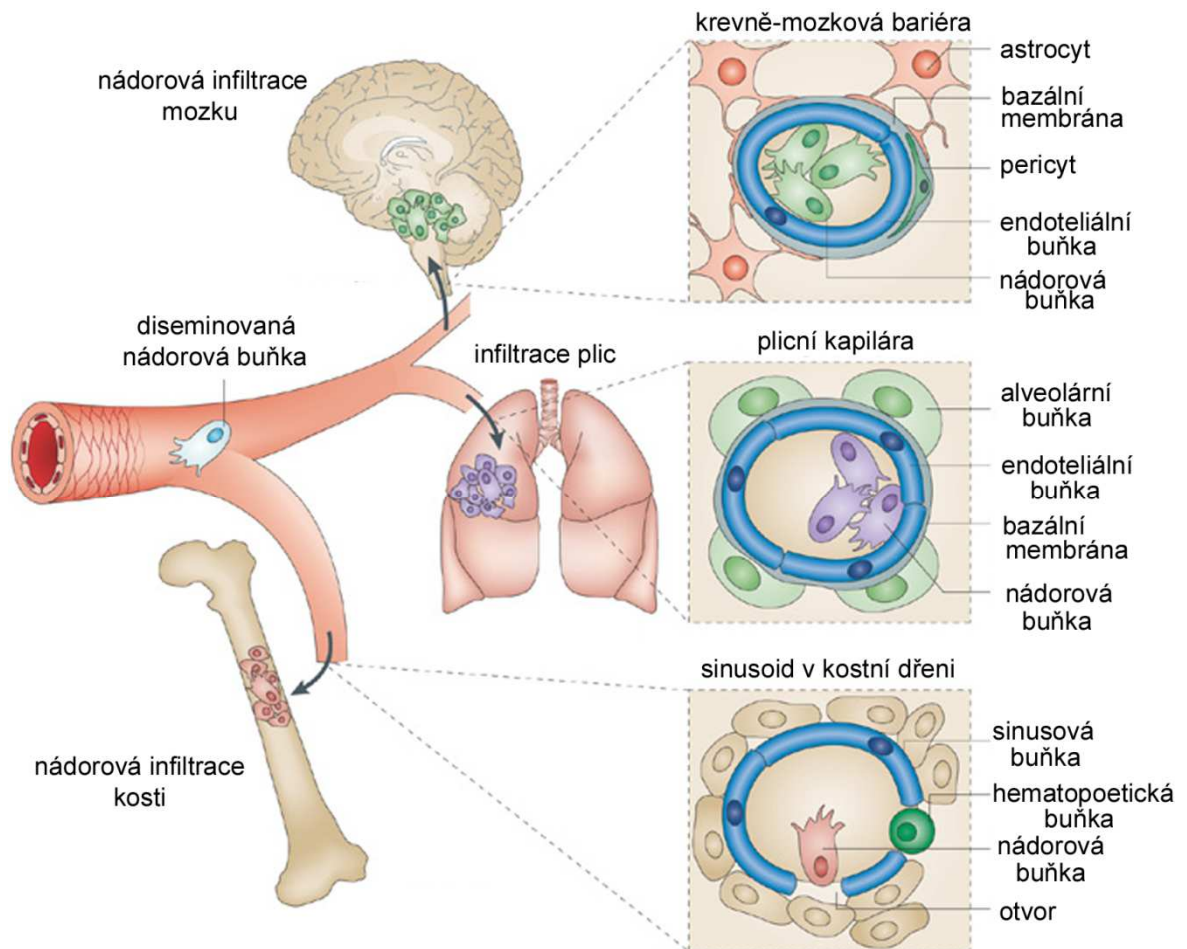
K objasnění mechanismů, které udávají orgánovou-specifitu metastáz, směřuje úsilí mnoha vědeckých pracovišť. Jak vyplývá z předchozích kapitol, preferenční kolonizace určitých sekundárních míst může být dána jejich přístupností danou cirkulací tělních tekutin (hemodynamická teorie místně specifických metastáz navržená J. Ewingem), formováním premetastatických „niche“, charakterem vaskulatury cílových míst, chemoatrakcí, expresí specifických receptorů, přítomností krevně mozkové bariéry, přívětivosti nového mikroprostředí a na druhé straně vybavením nádorové buňky, které (ne)umožňuje reagovat na chemoatraktanty, adherovat k endotelu, procházet cévní stěnou, přežít, adaptovat se a iniciovat metastatický růst v novém mikroprostředí. Obecně jsou to faktory ovlivňující vstup, přežití a růst metastatické buňky v cílovém orgánu. Ačkoli konkrétní biologicky selektivní mechanismy určující nenáhodnou distribuci sekundárních tumorů, někdy označovanou jako organotropismus metastáz, jsou stále předmětem zkoumání, s použitím celogenomových expresních přístupů a vhodných buněčných modelů se podařilo odhalit expresní profily prsních nádorů preferenčně metastázujících do plic, kostí a mozku (Kang et al., 2003; Minn et al., 2005; Bos et al., 2009). Toto úsilí spojené s funkčními studii vedlo k identifikaci některých genů řídících místně-specifické metastázování. Výsledky těchto studií naznačují, že nádorové buňky jsou na úrovni genové exprese modelovány už v primárním nádoru k následnému preferenčnímu usídlení sekundárních míst, a nabízejí tak potenciální prognostické nástroje (Minn et al., 2007).

Často studovaným typem místně specifických metastáz jsou metastázy v kostech, kam směřují se svými sekundárními depozity tzv. osteotropní nádory, mezi které patří například nádory prsu, prostaty a myelomy. Pro kostní metastázy je charakteristická manipulace buněčných složek kostního mikroprostředí (především osteoklastů a osteoblastů) nádorovou buňkou k aberantní remodelaci kostní hmoty zajišťující příznivé podmínky pro expanzi sekundárního nádoru. Z klinického pohledu je důležitým fenoménem souvisejícím s rozvojem metastatického onemocnění dormance diseminovaných buněk, kdy nádorové buňky po vstupu do sekundárního místa přetrvávají, aniž by se dělily (buněčná dormance), nebo tvoří konstantně početné shluky buněk, u nichž je proliferace balancovaná buněčnou smrtí (dormance nádorové masy; Aguirre-Ghiso, 2007). Reaktivace dormantních buněk vede k znovuobjevení nádorového onemocnění po různě dlouhé době latence. Adhezivní molekula VCAM1 byla nedávno identifikována jako kritický faktor reaktivace dormantních mikrometastáz v kosti (Lu et al., 2011). Interakcí s integrinem  $\alpha 4\beta 1$  přivádí cirkulující prekursor osteoklastů do kostního mikroprostředí a zabezpečuje tak rozvoj osteolytických lézí.

Pro plicní a mozkové metastázy je pravděpodobně více než schopnost podřítit si stromální buňky lokálního mikroprostředí důležité zabezpečit vstup do cílového místa (Obr.



4). Bylo zjištěno, že soubory genů, jimiž jsou charakterizovány prsní nádory metastázující do plic a do mozku, se částečně překrývají, a funkční studie prokázaly jejich význam pro vaskulární remodelaci, extravazaci, resp. překonání krevně-mozkové bariéry (Gupta et al., 2007; Bos et al., 2009).



Obr. 4. Organotropismus metastáz je částečně ovlivněný orgánově-specifickými bariérami vstupu nádorových buněk. Diskontinuální charakter sinusoidních kapilár v kostní dřeni přeznamenává snazší průnik nádorových buněk. Pro vstup do plicních kapilár a mozku musí být nádorová buňka vybavena schopností účinné extravazace, aby penetrovala souvislou vrstvu endoteliálních buněk a vaskulární bazální membránu. Převzato z Nguyen et al., 2009, upraveno.

## 1.2 Traskripční faktor c-Myb

Protein c-Myb patří do rodiny transkripčních faktorů se specifickou DNA-vazebnou doménou, do níž patří proteiny B-Myb, A-Myb a virový derivát v-Myb. Lidský protoonkogen *c-myb* (*MYB*, „*v-myb* avian myeloblastosis viral oncogene homolog“) lokalizovaný na chromozomu 6 (6q22-q23) kóduje několik sestřihových variant proteinu c-Myb. Protein c-Myb sestává ze tří strukturálních domén. N-terminální DNA vazebná doména je tvořena třemi tandemově uspořádanými úseky R1, R2 a R3, zodpovídá se rozpoznání sekvenčně specifického motivu *t/cAACT/gG* v promotorové oblasti cílových genů a nese jaderný lokalizační signál. Centrální transaktivační doména zajišťuje interakci s transkripčními koaktivátory CBP a p300. Doména na C-konci s negativní regulační funkcí obsahuje

strukturní motivy leucinového zipu, PEST/EVES a další, které se spolupodílejí na regulaci proteinu c-Myb vazbou dalších proteinů, a je také místem posttranskripčních modifikací (acetylací, fosforylací, ubikvitinací, sumoylací), jimiž je kontrolována aktivita/hladina proteinu c-Myb (Dash et al., 1996; Bies et al., 2002; Ramsay, Gonda, 2008). Exprese genu *MYB* je negativně regulována také zástavou transkripce v prvním intronu (Thompson et al., 1997; Mitra et al., 2012). Transkripce genu *MYB* je v některých buněčných systémech regulována TGF $\beta$  a Wnt signální drahou, transkripčními faktory PU.1, ER $\alpha$ , HoxA9, Meis1, Pbx i proteinem c-Myb v pozitivní zpětnovazebné smyčce (Nicolaidis et al., 1991; Bellon et al., 1997; Kanei-Ishii et al., 2004; Gonda et al., 2008; Cesi et al., 2011, Dassé et al., 2012).

Fyziologicky c-Myb funguje jako regulátor progenitorových buněk v kostní dřeni, ve střevním epitelu a v mozku (Ramsay, Gonda, 2008). Jeho deplece v myších modelech způsobuje embryonální letalitu, neboť funkční protein c-Myb je nepostradatelný pro krvetvorbu (Mucenski et al., 1991; Malaterre et al., 2008; Lieu et al., 2009; Cheasley et al., 2011). Transaktivací cílových genů se podílí na řízení procesů proliferace, diferenciaci a buněčné smrti. Vysokou expresí genu *MYB* se vyznačují nezralé proliferující hematopoetické progenitorové buňky, proliferačně aktivní buňky v bázi střevních krypt a pravděpodobně i progenitory neuronů v neurogeních „niche“ v dospělém mozku (Malaterre et al., 2008; Lorenzo et al., 2011). Mezi geny regulované proteinem c-Myb byly v různých buněčných systémech zařazeny např. *MYC*, *CCNA1*, *CCNB1*, *CCNE1*, *KIT*, *KRT16* (regulátory buněčného růstu/proliferace), *BCL2*, *HSPA5* (významné pro přežití buňky), *GATA3*, *LMO2*, *MYADM* (účast na buněčné diferenciaci) a další geny potenciálně zapojené do kancerogeneze (*DHRS2*, *TGFBI*, *PTGS2*, *JUN*, *KLF4*, *CXCR4*, *COLIA2*) (Ramsay et al., 2000; Luchetti et al., 2003; Rushton et al., 2003; Ramsay, Gonda, 2008; Quintana et al., 2011; Lorenzo et al., 2011). c-Myb působí většinou jako aktivátor transkripce svých cílových genů, ale byla zjištěna i represe transkripce indukovaná proteinem c-Myb (Mizuguchi et al., 1995; Zhao et al., 2011).

Patologické důsledky aberantní exprese genu *MYB* byly nejdříve rozpoznány v ptáčích modelech, kde onkogenní forma způsobuje hematologické malignity (myeloblastózu, odtud název genu), později byla amplifikace genu *MYB* spojena s leukemogenezí u člověka (Pattabiraman, Gonda, 2012), nově i v B-buněčné leukémii (Waldron et al., 2012). Dysfunkce proteinu c-Myb se prokázala i v epiteliálních nádorech, nejdříve v kolorektálních karcinomech, pak v nádorech prsu, pankreatu, hlavy a krku, v melanomech a dalších (Walker et al., 1998; Biroccio et al., 2001; Persson et al., 2009; Miao et al., 2011). Nově bylo zjištěno, že *MYB* působí jako onkogen v nádorech prostaty (Srivastava et al., 2012). Přitom jako příčina onkogenní aktivace byla popsána jeho deregulovaná exprese, amplifikace, translokace a fúze genů (Kauraniemi et al., 2000; Stenman et al., 2010). Donedávna byla jako mechanismus tumorigenní funkce proteinu c-Myb uvažována pouze deregulace proliferace, zástava diferenciaci a prevence buněčné smrti (Ramsay, Gonda, 2008).

### 1.2.1 c-Myb a migrace/invazivita nádorových buněk

Během posledních let se objevily indikace, že protein c-Myb se podílí také na migraci, resp. invazivitě nádorových buněk. Dříve bylo publikováno, že c-Myb podporuje migraci myších embryonálních fibroblastů a buněk neurální lišty (Karafiat et al., 2005; Kopecki et al., 2007), ale v souvislosti s invazivitou nádorů byl *MYB* poprvé zaznamenán, pokud je nám známo, na konferenci týkající gastrointestinálních nádorů v roce 2009 (Weston et al., 2009). K. Weston a její kolegové zjistili, že vypnutí exprese protoonkogenu *MYB* redukuje migraci a invazivitu buněk adenokarcinomu jícnu *in vitro* a že Myb-pozitivní buňky se v nádorech jícnu *in vivo* nacházejí především v okrajových oblastech, kde dochází k lokální invazi okolní

tkáně. První publikace představující protein c-Myb jako invazivní faktor vyšla v roce 2010 (Tanno et al., 2010). Vypnutí endogenní exprese *MYB* v buňkách kolorektálních nádorů a neuroblastomů vedlo k jejich snížené invazivitě *in vitro* a omezilo schopnost leukemických buněk usazovat se v kostní dřeni *in vivo*. Jako mechanismus indukce invazivity byla identifikována Myb-řízená aktivace transkripčního faktoru Slug a jím iniciovaná EMT (Tanno et al., 2010). Rok poté byl c-Myb identifikován jako regulátor EMT i v ER+ buňkách prsních karcinomů a byly naznačeny možné důsledky pro jeho funkci v invazivitě prsních nádorů (Cesi et al., 2011). Jako příčina zvýšení hladiny c-Myb během EMT bylo označeno mimo jiné vypnutí miR-200b/c (negativních regulátorů exprese genu *MYB*) a jako efektor proteinu c-Myb byl potvrzen transkripční faktor Slug (Cesi et al., 2011). Zatím poslední publikace zmiňující *MYB* a invazivitu nádorových buněk uvádí, že c-Myb podporuje EMT také v buňkách prostatických nádorů (Srivastava et al., 2012). Úbytek epiteliálních markerů a posílení mezenchymálních znaků včetně motility, reorganizace cytosketu a formování filopodií v důsledku nadměrné produkce proteinu c-Myb je v prostatických nádorových buňkách doprovázeno také rezistencí k depleci androgenů, což naznačuje dvojí funkci proteinu c-Myb v maligním rozvoji nádorů prostaty (Srivastava et al., 2012).

Chen et al. zjistili, že c-Myb může stimulovat invazivitu buněk hepatocelulárních karcinomů nezávisle na EMT (Chen et al., 2010a). Jako Myb-cílová molekula zodpovědná za tento efekt byl identifikován matricelulární protein osteopontin, který je často nadměrně exprimován metastatickými hepatocelulárními nádory.

### 1.3 Karcinomy prsu

Karcinomy prsu představují velmi heterogenní skupinu nádorů, jak z hlediska patogeneze, tak klinické prognózy a terapeutických možností. Kromě histopatologické analýzy je důležitým kritériem klinické klasifikace prsních nádorů také status estrogenových (ER) a progesteronových receptorů (PR) a exprese receptoru pro lidský epidermální růstový faktor 2 (HER2). Exprese ER je spojena s dobrou prognózou, naopak trojitě negativní status (ER-, PR-, HER2-) předznamenává vyšší riziko návratu onemocnění. Kromě prognostického významu je status těchto receptorů je důležitý také pro predikci odpovědi na cílenou terapii (tamoxifen, trastuzumab).

Přestože sporadické prsní nádory jsou často diagnostikovány v relativně častých stádiích lokálního onemocnění bez známek metastatického šíření, u 25-50% pacientek dojde někdy i desítky let po prvotní diagnóze k rozvoji vzdálených metastáz (Lorusso, Rüegg, 2012). Zatímco pravděpodobnost doby přežití 5 let je pro pacientky s lokalizovaným primárním nádorem prsu 98%, pro případy metastázujících prsních nádorů tato pravděpodobnost dramaticky klesá na pouhých 27%. Proto se hledají možnosti identifikace pacientek s vysokým rizikem recurence pro optimalizaci terapeutické intervence již během časných fází po diagnóze.

Alternativu k imunohistochemické/histologické klasifikaci nabízí expresní profilování souborů genů, vybraných na základě celogenomových expresních studií jako vhodné klasifikátory s prognostickou, případně prediktivní relevancí. Základní molekulární klasifikace prsních nádorů podle exprese padesáti genů označovaných jako PAM50 rozlišuje prsní karcinomy luminální A, luminální B, bazální, HER2 pozitivní a normální prsní tkáni podobné (Perou et al., 2000; Sørlie et al., 2001; Parker et al., 2009). Nádory spadající po luminálních subtypů jsou ER pozitivní, nádory bazální ER neexprimují. Nicméně se uvádí, že asi u 25% nádorů se neshoduje klasifikace založená na expresním profilování s imunochemickým/histologickým tříděním, kdy jednotlivé subtypy determinuje status ER, PR i HER2 a stupeň diferenciacce („grade“), a proto jsou nutné další studie ověřující

spolehlivost klasifikačních metod pro klinickou predikci. Byly navrženy i jiné soubory genů pro molekulární třídění prsních karcinomů, z nichž nejznámější je pravděpodobně sedmdesáti-genový klasifikátor identifikující pacientky s vysokým rizikem rozvoje distálních metastáz (někdy označovaný jako „Amsterdam signature“ nebo „poor prognosis signature“) (van 't Veer et al., 2002). Mezi komerčně dostupné soubory sond (testovaných genů) pro identifikaci rizikových skupin pacientek s prsními nádory patří např. Oncotype DX („21-gene signature“) nebo MammaPrint založený za 70-ti genech identifikovaných van 't Veer et al. (van 't Veer et al., 2002; Kao et al., 2011).

Prsní karcinomy zakládají metastázy nejčastěji v kostech, plicích, mozku a lymfatických uzlinách, využívají tedy lymfogenní i hematogenní šíření. Existují rozdíly v místech preferenční lokalizace metastáz nádorů různých molekulárních subtypů. Kostí jsou nejčastějším místem vzdálené rekurence ER-pozitivních nádorů prsu (Park et al., 2012). Také Sihto et al. zjistili, že luminální nádory zakládají metastázy preferenčně v kostech, HER2-pozitivní nádory metastázuji nejdříve do jater a plic a bazální nádory do mozku a jater (Sihto et al., 2011). Přesné molekulární příčiny této subtypově specifické lokalizace metastáz nejsou zcela objasněny.

Na rozdíl od rychle rostoucích a metastázujících nádorů jako jsou nádory pankreatu nebo plic, k progresi prsních karcinomů často dochází až po několikaleté latentní době i přes úspěšné odstranění primárního nádoru. Mechanismus dormance a reaktivace diseminovaných nádorových buněk je proto v souvislosti s nádory prsu intenzivně zkoumán. Pozornost je v tomto kontextu věnována charakterizaci dormantních buněk schopných iniciovat růst sekundárního nádoru, tzv. nádorovým kmenovým buňkách nebo tumor-iniciujícím buňkách. Tato minoritní populace nádorových buněk schopná rekapitulovat růst primárního nádoru je v případě karcinomu prsu charakterizovaná vysokou expresí povrchového markeru CD44 a nízkou expresí CD24. Bylo zjištěno, že EMT v mamárních karcinomech podporuje vznik buněk s vlastnostmi tumor-iniciujících buněk (Feroni et al., 2012).

### 1.3.1 c-Myb a prsní karcinomy

Protoonkogen *MYB* je jedním z cílových genů estrogenového receptoru, jeho exprese je proto výrazně vyšší v nádorech ER+ než ER-. Nicméně i mezi ER- nádory existuje variabilita v expresi genu *MYB* (Thorner et al., 2010). Jedna z prvních funkčních studií proteinu c-Myb v prsních karcinomech konstatovala závislost buněčné proliferace prsních nádorových buněk na expresi protoonkogenu *MYB* (Drabsch et al., 2007). Ztráta jeho funkce přiměla ER+ buňky zastavit buněčný cyklus, ER- buňky však k supresi *MYB* nebyly senzitivní. Stejná skupina publikovala o tři roky později data dokazující, že *MYB* funguje v prsních nádorech nejen jako promotor buněčného růstu, ale že jsou jím zasaženy i procesy buněčné diferenciaci a smrti (Drabsch et al., 2010). Během indukované diferenciaci ER+ prsních nádorových buněk MCF7 dochází k vypnutí endogenní exprese *MYB*. Genetická inhibice *MYB* spouští diferenciaci a naopak jeho ektopická exprese diferenciaci i apoptózu buněčné linie MCF7 blokuje (Drabsch et al., 2010). *MYB* byl takto definován v prsních nádorech jako onkogen s podobným účinkem, jaký byl popsán u leukémií a kolorektálních nádorů. Navíc deplece *MYB* znemožňuje vznik nádorů *in vivo*, pokud se používá MMTV-*NEU* myší model mamárních nádorů. Pokud se testuje tumorigenní funkce proteinu c-Myb s využitím myšího modelu MMTV-*PyMT*, který zajišťuje vznik agresivních nádorů mléčné žlázy, absence proteinu c-Myb růst nádoru významně zpomaluje (Miao et al., 2011). Pokud jde o invazivitu a metastázování prsních nádorů, byla potenciální participace proteinu c-Myb naznačena ve studii Chen et al. z roku 2010, kde se uvádí c-Myb-dependentní exprese chemokinu CXCL12/SDF-1, což je významný chemoatraktant a spolu se svými receptorem

CXCR4 tvoří důležitou pro-invazivní signalizační dvojici (Chen et al., 2010b). c-Myb byl poté přímo zahrnut do regulační sítě spojené s EMT a jeho exprese se ukázala být nepostradatelnou pro TGF $\beta$ -indukované změny v buňkách prsního karcinomu MCF7 (Cesi et al., 2011). Suprese *MYB* blokuje vznik mezenchymálních markerů a invazi těchto buněk po přidání TGF $\beta$ .

Krátce po sobě v roce 2010 se však objevily články popisující nádorově supresivní funkci proteinu c-Myb v prsních karcinomech. Deisenroth a spolupracovníci překvapivě identifikovali novou funkci jednoho z dříve popsanych cílových genů proteinu c-Myb Hep27 (kódovaný genem *DHRS2*) (Deisenroth et al., 2010). Zjistili, že mitochondriální enzym Hep27 se může v důsledku aberantní exprese *MYB* translokovat do jádra, kde interakcí s Mdm2 stabilizuje protein p53. Hladina *DHRS2* mRNA je zvýšená zejména v ER+ nádorech (s vysokou expresí *MYB* mRNA) a v nádorech s wt proteinem p53 (Deisenroth et al., 2010). Takto by protein c-Myb mohl ovlivňovat charakter nádorů prsu s wt proteinem p53. Přímý funkční průkaz tumor-supresivní funkce proteinu c-Myb byl podán krátce poté (Thorner et al., 2010). Vypnutí exprese *MYB* pomocí shRNA v buňkách MCF7 potencuje tumorigenezi *in vitro* (růst kolonií nezávislý na podkladu, „anchorage-independent growth“) a *in vivo* urychluje růst ortotopicky implatovaných mamárních nádorů. Klinickou relevanci k těmto experimentálním výsledkům přidala další studie, která poukázala na to, že skupina pacientek s karcinomy prsu vyznačujícími se vysokou expresí *MYB* genu má výbornou prognózu a minimální pravděpodobnost výskytu distálních metastáz (Nicolau et al., 2011).

## 2 CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE

Cílem předkládané disertační práce bylo stanovení funkce transkripčního faktoru c-Myb v regulaci tumorigenních vlastností buněk prsních karcinomů, s konkrétním zaměřením na invazivitu a metastázování nádorů.

1. Stanovit funkci proteinu c-Myb v regulaci migrace buněk prsních karcinomů *in vitro*
2. Stanovit funkci proteinu c-Myb v řízení invazivity buněk prsních karcinomů *in vitro*
3. Určit význam proteinu c-Myb pro tumorigenezi a metastázování prsních karcinomů *in vivo*
4. Identifikovat molekulární efekторы Myb-řízených procesů v buňkách prsních karcinomů

## 3 MATERIÁL A METODY

### 3.1 Materiál

#### 3.1.1 Buňky

##### 3.1.1.1 Nádorové linie

MDA-MB-231 – nádorová linie odvozená z pleurální efúze lidského adenokarcinomu prsu  
4T1 – nádorová linie odvozená z tumoru mléčné žlázy myši kmene BALB/cfC3H (kmen s vysokou četností spontánních prsních nádorů způsobenou přítomností exogenního viru MMTV („mouse mammary tumor virus“))

##### *Kultivační média*

MDA-MB-231: RPMI 1640 (Sigma) s 10% fetálním bovinním sérem (FCS), 2 mM L-glutaminem, penicilinem (100 U/ml) a streptomycinem (100 µg/ml)

4T1: RPMI 1640 (Sigma) s 10% fetálním bovinním sérem (FCS), 2 mM L-glutaminem, penicilinem (100 U/ml), streptomycinem (100 µg/ml), glukózou (4500 mg/ml) a 1 mM pyruvátem sodným

##### 3.1.1.2 Linie lidských endoteliálních buněk

HUVEC – lidské endoteliální buňky získané z pupečnickové žíly („Human Umbilical Vein Endothelial Cells“)

##### *Kultivační médium*

HUVEC: „Endothelial Basal Medium“ (EBM; Lonza) doplněno „EGM SingleQuotes“ (Lonza; CC-4133): lidský epidermální růstový faktor, FCS, hydrokortison, gentamicin, amfotericin-B, bovinní mozkový extrakt, vitamin C.

##### 3.1.1.3 Bakterie

Bakterie kmene *E. coli* DH5 $\alpha$ , kultivovány v LB médiu (1% trypton, 0,5% kvasničný extrakt, 1% NaCl)

#### 3.1.2 Myši

Myši kmene BALB/c, samice, stáří 7 týdnů, 18 myší, projekt pokusu byl schválen odbornou komisí na ochranu pokusných zvířat

#### 3.1.3 Další materiál

##### 3.1.3.1 Plazmidy

- pcDNA3-hMYB-HA – expresní vektor pcDNA3 nesoucí cDNA lidského genu *MYB* (dar J. Biese; Bies et al., 1999)
- pcDNA3-mMYB - expresní vektor pcDNA3 nesoucí cDNA myšího genu *Myb* (dar J. Biese; Bies et al., 1999)
- pcDNA3-Slug - expresní vektor pcDNA3 nesoucí cDNA lidského genu *SNAI2* (dar Muh-Hwa Yang; Huang et al., 2009b)
- p6MBSluc – luciferázový reportérový konstrukt s umělým promotorem obsahujícím šest vazebných míst pro c-Myb (dar T. Nakano; Takahashi et al., 2000)

- pGL3-2.85kbCD - luciferázový reportérový konstrukt s 2,85 kb dlouhou sekvencí promotoru lidského genu *CTSD* (dar J. Chirgwina; Wang et al., 2000)
- pGL3-0.82kbCD - luciferázový reportérový konstrukt s 0,82 kb dlouhou sekvencí promotoru lidského genu *CTSD* (dar J. Chirgwina; Wang et al., 2000)
- pGL3-4.3kbMMP1-1G – luciferázový reportérový konstrukt s 4,3 kb dlouhou sekvencí promotoru lidského genu *MMP1*, 1G polymorfismus (-1607 bp) (dar C. Brinckerhoff; Rutter et al., 1998)
- pGL3-1.606kbMMP1 – luciferázový reportérový konstrukt s 1,606 kb dlouhou sekvencí promotoru lidského genu *MMP1* (dar A. Galloway; Benanti et al., 2002)
- pGL3-0.624kbMMP1 – luciferázový reportérový konstrukt s 0,624 kb dlouhou sekvencí promotoru lidského genu *MMP1* (dar A. Galloway; Benanti et al., 2002)
- pGL2-MMP9 – luciferázový reportérový konstrukt s 1,38 kb dlouhou sekvencí promotoru lidského genu *MMP9* (příprava popsána níže)
- CMV-βgal – vektor kódující β-galaktosidázu (Smarda et al., 1999)

### 3.1.3.2 Protilátky

Anti-c-Myb: 05-175, Millipore, ředění 1:1000

Anti-katepsin D: 610801, BD Biosciences, ředění 1:1000

Anti-MMP9: G657, Cell Signaling Technology, ředění: 1:500

Anti-MMP1: 1976-S, EpiSelect MMP sampler kit, Epitomics, ředění: 1:1000

Anti-Slug: 9585, Cell Signaling Technology, ředění 1:1000

Anti-vimentin: 13.2, Sigma, ředění 1:3000

Anti-HA: 11 666 606 001, Roche, ředění 1:5000

Anti-OB-kadherin: 4442, Cell Signaling Technology, ředění 1:1000

Anti-CD61 (integrin β3): 611140, Integrins sampler kit, BD Biosciences, ředění 1:2500

Anti-moesin: 3150, Cell Signaling Technology, ředění 1:1000

Anti-Hep27 (*DHRS2*): SAB4500058, Sigma, ředění 1:1000

Anti-osteopontin (*SPP1*): ab8448, Abcam, ředění 1:1000

Anti-Cox-2 (*PTGS2*): 100-401-226, Rockland, ředění 1:4000

Anti-c-Jun: 9165, Cell Signaling Technology, ředění 1:1000

Anti-fosfo-c-Jun (Ser73): 9164, Cell Signaling Technology, ředění 1:1000

Anti-aktin: A5060, Sigma, ředění 1:5000

Anti-mouse IgG HRP-linked: 7076, Cell Signaling Technology

Anti-rabbit IgG HRP-linked: A4914, Sigma

### 3.1.3.3 siRNA

siRNA *CTSD*: 5'-GGAUCCCGCUGCACAAGUUTT-3' (Ambion)

siRNA *MYB*: 5'-UAUAGUGUCUCUGAAUGGCUGCGGC-3' (Invitrogen)

siRNA *CDH11*: ON-TARGETplus SMARTpool, mix 4 siRNA (Dharmacon, L-013493-00-0005)

siRNA *SNAI2* (*SLUG*): mix 3 siRNA (Santa Cruz Biotechnology, sc-38393)

siRNA ctrl: ON-TARGETplus non-targeting pool (Dharmacon, D-001810-1-05)

### 3.1.3.4 Fluorescenční sondy

*MYB*: Hs00920554\_m1

*MMP9*: Hs00234579\_m1

*MMP1*: Hs00899658\_m1



*CTSD*: Hs00157201\_m1  
*JUN*: Hs99999141\_s1  
*COLIA2*: Hs01028970\_m1  
*DHRS2*: Hs00195090\_m1  
*PTGS2*: Hs00153133\_m1  
*PCNA*: Hs00696862\_m1  
*GAPDH*: 4326317e  
*Myb*: Mm00501741\_m1  
*Cxcr4*: Mm99999055\_m1  
*Id1*: Mm00775963\_g1  
*Msn*: Mm00447889\_m1  
*Gapdh*: 4352339e

### 3.1.3.5 Proteiny extracelulární matrix

Fibronektin (Sigma, F2006), zásobní koncentrace 1 mg/ ml  
Matrigel (BD Matrigel Basement Membrane Matrix, BD Biosciences, 356234)  
Kolagen I (Sigma, C4243), zásobní koncentrace 3 mg/ml

### 3.1.3.6 Další chemikálie

SP600125: inhibitor kinázy JNK („c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase“) (Merck Millipore, 420119)  
GM6001: širokospektrý inhibitor MMP, (R)-N<sup>4</sup>-Hydroxy-N<sup>1</sup>-[(S)-2-(1H-indol-3-yl)-1-methylcarbamoyl-ethyl]-2-isobutyl-succinamid (Sigma, M5939)  
Pepstatin A metylester: inhibitor katepsinu D (Merck Millipore, 516485)  
Mitomycin C (Sigma, M4287)

## 3.2 Metody

### 3.2.1 Příprava plazmidu pGL2-MMP9

Sekvence promotoru genu MMP9 (-1362/+19) byla získána amplifikací genomové DNA izolované ze vzorků krve zdravých dárců (směs čtyř vzorků DNA) PCR reakcí s použitím AccuTaq LA DNA polymerázy (Sigma) a specifických primerů (primer 1: 5'-TATAGACCCTGCCCGATGCCGG-3', primer 2 5'-TGGTGAGGGCAGAGGTGTCTGAC-3') a následnou PCR reakcí s primery obsahujícími restrikční místa pro endonukleázy BglII a HindIII (primer 1: 5'-GCGCGCAGATCTTATAGACCCTGCCCGATGCCGG-3'; primer 2: 5'-GCGCGCAAGCTTTGGTGAGGGCAGAGGTGTCTGAC-3'). Získaná sekvence byla štěpena BglII a HindIII a klonována do vektoru pGL2Basic (Promega, luciferázový reportérový konstrukt). Úspěšnost klonování potvrdila kontrolní sekvenace inzertu s použitím sekvenačních primerů 5'-TGTATCTTATGGTACTGTAAGT-3', 5'-CTTTATGTTTTGGCGTCTTCCA-3' a následně 5'-CTCCCTGACAGCCTTCTTTG-3'. Eluce DNA z agarózového gelu byla provedena kitem „QIAEX II Gel Extraction Kit“ (Qiagen) podle návodu výrobce. Plazmidová DNA byla izolována kitem „QIAprep Spin Miniprep Kit“ (Qiagen) podle návodu výrobce.

### 3.2.2 Stabilní transfekce

Pro přípravu stabilních linií buněk MDA-MB-231/4T1 se zvýšenou expresí genu *MYB* byly buňky lidského karcinomu prsu MDA-MB-231 transfekovány expresním plazmidem pcDNA3-hMYB-HA nesoucím sekvenci cDNA lidského genu *MYB* a buňky myšího karcinomu mléčné žlázy plazminem pcDNA3-mMYB kódujícím myší protein c-Myb a také plazmidem pcDNA3-hMYB-HA (varianty MYBup). Současně byly buňky transfekovány kontrolním vektorem bez inzertu (varianty vektor). K transfekci buněk MDA-MB-231 i 4T1 jsme použili Lipofectamine 2000 (Invitrogen) podle návodu výrobce. Buňky MDA-MB-231 byly selektovány dva týdny v médiu s 800 µg/ml G418, buňky 4T1 dva týdny v médiu s 300 µg/ml G418. Populace G418-rezistentních buněk byla klonována metodou mezního zředění a hladina ektopicky exprimovaného proteinu c-Myb v získaných klonech byla ověřena imunoblotingem.

### 3.2.3 Transaktivační testy

Transaktivační funkce proteinu c-Myb byla testována s využitím luciferázových reportérových konstruktů. Sekvenci kódující luciferázu světlušky *Photinus pyralis* jsou předřazeny zkoumané regulační úseky: umělý promotor s šesti vazebnými místy pro c-Myb (vektor p6MBSluc), sekvence promotoru lidského genu pro *CTSD* o různé délce (vektory pGL3-2.85kbCD, pGL3-0.82kbCD, pGL3-0.35kbCD), 1,38 kb dlouhá regulační sekvence ležící proti směru transkripce od startovacího nukleotidu lidského genu *MMP9* (pGL2-MMP9) a různě dlouhé úseky promotoru lidského genu *MMP1* (pGL3-0.624kbMMP1, pGL3-1.606kbMMP1, pGL3-4,3kbMMP1-1G). Stabilní klony buněk MDA-MB-231 a 4T1 byly transfekovány uvedenými luciferázovými reportéry současně s plazminem kódujícím β-galaktozidázou (CMV-βgal) Lipofectaminem 2000 (Invitrogen) podle návodu výrobce. Buňky byly sklizeny 24 hod po transfekci. V jiném případě byly současně s plazminem kódujícím luciferázu a β-galaktozidázou kotransfekovány buňky MDA-MB-231 expresními plazmidy s kódujícími sekvencemi genů *MYB* a *SNAI2*, tyto buňky byly sklizeny 48 hod po transfekci. Lyzáty byly připraveny z buněčné suspenze (buňky v pufru 0,25 M Tris.Cl, pH 7,5) třemi cykly prudkého zmrazení. Po centrifugaci byl supernatant použit k testování aktivity β-galaktozidázy a luciferázy.

#### 3.2.3.1 β-galaktozidázová assay

K optimalizovanému množství lyzátu (naředěn pufrům 0,25 M Tris.Cl, pH 7,5; celkový objem 40 µl) jsme přidali 360 µl „β-gal assay“ pufru (1 mM MgCl<sub>2</sub>, 45 mM β-merkaptóetanol, 1,3 mg/ml 2-nitrofenyl-β-D-galaktopyranosid, 122 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O, 27 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O, pH 7,5). Po inkubaci při 37 °C jsme reakci zastavili přidáním 1,85násobného objemu 1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> a změřili jsme absorbanci při 420 nm analyzátozem Synergy HT (Bio-tek).

#### 3.2.3.2 Luciferázová assay

K buněčnému lyzátu (10 µl, naředěn pufrům 0,25 M Tris.Cl do objemu 100 µl) jsme přidali 360 µl „luc assay“ pufru (2,5 mM glycyl-glycin, 15 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.3H<sub>2</sub>O, 15 mM MgSO<sub>4</sub>, 4 mM EGTA, 2 mM ATP, 1 mM DTT). Po přidání luciferinu (1 mM luciferin s 10 mM DTT, naředit ve vodě 1:4) jsme změřili aktivitu luciferázy luminometrem Turner TD-20E. Naměřenou aktivitu luciferázy jsme normalizovali k účinnosti transfekce zjištěnou aktivitou β galaktozidázy.

### 3.2.4 Detekce mRNA

#### 3.2.4.1 Izolace celkové RNA (qRT-PCR)

Celková RNA byla z buněčných linií MDA-MB-231/4T1 a jejich variant MYBup/vektor izolována kitem „Gene-Elute Total Mammalian RNA Kit“ (Sigma) podle návodu výrobce. Stejným kitem byla izolovaná RNA z lyzátů nádorové tkáně, vzniklých homogenizací 50 mg odebrané tkáně (RNAlater) v 800 µl lyzačního pufru (součást kitu „Gene-Elute Total Mammalian RNA Kit“) v přístroji MagNA Lyser (Roche). Koncentrace a čistota získané RNA byla stanovena spektrofotometricky (NanoPhotometer, Implen).

#### 3.2.4.2 Izolace celkové RNA (PCR array)

RNA určená k expresní analýze pomocí PCR array byla z buněk MDA-MB-231MYBup a MDA-MB-231wt/vektor izolovaná kitem „RNeasy Mini Kit“ (Qiagen) podle návodu výrobce. Koncentrace a čistota získané RNA byla stanovena spektrofotometricky (NanoPhotometer, Implen) a integrita vybraných vzorků RNA byla stanovena kitem „RNA 6000 Pico“ na bioanalyzeru Agilent 2100 (Agilent Technologies) podle návodu výrobce.

#### 3.2.4.3 Reverzní transkripce

Reverzní transkripci jsme prováděli kitem „Quantitect Reverse Transcription Kit“ (Qiagen) podle návodu výrobce. Do reakční směsi jsme přidali 0,5 až 1 µg RNA, výsledný objem reakce po přidání „Wipeout“ pufru, „Quantiscrypt“ RT pufru, RT Primer mix a „Quantiscrypt“ reverzní transkriptázy byl 20 µl. Výsledná cDNA byla použita pro kvantitativní PCR v reálném čase (qRT-PCR) nebo pro PCR array, případně byla uchována při -20 °C.

#### 3.2.4.4 Kvantitativní PCR v reálném čase (qRT-PCR)

Pro detekci transkriptů genů *MYB*, *MMP9*, *MMP1*, *CTSD*, *JUN*, *COL1A2*, *DHRS2*, *PTGS2*, *PCNA*, *Myb*, *Id1*, *Cxcr4*, *Msn* byly používány komerčně dostupné sady primerů a TaqMan sond označených fluoroforem FAM (Applied Biosystems). Jako endogenní kontrola byla použita mRNA genu *GAPDH* (případně myší *Gapdh*), detekovaná TaqMan sondou označenou fluoroforem VIC. Pro vlastní qRT-PCR byl využíván systém 7500 Real-Time PCR (software SDS verze 1.3.1, Applied Biosystems). Každá reakce byla provedena v triplicátech. Reakce byly doplněny o kontrolní vzorky RNA bez reverzní transkriptázy a bez templátu. Průběh PCR: 95 °C 10 min, 40 cyklů: 95 °C 15 s, 60 °C 1 min.

Příprava reakce:

12,5 µl 2× „FastStart Universal Probe Master Mix“  
1,25 µl 20× TaqMan primery/sondy (FAM)  
1,25 µl 20× TaqMan primery/sondy (*GAPDH*-VIC)  
25-100 ng cDNA, doplnit vodou do objemu 25 µl

Relativní genová exprese byla stanovena metodou  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  normalizací k hodnotě *GAPDH* daného vzorku a k hodnotě stejným způsobem normalizovaného kalibrátoru (kontrolní wt netransfekované buňky nebo buňky transfekované prázdným vektorem).

### **3.2.4.5 PCR array**

K expresnímu profilování buněk MDA-MB-231MYBup jsme použili „RT<sup>2</sup> Profiler PCR Array Human Tumor Metastasis“ (PAHS-028A, SABiosciences). PCR array v 96-well formátu obsahuje panel 96 sad primerů, umožňujících detekci 84 genů relevantních pro metastázování nádorů a 5 provozních genů. 0,5 µg RNA získané z buněk MDA-MB-231MYBup a kontrolních buněk jsme přepsali do cDNA, jak je popsáno výše, a reverzní reakci jsme naředili vodou bez nukleáz na výsledný objem 111 µl. K reakci jsme přidali pufr RT<sup>2</sup> SYBR Green/ROX qPCR Master Mix, který obsahuje SYBR green, ROX referenční barvu, HotStart DNA Taq polymerázu a nukleotidy a vodu bez nukleáz. 25 µl reakční směsi jsme pipetovali do 96 jamek PCR array destičky. Pro qRT-PCR reakci jsme využili 7500 Real-Time PCR a software SDS verze 1.3.1 (Applied Biosystems). Získaná data jsme vyhodnotili softwarem PCR Array Data Analysis Template Excel (SABiosciences).

## **3.2.5 Detekce proteinů**

### **3.2.5.1 Příprava buněčných lyzátů**

Pro získání buněčných lyzátů k rozdělení pomocí SDS-PAGE a případné imunodetekci proteinů jsme buňky sklídili, promyli 1× PBS, spočítali na přístroji CASY Cell Counter (Roche) a stejný počet buněk jsme lyzovali adekvátním množstvím pufru 2× CSB (126 mM Tris.Cl pH 6,8, 20% glycerol, 4% SDS, 0,005% bromfenolová modř, 10% β-merkaptetanol) a pětiminutovým varem.

### **3.2.5.2 Příprava kondiciovaných médií**

Pro detekci sekretovaných proteinů byla připravena média kondiciovaná různými buněčnými variantami MDA-MB-231 a 4T1. Buňky při 80% konfluenci jsme promyli 1× PBS, přidali jsme médium bez přísady FCS. Kondiciované médium jsme sklídili po 8 hodinách inkubace při 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>, centrifugací jsme oddělili zbytky buněk a média koncentrovali na centrifugačních kolonkách Amicon („Amicon Ultra-4 Centrifugal Filters with Ultracel-10 membrane“, Millipore) při 4 000g/15 min. Koncentraci proteinů jsme stanovili kolorimetricky kitem Bio-Rad DC protein assay (Bio-Rad; modifikovaná Lowryho metoda) podle návodu výrobce.

### **3.2.5.3 Elektroforetická separace proteinů polyakrylamidovou gelovou elektroforézou (SDS-PAGE)**

Kondiciovaná média a proteinové lyzáty byly koncentrovány v 4% zaostřovacím polyakrylamidovém gelu a rozděleny v 10% separačním polyakrylamidovém gelu v aparatuře Mini-PROTEAN 3 (Bio-Rad). Gely byly obarveny Coomassie Brilliant Blue R-250 Staining Solution (Bio-Rad) nebo byly použity k přenesení proteinů na membránu westernovým přenosem (viz imunobloting).

### **3.2.5.4 Imunobloting**

Proteiny z polyakrylamidového gelu byly přeneseny na PVDF membránu (Millipore) elektroblottingem (100 V, 2 hod). Membránu jsme blokovali 5% odtučněným mlékem v 25 mM Tris.Cl, pH 8, 144 mM NaCl a 0,075% Tween. Primární protilátky jsme ředili ve stejném roztoku (5% odtučněné mléko v 25 mM Tris.Cl, pH 8, 144 mM NaCl a 0,075% Tween), ředění je uvedeno v kapitole Materiál. Inkubace s primární protilátkou probíhala při 4 °C přes noc, následovalo promytí membrány a hodinová inkubace se sekundární protilátkou

naředěnou 1:15000 ve stejném roztoku jako primární protilátka. Navázaná protilátka byla detekovaná metodou ECL („enhanced chemiluminiscence“) pomocí „Immobilon Western Chemiluminiscent HRP Substrate“ (Millipore), jak je uvedeno v návodu výrobce.

### 3.2.5.5 Stanovení enzymatické aktivity katepsinu D

Buněčné lyzáty určené k měření enzymatické aktivity katepsinu D byly připraveny lyzí stejného počtu buněk ( $9 \times 10^5$ ) v 80  $\mu$ l destilované vody třemi cykly prudkého zmrazení. Lyzáty byly centrifugovány (max. otáčky/4 °C/5 min) a koncentrace proteinů v supernatantech byla změřena výše popsaným postupem (viz kapitola 3.2.5.2). Enzymatická aktivita katepsinu D v buněčných lyzátech byla stanovena kitem „Cathepsin D assay“ (Sigma). 20  $\mu$ g celkových proteinů (max. objem 30  $\mu$ l) bylo nanášeno v duplikátech do jamek mikrotitrační destičky, současně byly připraveny kontrolní jamky s inhibitorem katepsinu D pepstatinem A (výsledná koncentrace 0,2 mg/ml). K lyzátům byl přidán pufr a voda a následovala inkubace 10 min při 37 °C. Ke vzorkům byl přidán substrát („Cathepsin D substrate solution“, součástí kitu Cathepsin D assay“) a emitovaná fluorescence byla měřena kineticky přístrojem Synergy HT při tomto nastavení: excitace 360/40 nm, emise 460/40 nm, senzitivita 70, teplota 37 °C, doba měření 30 min, interval 2 min.

### 3.2.6 Analýza buněčné proliferace

Růstová křivka byla určena pro buňky MDA-MB-231 (varianty MYBup, vektor, wt a MIG4) a pro buňky 4T1 (varianty MYBup, vektor a wt). Buňky linie MDA-MB-231 byly nasazeny do kultivačních misek v koncentraci  $5 \times 10^4$ /ml a buňky 4T1 v koncentraci  $7,5 \times 10^4$ /ml. Po dobu 4 dnů jsme určovali počet živých buněk jednotlivých vzorků přístrojem CASY Cell Counter (Roche).

### 3.2.7 Analýza buněčné migrace/invazivity *in vitro*

#### 3.2.7.1 „Transwell“ migrační/invazivní test

Chemotaktická migrace buněk byla testována kitem „Cultrex Cell Invasion Assay“ (Trevigen). Kit využívá kultivační systém „transwell“ v 96-jamkovém formátu, v němž je horní a dolní část jamky oddělena porézní membránou (průměr pórů je 8  $\mu$ m). Buňky MDA-MB-231 (70% konfluence) jsme kultivovali za podmínek sérové deprivace 8 hod, následně byly spočítány a naředěny v mediu bez přídavku FCS na koncentraci  $1 \times 10^6$ /ml. 50  $\mu$ l buněčné suspenze ( $5 \times 10^4$  buněk/jamku) bylo přidáno do horní části jamek, do kontrolních jamek nebyly buňky přidány. Ještě před přidáním buněk byly membrány v některých pokusech překryty tenkou vrstvou fibronektinu (Sigma) naředěného v 1 $\times$ PBS na koncentraci 20  $\mu$ g/ml. 50  $\mu$ l naředěného roztoku fibronektinu bylo nanášeno do inzertu, po třicetiminutové inkubaci při pokojové teplotě byl odstraněn přebytek roztoku. Do dolní části jamek bylo přidáno médium s přídavkem 10% FCS, použitého jako chemoatraktant, nebo médium bez něj. Po 16 hod inkubace při 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> byly jamky promyty a buňky, které pronikly skrz membránu, byly uvolněny z filtru, obarveny Calceinem AM (součástí kitu „Cultrex Cell Invasion Assay“) a emitovaná fluorescence byla změřena přístrojem Synergy HT (Bio-tek) při tomto nastavení: excitace 485 nm, emise 520 nm, senzitivita 70.

Pro testování buněčné invazivity byl tento postup modifikován přidáním extraktu bazální membrány (BME nebo Matrigel, součástí kitu „Cultrex Cell Invasion Assay“), který pokrývá membránu a tvoří tak bariéru buněčnému pohybu. BME (dodáván výrobcem 5 $\times$



koncentrovaný) byl naředěn na výslednou koncentraci  $0,5 \times 50 \mu\text{l}$  naředěného roztoku BME bylo navrstveno na membránu před přidáním buněk. Po čtyřhodinové inkubaci při  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  byla na membránu aplikovaná suspenze buněk, jak je popsáno výše, a dále se postupovalo jako při migračních experimentech.

### 3.2.7.2 Selekcce migračně aktivních buněk linie MDA-MB-231 *in vitro*

Buňky s vysokou chemotaktickou migrační aktivitou jsme selektovali z buněk MDA-MB-231 čtyřmi cykly „transwell“ migrace a expanze získané subpopulace buněk. Postupovali jsme jako při „transwell“ migračním testu, buňky (70% konfluence) byly kultivovány při sérové deprivaci 8 hod a nasazeny v počtu  $5 \times 10^4$  buněk/jamku 96-jamkové destičky. Do dolní části jamky bylo přidáno médium s chemoatraktantem (10% FCS). Po čtyřhodinové inkubaci při  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  se buňky uvolnily z filtru disociačním pufrem (součást kitu „Cultrex Cell Invasion Assay“) a suspenzi buněk, které prostoupily filtrem za 4 hod, jsme přenesli do kultivační misky s kompletním médiem. Buňky jsme kultivovali po dobu nutnou pro získání dostatečného počtu buněk pro další cyklus migrace. Cyklus migrace a expanze jsme opakovali čtyřikrát, migrační aktivitu získané buněčné populace jsme srovnávali s parentální linií MDA-MB-231 stejné pasáže.

### 3.2.7.3 Analýza buněčné migrace/invazivity v reálném čase pomocí xCELLigence „Real-Time Cell Analyzer“ (Roche)

Pro kinetickou analýzu buněčné migrace/invazivity jsme využili systém „transwell“ destiček v 16-jamkovém formátu (destičky CIM 16) upravených pro měření impedance přístrojem xCELLigence „Real-Time Cell Analyzer“ (RTCA). Buňky MDA-MB-231 a 4T1 (70% konfluence) byly kultivovány v podmínkách sérové deprivace 8 hod. Pro invazivní experimenty jsme membránu horní části destičky CIM 16 překryli vrstvou extraktu bazální membrány (Matrigel, BD Biosciences) nebo kolagenu I (Sigma). Matrigel jsme naředili 1:40 v médiu RPMI bez přídavku FCS, antibiotik a glutaminu a  $50 \mu\text{l}$  naředěného roztoku jsme přidali do horní části jamek „CIM-plate 16“, odebrali  $30 \mu\text{l}$  a horní část destičky se zbylými  $20 \mu\text{l}$  roztoku Matrigelu inkubovali 4 hod při  $37^\circ\text{C}$  a 5%  $\text{CO}_2$ . Kolagen I naředěný 1:8 v  $1 \times \text{PBS}$ , (pH 7) jsme přidali po  $50 \mu\text{l}$  do horní části jamek „CIM-plate 16“, odebrali  $30 \mu\text{l}$  a horní část destičky se zbylými  $20 \mu\text{l}$  roztoku kolagenu I inkubovali 1 hod při  $37^\circ\text{C}$  a 5%  $\text{CO}_2$ . Pro migrační experimenty jsme membrány ponechali bez vrstvy matrix.

Po přípravě filtrů jsme kompletovali horní a dolní část destičky „CIM-plate 16“. Do jamek dolní části jsme nakapali médium s chemoatraktantem/bez chemoatraktantu (10% FCS). V indikovaných případech jsme do média v dolní části jamky přidali inhibitor GM6001 (cílová koncentrace  $20 \mu\text{M}$ ), SP600125 ( $10 \mu\text{M}$ ) nebo metylester pepstatinu A ( $15 \mu\text{M}$ ). Kompletní „CIM-plate 16“ jsme inkubovali při  $37^\circ\text{C}$  a 5%  $\text{CO}_2$  1 hod před měřením „background“ signálu (médium bez buněk) v xCELLigence RTCA.

Buňky jsme naředili v médiu bez přídavku séra, koncentrace buněk byla  $7,5 \times 10^5/\text{ml}$ .  $100 \mu\text{l}$  buněčné suspenze ( $7,5 \times 10^4$  buněk/jamku) jsme aplikovali do horní části jamek. V indikovaných případech bylo médium doplněno inhibitory (GM6001, SP600125, metylester pepstatinu A) o požadované koncentraci. Relativní změna impedance (buněčný index) byla měřena po dobu několika hodin v intervalech 10 až 15 min. Po ukončení měření byla destička CIM rozložena a spodní část membrány obarvena sadou Diff-Quik krátkým ponořením horní části destičky do fixačního roztoku a barviv.

### 3.2.7.4 Analýza chemokinetické motility buněk („wound healing assay“) v reálném čase

Chemokinetickou motilitu buněk MDA-MB-231 MYBup jsme monitorovali v reálném čase při zacelování mechanického „poranění“ souvislé vrstvy buněk. Buňky jsme kultivovali na misce upravené pro videomikroskopické pozorování („glass bottom“), po dosažení 100% konfluence jsme špičkou (10-100  $\mu$ l) mechanicky odstranili část buněk za vzniku bezbuněčné rýhy o šířce 240 nm (šířku rýhy změřit v mikroskopu pomocí software LAS („Leica Application Suite“). Buňky jsme promyli 1 $\times$  PBS a na misku přidali médium RPMI s 0,5% FCS s/bez mitomycinu C. Misku jsme vložili do inkubační komory mikroskopu Leica TCS SP5 X (37  $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub>), zaostřili obraz a snímali v intervalech 10 minut po dobu 20 hodin při tomto nastavení: rozlišení 128 $\times$ 128 pixelů na automatické ostření, zoom 8, rozlišení 1024 $\times$ 1024 pixelů na snímání.

### 3.2.7.5 Transendoteliální migrace

Buňky HUVEC („Human Umbilical Vein Endothelial Cells“) (maximálně 9. pasáž) jsme kultivovali do dosažení 80% konfluence. Filtr v jamkách „CIM-plate 16“ jsme pokryli tenkou vrstvou fibronektinu (Sigma, F2006) o koncentraci 50  $\mu$ g/ml (naředěno v 1 $\times$ PBS). 50  $\mu$ l naředěného roztoku bylo naneseno do inzertu. Po 30 minutách inkubace při pokojové teplotě byl odstraněn přebytek roztoku. Buňky HUVEC byly sklizeny a naředěny v EBM kultivačním médiu (koncentrace 6 $\times$ 10<sup>5</sup>/ml) a 100  $\mu$ l buněčné suspenze bylo přeneseno do jamek „CIM-plate 16“. Současně bylo pro kontrolu konfluence nasazeno odpovídající množství buněk do jamky 96-jamkové destičky (přepočítáno na plochu vnitřní části jamky). Doplňit jamky kultivačním médiem EBM. Po 24-48 hod jsme ověřili konfluenci buněk HUVEC v jamkách 96-jamkové destičky (fixace a barvení buněk Diff-Quik sadou). K buňkám HUVEC v „CIM-plate 16“ přidat 50  $\mu$ l EBM média

Buňky MDA-MB-231 byly pro transendoteliální migrace připraveny jako při analýze kinetiky buněčné migrace/invazivity. Buňky byly po dosažení 70% konfluence kultivovány 8 hodin v podmínkách sérové deprivace. Postup kompletace „CIM-plate 16“ se shoduje s migračními a invazivními experimenty provedenými pomocí xCELLigence RTCA. Do dolní části jamek destičky jsme přidali médium s chemoatraktantem (10% FCS), spojili horní a dolní část „CIM-plate 16“ a po hodinové inkubaci při 37  $^{\circ}$ C jsme změřili bazální signál impedance. Nádorové buňky jsme naředili v médiu bez FCS (koncentrace buněk 7,5 $\times$ 10<sup>5</sup>/ml). Těsně před přidáním 100  $\mu$ l suspenze nádorových buněk do horní části jamek destičky CIM 16 jsme opatrně odstranili EBM médium, aby nebyla narušena souvislá vrstva buněk HUVEC. Do kontrolních jamek jsme nádorové buňky nepřidávali. Relativní změna impedance byla měřena po dobu několika hodin v intervalu 15 minut.

### 3.2.8 Analýza buněčné adheze pomocí xCELLigence „Real-Time Cell Analyzer“ (Roche)

Pro kontrolu míry buněčné adherence jsme využili E-destiček („E-plate 16“, Roche) umožňujících měření změn impedance vzniklých přisednutím buněk na dno kultivační jamky pokryté elektrodami. Nejdříve jsme změřili signál média bez přídavku buněk (100  $\mu$ l/jamku) v xCELLigence RTCA. Buňky MDA-MB-231 a 4T1 a jejich deriváty MYBup a vektor jsme nasadili v kompletním kultivačním médiu do jamek E-destičky v koncentraci 1 $\times$ 10<sup>4</sup> buněk/100  $\mu$ l/jamku. Buňky MIG4 a kontrolní buňky MDA-MB-231 (ctrl) byly nasazena v hustotě 5 $\times$ 10<sup>3</sup>/100  $\mu$ l/jamku, 1 $\times$ 10<sup>4</sup>/100  $\mu$ l/jamku a 2 $\times$ 10<sup>4</sup>/100  $\mu$ l/jamku. Celkový objem média v jedné jamce byl 200  $\mu$ l. Jednotlivé vzorky byly nasazeny nejméně v duplikátech.

Změna impedance byla odečítána alespoň 8 hod v intervalech 15 minut, změna buněčného indexu v čase byla analyzována pomocí softwaru RTCA (ACEA Biosciences).

### **3.2.9 Analýza metastatické aktivity nádorových buněk 4T1 *in vivo***

Sledovali jsme spontánní metastázování nádorů mléčné žlázy indukovaných ortotopickou implantací buněk 4T1 (varianty MYBup M-M5 a vektor). Buňky 4T1 byly naředěny v PBS (výsledná koncentrace  $5 \times 10^6$ /ml), 10  $\mu$ l buněčné suspenze přeneseno do zkumavky, přidán 1 objem Matrigelu. Samice myši kmene BALB/c (stáří 7 týdnů) byly podrobeny intraperitoneální anestezii (ketamin/xylazin) a po chirurgické expozici čtvrté (inguinální) mléčné žlázy bylo injikováno 20  $\mu$ l buněčné suspenze ( $1 \times 10^5$  buněk ve směsi Matrigel : PBS, 1 : 1). Myši byly sledovány po dobu jedno měsíce, růst nádoru monitorován pravidelně nejméně dvakrát týdně, odečítána délka a šířka tumoru pomocí posuvného měřítka. Jakmile průměrný průměr nádoru dosáhl 1,2 cm, byly myši usmrceny cervikální dislokací. Nádory byly odebrány, zváženy a uloženy v RNAlater pro izolaci RNA. Plíce byly odebrány a uloženy ve fixativu Bouin, játra a stehenní kosti byly fixovány 10% formalinem. Pod preparačním mikroskopem byl stanoven počet povrchových metastáz v plicích (na základě diferenciálního obarvení nádorového ložiska fixativem Bouin). Neoplastický původ plicních nodulů byl potvrzen histologickou analýzou: fixované tkáně byly zality do parafinu, připraveny řezy, nabarveny hematoxylin/eosinem a hodnoceny patoložkou prof. MUDr. Markétou Hermanovou, PhD. Analýza přítomnosti/rozsahu kostních a jaterních metastáz byla provedena analogickou histologickou analýzou: fixované tkáně zality do parafinu, připraveny řezy, nabarveny hematoxylin/eosinem a hodnoceny.

### **3.2.10 Přejídná transfekce siRNA**

Přejídného vypnutí genové exprese bylo docíleno transfekcí buněk MDA-MB-231MYBup specifickými siRNA (výčet v kapitole Materiál). Buňky (60% konfluence) byly před transfekcí kultivovány 3 hodiny v médiu OptiMEM. K transfekci siRNA jsme použili transfekční činidlo xtremeGENE siRNA (Roche) podle návodu výrobce. Cílová koncentrace siRNA byla 30 nM. Transfekční směs byla odstraněna po 3 hodinách působení, buňky byly dále kultivovány v kompletním médiu 72 hod a následně zpracovány jako při kinetické analýze buněčné migrace, jak je popsáno výše. Vypnutí exprese příslušných genů v těchto buňkách bylo testováno imunoblotingem v buněčných lyzátech rozdělených SDS-PAGE.

### **3.2.11 Analýza expresních profilů vybraných genů v prsních karcinomech z databází Oncomine a GEO (Gene Expression Omnibus)**

Databáze Oncomine (<https://www.oncomine.org>) a GEO (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) jsou veřejně přístupné depozitáře publikovaných dat cDNA microarrays. S využitím analyzačních nástrojů databází jsme zjistili normalizovanou expresi mRNA vybraných genů v souborech klinických vzorků prsních karcinomů ze studií Glück et al. (152 klinických vzorků; Glück et al., 2012), Kao et al. (327 vzorků; Kao et al., 2011), Minn et al. (82 vzorků, Minn et al., 2005) a Landemaine et al. (23 vzorků; Landemaine et al., 2008).

Klasifikace prsních karcinomů podle souboru genů PAM50, stejně jako molekulární typizace podle Kao et al. (Kao et al., 2011) byla provedena analyzačním nástrojem



v databázích Oncomine a GEO. Pro korelační analýzu jsme využili expresní data pro jednotlivé klinické vzorky extrahovaná z databáze GEO a statistickou analýzu významnosti korelace jsme provedli pomocí <http://www.quantitativeskills.com/sisa/dataprocs/rdata.htm>.

### **3.2.12 Statistická analýza**

Pokud není uvedeno jinak, jsou data vyjádřena jako průměrné hodnoty a směrodatné odchylky a statisticky vyhodnocena jsou Student *t*-testem. Expresní data získaná z databází Oncomine a GEO jsou zobrazena jako medián, maximum, minimum, percentil 75 a percentil 25 a statisticky zpracována Student *t*-testem.

## 4 VÝSLEDKY

### 4.1 Ektopická exprese genu *MYB* v buňkách MDA-MB-231 a 4T1

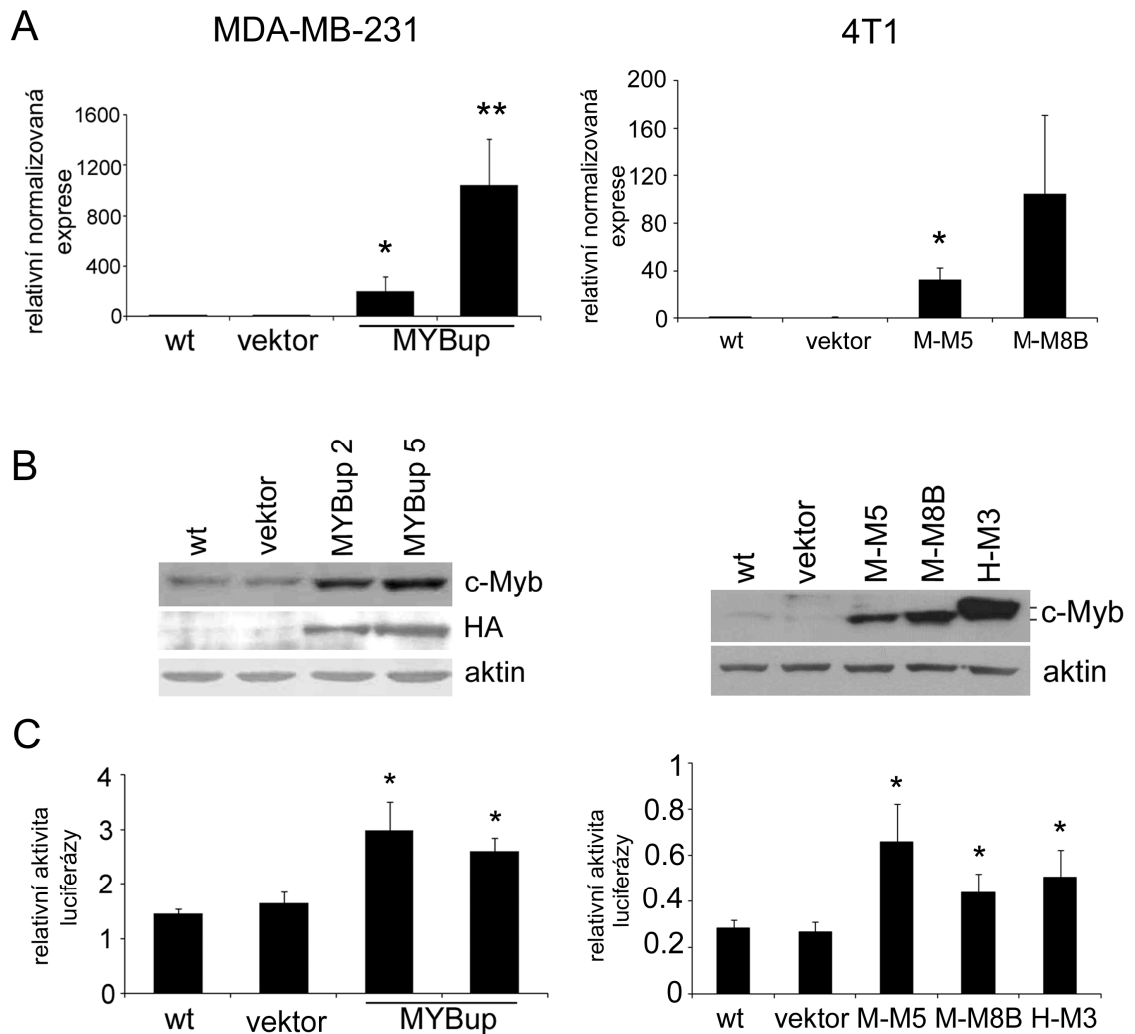
#### 4.1.1 Vytvoření stabilních linií MDA-MB-231MYBup a 4T1MYBup

Jako modelový systém pro stanovení funkce proteinu c-Myb v řízení invazivity a metastázování prsních karcinomů byla v této práci použita buněčná linie MDA-MB-231 odvozená z pleurální efúze lidského adenokarcinomu prsu a linie 4T1 získaná z nádoru mléčné žlázy myši kmene BALB/cfC3H. Obě uvedené linie, lidská i myší, jsou rozsáhle využívány ke studiu invazivity nádorových buněk a metastázování prsních nádorů. Žádná z těchto linií neexprimuje estrogenový receptor  $\alpha$ , progesteronový receptor a HER2 a zastupují tak tzv. trojitě-negativní prsní nádory vyznačující se vysokou agresivitou a špatnou prognózou (Kaur et al., 2012). Současně vykazují nízkou hladinu endogenního proteinu c-Myb, použijeme-li ke srovnání jiné hojně studované linie prsních karcinomů zastoupené jak ER-pozitivními liniemi MCF7 a T47D, tak ER-negativními buňkami MDA-MB-468. Buněčné linie MDA-MB-231 a 4T1 reprezentují jak lidskou, tak myší biologii mamárních nádorů a umožňují sledovat důsledky ektopické exprese proteinu c-Myb ve dvou různých buněčných kontextech. Do buněk MDA-MB-231 byl lipofekcí vpraven konstrukt pcDNA3-hMYB-HA, nesoucí sekvenci cDNA kódující lidský protein c-Myb značený na N-konci třemi kopiemi hemaglutininového afinitního epitopu (HA-tag). Konstitutivní expresi genu *MYB* a selekčního markeru, umožňujícího růst stabilních transfektantů MDA-MB-231MYBup v přítomnosti selekčního antibiotika G418, zajišťuje cytomegalovirový (CMV) promotor (pro *MYB*) a promotor SV40 (pro selekční marker). Buňky 4T1 byly analogicky transfekovány plazmidem pcDNA3-mMYB, který nese cDNA myšího genu *Myb* (4T1M), a také výše popsáním pcDNA3-hMYB-HA (4T1H). Pro oba buněčné systémy byly současně s variantami MYBup vytvořeny kontrolní G418-rezistentní buněčné linie stabilně transfekované „prázdným“ vektorem pcDNA3.1(+) (dále označované MDA-MB-231vektor a 4T1vektor). Populaci G418-rezistentních buněk jsme klonovali a získali tak několik nezávislých klonů MYBup. Pro další experimenty byly na základě detekce exprese genu *MYB* na úrovni mRNA a proteinů vybrány dva klony MDA-MB-231 (MYBup 2 a 5) a tři klony 4T1 (M-M5 a M-M8B s myším exogenním proteinem c-Myb a H-M3, který exprimuje lidský c-Myb) (Obr. 5). Funkčnost exogenního proteinu c-Myb byla testována transaktivačními testy založenými na přechodné transfekci získaných klonů MYBup a odpovídajících kontrol reportérovým konstruktem p6MBSluc, obsahujícím gen *luc* pod kontrolou Myb-specifického promotoru. V klonech MYBup jsme zaznamenali zvýšenou luciferázovou aktivitu. Z toho lze vyvodit, že exogenní c-Myb je schopen vykonávat svou transkripčně aktivační funkci v transfekovaných buňkách MDA-MB-231 a 4T1 (Obr. 5).

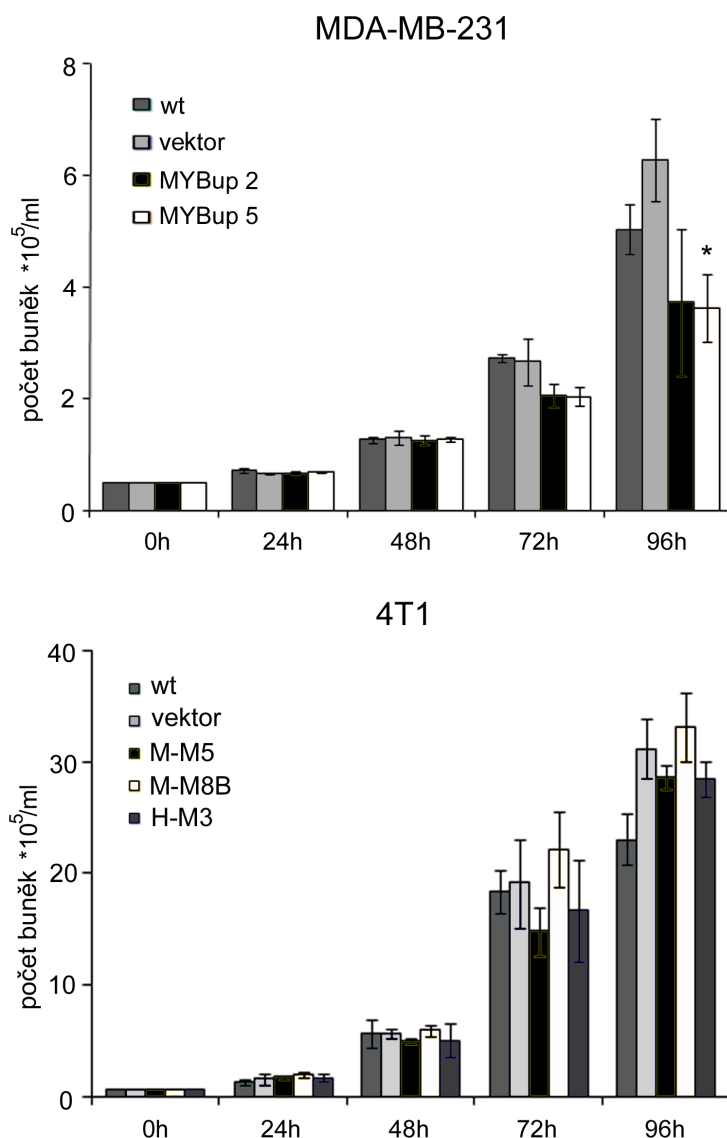
#### 4.1.2 Protein c-Myb neovlivňuje proliferaci buněk MDA-MB-231 a 4T1 *in vitro*

Pro první charakterizaci nově vytvořených variant buněk MDA-MB-231 a 4T1 produkujících funkční exogenní transkripční faktor c-Myb z hlediska tumorigenního potenciálu jsme testovali růstové vlastnosti buněk MYBup *in vitro*. Všechny varianty buněk MDA-MB-231 byly nasazeny ve výchozí koncentraci  $5 \times 10^4$ /ml do kultivačních misek, buňky 4T1 (varianty MYBup, vektor a wt) v koncentraci  $7,5 \times 10^4$ /ml a následujících 96 hod v intervalu 24 hod byly živé buňky počítány pomocí CASY Cell Counter, jak je uvedeno v kapitole Metody. Z růstových křivek (Obr. 6) je zřejmý mírný pokles proliferační aktivity

buněk MDA-MB-231MYBup po 72 a 96 hod růstu, nikoli během prvních dvou dnů kultivace. Statisticky významný je však pouze rozdíl v koncentraci buněk klonu MDA-MB-231MYBup 5 po 96 hodinách kultivace ve srovnání s kontrolními G418-rezistentními buňkami (vektor). MYBup varianty buněk 4T1 se v rychlosti růstu *in vitro* neliší od buněk kontrolních. Exogenní protein c-Myb tedy významně nemění proliferační aktivitu buněk MDA-MB-231 a 4T1 při kultivaci *in vitro*.



Obr. 5. Varianty buněk MDA-MB-231 a 4T1 ektopicky exprimující *MYB/Myb*. V G418-rezistentních klonech buněk MDA-MB-231 a 4T1 transfekovaných vektorem kódujícím lidský (MYBup, H-M3) nebo myší protein c-Myb (M-M5, M-M8B), v G418-rezistentních buňkách kontrolních transfekovaných prázdným vektorem (vektor) a v parentálních buňkách netransfekovaných (wt) byla pomocí qRT-PCR detekovaná hladina *MYB/Myb* mRNA (A) a westernovým přenosem hladina proteinu c-Myb, resp. přítomnost HA-tag epitopu v buňkách MDA-MB-231MYBup (B). (C) Transaktivace testy byly provedeny s reportérovým plazmidem p6MBSluc. Relativní aktivita luciferázy každého vzorku je normalizována podle aktivity  $\beta$ -galaktosidázy, která koresponduje s účinností transfekce. Statisticky významný rozdíl v expresi *MYB/Myb* mRNA a v relativní luciferázové aktivitě mezi klony stabilně transfekovanými *MYB/Myb* cDNA a buňkami kontrolními (vektor) je označen \* ( $p < 0,05$ ) a \*\* ( $p < 0,01$ ).



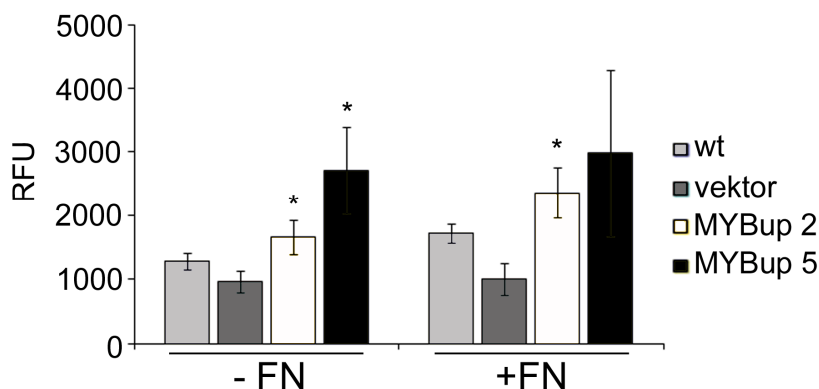
Obr. 6. Proliferace buněk MDA-MB-231MYBup a 4T1MYBup *in vitro*. Proliferační aktivita buněk MDA-MB-231 (varianty wt, vektor a MYBup) a 4T1 (varianty wt, vektor a M-M5, M-M8B, H-M3) vyjádřená jako počet živých buněk/ml v závislosti na čase (délce kultivace). Buňky byly počítány pomocí CASY Cell Counter. Statisticky významný ( $p < 0,05$ ) pokles počtu buněk/ml mezi variantou MDA-MB-231MYBup 5 a kontrolou (vektor) je označen \*.

### 4.1.3 Protein c-Myb reguluje migraci/invazivitu buněk MDA-MB-231 a 4T1 *in vitro*

#### 4.1.3.1 Exogenní protein c-Myb zvyšuje chemotaktickou migrační aktivitu buněk MDA-MB-231 a 4T1 *in vitro*

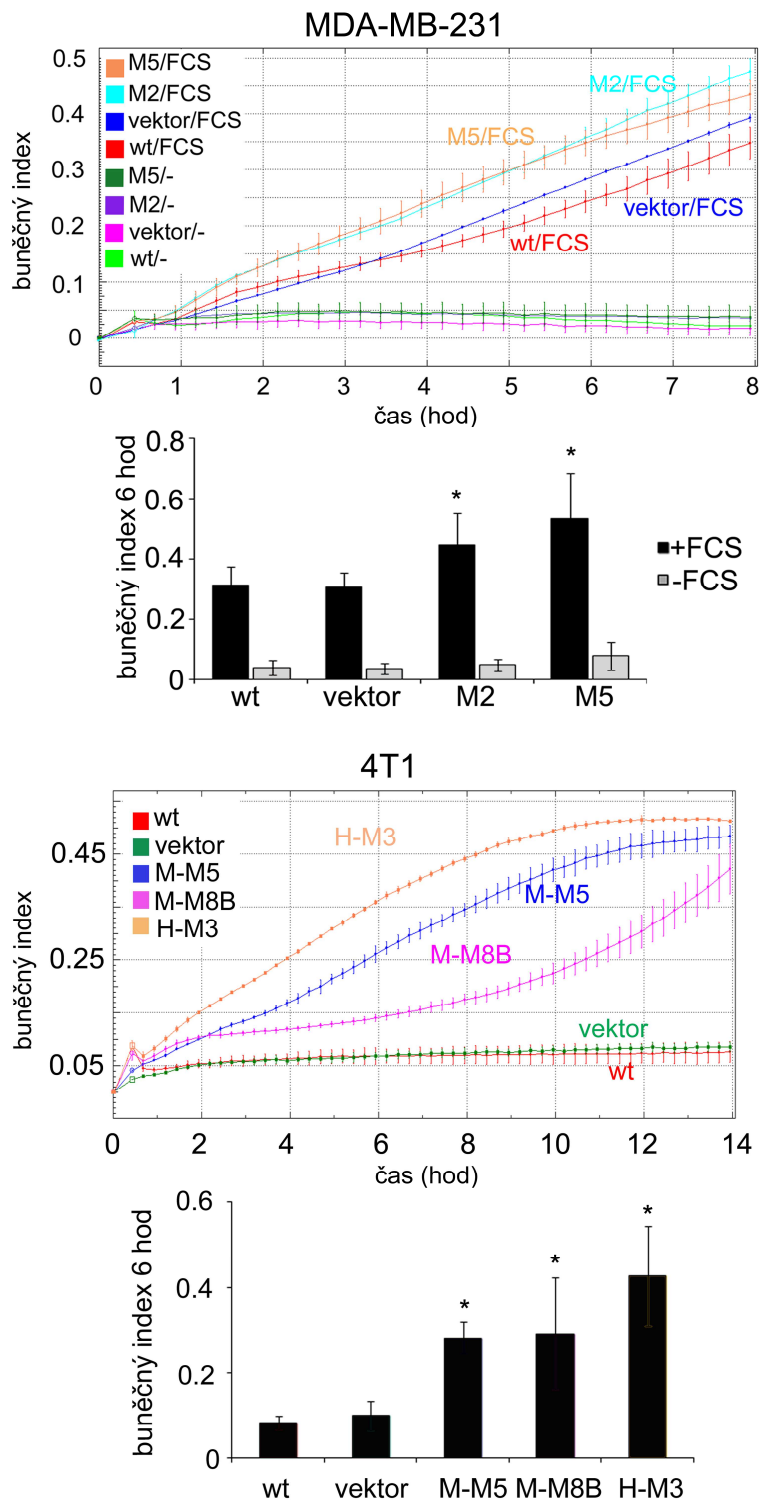
Buněčnou migraci jsme nejdříve sledovali *in vitro* testem, který spočívá ve směrovaném průchodu buněk z jedné části jamky přes porézní membránu z polyethylentereftalátu (PET) do druhé části jamky s chemoatraktantem. Buňky MDA-MB-231 všech variant po osmihodinové kultivaci v růstovém médiu bez přídavku séra (FCS) byly nasazeny v koncentraci  $5 \times 10^4 / 50 \mu\text{l}$  do inzertu 96-jamkové destičky typu „transwell“ také v médiu bez FCS, do spodní jamky bylo přidáno růstové médium s 10% FCS, sloužícím jako

chemoatraktant. Membrána inzertu byla ponechána bez ošetření, nebo pokryta tenkou vrstvou fibronektinu (20  $\mu\text{g/ml}$ ) pro zvýšení buněčné adheze. Po 16 hodinách inkubace byly migrující buňky (tj. takové, které prostoupily přes membránu) obarveny kalceinem AM, jak je popsáno v kapitole Metody. Relativní kvantifikace buněčné migrace fluorimetrickým měřením ukázala navýšení četnosti migračně aktivních buněk v derivátech linie MDA-MB-231 exprimujících exogenní c-Myb (MYBup) ve srovnání s kontrolními liniemi (Obr. 7). Ošetření membrány adhezivním glykoproteinem fibronektinem neovlivňuje významně buněčnou migraci, což naznačuje dostatečnou schopnost buněk MDA-MB-231 adherovat k povrchu PET membrány bez nutnosti modifikace jejího povrchu.



Obr. 7. Exogenní c-Myb stimuluje směrovanou migraci buněk MDA-MB-231. Migrace buněk linie MDA-MB-231 (wt) a jejích variant (MYBup a vektor) byla testována pomocí kitu „Cultrex Cell Invasion Assay“ (Trevigen). Membrána byla pokryta tenkou vrstvou fibronektinu (20  $\mu\text{g/ml}$ ) (+FN) nebo nijak neupravena (-FN). Buňky chemotakticky migrující membránou do jamky obsahující médium s 10% FCS byly obarveny kalceinem AM. Buněčná migrace byla kvantifikována na základě měření emitované fluorescence pomocí analyzátoru Synergy HT. Graf zobrazuje průměrné hodnoty fluorescence (RFU) naměřené ve třech nezávislých experimentech. Statisticky významný rozdíl ( $p < 0,05$ ) v míře fluorescence emitované buňkami MYBup a vektor je označen \*.

Pro získání dat, která by vypovídala o kinetice migrace buněk MDA-MB-231MYBup a 4T1MYBup, jsme použili systém xCELLigence RTCA („Real-Time Cell Analyser“) DP v kombinaci s CIM („Cell Invasion and Migration“) destičkami. Tento systém umožňuje nepřetržitě monitorovat postup migrujících buněk z horní části jamky přes porézní PET membránu směrem do spodní části obsahující chemoatraktant v reálném čase. Přítomnost migrujících buněk je zaznamenána mikroelektrodami na spodní straně membrány jako změna impedance a převedena na bezrozměrnou veličinu zvanou buněčný index. Narůst buněčného indexu v čase odráží zvýšení počtu buněk, které jsou v kontaktu s elektrodami, ať už postupnou migrací z horní části jamky nebo následným dělením buněk, které póry membrány prostoupily. Pro omezení důsledků buněčné proliferace na změnu buněčného indexu jsme pro interpretaci dat a srovnání míry migrace nádorových buněk používali hodnoty buněčného indexu z časných fází měření, konkrétně jsme pro statistickou analýzu používali hodnoty naměřené 6 hod od začátku měření, tedy od okamžiku nasazení buněk do horní části jamek. Zjistili jsme, že oba klony MDA-MB-231MYBup dosahují po šesti hodinách opakovaně vyšších hodnot buněčného indexu (1,5 a 1,7krát) než buňky kontrolní (Obr. 8), což ukazuje na zvýšenou migrační schopnost těchto buněk a koresponduje s výše popsány výsledky nekinetických migračních testů. Podobných výsledků jsme dosáhli při srovnání buněčných



Obr. 8. Kinetika c-Myb-indukované migrace buněk MDA-MB-231 a 4T1. Buněčná migrace byla monitorována v reálném čase pomocí přístroje xCELLigence RTCA. Buňky MDA-MB-231 (wt, vektor a MYBup varianty M2 a M5) a buňky 4T1 (wt, vektor a MYBup varianty M-M5, M-M8B a H-M3) byly nasazeny v médiu bez přídavku séra v hustotě  $7,5 \times 10^4$  do jamky destičky CIM 16. Do spodní části jamek bylo přidáno médium s 10% FCS (+FCS), do kontrolních jamek pak médium bez chemoatraktantu (-FCS). Grafy v horní části panelů představují reprezentativní výstup jednoho měření, grafy v dolní části panelů pak průměrné hodnoty buněčného indexu v čase 6 hodin z nejméně čtyř nezávislých experimentů. Statisticky významný rozdíl ( $p < 0,05$ ) v hodnotách buněčného indexu v čase 6 hodin mezi buňkami MYBup a buňkami kontrolními (vektor) je vyznačen \*.

indexů naměřených v čase 4 hod a 8 hod (data nejsou prezentována). Z grafů ukazujících změnu buněčného indexu v čase reprezentujících výstup jednoho měření (maximálně šestnácti vzorků) je patrné, že rozdíl v migrační aktivitě buněk MYBup a buněk kontrolních se projevil už během prvních 120 minut měření (Obr. 8). Z důvodu rychlého nástupu c-Myb-indukované migrace a také pro srovnatelnou rychlost růstu buněk MYBup a buněk kontrolních je příspěvek proliferace k nárůstu buněčného indexu buněk MYBup málo pravděpodobný.

Abychom zjistili, zda se nejedná o buněčně specifický účinek proteinu c-Myb, případně o účinek výlučně lidského protoonkogenu *MYB*, provedli jsme analogické pokusy s MYBup variantami buněčné linie 4T1. Obr. 8 znázorňuje výsledek sady experimentů dokládající, že exogenní protein c-Myb lidského i myšího původu podporuje migraci buněk 4T1. Kinetická analýza ukázala, že rozdíl v hodnotě buněčného indexu mezi buňkami MYBup a buňkami kontrolními je možno zaznamenat už během druhé hodiny měření, dále se zvětšuje a trvá až do 12 až 14 hod od začátku měření, kdy buněčný index dosahuje svého maxima, a buňky na spodní straně membrány pokrývají veškerou plochu detekčních elektrod. To bylo ověřeno spolu s těsností horní a spodní části destičky (resp. nepřítomností vzduchových bublin v místě kontaktu obou částí) obarvením buněk na spodní straně membrány po ukončení měření sadou Diff-Quik.

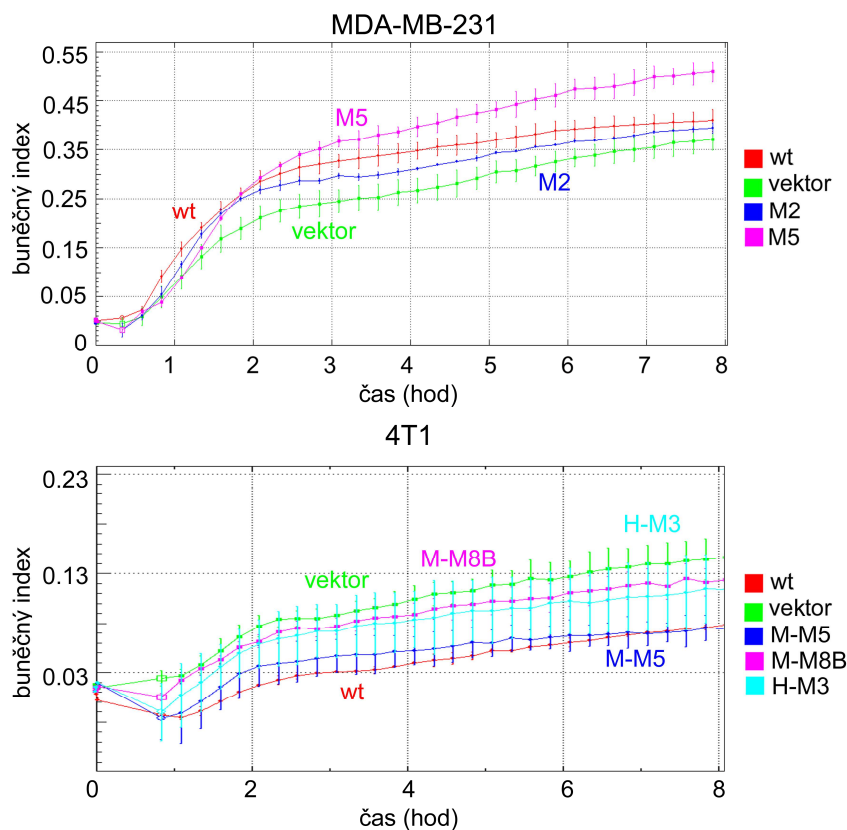
K nárůstu buněčného indexu může kromě buněčné migrace a proliferace přispívat také zvýšená přilnavost buněk k povrchu detektorů. Abychom zjistili, zda za rozdíl v hodnotách buněčného indexu mezi buňkami kontrolními a MYBup nezodpovídá pevnější adheze buněk s ektopickou expresí *MYB/Myb* k mikroelektrodám tohoto analyzačního systému, testovali jsme nárůst buněčného indexu během prvních hodin po nasazení buněk do tzv. „E-plate“, kterou tvoří 16 kultivačních jamek se stejnými detekčními mikroelektrodami jako v případě destiček CIM, tentokrát však umístěnými na dně jamky. Všechny varianty buněk MDA-MB-231 a 4T1 byly nasazeny v hustotě  $1 \times 10^4$ /jamku/200  $\mu$ l a buněčný index byl odečítán po dobu nejméně 10 hod v intervalu 15 min. Výstupy měření ukazující změnu buněčného indexu v čase, jak byla vyhodnocena softwarem RTCA (ACEA Biosciences), dokládají, že buňky MYBup (MDA-MB-231 a 4T1) se mírou adherence (vyjádřenou růstem buněčného indexu během prvních hodin měření) výrazně neliší od odpovídajících buněk kontrolních (Obr. 9). Zvýšení buněčného indexu, který jsme pozorovali při kinetické analýze chování buněk MYBup v jamkách destičky CIM 16, je tedy velmi pravděpodobně důsledkem vyšší migrační aktivity těchto buněk.

#### **4.1.3.2 c-Myb aktivuje buňky MDA-MB-231 a 4T1 k penetraci Matrigelu *in vitro***

Ačkoli zvýšená migrace nádorových buněk *in vitro* může naznačovat agresivnější chování nádoru *in vivo*, pro důkladnou charakterizaci invazivního chování nádorových buněk se migrační testy *in vitro* modifikují a doplňují o fázi penetrace substrátu simulujícího prostředí extracelulární matrix. Jako *in vitro* náhražka bazální membrány se běžně používá Matrigel (uváděn také pod označením extrakt bazální membrány), což je rozpustná proteinová směs izolovaná z Engelbreth-Holm-Swarmova (EHS) myšího sarkomu, jejíž hlavní složky tvoří laminin, kolagen IV, entaktin a proteoglykan heparin sulfát. V testech invazivity *in vitro* se využívá stejného kultivačního systému jako v testech směrované migrace, tedy inzertu odděleného porézní membránou od zásobárny média s chemoatraktantem, v tomto případě doplněném o bariéru buněčného pohybu tvořenou vrstvou proteinové hmoty gelové konzistence (Matrigel) překrývající membránu. Podobně jako při zkoumání migrační aktivity buněk MDA-MB-231MYBup jsme nejdříve použili 96-jamkový „transwell“ formát a fluorescenční detekci invazivních buněk po šestnáctihodinové inkubaci a obarvení kalceinem AM. Kvantifikace relativní buněčné invazivity ukázala, že zatímco fluorescence buněk kontrolních vystavených chemotaktickému působení 10% FCS nijak výrazně nepřesahuje



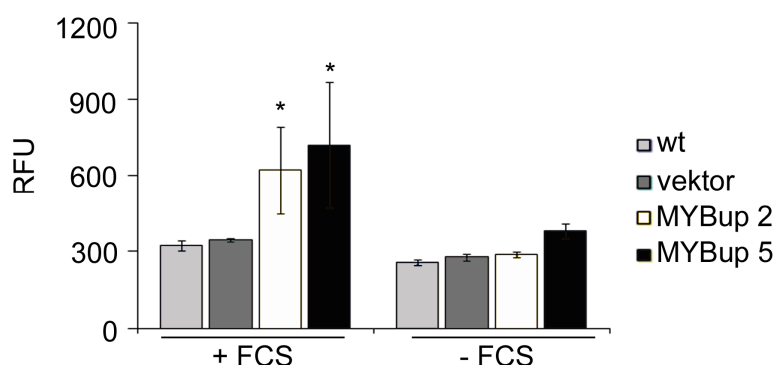
bazální míru fluorescence buněk nestimulovaných k invazi žádným chemoatraktantem (-FCS), přítomnost chemoatraktantu až dvojnásobně navýší fluorescenci, tedy četnost živých buněk MYBup, přítomných na spodní straně membrány inzertu (Obr. 10). Z toho plyne, že buňky MDA-MB-231MYBup pronikají bariérou mimobuněčné hmoty bazální membrány účinněji než buňky kontrolní.



Obr. 9. Analýza kinetiky adheze buněk MDA-MB-231MYBup a 4T1MYBup. Varianty buněk MDA-MB-231 (wt, vektor, MYBup klon M2 a M5) a 4T1 (wt, vektor, MYBup klony M-M5, M-M8B, H-M3) byly v hustotě  $1 \times 10^4/200 \mu\text{l}$  nasazeny do jamek „E-plate“ a analyzovány v xCELLigence RTCA DP v intervalu 15 min po dobu 8 hod. Měření probíhalo nejméně v duplikátech, barevné linie reprezentují průměrné hodnoty, chybové úsečky znázorňují směrodatné odchylky, jak byly vyhodnoceny pomocí softwaru RTCA (ACEA Biosciences).

Kinetická analýza invazivity buněk MDA-MB-231 je opět kombinací výše popsaného přístupu k testování buněčné migrace v reálném čase pomocí xCELLigence RTCA a použití překážky pro přímý chemotaktický pohyb buněk v podobě vrstvy Matrigelu. Buňky byly připraveny a nasazeny stejným způsobem jako v testech migrace, jen membrány inzertů byly před přidáním buněk převrstveny roztokem Matrigelu, který po 4 hodinách inkubace při  $37^\circ\text{C}$  vytvoří gelovou strukturu simulující bazální membránu. Ve srovnání s migrací je průchod buněk membránou pokrytou vrstvou Matrigelu zpomalen. K nárůstu buněčného indexu v jamkách obsahujících chemoatraktant ve srovnání s kontrolními jamkami dochází později než v případě migrace, kdy buňky nejsou vystaveny nutnosti penetrovat vrstvu Matrigelu (Obr. 11). Matrigel tedy plní funkci bariéry buněčného pohybu vyžadující proteolytickou degradaci. Pro statistickou analýzu buněčné invazivity variant MYBup a kontrolních buněk byly použity hodnoty buněčného indexu odečtené 12 hod po přidání buněk a začátku měření. Výsledky potvrzují více než dvojnásobně zvýšenou invazivitu (resp. účinnost penetrace

vrstvy Matrigelu) buněk MDA-MB-231MYBup ve srovnání s kontrolními liniemi (Obr. 11). Podobných výsledků bylo dosaženo při statistické analýze hodnot buněčných indexů buněk MYBup a kontrolních linií naměřených v čase 10 a 16 hod (data nejsou prezentována).

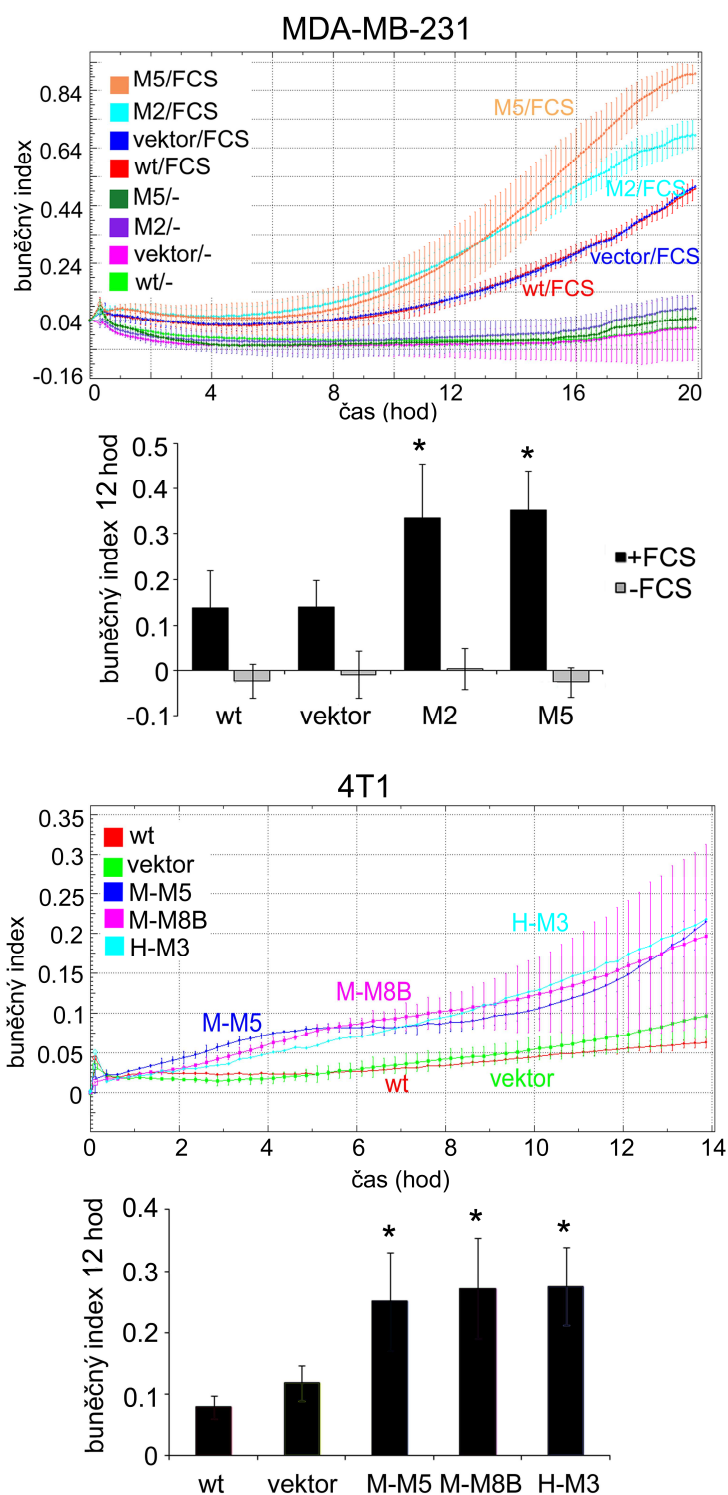


Obr. 10. Ektopická exprese genu *MYB* zvyšuje invazivní potenciál buněk MDA-MB-231 modelovaný penetrací extraktu bazální membrány. Invazivita buněk linie MDA-MB-231 (wt) a jejích variant (MYBup a vektor) byla testována kitem „Cultrex Cell Invasion Assay“ (Trevigen). Membrána byla převrstvena extraktem bazální membrány. Buňky procházející membránou byly obarveny kalceinem AM. Kontrolní jamky neobsahují chemoatraktant (-FCS). Buněčná invazivita byla kvantifikována na základě měření emitované fluorescence analyzátozem Synergy HT. Graf zobrazuje průměrné hodnoty fluorescence (RFU) naměřené ve třech nezávislých experimentech. Statisticky významný rozdíl ( $p < 0,05$ ) v míře fluorescence emitované buňkami MYBup a vektor je označen \*.

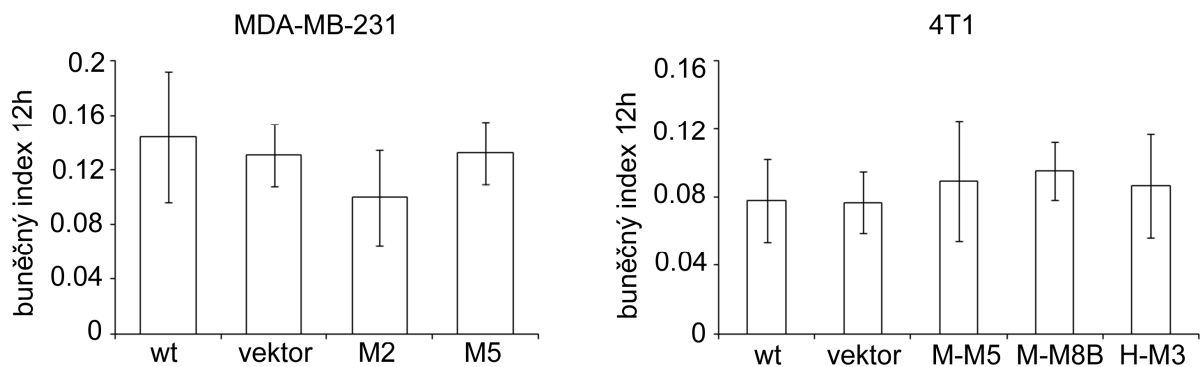
Invazivita buněk 4T1MYBup v substrátu složením podobném bazální membráně byla hodnocena analogicky, tedy monitorováním průchodu buněk membránou pokrytou vrstvou Matrigelu. Všechny tři klony linie 4T1 produkující exogenní c-Myb dosahují statisticky významně vyšších hodnot buněčného indexu naměřeného v čase 12 hod než buňky kontrolní (Obr. 11), což naznačuje schopnost proteinu c-Myb aktivovat také buňky 4T1 k invazi/penetraci Matrigelu *in vitro*.

#### 4.1.3.3 c-Myb nepodporuje penetraci matrix tvořené kolagenem I buňkami MDA-MB-231 a 4T1 *in vitro*

Pro *in vitro* simulaci invazivního chování nádorových buněk uvnitř intersticiální matrix se jako proteinová bariéra místo Matrigelu používá kolagen I, jako nejvíce abundantní protein stromální mimobuněčné hmoty. Abychom charakterizovali buňky MYBup i z hlediska schopnosti invadovat stromální substrát tvořený kolagenem I, provedli jsme kinetickou analýzu buněčné invazivity analogicky jako v případě penetrace Matrigelu, modifikován byl pouze postup pokrývání membrány proteinovou matrix: kolagen I naředěný v 1×PBS byl po úpravě pH nanesen na membránu a následně inkubován 1 hod při 37 °C. Vlastní příprava a nasazení buněk, stejně jako průběh a analýza měření se neliší od výše uvedeného postupu. Výsledky těchto pokusů ukazují, že buňky MDA-MB-231MYBup i 4T1MYBup se v účinnosti/rychlosti penetrace kolagenu I neliší od odpovídajících kontrolních buněk (Obr. 12). c-Myb tedy nestimuluje buňky MDA-MB-231 ani 4T1 ke zvýšené penetraci extracelulární hmoty tvořené kolagenem I, což spolu s výše popsány výsledky poukazuje k možné substrátově-specifické regulaci c-Myb-dependentní invazivity prsních nádorových buněk.



Obr. 11. Kinetika invaze/penetrace Matrigelu buňkami MDA-MB-231MYBup a 4T1MYBup. Invazivita v matrix tvořené Matrigelem byla monitorována v reálném čase přístrojem xCELLigence RTCA. Membrány v jamkách horní destičky byly pokryty vrstvou Matrigelu, jak je popsáno v kapitole Metody. Buňky byly nasazeny v médiu bez přídavku séra v hustotě  $7,5 \times 10^4$  na jamku do destiček CIM 16. Do spodní části jamek bylo přidáno médium s 10% FCS (+FCS), do kontrolních jamek pak médium bez chemoatraktantu (-FCS). Grafy v horní části panelů představují reprezentativní výstup jednoho měření, grafy v dolní části panelů pak průměrné hodnoty buněčného indexu v čase 12 hodin z nejméně čtyř nezávislých experimentů. Statisticky významný rozdíl ( $p < 0,05$ ) v hodnotách buněčného indexu v čase 12 hodin mezi buňkami MYBup a buňkami kontrolními (vektor) je vyznačen \*.

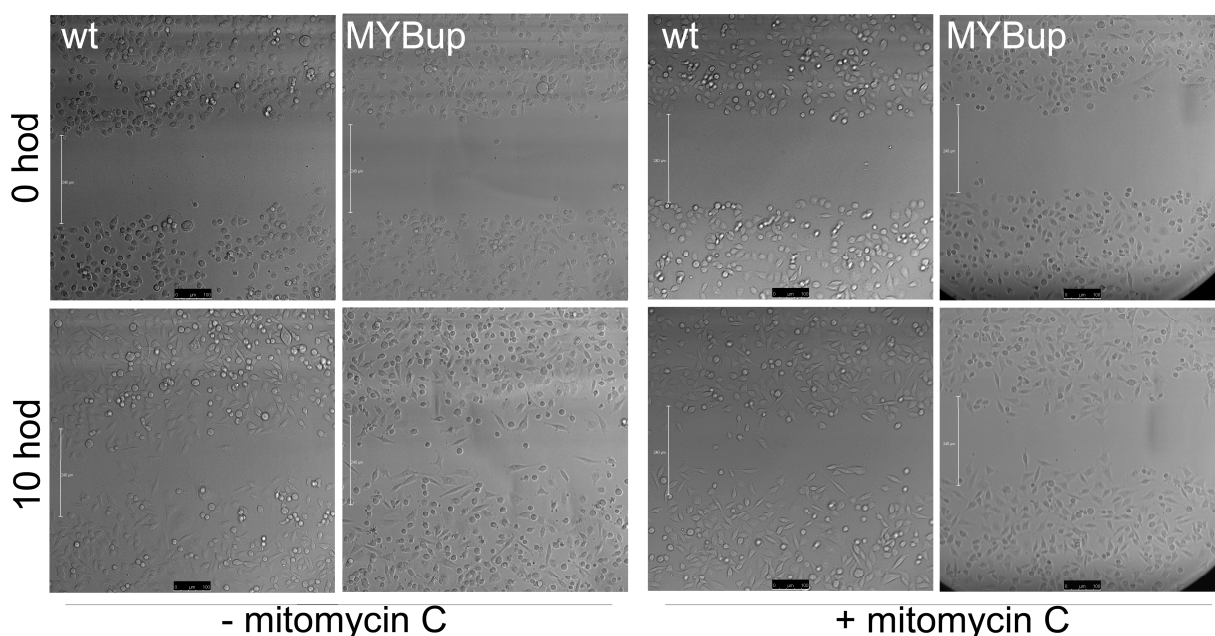


Obr. 12. Buňky MDA-MB-231MYBup a 4T1MYBup nepenetrují kolagen I účinněji než buňky kontrolní. Invazivita v prostředí mimobuněčné matrix tvořené kolagenem I byla monitorována v reálném čase pomocí přístroje xCELLigence RTCA. Membrány v jamkách horní destičky byly pokryty vrstvou kolagenu I, jak je popsáno v kapitole Metody. Buňky MDA-MB-231 (wt, vektor a MYBup varianty M2 a M5) a buňky 4T1 (wt, vektor a MYBup varianty M-M5, M-M8B a H-M3) byly nasazeny v médiu bez přídavku séra v hustotě  $7,5 \times 10^4$  na jamku do destiček CIM 16. Jako chemoatraktant bylo použito 10% FCS. Hodnoty buněčného indexu byly snímány po dobu nejméně 16 hodin v intervalu 15 minut. Grafy ukazují průměrné hodnoty buněčného indexu v čase 12 hodin z nejméně tří nezávislých experimentů. Chybové úsečky znázorňují směrodatné odchylky.

#### 4.1.3.4 c-Myb nezvyšuje chemokinetickou motilitu aktivitu buněk MDA-MB-231 *in vitro*

Kromě transmigračních experimentů se buněčná motilita hodnotí tzv. „scratch“ nebo „wound-healing“ testem. Tento test buněčné motility je založen na detekci náhodného pohybu buněk po povrchu kultivačního plastiku/skla do míst „poranění“ („scratch“), kterým se rozumí narušení vrstvy adherentních buněk a vytvoření bezbuněčných zón (definované velikosti) v jinak konfluentní populaci přisedlých buněk. Směr pohybu není tedy na rozdíl od transmigračních experimentů určován koncentračním gradientem chemoatraktantu, nejedná se o chemotaktický pohyb, ale o chemokinetickou motilitu, kterou je možno kvantifikovat pomocí času nezbytného pro obnovení konfluency. Tento čas lze stanovit buď pravidelnou kontrolou růstu buněk v určitých časových intervalech, případně měřením šířky/plochy poranění po určité konstantní délce inkubace, nebo kontinuálním snímáním jednoho „bezbuněčného“ místa kultivační misky uložené v inkubační komůrce spojené s mikroskopem a zobrazovacím zařízením. My jsme použili časosběrnou videomikroskopii k určení času nezbytného pro zacelení poranění i pro vizuální kontrolu lokomoce jednotlivých buněk. Buňky byly po dosažení téměř 100% konfluency v několika místech mechanicky odstraněny pomocí 100  $\mu$ l špičky za vzniku bezbuněčných rýh, následně promyty a inkubovány v médiu s přídavkem 0,5% FCS. Pomocí mikroskopu a softwarové analýzy vzdálenosti byla vybrána rýha o šířce 240  $\mu$ m. Zvolené místo bylo snímáno po dobu 20 hodin každých 10 minut. Následná analýza získaných snímků ukázala, že doba nutná pro zacelení rýhy je stejná pro buňky MDA-MB-231MYBup a pro buňky kontrolní, přibližně 16 hod. Přestože bylo použito médium se sníženým obsahem séra, ze záznamů je zřejmé, že dochází k buněčnému dělení. Pro eliminaci vlivu buněčné proliferace na rychlost zacelení „poranění“ jsme stejným postupem zaznamenávali motilitu buněk v přítomnosti mitomycinu C. Z posloupnosti snímků bylo patrné, že k dělení buněk nedochází, nicméně je potřeba delšího času (více než 20 hod) k úplnému zacelení poranění. Buňky MYBup se ani za těchto podmínek v rychlosti obnovení konfluency od buněk kontrolních neliší, jak je ukázáno na obr. 1 v čase 10 hod od začátku

snímání (Obr. 13). Můžeme uzavřít, že protein c-Myb nestimuluje konfluentní buňky MDA-MB-231 k chemokinetickému pohybu v místě poranění.



Obr. 13. Chemokinetická motilita buněk MDA-MB-231MYBup stanovená videomikroskopickou detekcí zacelování bezbuněčného místa vytvořeného v konfluentní populaci buněk. Vrstva konfluentních buněk byla narušena pomocí 100  $\mu$ l špičky za vzniku rýhy o šířce 240 nm, jak bylo určeno softwarem LAS („Leica Application Suite“). Buňky kultivované v přítomnosti mitomycinu C nebo bez něj v komoře spojené s mikroskopem mikroskopu Leica TCS SP5 X byly snímány v intervalu 10 minut. Vybrané snímky ukazují bezbuněčné místo ve vrstvě buněk kontrolních (wt) nebo MYBup krátce po jeho vytvoření (0 hod) a po 10 hodinách.

## 4.2 Expresní profil buněk MDA-MB-231MYBup: geny regulující invazivitu/metastázování nádorů

### 4.2.1 Expresní panelu genů zapojených do metastázování nádorů v buňkách MDA-MB-231MYBup

Abychom objasnili molekulární mechanismus, kterým protein c-Myb ovlivňuje migraci/invazivitu/metastázování buněk prsních karcinomů, zvolili jsme nejdříve technologii PCR array pro současnou analýzu exprese panelu 84 genů relevantních pro metastázování („RT<sup>2</sup> Profiler PCR Array Human Tumor Metastasis“, SABiosciences). Výsledky popsané v Tabulce 1 ukazují významnou změnu (více než 1,5krát;  $p < 0,5$ ) v hladině mRNA šesti genů v buňkách MYBup ve srovnání s kontrolními variantami linie MDA-MB-231. Všechny uvedené geny jsou v buňkách MYBup exprimovány ve vyšší míře než v kontrolách, nejvýrazněji se zdá být deregulovaná exprese *CDH11* (kadherin 11, OB-kadherin) mRNA, jejíž hladina je v buňkách MYBup pětinasobná v porovnání s kontrolami. Dalšími geny s přibližně dvojnásobným nárůstem hladiny mRNA v buňkách MYBup jsou *MCAM* a *ITGB3*, geny kódující povrchové proteiny CD146 („melanoma cell adhesion molecule“) a CD61



(integrin  $\beta 3$ ). Téměř dvakrát více než buňky kontrolní obsahují buňky MYBup mRNA genu *MMP9*, který kóduje matrix metaloproteinázu 9 (92kDa kolagenáza typu IV). Dalšími geny s mírně zvýšenou expresí v buňkách produkujících exogenní c-Myb jsou *HTATIP2* (kódující oxidoreduktázu TIP30) a *IL18* (kódující interleukin 18) (Tabulka 1).

Tabulka 1. Geny zahrnuté v PCR array „Human Tumor Metastasis“ s deregulovanou expresí v buňkách MDA-MB-231MYBup.

gen	GenBank	popis genu	exprese (násobek) MYBup/kontrola	p
CDH11	NM_001797	Kadherin 11, OB-kadherin (osteoblast)	5,03	0,02409
MCAM	NM_006500	"Melanoma cell adhesion molecule" (adhezivní protein maligního melanomu)	2,19	0,018043
ITGB3	NM_000212	Integrin, beta 3 (antigen CD61)	1,94	0,027575
MMP9	NM_004994	Matrixmetalopeptidáza 9 (gelatináza B, 92kDa typ IV kolagenáza)	1,89	0,000608
HTATIP2	NM_006410	HIV-1 Tat interaktivní protein 2, 30kDa	1,69	0,020023
IL18	NM_001562	Interleukin 18	1,56	0,024207

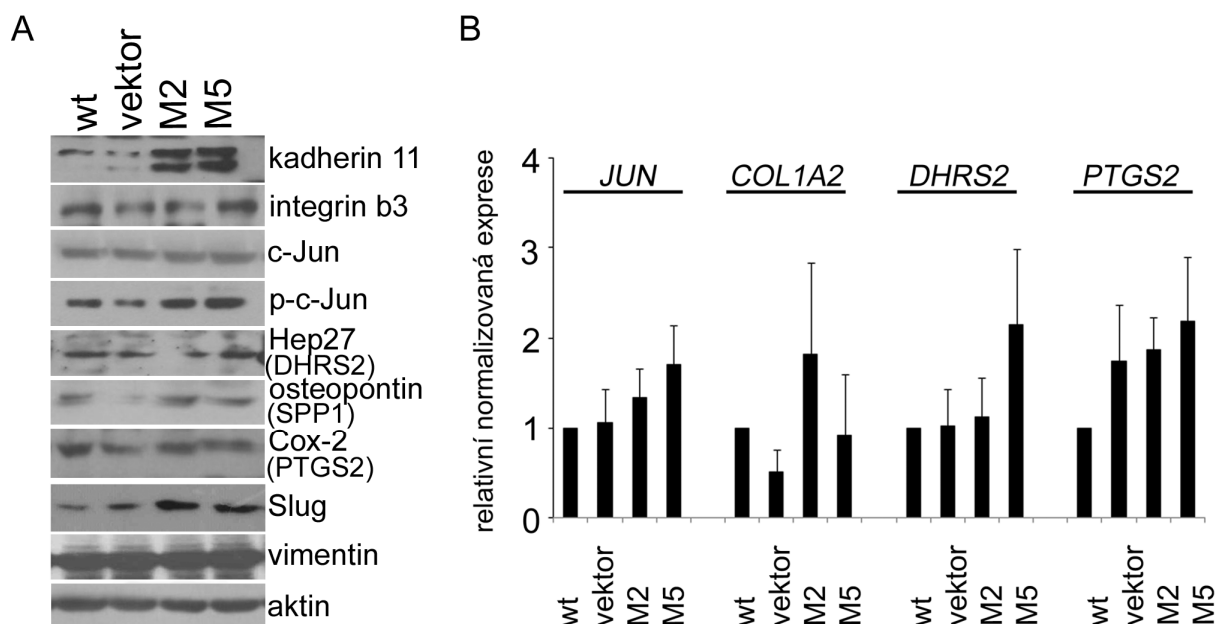
Deregulaci kadherinu 11, nikoli však integrinu  $\beta 3$ , jsme v buňkách MYBup potvrdili imunoblotingem (Obr. 14). Kromě genů zahrnutých v panelu PCR array „Human Tumor Metastasis“ nás zajímala exprese skupiny genů vybraných na základě jejich potenciální indukce/suprese proteinem c-Myb a možném zapojení v kontrole buněčné migrace/invazivity. Geny *COL1A2*, *PTGS2*, *SPP1*, *SNAI2*, *DHRS2*, *JUN* patří na základě publikovaných dat mezi geny, jejichž exprese je v některých buněčných systémech pod kontrolou transkripčního faktoru c-Myb (Quintana et al., 2011; Lei et al., 2004; Piccinini et al., 1999; Chen et al., 2010a; Tanno et al., 2010; Ramsay et al., 2000; Lang et al., 2005). Výsledky qRT-PCR a/nebo imunoblotingu ukázali, že exprese genů *COL1A2*, *PTGS2*, *SPP1* a *DHRS2* se s exogenní expresí *MYB* v buňkách MDA-MB-231 nemění. Protein Slug (kódovaný genem *SNAI2*) je ale buňkami MDA-MB-231MYBup produkován ve zvýšené míře (Obr. 14), proto jsme detekovali také vimentin používaný jako marker EMT. Jeho exprese se nicméně mezi buňkami MYBup a kontrolami neliší (Obr. 14). Dále nás zajímalo, zda je v buňkách MDA-MB-231MYBup aktivovaná exprese protoonkogenu *JUN*. Pomocí qRT-PCR jsme nezjistili významnou změnu hladiny *JUN* mRNA v buňkách MYBup. Také množství proteinu c-Jun v buňkách MYBup významně zvýšeno není, nicméně jeho fosforylované formy (Ser73) při nadprodukci proteinu c-Myb přibývá (Obr. 14).

## 4.2.2 c-Myb dereguluje v buňkách MDA-MB-231 proteázy degradující složky extracelulární matrix

### 4.2.2.1 Deregulace *MMP1*, *MMP9* a *CTSD* mRNA v buňkách MDA-MB-231MYBup

Vzhledem k tomu, že invazivita buněk MYBup se ukázala být závislá na složení ECM, zaměřili jsme se v dalším studiu mechanismu Myb-indukované migrace/invazivity na expresi a sekreci enzymů s proteolytickou aktivitou. PCR array analýza poukázala na významné navýšení *MMP9* mRNA v buňkách MDA-MB-231MYBup, nicméně z dalších sedmi MMP zahrnutých v panelu 84 genů žádná nevykazovala deregulaci v důsledku

exogenní exprese *MYB* (Obr. 15). Nárůst relativního množství *MMP9* mRNA jsme potvrdili v obou klonech MYBup pomocí qPCR s použitím TaqMan sondy specifické pro *MMP9* (Obr. 15). Navíc jsme určili relativní množství mRNA kódující další dvě proteázy relevantní pro invazivitu a metastázování prsních karcinomů, matrixové metaloproteinázy 1 (*MMP1*; intersticiální kolagenáza) a katepsinu D (*CTSD*, CD). Buňky MYBup obsahují více než dvojnásobné množství *CTSD* mRNA ve srovnání s buňkami kontrolními. Naopak exprese *MMP1* mRNA poklesla v buňkách s exogenní expresí *MYB* téměř o 60% (Obr. 15).



Obr. 14. Detekce exprese vybraných Myb-cílových genů v buňkách MDA-MB-321MYBup. (A) Imunodetekce vybraných proteinů (kadherin 11, integrin  $\beta$ 3, c-Jun, Hep27, osteopontin, Cox-2, Slug) a markeru EMT (vimentin) v buněčných lyzátech MDA-MB-231 variant wt, vektor a MYBup (M2 a M5). (B) qRT-PCR analýza exprese *JUN*, *COL1A2*, *DHRS2* a *PTGS2* mRNA v buňkách MDA-MB-231 wt, vektor, MYBup (M2, M5). Relativní množství mRNA těchto genů je normalizováno k expresi *GAPDH* a vztaženo k hladině mRNA v buňkách kontrolních (wt).

#### 4.2.2.2 c-Myb zvyšuje intra- a extracelulární množství proteinů MMP9 a katepsinu D a snižuje hladinu proteinu MMP1

Dále nás zajímalo, zda pozorované změny v relativním množství mRNA genů *MMP9*, *MMP1* a *CTSD* v důsledku exogenní exprese *MYB* odráží stav proteinové exprese v buňkách MYBup. Intracelulární množství proteinů MMP9, MMP1 i CTSD určené imunoblotingem odpovídá relativnímu množství transkriptů těchto genů v buňkách MYBup: zatímco hladina MMP9 a katepsinu D vlivem zvýšené produkce proteinu c-Myb stoupá, hladina proteinu MMP1 naopak klesá (Obr. 15). Tyto proteázy jsou nádorovými buňkami vylučovány do extracelulárního prostředí, kde se podílejí na degradaci složek mimobuněčné matrix (Koblinski et al., 2000; Duffy et al., 2000). Určili jsme proto také míru sekrece proteinů MMP1, MMP9 a CTSD stanovením jejich přítomnosti v médiu kondiciovaném buňkami MYBup, resp. kontrolními liniemi. Výsledky (Obr. 15) ukazují, že extracelulární množství těchto proteinů koresponduje s množstvím intracelulárním. Zvýšená produkce katepsinu D buňkami MYBup je doprovázena jeho zvýšenou enzymatickou aktivitou v buněčných



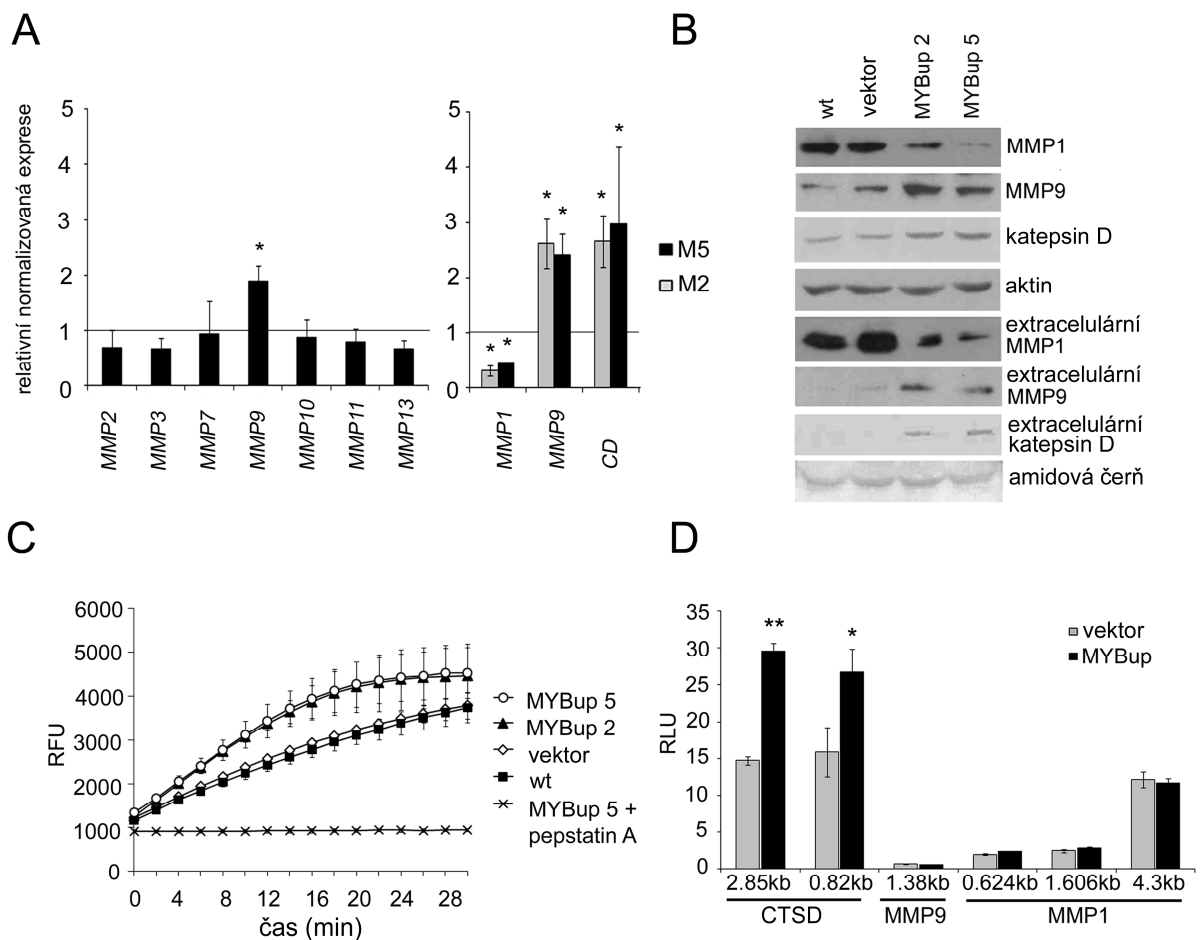
lyzátech (Obr. 15). Tyto výsledky naznačují, že protein c-Myb zasahuje do regulace exprese i aktivity některých proteáz důležitých pro invazivitu a metastázování nádorů.

#### **4.2.2.3 c-Myb aktivuje reportérový gen z promotoru *CTSD*, nikoli *MMP9* a *MMP1***

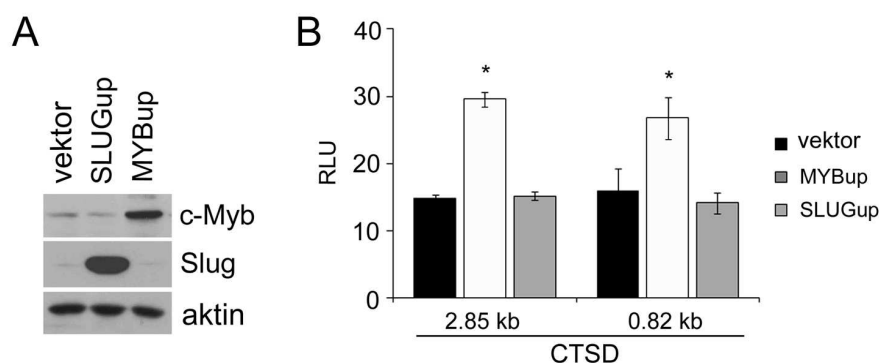
Abychom objasnili mechanismus, kterým c-Myb řídí produkci proteinů *MMP1/9* a *CTSD*, zkoumali jsme, zda c-Myb transaktivuje expresi luciferázového reportérového genu z promotorových sekvencí lidských genů *MMP1*, *MMP9* a *CTSD*. Připravili jsme konstrukt s nukleotidovou sekvencí kódující modifikovanou luciferázu světlušky *Photinus pyralis* pod kontrolou regulačních sekvencí o délce 1,38 kb ležících proti směru transkripce od genu *MMP9*. Dále jsme měli díky laskavému daru prof. C. Brinckerhoff a D. A. Galloway k dispozici reportéry se třemi různě dlouhými (4,3; 1,606 a 0,624 kb) sekvencemi promotoru genu *MMP1*. Reportéry, do kterých byly vloženy různě dlouhé (2,85 a 0,82 kb) úseky promotoru *CTSD*, jsme získali od J. Chirgwin. Transaktivační testy byly provedeny po přechodné transfekci buněk MYBup, resp. kontrolních buněk, výše popsány reportérovými vektory současně s plazmidem nesoucím  $\beta$ -galaktozidázový gen pod kontrolou konstitutivního promotoru. Luciferázová aktivita stanovená luminometricky v extraktech transfekovaných buněk byla normalizována podle účinnosti transfekce odpovídající aktivitě  $\beta$ -galaktozidázy. Popsaným způsobem jsme zjistili, že na rozdíl od promotorů genů *MMP1* a *MMP9*, jejichž transaktivace není v buňkách MYBup nijak ovlivněna, je exprese luciferázy z obou regulačních úseků katepsinu D v buňkách se zvýšenou hladinou c-Myb významně stimulována (Obr. 15). Z toho vyplývá, že transkripční faktor c-Myb může v reportérovém systému aktivovat transkripci z promotoru genu *CTSD*, nikoli však genů *MMP1* a *MMP9*.

#### **4.2.2.4 c-Myb reguluje expresi katepsinu D nezávisle na transkripčním faktoru Slug**

Protože exogenní protein c-Myb indukuje v buňkách MDA-MB-231 expresi transkripčního faktoru Slug, chtěli jsme zjistit, zda není zvýšená transaktivace *CTSD* promotoru v reportérovém systému v buňkách MYBup důsledkem nadprodukce proteinu Slug. Pro tento účel jsme buňky MDA-MB-231 přechodně transfekovali plazmidy kódujícími buď protein c-Myb nebo Slug, a současně plazmidy reportérovými s regulačními sekvencemi genu *CTSD* (2,8 kb a 0,82 kb) a plazmidem CMV- $\beta$ gal pro určení účinnosti transfekce. Obr. 16. ukazuje nárůst množství proteinu c-Myb, resp. Slug po přechodné transfekci vektory pcDNA3hcMYB (MYBup) nebo pcDNA3Slug (SLUGup) a relativní luciferázovou aktivitu v těchto buňkách při kotransfekci s reportérovými konstrukty. Z výsledků vyplývá, že c-Myb aktivuje transkripci z obou testovaných sekvencí, zatímco Slug žádný účinek na aktivitu luciferázy exprimované z *CTSD* promotoru nemá. Abychom prověřili hypotézu, že protein c-Myb aktivuje transkripci genu *CTSD*, analyzovali jsme uvedenou regulační sekvenci genu *CTSD* o délce 2,5 kb ležící proti směru transkripce od startovacího nukleotidu pomocí softwaru TESS („Transcription Element Search Software“; <http://www.cbil.upenn.edu/cgi-bin/tess/>) a identifikovali jsme několik potenciálních vazebných míst pro transkripční faktor c-Myb v sekvenci promotoru lidského genu *CTSD* (2,5 kb; Obr. 16).



Obr. 15. c-Myb reguluje expresi genů *MMP1*, *MMP9* a *CTSD*. (A) Relativní množství mRNA genů *MMP2*, *3*, *7*, *9*, *10*, *11* a *13* v buňkách MYBup a v kontrolních buňkách (vektor) bylo zjištěno pomocí „RT<sup>2</sup> Profiler PCR Array Human Tumor Metastasis“ (SABiosciences). Relativní množství transkriptů genů *MMP1*, *9* a *CTSD* (CD) bylo detekováno pomocí qRT-PCR s použitím TaqMan sond v buňkách MYBup (M2, M5). Relativní množství těchto mRNA je normalizováno vzhledem k expresi *GAPDH* a vztaženo k hladině mRNA v buňkách kontrolních (vektor). Statisticky významný rozdíl v expresi genu mezi buňkami MYBup a buňkami kontrolními (vektor) je označen \* ( $p < 0,05$ ). (B) Proteinové lyzáty, resp. kondiciovaná média získaná z buněk MYBup a kontrolních buněk (wt, vektor) byly rozděleny SDS-PAGE a proteiny MMP1, MMP9, katepsin D byly detekovány specifickými protilátkami. Pro kontrolu nanášení stejného množství proteinů byl v buněčných lyzátech detekován aktin a proteiny kondiciovaných médií byly nespecificky obarveny amidovou černí. (C) Enzymatická aktivita katepsinu D v buněčných lyzátech byla stanovena pomocí kity „Cathepsin D assay“ (Sigma). Účinnost hydrolýzy fluorimetrického substrátu byla měřena v reálném čase analyzátozem Synergy HT. Pro kontrolu specifické hydrolýzy byla aktivita katepsinu D inhibována pepstatinem A (prezentováno pro buněčný klon M5). (D) Transkripční testy byly provedeny s šesti variantami luciferázových reportérů: dva pro katepsin D (se sekvencí promotoru *CTSD* dlouhou 2,85 kb nebo 0,82 kb), jeden pro *MMP9* (1,38 kb sekvence promotoru) a tři pro *MMP1* (0,624 kb, 1,606 kb a 4,3 kb). Relativní aktivita luciferázy (RLU) každého vzorku je normalizována podle aktivity  $\beta$ -galaktozidázy, která koresponduje s účinností transfekce. Statisticky významný rozdíl v hodnotách relativní aktivity luciferázy mezi buňkami MYBup a buňkami kontrolními (vektor) je vyznačen \* ( $p < 0,05$ ) nebo \*\* ( $p < 0,01$ ).



Promotor genu *CTSD* s možnými Myb-vazebnými místy

gggaccttctctgagggtcgctgttgagcacatcccctggctccatttctgtgtgacttggacctgccctaaa  
 tgattgtcccaatattcccttctacttacagcgaccgcacctcccgcctggctgtgtgctccagagcatctgg  
 ggaatgacccgggccccctcccaacaggcctaatcagtcctccatgcccagggcaggaccaggggcacacagagaat  
 ggtgaagtctctggggaactgtcaccatggcctctgcaagctcagtgctgggagaccaggttctgacctggata  
 cactgctcactcttgaggctggggcctagagggacgggtgccacgttgagacagggcctccagggacaggtgccacg  
 ttgaagacggggtccagggacgggtgccacgttagagatggggtccagggacaggtgccacgttgaagacggggt  
 tccagggacgggtgccacgttgagatggggtccagggatgggtgccacattggagatgggcaagtctgggctaa  
 ggaggaggccagggtggccagggcagggtccagtgagggtgctgctctgaggaggtggagagtgggctctggg  
 aggggacacttggagagttaaggtgaggtccatctgggtaccctgggtatagggagtgtgttgaaaaaagcca  
 aacactataaaatattgaagatatttctgagcaaatgtgaggactatgacctgtgaaaccacctcagcagg  
 tctgagaatattgtgagcaaggtgggtgggtaacagcttggctttatactttttttaaatttccaggctcttt  
 ctgtagagacagggtctcaccatgttggccaggctgatctcaagctctcagctcaagcaatgctcccacctgg  
 cctccgagtatgctggggtatagggcaacagtcaccatgcccggcctgggtttacggatttacagagacagatg  
 ttacaggccaaaaccataaatacaacatattgaagatatacattgggtccagcctagaaacagggttggcaggggca  
 gctccagggtcataggggtatcaagattctctgattggcaagtggttgaagaggttatgttggctaaagaggt  
taagtgagggttactcagcctgttaaccccagcctttggaaggctgaggcaggcagatcactgaggtcaggag  
ttcagagaccgctggcccaacatggtgaaacacacatctctactaaaaatacaaaaacatataacacatatacatg  
 tataatataacacatatacatgtatataacacatatacatgtatataacacatatacatgtatataat  
 atacatataacatgtatataacacatataacatgtatataacacatataacacatataacatataacatgtata  
 taacacatataacacatatacatatgtatataacatataatgtatataacacatataacatataacatgtata  
 tatacactataatgtgtgtgtgtatataacacatagctgtgtgtatatacactatagccagggt  
 ggtagcagcggcctgtatcccagctacttaggggtgaggcaggagaaatcgctgaaaccaggaggttagaggt  
 tgcaagtgagccagatcatgccaactgcactccagcctgggcccagagcgagatctgtctcaaaaaaaaaaaaa  
 aaaaaaaaaaggttgactgagtgaggcaaaaaggtgcccagcctcctagggaaggagctctctagaaaaacggca  
 tttcgccccctcaagagacagctgtgcaagtcacatcaaaacatgtgaaagaaatgtattttagggtggaatac  
 tttgctgctctcgggcctgtgtctgcccagctgaggctgtgcaagtgagggtggaatttgggactctggaggt  
 agagcctcgggtgaggcctgagctctcaagcagcggcccagaggagggcgggacgggtccgaccccccttgccg  
 geaggcctgagctgggtttccagggttctctggaagcctgtagaggagcggagggtccattcgggtggctggg  
 gactttgaatttaaccttgggttgcaagaggctccagagaggatgtctgggagcgtctcggaggggacgaggg  
 ggccggggaggagcaggtgcaaggagcccacgggcacgcgccggcagggcctggacgggggacggccggcg  
 gccgggacagggtcaccocgggggccccctccagggtgggcccggcccaagccccggggcagggcgggaa  
 tctccagaccccagaagctgggcccgggtgaccccggggcggcagggcgggaaactgtaggcggcaggcggc  
 accaccaccccccccccggggcctgtgcccgtgcccaggttgcocccggccaggccaggccctccgccc  
 ccgccccggcagcggcggccgcccagctgaccgggtccgggtgcaaacacgggggtcagctgactccggcccaac  
tgaggcgtcatcccggctataagcgcacggcctcgggacacctctccgaccggccggccggccatg

Obr. 16. c-Myb aktivuje transkripci reportérového genu z promotoru *CTSD* nezávisle na proteinu Slug. Buňky MDA-MB-231 byly přechodně transfekovány *MYB* cDNA (MYBup), *SLUG* cDNA nebo kontrolním plazmidem bez inzertu (vektor). Současně byly do buněk vpraveny reportérové plazmidy s 2,5 kb nebo 0,82 kb dlouhou sekvencí promotoru genu *CTSD* proti směru transkripce od cDNA kódující luciferázu. Množství proteinu c-Myb a Slug v přechodně transfekovaných buňkách bylo určeno imunoblotingem (A) a relativní aktivita luciferázy (RLU) každého vzorku je normalizována k aktivitě  $\beta$ -galaktosidázy, která koresponduje s účinností transfekce (B). Statisticky významný rozdíl v hodnotách relativní aktivity luciferázy mezi buňkami přechodně transfekovanými *MYB* cDNA a buňkami kontrolními (vektor) je vyznačen \* ( $p < 0,05$ ). (C) TESS analýza sekvence *CTSD* promotoru o délce 2,5 kb, potenciální vazebná místa proteinu c-Myb vyznačena podtržením.

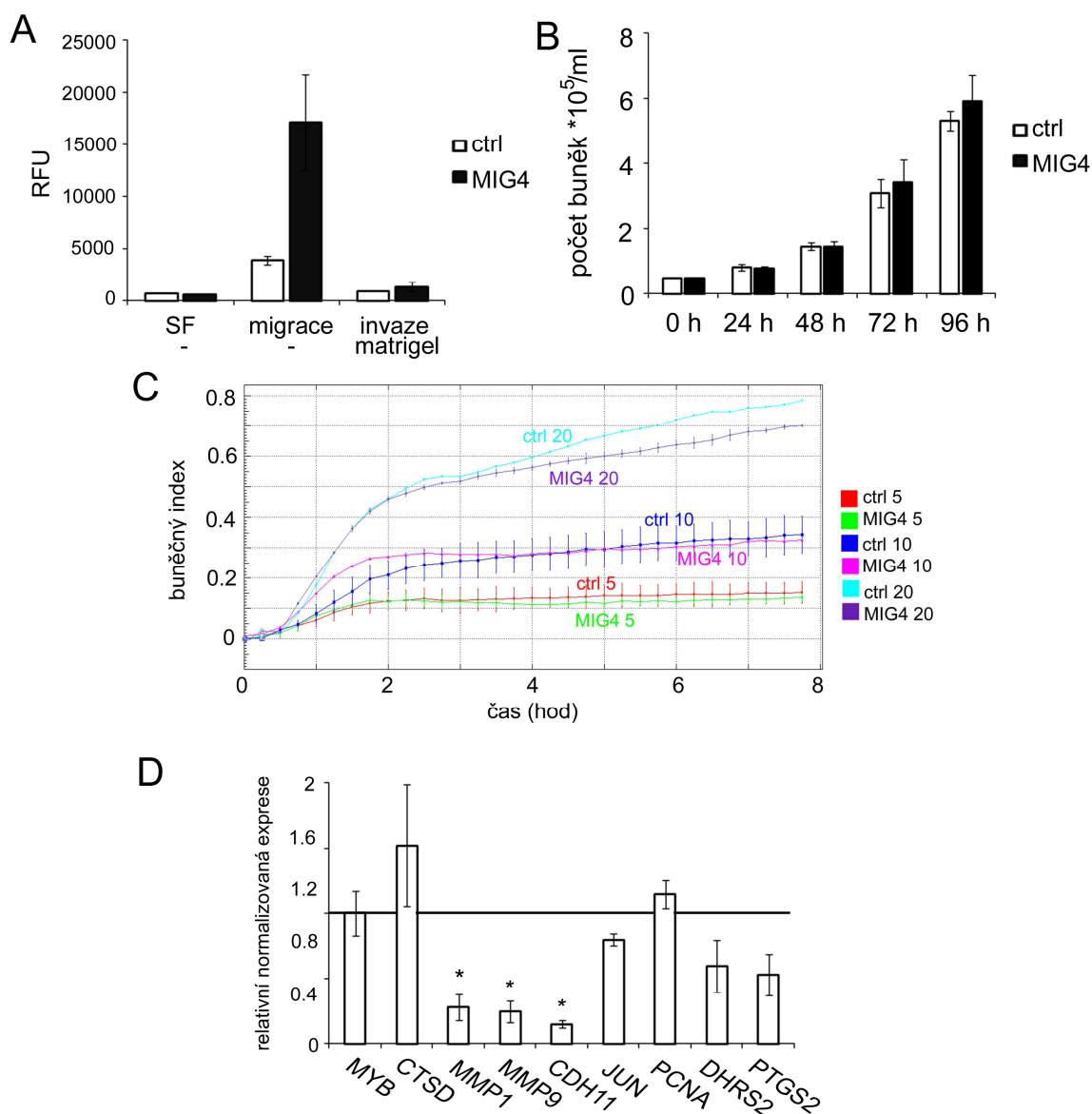
### 4.3 Efektory migrace a invazivity indukované proteinem c-Myb

#### 4.3.1 Selekcce subpopulace linie MDA-MB-231 s vysokou migrační aktivitou *in vitro*

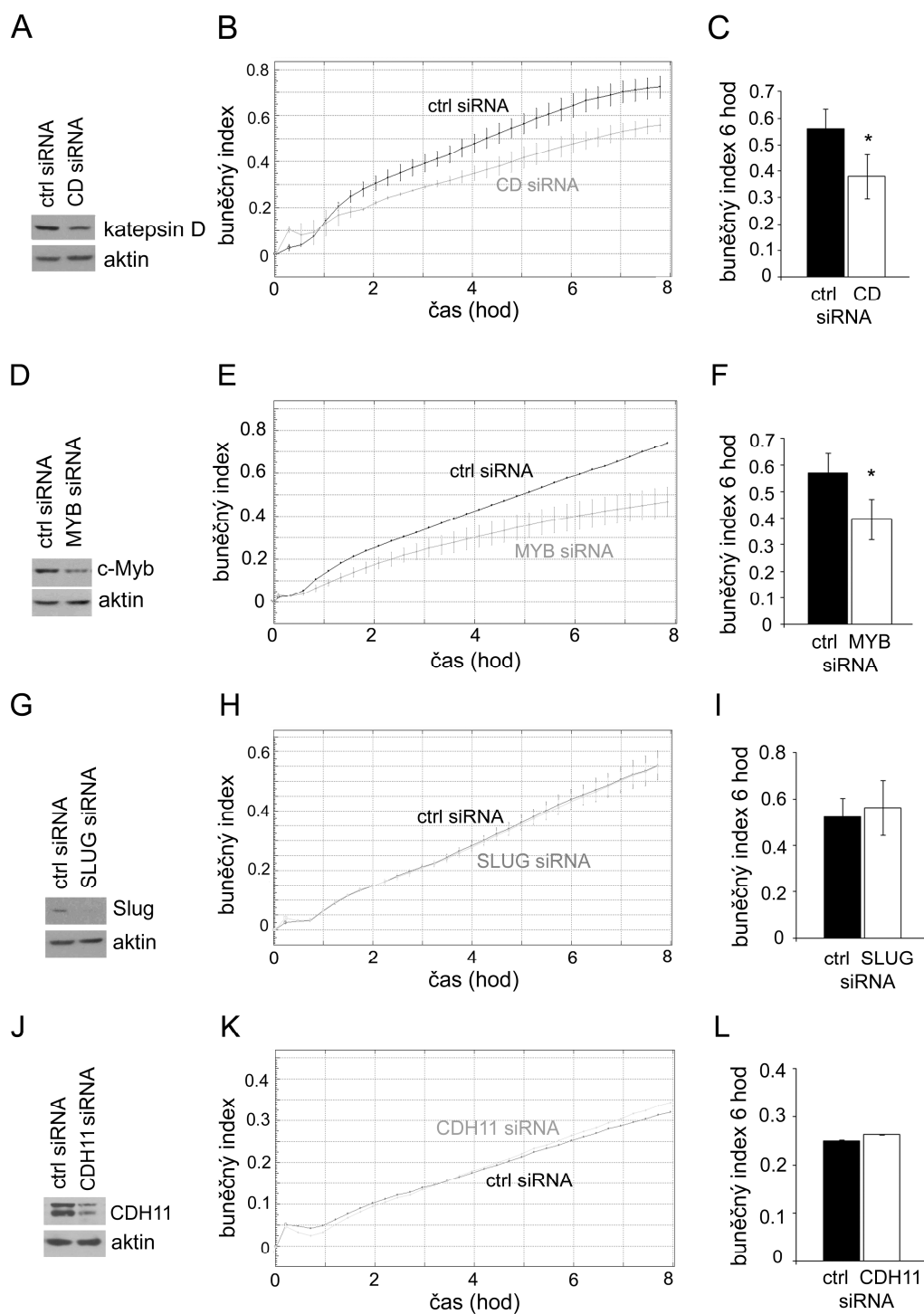
Abychom prozkoumali význam proteinu c-Myb a jeho potenciálních proteázových a dalších efektorů pro směrovanou migraci buněk MDA-MB-231, selektovali jsme buněčnou subpopulaci s vysokou migrační aktivitou čtyřmi postupnými cykly migrace a proliferace. Buňky získané ze spodní části „transwell“ filtru po čtyřech hodinách migrace byly kultivovány do dostatečné hustoty a následně nasazeny do „transwell“ jamky na další cyklus migrace. Po čtyřnásobném opakování tohoto postupu jsme získali linii (MIG4) s čtyřnásobně vyšší migrační aktivitou než jakou má linie parentální MDA-MB-231 stejné pasáže (ctrl), pouze 1,4násobně zvýšenou schopností invadovat Matrigel, mírně zvýšenou rychlostí růstu a nezměněnou adhezivitou (Obr. 17). Následné expresní profilování buněk MIG4 ve vybraných genech ukázalo mírně zvýšenou expresi *CTSD* mRNA, významný pokles hladiny *MMP1*, *MMP9* a *CDH11* mRNA při nezměněné expresi *MYB* mRNA ve srovnání s parentální linií (Obr. 17). Další sledované geny (*JUN*, *DHRS2*, *PTGS2*) vykazovaly jen nevýznamný úbytek transkriptů v buňkách MIG4 ve srovnání s kontrolními buňkami parentální linie. Exprese *PCNA* mRNA se neliší v linii MIG4 a linii kontrolní.

#### 4.3.2 Inhibice *MYB*, *CTSD* a *JNK* zastavuje migraci buněk MDA-MB-231MYBup

Abychom zjistili, zda je vysoká exprese *MYB* v buňkách MDA-MB-231MYBup skutečně příčinou jejich zvýšené migrační a invazivní aktivity a zda k ní přispívá deregulace genů *MMP1*, *MMP9*, *CTSD*, *CDH11*, *SNAI2* a *JUN*, zaměřili jsme se na inhibici těchto genů pomocí specifických siRNA a/nebo dostupných farmakologických inhibitorů. Nejdříve jsme se zaměřili na pozorování změn migrace buněk MYBup při inhibici *MYB* a Myb-indukovaných genů. Obr 18. ukazuje, že účinná suprese *MYB* a *CTSD* dosažená transfekcí specifických siRNA má za následek snížení migrace buněk MDA-MB-231MYBup, proti tomu siRNA specifické pro *SNAI2* a *CDH11* migraci buněk MYBup neovlivňují. Zatímco inaktivace všech MMP za použití inhibitoru GM6001 Myb-aktivovanou buněčnou migraci mírně zvyšuje (Obr. 19), JNK inhibitor SP600125, podobně jako inhibitor katepsinu D metylester pepstatinu A, migrační aktivitu buněk MYBup snižuje (Obr. 19). Působení inhibitorů v uvedených koncentracích neovlivňuje po dobu nejméně 12 hod viabilitu a proliferaci buněk MDA-MB-231MYBup. Popsané výsledky dokazují význam proteinu c-Myb pro migraci buněk MDA-MB-231MYBup a poukazují na možnou funkci katepsinu D a JNK signální dráhy jako efektorů proteinu c-Myb v regulaci buněčné migrace.

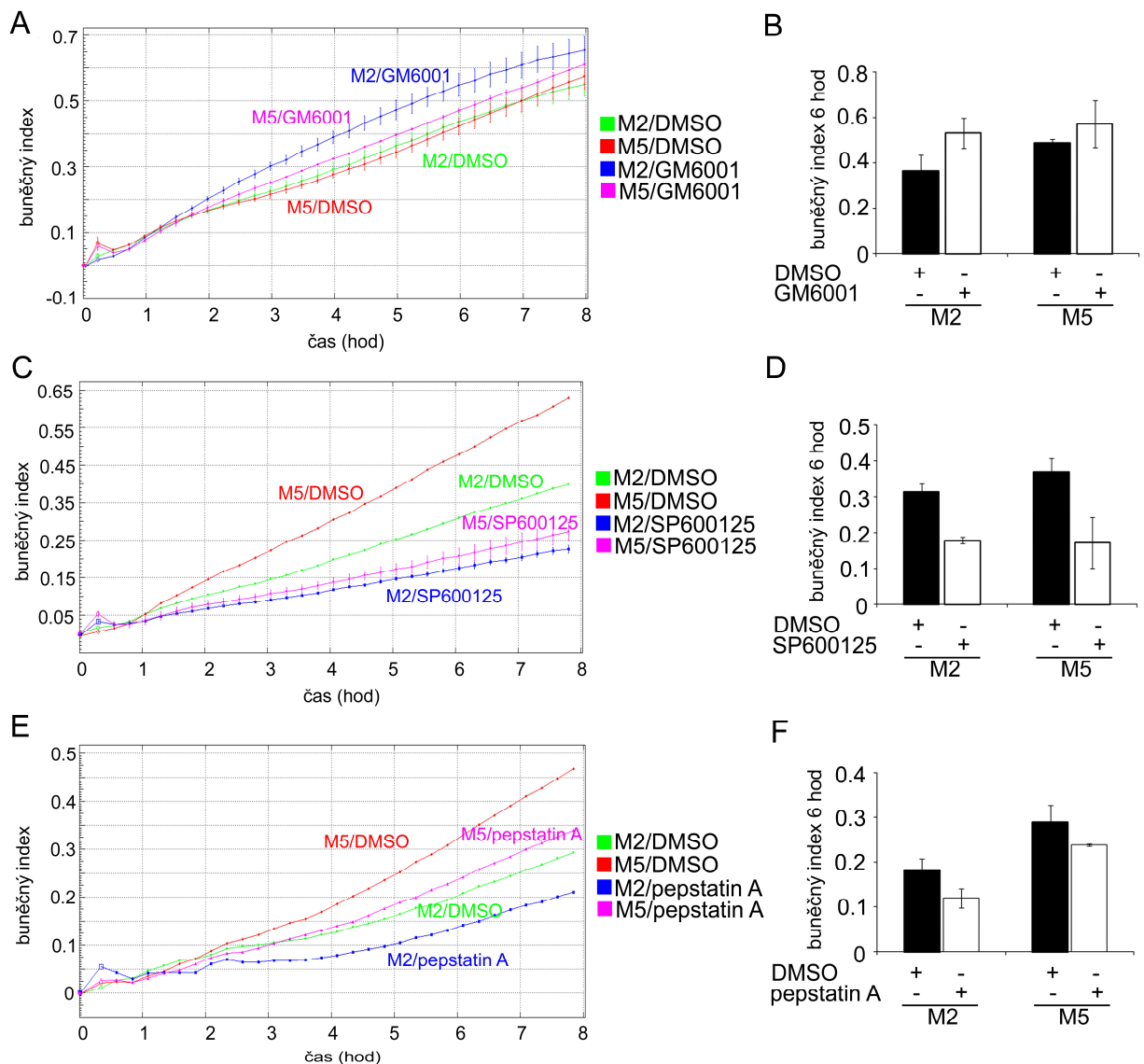


Obr. 17. Subpopulace MDA-MB-231 s vysokou schopností migrace získaná *in vitro* selekcí. (A) „Transwell“ migrace/invazivita buněk MDA-MB-231 MIG4 byla testována kitem „Cultrex Cell Invasion Assay“ (Trevigen). Buňky chemotakticky migrující membránou s vrstvou Matrigelu nebo bez ní do jamky obsahující médium s chemoatraktantem (10% FCS) nebo bez něj (SF) byly obarveny kalceinem AM. Buněčná migrace/invazivita byla kvantifikována na základě měření emitované fluorescence (excitace 485 nm, emise 520 nm, senzitivita) analyzátozem Synergy HT. Graf zobrazuje průměrné hodnoty fluorescence (RFU) naměřené ve dvou nezávislých experimentech. (B) Proliferační aktivita buněk MIG4 a buněk kontrolních vyjádřená jako koncentrace živých buněk v závislosti na čase. Počet buněk byl stanoven pomocí CASY Cell Counter. (C) Adherence buněk MIG4. Buňky MIG4 a kontrolní varianta linie MDA-MB-231 (ctrl) byly v hustotě  $5 \times 10^3/200 \mu\text{l}$  (ctrl 5 a MIG4 5),  $1 \times 10^4/200 \mu\text{l}$  (ctrl 10 a MIG4 10) a  $2 \times 10^4/200 \mu\text{l}$  (ctrl 20 a MIG4 20) nasazeny do jamek E-destičky a analyzovány v xCELLigence RTCA DP v intervalu 15 min po dobu 8 hod. Měření probíhalo nejméně v duplikátech, barevné linie reprezentují průměrné hodnoty, chybové úsečky znázorňují směrodatné odchylky, jak byly vyhodnoceny pomocí softwaru RTCA (ACEA Biosciences) (D) Expres vybraných genů v buňkách MIG4 analyzovaná pomocí qRT-PCR. Relativní exprese normalizovaná pomocí *GAPDH* v buňkách MIG4 vztažená k expresi uvedených genů v buňkách kontrolních. Statisticky významný rozdíl v expresi genu mezi buňkami MIG4 a buňkami kontrolními je označen \* ( $p < 0,05$ ).



Obr. 18. Vliv specifické suprese *MYB*, *CTSD*, *SNAI2* a *CDH11* pomocí siRNA na migraci buněk MDA-MB-231MYBup. Buňky byly transfekovány *MYB*, *CTSD* (CD), *SNAI2* (SLUG), *CDH11* nebo kontrolní (ctrl) siRNA (viz Metody), účinnost inhibice exprese příslušných genů byla ověřena imunoblotingem (A, D, G, J) a migrační aktivita těchto buněk byla stanovena pomocí xCELLigence RTCA. Grafy B, E, H, K ukazují výsledky reprezentativní kinetické analýzy buněčné migrace, grafy C, F, I, L pak průměrné hodnoty buněčného indexu v čase 6 hodin z nejméně dvou nezávislých experimentů. Chybové úsečky znázorňují směrodatné odchylky. Statisticky významný rozdíl ( $p < 0,05$ ) v hodnotách buněčného indexu v čase 6 hodin mezi buňkami transfekovanými *CTSD* nebo *MYB* siRNA a buňkami transfekovanými kontrolní siRNA je vyznačen \*.





Obr. 19. Účinek inhibitoru matrixových metaloproteináz GM6001, inhibitoru JNK kinázy SP600125 a metylesteru pepstatinu A na migraci buněk MDA-MB-231MYBup. Širokospektrý MMP inhibitor GM6001 byl přidán do dolní části jamek obsahujících chemoatraktant i do horní části jamek destičky CIM 16 v cílové koncentraci 20  $\mu\text{M}$ . Inhibitor SP600125 v cílové koncentraci 10  $\mu\text{M}$  a metylester pepstatinu A (cílová koncentrace 15  $\mu\text{M}$ ) byly použity analogicky. Migrace buněk MDA-MB-231MYBup (M2 a M5) za podmínek inhibice MMP/JNK/CTSD byla monitorována pomocí xCELLigence RTCA. Grafy A, C, E ukazují reprezentativní kinetickou analýzu buněčné migrace, grafy B, D, F pak průměrné hodnoty buněčného indexu v čase 6 hodin z nejméně dvou nezávislých experimentů.

### 4.3.3 Schopnost buněk MDA-MB-231MYBup pronikat Matrigelem je senzitivní k inhibici *MYB*, *CTSD* a MMP, genetické vypnutí *CTSD* a inhibice JNK blokuje jejich invazivitu v kolagenu I

Analogicky jsme testovali účinek vybraných siRNA a inhibitorů na invazivitu buněk MYBup. Jak specifické vypnutí genů *MYB* a *CTSD*, tak farmakologicky zablokovaná aktivita všech MMP pomocí GM6001 způsobí ztrátu schopnosti buněk MYBup účinně procházet přes

bariéru extracelulární matrix tvořenou Matrigelem (Obr. 20). Invazivita v Matrigelu je mírně znesnadněna i za přítomnosti inhibitorů SP600125 a metylesteru pepstatinu A (Obr. 20). Pokud použijeme kolagen I jako bariéru pro buněčnou migraci, siRNA specifická pro *MYB* sníží invazivitu jen nevýznamně, na rozdíl od *CTSD* siRNA, která účinně brání invazi buněk MYBup i přes kolagen I. Penetrace matrix tvořené *in vitro* kolagenem I není v buňkách MYBup působením GM6001 ani metylesteru pepstatinu A ovlivněna, ale je senzitivní k inhibici JNK kinázy (Obr. 20). Uvedená data poukazují na příčinnou souvislost mezi ektopickou expresí *MYB* a invazivní aktivitou buněk MYBup modelovanou *in vitro* s použitím Matrigelu a potvrzují pozorování, že exprese genu *MYB* není relevantní pro penetraci matrix tvořené kolagenem I buňkami MDA-MB-231. Dále naznačují, že katepsin D je nezbytný pro invazivní aktivitu buněk MDA-MB-231MYBup v Matrigelu i v kolagenu I, ale tento účinek je pravděpodobně alespoň částečně nezávislý na jeho enzymatické aktivitě. Ačkoli inaktivace širokého spektra MMP enzymů znemožňuje průnik vrstvou Matrigelu, nemá vliv na penetraci kolagenu buňkami MDA-MB-231MYBup. Naopak Jun/JNK signální dráha je pravděpodobně významná pro invazivní aktivitu buněk MDA-MB-231 v matrix z kolagenu I.

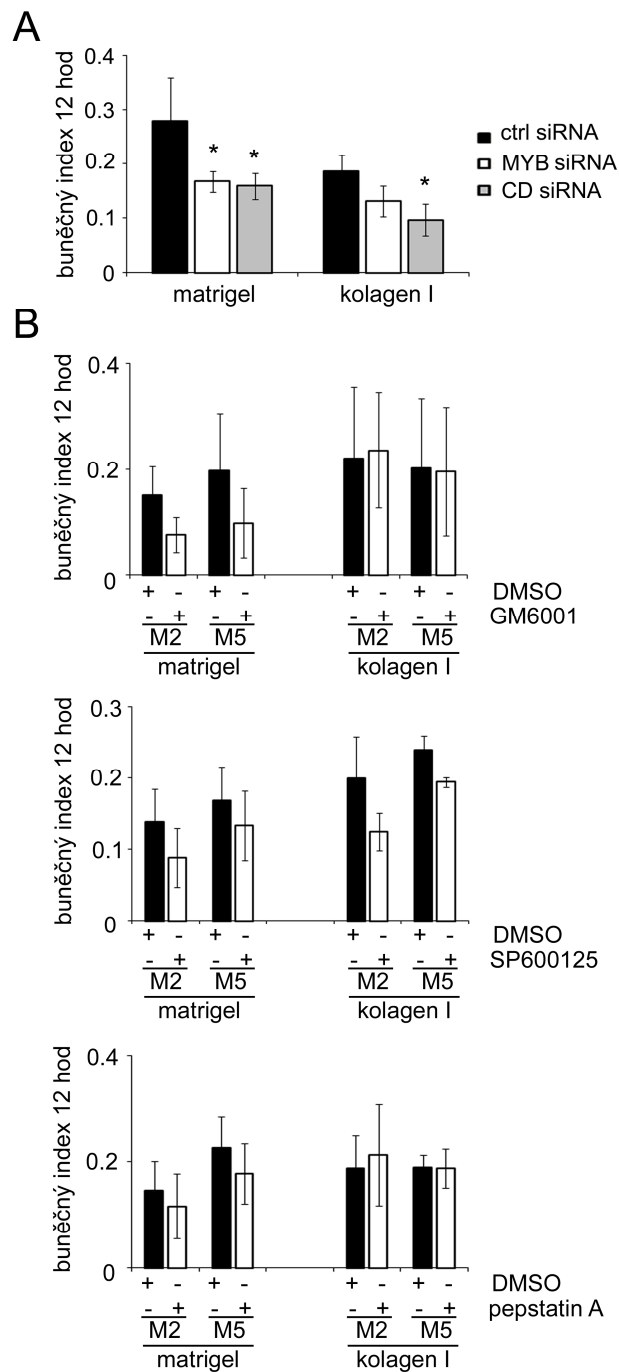
## 4.4 Protein c-Myb reguluje metastázování prsních nádorů

### 4.4.1 c-Myb zpomaluje růst nádorů mléčné žlázy a brání vzniku plicních metastáz v syngenním 4T1-BALB/c modelu

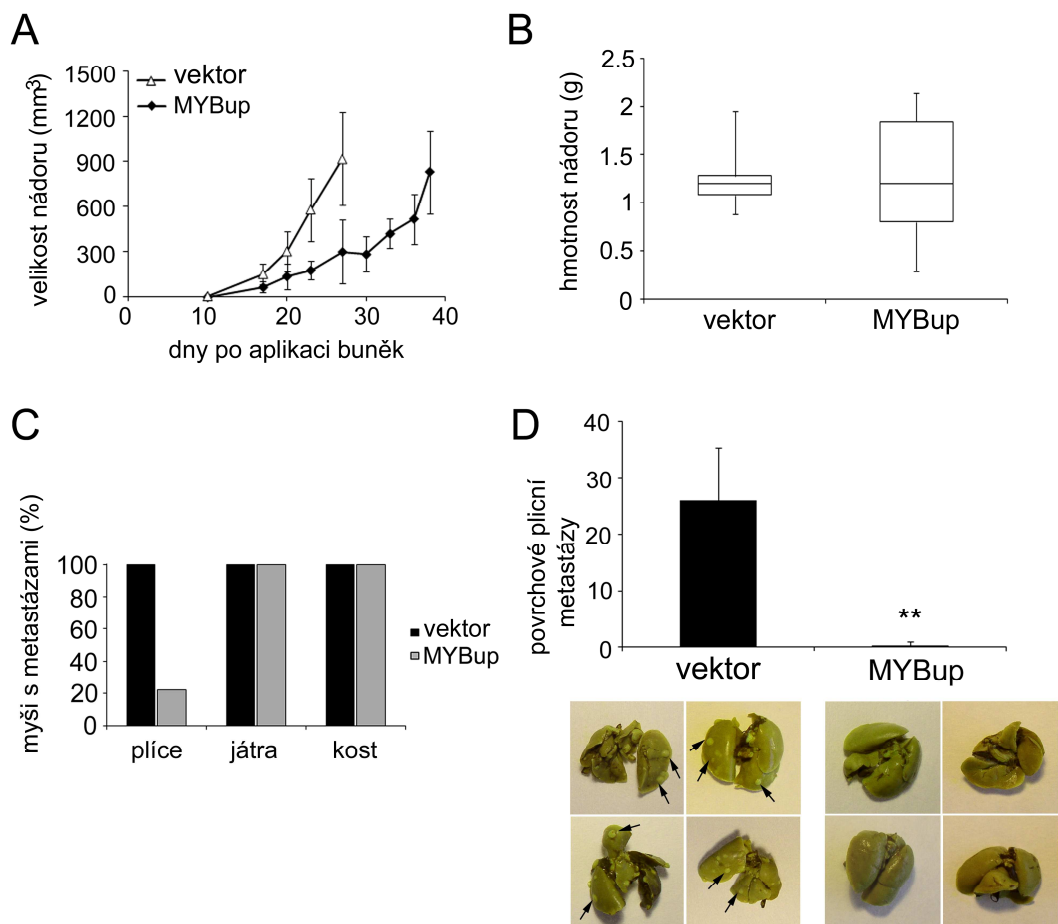
Vzhledem k tomu, že invazivní chování buněk MYBup *in vitro* jsme vyhodnotili jako závislé na složení matrix, kterou buňky pronikají, zajímalo nás, zda (případně jak) se tento fenotyp odráží v invazivitě těchto buněk *in vivo*, tedy během metastázování. Pro tyto studie jsme použili buňky 4T1 (a jejich varianty MYBup) v syngenním myším modelu nádoru prsní žlázy. Buňky 4T1MYBup (MM5) a buňky kontrolní (vektor) byly inokulovány do prsních žláz samic myší kmene BALB/c, přičemž každou skupinu tvořilo 9 myší. Přibližně deset dnů po ortotopické aplikaci nádorových buněk jsme pozorovali první známky růstu tumorů u všech myší, kterým byly nádorové buňky injikovány. Růst nádorů byl nadále pravidelně monitorován, z odečtené délky (*l*) a šířky (*w*) novotvaru byla odvozena velikost tumoru ( $l \times w^2/2$ ) a výsledná průměrná velikost tumorů v závislosti na čase je zobrazena na Obr. 21. Uvedená data dokumentují, že nádory ektopicky exprimující *Myb* (MYBup) rostou pomaleji než nádory kontrolní (vektor). Například 27 dnů po aplikaci buněk byla průměrná velikost nádoru ve skupině myší, jimž byly injikovány buňky kontrolní  $954 \pm 310 \text{ mm}^3$ , zatímco ve skupině myší, jimž byly inokulovány buňky MYBup, dosáhly tumory velikosti průměrně  $360 \pm 212 \text{ mm}^3$  ( $p < 0.05$ ; Obr. 21). Jakmile průměr nádorů ve skupině dosáhl přibližně 1,2 cm, byly myši usmrceny, nádory vyjmuty a zváženy. Průměrná hmotnost nádorů po excizi byla přibližně stejná v obou skupinách myší (Obr. 21). Z primárních nádorů byla získána RNA a pomocí qRT-PCR ověřena zvýšená relativní exprese *Myb* mRNA v tumorech MYBup.

Dále jsme odebrali plíce, játra a stehenní kosti myší a po fixaci vyhodnocovali přítomnost neoplastických ložisek. V plicích jsme hodnotili přítomnost/četnost ložisek nádorového původu po diferenciacím obarvení ve fixativu Bouin. Zjistili jsme, že metastatická ložiska jsou přítomna v plicích všech myší kontrolní skupiny, zatímco ve skupině myší s nádory exprimujícími exogenní *Myb* se metastázy na povrchu plic vyskytují pouze u 22% myší (Obr. 21). S tím koresponduje i výrazně nižší průměrná četnost metastatických nodů v plicích ve skupině myší s MYBup nádory (Obr. 21). Zatímco v kontrolní skupině myší dosahoval průměrný počet metastáz na plíce hodnoty 26, přičemž

jejich minimální počet byl 14 a maximální 41, myši s MYBup nádory měli průměrně méně než jedno metastatické ložisko na plíce a nejvýše se na povrchu plic vyskytovaly 3 metastázy.



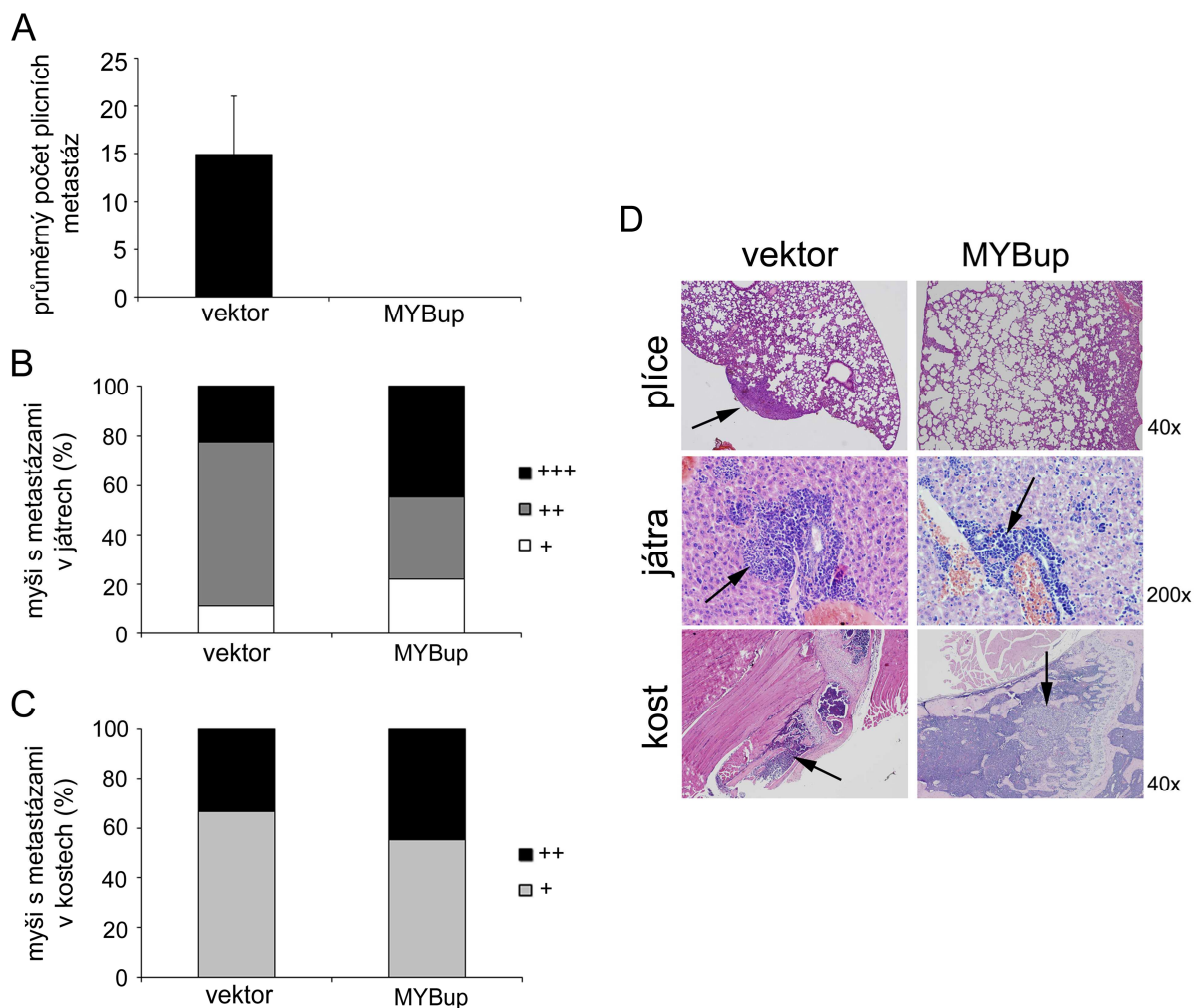
Obr. 20. Invazivita buněk MDA-MB-231MYBup za podmínek suprese *MYB*, *CTSD* pomocí siRNA a farmakologické inhibice MMP, JNK a katepsinu D. Invazivita buněk MDA-MB-231MYBup (M2 a M5) byla monitorována pomocí xCELLigence RTCA. (A) Buňky byly transfekovány *MYB*, *CTSD* (CD) nebo kontrolní (ctrl) siRNA (viz Metody). Statisticky významný rozdíl ( $p < 0,05$ ) v hodnotách buněčného indexu mezi buňkami transfekovanými *CTSD* nebo *MYB* siRNA a buňkami transfekovanými kontrolní siRNA je vyznačen \*. (B) Do horní i dolní části jamek „CIM-plate 16“ byl přidán inhibitor GM6001 (20  $\mu$ M), SP600125 (10  $\mu$ M) a metylester pepstatinu A (15  $\mu$ M). V grafech jsou uvedeny průměrné hodnoty buněčného indexu po 12 hodinách z nejméně dvou experimentů. Chybové úsečky znázorňují směrodatné odchylky.



Obr. 21. c-Myb zpomaluje růst nádorů mléčné žlázy BALB/c myši a brání metastázování do plic. Růst *in vivo* a spontánní metastatická aktivita buněk 4T1MYBup (MM5) byla stanovena s použitím techniky ortotopické injekce nádorových buněk (MYBup a vektor) do mléčné žlázy syngenního myšního modelu. (A) Růst nádoru byl monitorován dvakrát týdně, velikost novotvaru byla vypočítána z naměřených hodnot délky a šířky. (B) Myši byly usmrceny, jakmile nádory ve skupině myši dosáhly v průměru 1,2 cm. Nádory byly po excizi zváženy. Graf ukazuje medián (maximum, 75. percentil, medián, 25. percentil, minimum) hmotnosti nádorů ve skupině myši kontrolních (vektor, n=9) a myši s MYBup nádory (n=9). (C) Po fixaci odebraných orgánů byla hodnocena přítomnost nádorových infiltrátů v plicích (povrchové metastázy), játrech a kostech (histologická analýza). Graf ukazuje četnost myši s metastázami v uvedených orgánech. (D) Povrchové metastatické nody byly spočítány po fixaci a barvení ve fixativu Bouin s použitím preparačního mikroskopu. Statisticky významný rozdíl v četnosti metastáz v plicích mezi skupinou kontrolní a skupinou myši s MYBup tumory je vyznačen \* ( $p < 0,05$ ). Chybové úsečky označují směrodatnou odchylku. Pod grafem jsou čtyři reprezentativní vzorky každé skupiny. Šipky ukazují na nádorové infiltráty.

Abychom vyloučili možnost, že četnost povrchových metastatických ložisek neodpovídá aktuálnímu výskytu neoplastických lézí v celém orgánu, požádali jsme patoložku prof. MUDr. Markétu Hermanovou, PhD. o podrobnou histologickou analýzu těchto vzorků. Fixované orgány byly zality do parafinu, nařezány, obarveny hematoxylin/eosinem a každý desátý řez byl testován na přítomnost nádorových ložisek. Histologickou analýzou byl potvrzen rozdíl v četnosti plicních metastáz mezi skupinou kontrolní a skupinou MYBup, tedy nádory produkující c-Myb ve zvýšené míře metastázuji do plic s výrazně nižší frekvencí než nádory kontrolní (Obr. 22).

Histologicky byly také zkoumány játra a kosti a přítomnost/rozsah nádorových infiltrátů byl hodnocen na analogicky zpracovaných vzorcích. Ukázalo se, že všechny myši obou skupin měly nádorové infiltráty v játrech i v kostech, tedy nádory kontrolní i nádory MYBup metastázovaly do jater i kostí s 100% účinností. Semikvantitativní odečet míry infiltrace neodhalil výrazný rozdíl mezi skupinami, tedy četnost i velikost metastatických ložisek v játrech a kostech je stejná u myší, kterým byly injikovány buňky 4T1MYBup, a u myší kontrolních (Obr. 22). Dohromady tato data naznačují, že protein c-Myb se podílí na regulaci růstu prsních nádorů v syngenním myším modelu i na jejich spontánním metastázování. Ačkoli c-Myb zpomaluje růst primárního nádoru mléčné žlázy a znesnadňuje jeho metastatický rozsev do plic, jeho exprese v primárním nádoru neovlivňuje výskyt a rozsah metastatických infiltrátů v játrech a kostech.



Obr. 22. Histologická analýza plic, jater, kostí BALB/c myší po ortotopické aplikaci buněk 4T1MYBup a 4T1vektor. Fixované tkáně byly zalaty do parafinu, nařezány a obarveny hematoxylin/eosinem. (A) Průměrný počet metastatických lézí v plicích myší kontrolní skupiny (vektor) skupiny a skupiny myší, kterým byly aplikovány buňky 4T1MYBup (MYBup). Každý desátý řez byl zhodnocen z hlediska přítomnosti metastáz. (B) Semikvantitativní hodnocení jaterních metastáz: + málo četné mikroskopické léze, ++ četné mikroskopické léze, +++ četné rozsáhlé neoplastické léze. (C) Semikvantitativní hodnocení kostních metastáz: + infiltrace nádorových buněk a destrukce kosti, ++ infiltrace nádorových buněk, destrukce kosti a invaze měkkých tkání. (D) Reprezentativní histologické řezy plic, jater, kostí obou skupin myší, šipky označují nádorové infiltráty.

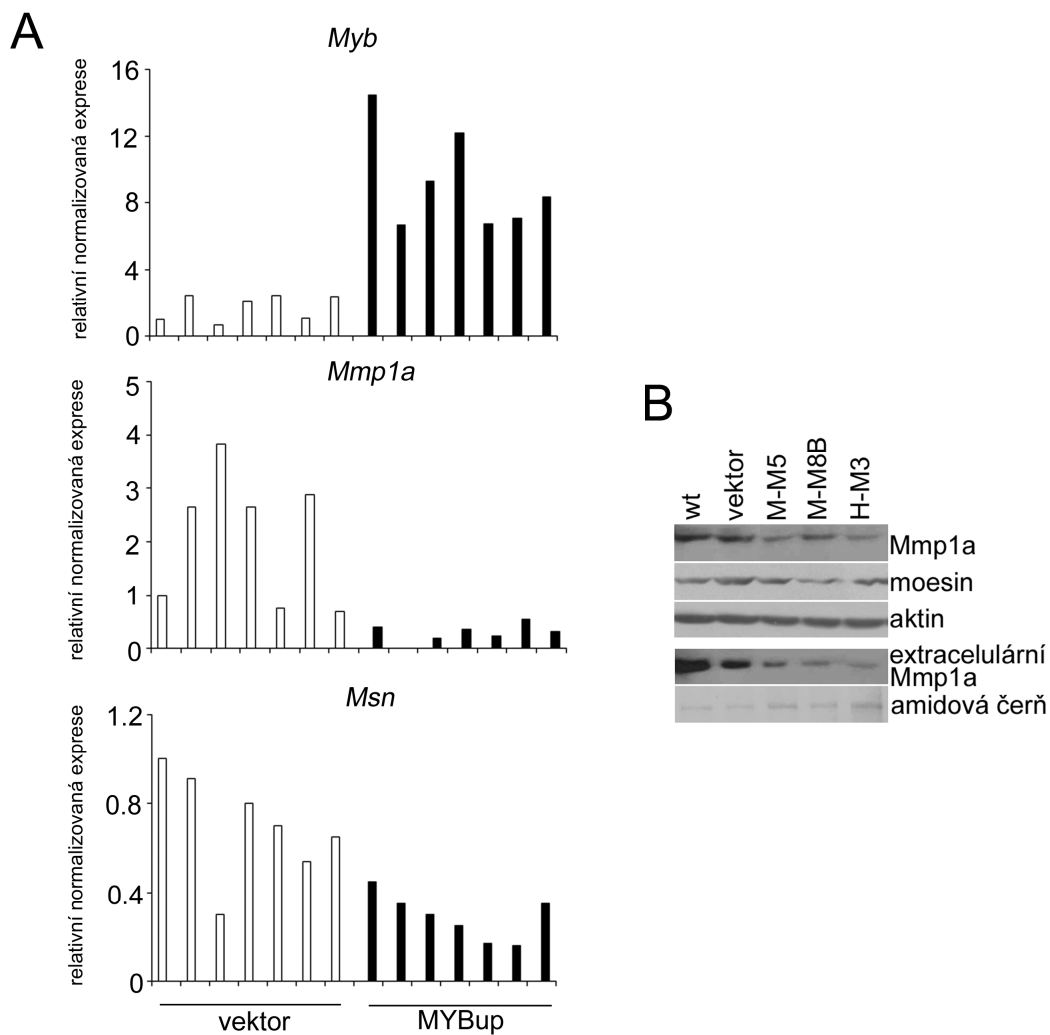
#### **4.4.2 c-Myb způsobuje deregulaci *Mmp1a* (intersticiální kolagenáza) a *Msn* (moesin) v buňkách a nádorech 4T1MYBup**

Z nádorů 4T1 jsme izolovali RNA a analyzovali expresi vybraných genů pomocí qRT-PCR. V nádorech MYBup jsme potvrdili stabilní expresi *Myb* (Obr. 23). Dále nás zajímalo relativní množství mRNA genů *Cxcr4*, *Mmp1a*, *Msn* a *Id1* jako potenciálních Myb-indukovaných efektorů buněčné invazivity. Ačkoli nádory skupiny myší, jimž byly injikovány buňky 4T1MYBup, nevykazovaly abnormální expresi genů *Cxcr4* a *Id1* v porovnání s kontrolními nádory, odlišovaly se v expresi *Mmp1a* a *Msn* (Obr. 23). Průměrné relativní množství *Mmp1a* i *Msn* mRNA je v tumorech MYBup nižší než v tumorech kontrolních, snížení exprese těchto genů na úrovni proteinů ve srovnání s kontrolními buňkami (vektor) jsme zjistili i v buněčných klonech 4T1MYBup (Obr. 23). Testovali jsme dále, zda některý z genů, jejichž deregulovanou expresi jsme zaznamenali v buňkách MDA-MB-231MYBup, je proteinem c-Myb indukován i v buněčné linii 4T1. Mimo již potvrzenou aberantní expresi *Mmp1a* jsme žádnou konzistentní změnu v expresi těchto genů (*Cdh11*, *Snai2*, *Ctsd*, *Mmp9*) mezi buňkami MYBup a kontrolními variantami linie 4T1 nepozorovali (data nejsou prezentována).

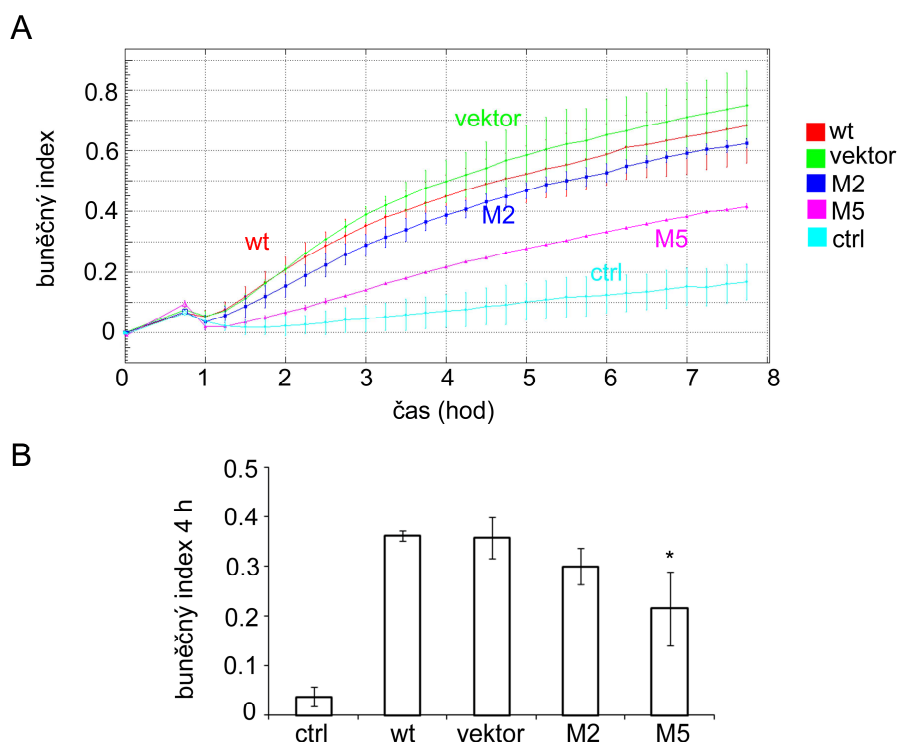
#### **4.4.3 Ektopická exprese c-Myb poškozuje transendoteliální migraci buněk MDA-MB-231**

Specifická inhibice nádorové infiltrace do plic indukovaná proteinem c-Myb, kterou jsme pozorovali při experimentech *in vivo*, vzbuzuje otázku mechanismu orgánové selektivity metastáz MYBup nádorů. Uvážíme-li rozdílný charakter endotelu kapilár v plicní tkáni a v játrech, resp. v kostní dřeni, nabízí se hypotéza poškození funkce transendoteliální migrace v buňkách MYBup, která by mohla vysvětlit jejich znevýhodnění při průchodu přes kontinuální endotel do plicní tkáně bez zasažení schopnosti infiltrovat orgány s diskontinuální vrstvou endotelu. Testovali jsme proto schopnost buněk MYBup procházet přes spojitou vrstvu endoteliálních buněk *in vitro*. Pro tento účel se používá linie HUVEC („Human Umbilical Vein Endothelial Cells“), která se nasadí na fitry destiček „transwell“ (destička CIM 16) překryté vrstvou fibronektinu a nechá se dorůst do 100% konfluence. Následně se nad tuto vrstvu přidá suspenze nádorových buněk, které procházejí skrze ni do spodní části s chemoatraktantem. Jak ukazují výsledky zobrazené na Obr. 24, schopnost procházet vrstvou endoteliálních buněk je v buňkách MDA-MB-231MYBup mírně zhoršena ve srovnání s kontrolními liniemi. Pro potvrzení výsledků experimentů *in vivo* by bylo nezbytné testovat transendoteliální migraci buněk 4T1MYBup s použitím myších endoteliálních buněk, nicméně naše výsledky naznačují možnou souvislost mezi nadprodukcí proteinu c-Myb a poruchou transendoteliální migrace.





Obr. 23. Expres *Myb*, *Mmp1a*, *Msn* v nádorech a buňkách 4T1MYBup. (A) Detekce *Myb*, *Mmp1a* a *Msn* mRNA v nádorech produkujících exogenní c-Myb (MYBup) a v nádorech kontrolních (vektor) pomocí qRT-PCR. Relativní exprese byla normalizována k expresi *Gapdh* a vztažena vždy k jednomu kontrolnímu vzorku. (B) Imunodetekce proteinů Mmp1a a moesin v lyzátech a kondiciovaných médiích buněk 4T1MYBup (M-M5, M-M8B a H-M3) a buněk kontrolních (wt, vektor). Pro kontrolu nanášení stejného množství proteinů byl v buněčných lyzátech detekován aktin a proteiny kondiciovaných médií byly nespecificky obarveny amidovou černí.



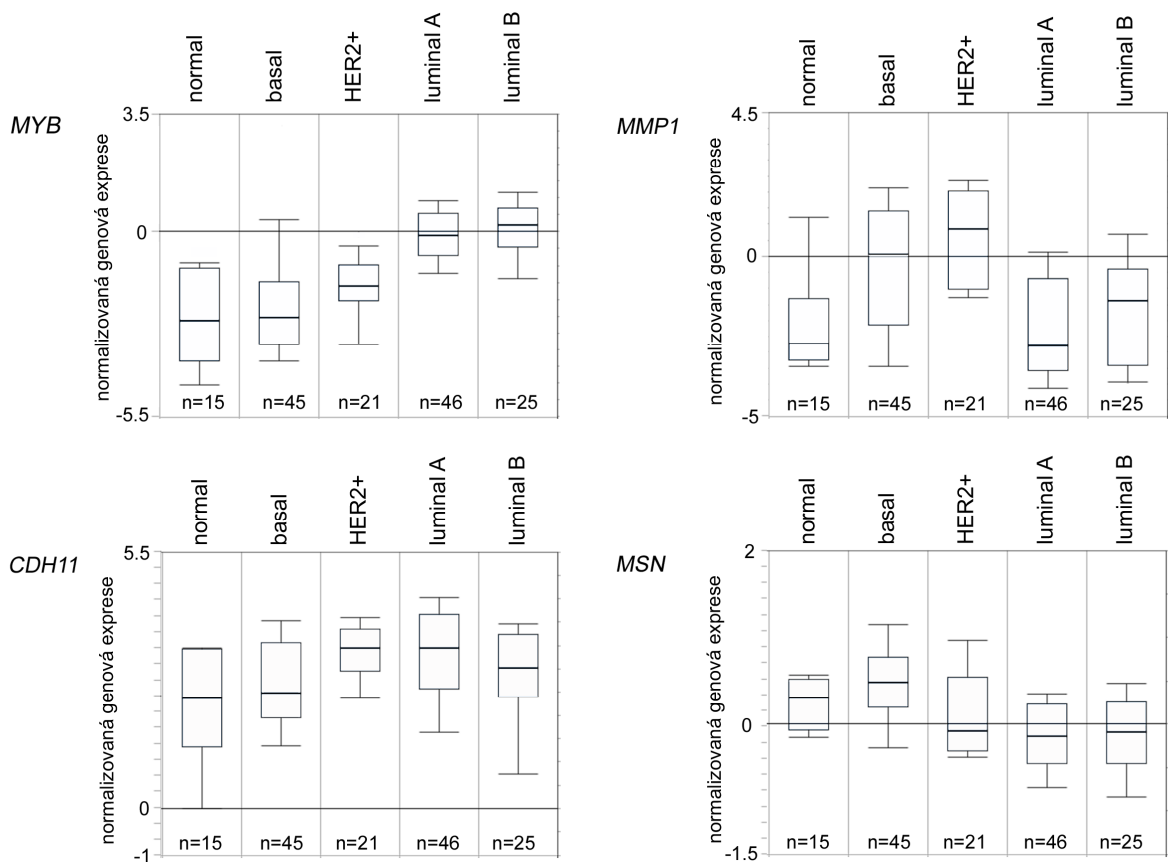
Obr. 24. Transendoteliální migrace buněk MDA-MB-231 je blokována exogenní expresí *MYB*. Buněčná linie lidských endoteliálních buněk HUVEC byla nasazena do jamek destičky CIM 16, jak je popsáno v kapitole Metody. Buňky MDA-MB-231 (varianty wt, vektor, MYBup M2 a M2) byly před analýzou transmigrace přes vrstvu endoteliálních buněk připraveny a nasazeny stejně jako při kinetické analýze buněčné migrace pomocí xCELLigence RTCA (viz Obr. 8). Do kontrolních jamek (ctrl) nebyly k buňkám HUVEC přidány žádné nádorové buňky. Hodnoty buněčného indexu byly snímány po dobu nejméně osmi hodin v intervalu 15 minut. (A) Graf představuje reprezentativní výstup jednoho měření. (B) Graf ukazuje průměrné hodnoty buněčného indexu v čase 4 hodin ze tří nezávislých experimentů. Chybové úsečky znázorňují směrodatné odchylky. Statisticky významný rozdíl ( $p < 0,05$ ) v hodnotách buněčného indexu v čase 4 hodiny mezi buňkami MYBup a buňkami kontrolními je vyznačen \*.

#### 4.4.4 Expresní profily genu *MYB* a vybraných Myb-cílových genů v klinických vzorcích prsních karcinomů z dat cDNA microarrays uložených v databázích Oncomine a GEO

##### 4.4.4.1 *MYB* a *MMP1/MSN* mRNA v prsních karcinomech luminálních a bazálních subtypů vykazuje opačný expresní profil

Abychom prozkoumali relevanci c-Myb-řízené deregulace *CTSD*, *MMP9*, *MMP1*, *CDH11*, *MSN* a *SNAI2* zjištěné *in vitro* pro onkologické pacienty s prsními karcinomy, provedli jsme analýzu genové exprese v klinických vzorcích prsních nádorů *in silico* s využitím dat a nástrojů obsažených ve veřejně dostupných databázích Oncomine ([www.oncomine.org](http://www.oncomine.org)) a Gene Expression Omnibus (GEO; [www.ncbi.nlm.nih.gov/gds](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gds)). Nejdříve nás zajímalo, zda se exprese genů *MYB*, *CTSD*, *MMP9*, *MMP1*, *CDH11*, *SNAI2* a *MSN* liší mezi jednotlivými molekulárními subtypy prsních nádorů, definovanými na základě expresních profilů, a vyznačujícími se rozdílnými klinickými a prognostickými

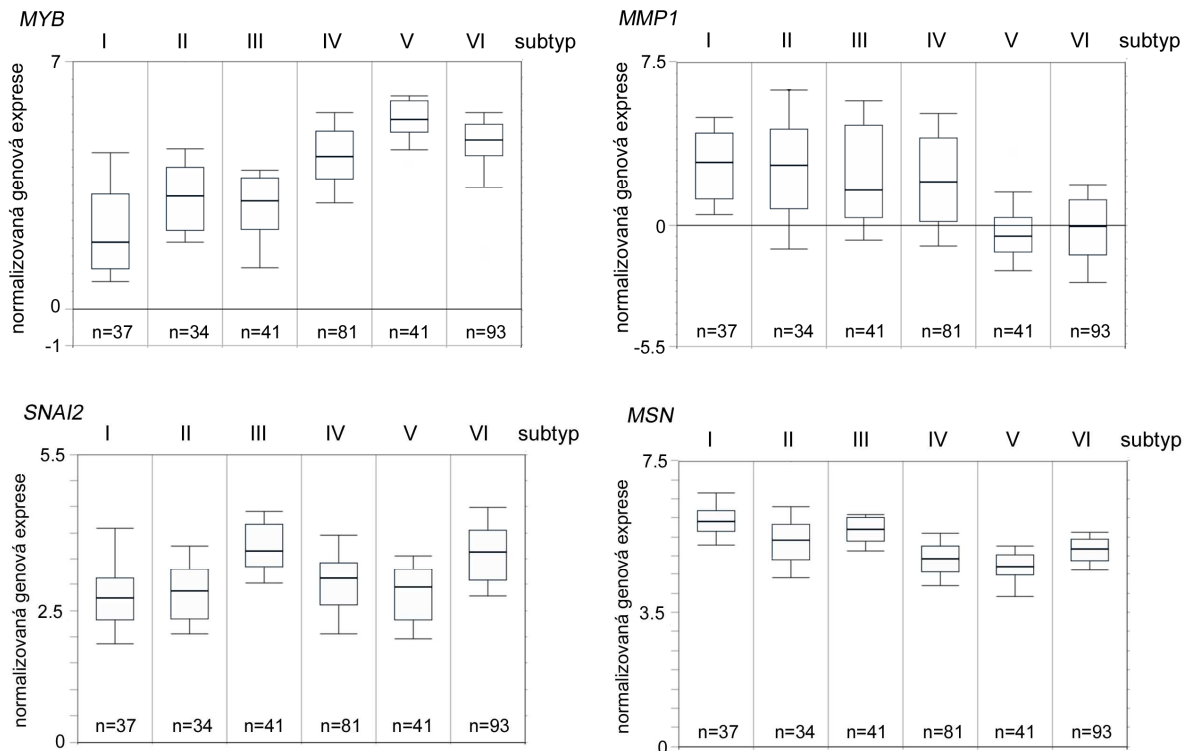
charakteristikami (Perou et al., 2000; Sørlie et al., 2001). Konkrétně jsme použili klasifikaci na základě exprese souboru 50 genů označovaných PAM50, rozdělujících prsní nádory do pěti subtypů: luminální A, luminální B, bazální, HER2 pozitivní a normální prsní tkáň podobné (Parker et al., 2009). Shodně s dříve publikovanými daty (Deisenroth et al., 2010) ukázala analýza souboru expresních dat 152 vzorků karcinomu prsu publikovaných ve studii Glück et al. (Glück et al., 2012) vysokou hladinu *MYB* mRNA v luminálních subtypech prsních nádorů, zatímco její hladina v nádorech bazálního typu byla nízká (Obr. 25). Na rozdíl od exprese *CTSD*, *MMP9* a *SNAI2*, jejíž míra se v jednotlivých subtypech prsních nádorů významně neliší (data neukázána), hladina *MMP1* a *MSN* mRNA mezi subtypy kolísá a vykazuje opačný profil než hladina *MYB* mRNA: vysokou expresí *MMP1* a *MSN* se vyznačují bazální prsní nádory, nejnižší nádory luminální (Obr. 25). Relativní množství *CDH11* mRNA je nejvyšší v nádorech HER2 pozitivních a luminálních typu A (Obr. 25).



Obr. 25. Exprese *MYB*, *MMP1*, *CDH11* a *MSN* v souboru prsních karcinomů ze studie Glück et al. (Glück et al., 2012) rozdělených do skupin podle molekulárních subtypů na nádory podobné normální prsní tkáni (normal; n=15), bazální (basal; n=45), HER2 pozitivní (HER2+; n=21), luminální A (luminal A; n=46) a luminální B (luminal B; n=25). Soubor expresních dat této studie je veřejně přístupný v databázi Oncomine a v databázi GEO (GSE22358). Počet analyzovaných vzorků v rámci skupiny je vyznačen pod každým sloupcem.

Další molekulární klasifikaci prsních nádorů založenou na expresních profilech navrhli Kao et al. (Kao et al., 2011). Analýza souboru expresních dat z 327 prsních nádorů publikovaných v této studii s použitím molekulární stratifikace v této práci navržené poskytuje podobný expresní profil námi sledovaných genů jako typizace podle PAM50:

Zatímco některé subtypy se odlišují od jiných v expresi *MYB*, *MSN* a *MMP1*, hladina *CTSD* a *MMP9* mRNA není mezi jednotlivými subtypy významně variabilní (Obr. 26). Relativní exprese *SNAI2* ani *CDH11* nekoresponduje s expresí *MYB* mRNA kladně ani záporně. Podobně jako v předchozím případě skupina nádorů vyznačujících se vysokou expresí *MYB* protoonkogenu (subtyp V) má nízkou hladinu *MMP1* a *MSN* mRNA (Obr. 26).



Obr. 26. Expresie *MYB*, *MMP1*, *SNAI2* a *MSN* v souboru prsních karcinomů ze studie Kao et al. (Kao et al., 2011) rozdělených do šesti skupin podle molekulárních subtypů. Soubor expresních dat této studie je veřejně přístupný v databázi Oncomine. Počet analyzovaných vzorků v rámci skupiny (označena nad sloupcem) je vyznačen pod každým sloupcem.

#### 4.4.4.2 Negativní korelace mezi *MYB* a *MMP1/MSN* mRNA v prsních karcinomech

Tato data mohou naznačovat možný funkční antagonismus proteinů c-Myb a *MMP1/MSN* v prsních nádorech, nicméně jejich regulační spjatost by lépe indikovala přítomnost negativní korelace mezi expresí *MYB* a *MMP1/MSN* v jednotlivých nádorech. Pro tento účel jsme analyzovali data souboru prsních karcinomů publikovaná skupinou Glück et al. (Glück et al., 2012), nyní s ohledem na úroveň exprese *MYB* a *MMP1/MSN* v jednotlivých vzorcích. Zjistili jsme statisticky významnou negativní korelaci ( $r = -0,31$ ;  $p = 0$ ;  $n = 152$ ) mezi hladinou *MYB* a *MMP1* mRNA a mezi hladinou *MYB* a *MSN* mRNA ( $r = -0,53$ ;  $p = 0$ ,  $n = 152$ ) v nádorech prsu bez ohledu na molekulární subtyp, kterému přísluší (Obr. 27). Dále nás zajímalo, zda je tato závislost patrná i v rámci skupiny nádorů jednotlivého subtypu. Z Obr. 27 je patrné, že hladina *MYB* mRNA mírně negativně koreluje s hladinou *MMP1* mRNA ve skupině lumenálních nádorů ( $r = -0,2$  pro lumenální typ A,  $n = 46$  a  $r = -0,34$  pro lumenální typ B,  $n = 25$ ) i v nádorech bazálních ( $r = -0,19$ ;  $n = 45$ ) a HER2 pozitivních ( $r = -0,34$ ;  $n = 21$ ), nicméně v nádorech podobných normální prsní tkáni je korelace pozitivní ( $r = 0,41$ ;  $n = 15$ ). Statisticky významné však závislosti v rámci menších skupin tvořených nádory jednoho subtypu nejsou. Pokud jde o korelaci relativní exprese *MYB* a *MSN* mRNA, je významně negativní v lumenálních nádorech obou typů ( $r = -0,54$ ;  $p = 0$  pro lumenální typ A a  $r = -0,53$ ,  $p$

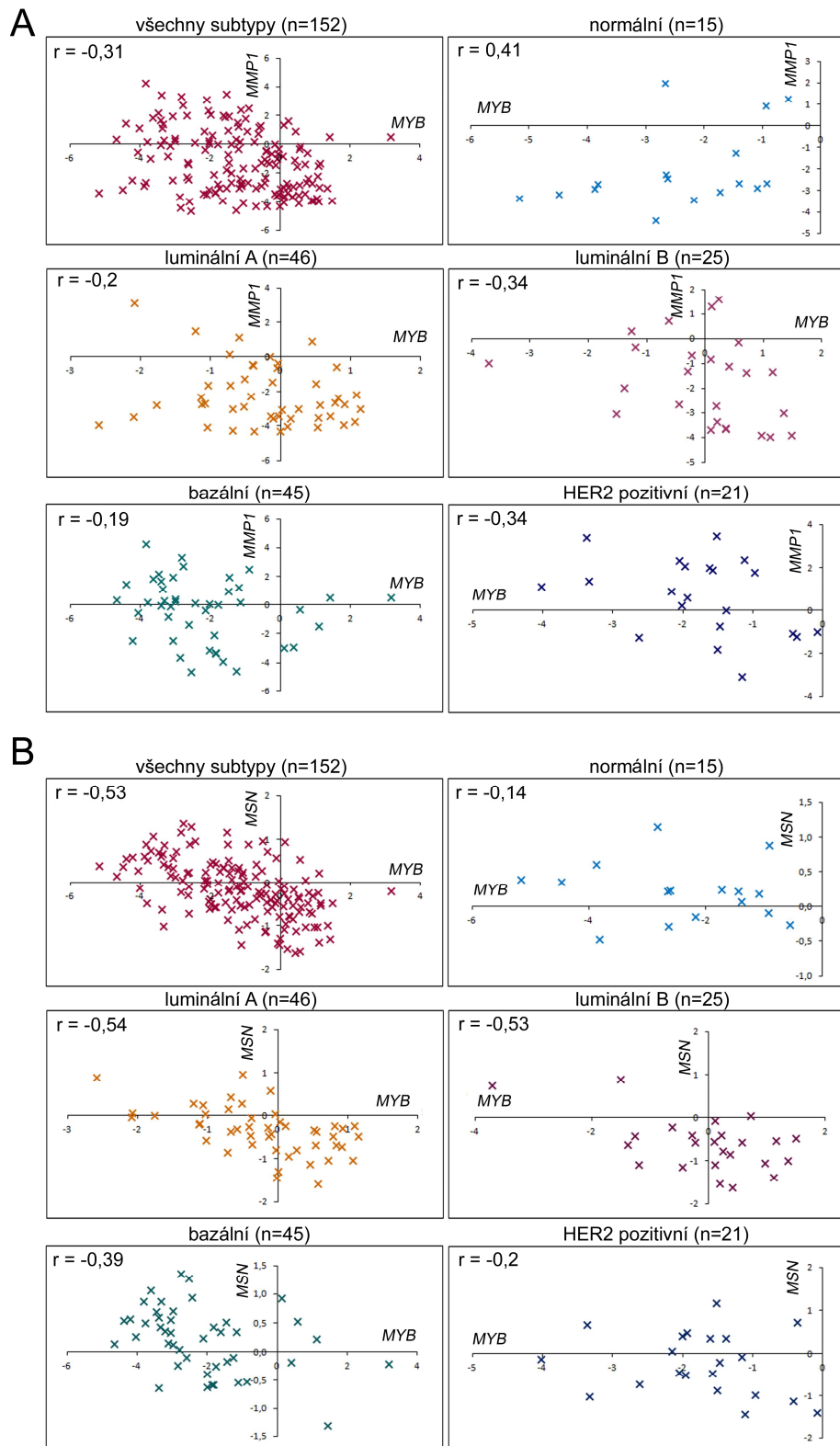
= 0,0033 pro luminální typ B) i v nádorech bazálních ( $r = -0,39$ ;  $p = 0,0047$ ), ne tak v normálních ( $r = -0,14$ ;  $p = 0,6$ ) a HER2 pozitivních ( $r = -0,2$ ;  $p = 0,38$ ).

Z popsaných dat vyplývá, že vysoká exprese genů *MMP1/MSN* předpokládá nízkou hladinu *MYB* mRNA. V případě dalších genů jsme zjistili negativní korelaci také mezi hladinou *MMP9* a *MYB* mRNA v nádorech prsu ( $r = -0,34$ ;  $p = 0$ ;  $n = 152$ ) a *SNAI2* a *MYB* mRNA ( $-0,37$ ;  $p = 0$ ,  $n = 152$ ), zatímco exprese genů *CTSD* a *MYB*, resp. *CHD11* a *MYB* nevykazovala korelaci žádnou (data neprezentována).

#### 4.4.4.3 Nádory prsu s různým organotropismem metastáz se liší v relativní expresi *MYB*, *MMP1*, *MSN* a *MMP9* mRNA

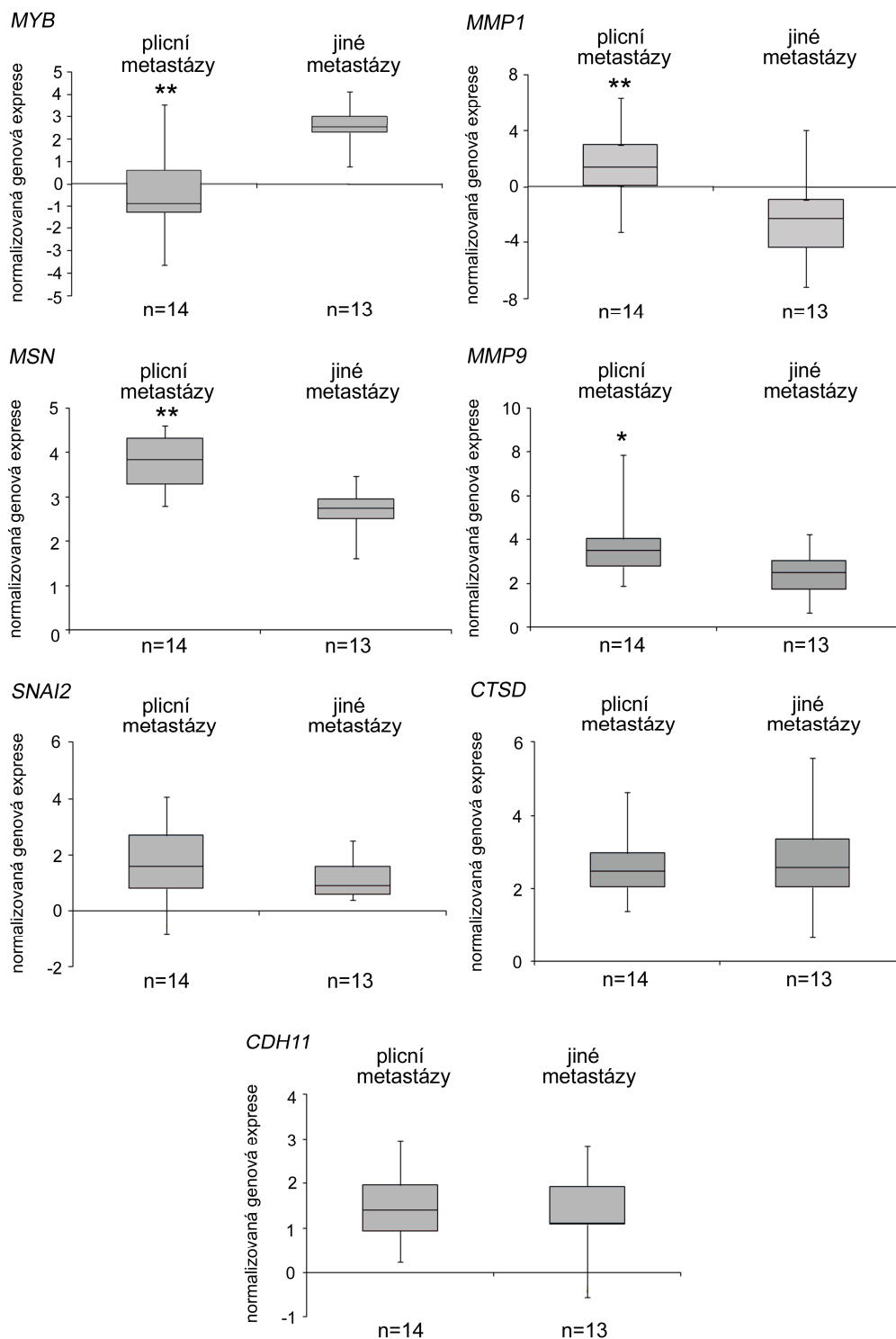
Pro získání dalších informací, které by pomohly objasnit naše pozorování, že protein c-Myb ovlivňuje směřování metastáz prsních nádorů do různých orgánů, jsme zjišťovali expresi genů *MYB*, *MMP1*, *MMP9*, *CTSD*, *CDH11*, *SNAI2* a *MSN* v dalším souboru expresních dat klinických vzorků prsních tumorů (Minn et al., 2005) uloženého v databázi Oncomine a GEO (přístupový kód GSE2603). Tento soubor 82 vzorků primárních nádorů prsu (jejich expresních profilů) obsahuje informace o přítomnosti/nepřítomnosti distálních metastáz u každého vzorku a dále jsou specifikovány orgány, které byly metastázami zasaženy. Ve skupině metastázujících nádorů se vyskytuje výrazná variabilita v expresi genu *MYB* v závislosti na cílovém orgánu postiženém sekundárním nádorem. Exprese genu *MYB* v nádorech metastázujících do plic je výrazně nižší než její úroveň v nádorech zakládajících metastázy v jiných orgánech ( $p = 0,0001$ ) (Obr. 28). Hladina *MMP1* a *MSN* mRNA je také rozdílná mezi nádory s různým tropismem metastáz, a to inverzně k expresi genu *MYB*: zvýšenou hladinou *MMP1/MSN* mRNA ve srovnání s ostatními metastázujícími nádory se vyznačují nádory tvořící plicní metastázy ( $p = 0,022$  pro *MMP1*;  $p = 0,00006$  pro *MSN*). Zatímco *MMP9* má podobný, i když méně výrazný expresní profil jako *MMP1*, exprese genu *CTSD*, *SNAI2* a *CDH11* nijak neodráží místně-specifický výskyt metastáz prsních nádorů v tomto souboru (Obr. 28).

Tentýž soubor dat získaných analýzou expresních profilů 82 vzorků prsních karcinomů (Minn et al., 2005) obsahuje údaje o délce časového období ohraničeného resekci primárního nádoru a případným zjištěním přítomnosti metastáz. Pro zhodnocení rizika časného vzniku metastáz v souvislosti s mírou exprese genů *MYB*, *MSN*, *MMP9*, *CTSD*, *SNAI2*, *CDH11* a *MMP1* v primárním tumoru jsme využili těchto údajů a metastázující nádory jsme rozdělili do skupin podle toho, zda byla přítomnost metastáz v plicích nebo mimo plíce zjištěna v období do dvou let od operace nebo později. Pacientky, u nichž se objevily metastázy v plicích do dvou let od resekce nádoru, mají mírně zvýšenou hladinu *MMP1* mRNA v primárním karcinomu ve srovnání s pacientkami, u nichž byly plicní metastázy zjištěny později (Obr. 29). Exprese genu *MYB* a *MSN* se v karcinomech pacientek s plicními metastázami významně neliší, ať vznikají během prvních dvou let nebo později (Obr. 29). Výraznější rozdíly mezi nádory metastázujícími během prvních dvou let a později v expresi těchto genů jsou zřejmě ve skupině nádorů zakládajících sekundární nádory mimo plíce. Vysoká exprese genů *MMP1*, *MMP9*, *MSN* a naopak nízká exprese *MYB* v nádorech metastázujících mimo plíce předznamenává dřívější objevení metastáz (Obr. 29). *MMP1* a *MSN* vykazují tedy opačný trend expresního profilu než gen *MYB*. Tato zjištění naznačují, že geny *MYB/MMP1/MSN/MMP9* exprimované v primárním tumoru mohou ovlivňovat nejen orgánovou selektivitu metastáz, ale částečně i pravděpodobnost jejich časného výskytu, zejména pokud mají nádory predilekci metastázovat mimo plíce. Naproti tomu exprese genů *SNAI2*, *CDH11* a *CTSD* v metastatických nádorech pravděpodobně rychlost vzniku makrometastáz neovlivňuje, protože mezi časně a pozdně metastázujícími nádory není významný rozdíl v expresi těchto genů na úrovni mRNA (data neprezentována).

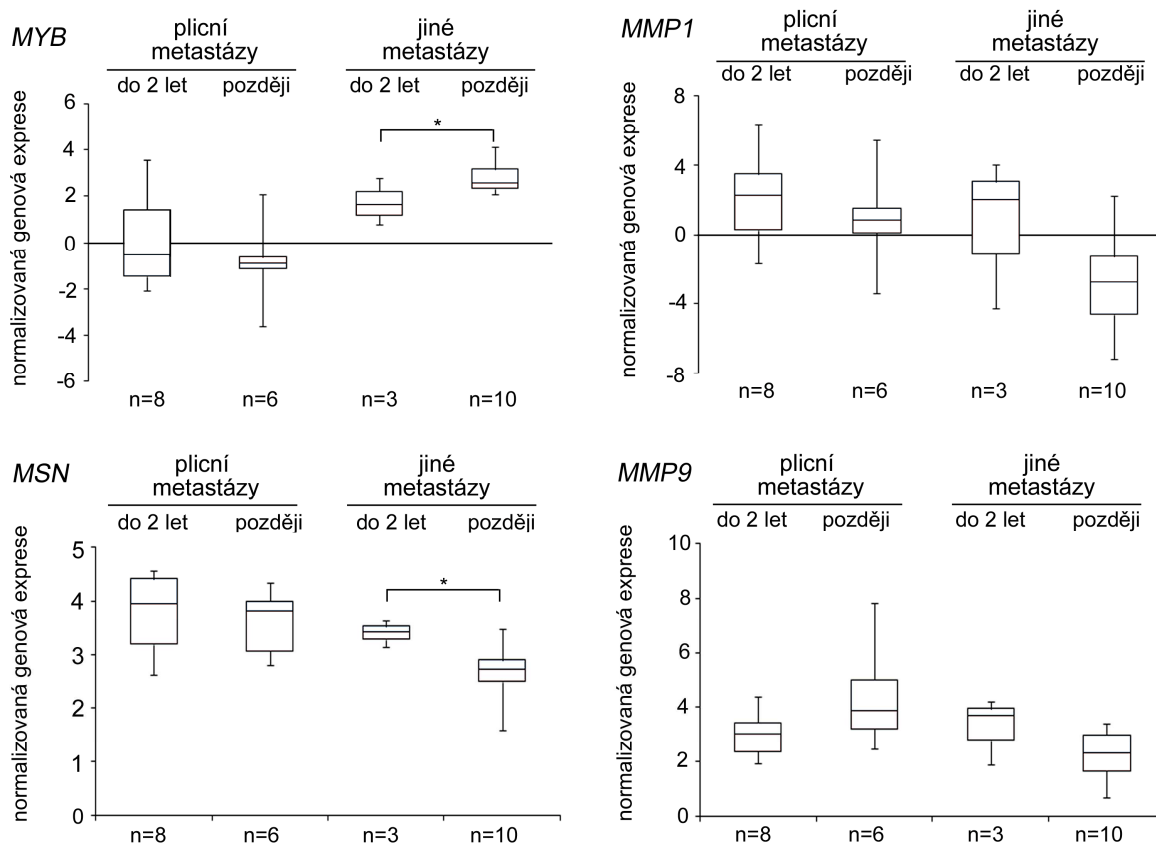


Obr. 27. Korelace exprese *MYB* a *MMP1/MSN* v jednotlivých vzorcích souboru prsních karcinomů ze studie Glück et al. (Glück et al., 2012) nerozdělených (všechny subtypy) nebo rozdělených podle molekulárních subtypů do pěti skupin (normální, luminální A, luminální B, bazální a HER2 pozitivní). Hodnoty představují jednotky normalizované genové exprese *MYB* a *MMP1* (A), resp. *MYB* a *MSN* (B) podle GEO.





Obr. 28. Expresse *MYB*, *MMP1*, *MSN*, *MMP9*, *SNAI2*, *CTSD* a *CDH11* v souboru prsních karcinomů ze studie Minn et al. (Minn et al., 2005). Metastázující primární nádory obsažené v tomto souboru (n=27) byly rozděleny na dvě skupiny podle toho, zda v průběhu studie metastázovaly do plic (plicní metastázy) nebo mimo plíce (jiné metastázy). Soubor expresních dat této studie je veřejně přístupný v databázi Oncomine a v databázi GEO (GSE2603). Počet analyzovaných vzorků v rámci skupiny je vyznačen pod každým sloupcem. Statisticky významný rozdíl v hodnotách normalizované genové exprese vyznačených genů mezi nádory metastázujícími do plic a mimo plíce jsou označeny \*\* (p<0,01) a \* (p<0,05).

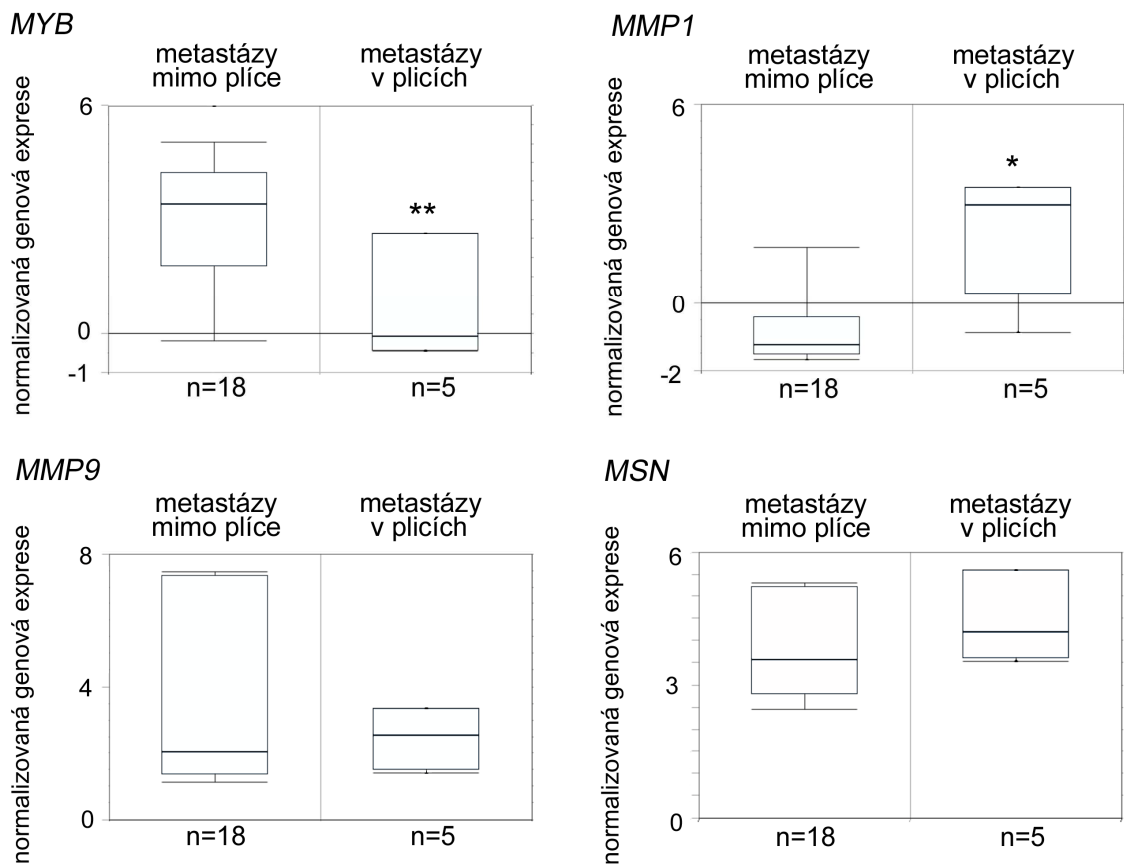


Obr. 29. Expresse *MYB*, *MMP1*, *MSN* a *MMP9* v souboru prsních karcinomů ze studie Minn et al. (Minn et al., 2005). Metastázující primární nádory obsažené v tomto souboru (n=27) byly rozděleny na dvě skupiny podle toho, zda v průběhu studie metastázovaly do plic (plicní metastázy) nebo mimo plíce (jiné metastázy) a dále podle doby přežití pacientů bez výskytu makrometastáz. Konkrétně byly odlišeny nádory metastázující během prvních dvou let od nádorů metastázujících později. Soubor expresních dat této studie je veřejně přístupný v databázi Oncomine a v databázi GEO (GSE2603). Počet analyzovaných vzorků v rámci skupiny je vyznačen pod každým sloupcem. Statisticky významný rozdíl ( $p < 0,05$ ) v relativním množství *MYB* a *MSN* mRNA mezi nádory zakládajícími makrometastázy do dvou let a nádory metastázujícími později je vyznačen \*.

#### 4.4.4.4 Metastázy prsních nádorů v plicích a mimo plíce se liší v relativní expresi *MYB* a *MMP1* mRNA

Z podobného důvodu jako soubor předchozí, to je pro data týkající se lokalizace metastáz v něm obsažená, byl pro nás zajímavý soubor expresních dat vzorků metastáz prsních karcinomů publikovaných Landemaine et al. (Landemaine et al., 2008). 23 vzorků metastáz bylo získáno z plic (n = 5), jater (n = 6), mozku (n = 4), kůže (n = 2) a kostí (n = 6) pacientů s karcinomem prsu. Srovnáním expresních profilů metastáz vzniklých v plicích a metastáz lokalizovaných mimo plíce jsme získali podobná data jako při srovnávání expresních dat z primárních nádorů kolonizujících plíce nebo jiné distální orgány. Plicní metastázy vykazují statisticky významně sníženou expresi genu *MYB* a naopak zvýšenou expresi *MMP1* a *MSN* ve srovnání s mimoplicními metastázami (Obr. 30). Expresí genů *MMP9*, *CDH11*, *SNAI2* a *CTSD* se metastázy v plicích neliší od distálních metastáz v jiných orgánech. Zjištěná data potvrzují, že geny *MYB*, *MMP1* a *MSN* exprimované prsními

nádorovými buňkami pravděpodobně ovlivňují preferenční kolonizaci některých distálních orgánů a naopak selektivně znevýhodňují metastatický rozsev do plic.



Obr. 30. Expresa *MYB*, *MMP1*, *MMP9* a *MSN* v souboru metastáz prsních karcinomů ze studie Landemaine et al. (Landemaine et al., 2008). Vzorčky sekundárních nádorů byly rozděleny na dvě skupiny podle toho, zda se jednalo o metastázy v plicích nebo mimo plíce. Soubor expresních dat této studie je veřejně přístupný v databázi Oncomine a v databázi GEO (GSE11078). Počet analyzovaných vzorků v rámci skupiny je vyznačen pod každým sloupcem. Statisticky významný rozdíl v hodnotách normalizované genové exprese vyznačených genů mezi plicními a mimoplicními metastázami jsou označeny \*\* ( $p < 0,01$ ) a \* ( $p < 0,05$ ).

## 5 DISKUSE

### 5.1 c-Myb aktivuje chemotaktickou migraci buněk prsního karcinomu, nikoli jejich chemokinetickou motilitu

Testováním buněčné migrace dvěma odlišnými přístupy jsme zjistili, že ektopická exprese *MYB* navyšuje chemotaktickou pohyblivost buněk prsních karcinomů, ale neovlivňuje chemokinetický pohyb při zacelování poranění v souvislé vrstvě buněk (Obr. 7, 8 a 13). Ačkoli chemotaxe i chemokineze jsou pro nádorové buňky určujícími faktory, které se uplatňují při metastatickém šíření nádoru, nejsou funkčně ekvivalentní. Tchou-Wong a kolegové seletovali z buněčné linie plicního karcinomu buňky vysoce chemokineticky aktivní (buňky KINE) postupným opakováním cyklů migrace v uspořádání „transwell“ bez chemoatraktantu a expanze migrujících buněk (Tchou-Wong et al., 2006). Zjistili, že buňky KINE mají ve srovnání s parentálními liniemi výhodu nejen v izotropních podmínkách, ale i v přítomnosti gradientu chemoatraktantu více migrují a navíc účinněji penetrují bariéru ECM. Autoři poukazují na odlišnou morfolonii, adhezivní vlastnosti a buněčnou architekturu buněk KINE, které připomínají buňky s améboidní motilitou. Jsou spíše kulaté, méně adherují k podkladu a mají nefokalizované uspořádání kortikálního aktinu, zatímco chemokineticky aktivní buňky se vyznačují protáhlou morfologií, předozadní polarizací a pevnými fokálními adhezemi v přední části buňky. Zatímco chemokinetická pohyblivost buňky předznamenává i její vysokou chemotaktickou aktivitu, molekulární mechanismus poskytující buňkám výhodu v chemotaktické pohyblivosti (například efektivní polarizace buňky) se nemusí projevit zvýšenou chemokinetickou motilitou (Thou-Wong et al., 2006).

S tímto korespondují výsledky našich experimentů s populací buněk MDA-MB-231 obohacenou o chemotakticky aktivní buňky (MIG4). Buňky MIG4 selektované v „transwell“ systému za přítomnosti chemoatraktantu, tedy za chemotaktických podmínek, mají spíše mezenchymální morfolonii, jsou protáhlé a polarizované (výsledky neuvedeny), nemají sníženou přilnavost k podkladu, jsou schopny invadovat Matrigel jen o málo účinněji než buňky kontrolní a za nepřítomnosti chemoatraktantu (SF) nejsou schopny chemokinetické migrace (Obr. 17). Výhoda buněk snadno polarizovatelných pro směrovaný pohyb může být v podmínkách chemokinetických ztracena, je proto možné, že buňky MYBup, podobně jako MIG4, ačkoli nadány k účinné směrované migraci, nejsou vybaveny pro chemokinetickou motilitu. Je ovšem třeba zmínit, že přestože nadměrná produkce proteinu c-Myb podporuje směrovanou migraci buněk MDA-MB-231 (Obr. 7 a 8), vysoká chemotaktická aktivita buněk MDA-MB-231 není podmíněna vysokou expresí genu *MYB*. Buňky MIG4 totiž neprodukují více *MYB* mRNA než buňky parentální, nicméně kopírují expresní profil buněk MYBup v některých jiných genech (*CTSD*, *MMP1*, Obr. 17), které proto mohou být klíčovými faktory určujícími chemotaktickou pohyblivost těchto buněk (viz dále).

#### 5.1.1 Cílové efekory chemotaktické migrace aktivované proteinem c-Myb

Expresní profilování buněk MYBup v genech relevantních pro metastazování pomocí „Human Tumor Metastasis PCR array“ (SABiosciences) a testování dalších kandidátních genů poukázalo na několik potenciálních efektorů Myb-indukované chemotaktické migrace buněk MDA-MB-231. Jako potenciální cíle Myb-indukované deregulace buněčných programů byly identifikovány geny *CTSD*, *MMP9*, *MMP1*, *CDH11*, *SNAI2* a *JNK/JUN* signální dráha.

### 5.1.1.1 Katepsin D

Deregulace genu *CTSD* byla v buňkách MDA-MB-231MYBup zjištěna na úrovni produkce mRNA, proteinu i jeho sekrece z buňky (Obr. 15). Transkripční testy ukázaly Myb-dependentní aktivaci promotoru lidského genu *CTSD* a *in silico* bylo nalezeno několik potenciálních Myb-vazebných míst v promotoru tohoto genu (Obr. 15 a 16). Přestože regulační sekvence genu *CTSD* nebyly dosud funkčně charakterizovány s ohledem na Myb-řízenou transaktivaci, mRNA *CTSD* byla identifikovaná mezi transkripty, jejichž hladina roste s exogenní expresí *MYB* v buňkách prsních karcinomů v celogenomové expresní studii Rushton et al. (Rushton et al., 2003). Katepsin D je lysozomální aspartátová proteáza, která je syntetizovaná jako neaktivní pre-pro-katepsin a je proteolyticky aktivována v kyselém prostředí lysozomu. Deregulace katepsinu D je spojena s karcinomy prsu, prostaty, kolorekta a s dalšími nádory (Leto et al., 2004; Benes et al., 2008; Pruitt et al., 2012). Prsními nádorovými buňkami je katepsin D sekretován do extracelulárního mikroprostředí, kde působí autokrinně i parakrinně na stromální buňky asociované s nádorem (Masson et al., 2010). Je považován za negativní prognostický marker pro pacientky s karcinomem prsu (Foekens et al., 1999).

Funkční testování katepsinu D jako efektoru Myb-aktivované chemotaktické migrace farmakologickou inhibicí nebo genetickým vypnutím pomocí siRNA ukázalo závislost migrační aktivity buněk MYBup na expresi a/nebo enzymatické aktivitě katepsinu D (Obr. 18 a 19). Pro farmakologickou inaktivaci katepsinu D jsme použili metylester pepstatinu A, což je derivát pepstatinu A propustný pro buněčnou membránu, který inhibuje aspartátové proteázy. Nemodifikovaný pepstatin A migraci buněk MDA-MB-231MYBup neovlivňuje (výsledky neuvedeny), ale pepstatin A metylester i siRNA specifická pro *CTSD* migrační aktivitu buněk MYBup významně omezují (Obr. 18 a 19). Z výsledků vyplývá, že katepsin D podporuje migraci buněk MDA-MB-231. Tomu napovídá také mírné zvýšení exprese mRNA *CTSD* v buňkách MDA-MB-231 MIG4. Bylo popsáno, že indukce katepsinu D v buňkách 4T1 a HUVEC zvyšuje chemotaktickou migraci (Hu et al., 2008) a toto zvýšení je senzitivní k inhibici enzymatické aktivity katepsinu D. Jako mechanismus indukované chemotaxe byla navržena enzymatická aktivace MMP9 katepsinem D (Hu et al., 2008). Přestože i v buňkách MDA-MB-231MYBup jsme pozorovali zvýšenou produkci MMP9, není její aktivita pravděpodobně nezbytná pro chemotaktickou migraci těchto buněk, jak ukázaly pokusy s inhibicí MMP pomocí širokospektrého inhibitoru GM6001 (Ilomastat). Proteolytické zpracování chemokinů byla také navrženo jako možný mechanismus, kterým katepsin D moduluje migraci buněk (Wolf et al., 2003). Katepsin D může být pravděpodobně enzymaticky aktivní i mimo kyselé prostřední lysozomů, například extracelulárně v lokálním mikroprostředí nádoru, které je kyselější než normální tkáň, nebo za určitých okolností může štěpit cílové proteiny i v cytozolu (Zaidi et al., 2008; Benes et al., 2008; Masson et al., 2010; Laurent-Matha et al., 2012). Naše výsledky s inhibicí extracelulárního katepsinu D pepstatinem A nepronikajícím do buňky ukazují, že štěpení extracelulárních proteinů pravděpodobně nezprostředovává účinek katepsinu D na migraci. Kromě degradace proteinů v lysozomech se katepsin D podílí na proteolytické aktivaci biologicky aktivních molekul, jako je osteokalcin, osteopontin, prolaktin, FGF, katepsin B a další (Benes et al., 2008; Masson et al., 2010). Mnoho substrátů katepsinu D bylo identifikováno *in vitro*, včetně cytoskeletálních proteinů jako je aktin a  $\alpha$ -aktinin, ale endogenní substráty katepsinu D dosud nebyly přesně definovány (Masson et al., 2010). Je možné, že katepsin D stimuluje migraci buněk MDA-MB-231 intracelulárním štěpením dosud neznámého substrátu.

Můžeme také uvažovat, že katepsin D stimuluje chemotaktický pohyb buněk MYBup nezávisle na své enzymatické aktivitě a efekt metylesteru pepstatinu A je důsledkem inhibice jiných aspartátových proteáz nebo nespécifického působení (Okada et al., 2003; Yoshida et al., 2006). Laurent-Matha a kolegové zjistili, že i katalyticky inaktivní forma katepsinu D

stimuluje chemotaktickou motilitu lidských fibroblastů (Laurent-Matha et al., 2005). Protože zjistili aktivaci Ras/MAPK signální dráhy v těchto buňkách, nastínili možnost, že katepsin D nezávisle na své enzymatické aktivitě ovlivňuje intracelulární signalizace vazbou na receptor na povrchu buněk. Nezávisle na své enzymatické aktivitě katepsin D, resp. propeptid katepsinu D/aktivační peptid (AP), indukuje změny v genové expresi prsních nádorových buněk (Benes et al., 2006). Indukce GTPázy Cdc42, klíčového regulátoru buněčné motility a reorganizace cytoskeletu, je jedním z důsledků signalizace, kterou spouští AP katepsinu D (Benes et al., 2006). Dramatické změny cytoskeletu, fokálních adhezí a výběžků cytoplazmy byly popsány u myších fibroblastů neexprimujících katepsin D získaných z plic *Ctts*<sup>-/-</sup> myši (Koch et al., 2013). Proteomická analýza *Ctts*<sup>-/-</sup> buněk odhalila skupinu proteinů účastnících se uspořádání cytoskeletu a membránových výběžků, které se odlišně exprimují v důsledku absence funkčního katepsinu D, například Mtap2, Myh9, Tubb4, Rdx a Actr10 (Koch et al., 2013). Nedávno bylo popsáno, že transmembránový receptor LRP1 na povrchu fibroblastů váže katepsin D (Beaujouin et al., 2010). Receptor LRP1 exprimují i prsní nádory a bylo popsáno, že signalizace jím aktivovaná může vést k podpoře buněčné motility (Li et al., 1998; Song et al., 2009). Dedieu et al. zjistili, že specifické vypnutí signalizace zprostředkované receptorem LRP1 znemožňuje buněčnou migraci v důsledku dramatické reorganizace cytoskeletu: buňky netvoří cytoplazmatické výběžky, pevněji přisedají k podkladu a vykazují odlišnou distribuci proteinů asociovaných s aktinem (Dedieu et al., 2008). Můžeme shrnout, že katepsin D stimuluje chemotaktickou migraci buněk MDA-MB-231MYBup proteolytickým štěpením neznámého substrátu, nebo interakcí se svým povrchovým receptorem nebo jinými proteiny, nebo kombinací katalytické aktivity a vazebných vlastností.

Katepsin D je ve zvýšené míře produkován nádorovými buňkami, v nichž byla indukovaná předčasná senescence (Byun et al., 2009). Buňky MDA-MB-231MYBup nevykazují fenotyp senescence, mají jen mírně zpomalené buněčné dělení a přestože ve zvýšené míře produkují katepsin D, který je používán jako marker buněčné senescence, nevykazují aktivitu SA-β-gal („senescence-associated β-galactosidase“), kterou se vyznačují specificky senescentní buňky (výsledky neuvedeny).

#### 5.1.1.2 MMP1/9

V buňkách MYBup jsme dále pozorovali deregulovanou expresi proteáz MMP1 a MMP9: zatímco expresi genu *MMP9* protein c-Myb aktivuje, hladina mRNA *MMP1* a inter- i extracelulární množství proteinu MMP1 jsou v důsledku ektopické exprese *MYB* sníženy (Obr. 15). Naše data souhlasí s nedávno publikovaným sdělením, že genetická manipulace exprese *MYB* způsobuje odpovídající změny v expresi *MMP9*: exogenní c-Myb aktivuje expresi *MMP9* a jeho suprese způsobuje pokles hladiny proteinu MMP9 za prozánětlivé signalizace (Bhattarai et al., 2011). Pokud je nám známo, negativní regulace exprese *MMP1* řízená proteinem c-Myb ještě popsána nebyla. Přestože deregulace *MMP1/9* se v buňkách MYBup projevuje také na úrovni mRNA, neprokázali jsme, že protein c-Myb aktivuje transkripci z promotoru těchto genů v reportérových plazmidech (Obr. 15). Přestože transkripci většiny svých cílových genů ovlivňuje c-Myb přímou vazbou na DNA regulačních oblastí, bylo popsáno, že může regulovat genovou expresi i nepřímo (Bein et al., 1998; Tanno et al., 2002). Protože jsme nezjistili změnu stability *MMP1/9* mRNA v buňkách MYBup (výsledky neuvedeny), domníváme se, že strukturální a funkční rozdíly mezi přechodně transfekovanou plazmidovou DNA a genomovými templáty (například nedostatečná chromatinizace plazmidového templátu; Smith, Hager, 1997) mohou vysvětlit, proč c-Myb neaktivuje transkripci reportérového genu z promotoru *MMP1/9* v plazmidovém konstrukt. Podmínkou transaktivace některých cílových genů proteinem c-Myb je vazba c-Myb na chromatinový templát a indukce remodelace chromatinu (Ko et al., 2008; Wilczek et al., 2009).



Podobně jako v případě katepsinu D, neexistuje mnoho informací o funkci proteolytických enzymů MMP1/9 v řízení buněčné migrace, ačkoli s invazivitou buněk jsou spojovány často. Wang et al. ukázali, že chemokinetická motilita („wound-healing“) buněk melanomu je citlivá ke genetickému vypnutí *MMP1* (Wang et al., 2012), nicméně mechanismus tohoto účinku blíže nezkoumali. Naše experimenty s GM6001 naopak dokazují, že za podmínek inhibice všech MMP mírně vzroste migrační aktivita buněk MDA-MB-231MYBup (Obr. 19). Zdá se tedy, že proteázy MMP (některá z nich) chemotaktickou motilitu těchto buněk brzdí. Tento jev poznatek zajímavě doplňují expresní data linie MIG4 (subpopulace linie MDA-MB-231 obohacená o chemotakticky aktivní buňky), která ukazuje významné snížení hladiny *MMP1* i *MMP9* mRNA ve srovnání s parentálními liniemi (Obr. 17). Přestože jsme netestovali funkční relevanci tohoto snížení pro migraci MIG4 buněk, tato data by mohla indikovat, že exprese MMP1/9 brání účinnému směřovanému pohybu buněk MDA-MB-231. To by mohlo znamenat, že vypnutí *MMP1* v buňkách MYBup funkčně souvisí s účinnou migrací těchto buněk. Molekulární mechanismus tohoto působení není znám.

### 5.1.1.3 Slug a kadherin 11

Jako další z potenciálních efektorů Myb-aktivované buněčné migrace byl identifikován transkripční faktor Slug (kódovaný genem *SNAI2*) a kadherin 11 (*CDH11*). Exprese obou těchto genů je v buňkách MDA-MB-231 produkujících exogenní c-Myb navýšena ve srovnání s kontrolními liniemi (Obr. 14). Akumulace *SNAI2* mRNA a proteinu Slug vlivem zvýšené hladiny proteinu c-Myb byla zaznamenána už dříve (Karafiat et al., 2005; Tanno et al., 2010; Cesi et al., 2011), *CDH11*, pokud víme, dosud mezi Myb-cílové geny zařazen nebyl.

Slug je transkripční represor klíčového epiteliálního membránového proteinu E-kadherinu a tedy významný regulátor EMT (Peinado et al., 2007); kadherin 11 (OB-kadherin) je adhezivní molekula zajišťující homotypické interakce osteoblastů a dalších buněk a používá se jako jeden z mnoha mezenchymálních markerů zejména v buňkách nádorů prsu a prostaty (Hazan et al., 2004; Sarrió et al., 2008). Nadprodukce těchto proteinů nasvědčuje indukci EMT v buňkách MYBup. Jak bylo zmíněno v kapitole Úvod, na funkci proteinu c-Myb v indukci EMT již bylo v poslední době upozorněno mimo jiné v souvislosti s prsními karcinomy (Tanno et al., 2010; Cesi et al., 2011). Abychom podpořili závěr o indukci EMT v buňkách MDA-MB-231MYBup, detekovali jsme další markery EMT, jako je E-kadherin, vimentin a fibronectin. Nejistili jsme však významnou odlišnost v expresi těchto proteinů mezi buňkami MYBup a kontrolními liniemi (Obr. 14, gen *FNI* kódující fibronectin je součástí „Human Tumor Metastasis PCR array“). Buňky MDA-MB-231 exprimují mezenchymální marker vimentin ve vysoké míře a naopak epiteliální E-kadherin jsme nebyli schopni imunodetektovat vůbec, což svědčí o vysoce mezenchymálním charakteru parentální linie. Je proto možné, že další posun směrem k mezenchymálnímu fenotypu není už navzdory nadprodukci Slug v buňkách MDA-MB-231MYBup možný.

Mohli bychom i přes nedostatečnost průkazu EMT na úrovni proteinových markerů v buňkách MYBup uvažovat o zapojení efektorů EMT proteinů Slug a kadherinu 11 do nárůstu migrační aktivity v buňkách MYBup. Pokusy, během nichž jsme testovali migrační aktivitu buněk MYBup, ve kterých byla dočasně vypnuta exprese *SNAI2* a *CDH11* pomocí siRNA, však prokázaly postradatelnost proteinů Slug a kadherinu 11 pro Myb-indukovanou chemotaktickou migraci (Obr. 18). Tyto výsledky naznačují, že c-Myb v buňkách MDA-MB-231 aktivuje buněčnou migraci nezávisle na EMT. Přestože většina studií o Myb-řízené buněčné migraci ji spojuje se získáním mezenchymálních vlastností, Chen et al. popisují buněčnou migraci vyvolanou exogenním proteinem c-Myb bez indukce EMT (Chen et al., 2010a). Jako cílovou molekulu proteinu c-Myb zodpovědnou za tento efekt identifikovali osteopontin, tj. matricelulární protein kódovaný genem *SPP1*. My jsme v buňkách MDA-MB-

231MYBup deregulaci osteopontinu nezjistili (Obr. 14). Můžeme shrnout, že c-Myb aktivuje buněčnou migraci dosud nepopsaným způsobem nezávisle na EMT.

Bylo demonstrováno, že exogenní kadherin 11 podporuje motilitu nádorových buněk prostaty interakcí své cytoplazmatické domény s adaptorovými proteiny (Huang et al., 2010) a podobně působí v buňkách prsních karcinomů (Nieman et al., 1999). Kadherin 11, ač považován za marker invazivních nádorů a spojován se špatnou prognózou (Pishvaian et al., 1999; Chu et al., 2008), byl nedávno identifikován jako nádorový supresor indukující apoptózu a blokující migraci nádorových buněk remodelací buněčné architektury (Marchong et al., 2010; Li et al., 2012b). S ohledem na tuto ambivalentní funkci kadherinu 11 v řízení buněčné migrace je zajímavý námi pozorovaný pokles *CDH11* mRNA v chemotakticky aktivních buňkách MDA-MB-231 MIG4 (Obr. 17). Ačkoli jsme netestovali jeho význam pro migraci buněk MIG4, výrazný úbytek *CDH11* mRNA koresponduje s nárůstem migrační aktivity buněk MDA-MB-231.

#### 5.1.1.4 Signální dráha JNK/Jun

Ačkoli protonkogen *JUN* patří mezi charakterizované cílové geny transkripčního faktoru c-Myb (Quintana et al., 2011), v buňkách MDA-MB-231MYBup jsme nezjistili výraznou deregulaci hladiny *JUN* mRNA/proteinu, nicméně aktivita proteinu c-Jun reprezentovaná množstvím jeho fosforované (Ser73) formy je v buňkách s exogenním proteinem c-Myb zvýšená (Obr. 14). c-Jun spolu s dalšími proteiny (rodiny Jun, Fos, Atf, Maf) tvoří transkripční faktor AP1. Fosforylaci proteinu c-Jun v místě Ser73 zajišťuje c-Jun N-terminalní kináza/protein kináza aktivovaná stresem JNK/SAPK (Vogt, 2001), jejíž zvýšenou fosforylaci jsme detekovali za podmínek sérové deprivace v buňkách MYBup ve srovnání s kontrolními buňkami (výsledky neuvedeny). Není nám známo, jakým způsobem c-Myb aktivuje JNK/Jun signální dráhu. Může ovlivňovat molekuly nebo faktory aktivující JNK kinázu (např. kinázy MKK4, MKK7, ASK1, MLK1, TAK1), nebo proteiny zajišťující její inaktivaci (Davis, 2000). Z těchto je v tomto kontextu třeba zmínit fosfatázy dvojí specifity (DUSP, „dual-specificity phosphatases“), které zajišťují defosforylaci MAPK kináz, konkrétně pro JNK kinázu jsou to DUSP1, 4, 8, 10, 16 (Bermudez et al., 2010). *DUSP16* byl identifikovaný mezi geny podléhající transkripční represi řízené proteinem c-Myb (Zhao et al., 2011). Akumulace mRNA *DUSP16* spolu s mRNA *DUSP1* v důsledku vypnutí exprese *MYB* byla potvrzena také při celogenomové expresní analýze leukemických buněk (Zuber et al., 2011, SI). Hypotézou vysvětlující Myb-aktivaci JNK signální dráhy by mohla být deregulace exprese/aktivity fosfatáz DUSP1/16 v buňkách MYBup.

Zkoumali jsme účinek inhibice signální dráhy JNK na migraci buněk MDA-MB-231MYBup a zjistili jsme, že přítomnost inhibitoru SP600125 snižuje schopnost účinné směrované migrace těchto buněk (Obr. 19). Z toho vyplývá, že aktivace signální dráhy JNK by mohla být jedním z mechanismů, jimiž c-Myb podporuje chemotaktickou motilitu buněk MDA-MB-231. Signální dráha JNK/c-Jun/AP1 se (ač v závislosti na buněčném kontextu) podílí na regulaci proliferace, přežití/buněčné smrti, angiogeneze a migrace buněk (Eferl, Wagner, 2003; Xia, Karin, 2004).

Schopnost remodelovat aktinový cytoskelet je klíčový faktor, kterým signalizace JNK/Jun uděluje buňkám migrační potenciál. Delece endogenu *Jun* v myších fibroblastech vede ke změně buněčné morfologie, ztrátě polarizace a migrační aktivity (Jiao et al., 2008). Tento fenotyp je ztracen při obnovení exprese genu *Jun*. Účinek proteinu c-Jun na migraci myších fibroblastů je přisouzen c-Jun-dependentní aktivaci kinázy Src, která zajišťuje inhibici kinázy ROCK a způsobuje remodelaci fokálních adhezí a destabilizaci stresových vláken F-aktinu, čímž podporuje buněčnou migraci (Jiao et al., 2008). Redukcí buněčné adherence a transaktivací genu kódujícího chemokin CCL2 stimuluje c-Jun migraci epiteliálních buněk mléčné žlázy (Jiao et al., 2010). Ačkoli autoři zjistili i nadprodukcii chemokinu SCF („stem

cell factor“) v důsledku transkripční aktivace proteinem c-Jun, nepotvrdili účinek SCF na migraci epiteliálních buněk mléčné žlázy. c-Jun-řízená exprese chemokinu SCF však byla identifikována jako mechanismus zodpovídající za zrychlenou migraci myších fibroblastů (Katiyar et al., 2007). c-Jun navíc zvyšuje schopnost fibroblastů udržovat stálý směr migrace (Katiyar et al., 2007). Endogenní c-Jun je nezbytný také pro chemotaktickou migraci fibroblastů vyvolanou působením TGF $\beta$  (Janowski et al., 2011). Konstitutivní aktivita JNK uděluje buňkám prsních nádorů mezenchymální morfologii a migrační schopnosti akumulací IRS-2 („insulin receptor substrate 2“), adaptorové signální molekuly, která podléhá c-Jun/AP1 transkripční regulaci (Cui et al., 2006; Wang et al., 2010). Suprese signalizace JNK vede k poklesu exprese genu *MPRIP*, který kóduje protein interagující s myosin fosfatázou a Rho kinázou a je důležitý pro remodelaci aktinového cytoskeletu (Ono et al., 2008). Podobně protein asociovaný s aktinem filamin A (resp. jeho ortolog cherrio) byl nedávno identifikován jako JNK responzivní gen modulující buněčnou motilitu (Külshammer, Uhlirova, 2012).

Nezávisle na proteinu c-Jun a transkripční regulaci umožňuje JNK buněčnou migraci také rozvolněním kontaktů buňky s podkladem fosforylací paxilinu, což je adaptorový protein fokálních adhezí (Huang et al., 2003), nebo  $\beta$ -kateninu (Lee et al., 2009). Přímé spojení mezi kinázou JNK a reorganizací cytoskeletu, která ústí v buněčnou migraci, představuje protein p150-Spir, což je člen rodiny WASP proteinů asociovaných s aktinem, který je fosforylací kinázou JNK aktivován k řízení nukleace aktinu (Otto et al., 2000). Naše pokusy zaměřené na určení míry adherence buněk MYBup v kultivačním systému E-destiček pro xCELLigence RTCA neukázaly rozdílnou přilnavost těchto buněk k podkladu (Obr. 9), pravděpodobně tedy JNK/Jun nepůsobí na migraci buněk MYBup redukcí buněčné adheze. Protože c-Jun není jediným substrátem kinázy JNK účastnícím se regulace buněčné migrace, bylo by nutné ověřit efekt specifické deplece c-Jun na pohyblivost buněk MYBup pro potvrzení funkčního příspěvku tohoto proteinu. Také individuální inhibice *JNK* prostřednictvím siRNA by byla nutná pro vyloučení nespecifických účinků inhibitoru SP600125 (Bain et al., 2003) a potvrzení funkce JNK. Nicméně můžeme shrnout, že inhibice signální dráhy JNK prostřednictvím SP600125 blokuje chemotaktickou motilitu buněk MDA-MB-231MYBup buď v závislosti na aktivitě proteinu c-Jun nebo nezávisle na ní.

### 5.1.1.5 Další potenciální efekty

Mezi 84 geny obsaženými v „Human Tumor Metastasis PCR array“ byly v buňkách MYBup identifikovány další deregulované geny (kromě výše uvedených), a to *MCAM*, *ITGB3*, *HTATIP2* a *IL18* (Tabulka 1). Expresi *ITGB3* jsme v buňkách MYBup testovali na úrovni proteinu, ale nepozorovali jsme významnou změnu v množství integrinu  $\beta 3$  v důsledku ektopické exprese *MYB* (Obr. 14). Relativní množství proteinů MCAM, TIP30 (HIV-1 Tat interaktivní protein 2, 30 kDa kódovaný genem *HTATIP2*) a IL18 jsme v buňkách MDA-MB-231MYBup v rámci této studie nezjišťovali. Zůstávají tedy kandidátními molekulárními efekty Myb-indukovaných změn v buňkách MDA-MB-231 a jejich expresi a funkční význam v buňkách MYBup je třeba dále ověřit. MCAM (CD146) je povrchová adhezivní molekula zajišťující homo- a heterotypické mezibuněčné interakce. Je spojena s metastázováním a špatnou prognózou u různých nádorů, mimo jiné melanomů. V buňkách prsních karcinomů stimuluje buněčnou migraci, invazivitu a tumorigenezi (Zabouo et al., 2009; Zeng et al., 2011; Zeng et al., 2012). Interleukin 18 je cytokin důležitý v imunitní odpovědi, jehož sekrece je zvýšena v některých nádorech (Park et al., 2007; Metwally et al., 2011). Působí jako angiogenní faktor a podporuje migraci a metastázování melanomů, nádorů žaludku a plic (Jiang et al., 2003; Jung et al., 2006). Naopak protein TIP30 byl klasifikován jako supresor metastáz u karcinomů prsu i dalších nádorů (Zhao et al., 2007; Tong et al., 2009). Nárůst jeho exprese v buňkách MYBup tedy zřejmě nepřispívá k migraci buněk MDA-MB-231MYBup, ale jeho vliv na chování buněk exprimujících exogenní Myb *in vivo* nelze

vyločit. Proto další výzkum zaměřený na tyto proteiny by mohl přispět k objasnění ambivalentní funkce proteinu c-Myb v prsních nádorech.

## **5.2 c-Myb reguluje invazivitu buněk prsního karcinomu *in vitro* v závislosti na složení ECM**

Při testování invazivity buněk s modifikovanou expresí genu *MYB* jsme použili dva typy náhrad ECM, Matrigel a kolagen typu I. Složení těchto matrixových bariér odráží biologickou odlišnost intersticiální ECM a bazální membrány. Matrigel, neboli extrakt bazální membrány, se často používá pro stanovení invazivních schopností nádorových buněk *in vitro*. Na základě invaze bariéry tvořené Matrigelem *in vitro* se odhaduje schopnost nádorových buněk penetrovat bazální membránu, jejíž hlavní složky jsou kolagen typu IV, laminin, perlekan, nidogen (Li et al., 2012a; Montgomery et al., 2012). Na druhou stranu bariéra tvořená kolagenem I, proteinem převažujícím v intersticiální matrix, je *in vitro* účinně penetrována buňkami vybavenými pro průnik stromální ECM (Sodek et al., 2008; Li et al., 2012a; Montgomery et al., 2012). Naše výsledky ukazují, že ačkoli buňky MYBup snáze procházejí bariérou tvořenou Matrigelem než buňky kontrolní, nevykazují zvýšenou schopnost invadovat matrix tvořenou kolagenem I (Obr. 10, 11 a 12). Schopnost degradovat složky ECM je nezbytnou podmínkou lokální invaze nádoru i metastázování. Přestože při testování invazivity nádorových buněk *in vitro* převažuje používání Matrigelu, penetrace intersticiální matrix může být kritickým faktorem limitujícím metastatické šíření nádoru (Brinckerhoff et al., 2000; Sodek et al., 2008).

### **5.2.1 Cílové efekty Myb-regulované penetrace ECM bariér *in vitro***

Odlišné způsoby invaze byly zjištěny v ECM lišících se složením (Strohmaier et al., 1996) a mohou odrážet odlišnou proteolytickou výbavu buňky (Tatti et al., 2011). Proto jsme se zaměřili na detekci proteáz účastnících se degradace složek ECM v buňkách MYBup a zjistili jsme, jak bylo zmíněno výše, že c-Myb dereguluje v buňkách MDA-MB-231 katepsin D a MMP1/9. Hlavním substrátem MMP9 je kolagen IV (obsažený v Matrigelu), zatímco MMP1 degraduje zejména kolagen I. Mezi substráty katepsinu D patří kolagen I, fibronectin i některé proteoglykany. Přestože prsní nádory ve velké míře sekretují katepsin D do extracelulárního prostředí, kde se může podílet na remodelaci ECM, případně uvolňování růstových faktorů, naše výsledky ukazují, že katepsin D pravděpodobně neovlivňuje invazivitu buněk MDA-MB-231 štěpením složek ECM. Ačkoli penetrace Matrigelu i kolagenu I buňkami MYBup je zhoršena umlčením exprese *CTSD* specifickou siRNA, inaktivace katepsinu D metylesterem pepstatinu A nemá tak výrazný účinek (Obr. 20). Katepsin D může nezávisle na své enzymatické aktivitě ovlivňovat signální dráhy a genovou expresi vedoucí k reorganizaci buněčného cytoskeletu (viz výše), což může podporovat buněčnou invazivitu. Funkce katepsinu D v regulaci invazivity a metastázování prsních nádorů nebyla dosud zcela objasněna. Johnson et al. zjistili, že množství katepsinu D sekretovaného různými subpopulacemi buněčné linie MCF7 neodpovídá invazivní aktivitě těchto populací (Johnson et al., 1993). Manipulace exprese katepsinu D prostřednictvím protismyslných sekvencí nemělo vliv na invazivitu prsních nádorových buněk *in vitro*, ačkoli zastavuje metastázování *in vivo* (Glondou et al., 2002). Nicméně další publikace poukazují na pokles invazivní aktivity buněk prsních nádorů stanovené v „transwell“ systémech s Matrigelem jako náhradou ECM v důsledku vypnutí *CTSD* prostřednictvím podobných metod genetické inhibice (Tedone et al., 1997; Ohri et al., 2007). Pokud jde o metastázování *in*

*vivo*, většina studií dokumentuje asociaci mezi nadměrnou expresí katepsinu D a agresivitou nádorů (Garcia et al., 1990; Sivaparvathi et al., 1996; Dumartin et al., 2011; Dian et al., 2012). Jako mechanismus účinku katepsinu D na invazivní chování nádorových buněk se uvažuje degradace složek ECM, proteolytické uvolnění růstových faktorů obsažených v ECM nebo schopnost katepsinu ovlivňovat buněčné signalizace interakcí s jinými proteiny. Naše data vyzdvihují spíše neenzymatickou funkci katepsinu D jako efektoru proteinu c-Myb v řízení invazivity buněk MDA-MB-231.

Ukázali jsme, že invaze buněk MDA-MB-231MYBup přes vrstvu Matrigelu je závislá na aktivitě MMP, zatímco průnik buněk MYBup vrstvou kolagenu I širokospektrý MMP inhibitor GM6001 neovlivňuje (Obr. 20). Z osmi testovaných *MMP* pouze *MMP9* vykazovala zvýšenou expresi v buňkách MYBup (Obr. 15). *MMP9* se podílí na degradaci kolagenu IV obsaženém v Matrigelu (Xu et al., 2010; Wang et al., 2011), proto může být efektoem přispívajícím k nárůstu invazivity buněk MYBup testované na „transwell“ filtrech pokrytých vrstvou Matrigelu. Zatímco exprese *CTSD* a *MMP9* byla v buňkách MYBup zvýšena, *MMP1* mRNA i proteinu *MMP1* v důsledku ektopické exprese *MYB* významně ubylo. Buňky MYBup tedy invadují Matrigel účinněji než kontrolní linie navzdory nedostatku kolagenázy *MMP1*. Ten se ale pravděpodobně projevuje na substrátu tvořeném kolagenem I, kde buňky MYBup výhodu v invazivní aktivitě nad kontrolními buňkami ztrácejí (Obr. 12). Vypnutí exprese *MMP1* prostřednictvím siRNA snižuje invazivitu buněk chondrosarkomu v kolagenovém gelu *in vitro* (Jiang et al., 2005). Myší intersticiální kolagenáza *Mmpla*, funkční homolog lidského genu *MMP1*, je nezbytný pro invazi matrix tvořené kolagenem I buňkami myších melanomů a plicních karcinomů (Foley et al., 2012). Degradace matrix tvořené kolagenem I vyžaduje aktivitu *MMP1* také u jiných nádorů (Benbow et al., 1999; Ziober et al., 2000; Varani et al., 2000). Částečnou invazi substrátu tvořeného kolagenem I zajišťují v buňkách MYBup jiné invazivitu podporující mechanismy jako je nadprodukce katepsinu D nebo aktivace JNK signální dráhy. Inhibice kinázy JNK totiž oslabuje schopnost buněk MYBup procházet vrstvou kolagenu I (Obr. 20). Účinek inhibitoru SP600125 na invazi Matrigelu není tak výrazný (Obr. 20). Aktivace signální dráhy JNK tedy přispívá nejen k migraci, ale i k invazi kolagenu I buňkami MYBup. Protože *MMP1*, *MMP3* a *MMP9* patří mezi geny transaktivované transkripčním faktorem AP1 (Ozanne et al., 2007), můžeme spekulovat, že inhibice JNK brání aktivační fosforylaci proteinu c-Jun a snižuje expresi *MMP1* (případně dalších proteáz) pod úroveň danou nadprodukcí proteinu c-Myb, a takto znemožňuje buňkám MYBup degradovat kolagen I. Podobně Kimura et al. zjistili, že inhibice JNK v buňkách osteosarkomu vede k inhibici invazivity *in vitro* z důvodu poklesu hladiny *MMP1*, jejíž konstitutivní expresi zajišťuje AP1 (Kimura et al., 2011). Můžeme uzavřít, že c-Myb reguluje invazivitu buněk MDA-MB-231MYBup v závislosti na typu proteinové matrix zejména deregulací proteáz *MMP1/9* a katepsinu D.

### **5.3 c-Myb neovlivňuje proliferaci buněk prsních karcinomů *in vitro*, ale zpomaluje růst mamárních nádorů *in vivo***

Míra proliferace buněk 4T1MYBup *in vitro* je srovnatelná s rychlostí proliferace buněk kontrolních, nicméně *in vivo* je růst buněk 4T1 exprimujících exogenní Myb významně zpomalen ve srovnání s růstem kontrolní linie (Obr. 6 a 21). Pro extrapolaci dat získaných proliferačními testy *in vitro* a jejich aplikaci na chování nádorových buněk *in vivo* je vhodnější použít pro kultivaci nádorových buněk *in vitro* 3D podmínky (Chitcholtan et al., 2013). Růst nádorových buněk obklopených gelovou hmotou napodobující ECM lépe simuluje podmínky *in vivo* než růst nádorových buněk na 2D povrchu. Nicméně bylo



popsáno, že některé nádorové supresory blokují růst tumorů *in vivo*, aniž by nějak ovlivnily růst nádorových buněk *in vitro*, ať už se hodnotí v podmínkách 3D nebo 2D kultivace. Takto působí například geny *HYAL1* a *HYAL2* kódující hyaluronidázu 1 a 2 v renálních a plicních karcinomech (Wang et al., 2008). Rozdílné působení na proliferaci nádorových buněk plic *in vitro* a na formování nádorů *in vivo* v myších modelech bylo popsáno také pro gen *Notch3* (Osanyingbemi-Obidi et al., 2011). Podobně genetické navýšení exprese N-kadherinu a kadherinu 11 inhibuje růst osteosarkomů *in vivo*, aniž by se *in vitro* projevil pokles proliferační aktivity (Kashima et al., 2003). Rozdíl v růstu nádorových buněk *in vitro* a *in vivo* může být alespoň částečně způsoben interakcí nádorových a stromálních buněk. Buněčné a nebuněčné mikroprostředí nádoru působí na nádorové buňky implantované do hostitelského organismu. Schopnost nádoru reagovat na stimuly z nádorového stromatu determinuje přežití a rychlost růstu nádorové populace *in vivo*, nicméně nemůže být odhalena běžnými kultivačními postupy *in vitro*. Je možné, že c-Myb ovlivňuje v buňkách 4T1 molekuly důležité pro tuto interakci s mikroprostředím hostitelského organismu a pro odpověď na ni, a proto omezuje růst nádorových buněk *in vivo*, nikoli *in vitro*. Deregulace *MMP1* proteinem c-Myb je dále uvažována jako faktor k tomuto přispívající (viz kapitola 5.4.1.2).

#### 5.4 c-Myb ovlivňuje metastázování prsních nádorů orgánově-specificky

Pro testování invazivního potenciálu buněk MYBup *in vivo* jsme využili myší buněčné linie 4T1 odvozené z karcinomu mléčné žlázy myši kmene BALB/cfC3H jako syngenního myšího modelu. Ortotopická implantace buněk 4T1 do mléčné žlázy myši kmene BALB/c umožňuje modelovat spontánně metastázující mamární karcinom *in vivo*. 4T1 tumory jsou často používaným modelem pro metastázování, protože zakládají sekundární tumory s vysokou účinností a jejich distribuce je podobná jako u lidských karcinomů prsu (Pulaski, Ostrand-Rosenberg, 2001; Tao et al., 2008). Výhoda testování spontánních metastáz nad často používaným systémem experimentálních metastáz, kdy se nádorové buňky injikují přímo do cévního systému myši, je rekapitulace celé metastatické kaskády, kdy můžeme zohlednit růst primárního nádoru a účinnost, se kterou se nádorové buňky uvolňují z nádoru (Bos et al., 2010). Navíc není poloha sekundárních nádorů předurčena místem injikace nádorových buněk. Pokud se buňky inokulují do ocasní žíly myši, tvoří se metastázy přednostně v plicích, pokud se pro injekci použije portální žíla, vznikají metastázy v játrech, a pro usazení nádorových buněk v kosti se používá intrakardiální injikace (Bos et al., 2010; Francia et al., 2011). Při spontánním metastázování 4T1 mamárního tumoru jsme zjišťovali přítomnost metastáz v kostech, plicích a játrech. Přítomnost kostních a jaterních metastáz jsme zaznamenali u všech myší obou skupin, to znamená jak ve skupině myši s 4T1MYBup nádory, tak v kontrolní skupině myši s nádory 4T1vektor (Obr. 21 a 22). Pouze u 22% myši s nádory MYBup se vytvořily metastázy v plicích, zatímco všechny myši kontrolní skupiny měly v plicích nádorové infiltráty (Obr. 21). Četnost nádorových ložisek v plicích myši s nádory 4T1MYBup je výrazně nižší než v skupině kontrolní a pohybuje se v rozmezí 0 až 3 ložiska, u myši s kontrolními nádory dosahuje četnost pulmonárních metastáz minimálních hodnot 14 a nejvíce bylo v plicích těchto myši zaznamenáno 41 povrchových metastatických nodů. Ektopická exprese *Myb* v ortotopických nádorech mléčné žlázy myši tedy omezuje schopnost nádorů zakládat sekundární nádory v plicích, metastázování do kostí a jater však neovlivňuje. c-Myb tedy ovlivňuje organotropismus metastáz prsních nádorů v tomto modelovém systému.

Abychom zjistili, zda mají uvedená data odvozená z myšího modelu *in vivo* nějakou relevanci pro metastázování prsních karcinomů lidských pacientek, využili jsme veřejně



přístupných databází shromažďujících data z různých studií věnovaných celogenomové expresní analýze klinických vzorků. Z databází Oncomine a GEO jsme vybrali čtyři soubory vzorků primárních prsních karcinomů nebo jejich metastáz a jejich expresních dat publikovaných těmito studiemi: Minn et al., 2005; Landemaine et al., 2008; Kao et al., 2011 a Glück et al., 2012. Analýzou expresních profilů genu *MYB* v klinických vzorcích primárních prsních nádorů s různým tropismem metastáz (Minn et al., 2005) jsme zjistili, že nádory metastázující do plic mají významně nižší relativní množství *MYB* mRNA než nádory metastázující mimo plíce (Obr. 28). Podobně také sekundární nádory prsních karcinomů v plicích vykazují nižší expresi genu *MYB* než sekundární nádory z jiných orgánů (jater, kostí, mozku, kůže; Obr. 30). Tato data naznačují, že c-Myb ovlivňuje směřování metastáz karcinomů prsu také u onkologických pacientek. Zdá se, že vysoká hladina mRNA *MYB* v primárním nádoru determinuje neúčinnou metastatickou kolonizaci plic, ale umožňuje infiltraci a sekundární růst v jiných orgánech, což koresponduje s výsledky našich pokusů s buňkami 4T1 nadprodukcujícími *Myb* mRNA v myším modelu mamárních tumorů. Pokud víme, funkce proteinu c-Myb jako faktoru determinujícího organotropismus prsních nádorů dosud nebyla popsána.

Přestože o význam proteinu c-Myb v prsních karcinomech se stále vedou spory, o orgánově-specifické inhibici metastázování v důsledku exprese genu *MYB* v primárním nádoru se zatím neuvažovalo. Rozsáhlé celogenomové expresní studie zaměřené na identifikaci expresních profilů prsních nádorů přeurčujících vznik metastáz v různých orgánech poukázaly na to, že nádorové buňky jsou na úrovni genové exprese modelovány už v primárním nádoru k následnému preferenčnímu usídlení sekundárních míst, a identifikovaly některé geny řídící orgánově specifické metastázování (Kang et al., 2003; Minn et al., 2005; Minn et al., 2007; Bos et al., 2009). Nicméně gen *MYB* mezi ně zařazen nebyl, přestože data z klinických vzorků, na nichž byly identifikované geny validovány, ukazují významný pokles exprese *MYB* v souvislosti s plicním metastázováním (Minn et al., 2005; Obr. 28). Důvodem je modelový buněčný systém, založený na postupném obohacování linie prsních karcinomů o buňky s vysokou kapacitou metastázování do plic selekcí *in vivo*, který byl použit pro identifikaci genů významných pro metastázování do plic a který nevykazuje významné změny v expresi *MYB* mRNA (Minn et al., 2005). Ačkoli existují publikace dokládající, že c-Myb je důležitý pro proliferaci buněk prsních karcinomů *in vitro* a růst nádorů mléčné žlázy v myších *in vivo* (Drabsch et al., 2007; Miao et al., 2011), byla zaznamenána také nádorově supresivní funkce proteinu c-Myb v prsních nádorech (Deisenroth et al., 2010; Thorner et al., 2010). Nádorově supresivní účinek genu *MYB* byl zjištěn u ER+ nádorů a jako mechanismus tohoto účinku byla navržena stabilizace proteinu p53 prostřednictvím cílového proteinu Hep27 (Deisenroth et al., 2010; Thorner et al., 2010). Jak ukazují naše výsledky, i v ER- nádorech s mutantní formou proteinu p53 může c-Myb nezávisle na Hep27 (Obr. 14) plnit funkci nádorového supresoru, případně orgánově specifického supresoru metastáz. I mezi ER- nádory prsu existuje variabilita v expresi genu *MYB* a vysoká hladina *MYB* mRNA koreluje s dobrou prognózou pro pacienty s ER- karcinomy prsu, které často vykazují mutantní formu p53 (Thorner et al., 2010).

Význam genu *MYB* pro metastázování prsních nádorů naznačila až matematická analýza expresních dat klinických vzorků, která definovala skupinu nádorů s vysokou expresí *MYB* a minimální pravděpodobností výskytu vzdálených metastáz (Nicolau et al., 2011). Naše výsledky ukazují na c-Myb-dependentní supresi plicních metastáz nádorů mléčné žlázy. Tato orgánově specifická inhibice metastázování může být způsobena různou schopností adherovat k endoteliálním buňkám, které mají stejně jako subendoteliální matrix odlišné proteinové složení v různých orgánech (Gassmann et al., 2010), nebo různě účinnou schopností vstupovat do cílového orgánu, nebo pak různě permisivními podmínkami pro dělení a růst nádorového infiltrátu v různých orgánech. Z několika důvodů považujeme za

pravděpodobnou příčinu Myb-indukované suprese plicních metastáz sníženou schopnost vstupu do plicního parenchymu. (1) Při expresním profilování buněk účinně metastázujících do plic se ukázalo, že klíčovou skupinu genů tvoří geny *EREG*, *MMP1*, *MMP2* a *PTGS2*, jejichž funkcí je koordinovaná remodelace vaskulatury v primárním tumoru a v místě sekundárního nádoru (v plicích) zajišťují extravazaci (Gupta et al., 2007). (2) Vzhledem k tomu, že naprodukcí proteinu c-Myb jsou zasaženy metastázy v plicích a nikoli v kostech a játrech, domníváme se, že odlišný charakter vaskulatury v plicích ve srovnání s vaskulaturou v játrech a kostní dřeni přispívá alespoň částečně k pozorovanému efektu. Kapiláry v plicích se vyznačují souvislou vrstvou endoteliálních buněk obklopených kontinuálně bazální membránou, na rozdíl od netěsných kapilár v játrech a kostní dřeni s diskontinuální bazální membránou (Pugsley, Tabrizchi, 2000; Padua et al., 2008). Bariéry pro průnik nádorových buněk cévní stěnou jsou tedy odlišné v různých orgánech (Paku et al., 2000). Experimentální extravazace v játrech a kostech je rychlejší než plicní tkáni (Paku et al., 2000). Zatímco do jater se během 24 hod od injekce prsních nádorových buněk do cévního systému extravazuje 56% buněk, do plic se dostane jen 22% nádorových buněk (Martin et al., 2010). Nádorové buňky v plicích adherují přímo k endoteliálním buňkám, na rozdíl od nádorových buněk v játrech, kde je primární adheze v cílovém místě zprostředkována mezi nádorovou buňkou a ECM integriny (Enns et al., 2004; Gassmann et al., 2010). (3) Buňky MDA-MB-231MYBup procházejí přes vrstvu endoteliálních buněk *in vitro* pomaleji než kontrolní buňky. Z mírně zhoršené schopnosti transendoteliální migrace těchto buněk nicméně nemůžeme usuzovat na poruchu extravazace buněk 4T1 *in vivo*. Proto by bylo třeba testovat schopnost migrace buněk 4T1MYBup přes myší endotel (např. buněčná linie MS1; Kim et al., 2011) *in vitro*. Pro inhibiční účinek proteinu c-Myb na transendoteliální migraci však svědčí i další pozorování. Například při srovnání expresních profilů nádorových buněčných linií schopných transendoteliální migrace (TEM+) a linií neschopných procházet přes endotel (TEM-) byl zjištěn asi šestinásobný pokles hladiny *MYB* mRNA v buňkách TEM+ ve srovnání s buňkami TEM- (Bauer et al., 2007). K snížení exprese genu *MYB* dochází také během selekce buněk prostatických nádorů schopných účinné transmigrace přes endotel, subpopulace buněk linie PC3 aktivní v transendoteliální migraci má méně *MYB* mRNA než linie parentální (Drake et al., 2009, GEO přístupový kód GSE14405). Williams et al. zkoumali expresní profily monocytů po úspěšné transmigraci a profily monocytů, které transmigrace přes endotel nebyly schopny (Williams et al., 2009). Data uložená v databázi GEO (přístupový kód GSE14027) ukazují, že monocyty neschopné transendoteliální migrace exprimují *MYB* mRNA ve vyšší míře než monocyty transmigrace schopné. Tato data podporují hypotézu o funkci proteinu c-Myb v negativní regulaci transendoteliální migrace, a tedy extravazace v cílových místech s těsnými vazbami mezi endoteliálními buňkami a s kontinuální subendoteliální bazální membránou, jako jsou plíce.

#### 5.4.1 Cílové efekторы Myb-řízené inhibice plicních metastáz

##### 5.4.1.1 Moesin

V buňkách a nádorech 4T1MYBup jsme zjistili sníženou expresi genu *Msn* a stejně jako v buňkách MDA-MB-231MYBup sníženou expresi genu *Mmpla* kódujícího intersticiální kolagenázu (Obr. 23). Gen *Msn* kódující moesin, protein rodiny ERM (ezrin, radixin, moesin) zprostředkovávající interakce aktinového cytoskeletu a membránových proteinů, byl popsán jako cílový gen proteinu c-Myb v hematopoetických buňkách (Lang et al., 2005), nicméně jako gen, jehož exprese je proteinem c-Myb řízena pozitivně. Na druhou stranu *MSN* byl zařazen mezi geny, jejichž exprese vzrůstá při vypnutí genu *MYB* v leukemických buňkách (Zuber et al., 2011, SI). Protein c-Myb reguluje expresi svých cílových genů v závislosti na buněčném typu a jeho funkce podléhá buněčně-specifickým

regulačním mechanismům (Ness, 2003), což může vysvětlit rozdíly v regulaci genu *Msn* proteinem c-Myb v různých buněčných kontextech. Jak ukazují expresní profily genu *MSN* v databázích Oncomine a GEO, v klinických vzorcích karcinomu prsu je zřejmá negativní korelace mezi hladinou *MYB* a *MSN* mRNA jak přímo v jednotlivých vzorcích (Obr. 27), tak mezi jednotlivými skupinami nádorů (Obr. 25, 26, 28 a 30), což podporuje naše pozorování Myb-indukované represe *Msn* v buňkách 4T1. Navíc tyto údaje indikují potenciální funkci moesinu jako efektoru Myb-řízeného orgánově specifického metastázování. Expres *MSN* je významně zvýšena v primárních nádorech prsu diseminujících do plic (Obr. 28), stejně tak v plicních metastázách prsních nádorů je hladina *MSN* mRNA zvýšena ve srovnání s mimoplicními metastázami (Obr. 30). Moesin navíc pravděpodobně reguluje časný výskyt metastáz v plicích, neboť jeho exprese v prsních nádorech je vyšší u těch pacientek, u nichž byly plicní metastázy diagnostikovány do dvou let od operace primárního nádoru (Obr. 29).

Moesin se účastní připojení kortikálních aktinových vláken k cytoplazmatické membráně, ovlivňuje lokální pevnost buňky a umožňuje rychlou reorganizaci cytoskeletu v reakci na vnější signály (Niggli, Rossy, 2008). Různé signály indukují fosforylaci ERM proteinů a jejich konformační změnu ústící v modifikaci cytoskeletu, mimo jiné vedou k formování adhezivních spojů a membránových protruzí nezbytných pro buněčnou migraci (Gautreau et al., 2002; Arpin et al., 2011). Moesin je ve zvýšené míře exprimován bazálními karcinomy prsu se špatnou prognózou (Charafe-Jauffret et al., 2007) a dalšími metastatickými nádory (Belbin et al., 2005; Cui et al., 2009). Estecha et al. dokázali, že moesin je nezbytný pro kolonizaci plic buňkami melanomu (Estecha et al., 2009). Když injikovali do ocasní žíly myší buňky bez exprese moesinu a buňky kontrolní, 20 hod po injekci zůstali v plicním parenchymu pouze buňky exprimující moesin. Zjistili, že moesin a kortikální aktin se přesunují z místa, kde se nádorová buňka dotýká endotelu, na opačnou stranu buňky. Moesin takto zajišťuje polarizaci buňky melanomu indukovanou interakcí s endotelem, což je nutná podmínka účinné extravazace (Estecha et al., 2009). Vypnutí exprese *MSN* ale naopak podporuje „transwell“ migraci těchto buněk, aniž by ovlivnilo jejich adhezi k podkladu (Estecha et al., 2009). Také v leukocytech se moesin během buněčné polarizace předcházející transendoteliální migraci přesunuje do distální části buňky a definuje tak pól buňky vzdálený od endotelu (del Pozo et al., 1998). Pokud je polarizace leukocytů znemožněna, nejsou schopny transmigrace přes endoteliální vrstvu (del Pozo et al., 1997). Je možné, že Myb-indukovaná represe moesinu může blokovat procesy nutné pro polarizaci buňky po kontaktu s endotelem, a tedy účinnou transendoteliální migraci, a současně stimulovat chemotaktickou migraci těchto buněk *in vitro*. Tomu nasvědčují expresní data získaná studii zaměřenými na transendoteliální migraci (Drake et al., 2009; Williams et al., 2009; expresní data jsou uložena v databázi GEO pod přístupovými kódy GSE14405 a GSE14027). Drake et al. vytvořili linii odvozenou z buněk PC3, která je aktivní v transendoteliální migraci. Zatímco tyto buňky na rozdíl od buněk parentálních mají méně *MYB* mRNA, jak bylo zmíněno výše, vykazují naopak vyšší expresi *MSN* (Drake et al., 2009). Podobně populace monocytů schopných transmigrace přes endotel má méně *MYB* mRNA, ale více *MSN* mRNA než monocyty s porušenou transmigrační schopností (Williams et al., 2009). Můžeme shrnout, že moesin může být jedním z efektorů Myb-dependentního organotropismu metastáz prsních nádorů z důvodu porušené endoteliální transmigrace/extravazace.

#### 5.4.1.2 Intersticiální kolagenáza *Mmp1a*

V buňkách a nádorech 4T1MYBup jsme dále zaznamenali sníženou expresi intersticiální kolagenázy *Mmp1a*, což je funkční homolog lidského genu *MMP1* (Obr. 23). Účast proteinu c-Myb v regulaci genu *MMP1* jsme tedy prokázali v lidských buňkách MDA-MB-231 i v myší linii 4T1. *Mmp1a* kolagenáza podporuje invazivitu a metastázování nádorů plic a melanomů (Foley et al., 2012). Zvýšená exprese *MMP1* je spojena s pokročilými stádii

lidských nádorů prsu a predikuje rychlý rozvoj a šíření nádoru (van 't Veer et al., 2002; Poola et al., 2005). Přítomnost proteinu MMP1 v premaligních lézích (atypická duktální hyperplazie) prsu předurčuje rozvoj léze do invazivního karcinomu (Poola et al., 2005). Z expresního profilování těchto hyperplazií vyplývá nepřímá úměrnost mezi mRNA *MMP1* a *MYB*. V premaligních tkáních s vysokým rizikem progresu do karcinomu je exprese *MYB* mRNA nízká (0,3krát nižší než v nerizikových premaligních lézích), zatímco exprese mRNA *MMP1* je v rizikových vzorcích 35krát vyšší (Poola et al., 2005, SI). Pokud se specificky inhibuje exprese *MMP1* v buňkách MDA-MB-231, zhorší se růst těchto nádorových buněk *in vivo* po implantaci do mléčných žláz imunodeficientních myší (Wyatt et al., 2005). MMP1 je klíčový protein v nádorech osteosarkomu zajišťující metastázování do plic (Husmann et al., 2013). Specifická genetická inhibice *MMP1* ztěžuje formování metastáz v plicích a naopak ektopická exprese *MMP1* v linii osteosarkomu HOS, která není tumorigenní ani metastázuje *in vivo*, umožňuje růst primárního tumoru v kostech i jeho diseminaci do plic (Husmann et al., 2013). Plíce jsou přitom orgán, který osteosarkomy (podobně jako chondrosarkomy) kolonizují přednostně. Přes odlišnou biologii karcinomů a sarkomů se zdá, že MMP1 se funkčně zapojuje do metastatické infiltrace plic i v osteosarkomech a chondrosarkomech (Jawad et al., 2010).

Účinek proteinu MMP1 na růst primárního nádoru se přisuzuje jednak degradaci fibrózního stroma obklopujícího nádor, jednak uvolnění růstových faktorů obsažených v ECM (Wyatt et al., 2005) a také spuštění signalizace interakcí s receptorem aktivovaným proteázou 1 (PAR-1; „protease-activated receptor 1“). PAR-1 je exprimovaný invazivními prsními nádory, nikoli normální prsní tkání a je aktivován proteolytickým štěpením kolagenázou MMP1 (Uziely et al., 2011). Signální dráha MMP1/PAR-1 vede k zvýšení migrační schopnosti prsních nádorových buněk a přispívá nejen k růstu primárního nádoru, ale ovlivňuje i jeho metastázování (Boire et al., 2005). Inhibice MMP1 nebo PAR-1 způsobuje apoptózu buněk prsních xenograftů a brání vzniku experimentálních metastáz v plicích (Yang et al., 2009; Liu et al., 2012). *MMP1* je jedním z genů, které se výrazně exprimují v prsních nádorech preferenčně kolonizujících plíce (Minn et al., 2005). Kombinované vypnutí exprese *MMP1* spolu s dalšími třemi geny (*MMP2*, *EREG*, *PTGS2*), které byly při expresním profilování buněk metastázujeících do plic identifikovány, má za následek zpomalení růstu prsních xenograftů a inhibici vstupu prsních nádorových buněk do plic (Gupta et al., 2007). MMP1 se podílí jak na podpoře růstu primárních nádorů prsu, tak na jejich metastázování do plic (Minn et al., 2007). Účinek MMP1 na plicní metastázování se přisuzuje schopnosti remodelovat cévní stěnu a zajistit účinnou extravazaci (Gupta et al., 2007). Domníváme se, že potlačení exprese *Mmp1a* vyvolané ektopickou expresí genu *Myb* v buňkách 4T1 může být příčinou zpomaleného růstu tumorů 4T1MYBup *in vivo* a také jejich neschopnosti zakládat metastázy selektivně v plicích kvůli ztížené extravazaci, přičemž v metastázování do kostí a jater nejsou omezeny.

## 6 ZÁVĚR

Výsledky této práce přispívají k poznání funkce proteinu c-Myb v biologii prsních karcinomů a nabízejí nový pohled na jeho rozporuplné působení jako onkoproteinu/nádorového supresoru v těchto nádorech. Naše výsledky poukazují na skutečnost, že funkce proteinu c-Myb je v buňkách prsních karcinomů určována podmínkami a kontextem mikroprostředí, v němž je sledována.

Zjistili jsme, že protein c-Myb stimuluje chemotaktickou, ale ne chemokinetickou motilitu buněk prsního karcinomu MDA-MB-231. Vysoká chemotaktická aktivita těchto buněk ale není podmíněna jen vysokou expresí genu *MYB*. Naše výsledky ukazují, že c-Myb reguluje invazivitu buněk prsních nádorů v závislosti na složení matrix, která představuje bariéru buněčné migraci. Pokud je buňkám jako překážka pohybu ve směru koncentračního gradientu chemoatraktantu předložena vrstva Matrigelu, zajišťuje protein c-Myb účinnou penetraci této bariéry. Pokud je však intersticiální matrix modelovaná *in vitro* vrstvou kolagenu I, je invazivita buněk na expresi genu *MYB* nezávislá. Účinek proteinu c-Myb na chemotaktickou migraci a invazivitu buněk linie MDA-MB-231 *in vitro* je rekapitulován v linii 4T1, není tedy buněčně ani druhově specifický.

Identifikovali jsme několik genů (*CDH11*, *MCAM*, *HTATIP2*, *IL18*, *MMP9*, *MMP1*, *CTSD*, *SNAI2*), jejichž exprese je deregulována v buňkách MDA-MB-231 v důsledku přítomnosti exogenního proteinu c-Myb. Mezi potenciální efektoři proteinu c-Myb v řízení buněčné migrace a invazivity jsme na základě funkčního testování zařadili katepsin D (kódovaný genem *CTSD*), matrixové metaloproteinázy 1/9 a signální dráhu JNK.

Dokumentovali jsme novou funkci proteinu c-Myb v řízení organotropismu metastáz mamárních karcinomů *in vivo*. c-Myb zpomaluje růst ortotopicky implantovaných nádorů 4T1 v syngenním myším modelu a zabraňuje jejich spontánnímu metastázování do plic, aniž by ovlivňoval formování metastáz v kostech a játrech. Jako hypotézu vysvětlující selektivní inhibici vzniku plicních metastáz řízenou proteinem c-Myb jsme navrhli omezenou schopnost extravazace buněk s exogenní expresí *MYB* v plicních kapilárách. Toto vysvětlení podporuje námi zjištěná skutečnost, že buňky MDA-MB-231MYBup mají poškozenou funkci transendoteliální migrace *in vitro*.

V buňkách 4T1MYBup jsme zaznamenali sníženou produkci intersticiální kolagenázy *Mmp1a* a ERM proteinu moesinu. Negativní korelaci mezi expresí *MYB* a *MMP1/MSN* mRNA jsme zjistili také v klinických vzorcích prsních karcinomů s využitím databází Oncomine a GEO. Klinická a expresní data z těchto databází ukázala, že vysoká exprese genu *MYB* v primárním nádoru prsu předznamenává nízkou pravděpodobnost vzniku metastáz v plicích. Naopak primární nádory metastázující do plic, stejně jako sekundární nádorová ložiska v plicích, exprimují ve vysoké míře mRNA *MMP1/MSN*. Myb-řízená represe genů *Mmp1a* a *Msn* by mohla alespoň částečně vysvětlit nádorově supresivní funkci proteinu c-Myb a směřování metastáz prsních karcinomů mimo plíce v myších modelech *in vivo*. Je možné, že kontrola nad expresí genů *MMP1* a *MSN* zajištěná proteinem c-Myb je relevantní také pro prognózu a metastázování prsních karcinomů onkologických pacientek.

## 7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Abdel-Ghany M, Cheng HC, Elble RC, Lin H, DiBiasio J, Pauli BU. 2003. The interacting binding domains of the beta(4) integrin and calcium-activated chloride channels (CLCAs) in metastasis. *J Biol Chem.* 278(49):49406-16.
- Aguirre-Ghiso JA. 2007. Models, mechanisms and clinical evidence for cancer dormancy. *Nat Rev Cancer.* 7(11):834-46.
- Al-Nedawi K, Meehan B, Micallef J, Lhotak V, May L, Guha A, Rak J. 2008. Intercellular transfer of the oncogenic receptor EGFRvIII by microvesicles derived from tumour cells. *Nat Cell Biol.* 10(5):619-24.
- Ansieau S, Bastid J, Doreau A, Morel AP, Bouchet BP, Thomas C, Fauvet F, Puisieux I, Doglioni C, Piccinin S, Maestro R, Voeltzel T, Selmi A, Valsesia-Wittmann S, Caron de Fromentel C, Puisieux A. 2008. Induction of EMT by twist proteins as a collateral effect of tumor-promoting inactivation of premature senescence. *Cancer Cell.* 14(1):79-89.
- Aokage K, Ishii G, Ohtaki Y, Yamaguchi Y, Hishida T, Yoshida J, Nishimura M, Nagai K, Ochiai A. 2011. Dynamic molecular changes associated with epithelial-mesenchymal transition and subsequent mesenchymal-epithelial transition in the early phase of metastatic tumor formation. *Int J Cancer.* 128(7):1585-95.
- Armstrong AJ, Marengo MS, Oltean S, Kemeny G, Bitting RL, Turnbull JD, Herold CI, Marcom PK, George DJ, Garcia-Blanco MA. 2011. Circulating tumor cells from patients with advanced prostate and breast cancer display both epithelial and mesenchymal markers. *Mol Cancer Res.* 9(8):997-1007.
- Arpin M, Chirivino D, Naba A, Zwaenepoel I. 2011. Emerging role for ERM proteins in cell adhesion and migration. *Cell Adh Migr.* 5(2):199-206.
- Bain J, McLauchlan H, Elliott M, Cohen P. 2003. The specificities of protein kinase inhibitors: an update. *Biochem J.* 371(Pt 1):199-204.
- Bauer K, Mierke C, Behrens J. 2007. Expression profiling reveals genes associated with transendothelial migration of tumor cells: a functional role for alphavbeta3 integrin. *Int J Cancer.* 121(9):1910-8.
- Beaujouin M, Prébois C, Derocq D, Laurent-Matha V, Masson O, Patingre S, Coopman P, Bettache N, Grossfield J, Hollingsworth RE, Zhang H, Yao Z, Hyman BT, van der Geer P, Smith GK, Liaudet-Coopman E. 2010. Pro-cathepsin D interacts with the extracellular domain of the beta chain of LRP1 and promotes LRP1-dependent fibroblast outgrowth. *J Cell Sci.* 123(Pt 19):3336-46.
- Bein K, Ware JA, Simons M. 1998. Myb-dependent regulation of thrombospondin 2 expression. Role of mRNA stability. *J Biol Chem.* 273(33):21423-9.



- Belbin TJ, Singh B, Smith RV, Socci ND, Wreesmann VB, Sanchez-Carbayo M, Masterson J, Patel S, Cordon-Cardo C, Prystowsky MB, Childs G. 2005. Molecular profiling of tumor progression in head and neck cancer. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 131(1):10-8.
- Bellon T, Perrotti D, Calabretta B. 1997. Granulocytic differentiation of normal hematopoietic precursor cells induced by transcription factor PU.1 correlates with negative regulation of the c-myb promoter. *Blood.* 90(5):1828-39.
- Benanti JA, Williams DK, Robinson KL, Ozer HL, Galloway DA. 2002. Induction of extracellular matrix-remodeling genes by the senescence-associated protein APA-1. *Mol Cell Biol.* 22(21):7385-97.
- Benbow U, Schoenermark MP, Orndorff KA, Givan AL, Brinckerhoff CE. 1999. Human breast cancer cells activate procollagenase-1 and invade type I collagen: invasion is inhibited by all-trans retinoic acid. *Clin Exp Metastasis.* 17(3):231-8.
- Benes P, Vashishta A, Saraswat-Ohri S, Fusek M, Pospisilova S, Tichy B, Vetvicka V. 2006. Effect of procathepsin D activation peptide on gene expression of breast cancer cells. *Cancer Lett.* 239(1):46-54.
- Benes P, Vetvicka V, Fusek M. 2008. Cathepsin D--many functions of one aspartic protease. *Crit Rev Oncol Hematol.* 68(1):12-28.
- Bermudez O, Pagès G, Gimond C. 2010. The dual-specificity MAP kinase phosphatases: critical roles in development and cancer. *Am J Physiol Cell Physiol.* 299(2):C189-202.
- Bhattarai G, Lee YH, Lee NH, Yun JS, Hwang PH, Yi HK. 2011. c-myb mediates inflammatory reaction against oxidative stress in human breast cancer cell line, MCF-7. *Cell Biochem Funct.* 29(8):686-93.
- Bies J, Markus J, Wolff L. 2002. Covalent attachment of the SUMO-1 protein to the negative regulatory domain of the c-Myb transcription factor modifies its stability and transactivation capacity. *J Biol Chem.* 277(11):8999-9009.
- Bies J, Nazarov V, Wolff L. 1999. Identification of protein instability determinants in the carboxy-terminal region of c-Myb removed as a result of retroviral integration in murine monocytic leukemias. *J Virol.* 73(3):2038-44.
- Biroccio A, Benassi B, D'Agnano I, D'Angelo C, Buglioni S, Mottolese M, Ricciotti A, Citro G, Cosimelli M, Ramsay RG, Calabretta B, Zupi G. 2001. c-Myb and Bcl-x overexpression predicts poor prognosis in colorectal cancer: clinical and experimental findings. *Am J Pathol.* 158(4):1289-99.
- Boire A, Covic L, Agarwal A, Jacques S, Sherifi S, Kuliopulos A. 2005. PAR1 is a matrix metalloprotease-1 receptor that promotes invasion and tumorigenesis of breast cancer cells. *Cell.* 120(3):303-13.
- Bonde AK, Tischler V, Kumar S, Soltermann A, Schwendener RA. 2012. Intratumoral macrophages contribute to epithelial-mesenchymal transition in solid tumors. *BMC Cancer.* 12:35.

- Bos PD, Nguyen DX, Massagué J. 2010. Modeling metastasis in the mouse. *Curr Opin Pharmacol.* 10(5):571-7.
- Bos PD, Zhang XH, Nadal C, Shu W, Gomis RR, Nguyen DX, Minn AJ, van de Vijver MJ, Gerald WL, Foekens JA, Massagué J. 2009. Genes that mediate breast cancer metastasis to the brain. *Nature.* 459(7249):1005-9.
- Brabletz T, Jung A, Spaderna S, Hlubek F, Kirchner T. 2005. Opinion: migrating cancer stem cells - an integrated concept of malignant tumour progression. *Nat Rev Cancer.* 5(9):744-9.
- Brinckerhoff CE, Rutter JL, Benbow U. 2000. Interstitial collagenases as markers of tumor progression. *Clin Cancer Res.* 6(12):4823-30.
- Buccione R, Caldieri G, Ayala I. 2009. Invadopodia: specialized tumor cell structures for the focal degradation of the extracellular matrix. *Cancer Metastasis Rev.* 28(1-2):137-49.
- Byun HO, Han NK, Lee HJ, Kim KB, Ko YG, Yoon G, Lee YS, Hong SI, Lee JS. 2009. Cathepsin D and eukaryotic translation elongation factor 1 as promising markers of cellular senescence. *Cancer Res.* 69(11):4638-47.
- Cao M, Seike M, Soeno C, Mizutani H, Kitamura K, Minegishi Y, Noro R, Yoshimura A, Cai L, Gemma A. 2012. MiR-23a regulates TGF- $\beta$ -induced epithelial-mesenchymal transition by targeting E-cadherin in lung cancer cells. *Int J Oncol.* 41(3):869-75.
- Cesi V, Casciati A, Sesti F, Tanno B, Calabretta B, Raschellà G. 2011. TGF $\beta$ -induced c-Myb affects the expression of EMT-associated genes and promotes invasion of ER+ breast cancer cells. *Cell Cycle.* 10(23):4149-61.
- Cocucci E, Racchetti G, Meldolesi J. 2009. Shedding microvesicles: artefacts no more. *Trends Cell Biol.* 19(2):43-51.
- Condeelis J, Segall JE. 2003. Intravital imaging of cell movement in tumours. *Nat Rev Cancer.* 3(12):921-30.
- Cui X, Kim HJ, Kuitse I, Kim H, Brown PH, Lee AV. 2006. Epidermal growth factor induces insulin receptor substrate-2 in breast cancer cells via c-Jun NH(2)-terminal kinase/activator protein-1 signaling to regulate cell migration. *Cancer Res.* 66(10):5304-13.
- Cui Y, Wu J, Zong M, Song G, Jia Q, Jiang J, Han J. 2009. Proteomic profiling in pancreatic cancer with and without lymph node metastasis. *Int J Cancer.* 124(7):1614-21.
- D'Amato NC, Howe EN, Richer JK. 2012. MicroRNA regulation of epithelial plasticity in cancer. *Cancer Lett.* S0304-3835(12)00716-1.
- Dash AB, Orrico FC, Ness SA. 1996. The EVES motif mediates both intermolecular and intramolecular regulation of c-Myb. *Genes Dev.* 10(15):1858-69.
- Dass K, Ahmad A, Azmi AS, Sarkar SH, Sarkar FH. 2008. Evolving role of uPA/uPAR system in human cancers. *Cancer Treat Rev.* 2008 Apr;34(2):122-36.

- Dassé E, Volpe G, Walton DS, Wilson N, Del Pozzo W, O'Neill LP, Slany RK, Frampton J, Dumon S. 2012. Distinct regulation of c-myb gene expression by HoxA9, Meis1 and Pbx proteins in normal hematopoietic progenitors and transformed myeloid cells. *Blood Cancer J.* 2(6):e76.
- Davis RJ. 2000. Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell.* 13;103(2):239-52.
- Dedieu S, Langlois B, Devy J, Sid B, Henriët P, Sartelet H, Bellon G, Emonard H, Martiny L. 2008. LRP-1 silencing prevents malignant cell invasion despite increased pericellular proteolytic activities. *Mol Cell Biol.* 28(9):2980-95.
- Deisenroth C, Thorner AR, Enomoto T, Perou CM, Zhang Y. 2010. Mitochondrial Hep27 is a c-Myb target gene that inhibits Mdm2 and stabilizes p53. *Mol Cell Biol.* 30(16):3981-93.
- del Pozo MA, Nieto M, Serrador JM, Sancho D, Vicente-Manzanares M, Martínez C, Sánchez-Madrid F. 1998. The two poles of the lymphocyte: specialized cell compartments for migration and recruitment. *Cell Adhes Commun.* 6(2-3):125-33.
- del Pozo MA, Cabañas C, Montoya MC, Ager A, Sánchez-Mateos P, Sánchez-Madrid F. 1997. ICAMs redistributed by chemokines to cellular uropods as a mechanism for recruitment of T lymphocytes. *J Cell Biol.* 137(2):493-508.
- Deryugina EI, Quigley JP. 2006. Matrix metalloproteinases and tumor metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* 25(1):9-34.
- Dian D, Vrekoussis T, Shabani N, Mylonas I, Kuhn C, Schindlbeck C, Navrozoglou I, Friese K, Makrigiannakis A, Jeschke U. 2012. Expression of cathepsin-D in primary breast cancer and corresponding local recurrence or metastasis: an immunohistochemical study. *Anticancer Res.* 32(3):901-5.
- Dolo V, D'Ascenzo S, Violini S, Pompucci L, Festuccia C, Ginestra A, Vittorelli ML, Canevari S, Pavan A. 1999. Matrix-degrading proteinases are shed in membrane vesicles by ovarian cancer cells in vivo and in vitro. *Clin Exp Metastasis.* 17(2):131-40.
- Drabsch Y, Hugo H, Zhang R, Dowhan DH, Miao YR, Gewirtz AM, Barry SC, Ramsay RG, Gonda TJ. 2007. Mechanism of and requirement for estrogen-regulated MYB expression in estrogen-receptor-positive breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104(34):13762-7.
- Drabsch Y, Robert RG, Gonda TJ. 2010. MYB suppresses differentiation and apoptosis of human breast cancer cells. *Breast Cancer Res.* 12(4):R55.
- Drake JM, Strohhahn G, Bair TB, Moreland JG, Henry MD. 2009. ZEB1 enhances transendothelial migration and represses the epithelial phenotype of prostate cancer cells. *Mol Biol Cell.* 20(8):2207-17.
- Dumartin L, Whiteman HJ, Weeks ME, Hariharan D, Dmitrovic B, Iacobuzio-Donahue CA, Brentnall TA, Bronner MP, Feakins RM, Timms JF, Brennan C, Lemoine NR, Crnogorac-Jurcevic T. 2011. AGR2 is a novel surface antigen that promotes the dissemination of

- pancreatic cancer cells through regulation of cathepsins B and D. *Cancer Res.* 2011 Nov 15;71(22):7091-102.
- Duffy MJ, Maguire TM, Hill A, McDermott E, O'Higgins N. 2000. Metalloproteinases: role in breast carcinogenesis, invasion and metastasis. *Breast Cancer Res.* 2:252-257.
- Dykhhoorn DM, Wu Y, Xie H, Yu F, Lal A, Petrocca F, Martinvalet D, Song E, Lim B, Lieberman J. 2009. miR-200 enhances mouse breast cancer cell colonization to form distant metastases. *PLoS One.* 4(9):e7181.
- Eferl R, Wagner EF. 2003. AP-1: a double-edged sword in tumorigenesis. *Nat Rev Cancer.* 3(11):859-68.
- Enns A, Gassmann P, Schlüter K, Korb T, Spiegel HU, Senninger N, Haier J. 2004. Integrins can directly mediate metastatic tumor cell adhesion within the liver sinusoids. *J Gastrointest Surg.* 8(8):1049-59.
- Erler JT, Bennewith KL, Cox TR, Lang G, Bird D, Koong A, Le QT, Giaccia AJ. 2009. Hypoxia-induced lysyl oxidase is a critical mediator of bone marrow cell recruitment to form the premetastatic niche. *Cancer Cell.* 15(1):35-44.
- Estecha A, Sánchez-Martín L, Puig-Kröger A, Bartolomé RA, Teixidó J, Samaniego R, Sánchez-Mateos P. 2009. Moesin orchestrates cortical polarity of melanoma tumour cells to initiate 3D invasion. *J Cell Sci.* 122(Pt 19):3492-501.
- Flynn DC, Cho Y, Vincent D, Cunnick JM. 2008. Podosomes and Invadopodia: Related structures with Common Protein Components that May Promote Breast Cancer Cellular Invasion. *Breast Cancer (Auckl).* 2:17-29.
- Foekens JA, Look MP, Bolt-de Vries J, Meijer-van Gelder ME, van Putten WL, Klijn JG. 1999. Cathepsin-D in primary breast cancer: prognostic evaluation involving 2810 patients. *Br J Cancer.* 79(2):300-7.
- Foley CJ, Luo C, O'Callaghan K, Hinds PW, Covic L, Kuliopulos A. 2012. Matrix metalloprotease-1a promotes tumorigenesis and metastasis. *J Biol Chem.* 287(29):24330-8.
- Froni C, Brogini M, Generali D, Damia G. 2012. Epithelial-mesenchymal transition and breast cancer: role, molecular mechanisms and clinical impact. *Cancer Treat Rev.* 38(6):689-97.
- Francia G, Cruz-Munoz W, Man S, Xu P, Kerbel RS. 2011. Mouse models of advanced spontaneous metastasis for experimental therapeutics. *Nat Rev Cancer.* 11(2):135-41.
- Friedl P, Wolf K. 2010. Plasticity of cell migration: a multiscale tuning model. *J Cell Biol.* 188(1):11-9.
- Gao D, Joshi N, Choi H, Ryu S, Hahn M, Catena R, Sadik H, Argani P, Wagner P, Vahdat LT, Port JL, Stiles B, Sukumar S, Altorki NK, Raffi S, Mittal V. 2012. Myeloid progenitor cells in the premetastatic lung promote metastases by inducing mesenchymal to epithelial transition. *Cancer Res.* 2012 Mar 15;72(6):1384-94.

- Gao D, Nolan DJ, Mellick AS, Bambino K, McDonnell K, Mittal V. 2008. Endothelial progenitor cells control the angiogenic switch in mouse lung metastasis. *Science*. 319(5860):195-8.
- Garcia M, Derocq D, Pujol P, Rochefort H. 1990. Overexpression of transfected cathepsin D in transformed cells increases their malignant phenotype and metastatic potency. *Oncogene*. 5(12):1809-14.
- Gassmann P, Haier J, Schlüter K, Domikowsky B, Wendel C, Wiesner U, Kubitza R, Engers R, Schneider SW, Homey B, Müller A. 2009. CXCR4 regulates the early extravasation of metastatic tumor cells in vivo. *Neoplasia*. 11(7):651-61.
- Gassmann P, Kang ML, Mees ST, Haier J. 2010. In vivo tumor cell adhesion in the pulmonary microvasculature is exclusively mediated by tumor cell-endothelial cell interaction. *BMC Cancer*. 10:177.
- Gautreau A, Louvard D, Arpin M. 2002. ERM proteins and NF2 tumor suppressor: the Yin and Yang of cortical actin organization and cell growth signaling. *Curr Opin Cell Biol*. 14(1):104-9.
- Giampieri S, Manning C, Hooper S, Jones L, Hill CS, Sahai E. 2009. Localized and reversible TGFbeta signalling switches breast cancer cells from cohesive to single cell motility. *Nat Cell Biol*. 11(11):1287-96.
- Gligorijevic B, Wyckoff J, Yamaguchi H, Wang Y, Roussos ET, Condeelis J. 2012. N-WASP-mediated invadopodium formation is involved in intravasation and lung metastasis of mammary tumors. *J Cell Sci*. 125(Pt 3):724-34.
- Glondou M, Liaudet-Coopman E, Derocq D, Platet N, Rochefort H, Garcia M. 2002. Down-regulation of cathepsin-D expression by antisense gene transfer inhibits tumor growth and experimental lung metastasis of human breast cancer cells. *Oncogene*. 21(33):5127-34.
- Glück S, Ross JS, Royce M, McKenna EF Jr, Perou CM, Avisar E, Wu L. 2012. TP53 genomics predict higher clinical and pathologic tumor response in operable early-stage breast cancer treated with docetaxel-capecitabine ± trastuzumab. *Breast Cancer Res Treat*. 132(3):781-91.
- Gocheva V, Joyce JA. 2007. Cysteine cathepsins and the cutting edge of cancer invasion. *Cell Cycle*. 6(1):60-4.
- Gonda TJ, Leo P, Ramsay RG. 2008. Estrogen and MYB in breast cancer: potential for new therapies. *Expert Opin Biol Ther*. 8(6):713-7.
- Gupta GP, Nguyen DX, Chiang AC, Bos PD, Kim JY, Nadal C, Gomis RR, Manova-Todorova K, Massagué J. 2007. Mediators of vascular remodelling co-opted for sequential steps in lung metastasis. *Nature*. 446(7137):765-70.
- Hamada S, Satoh K, Miura S, Hirota M, Kanno A, Masamune A, Kikuta K, Kume K, Unno J, Egawa S, Motoi F, Unno M, Shimosegawa T. 2012. MiR-197 induces epithelial-

mesenchymal transition in pancreatic cancer cells by targeting p120 catenin. *J Cell Physiol.* doi: 10.1002/jcp.24280.

Hazan RB, Qiao R, Keren R, Badano I, Suyama K. 2004. Cadherin switch in tumor progression. *Ann N Y Acad Sci.* 1014:155-63.

Hiratsuka S, Nakamura K, Iwai S, Murakami M, Itoh T, Kijima H, Shipley JM, Senior RM, Shibuya M. 2002. MMP9 induction by vascular endothelial growth factor receptor-1 is involved in lung-specific metastasis. *Cancer Cell.* 2(4):289-300.

Hiratsuka S, Watanabe A, Aburatani H, Maru Y. 2006. Tumour-mediated upregulation of chemoattractants and recruitment of myeloid cells predetermines lung metastasis. *Nat Cell Biol.* 8(12):1369-75.

Hiratsuka S, Watanabe A, Sakurai Y, Akashi-Takamura S, Ishibashi S, Miyake K, Shibuya M, Akira S, Aburatani H, Maru Y. 2008. The S100A8-serum amyloid A3-TLR4 paracrine cascade establishes a pre-metastatic phase. *Nat Cell Biol.* 10(11):1349-55.

Honn KV, Tang DG, Grossi IM, Renaud C, Duniec ZM, Johnson CR, Diglio CA. 1994. Enhanced endothelial cell retraction mediated by 12(S)-HETE: a proposed mechanism for the role of platelets in tumor cell metastasis. *Exp Cell Res.* 210(1):1-9.

Hood JL, San RS, Wickline SA. 2011. Exosomes released by melanoma cells prepare sentinel lymph nodes for tumor metastasis. *Cancer Res.* 71(11):3792-801.

Hu L, Roth JM, Brooks P, Luty J, Karpatkin S. 2008. Thrombin up-regulates cathepsin D which enhances angiogenesis, growth, and metastasis. *Cancer Res.* 68(12):4666-73.

Huang CF, Lira C, Chu K, Bilen MA, Lee YC, Ye X, Kim SM, Ortiz A, Wu FL, Logothetis CJ, Yu-Lee LY, Lin SH. 2010. Cadherin-11 increases migration and invasion of prostate cancer cells and enhances their interaction with osteoblasts. *Cancer Res.* 70(11):4580-9.

Huang C, Rajfur Z, Borchers C, Schaller MD, Jacobson K. 2003. JNK phosphorylates paxillin and regulates cell migration. *Nature.* 424(6945):219-23.

Huang Y, Song N, Ding Y, Yuan S, Li X, Cai H, Shi H, Luo Y. 2009a. Pulmonary vascular destabilization in the premetastatic phase facilitates lung metastasis. *Cancer Res.* 69(19):7529-37.

Huang CH, Yang WH, Chang SY, Tai SK, Tzeng CH, Kao JY, Wu KJ, Yang MH. 2009b. Regulation of membrane-type 4 matrix metalloproteinase by SLUG contributes to hypoxia-mediated metastasis. *Neoplasia.* 11(12):1371-82.

Husmann K, Arlt MJ, Muff R, Langsam B, Bertz J, Born W, Fuchs B. 2013. Matrix Metalloproteinase 1 promotes tumor formation and lung metastasis in an intratibial injection osteosarcoma mouse model. *Biochim Biophys Acta.* 2013 Feb;1832(2):347-54.

Chaffer CL, Brennan JP, Slavin JL, Blick T, Thompson EW, Williams ED. 2006. Mesenchymal-to-epithelial transition facilitates bladder cancer metastasis: role of fibroblast growth factor receptor-2. *Cancer Res.* 66(23):11271-8.



- Chao YL, Shepard CR, Wells A. 2010. Breast carcinoma cells re-express E-cadherin during mesenchymal to epithelial reverting transition. *Mol Cancer*. 7;9:179.
- Charafe-Jauffret E, Monville F, Bertucci F, Esterni B, Ginestier C, Finetti P, Cervera N, Geneix J, Hassanein M, Rabayrol L, Sobol H, Taranger-Charpin C, Xerri L, Viens P, Birnbaum D, Jacquemier J. 2007. Moesin expression is a marker of basal breast carcinomas. *Int J Cancer*. 121(8):1779-85.
- Cheasley D, Pereira L, Lightowler S, Vincan E, Malaterre J, Ramsay RG. 2011. Myb controls intestinal stem cell genes and self-renewal. *Stem Cells*. 29(12):2042-50.
- Chen RX, Xia YH, Xue TC, Ye SL. 2010a. Transcription factor c-Myb promotes the invasion of hepatocellular carcinoma cells via increasing osteopontin expression. *J Exp Clin Cancer Res*. 29:172.
- Chen L, Xu S, Zeng X, Li J, Yin W, Chen Y, Shao Z, Jin W. 2010b. c-myb activates CXCL12 transcription in T47D and MCF7 breast cancer cells. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 42(1):1-7.
- Chitcholtan K, Asselin E, Parent S, Sykes PH, Evans JJ. 2013. Differences in growth properties of endometrial cancer in three dimensional (3D) culture and 2D cell monolayer. *Exp Cell Res*. 319(1):75-87.
- Chu K, Cheng CJ, Ye X, Lee YC, Zurita AJ, Chen DT, Yu-Lee LY, Zhang S, Yeh ET, Hu MC, Logothetis CJ, Lin SH. 2008. Cadherin-11 promotes the metastasis of prostate cancer cells to bone. *Mol Cancer Res*. 6(8):1259-67.
- Janowski E, Jiao X, Katiyar S, Lisanti MP, Liu M, Pestell RG, Morad M. 2011. c-Jun is required for TGF- $\beta$ -mediated cellular migration via nuclear Ca<sup>2+</sup> signaling. *Int J Biochem Cell Biol*. 43(8):1104-13.
- Jawad MU, Garamszegi N, Garamszegi SP, Correa-Medina M, Diez JA, Wen R, Scully SP. 2010. Matrix metalloproteinase 1: role in sarcoma biology. *PLoS One*. 5(12):e14250.
- Jiang X, Dutton CM, Qi WN, Block JA, Garamszegi N, Scully SP. 2005. siRNA mediated inhibition of MMP-1 reduces invasive potential of a human chondrosarcoma cell line. *J Cell Physiol*. 202(3):723-30.
- Jiang D, Ying W, Lu Y, Wan J, Zhai Y, Liu W, Zhu Y, Qiu Z, Qian X, He F. 2003. Identification of metastasis-associated proteins by proteomic analysis and functional exploration of interleukin-18 in metastasis. *Proteomics*. 3(5):724-37.
- Jiao X, Katiyar S, Liu M, Mueller SC, Lisanti MP, Li A, Pestell TG, Wu K, Ju X, Li Z, Wagner EF, Takeya T, Wang C, Pestell RG. 2008. Disruption of c-Jun reduces cellular migration and invasion through inhibition of c-Src and hyperactivation of ROCK II kinase. *Mol Biol Cell*. 19(4):1378-90.
- Jiao X, Katiyar S, Willmarth NE, Liu M, Ma X, Flomenberg N, Lisanti MP, Pestell RG. 2010. c-Jun induces mammary epithelial cellular invasion and breast cancer stem cell expansion. *J Biol Chem*. 285(11):8218-26.

- Johnson MD, Torri JA, Lippman ME, Dickson RB. 1993. The role of cathepsin D in the invasiveness of human breast cancer cells. *Cancer Res.* 53(4):873-7.
- Jung MK, Song HK, Kim KE, Hur DY, Kim T, Bang S, Park H, Cho DH. 2006. IL-18 enhances the migration ability of murine melanoma cells through the generation of ROI and the MAPK pathway. *Immunol Lett.* 107(2):125-30.
- Kanei-Ishii C, Ninomiya-Tsuji J, Tanikawa J, Nomura T, Ishitani T, Kishida S, Kokura K, Kurahashi T, Ichikawa-Iwata E, Kim Y, Matsumoto K, Ishii S. 2004. Wnt-1 signal induces phosphorylation and degradation of c-Myb protein via TAK1, HIPK2, and NLK. *Genes Dev.* 18(7):816-29.
- Kang Y, Siegel PM, Shu W, Drobnyak M, Kakonen SM, Cordón-Cardo C, Guise TA, Massagué J. 2003. A multigenic program mediating breast cancer metastasis to bone. *Cancer Cell.* 3(6):537-49.
- Kaplan RN, Psaila B, Lyden D. 2006. Bone marrow cells in the 'pre-metastatic niche': within bone and beyond. *Cancer Metastasis Rev.* 25(4):521-9.
- 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(7069):820-7.
- Kao KJ, Chang KM, Hsu HC, Huang AT. 2011. Correlation of microarray-based breast cancer molecular subtypes and clinical outcomes: implications for treatment optimization. *BMC Cancer.* 11:143.
- Karafiati V, Dvorakova M, Krejci E, Kralova J, Pajer P, Snajdr P, Mandikova S, Bartunek P, Grim M, Dvorak M. 2005. Transcription factor c-Myb is involved in the regulation of the epithelial-mesenchymal transition in the avian neural crest. *Cell Mol Life Sci.* 62(21):2516-25.
- Kashima T, Nakamura K, Kawaguchi J, Takanashi M, Ishida T, Aburatani H, Kudo A, Fukayama M, Grigoriadis AE. 2003. Overexpression of cadherins suppresses pulmonary metastasis of osteosarcoma in vivo. *Int J Cancer.* 104(2):147-54.
- Katiyar S, Jiao X, Wagner E, Lisanti MP, Pestell RG. 2007. Somatic excision demonstrates that c-Jun induces cellular migration and invasion through induction of stem cell factor. *Mol Cell Biol.* 27(4):1356-69.
- Kaur P, Nagaraja GM, Zheng H, Gizachew D, Galukande M, Krishnan S, Asea A. 2012. A mouse model for triple-negative breast cancer tumor-initiating cells (TNBC-TICs) exhibits similar aggressive phenotype to the human disease. *BMC Cancer.* 12:120.
- Kauraniemi P, Hedenfalk I, Persson K, Duggan DJ, Tanner M, Johannsson O, Olsson H, Trent JM, Isola J, Borg A. 2000. MYB oncogene amplification in hereditary BRCA1 breast cancer. *Cancer Res.* 60(19):5323-8.

- Kim CW, Lee HM, Lee TH, Kang C, Kleinman HK, Gho YS. 2002. Extracellular membrane vesicles from tumor cells promote angiogenesis via sphingomyelin. *Cancer Res.* 62(21):6312-7.
- Kim C, Lee HS, Lee D, Lee SD, Cho EG, Yang SJ, Kim SB, Park D, Kim MG. 2011. Epithin/PRSS14 proteolytically regulates angiopoietin receptor Tie2 during transendothelial migration. *Blood.* 117(4):1415-24.
- Kim MY, Oskarsson T, Acharyya S, Nguyen DX, Zhang XH, Norton L, Massagué J. 2009a. Tumor self-seeding by circulating cancer cells. *Cell.* 139(7):1315-26.
- Kim S, Takahashi H, Lin WW, Descargues P, Grivennikov S, Kim Y, Luo JL, Karin M. 2009b. Carcinoma-produced factors activate myeloid cells through TLR2 to stimulate metastasis. *Nature.* 457(7225):102-6.
- Kimura R, Ishikawa C, Rokkaku T, Janknecht R, Mori N. 2011. Phosphorylated c-Jun and Fra-1 induce matrix metalloproteinase-1 and thereby regulate invasion activity of 143B osteosarcoma cells. *Biochim Biophys Acta.* 1813(8):1543-53.
- Klemke M, Weschenfelder T, Konstandin MH, Samstag Y. 2007. High affinity interaction of integrin alpha4beta1 (VLA-4) and vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) enhances migration of human melanoma cells across activated endothelial cell layers. *J Cell Physiol.* 212(2):368-74.
- Klymkowsky MW, Savagner P. 2009. Epithelial-mesenchymal transition: a cancer researcher's conceptual friend and foe. *Am J Pathol.* 174(5):1588-93.
- Ko ER, Ko D, Chen C, Lipsick JS. 2008. A conserved acidic patch in the Myb domain is required for activation of an endogenous target gene and for chromatin binding. *Mol Cancer.* 7:77.
- Koblinski JE, Ahram M, Sloane BF. 2000. Unraveling the role of proteases in cancer. *Clin Chim Acta.* 291:113-135.
- Koch S, Scifo E, Rokka A, Trippner P, Lindfors M, Korhonen R, Corthals GL, Virtanen I, Lalowski M, Tyynelä J. 2013. Cathepsin D deficiency induces cytoskeletal changes and affects cell migration pathways in the brain. *Neurobiol Dis.* 50:107-19.
- Kopecki Z, Luchetti MM, Adams DH, Strudwick X, Mantamadiotis T, Stoppacciaro A, Gabrielli A, Ramsay RG, Cowin AJ. 2007. Collagen loss and impaired wound healing is associated with c-Myb deficiency. *J Pathol.* 211(3):351-61.
- Korpala M, Lee ES, Hu G, Kang Y. 2008. The miR-200 family inhibits epithelial-mesenchymal transition and cancer cell migration by direct targeting of E-cadherin transcriptional repressors ZEB1 and ZEB2. *J Biol Chem.* 283(22):14910-4.
- Külshammer E, Uhlirova M. 2012. The actin cross-linker Filamin/Cheerio mediates tumor malignancy downstream of JNK signaling. *J Cell Sci.* doi: 10.1242/jcs.114462.

- Kurahara H, Takao S, Maemura K, Mataka Y, Kuwahata T, Maeda K, Ding Q, Sakoda M, Iino S, Ishigami S, Ueno S, Shinchi H, Natsugoe S. 2012. Epithelial-mesenchymal transition and mesenchymal-epithelial transition via regulation of ZEB-1 and ZEB-2 expression in pancreatic cancer. *J Surg Oncol.* 105(7):655-61.
- Kurrey NK, Jalgaonkar SP, Joglekar AV, Ghanate AD, Chaskar PD, Doiphode RY, Bapat SA. 2009. Snail and slug mediate radioresistance and chemoresistance by antagonizing p53-mediated apoptosis and acquiring a stem-like phenotype in ovarian cancer cells. *Stem Cells.* 27(9):2059-68.
- Landemaine T, Jackson A, Bellahcène A, Rucci N, Sin S, Abad BM, Sierra A, Boudinet A, Guinebretière JM, Ricevuto E, Noguès C, Briffod M, Bièche I, Cherel P, Garcia T, Castronovo V, Teti A, Lidereau R, Driouch K. 2008. A six-gene signature predicting breast cancer lung metastasis. *Cancer Res.* 68(15):6092-9.
- Lang G, White JR, Argent-Katwala MJ, Allinson CG, Weston K. 2005. Myb proteins regulate the expression of diverse target genes. *Oncogene.* 24(8):1375-84.
- Laurent-Matha V, Huesgen PF, Masson O, Derocq D, Prébois C, Gary-Bobo M, Lecaille F, Rebière B, Meurice G, Oréar C, Hollingsworth RE, Abrahamson M, Lalmanach G, Overall CM, Liaudet-Coopman E. 2012. Proteolysis of cystatin C by cathepsin D in the breast cancer microenvironment. *FASEB J.* 26(12):5172-81.
- Laurent-Matha V, Maruani-Herrmann S, Prébois C, Beaujouin M, Glondu M, Noël A, Alvarez-Gonzalez ML, Blacher S, Coopman P, Baghdiguian S, Gilles C, Loncarek J, Freiss G, Vignon F, Liaudet-Coopman E. 2005. Catalytically inactive human cathepsin D triggers fibroblast invasive growth. *J Cell Biol.* 2005 Jan 31;168(3):489-99.
- Lee TH, Avraham HK, Jiang S, Avraham S. 2003. Vascular endothelial growth factor modulates the transendothelial migration of MDA-MB-231 breast cancer cells through regulation of brain microvascular endothelial cell permeability. *J Biol Chem.* 278(7):5277-84.
- Lee MH, Koria P, Qu J, Andreadis ST. 2009. JNK phosphorylates beta-catenin and regulates adherens junctions. *FASEB J.* 23(11):3874-83.
- Lei W, Rushton JJ, Davis LM, Liu F, Ness SA. 2004. Positive and negative determinants of target gene specificity in myb transcription factors. *J Biol Chem.* 279(28):29519-27.
- Leto G, Tumminello FM, Crescimanno M, Flandina C, Gebbia N. 2004. Cathepsin D expression levels in nongynecological solid tumors: clinical and therapeutic implications. *Clin Exp Metastasis.* 21(2):91-106.
- Li R, Ackerman WE 4th, Mihai C, Volakis LI, Ghadiali S, Kniss DA. 2012a. Myoferlin depletion in breast cancer cells promotes mesenchymal to epithelial shape change and stalls invasion. *PLoS One.* 7(6):e39766.
- Li Y, Wood N, Grimsley P, Yellowlees D, Donnelly PK. 1998. In vitro invasiveness of human breast cancer cells is promoted by low density lipoprotein receptor-related protein. *Invasion Metastasis.* 18(5-6):240-51.

- Li L, Ying J, Li H, Zhang Y, Shu X, Fan Y, Tan J, Cao Y, Tsao SW, Srivastava G, Chan AT, Tao Q. 2012b. The human cadherin 11 is a pro-apoptotic tumor suppressor modulating cell stemness through Wnt/ $\beta$ -catenin signaling and silenced in common carcinomas. *Oncogene*. 31(34):3901-12.
- Liang YJ, Wang QY, Zhou CX, Yin QQ, He M, Yu XT, Cao DX, Chen GQ, He JR, Zhao Q. 2012. MiR-124 Targets Slug to Regulate Epithelial-to-Mesenchymal Transition and Metastasis of Breast Cancer. *Carcinogenesis*. doi: 10.1093/carcin/bgs383.
- Lieu YK, Reddy EP. 2009. Conditional c-myb knockout in adult hematopoietic stem cells leads to loss of self-renewal due to impaired proliferation and accelerated differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 106(51):21689-94.
- Liu H, Kato Y, Erzinger SA, Kiriakova GM, Qian Y, Palmieri D, Steeg PS, Price JE. 2012. The role of MMP-1 in breast cancer growth and metastasis to the brain in a xenograft model. *BMC Cancer*. 12:583.
- Lorenzo PI, Brendeford EM, Gilfillan S, Gavrilov AA, Leedsak M, Razin SV, Eskeland R, Sæther T, Gabrielsen OS. 2011. Identification of c-Myb Target Genes in K562 Cells Reveals a Role for c-Myb as a Master Regulator. *Genes Cancer*. 2(8):805-17.
- Lorusso G, Rüegg C. 2012. New insights into the mechanisms of organ-specific breast cancer metastasis. *Semin Cancer Biol*. 22(3):226-33.
- Lu X, Mu E, Wei Y, Riethdorf S, Yang Q, Yuan M, Yan J, Hua Y, Tiede BJ, Lu X, Haffty BG, Pantel K, Massagué J, Kang Y. 2011. VCAM-1 promotes osteolytic expansion of indolent bone micrometastasis of breast cancer by engaging  $\alpha 4\beta 1$ -positive osteoclast progenitors. *Cancer Cell*. 20(6):701-14.
- Luchetti MM, Paroncini P, Majlingová P, Frampton J, Mucenski M, Baroni SS, Sambo P, Golay J, Inrona M, Gabrielli A. 2003. Characterization of the c-Myb-responsive region and regulation of the human type I collagen alpha 2 chain gene by c-Myb. *J Biol Chem*. 278(3):1533-41.
- Luzzi KJ, MacDonald IC, Schmidt EE, Kerkvliet N, Morris VL, Chambers AF, Groom AC. 1998. Multistep nature of metastatic inefficiency: dormancy of solitary cells after successful extravasation and limited survival of early micrometastases. *Am J Pathol*. 153(3):865-73.
- Malanchi I, Santamaria-Martínez A, Susanto E, Peng H, Lehr HA, Delaloye JF, Huelsken J. 2011. Interactions between cancer stem cells and their niche govern metastatic colonization. *Nature*. 481(7379):85-9.
- Malaterre J, Mantamadiotis T, Dworkin S, Lightowler S, Yang Q, Ransome MI, Turnley AM, Nichols NR, Emambokus NR, Frampton J, Ramsay RG. 2008. c-Myb is required for neural progenitor cell proliferation and maintenance of the neural stem cell niche in adult brain. *Stem Cells*. 26(1):173-81.
- Marchong MN, Yurkowski C, Ma C, Spencer C, Pajovic S, Gallie BL. 2010. Cdh11 acts as a tumor suppressor in a murine retinoblastoma model by facilitating tumor cell death. *PLoS Genet*. 6(4):e1000923.

- Martin MD, Kremers GJ, Short KW, Rocheleau JV, Xu L, Piston DW, Matrisian LM, Gorden DL. 2010. Rapid extravasation and establishment of breast cancer micrometastases in the liver microenvironment. *Mol Cancer Res.* 8(10):1319-27.
- Mason SD, Joyce JA. 2011. Proteolytic networks in cancer. *Trends Cell Biol.* 21(4):228-37.
- Masson O, Bach AS, Derocq D, Prébois C, Laurent-Matha V, Pattingre S, Liaudet-Coopman E. 2010. Pathophysiological functions of cathepsin D: Targeting its catalytic activity versus its protein binding activity? *Biochimie.* 92(11):1635-43.
- Metwally FM, El-mezayen HA, Ahmed HH. 2011. Significance of vascular endothelial growth factor, interleukin-18 and nitric oxide in patients with breast cancer: correlation with carbohydrate antigen 15.3. *Med Oncol.* 28 Suppl 1:S15-21.
- Miao RY, Drabsch Y, Cross RS, Cheasley D, Carpinteri S, Pereira L, Malaterre J, Gonda TJ, Anderson RL, Ramsay RG. 2011. MYB is essential for mammary tumorigenesis. *Cancer Res.* 71(22):7029-37.
- Miles FL, Pruitt FL, van Golen KL, Cooper CR. 2008. Stepping out of the flow: capillary extravasation in cancer metastasis. *Clin Exp Metastasis.* 25(4):305-24.
- Minn AJ, Gupta GP, Padua D, Bos P, Nguyen DX, Nuyten D, Kreike B, Zhang Y, Wang Y, Ishwaran H, Foekens JA, van de Vijver M, Massagué J. 2007. Lung metastasis genes couple breast tumor size and metastatic spread. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104(16):6740-5.
- Minn AJ, Gupta GP, Siegel PM, Bos PD, Shu W, Giri DD, Viale A, Olshen AB, Gerald WL, Massagué J. 2005. Genes that mediate breast cancer metastasis to lung. *Nature.* 436(7050):518-24.
- Mitra P, Pereira LA, Drabsch Y, Ramsay RG, Gonda TJ. 2012. Estrogen receptor- $\alpha$  recruits P-TEFb to overcome transcriptional pausing in intron 1 of the MYB gene. *Nucleic Acids Res.* 40(13):5988-6000.
- Mizuguchi G, Kanei-Ishii C, Takahashi T, Yasukawa T, Nagase T, Horikoshi M, Yamamoto T, Ishii S. 1995. c-Myb repression of c-erbB-2 transcription by direct binding to the c-erbB-2 promoter. *J Biol Chem.* 270(16):9384-9.
- Montgomery N, Hill A, McFarlane S, Neisen J, O'Grady A, Conlon S, Jirstrom K, Kay EW, Waugh DJ. 2012. CD44 enhances invasion of basal-like breast cancer cells by upregulating serine protease and collagen-degrading enzymatic expression and activity. *Breast Cancer Res.* 14(3):R84.
- Morel AP, Lièvre M, Thomas C, Hinkal G, Ansieau S, Puisieux A. 2008. Generation of breast cancer stem cells through epithelial-mesenchymal transition. *PLoS One.* 3(8):e2888.
- Mucenski ML, McLain K, Kier AB, Swerdlow SH, Schreiner CM, Miller TA, Pietryga DW, Scott WJ Jr, Potter SS. 1991. A functional c-myb gene is required for normal murine fetal hepatic hematopoiesis. *Cell.* 65(4):677-89.



- Muralidharan-Chari V, Clancy JW, Sedgwick A, D'Souza-Schorey C. 2010. Microvesicles: mediators of extracellular communication during cancer progression. *J Cell Sci.* 123(Pt 10):1603-11.
- Murphy DA, Courtneidge SA. 2011. The 'ins' and 'outs' of podosomes and invadopodia: characteristics, formation and function. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 12(7):413-26.
- Naik RP, Jin D, Chuang E, Gold EG, Tousimis EA, Moore AL, Christos PJ, de Dalmas T, Donovan D, Rafii S, Vahdat LT. 2008. Circulating endothelial progenitor cells correlate to stage in patients with invasive breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 107(1):133-8.
- Ness SA. 2003. Myb protein specificity: evidence of a context-specific transcription factor code. *Blood Cells Mol Dis.* 31(2):192-200.
- Nicolau M, Levine AJ, Carlsson G. 2011. Topology based data analysis identifies a subgroup of breast cancers with a unique mutational profile and excellent survival. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 108(17):7265-70.
- Nieman MT, Prudoff RS, Johnson KR, Wheelock MJ. 1999. N-cadherin promotes motility in human breast cancer cells regardless of their E-cadherin expression. *J Cell Biol.* 147(3):631-44.
- Niggli V, Rossy J. 2008. Ezrin/radixin/moesin: versatile controllers of signaling molecules and of the cortical cytoskeleton. *Int J Biochem Cell Biol.* 40(3):344-9.
- Nguyen DX, Bos PD, Massagué J. 2009. Metastasis: from dissemination to organ-specific colonization. *Nat Rev Cancer.* 9(4):274-84.
- Nicolaides NC, Gualdi R, Casadevall C, Manzella L, Calabretta B. 1991. Positive autoregulation of c-myc expression via Myb binding sites in the 5' flanking region of the human c-myc gene. *Mol Cell Biol.* 11(12):6166-76.
- Nolan DJ, Ciarrocchi A, Mellick AS, Jaggi JS, Bambino K, Gupta S, Heikamp E, McDevitt MR, Scheinberg DA, Benezra R, Mittal V. 2007. Bone marrow-derived endothelial progenitor cells are a major determinant of nascent tumor neovascularization. *Genes Dev.* 21(12):1546-58.
- 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. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 108(38):16002-7.
- Ohri SS, Vashishta A, Proctor M, Fusek M, Vetvicka V. 2007. Depletion of procathepsin D gene expression by RNA interference: a potential therapeutic target for breast cancer. *Cancer Biol Ther.* 6(7):1081-7.
- Okada M, Irie S, Sawada M, Urae R, Urae A, Iwata N, Ozaki N, Akazawa K, Nakanishi H. 2003. Pepstatin A induces extracellular acidification distinct from aspartic protease inhibition in microglial cell lines. *Glia.* 43(2):167-74.

- Olson MF, Sahai E. 2009. The actin cytoskeleton in cancer cell motility. *Clin Exp Metastasis*. 26(4):273-87.
- Ono R, Matsuoka J, Yamatsuji T, Naomoto Y, Tanaka N, Matsui H, Matsushita M. 2008. M-RIP, a novel target of JNK signaling and a requirement for human cancer cell invasion. *Int J Mol Med*. 22(2):199-203.
- Osanyingbemi-Obidi J, Dobromilskaya I, Illei PB, Hann CL, Rudin CM. 2011. Notch signaling contributes to lung cancer clonogenic capacity in vitro but may be circumvented in tumorigenesis in vivo. *Mol Cancer Res*. 9(12):1746-54.
- Oskarsson T, Massagué J. 2011. Extracellular matrix players in metastatic niches. *EMBO J*. 31(2):254-6.
- Otto IM, Raabe T, Rennefahrt UE, Bork P, Rapp UR, Kerkhoff E. 2000. The p150-Spir protein provides a link between c-Jun N-terminal kinase function and actin reorganization. *Curr Biol*. 10(6):345-8.
- Overall CM, Tam EM, Kappelhoff R, Connor A, Ewart T, Morrison CJ, Puente X, López-Otín C, Seth A. 2004. Protease degradomics: mass spectrometry discovery of protease substrates and the CLIP-CHIP, a dedicated DNA microarray of all human proteases and inhibitors. *Biol Chem*. 385(6):493-504.
- Ozanne BW, Spence HJ, McGarry LC, Hennigan RF. 2007. Transcription factors control invasion: AP-1 the first among equals. *Oncogene*. 26(1):1-10.
- Padua D, Zhang XH, Wang Q, Nadal C, Gerald WL, Gomis RR, Massagué J. 2008. TGFbeta primes breast tumors for lung metastasis seeding through angiopoietin-like 4. *Cell*. 133(1):66-77.
- Paget S. 1989. The distribution of secondary growths in cancer of the breast. 1889. *Cancer Metastasis Rev*. 8(2):98-101.
- Paku S, Döme B, Tóth R, Timár J. 2000. Organ-specificity of the extravasation process: an ultrastructural study. *Clin Exp Metastasis*. 18(6):481-92.
- Park S, Cheon S, Cho D. 2007. The dual effects of interleukin-18 in tumor progression. *Cell Mol Immunol*. 4(5):329-35.
- Park HS, Kim S, Kim K, Yoo H, Chae BJ, Bae JS, Song BJ, Jung SS. 2012. Pattern of distant recurrence according to the molecular subtypes in Korean women with breast cancer. *World J Surg Oncol*. 10:4.
- Parker JS, Mullins M, Cheang MC, Leung S, Voduc D, Vickery T, Davies S, Fauron C, He X, Hu Z, Quackenbush JF, Stijleman IJ, Palazzo J, Marron JS, Nobel AB, Mardis E, Nielsen TO, Ellis MJ, Perou CM, Bernard PS. 2009. Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. *J Clin Oncol*. 27(8):1160-7.
- Pattabiraman DR, Gonda TJ. 2012. Role and potential for therapeutic targeting of MYB in Leukemia. *Leukemia*. doi: 10.1038/leu.2012.225.

Peinado H, Alečković M, Lavotshkin S, Matei I, Costa-Silva B, Moreno-Bueno G, Hergueta-Redondo M, Williams C, García-Santos G, Ghajar C, Nitadori-Hoshino A, Hoffman C, Badal K, Garcia BA, Callahan MK, Yuan J, Martins VR, Skog J, Kaplan RN, Brady MS, Wolchok JD, Chapman PB, Kang Y, Bromberg J, Lyden D. 2012. Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET. *Nat Med.* 18(6):883-91.

Peinado H, Lavotshkin S, Lyden D. 2011. The secreted factors responsible for pre-metastatic niche formation: old sayings and new thoughts. *Semin Cancer Biol.* 21(2):139-46.

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(6):415-28.

Perou CM, Sørlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, Pollack JR, Ross DT, Johnsen H, Akslen LA, Fluge O, Pergamenschikov A, Williams C, Zhu SX, Lønning PE, Børresen-Dale AL, Brown PO, Botstein D. 2000. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature.* 406(6797):747-52.

Persson M, Andrén Y, Mark J, Horlings HM, Persson F, Stenman G. 2009. Recurrent fusion of MYB and NFIB transcription factor genes in carcinomas of the breast and head and neck. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106(44):18740-4.

Piccinini G, Golay J, Flora A, Songia S, Luchetti M, Gabrielli A, Introna M. 1999. C-myb, but not B-myb, upregulates type I collagen gene expression in human fibroblasts. *J Invest Dermatol.* 112(2):191-6.

Pink DB, Schulte W, Parseghian MH, Zijlstra A, Lewis JD. 2012. Real-time visualization and quantitation of vascular permeability in vivo: implications for drug delivery. *PLoS One.* 2012;7(3):e333760.

Pishvaian MJ, Feltes CM, Thompson P, Bussemakers MJ, Schalken JA, Byers SW. 1999. Cadherin-11 is expressed in invasive breast cancer cell lines. *Cancer Res.* 59(4):947-52.

Polyak K, Weinberg RA. 2009. Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits. *Nat Rev Cancer.* 9(4):265-73.

Poola I, DeWitty RL, Marshalleck JJ, Bhatnagar R, Abraham J, Leffall LD. 2005. Identification of MMP-1 as a putative breast cancer predictive marker by global gene expression analysis. *Nat Med.* 11(5):481-3.

Prall F. 2007. Tumour budding in colorectal carcinoma. *Histopathology.* 50(1):151-62.

Pruitt FL, He Y, Franco OE, Jiang M, Cates JM, Hayward SW. 2012. Cathepsin D acts as an essential mediator to promote malignancy of benign prostatic epithelium. *Prostate.* doi: 10.1002/pros.22589.

Psaila B, Kaplan RN, Port ER, Lyden D. 2006. Priming the 'soil' for breast cancer metastasis: the pre-metastatic niche. *Breast Dis.* 26:65-74.

- Psaila B, Lyden D. 2009. The metastatic niche: adapting the foreign soil. *Nat Rev Cancer*. 9(4):285-93.
- Pulaski BA, Ostrand-Rosenberg S. 2001. Mouse 4T1 breast tumor model. *Curr Protoc Immunol*. Chapter 20:Unit 20.2. doi: 10.1002/0471142735.im2002s39.
- Pugsley MK, Tabrizchi R. 2000. The vascular system. An overview of structure and function. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 44(2):333-40.
- Quintana AM, Liu F, O'Rourke JP, Ness SA. 2011. Identification and regulation of c-Myb target genes in MCF-7 cells. *BMC Cancer*. 11:30.
- 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. *Clin Exp Metastasis*. 22(6):475-83.
- Ramsay RG, Friend A, Vizantios Y, Freeman R, Sicurella C, Hammett F, Armes J, Venter D. 2000. Cyclooxygenase-2, a colorectal cancer nonsteroidal anti-inflammatory drug target, is regulated by c-MYB. *Cancer Res*. 60(7):1805-9.
- Ramsay RG, Gonda TJ. 2008. MYB function in normal and cancer cells. *Nat Rev Cancer*. 8(7):523-34.
- Ratajczak J, Wysoczynski M, Hayek F, Janowska-Wieczorek A, Ratajczak MZ. 2006. Membrane-derived microvesicles: important and underappreciated mediators of cell-to-cell communication. *Leukemia*. 20(9):1487-95.
- Rhim AD, Mirek ET, Aiello NM, Maitra A, Bailey JM, McAllister F, Reichert M, Beatty GL, Rustgi AK, Vonderheide RH, Leach SD, Stanger BZ. 2012. EMT and dissemination precede pancreatic tumor formation. *Cell*. 148(1-2):349-61.
- Ridley AJ. 2006. Rho GTPases and actin dynamics in membrane protrusions and vesicle trafficking. *Trends Cell Biol*. 16(10):522-9.
- Rucci N, Sanità P, Angelucci A. 2011. Roles of metalloproteases in metastatic niche. *Curr Mol Med*. 11(8):609-22.
- Rushton JJ, Davis LM, Lei W, Mo X, Leutz A, Ness SA. 2003. Distinct changes in gene expression induced by A-Myb, B-Myb and c-Myb proteins. *Oncogene*. 22(2):308-13.
- Rutter JL, Mitchell TI, Buttice G, Meyers J, Gusella JF, Ozelius LJ, Brinckerhoff CE. 1998. A single nucleotide polymorphism in the matrix metalloproteinase-1 promoter creates an Ets binding site and augments transcription. *Cancer Res*. 58(23):5321-5.
- Sahai E, Marshall CJ. 2003. Differing modes of tumour cell invasion have distinct requirements for Rho/ROCK signalling and extracellular proteolysis. *Nat Cell Biol*. 5(8):711-9.
- Saltel F, Daubon T, Juin A, Ganuza IE, Veillat V, Génot E. 2011. Invadosomes: intriguing structures with promise. *Eur J Cell Biol*. 90(2-3):100-7.

- Saltel F, Chabadel A, Bonnelye E, Jurdic P. 2008. Actin cytoskeletal organisation in osteoclasts: a model to decipher transmigration and matrix degradation. *Eur J Cell Biol.* 87(8-9):459-68.
- Sanz-Moreno V, Gadea G, Ahn J, Paterson H, Marra P, Pinner S, Sahai E, Marshall CJ. 2008. Rac activation and inactivation control plasticity of tumor cell movement. *Cell.* 135(3):510-23.
- Sarrió D, Rodriguez-Pinilla SM, Hardisson D, Cano A, Moreno-Bueno G, Palacios J. 2008. Epithelial-mesenchymal transition in breast cancer relates to the basal-like phenotype. *Cancer Res.* 68(4):989-97.
- Sihto H, Lundin J, Lundin M, Lehtimäki T, Ristimäki A, Holli K, Sailas L, Kataja V, Turpeenniemi-Hujanen T, Isola J, Heikkilä P, Joensuu H. 2011. Breast cancer biological subtypes and protein expression predict for the preferential distant metastasis sites: a nationwide cohort study. *Breast Cancer Res.* 13(5):R87.
- Schlüter K, Gassmann P, Enns A, Korb T, Hemping-Bovenkerk A, Hölzen J, Haier J. 2006. Organ-specific metastatic tumor cell adhesion and extravasation of colon carcinoma cells with different metastatic potential. *Am J Pathol.* 169(3):1064-73.
- Schoumacher M, Goldman RD, Louvard D, Vignjevic DM. 2010. Actin, microtubules, and vimentin intermediate filaments cooperate for elongation of invadopodia. *J Cell Biol.* 189(3):541-56.
- Sivaparvathi M, Sawaya R, Chintala SK, Go Y, Gokaslan ZL, Rao JS. 1996. Expression of cathepsin D during the progression of human gliomas. *Neurosci Lett.* 208(3):171-4.
- Smarda J, Zemanová K, Bryja J, Smardová J, Kozubík A, Hofmanová J, Nemažerová A, Sevcíková S, Kohoutek J, Vodicka P. 1999. Retinoid X receptor suppresses transformation by the v-myb oncogene. *J Leukoc Biol.* 66(6):1039-48.
- Smith CL, Hager GL. 1997. Transcriptional regulation of mammalian genes in vivo. A tale of two templates. *J Biol Chem.* 272(44):27493-6.
- Sodek KL, Brown TJ, Ringuette MJ. 2008. Collagen I but not Matrigel matrices provide an MMP-dependent barrier to ovarian cancer cell penetration. *BMC Cancer.* 8:223.
- Song H, Li Y, Lee J, Schwartz AL, Bu G. 2009. Low-density lipoprotein receptor-related protein 1 promotes cancer cell migration and invasion by inducing the expression of matrix metalloproteinases 2 and 9. *Cancer Res.* 69(3):879-86.
- Sørli T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, Hastie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Thorsen T, Quist H, Matese JC, Brown PO, Botstein D, Lønning PE, Børresen-Dale AL. 2001. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98(19):10869-74.
- Spring H, Schüler T, Arnold B, Hämmerling GJ, Ganss R. 2005. Chemokines direct endothelial progenitors into tumor neovessels. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102(50):18111-6.

- Srivastava SK, Bhardwaj A, Singh S, Arora S, McClellan S, Grizzle WE, Reed E, Singh AP. 2012. Myb overexpression overrides androgen depletion-induced cell cycle arrest and apoptosis in prostate cancer cells, and confers aggressive malignant traits: potential role in castration resistance. *Carcinogenesis*. 33(6):1149-57.
- Stenman G, Andersson MK, Andrén Y. 2010. New tricks from an old oncogene: gene fusion and copy number alterations of MYB in human cancer. *Cell Cycle*. 9(15):2986-95.
- Stoletov K, Kato H, Zardoujian E, Kelber J, Yang J, Shattil S, Klemke R. 2010. Visualizing extravasation dynamics of metastatic tumor cells. *J Cell Sci*. 123(Pt 13):2332-41.
- Strohmaier AR, Spring H, Spiess E. 1996. Three-dimensional analysis of the substrate-dependent invasive behavior of a human lung tumor cell line with a confocal laser scanning microscope. *Histochem Cell Biol*. 105(3):179-85.
- Takahashi T, Suwabe N, Dai P, Yamamoto M, Ishii S, Nakano T. 2000. Inhibitory interaction of c-Myb and GATA-1 via transcriptional co-activator CBP. *Oncogene*. 19(1):134-40.
- Tanno B, Negroni A, Vitali R, Pirozzoli MC, Cesi V, Mancini C, Calabretta B, Raschellà G. 2002. Expression of insulin-like growth factor-binding protein 5 in neuroblastoma cells is regulated at the transcriptional level by c-Myb and B-Myb via direct and indirect mechanisms. *J Biol Chem*. 277(26):23172-80.
- Tanno B, Sesti F, Cesi V, Bossi G, Ferrari-Amorotti G, Bussolari R, Tirindelli D, Calabretta B, Raschellà G. 2010. Expression of Slug is regulated by c-Myb and is required for invasion and bone marrow homing of cancer cells of different origin. *J Biol Chem*. 285(38):29434-45.
- Tao K, Fang M, Alroy J, Sahagian GG. 2008. Imagable 4T1 model for the study of late stage breast cancer. *BMC Cancer*. 8:228.
- Tatti O, Arjama M, Ranki A, Weiss SJ, Keski-Oja J, Lehti K. 2011. Membrane-type-3 matrix metalloproteinase (MT3-MMP) functions as a matrix composition-dependent effector of melanoma cell invasion. *PLoS One*. 6(12):e28325.
- Taylor M, Rössler J, Georger B, Laplanche A, Hartmann O, Vassal G, Farace F. 2009. High levels of circulating VEGFR2+ Bone marrow-derived progenitor cells correlate with metastatic disease in patients with pediatric solid malignancies. *Clin Cancer Res*. 15(14):4561-71.
- Tedone T, Correale M, Barbarossa G, Casavola V, Paradiso A, Reshkin SJ. 1997. Release of the aspartyl protease cathepsin D is associated with and facilitates human breast cancer cell invasion. *FASEB J*. 11(10):785-92.
- Thiery JP, Acloque H, Huang RY, Nieto MA. 2009. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell*. 2009 139(5):871-90.
- Thompson MA, Flegg R, Westin EH, Ramsay RG. 1997. Microsatellite deletions in the c-myb transcriptional attenuator region associated with over-expression in colon tumour cell lines. *Oncogene*. 14(14):1715-23.

- Thorner AR, Parker JS, Hoadley KA, Perou CM. 2010. Potential tumor suppressor role for the c-Myb oncogene in luminal breast cancer. *PLoS One*. 5(10):e13073.
- Tchou-Wong KM, Fok SY, Rubin JS, Pixley F, Condeelis J, Braet F, Rom W, Soon LL. 2006. Rapid chemokinetic movement and the invasive potential of lung cancer cells; a functional molecular study. *BMC Cancer*. 6:151.
- Toh B, Wang X, Keeble J, Sim WJ, Khoo K, Wong WC, Kato M, Prevost-Blondel A, Thiery JP, Abastado JP. 2011. Mesenchymal transition and dissemination of cancer cells is driven by myeloid-derived suppressor cells infiltrating the primary tumor. *PLoS Biol*. 9(9):e1001162.
- Tong X, Li K, Luo Z, Lu B, Liu X, Wang T, Pang M, Liang B, Tan M, Wu M, Zhao J, Guo Y. 2009. Decreased TIP30 expression promotes tumor metastasis in lung cancer. *Am J Pathol*. 174(5):1931-9.
- Trimboli AJ, Fukino K, de Bruin A, Wei G, Shen L, Tanner SM, Creasap N, Rosol TJ, Robinson ML, Eng C, Ostrowski MC, Leone G. 2008. Direct evidence for epithelial-mesenchymal transitions in breast cancer. *Cancer Res*. 68(3):937-45.
- Tsuji T, Ibaragi S, Shima K, Hu MG, Katsurano M, Sasaki A, Hu GF. 2008. Epithelial-mesenchymal transition induced by growth suppressor p12CDK2-AP1 promotes tumor cell local invasion but suppresses distant colony growth. *Cancer Res*. 68(24):10377-86.
- Uziely B, Turm H, Maoz M, Cohen I, Maly B, Bar-Shavit R. 2011. Par genes: molecular probes to pathological assessment in breast cancer progression. *Patholog Res Int*. 2011:178265.
- Valenti R, Huber V, Iero M, Filipazzi P, Parmiani G, Rivoltini L. 2007. Tumor-released microvesicles as vehicles of immunosuppression. *Cancer Res*. 67(7):2912-5.
- van 't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, He YD, Hart AA, Mao M, Peterse HL, van der Kooy K, Marton MJ, Witteveen AT, Schreiber GJ, Kerkhoven RM, Roberts C, Linsley PS, Bernards R, Friend SH. 2002. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature*. 415(6871):530-6.
- Varani J, Hattori Y, Chi Y, Schmidt T, Perone P, Zeigler ME, Fader DJ, Johnson TM. 2000. Collagenolytic and gelatinolytic matrix metalloproteinases and their inhibitors in basal cell carcinoma of skin: comparison with normal skin. *Br J Cancer*. 82(3):657-65.
- Vogt PK. 2001. Jun, the oncoprotein. *Oncogene*. 20(19):2365-77.
- Waldron T, De Dominici M, Soliera AR, Audia A, Iacobucci I, Lonetti A, Martinelli G, Zhang Y, Martinez R, Hyslop T, Bender TP, Calabretta B. 2012. c-Myb and its target Bmi1 are required for p190BCR/ABL leukemogenesis in mouse and human cells. *Leukemia*. 26(4):644-53.
- Walker MJ, Silliman E, Dayton MA, Lang JC. 1998. The expression of C-myb in human metastatic melanoma cell lines and specimens. *Anticancer Res*. 18(2A):1129-35.



- Wang F, Duan R, Chirgwin J, Safe SH. 2000. Transcriptional activation of cathepsin D gene expression by growth factors. *J Mol Endocrinol.* 24(2):193-202.
- Wang F, Grigorieva EV, Li J, Senchenko VN, Pavlova TV, Anedchenko EA, Kudryavtseva AV, Tsimanis A, Angeloni D, Lerman MI, Kashuba VI, Klein G, Zabarovsky ER. 2008. HYAL1 and HYAL2 inhibit tumour growth in vivo but not in vitro. *PLoS One.* 3(8):e3031.
- Wang YG, Kim SJ, Baek JH, Lee HW, Jeong SY, Chun KH. 2012. Galectin-3 increases the motility of mouse melanoma cells by regulating matrix metalloproteinase-1 expression. *Exp Mol Med.* 44(6):387-93.
- Wang J, Kuitase I, Lee AV, Pan J, Giuliano A, Cui X. 2010. Sustained c-Jun-NH2-kinase activity promotes epithelial-mesenchymal transition, invasion, and survival of breast cancer cells by regulating extracellular signal-regulated kinase activation. *Mol Cancer Res.* 8(2):266-77.
- Wang X, Lu H, Urvalek AM, Li T, Yu L, Lamar J, DiPersio CM, Feustel PJ, Zhao J. 2011. KLF8 promotes human breast cancer cell invasion and metastasis by transcriptional activation of MMP9. *Oncogene.* 30(16):1901-11.
- Wang X, Zheng M, Liu G, Xia W, McKeown-Longo PJ, Hung MC, Zhao J. 2007. Krüppel-like factor 8 induces epithelial to mesenchymal transition and epithelial cell invasion. *Cancer Res.* 67(15):7184-93.
- Wells A, Yates C, Shepard CR. 2008. E-cadherin as an indicator of mesenchymal to epithelial reverting transitions during the metastatic seeding of disseminated carcinomas. *Clin Exp Metastasis.* 25(6):621-8.
- Weston K, Kraemer H, Roux R, Amon W, Darnton J, Dutton S, Harrison R, Jankowski J. 2009. Effect of MYB on invasion and migration in OE33 cells and use as a marker of prognosis in esophageal adenocarcinoma. 2009 Gastrointestinal Cancers Symposium, ASCO.
- Wickersheim A, Kerber M, de Miguel LS, Plate KH, Machein MR. 2009. Endothelial progenitor cells do not contribute to tumor endothelium in primary and metastatic tumors. *Int J Cancer.* 125(8):1771-7.
- Wicki A, Christofori G. 2007. The potential role of podoplanin in tumour invasion. *Br J Cancer.* 96(1):1-5.
- Wicki A, Lehembre F, Wick N, Hantusch B, Kerjaschki D, Christofori G. 2006. Tumor invasion in the absence of epithelial-mesenchymal transition: podoplanin-mediated remodeling of the actin cytoskeleton. *Cancer Cell.* 9(4):261-72.
- Wilczek C, Chayka O, Plachetka A, Klempnauer KH. 2009. Myb-induced chromatin remodeling at a dual enhancer/promoter element involves non-coding rna transcription and is disrupted by oncogenic mutations of v-myb. *J Biol Chem.* 284(51):35314-24.
- Williams MR, Sakurai Y, Zughaier SM, Eskin SG, McIntire LV. 2009. Transmigration across activated endothelium induces transcriptional changes, inhibits apoptosis, and decreases antimicrobial protein expression in human monocytes. *J Leukoc Biol.* 86(6):1331-43.

- Wirtz D, Konstantopoulos K, Searson PC. 2011. The physics of cancer: the role of physical interactions and mechanical forces in metastasis. *Nat Rev Cancer*. 11(7):512-22.
- Wolf M, Clark-Lewis I, Buri C, Langen H, Lis M, Mazzucchelli L. 2003. Cathepsin D specifically cleaves the chemokines macrophage inflammatory protein-1 alpha, macrophage inflammatory protein-1 beta, and SLC that are expressed in human breast cancer. *Am J Pathol*. 162(4):1183-90.
- Wolf MJ, Hoos A, Bauer J, Boettcher S, Knust M, Weber A, Simonavicius N, Schneider C, Lang M, Stürzl M, Croner RS, Konrad A, Manz MG, Moch H, Aguzzi A, van Loo G, Pasparakis M, Prinz M, Borsig L, Heikenwalder M. 2012. Endothelial CCR2 signaling induced by colon carcinoma cells enables extravasation via the JAK2-Stat5 and p38MAPK pathway. *Cancer Cell*. 22(1):91-105.
- Wyatt CA, Geoghegan JC, Brinckerhoff CE. 2005. Short hairpin RNA-mediated inhibition of matrix metalloproteinase-1 in MDA-231 cells: effects on matrix destruction and tumor growth. *Cancer Res*. 65(23):11101-8.
- Xia Y, Karin M. 2004. The control of cell motility and epithelial morphogenesis by Jun kinases. *Trends Cell Biol*. 14(2):94-101.
- Xu D, McKee CM, Cao Y, Ding Y, Kessler BM, Muschel RJ. 2010. Matrix metalloproteinase-9 regulates tumor cell invasion through cleavage of protease nexin-1. *Cancer Res*. 70(17):6988-98.
- Xu Q, Sun Q, Zhang J, Yu J, Chen W, Zhang Z. 2012. Downregulation of miR-153 contributes to epithelial-mesenchymal transition and tumor metastasis in human epithelial cancer. *Carcinogenesis*. doi: 10.1093/carcin/bgs374.
- Yamaguchi H. 2012. Pathological roles of invadopodia in cancer invasion and metastasis. *Eur J Cell Biol*. 91(11-12):902-7.
- Yamaguchi H, Wyckoff J, Condeelis J. 2005. Cell migration in tumors. *Curr Opin Cell Biol*. 17(5):559-64.
- Yamamoto M, Kikuchi H, Ohta M, Kawabata T, Hiramatsu Y, Kondo K, Baba M, Kamiya K, Tanaka T, Kitagawa M, Konno H. 2008. TSU68 prevents liver metastasis of colon cancer xenografts by modulating the premetastatic niche. *Cancer Res*. 68(23):9754-62.
- Yang E, Boire A, Agarwal A, Nguyen N, O'Callaghan K, Tu P, Kuliopulos A, Covic L. 2009. Blockade of PAR1 signaling with cell-penetrating pepducins inhibits Akt survival pathways in breast cancer cells and suppresses tumor survival and metastasis. *Cancer Res*. 69(15):6223-31.
- Yao D, Dai C, Peng S. 2011. Mechanism of the mesenchymal-epithelial transition and its relationship with metastatic tumor formation. *Mol Cancer Res*. 9(12):1608-20.
- Yates CC, Shepard CR, Stolz DB, Wells A. 2007. Co-culturing human prostate carcinoma cells with hepatocytes leads to increased expression of E-cadherin. *Br J Cancer*. 96(8):1246-52.

- Yilmaz M, Christofori G. 2010. Mechanisms of motility in metastasizing cells. *Mol Cancer Res.* 8(5):629-42.
- Yilmaz M, Christofori G, Lehembre F. 2007. Distinct mechanisms of tumor invasion and metastasis. *Trends Mol Med.* 13(12):535-41.
- Yokobori T, Suzuki S, Tanaka N, Inose T, Sohda M, Sano A, Sakai M, Nakajima M, Miyazaki T, Kato H, Kuwano H. 2012. MiR-150 is associated with poor prognosis in esophageal squamous cell carcinoma via targeting the EMT inducer ZEB1. *Cancer Sci.* doi: 10.1111/cas.12030.
- Yoshida H, Okamoto K, Iwamoto T, Sakai E, Kanaoka K, Hu JP, Shibata M, Hotokezaka H, Nishishita K, Mizuno A, Kato Y. 2006. Pepstatin A, an aspartic proteinase inhibitor, suppresses RANKL-induced osteoclast differentiation. *J Biochem.* 139(3):583-90.
- Zabouo G, Imbert AM, Jacquemier J, Finetti P, Moreau T, Esterni B, Birnbaum D, Bertucci F, Chabannon C. 2009. CD146 expression is associated with a poor prognosis in human breast tumors and with enhanced motility in breast cancer cell lines. *Breast Cancer Res.* 11(1):R1.
- Zaidi N, Maurer A, Nieke S, Kalbacher H. 2008. Cathepsin D: a cellular roadmap. *Biochem Biophys Res Commun.* 376(1):5-9.
- Zeng GF, Cai SX, Wu GJ. 2011. Up-regulation of METCAM/MUC18 promotes motility, invasion, and tumorigenesis of human breast cancer cells. *BMC Cancer.* 11:113.
- Zeng G, Cai S, Liu Y, Wu GJ. 2012. METCAM/MUC18 augments migration, invasion, and tumorigenicity of human breast cancer SK-BR-3 cells. *Gene.* 492(1):229-38.
- Zhang Z, Liu S, Shi R, Zhao G. 2011. miR-27 promotes human gastric cancer cell metastasis by inducing epithelial-to-mesenchymal transition. *Cancer Genet.* 204(9):486-91.
- Zhao L, Glazov EA, Pattabiraman DR, Al-Owaidi F, Zhang P, Brown MA, Leo PJ, Gonda TJ. 2011. Integrated genome-wide chromatin occupancy and expression analyses identify key myeloid pro-differentiation transcription factors repressed by Myb. *Nucleic Acids Res.* 39(11):4664-79.
- Zhao J, Ni H, Ma Y, Dong L, Dai J, Zhao F, Yan X, Lu B, Xu H, Guo Y. 2007. TIP30/CC3 expression in breast carcinoma: relation to metastasis, clinicopathologic parameters, and P53 expression. *Hum Pathol.* 38(2):293-8.
- Ziober BL, Turner MA, Palefsky JM, Banda MJ, Kramer RH. 2000. Type I collagen degradation by invasive oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol.* 36(4):365-72.
- Zuber J, Rappaport AR, Luo W, Wang E, Chen C, Vaseva AV, Shi J, Weissmueller S, Fellmann C, Taylor MJ, Weissenboeck M, Graeber TG, Kogan SC, Vakoc CR, Lowe SW. 2011. An integrated approach to dissecting oncogene addiction implicates a Myb-coordinated self-renewal program as essential for leukemia maintenance. *Genes Dev.* 25(15):1628-40.

## 8 SEZNAM ZKRATEK

4T1	buněčná linie z tumoru mléčné žlázy myši kmene BALB/cfC3H
12(S)-HETE	kyselina hydroxyeicosatetraenová, metabolit kyseliny arachidonové
Actr10	„ARP10 actin-related protein 10“
Angptl4	„angiopoetin-like 4“
AP	propeptid katepsinu D/aktivační peptid
AP1	„activator protein 1“, transkripční faktor
APC	„adenomatosis polyposis coli“, nádorový supresor
Arp2/3	„actin-related protein 2/3 homolog (yeast)“
ASK1	„mitogen-activated protein kinase kinase kinase 5“; <i>MAP3K5</i>
<i>BCL2</i>	gen kódující „B-cell CLL/lymphoma 2“, regulátor apoptózy
BMDC	„bone marrow-derived cell“
BME	extrakt bazální membrány, „basement membrane extract“
BM-EPC	„bone marrow-derived endothelial progenitor cells“
CBP	„CREB binding protein“, transkripční koaktivátor kódovaný genem <i>CREBBP</i>
<i>CCL2</i>	„chemokine (C-C motif) ligand 2“
<i>CCNA1</i>	gen kódující cyklin A1
<i>CCNB1</i>	gen kódující cyklin B1
<i>CCNE1</i>	gen kódující cyklin E1
CD11b	„cell surface glycoprotein MAC-1 subunit alpha“, gen <i>ITGAM</i>
CD44	povrchový glykoprotein CD44, „CD44 molecule (Indian blood group)“
Cdc42	GTP-vázající protein „cell division cycle 42“
<i>CDH11</i>	gen kódující kadherin 11, OB-kadherin („osteoblast-cadherin“)
CIM-plate 16	„cell invasion and migration“, 16-jamkové destičky pro RTCA
Citron	serin-treonin kináza interagující s Rho
CLCA1	„calcium-dependent chloride channel-1“
CMV	cytomegalovirus
<i>COL1A2</i>	gen kódující $\alpha 2$ polypeptid kolagenu I
Cox-2	cyklooxygenáza 2
<i>CTSD</i>	gen kódující katepsin D (CD)
CXCL1	„chemokine (C-X-C motif) ligand 1“
CXCL12	viz SDF-1
CXCR4	„chemokine (C-X-C motif) receptor 4“, receptor CXCL12/SDF-1
<i>Cxcr4</i>	myší gen kódující chemokinový receptor 4 (C-X-C motif)
c-Myb	protein kódovaný genem <i>MYB/Myb</i>
<i>DHRS2</i>	člen 2 SDR rodiny dehydrogenáz/reduktáz, kóduje Hep27
Dial	„diaphanous homolog 1 (Drosophila)“
DUSP	fosfatázy dvojí specifity („dual-specificity phosphatases“)
E47	„transcription factor 3 (E2A immunoglobulin enhancer binding factors E12/E47)“
EBM	„Endothelial Basal Medium“
ECM	extracelulární matrix
EHS	Engelbreth-Holm-Swarmův myší sarkom
EGF	epidermální růstový faktor
EMT	„epithelial-to-mesenchymal transition“
ER	estrogenový receptor
<i>EREG</i>	epiregulin

ERM	ezrin/radixin/moesin, rodina adaptorových proteinů
FCS	fetální bovinní sérum
FGF	fibroblastový růstový faktor
<i>FNI</i>	fibronektin 1
FOX2	„RNA binding protein, fox-1 homolog (C. elegans) 2“
<i>GAPDH</i>	lidský gen kódující glycerinaldehyd-3-fosfát dehydrogenázu
<i>Gapdh</i>	myší gen kódující glycerinaldehyd-3-fosfát dehydrogenázu
<i>GATA3</i>	gen kódující transkripční faktor „GATA binding protein 3“
GEO	„Gene Expression Omnibus“
HA	hemaglutinin
Hep27	viz <i>DHRS2</i>
HER2	receptoru pro lidský epidermální růstový faktor 2
HGF	hepatocytový růstový faktor
H-M3	varianta buněčné linie 4T1 stabilně exprimující exogenní <i>MYB</i>
HoxA9	transkripční faktor homeobox A9
<i>HSPA5</i>	gen kódující 70 kDa protein teplotního šoku 5, „heat shock 70kDa protein 5“
<i>HTATIP2</i>	gen kódující oxidoreduktázu TIP30
HUVEC	„Human Umbilical Vein Endothelial Cells“
<i>HYAL1/2</i>	geny kódující hyaluronidázu 1 a 2
ICAM1	mezibuněčná adhezivní molekula 1; CD54
<i>Id1</i>	myší gen kódující inhibitor diferenciaci 1 („inhibitor of DNA binding 1“)
IL12	interleukin 12
<i>IL18</i>	gen kódující interleukin 18
<i>ITGB3</i>	gen kódující CD61 (integrin β3)
JNK/SAPK	„c-Jun NH2-terminal kinase/stress-activated protein kinase“
<i>JUN</i>	protoonkogen <i>c-jun</i> , kóduje transkripční faktor c-Jun
<i>KIT</i>	„v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog“, kóduje tyrozin protein kinázu c-Kit
KLF4/8	transkripční faktory „Kruppel-like factor 4/8“
<i>KRT16</i>	gen kódující cytokeratin 16
LAS	„Leica Application Suite“
LB	Luria Broth (médium)
<i>LMO2</i>	gen kódující „LIM domain only 2 (rhombotin-like 1)“
LOX	„lysyl oxidase“
LRP1	„Low density lipoprotein receptor-related protein 1“, CD91
<i>Luc</i>	sekvence kódující luciferázu
<i>MCAM</i>	gen kódující CD146 („melanoma cell adhesion molecule“)
MCF7	buněčná linie lidského karcinomu prsu
MDA-MB-231	buněčná linie z pleurální efúze lidského adenokarcinomu prsu
Meis1	„Meis homeobox 1“, transkripční faktor
MET	„mesenchymal-epithelial reverting transition“
Mdm2	„p53 E3 ubiquitin protein ligase homolog (mouse)“
MKK4	„mitogen-activated protein kinase kinase 4“; <i>MAP2K4</i>
MKK7	„mitogen-activated protein kinase kinase 7“; <i>MAP2K7</i>
MLK1	„mitogen-activated protein kinase kinase kinase 9“; <i>MAP3K9</i>
M-M5, M-M8B	varianty buněčné linie 4T1 stabilně exprimující exogenní <i>Myb</i>
MMP	matrixová metaloproteináza
<i>MMP1</i>	gen kódující matrix metaloproteinázu 1 (intersticiální kolagenáza)

<i>Mmp1a</i>	myší gen kódující matrix metalopeptidázu 1a (intersticiální kolagenáza)
<i>MMP9</i>	gen kódující matrix metaloproteinázu 9 (92kDa kolagenáza typu IV)
MMTV	„mouse mammary tumor virus“
MMTV- <i>NEU</i>	transgenní myši, v nichž je exprese onkogenu <i>NEU</i> pod kontrolou promotoru viru MMTV („mouse mammary tumor virus“)
MMTV- <i>PyMT</i>	transgenní myši, v nichž je exprese onkogenu <i>PyMT</i> („polyoma middle T antigen“) pod kontrolou promotoru viru MMTV („mouse mammary tumor virus“)
<i>MPRIP</i>	„myosin phosphatase Rho interacting protein“
<i>MSN</i>	lidský gen kódující moesin
<i>Msn</i>	myší gen kódující moesin
MT1-MMP	„membrane-type matrix metalloproteinase 1“, matrix metaloproteináza 14
Mtap2	Map2, „microtubule-associated protein 2“
<i>MYADM</i>	„myeloid-associated differentiation marker“
<i>MYB</i>	lidský gen, „v- <i>myb</i> avian myeloblastosis viral oncogene homolog“
<i>Myb</i>	myší gen, „myeloblastosis oncogene“
MYBup (M2, M5)	varianty buněčné linie MDA-MB-231 stabilně exprimující exogenní <i>MYB</i>
<i>MYC</i>	„v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)“, kóduje transkripční faktor c-Myc
Myh9	„myosin, heavy polypeptide 9, non-muscle“
N-WASP	adaptorový protein „Wiskott-Aldrich syndrome-like“
p53	nádorový supresor p53, kódovaný genem <i>TP53</i>
p300	„E1A binding protein p300“, transkripční koaktivátor kódovaný genem <i>EP300</i>
PAI1	„plasminogen activator inhibitor 1“
PAK	„p21 protein (Cdc42/Rac)-activated kinase 1“
PAR-1	proteázou aktivovaný receptor 1; „protease-activated receptor 1“
Pbx	transkripční faktor „pre-B-cell leukemia homeobox 1“
<i>PCNA</i>	gen kódující „proliferating cell nuclear antigen“
PDGF	„platelet-derived growth factor“
PEST/EVES	proteinový motiv obklopující Lys <sup>523</sup> v C-koncové doméně proteinu c-Myb
PET	polyethylentereftalát
PKD	protein kináza D
PIGF	„placental growth factor“, kódovaný genem <i>PGF</i>
<i>PTGS2</i>	gen kódující prostaglandin endoperoxid syntázu 2 (cyklooxygenázu 2)
PR	progesteronový receptor
PU.1	transkripční faktor kódovaný genem <i>SPI1</i>
Rac1	GTP-vázající protein rodiny Rho
Rdx	radixin
RhoA	„ras homolog family member A“, GTP vázající protein
ROCK1/2	kinázy Rho „Rho-associated, coiled-coil containing protein kinase 1/2“
RLU	relativní aktivita luciferázy
RTCA	„Real-Time Cell Analyzer“
qRT-PCR	kvantitativní PCR v reálném čase
S100A8/9	„S100 calcium binding protein A8/A9“, kalgranulin A/B
SAA3	sérový amyloid A3
SA-β-gal	„senescence-associated β-galactosidase“

SCF	„stem cell factor“
SDF-1	„stromal cell-derived factor-1; chemokine (C-X-C motif) ligand 12“, kódovaný genem <i>CXCL12</i>
SDS-PAGE	„sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis“
SF	bez přídavku fetálního bovinního séra
Shh	„sonic hedgehog“
<i>SNAI1/2</i>	geny kódující transkripční faktory snail homolog 1 (Snail) a 2 (Slug)
<i>SPP1</i>	gen kódující osteopontin (sekretovaný fosfoprotein 1)
Src	tyrozin kináza c-Src, „v-src sarcoma (Schmidt-Ruppin A-2) viral oncogene homolog (avian)“
SV40	Simian virus 40
TAK1	„mitogen-activated protein kinase kinase kinase 7“; <i>MAP3K7</i>
TAM	„Tumor-Associated Macrophage“
TEM	transendoteliální migrace
TESS	„Transcription Element Search Software“
TGFβ	transformující růstový faktor β
<i>TGFBI</i>	gen kódující „transforming growth factor, beta-induced, 68kDa“
Tks-5	adaptorový protein invadopodií/podozomů; „SH3 and PX domains 2A“
Tubb4	tubulinβ 4A
uPA	urokináza, aktivátor plazminogenu, kódovaný genem <i>PLAU</i>
uPAR	receptor urokinázy, kódovaný genem <i>PLAUR</i>
VCAM1	„vascular cell adhesion molecule 1“, vaskulární adhezivní molekula 1
VEGF	vaskulární endoteliální růstový faktor
VEGFR1/2	receptory vaskulárního endoteliálního růstového faktoru 1 a 2
VLA-4	„Very Late Antigen-4“; integrin α4β1
WASP	adaptorový protein „Wiskott-Aldrich syndrome“
Wnt	signální protein „wingless-type MMTV integration site family“
ZEB1/2	transkripční faktory „zinc finger E-box binding homeobox 1/2“



## 9 PŘÍLOHY

### Publikace

1. KNOPFOVÁ, Lucia a Petr BENEŠ a Lucie PEKARČÍKOVÁ a Markéta HERMANOVÁ a Michal MASARŽÍK a Zuzana PERNICOVÁ a Karel SOUČEK a Jan ŠMARDÁ. c-Myb regulates matrix metalloproteinases 1/9, and cathepsin D: implications for matrix-dependent breast cancer cell invasion and metastasis. *Molecular Cancer*, 15, 11, 2012.
2. KNOPFOVÁ, Lucia a Jan ŠMARDÁ. v-Myb suppresses phorbol ester- and modifies retinoic acid-induced differentiation of human promonocytic U937 cells. *Neoplasma*, 55, 4, 286-293, 2008.
3. KNOPFOVÁ, Lucia a Jan ŠMARDÁ. The use of Cox-2 and PPAR gamma signaling in anti-cancer therapies (Review). *Experimental and Therapeutic Medicine*, 1, 1, 257-264, 2010.
4. BENEŠ, Petr a Lucia KNOPFOVÁ a Filip TRČKA a Alice NEMAJEROVÁ a Diana PINHEIRO a Karel SOUČEK a Miroslav FOJTA a Jan ŠMARDÁ. Inhibition of topoisomerase IIa: Novel function of wedelolactone. *Cancer Letters*, 303, 1, 29-38, 2011.
5. BENEŠ, Petr a Petra ALEXOVÁ a Lucia KNOPFOVÁ a Alena ŠPANOVÁ a Jan ŠMARDÁ. Redox State Alters Anti-Cancer Effects of Wedelolactone. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 53 (7), 515-24, 2012.
6. LUNGOVÁ, Vlasta a Marcela BUCHTOVÁ a Eva JANEČKOVÁ a Abigail S. TUCKER a Lucia KNOPFOVÁ a Jan ŠMARDÁ a Eva MATALOVÁ. Localization of c-MYB in differentiated cells during postnatal molar and alveolar bone development. *Eur J Oral Sci.* 120(6), 495-504, 2012