

INFORMAČNÍ LISTY



Zápis ze schůze výboru Genetické společnosti Gregora Mendela konané dne 19. 5. 2014 v Brně v Univerzitním kampusu v Bohunicích

Přítomni: Doškař, Mašek, Nešvera, Relichová, Šmarda, Zdražil, Miadoková, Slaninová, Malachová, Tomáška, Zelený, Knoll, Kočová

Omluveni: Šeda, Angelis

Program schůze:

- 1) Kontrola zápisu z minulé schůze výboru společnosti, zpráva o činnosti výboru za uplynulé období
- 2) Zhodnocení náplně IL č. 42 a příprava dalšího čísla
- 3) Detailní informace o průběhu příprav Genetické konference GSGM, která se bude konat 24. - 26. září 2014 v Průhonicích u Prahy
- 4) Zpráva hospodářů o stavu účtů a placení členských příspěvků
- 5) Projednání nových přihlášek za člena GSGM a zařazení nově přijatých členů do evidence
- 6) Aktuální stav přihlášek do soutěže o Cenu GSGM
- 7) Různé

ad 1)

Schůzi zahájil prof. Doškař, který uvedl jednotlivé body programu. Zhodnotil plnění úkolů vyplývajících ze zápisu z minulé schůze výboru společnosti a konstatoval, že většina úkolů byla splněna, některé trvají a jejich plnění bude průběžně kontrolováno. Prof. Doškař zhodnotil zejména dosavadní spolupráci s Mendelovým muzeem, která se rozvíjí v souladu s podepsaným memorandem. Je pozvaný na jednání s vedením muzea o rozvoji další spolupráce. Na jednání bude mimo jiné diskutován návrh na pravidelné zasílání nových publikací a dalších odborných materiálů, které budou k dispozici návštěvníkům Mendelova muzea v nově zakládané knihovně. Všichni členové společnosti obdrželi volnou vstupenku do muzea. Dosavadní spolupráci zhodnotili přítomní členové výboru jako slibně se rozvíjející (zodpovídá Doškař).

ad 2)

Opět byla velmi kladně hodnocena vysoká úroveň IL a maximální úsilí, které přípravě a konečné podobě věnuje prof. Šmarda. Pro nadcházející i další číslo IL obdržel autoreferáty úspěšně obhájených doktorských dizertačních prací. V připravovaném čísle IL, jehož uzávěrka je v polovině června, bude dále zveřejněna informace o soutěži GSGM a informace o nadcházející konferenci (zodpovídá Šmarda, Doškař, Kočová).

ad 3)

Přítomní členové výboru z Prahy informovali o stavu příprav genetické konference, která se uskuteční 24. – 26. září 2014 v konferenčním centru FLORET v Průhonicích u Prahy. Byl představen program konference se zvanými přednáškami a dosud nespecifikovanými příspěvky mladých vědeckých pracovníků a studentů. Byly diskutovány další detaily související s přípravou a průběhem konference, možnosti ubytování, apod. Bylo konstatováno, že příprava konference probíhá uspokojivě a v souladu s předem představeným plánem. Členové organizačního výboru konference vznesli požadavek, aby všichni členové výboru společnosti přispěli aktivně na

svých domovských institucích k maximální propagaci této akce a pomohli zajistit vysokou účast zejména z řad studentů, doktorandů a mladých vědeckých pracovníků. Plenární přednášky přednesou významní odborníci z různých oblastí genetiky a všichni účastníci konference budou mít jedinečnou možnost získat aktuální informace a představit a diskutovat na tomto fóru svůj výzkum. Všichni přítomní členové výboru obdrželi informační letáky konference s hlavními body programu pro zveřejnění na svých pracovištích a dalších spřátelených pracovištích. Všichni přislíbili maximální pomoc při propagaci konference.

ad 4)

Prof. Knoll a doc. Slaninová informovali o aktuálním stavu účtů společnosti. Příjmy a výdaje jsou vyrovnané, společnost hospodaří v souladu s pravidly hospodaření neziskových organizací. Zlepšila se morálka placení členských příspěvků.

ad 5)

Byly projednány dvě přihlášky za člena společnosti, které podali Mgr. Roman Šolc a RNDr. Michaela Schierová, Ph.D. Obě přihlášky byly jednomyslně schváleny a nově přijatí členové budou zařazeni do evidence.

ad 6)

Výbor obdržel do uzávěrky (30. 4. 2014) celkem pět přihlášek do soutěže o cenu GSGM. Posouzení přihlášených prací proběhne korespondenční formou. Každý člen výboru obdrží v elektronické podobě všechny materiály, které posoudí a stanoví pořadí přihlášených soutěžících. Na základě výsledků tohoto hlasování bude vybrán vítěz, který získá cenu GSGM a přednese přednášku na konferenci. Cena, kterou věnuje M.G.P. Zlín bude předána na konferenci.

ad 7)

Prof. Zadražil připomněl volby do výboru společnosti, které by se měly uskutečnit v nadcházejícím období. Navrhl, aby podobně jako v minulosti, proběhly korespondenční formou a na valném shromáždění během konference by byly zveřejněny jejich výsledky.

Prof. Tomáška navrhl uskutečnit v budoucnu seminář zástupců různých univerzit, který by byl věnovaný organizaci, formám a obsahu výuky genetiky na různých institucích a výměně zkušeností v této oblasti. Na podzimní schůzi výboru společnosti bude, v případě zájmu o takový seminář, dohodnutý konkrétní termín a program.

Po ukončení jednání výboru společnosti se uskutečnila krátká exkurze do nově otevřených částí univerzitního kampusu.

Zapsala: M. Kočová

VYÚČTOVÁNÍ HOSPODAŘENÍ GSGM OD 1. 1. 2013 DO 31. 12. 2013

ČR

Zůstatek k 31. 12. 2012		27384,77 Kč
z toho	na účtu KB	24745,77
	v hotovosti	2639,00

Příjmy v roce 2013		6355,60 Kč
1. úroky z účtu u KB		5,60
2. členské příspěvky (6650 Kč):		
z toho	placené na účet KB	6050,-
	placené hotově	300,-

Výdaje v roce 2013		4943,- Kč
1. občerstvení při jednání komise GSGM		128,-
2. poplatky banky za vedení účtu a položky		1815,-
3. zpracování IL		3000,-

Zůstatek k 31. 12. 2013		28797 Kč
z toho	na účtu KB	25986,-
	v hotovosti	2811,-

SR

Zostatok k 31. 12. 2012		1321,20 EUR
z toho	na účte Tatra banka	1246,82
	v hotovosti	74,38

Příjmy v roku 2013		81,00 EUR
Členské poplatky 1		66,-
Členské poplatky 2		15,-

Výdavky v roku 2013		79,14 EUR
1. poplatky banke za vedenie účtu		75,64
2. poštové obálky		3,50

Zostatok k 31. 12. 2013		1323,06 EUR
	na účte Tatra banka	1237,18
	v hotovosti	85,88

Zpracovali: Aleš Knoll a Miroslava Slaninová



24.9. – 26.9.2014
Průhonice u Prahy

Místo konání

FLORET

vzdělávací a informační centrum,
Květnové náměstí 391, Průhonice

Genetická společnost Gregora Mendela vás zve ve dnech 24.-26. září 2014 do krásného prostředí konferenčního centra FLORET v Průhonicích u Prahy na tradiční setkání českých a slovenských vědců a zájemců o genetiku a molekulární biologii různých organismů. Snahou organizačního výboru je zpřístupnit konferenci širokému okruhu zájemců a zejména pak mladším a začínajícím vědeckým pracovníkům a studentům. Na program tedy budou nejen zvané plenární přednášky významných odborníků z vysokých škol a akademických pracovišť, ale i kratší přednášky a tradiční prezentace formou plakátových sdělení. Konference připomene též 55. výročí založení katedry genetiky a mikrobiologie Přírodovědecké fakulty UK v Praze a proto jsou vítáni všichni absolventi. Konference je určena všem zájemcům bez ohledu na členství v GSGM. Pro doktorandy a magisterské studenty je to skvělá příležitost, jak představit výsledky své práce širší vědecké komunitě!

Organizátor

Genetická společnost Gregora Mendela

Prof. RNDr. Stanislav Zdražil, DrSc., PřF UK v Praze
RNDr. Marie Kočová, CSc., PřF UK v Praze
RNDr. Dana Holá, Ph.D., PřF UK v Praze
RNDr. Tomáš Mašek, Ph.D., PřF UK v Praze
RNDr. Jan Nešvera, CSc., MBÚ AV ČR, v.v.i., Praha
RNDr. Martin Pospíšek, Ph.D., PřF UK v Praze
RNDr. Olga Rothová, PřF UK v Praze
Doc. MUDr. Ondřej Šeda, Ph.D., 1.LF UK v Praze
RNDr. Karel Zelený, CSc., M.G.P. s.r.o. Zlín

Registrace

Online registrace do 15.7.2014

na internetové stránce

http://www.biologicals.cz/conferences/index.php?conference_id=20

Program konference

Přednášky a posterové prezentace budou zaměřeny na aktuální témata z nejrůznějších oblastí genetiky, molekulární a buněčné biologie včetně genomiky, epigenetiky, onkogenetiky, cytogenetiky, evoluční genetiky, forenzní genetiky aj. Zastoupeno bude široké spektrum studovaných organismů – viry, mikroorganismy, rostliny a živočichové včetně člověka.

Plenární přednášky

Prof. Ing. Jaroslav Doležel, DrSc. (ÚEB AV ČR, v.v.i., Olomouc): *Chromosomová genomika odhaluje tajemství složitých genomů rostlin*

Doc. Mgr. Juraj Gregáň, Ph.D. (PrF UK v Bratislavě): *Novel S. pombe proteins required for proper segregation of chromosomes during meiosis*

RNDr. Roman Hobza, Ph.D. (BFÚ AV ČR, v.v.i., Brno) *Co nám říkají pohlavní chromozómy rostlin o našem osudu?*

RNDr. Martina Putzová, Ph.D. (GENNET, s.r.o., Praha): *Využití NGS v preimplantační a prenatalní diagnostice*

RNDr. Zuzana Storchová, Ph.D. (Max Planck Institute of Biochemistry, Martinsried): *Komplexní změny v buňkách s abnormálním počtem chromozómů*

Doc. RNDr. Petr Svoboda, Ph.D. (ÚMG AV ČR, v.v.i., Praha): *Myší vejce a RNA interference*

RNDr. Michal Šmahel, Ph.D. (ÚHKT, Praha): *Záludnosti protinádorové DNA vakcinace*

RNDr. Daniel Vaněk, Ph.D. (Forenzní DNA Servis s.r.o., Praha): *Čtvrtstoletí identifikační genetiky: možnosti, přednosti, úskalí a neřešené problémy*

Prof. RNDr. Stanislav Zdražil, DrSc. (PřF UK v Praze): *Historie genetiky na Přírodovědecké fakultě UK v Praze*

Generální sponzor konference:



Mendelův rok zábavného vzdělávání

Eva Matalová

Ústav živočišné fyziologie a genetiky AV ČR, v.v.i., Veveří 97, 602 00 Brno



Příští rok uplyne 150 let od zveřejnění klíčové práce J. G. Mendela Pokusy s hybridy rostlin formou přednášek na půdě města Brna. Protože J. G. Mendel zviditelňuje Brno na vědecké a kulturní mapě Evropy a celého světa, toto výročí si zaslouží více než připomenutí. Mendelianum MZM Brno proto se svými partnery a spolupracovníky připravilo unikátní sérii aktivit pod hlavičkou Mendelův rok zábavného vzdělávání. Mendelův rok byl zahájen v dubnu 2014 a bude ukončen v březnu 2015. Každý měsíc roku přinese něco nového, a to s využitím tradičních i netradičních formátů akcí zahrnujících např. motivační výstavy, soutěže, letní školu, vědu hrou, vědu v akci, interaktivní workshopy, konference, které budou doplněny vydáním řady odborných i populárně vědeckých publikací.



Rámcový program akcí Mendelova roku

Duben 2014

Motivační genetické příběhy

Odpoledne s DNA: Genová exprese aneb co vlastně kódují geny

Květen 2014

Mendel Forum 2014

Mendel Medal + Mendel Lecture

Round Table Discussion – Mendel Expert Team

Fotografická a výtvarná soutěž Mendelovy pokusné rostliny - zahájení

Červen 2014

Léto s genetikou v Mendelově Brně - nabídka akcí

Fotografická a výtvarná soutěž Mendelovy pokusné rostliny

Červenec 2014

Prázdninové středy s genetikou
Mendelova letní škola: Mendelův vzdělávací víkend
Procházka Mendelovým Brnem
Fotografická a výtvarná soutěž Mendelovy pokusné rostliny
Pilotní provoz návštěvnického centra Mendelianum – atraktivní svět genetiky

Srpen 2014

Mendelova letní škola: „Jak funguje ...“
Prázdninové středy s genetikou
Fotografická a výtvarná soutěž Mendelovy pokusné rostliny
Pilotní provoz návštěvnického centra Mendelianum - atraktivní svět genetiky

Září 2014

Mendelova mobilní škola - zahájení pilotního provozu
Fotografická a výtvarná soutěž Mendelovy pokusné rostliny - ukončení
Pilotní provoz návštěvnického centra Mendelianum – atraktivní svět genetiky

Říjen 2014

Junior Mendel Forum 2014
Fotografická a výtvarná soutěž Mendelovy pokusné rostliny - hlasování
Mendelianum – atraktivní svět genetiky (finalizace návštěvnického centra)

Listopad 2014

Nobelovská výročí a věda v akci: Geny a čichový epitel aneb proč nám někdo voní a někdo ne
Nobelovy ceny 2014
Fotografická a výtvarná soutěž Mendelovy pokusné rostliny - hlasování
Mendelianum – atraktivní svět genetiky

Prosinec 2014

Mendelova WWW škola: Věda hrou - oficiální zahájení
Fotografická a výtvarná soutěž Mendelovy pokusné rostliny - finalizace
Mendelianum – atraktivní svět genetiky

Leden 2015

Mendelova mobilní škola – oficiální zahájení
Mendelovo všestranné působení v Brně – vernisáž výstavy
Mendelianum – atraktivní svět genetiky

Únor 2015

Mendelova interaktivní škola – oficiální zahájení
Mendelovy pokusné rostliny - vernisáž výstavy
Mendelianum – atraktivní svět genetiky

Březen 2015

Jubilejní Mendel Forum
Mendel Medal + Mendel Lecture
Round Table Discussion – Mendel Expert Team
Mendelovo brněnské vědecké kolegium – vernisáž výstavy

Oficiální otevření CENTRUM MENDELIANUM
Genetika všemi smysly - zahájení cyklu

Spolupracující instituce



Více informací k nabídce naleznete na stránkách www.mendelianum.cz a www.mendel-brno.cz. Těšíme se na setkání na některé z akcí!



Prof. RNDr. Eva Matalová, Ph.D. je vědeckou pracovnící Ústavu živočišné fyziologie a genetiky Akademie věd ČR, v.v.i., profesorkou na Fakultě veterinárního lékařství VFU Brno) a je odbornou garantkou projektu Mendelianum – atraktivní svět genetiky (e-mail: matalova@iach.cz).

PhDr. Anna Matalová je dlouholetou pracovnící Mendeliana Moravského zemského muzea v Brně. Aktuálně se jako koordinátorka věnuje realizaci projektu Mendelianum – atraktivní svět genetiky.



Pilotní provoz centra Mendelianum – atraktivní svět genetiky

Jiří Sekerák

Moravské zemské muzeum, Zelný trh 6, 659 37 Brno

Moravské zemské muzeum je přímým pokračovatelem muzea Hospodářské společnosti, na jejíž půdě JGM působil a která sídlila v Biskupském dvoře v Brně. V těchto autentických prostorách jeho vědecké společnosti bude otevřeno návštěvnické centrum Mendelianum – atraktivní svět genetiky. Projekt podporovaný Evropským fondem pro regionální rozvoj a státním rozpočtem ČR (CZ.1.05/3.2.00/09.0180) byl zahájen v roce 2012 a nyní vstupuje do svého pilotního provozu. V návštěvnickém centru je na historicko-vědním základě představen vědecký odkaz J. G. Mendela a jeho propojení s moderní genetikou a molekulární biologii. Návštěvnické centrum představuje moderní formu „living museum“, jehož součástí jsou laboratoře a další interaktivní prvky, které umožňují aktivní zapojení návštěvníků do vědy a výzkumu.

Informační listy GSGM, 2014, 43: 7-8

Základní části návštěvnického centra tvoří:

- Vstupní část: Od genetického programu k jeho realizaci
- Molekulárně biologická laboratoř: Touha poznávat a objevovat
- Genetické příběhy na pozadí Nobelových cen
- Historický sál a moderní věda: Kontrapunkt starého a nového
- Zasedací sál: Kde získal Mendel motivaci pro své pokusy
- Mendelova laboratoř: Co Mendel věděl a co vědět nemohl
- Vědecké prostředí Mendelova objevu: Výlet do Mendelovy doby
- Mendelovy pokusné rostliny
- Mendelovo Brno: Procházka po stopách J. G. Mendela v Brně

Pilotní provoz probíhá od 1. 7. 2014 a veškeré modifikace budou ukončeny k 31. 10. 2014, kdy bude návštěvnické centrum finalizováno. Pilotní provoz nabízí náhled do jednotlivých komponent centra, ověření jejich funkčnosti a také zpětnou vazbu ve formě hodnocení návštěvníků. Bližší informace naleznete na www.mendelianum.cz, součástí pilotního provozu jsou i akce pod hlavičkou Prázdninové středy s genetikou.



Výstavba návštěvnického centra Mendelianum – atraktivní svět genetiky v Biskupském dvoře (vlevo) a představení projektu v Urban centru.



Projekt Mendelianum – atraktivní svět genetiky (CZ.1.05/3.2.00/09.0180) je spolufinancován z Evropského fondu pro regionální rozvoj a státního rozpočtu České republiky.



PhDr. Jiří Sekerák, Ph.D. je vedoucím Oddělení pro historii biologických věd Moravského zemského muzea v Brně (e-mail: jsekerak@mzm.cz).

Léto s vědou v Mendelově Brně

Eva Matalová

Ústav živočišné fyziologie a genetiky AV ČR, v.v.i., Veverčí 97, 602 00 Brno

Mendelianum Moravského zemského muzea ve spolupráci s Ústavem živočišné fyziologie a genetiky AV ČR, v.v.i. a dalšími institucemi představilo 18. 6. 2014 prázdninový program popularizace vědy a výzkumu v oblasti genetiky, molekulární biologie, fyziologie a biomedicíny. Nosné aktivity zahrnují program pod hlavičkou Prázdninové středě s genetikou a dále Letní Mendelovu školu. Prázdninové středě s genetikou jsou součástí pilotního provozu návštěvnického centra Mendelianum, Mendelova letní škola je zastřešována projektem Mendelova interaktivní škola genetiky (CZ.1.07/2.3.00/45.0037).

Letní aktivity jsou primárně určeny pro studenty vyšších ročníků SŠ, začínající VŠ studenty a SŠ pedagogy, ale vítáni jsou všichni zájemci o vědeckou práci.



Praktické ukázky laboratorní práce a diskuse v rámci akce Léto v Mendelově Brně, 18. 6. 2014, Dietrichsteinský palác MZM Brno

Prázdninové středy s genetikou

Tento program nabízí každou středu aktivní seznámení s vědou a výzkumem. Dopolední program (10 – 12 h) je zaměřen na praktickou činnost a bude realizován v prostorách nově vybudovaného návštěvnického centra Mendelianum – atraktivní svět genetiky. Odpolední část je určena pro další vzdělávání a ověření získaných poznatků formou e-learningu.

2. července 2014

Mendel, Brno a atraktivní genetiky

Chcete se blíže seznámit s novým návštěvnickým centrem Mendelianum – atraktivní svět genetiky v Brně? Být u zahájení jeho pilotního provozu? Být prvními návštěvníky, kteří nahlédnou do finalizace expozic? Chcete si vyzkoušet interaktivní prvky?

9. července 2014

Seznámení s DNA

Co vlastně kóduje DNA? Jak vypadá? Jak ji lze získat? Jaké metody slouží k jejímu výzkumu? Co nám prozradí?

16. července 2014

Geny a antigeny

Co je gen? Co je antigen? V jakém jsou vztahu? Jak se podílejí na naší jedinečnosti? Jak se uplatňují při transplantacích a transfuzích?

23. července 2014

Molekulární klonování

Co je klonování? Jak probíhá v přírodě? Kdy začalo v laboratořích? K čemu se využívá? Co je molekulární klonování?

30. července 2014

Genetika a tajemství krve

Proč se říká „mít něco v krvi“ a ne „v genech“? Co lze zjistit z krevního vzorku? Jak ho získat a zpracovat? Jak číst výsledky?

6. srpna 2014

Není buňka jako buňka

Jak buňky vznikají? Jak se od sebe liší? Co řídí tyto odlišnosti? Jak vypadají buňky, ze kterých lze nejnadhěji získat DNA? Co jsou kmenové buňky a jak je lze využít?

13. srpna 2014

Molekuly, buňky a tkáň

Jak se geny podílejí na diferenciaci buněk ve tkáních? Jak buňky komunikují? Jaké tkáň obsahuje naše tělo? Čím se od sebe liší? Jak je zkoumat?

20. srpna 2014

Genetická regulace vývoje orgánů a jejich funkce

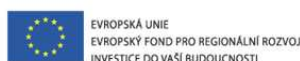
Co řídí vývoj orgánů během embryogeneze? Které orgány zahajují svoji funkci jako první? Kdo je řídí? Jak funguje srdce? Proč se mnohdy uvádí jako centrum emocí? Jak lze jeho funkce zkoumat?

27. srpna 2014

Věda Mendelovy a dnešní doby

Proč je Mendel stále celosvětově uznáván? Kdo na jeho práci navazuje? Jak by Mendelovy pokusy probíhaly dnes? Jaké metody používá dnešní molekulární biologie? Na kterých brněnských pracovištích?

Vzhledem k důrazu na praktické zkušenosti a tím limitovanému počtu míst je doporučena bezplatná registrace na webové stránce www.mendelianum.cz. Bez registrace je účast možná jen v případě volných míst.



Projekt Mendelianum – atraktivní svět genetiky (CZ.1.05/3.2.00/09.0180) je spolufinancován z Evropského fondu pro regionální rozvoj a státního rozpočtu České republiky.

Mendelova letní škola

Cílem Mendelovy letní školy je simulace vědecké činnosti v co nejreálnější podobě pro zájemce o vědu a výzkum zejména v oblasti molekulární biologie a genetiky, ale také fyziologie a biomedicíny. Letní škola je realizována v týdenních blocích, dopoledne budou probíhat v kontaktu s lektorem, odpoledne formou samostudia. Během jednotlivých dnů se student seznámí se základními kroky, které vedou k úspěchu ve vědecké práci. Student si vybere jednu z nabízených úrovní (gen, buňka, tkáň, orgán, organismus), které odpovídají modulům mobilní školy.



Týdenní bloky zahrnují:

- ✓ Teoretické znalosti (pondělí)
- ✓ Konzultace a ověření teoretických znalostí (úterý)
- ✓ Praktické metodické zkušenosti v laboratoři (středa)
- ✓ Vyhodnocení a ověření praktických zkušeností, aplikace výsledků (čtvrtek)
- ✓ Přímou zkušenost na vědecko-výzkumném pracovišti (pátek)

Po úspěšném absolvování letní školy získají účastníci oficiální certifikát.

Nabízená témata a termíny letní školy:

- 1) **Jak funguje gen** (28. 7. – 1. 8. 2014)
- 2) **Jak funguje buňka** (4. 8. – 8. 8. 2014)
- 3) **Jak funguje tkáň** (1. 8. – 15. 8. 2014)
- 4) **Jak funguje orgán** (18. 8. – 22. 8. 2014)
- 5) **Jak funguje organismus** (25. 8. – 29. 8. 2014)

Na letní školu je nezbytná bezplatná registrace na www.mendel-brno.cz.



Projekt Mendelova interaktivní škola genetiky (CZ.1.07/2.3.00/45.0037) je spolufinancován z Evropského sociálního fondu a státního rozpočtu České republiky.

Mendelovy rostliny

Iva Kubištová

Moravské zemské muzeum, Zelný trh 6, 659 37 Brno

Johann Gregor Mendel jako vědec je většinou znám svými pokusy s hrachem a ještřábníkem. Během své práce se však zajímal o mnoho dalších rostlin.



Přehled rostlinných rodů, které Mendel uvádí ve svých pracích a v dopisech Nägeli-mu (Matalová A 2007: G. Mendel: Pokusy s hybridy rostlin. ISBN 978-808-702-8025):

Antirrhinum – hledík
Aquilegia – orlíček
Calceolaria – pantoflíček
Carex – ostřice
Cirsium – pcháč
Dianthus – hvozdík
Geum – kuklík
Hieracium – ještřábník
Matthiola – fiala

Cheiranthus – chejra (= Matthiola – fiala)
Ipomoea – povijnice (= Pharbitis – povijník)
Lathyrus – hrachor
Lavatera – slézovec
Lens – čočka
Linaria – Inice
Lychnis – kohoutek
Malva – sléz
Mirabilis – nocenka

Informační listy GSGM, 2014, 43: 12-13

Nicotiana – tabák

Phaseolus – fazol

Potentilla – mochna

Tropaeolum – lichořeřišnice

Veronica – rozrazil

Zea - kukuřice

Oenothera –pupalka

Pisum – hrách

Salix – vrba

Verbascum –divizna

Viola – violka

V knize o historii moravského ovocnářství, vinařství a zahradnictví (1898) jsou uvedeny Mendelovy experimenty s fuchsiami a peckovicemi, ale sám se o těchto pokusech (v dochovaných materiálech) nezmiňuje.

Seznamte se s těmito rostlinami na stránkách www.mendelianum.cz a zkuste je nalézt během svých prázdninových výletů do přírody nebo během procházek. Pokud vás některé nálezy zaujmou, zachyťte je objektivem fotoaparátu nebo vaší rukou a přihlaste se do fotografické a výtvarné soutěže vyhlášené Mendelianem MZM Brno. Čekají na vás věcné ceny a zařazení nejzdařilejších děl do připravované výstavy ke 150. výročí zveřejnění Mendelovy objevitelské práce. Více informací k soutěži na www.mendelianum.cz.

Mendelův víkend

Anna Matalová

Moravské zemské muzeum, Zelný trh 6, 659 37 Brno

Mendelianum MZM Brno tradičně připomíná narození J. G. Mendela nabídkou akcí pro odborníky i širokou veřejnost. Pro akademické pracovníky a studenty je letos připraven Mendelův vzdělávací víkend, který proběhne ve dnech 18. – 20. 7. 2014 v Mendelově rodném domě. Hlavním tématem je popularizace vědy a rozvoj kulturního a vědeckého odkazu J. G. Mendela, kterému se Mendelianum systematicky věnuje již přes padesát let. Během Mendelova víkendu probíhají v jeho rodišti také oslavy obce Vražné, program je k dispozici na www.vrazne.cz
Mendelův rodný dům tak zve nejenom ke vzdělávání, ale také příjemnému prázdninovému výletu.

Program Mendelova víkendu

18. 7. 2014, pátek

16 h – odjezd z Brna

ubytování, setkání účastníků

Informační listy GSGM, 2014, 43: 13-15

19. 7. 2014, sobota

9:30 – 12:30 dopolední sekce

Využití genia loci při popularizaci vědy

9:30 – 10:15 Centrum Mendelianum (prof. E. Matalová)

10:15 – 10:45 *přestávka s občerstvením*

10:45 – 11:30 Mendelův rodný dům (Ing. V. Nippert)

11:30 – 12:30 Prohlídka expozic Mendelova rodného domu s průvodcem

12:30 – 14 h *oběd*

14 – 17 h odpolední sekce

Propagace vědy na SŠ

14-14:45 Genetika a molekulární biologie na SŠ (Dr. P. Vařejka)

14:45-15:30 Motivace pro vědu a výzkum na SŠ – úloha Mendelovy mobilní školy (Dr. I. Kubištová)

15:30 – 16:00 *přestávka s občerstvením*

16-16:30 E-learning při popularizaci vědy (Dr. I. Kubištová)

16:30-17 Animované programy při popularizaci vědy (Mgr. E. Pláteníková)

18 h – *společenský večer, oslavy obce Vražné*

20. 7. 2014, neděle

9:30 – 11 h dopolední sekce

Mendelova cesta z rodného domu do Brna

9:30-10:15 Mendel – z Hynčic, přes Lipník, Opavu a Olomouc do Brna (Dr. A. Matalová)

10:15-11 Procházka Mendelovými Hynčicemi (Dr. A. Matalová)

11 – 12 h – *přestávka s občerstvením*

12 – 16 h odpolední sekce

Po stopách JGM

Mendel, Lipník, Opava, Olomouc (Dr. A. Matalová)

14 – 15 h - *oběd v Olomouci*

16 h *návrat do Brna*

Pro zájemce, kteří se chtějí zúčastnit Mendelova víkendu v Brně je připravena aktivní procházka Po stopách J. G. Mendela v Brně. Mendel je jednou z osobností, která proslavuje město Brno po celém světě. I když z Brna nepocházel, strávil v něm čtyřicet let života. Mendel byl vědcem a učitelem, ale také prelátem či ředitelem banky, aktivně se účastnil společenského a kulturního života města Brna. 19. a 20. 7. 2014 budou elektronicky na webových stránkách a v tištěné verzi na pokladně Moravského zemského muzea (Zelný trh 8) zdarma k dispozici materiály pro explorativní toulky místy, která souvisejí se všestranným působením J. G. Mendela v Brně. Možná těmito místy denně procházíte, možná je ještě neznáte. Vydejte se po stopách JGM a poznejte jeho Brno! Čeká na vás nejen netradiční zážitek, ale při správném zodpovězení kvízových otázek také nová publikace Mendeliana MZM.



Mendelův rodný dům



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ



Projekt Mendelova interaktivní škola genetiky (CZ.1.07/2.3.00/45.0037) je spolufinancován z Evropského sociálního fondu a státního rozpočtu České republiky.

Mendel Forum 2014

Eva Matalová

Ústav živočišné fyziologie a genetiky AV ČR, v.v.i., Veverí 97, 602 00 Brno

Letošní Mendel Forum se konalo ve dnech 13. – 15. května 2014 na půdě Moravského zemského muzea, Ústavu živočišné fyziologie a genetiky AV ČR, v.v.i. a Veterinární a farmaceutické univerzity. První den byl zaměřen na osobnost J. G. Mendela a rozvoj jeho vědeckého odkazu ve formě Mendel Medal & Lecture a diskuse u kulatého stolu. Druhý den proběhl populárně-vědecký workshop na téma Molekulární embryologie vědecky i nevědecky, který byl určen nejen pro studenty, ale i další zájemce o vědu a výzkum z řad široké veřejnosti. Poslední den seznámil s aktuálními projekty popularizace a propagace vědy v Mendelově Brně, které realizuje Mendelianum MZM Brno se svými partnery a spolupracovníky. Mendel Forum 2014 bylo otevřeno pro 100 registrovaných účastníků. Další informace a sborník konference jsou dostupné na www.mendelianum.cz a www.mendel-brno.cz.

Program Mendel Forum 2014

13. 5. 2014, úterý

Mendel Medal & Lecture

(VFU Brno, Palackého 1/3, budova 34)

14:30 - 15 h: registrace/zahájení

15 – 16 h Dr. H. Lesot (Strasbourg, France): Craniofacial Genetics and Tissue Engineering

16 – 16:30 h diskusní přestávka s občerstvením

16:30 – 18 h Round Table Discussion - Mendel Expert Team

14. 5. 2014, středa

Molekulární embryologie vědecky i nevědecky

(ÚŽFG AV ČR, v.v.i. Brno, Veveří 97)

9:30: registrace/zahájení

10 – 10:30 h Mgr. Eva Švandová: Kaspázy nejen smrtící: nové role pro staré hráče

10:30 – 11 h Mgr. Veronika Oralová: Ze života kosti: nové molekuly v signálních drahách

11 – 11:30 h Mgr. Petra Celá: Selhání vývojového procesu: rozštěpy rtu/patra

11:30 – 12:30: *diskusní přestávka/oběd*

12:30 – 13 h Mgr. Eva Adamová: Jak spočítat aktivní molekuly v jedné buňce

13 – 13:30 h MVDr. Hana Dluhošová: Náhradní dentice u zvířat a naděje pro člověka

13:30 – 14 h Mgr. Barbora Veselá: Jak se tvoří chlup a k čemu má kmenové buňky

14 – 15 h: *závěrečná diskuse se zahraničním mentorem*

15. května 2014

Propagace a popularizace vědy a výzkumu v Mendelově Brně

(MZM Brno, Zelný trh 8)

9 – 17 h: Seznámení s aktuálními projekty MZM Brno a jeho partnerů

(jednodenní výstavní prezentace pro širokou veřejnost)

Doprovodný odpolední seminář pro pracovníky ÚŽFG AV ČR, v.v.i. na téma:

Popularizace vědy v Mendelově Brně - aktuální projekty s účastí ÚŽFG AV ČR, v. v. i.



Mendel Forum 2014, 13. – 15. 5. 2014, Brno



Projekt Mendelova interaktivní škola genetiky (CZ.1.07/2.3.00/45.0037) je spolufinancován z Evropského sociálního fondu a státního rozpočtu České republiky.

Odpoledne s DNA 2014

Eva Janečková

Ústav živočišné fyziologie a genetiky AV ČR, v.v.i., Veverčí 97, 602 00 Brno

Mendelianum MZM Brno se svými partnery a spolupracovníky připravilo i v letošním roce akci k připomenutí výročí zveřejnění struktury DNA v časopise Nature, které se stalo zásadním milníkem v molekulární biologii a genetice. 25. duben je celosvětově znám jako Den DNA. Letošní ročník Odpoledne s DNA probíhal ve dvoudenním schématu s přímou návazností a byl zaměřen na molekulární analýzy. Protože se jednalo o akci ve dvou dnech, bylo možné nabídnout bohatší program s dostatečnou teoretickou přípravou a důrazem na praktické zkušenosti. První den (23. dubna 2014) byl věnován nukleovým kyselinám ve spolupráci s Ústavem živočišné fyziologie a genetiky AV ČR, v.v.i., na zajištění druhého dne (30. dubna 2014) k tématu proteinů se podílel také Ústav analytické chemie AV ČR, v.v.i. Padesát účastníků, především VŠ studentů, se seznámilo se zásadami práce s nukleovými kyselinami, metodami izolace, purifikace a amplifikace nukleových kyselin, technikami specifických analýz, např. PCR Arrays, s aktuálními metodickými přístupy proteomiky a řadou dalších postupů při molekulárních analýzách genové exprese. Na Den DNA byla zveřejněna vítězná fotografie cyklu Mendelovo Brno ve čtyřech ročních obdobích, která byla zvolena na základě veřejného hlasování na stránkách www.mendelianum.cz.



Odpoledne s DNA 2014 v laboratořích ÚŽFG AV ČR, v.v.i. a ÚACH AV ČR, v.v.i.

Informační listy GSGM, 2014, 43: 17

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

Jan Kosla

Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova v Praze

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

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

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

Vznik a progresi rakoviny

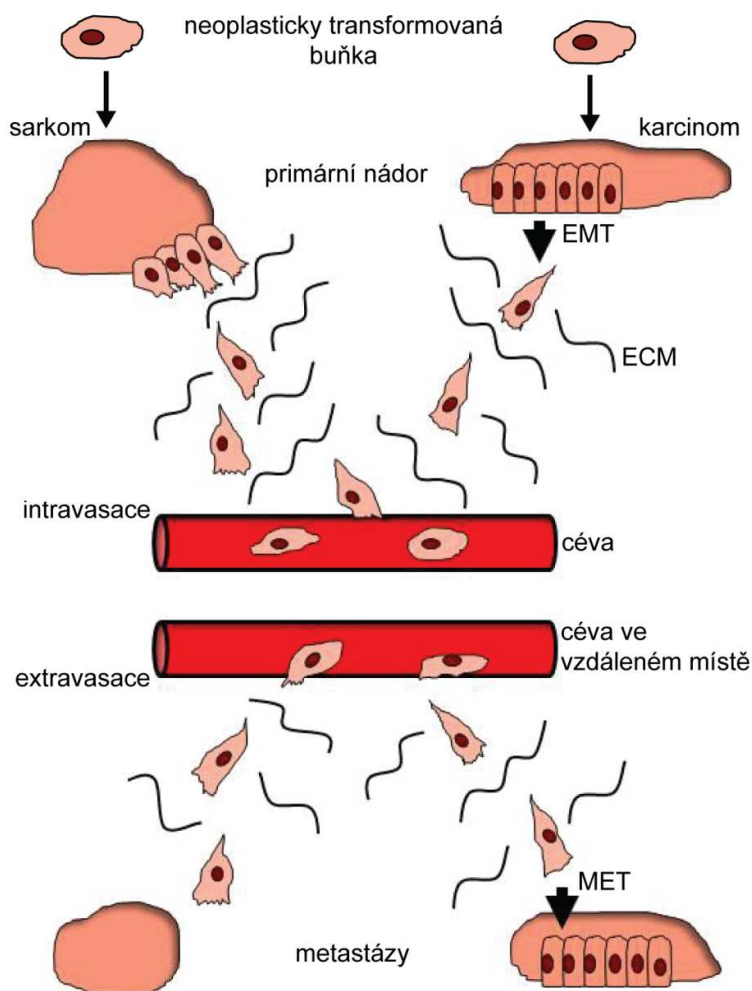
Vznik a progresi rakoviny, jejichž důsledkem je tvorba metastáz, jsou velmi komplexní procesy, které se skládají z mnoha kroků. Během těchto procesů se normální tělní buňky transformují v buňky rakovinné a společně s buňkami nádorového stroma vyvolávají vznik primárních nádorů. Primární nádor se dále rozsévá do vzdálených orgánů, kde indukuje tvorbu sekundárních nádorů, metastáz, procesem nazývaném metastazování. Prvním klíčovým krokem kancerogeneze je změna normální buňky v buňku nádorovou a tento proces je nazýván maligní (též neoplastická) transformace buňky. Nádory vznikající z epitelových buněk se nazývají kar-

cinomy, nádory tvořené mezenchymovými buňkami se nazývají sarkomy. Transformované buňky, spolu s buňkami stroma, které je obklopují, prolifерují a vytváří specifické nádorové prostředí. Takové prostředí usnadňuje tvorbu nových cév (angiogenezi), které často nemají normální stavbu. Cévy vzniklé v nádorovém prostředí umožňují nádorům dále růst a metastázovat. Zvláštní nádorové prostředí podporuje invazivitu nádorových buněk do dalších tkání a metastázování. Epitelové buňky musí nejdříve získat vlastnosti migrujících buněk, typické pro buňky mezenchymové, tak zvaným epitel-mezenchymovým přechodem (EMT). Invazivní rakovinné buňky migrují přes ECM, která je obklopuje a vstupují do krevních nebo lymfatických cév takzvanou intravasací. Když se nádorové buňky pohybují v krevním řečišti, jsou vystaveny mnoha pro ně nezvyklým stresům, se kterými se musí vyrovnat. Velký tlak a různá rychlost proudící tekutiny v řečišti například klade velké nároky na jejich mechanickou odolnost. Rakovinné buňky opouští krevní řečiště extravasací v místě i velmi vzdáleném od primárního nádoru a tvoří nejdříve mikrometastázy, které mohou vyrůst v makrometastázy. V tvorbě mikro- a makrometastáz jsou zapojené v zásadě stejné nebo obdobné procesy (migrace přes ECM, stromatogeneze, angiogeneze a případně i proces obrácený k EMT - totiž mezenchymo-epitelový přechod, MET), které byly potřeba pro vznik primárního nádoru (obr. 1). V průběhu všech výše zmíněných procesů musí nádorové buňky také unikat imunitnímu systému. Vysoká komplexita celého procesu vedoucího ke vzniku metastáz činí tento proces velmi neúčinným a nutí nádorové buňky k neustálému přizpůsobování a získání (alespoň u některých nádorových buněk) vlastností nádorových kmenových buněk [1, 2].

Hned od počátku rakovinné progresy hraje zcela zásadní roli nádorové mikroprostředí. Nádorové mikroprostředí, které v mnoha aspektech připomíná prostředí hojící se rány, je utvářeno specifikou interakcí mezi rakovinnými buňkami a okolní tkání, nazývanou nádorové stroma. Zatímco se výzkum rakoviny po velmi dlouhou dobu zaměřoval na rakovinné buňky samotné, během posledních let na sebe čím dál větší pozornost strhává nádorové stroma a jeho interakce s rakovinnými buňkami. Přibývají důkazy o klíčové úloze nádorového stroma a jeho interakci s rakovinnými buňkami při vzniku rakoviny a její progresi. Navíc se ukazuje, že analýza nádorového stroma zásadně přispívá ke klasifikaci a prognóze některých rakovinných onemocnění (např. rakoviny prsu [3, 4] a rakoviny vaječníků [5]). V některých případech mají pro kategorizaci a prognózu rakovinných onemocnění markery nádorového stroma větší význam, než markery samotných nádorových buněk.

Velmi významnou buněčnou složkou nádorového stroma představují myofibroblasty, které se zásadně podílí na tvorbě nádorového stroma, např. produkcí a remodelací extracelulární matrix (ECM), nebuněčné složky nádorového stroma. ECM obklopuje rakovinné buňky primárního nádoru a představuje první překážku rozšiřování rakovinných buněk po těle. Z toho vyplývá, že schopnost migrovat přes ECM je pro rakovinné buňky první a zásadní podmínkou, kterou tyto buňky musejí splnit v procesu vedoucím k tvorbě metastáz. Zatímco děje způsobující neoplastickou transformaci buněk a tvorbu primárních nádorů byly intenzivně studovány po dlouhou dobu, víme jen relativně málo o mechanismech, které stojí za procesem metastázování. Většina (90 %, [6]) pacientů se solidními nádory umírá kvůli tvorbě metastáz, což činí metastatický proces v současné době jedním z nejdůležitějších témat ve výzkumu zaměřenému na lidskou medicínu. Navzdory obrovskému množství úsilí a peněz, které byly do výzkumu vedoucího k léčbě rakoviny investovány, léčba rakoviny je v mnoha případech neúčinná. Vzhledem k faktu, že metastázování je

hlavní příčinou smrti pacientů s rakovinou, hlubší porozumění procesům, které stojí za rozséváním primárních nádorů po těle, by mělo vést k účinnější léčbě rakoviny a celkově většímu přežívání pacientů. Z těchto důvodů jsme se v našem výzkumu zaměřili na molekulární mechanismy vedoucí k dediferenciaci klíčových buněk nádorového stroma, myofibroblastů a mechanismy dovolující rakovinným buňkám účinně invadovat nejen nádorové stroma, ale i ostatní tkáně.



Obr. 1: Zjednodušené schéma šíření nádorových buněk.

Nádorové stroma v nádorovém mikroprostředí

Nádorové mikroprostředí je vytvářeno interakcí rakovinných buněk s okolní tkání, ze které vzniká nádorové stroma v procesu nazývaném stromatogeneze. Vývoj nádorových buněk ke zhoubnějším stádiím je doprovázen neustálou stromatogenezí, při které se mění složení i struktura stroma obklopujícího nádorové buňky [7]. Relativní poměr stroma k rakovinným buňkám v nádoru se liší u různých typů nádorů, přičemž stroma může tvořit dokonce většinu nádorové tkáně. Například u pokročilé rakoviny vaječníků tvoří stroma mezi 7% a 83% nádorové hmoty, s mediánem 50% hmoty [8]. Nádorové stroma je velmi specifické a skládá se jak z buněčné složky (CAFs/myofibroblasty, endoteliální buňky, imunitní buňky, atd.), tak nebuněčné

složky (ECM, cytokiny, proteázy a jejich inhibitory, atd.). Mezi charakteristické rysy mikroprostředí pevných nádorů patří např. deregulované pH, změny v buněčném metabolismu („Warburgův efekt“), hypoxie, tvorba abnormálních cév, zánětlivé prostředí a zvýšená tuhost dané ECM.

Deregulované pH je adaptivní odpovědí většiny nádorů. Rakovinné buňky mají, bez ohledu na svůj původ, obrácený gradient pH. To znamená, že nitrobuňčné pH je neustále vyšší než pH extracelulární [9]. V normálních buňkách dospělého jedince se nitrobuňčné pH pohybuje kolem 7,2 a extracelulární pH kolem 7,4. Rakovinné buňky mají naopak nitrobuňčné pH vyšší než 7,4 a extracelulární pH nižší než 6,7-7,1 [10]. Tento obrácený pH gradient vede u rakovinných buněk ke zvláštním vlastnostem, jako např. proliferaci bez přítomnosti růstových faktorů, úniku apoptóze, navození zvláštního metabolismu, migrace a invazivity, které nakonec vedou k metastázování. Kyselé pH v okolí rakovinných buněk je důsledkem metabolické adaptace na hypoxické nádorové prostředí. Hypoxie, nižší hladina kyslíku v tkáni než je obvyklé, je výsledkem intenzivní proliferace buněk nádoru. S intenzivní proliferací se totiž zvětšuje vzdálenost mezi buňkami a cévami krevního řečiště, které kyslík dodávají [11-13]. Nedostatek kyslíku uvnitř nádorové masy vede k omezení mitochondriální respirace a nutí nádorové buňky získávat energii pomocí glykolytické dráhy. Je zajímavé, že rakovinné buňky používají glykolytickou dráhu jako zdroj energie i v případě, že mají dostatečný přísun kyslíku (aerobní glykolýza nebo „Warburgův efekt“) [14-16]. Glykolýza se tedy stává nezbytnou pro přežití nádorových buněk [17]. Tato adaptace rakovinných buněk na hypoxii vede k zvýšené produkci kyselin, v důsledku zvýšeného příjmu glukózy a jejího metabolizování na kyselinu mléčnou i nedostatečného odstraňování kyseliny mléčné a CO₂ cévami, nedostupnými uvnitř nádorové masy [11-13]. Hypoxické prostředí, společně s dalšími faktory uvolňovanými rakovinnými buňkami, vede k zapojení stromálních buněk do tvorby abnormálních cév, které mají nedokonalé stěny a usnadňují případný vstup nádorových buněk do krevního řečiště při metastázování [18, 19]. Stromální buňky (především myofibroblasty a buňky imunitního systému) se vedle buněk rakovinných podílejí na tvorbě zánětlivého mikroprostředí. Myofibroblasty jsou hlavním buněčným typem zodpovědným za charakteristické zvýšení tuhosti místa pevného nádoru [20].

V této dizertační práci jsem se zaměřil na interakci mezi nádorovými buňkami, myofibroblasty a produkty myofibroblastů, protože tato interakce hraje zásadní roli v utváření nádorového stromatu a prostupováním nádorových buněk stromatem, tím tedy i v progresi nádorů a je předpokladem metastázování. Navíc myofibroblasty, více než jiné buněčné typy, hrají důležitou roli v určení celkového klinického výsledku v některých typech rakovin [21]. Interakce mezi nádorovými buňkami, myofibroblasty a produkty myofibroblastů se v posledních letech stává stále důležitějším tématem ve výzkumu rakoviny. Dá se očekávat, že lepší pochopení a narušení této interakce povede k významnému zlepšení léčby rakoviny.

Myofibroblasty

Myofibroblasty jsou buňky, které hrají zásadní roli v homeostázi tkání, hojení ran za fyziologických podmínek a ve vážných lidských patologiích jako jsou fibróza a rakovina. Původně fyziologický proces hojení ran není jak u fibrózy, tak rakoviny (tedy za patologických podmínek) ukončen. Navíc rakovinná onemocnění jsou často spojena s fibrotickým stavem nazývaným dezmozplázie a rakovinné buňky mají tendenci metastázovat do fibrotické tkáně [22, 23]. Fibroblasty a myofibroblasty jsou z molekulárního hlediska poměrně špatně charakterizované a zřejmě proto neexistu-

je účinná léčba jimi způsobených onemocnění [24]. Abychom lépe pochopili maligní roli myofibroblastů v rakovině, je třeba je lépe charakterizovat a porozumět úlohám myofibroblastů v procesu hojení ran i tvorbě fibróz (fibrogenezi), které jsou popsány níže.

Role myofibroblastů v hojení ran

Myofibroblasty hrají klíčovou roli v procesu hojení ran. Když dojde k poškození tkáně, v důsledku srážení krevních destiček se v místě zranění aktivuje diferenciací buněk do myofibroblastů. Krevní destičky se přichycují k exponovanému subendotelu v místě zraněných cév a uvolňují jejich biologický aktivní náklad (např. TGF- β 1, PDGF, IL1-B, MMPs, TIMPs), především z α -granulí [25]. Degranulace krevních destiček vede k degradaci bazální membrány, indukci buněčné proliferace i migrace a rekrutování buněk imunitního systému a také buněk, které vedou ke vzniku myofibroblastů [26]. Rekrutované imunitní buňky pak dále ovlivňují cytokinové prostředí hojící se rány; pro diferenciaci myofibroblastů je zásadní produkce TGF- β 1 makrofágy. Jak se hojící proces vyvíjí, různé buněčné typy se diferencují na myofibroblasty, ve kterých dochází k vytvoření autokrinní smyčky, vedoucí ke stálé tvorbě cytokinů TGF- β 1 a 3 [27]. Myofibroblasty secernují velké množství extracelulární matrix (ECM) a rozpustných faktorů, které přispívají k remodelaci ECM, komunikaci s ostatními buňkami (např. imunitního systému, endotelií, nervového systému, atd.) [28]. Myofibroblasty také tvoří vlákna z alfa-aktinu hladkého svalstva (α SMA), která umožňují kontrakci myofibroblastů a uzavření rány. Místně specifická kontrakce je zprostředkována fokálními adhezemi mezi myofibroblasty a ECM [29]. Jakmile se rána uzavře, změní se rovnováha mezi MMPs a TIMPs (secernovanými myofibroblasty) ve prospěch degradace ECM a populace myofibroblastů z rány vymizí. K vymizení dochází programovanou buněčnou smrtí, apoptózou anebo nemózou (angl. nemosis), která má řadu společných rysů s nekrózou spíše než s apoptózou [30, 31]. Nakonec v místě zhojené rány zůstávají pouze dormantní fibroblasty. Za patologických podmínek (fibróza, rakovina) k vymizení myofibroblastů nedochází.

Zajímavé je, že myofibroblasty mohou vzniknout z mnoha různých typů buněk. Mezi takové buněčné typy patří typicky lokální (dormantní) fibroblasty [32]. Dalším zdrojem myofibroblastů jsou cirkulující progenitory fibrocytů (buněk odvozených z monocytů pocházejících z kostní dřeně) [33], které migrují z krevního oběhu do místa zranění. Z progenitorů fibrocytů může překvapivě pocházet 30 - 50 % myofibroblastů podílejících se na hojení ran [34, 35]. Třetí zdroj se skládá z buněčných typů, které transdiferencují do myofibroblastů. Mezi buňky třetího zdroje patří pericyty [36], ale i myoepitelové, endoepitelové buňky. Pro diferenciaci různých buněčných typů na myofibroblasty hrají zásadní roli signalizace TGF- β 1 a mechanické vlastnosti mikroprostředí [37].

Role myofibroblastů ve fibróze

Při fibróze, též nazývané fibrotickým nebo fibroproliferativním onemocněním, dochází k proliferaci myofibroblastů a postupnému hromadění ECM, často doprovázenému chronickým zánětem, které vedou k nevratnému poškození postižené tkáně. Pokročilé stádium fibrózy vede selhání funkce daného orgánu a často i ke smrti pacienta. Poškozeny mohou být všechny životně důležité orgány, často játra, plíce, ledviny, srdce a kůže [38, 39]. Odhaduje se, že chronická ztráta funkce orgánů (jako jsou kostní dřeň, srdce, střeva, ledviny, játra plíce a kůže) spojená s fibrózou přispívá po celém světě k jedné třetině přirozených úmrtí. Přitom neexistuje účinná léčba, kte-

rá by zabránila vzniku fibróz nebo dokonce zvrátila již existující fibrotické onemocnění, ani u jednoho orgánu [40].

Myofibroblasty, někdy též nazývané „aktivované fibroblasty“ kvůli jejich zvýšeným biosyntetickým a proliferačním aktivitám, jsou ve fibróze hlavními producenty ECM bohaté na kolageny. Pro tyto buňky je typické výrazné drsné endoplazmatické retikulum, velké jádro a kontraktální aktinová vlákna složená z α SMA [41, 42]. Neexistuje však marker, který by byl specifický pro všechny myofibroblasty. Myofibroblasty jsou totiž různorodým buněčným typem, jehož variabilita odráží pravděpodobně původ těchto buněk. Proto je pro rozlišení subpopulací myofibroblastů potřeba dalších specifických markerů, stejně jako u rozlišování fibroblastů spojených s nádory (CAFs), které jsou uvedeny níže. Myofibroblasty se liší nejenom mezi jednotlivými orgány, ale mají různorodé fenotypy i v rámci jednotlivých orgánů [43].

Myofibroblasty fibrotických tkání pocházejí ze stejných buněčných typů jako normální myofibroblasty při hojení ran. Do prvního zdroje myofibroblastů patří lokální buňky normálních tkání jako fibroblasty nebo mezenchymové kmenové buňky [44]. Druhý zdroj představují cirkulující progenitory fibrocytů [8, 45, 46] nebo buňky odvozené z kostní dřeně, které migrují z krevního oběhu do místa nádoru, kde pak diferencují. U některých typů fibróz tvoří buňky odvozené z kostní dřeně až 20 - 40 % myofibroblastů fibrotických lezí [47-49]. Třetí zdroj se skládá z buněčných typů, které transdiferencují na myofibroblasty. Mezi buňky třetího zdroje patří pericyty, myoepitelové, endoepitelové buňky [36, 50-52].

Ve většině případů je fibróza doprovázená zánětem, podobně jako je tomu u hojení ran a nádorové stromatogeneze. Zánět může být u fibróz důsledkem původní infekce, ale prototypická fibróza je spojená se sterilním zánětem, vyvolaným pravděpodobně smrtí buněk v místě fibrózy. Fibrózy doprovází virové infekce (např. jaterní hepatitidy), bakteriální infekce (např. pyelonefritidy ledvin) a infekce mnohobuněčnými organizmy (např. schistomiázy jater) [40]. Pozoruhodné je, že protizánětlivá léčba fibrotické tkáně většinou není v klinické praxi schopná zastavit fibrogenézi. Taková fakta naznačují, že zánětlivá reakce a fibrogenéze jsou dva nezávislé procesy. Zatím není dostupná účinná léčba, která by zabránila vzniku fibróz nebo dokonce napravila již existující fibrotické onemocnění, ani u jednoho orgánu. Protože však fibrózy všech orgánů sdílejí velmi podobné histomorfologické rysy, nabízí se lákavá představa, že existují signální dráhy a regulace specifické pro všechny fibrózy [40]. Stále se doufá, že mechanistické porozumění obecným fibrotickým signálním dráhám povede v budoucnu k vývoji protifibrotických léků, které budou účinné ve všech orgánech [53]. Největší naděje jsou v současné době vkládány do inhibice signální dráhy TGF β , protože v experimentálních modelech se tímto způsobem podařilo alespoň zlepšit stav mnoha různých typů fibróz.

Role myofibroblastů ve vzniku a progresi rakoviny

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

Aktivované CAFs/myofibroblasty přítomné v nádorové tkáni mohou vzniknout z různých zdrojů, což velmi připomíná situaci při hojení ran a fibróze. Nádorové mikroprostředí s hojící se ránou sdílí mnoho rysů, a proto jsou nádory popisovány jako nehojící se rány [43]. Ukázalo se, že aktivované CAFs/ nádorové myofibroblasty

opět pocházejí ze tří hlavních zdrojů. Prvním zdrojem myofibroblastů jsou lokální buňky normálních tkání jako fibroblasty nebo mezenchymové kmenové buňky [44], rekrutované rakovinnými buňkami. Tyto lokální buňky asi jako první reagují na narušení vyvolané rakovinnými buňkami. Druhý zdroj představují cirkulující progenitory fibrocytů [8, 45], buňky odvozené z kostní dřeně, které migrují z krevního oběhu do místa nádoru, kde pak diferencují. Třetí zdroj se skládá z buněčných typů, které transdiferencují na myofibroblasty. Mezi buňky třetího zdroje patří pericyty, myoepitelové, endoepitelové buňky a dokonce samotné rakovinné epitelové buňky [44, 54].

CAFs jsou, stejně jako myofibroblasty účastníci se fibróz a hojení ran, velmi heterogenním buněčným typem, jehož variabilita zřejmě odráží jejich rozličný původ a tkáňové prostředí, ve kterém se vyvíjí. Nejtypičtějším markerem CAFs jsou vlákna tvořená α SMA, která jsou charakteristickým rysem myofibroblastů a buněk hladkého svalstva. Ačkoliv existují i další markery buněk CAFs, jako jsou: vimentin, PDGF receptor alfa (PDGFR- α), PDGF receptor beta (PDGFR- β), protein specifický pro fibroblasty (FSP-1) a protein aktivace fibroblastů (FAP) [55-58], neexistuje jediný specifický marker pro všechny CAFs, který by je jasně odlišil od normálních myofibroblastů nebo blízkce příbuzných buněčných typů. Proto se v praxi obvykle používá kombinace několika markerů.

Pozoruhodné je, že mnoho rakovin je spojeno s dezmozplázií. Dezmozplázie je fibrotický stav, charakteristický akumulací kolagenů typu I a III a degradací kolagenu typu IV (typický pro bazální laminu) [59, 60], který byl pozorován i v místech vzniku metastáz [61]. Špatná prognóza rakovinných onemocnění je obecně spojována s nádorovou dezmozplázií [62].

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

Vztah myofibroblastů k mechanickým vlastnostem nádorového mikroprostředí

Myofibroblasty výrazně mění jak biochemické tak mechanické vlastnosti mikroprostředí nádorů, které následně působí na rakovinné buňky a přispívá k výběru agresivních podtypů nádorových buněk, jejich invazivitě a metastázování. Během progresu nádorů vzrůstá rigidita jejich mikroprostředí. Právě zvýšená tuhost matrix v nádorovém mikroprostředí může usnadnit výběr velmi invazivních podtypů rakovinných buněk. Pravděpodobně se tak děje podobným způsobem jako při diferenciaci mezenchymových kmenových buněk do různých linií [63]. Mechanické vlastnosti ECM, konkrétně její tuhost, jsou důležité v regulaci diferenciaci, proliferaci a buněčných funkcí nejen rakovinných buněk, ale i kmenových buněk a fibroblastů [20, 64-66]. Například epitelové buňky reagují odlišně na signalizaci cytokinem TGF- β 1 v závislosti na tuhosti ECM, která je obklopuje a pravděpodobně proto tuhost ECM hraje roli i v EMT karcinomů. Hustá, rigidní kolagenová síť zase vede ke zvýšené signalizaci prostřednictvím kinázy fokálních adhezí (FAK) a p130Cas [20]. FAK jednak signalizuje dráhou RhoA a ovlivňuje tím kontraktilitu aktinomyozinového cytoskeletu (tvorbu fokálních adhezí a kontraktálních vláken) a tedy i migraci buněk

[68]. Navíc FAK zesiluje signalizaci dráhou ERK a Akt, čímž reguluje proliferaci a motilitu buněk [67].

Remodelace ECM myofibroblasty

ECM se skládá ze sítě biopolymerů, které jsou tvořeny proteiny, proteoglykany a glykosaminoglykany. Složení a struktura ECM je mezi různými místy odlišná. Velikost vláken biopolymerů a hustota sítě, kterou biopolymery tvoří, určují mechanické vlastnosti ECM. Záleží tedy na množství kolagenových vláken, jejich tloušťce a vzájemném propojení, které dohromady určují porozitu ECM [69]. V nádorovém mikroprostředí prochází ECM jak kvalitativními tak kvantitativními změnami, které následně ovlivňují přežití, proliferaci a migraci nádorových buněk [70, 71]. ECM v nádorovém mikroprostředí je remodelována převážně CAFs, které jsou zodpovědné za produkci proteinů ECM (např. kolagenu a fibronektinu) i proteáz a dalších enzymů, které se podílí na posttranskripční modifikaci proteinů tvořících ECM. U solidních nádorů dochází v jejich mikroprostředí ke zvýšenému ukládání ECM a s tím spojeným tuhnutím (zvýšení rigidity) ECM. Jak již bylo zmíněno, mnoho nádorů je spojeno s dezmozplázií, tedy fibrózou. Při dezmozplázií dochází k hromadění kolagenů typu I a III a degradaci kolagenu typu IV (typický pro bazální laminu) [59, 60]. Dezmozplázie byla navíc pozorována i v místech vzniku metastáz [61]. Tuhnutí nádorové ECM souvisí s kovalentním provázáním kolagenových molekul lyzyl oxidázou (LOX). Z počátku karcinogeneze (u nádoru prsu) je LOX tvořena hlavně myo/fibroblasty, ale v pozdějších fázích ji tvoří i hypoxické karcinomové buňky [20, 72]. Remodelace způsobená LOX následně podporuje migraci a invazivitu nádorových buněk a tedy obecně progresi nádoru [20]. Zvýšená tuhost nádorové matrix spolu se špatným cévním a lymfatickým zásobením vede ke zvýšení tlaku tkáňového moku, což brání doručení chemoterapeutických látek dovnitř nádoru. Experimentální odstranění CAFs (způsobujících ztuhlost ECM) zlepšuje výsledky chemoterapie u adenokarcinomů [73]. Vedle tuhosti ECM působí v mikroprostředí nádoru mechanickou silou i tok tkáňového moku. Tok tkáňového moku uvnitř nádoru působí invazi fibroblastů dovnitř nádoru a remodelaci ECM, které následně usnadňují invazivitu nádorových buněk. Taková aktivace fibroblastů k migraci je stimulována TGF- β 1 a remodelace ECM souvisí především s degradací kolagenových vláken pomocí MMPs. Uvolněnou cestou přes ECM pak mohou rakovinné buňky migrovat [75]. Ostatně byla také pozorována společná migrace CAFs a rakovinných buněk přes ECM. CAFs opět vytvářely cestu, kterou migrovaly rakovinné buňky [74]. CAFs kromě kolagenů ve velkém množství produkují další dvě důležité složky ECM nádorů, totiž fibronektin a hyaluronan. CAFs vedle fibronektinu produkují i jeho variantu ED-A, která je typicky vyráběna myofibroblasty [24]. Fibronektin, který reguluje strukturu kolagenových vláken [76], je ligandem velkého množství rodiny integrinových receptorů [74] a proto je důležitý v adhezi, růstu a migraci buněk [77]. Přítomnost fibronektinu ve stromatu nádorů koreluje se sekrecí MMPs a metastázováním lidských nádorů [61]. Vysoká produkce hyaluronanu v nádorové ECM vede k rekrutování makrofágů spojených s nádory, které následně hrají významnou roli v tvorbě nových cév [78].

Důležitou nebuněčnou složkou, jejíž sekrecí CAFs remodelují ECM, jsou matrixové metaloproteinázy (MMPs) a jejich inhibitory (TIMPs). MMPs totiž degradují ECM, čímž (i) vytvářejí prostor pro expanzi nádorových buněk, nově vznikající cévy nebo cesty pro migrující rakovinné buňky, (ii) uvolňují membránové a jinak vázané růstové faktory a (iii) štěpí adhezivní molekuly, jako jsou kadheriny, čímž podporují EMT a motilitu buněk [79, 80]. CAFs typicky secernují MMP-2, MMP-3 a MMP-9, ale i

další MMPs [81, 82]. Například MMP-9, secernovaná CAFs, indukuje u buněk karcinomu prostaty EMT [69] nebo MMP-13, secernovaná CAFs, uvolňuje VEGF z ECM, čímž podporuje angiogenezi a invazivitu melanomových buněk nebo karcinomu dlaždicových buněk [83].

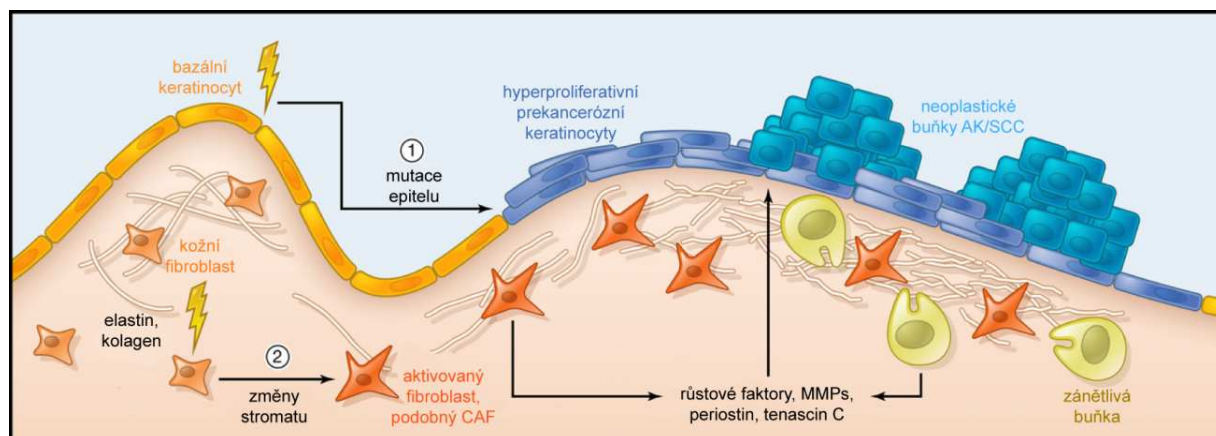
Sekrece rozpustných faktorů myofibroblasty

Důležitou složkou nádorového mikroprostředí, kterou do značné míry ovlivňují CAFs, jsou rozpustné faktory. Rozpustné faktory uvolňované CAFs se tedy podílejí na interakci mezi CAFs a nádorovými buňkami, přičemž tyto faktory významně ovlivňují proliferaci a invazivitu nádorových buněk. Mezi tyto rozpustné faktory patří například růstové faktory HGF, TGF- β 1, bFGF, EGF, VEGF, IGF, NGF a cytokiny SDF1 i IL6. HGF aktivuje v rakovinných buňkách signální dráhu spouštěnou receptorem c-Met, která indukuje růst nádorových buněk i jejich invazivitu, metastázování [84, 85] a rezistenci nádorových buněk ke konvenčním inhibitorům receptorů EGF [86, 87]. TGF- β 1 se věnuje následující kapitola. VEGF je zásadně důležitý pro tvorbu nových cév (angiogeneze a lymfangiogeneze), které slouží nejen pro zásobování nádorů živinami, ale usnadňují i metastázování nádorů. VEGF totiž zvyšuje propustnost cév, čímž usnadňuje intravasaci i extravasaci nádorových buněk [19, 88]. Důsledkem propustnějších cév je také zvýšení tlaku tkáňového moku v místě nádoru [19]. Z faktorů FGF secernovaných CAFs například FGF1 zvyšují migrační a invazivní vlastnosti buněk kolorektálního karcinomu přes signalizaci receptorem FGFR3 [89]. Prozánětlivé mikroprostředí nádorů je spoluvytvářeno CAFs i rakovinnými buňkami sekrecí interleukinů, interferonů a členů cytokinové rodiny TNF [31]. CAFs secernují cytokiny a chemokiny, které vedou k infiltraci místa nádoru imunitními buňkami a spolu podporují vznik nových cév a tím metastázování [90]. Produkce takových faktorů (SDF1, IL-6, IL-1 β) je v CAFs do značné míry spouštěna transkripčním faktorem NF- κ B [91]. V případě rakoviny slinivky břišní kombinace faktorů SDF1 a IL-8 vede u rekrutovaných endotelových buněk k aktivaci angiogenního programu [92]. Produkce SDF1 může být kromě NF- κ B řízena i transkripčním faktorem HIF1, který je aktivován hypoxickými podmínkami [93]. SDF1, uvolňovaný CAFs, nejen podporuje angiogenezi mobilizací prekurzorů endotelových buněk z kostní dřeně, ale indukuje i růst rakovinných buněk [94] a zprostředkovaně i mezenchymově-améboidní přechod rakovinných buněk, čímž usnadňuje jejich invazivní vlastnosti a metastázování. Jiným chemokinem, který mohou CAFs produkovat a podporovat tím angiogenezi, růst a infiltraci nádorů makrofágy, je CXCL14 [95]. Další růstové faktory produkované myofibroblasty jako bFGF, EGF, IGF, NGF stimulují růst karcinomových buněk [96].

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

Podle klasického pojetí kancerogeneze vznikne nejdříve rakovinná buňka a její interakcí s okolní tkání vznikají buňky nádorového stroma. Bez rakovinných buněk tedy buňky nádorového stroma nevzniknou. Nedávno však bylo ukázáno, že v některých případech může prekancerózní stroma vést ke vzniku rakoviny. Konkrétně epigenetické změny v kožních fibroblastech mohou vést ke vzniku karcinomu dlaždicových buněk. Epigenetické změny nebo mutace (způsobené například UV zářením) inaktivují signální dráhu Notch vedou ke změnám kožních fibroblastů, které tím získávají vlastnosti aktivovaných CAFs (myofibroblastů). Takové buňky se vyznačují expresí α SMA a jiných markerů aktivovaných CAFs, zvýšenou produkcí FGFs a matrixových metaloproteináz, stejně jako sekrecí tenascinů C a periostinu [97]. Zajímavé je, že o tenascinů C a periostinu je známo, že se podílejí na tvorbě

nyky rakovinných buněk [98] a nádorové angiogenezi. Přilehlé epidermální keratinocyty, buňky tvořící vnější vrstvu kůže, následně extrémě proliferují (hyperproliferují), což je stav vedoucí k rozvoji rakoviny. Aktivované fibroblasty podobné CAFs mohou dále způsobovat genetickou nestabilitu okolních buněk prostřednictvím reaktivních kyslíkových intermediátů [99]. Dále je pozoruhodné, že v okolí nejsilnější epidermální proliferace se hojně vyskytují zánětlivé buňky. Ty mohou přispět ke kancerogenezi uvolňováním reaktivních kyslíkových intermediátů, zvyšujících riziko další mutageneze a také navozením zvláštního prostředí bohatého na určité cytokiny a růstové faktory. Tento příklad dokazuje, že aktivace fenotypu myofibroblastů může za určitých okolností vést i ke vzniku rakovinných buněk.



Obr. 2: Dvě cesty indukované UV zářením vedoucí ke karcinomu dlaždicových buněk.

(1) UV záření způsobuje mutace v bazálních keratinocytech, vedoucí k rakovině. V lézích tvořených prekancerózními keratinocyty (tzv. aktinická keratóza, AK) často dochází k mutaci p53. S přibývajícímí mutacemi v genech, jako jsou NOTCH1 a NOTCH2, se aktinická keratóza vyvíjí na karcinom dlaždicových buněk (SCC). V druhém modelu (2) navrženém Hu et al. (2012) UV záření inaktivuje epigenetickými mechanismy signální dráhu Notch v kožních fibroblastech. Takové změny vedou k tvorbě buněk podobných CAFs, které produkují více růstových faktorů, proteinů ECM a proteáz, jejichž působením se zvyšuje proliferace přilehlých epidermálních keratinocytů. Oblasti zvýšené epidermální proliferace jsou postupně stále bohatší na zánětlivé buňky (CD45⁺), které přispívají k proliferaci keratinocytů a vytvoření aktinické keratózy, která se dále vyvíjí na karcinom dlaždicových buněk (SCC). Podle [100], upraveno.

Role myofibroblastů v EMT rakovinných buněk

Epitelově-mezenchymový přechod (EMT) je proces epigenetických změn, kterým epitelové buňky získají migrační a jiné vlastnosti buněk mezenchymových. Tento proces je zásadní pro progresi karcinomů a CAFs se podílí na jeho navození hned několika způsoby [101, 102]. CAFs konkrétně secernují řadu rozpustných faktorů i složek ECM a remodelují ECM, čímž EMT přímo navozují anebo usnadňují. Hladina E-kadherinu (adhezní molekula) a proteinu Slug (transkripční faktor), důležitých v EMT, souvisí s rigiditou mikroprostředí nádorů [103]. Pro získání mezenchymového fenotypu je, mimo jiné, potřeba aktivovat transkripční program řízený proteinem Slug a rozvolnit pevné kontakty mezi epitelovými buňkami (zprostředkovaných E-kadherinem). Hladina E-kadherinu je vyšší u buněk na měkčím podkladu, zatímco na tužším podkladu klesá. Naopak hladina proteinů Slug je v karcinomových buňkách nižší na měkkém podkladu. S rigiditou mikroprostředí

nádorů souvisí i reakce epitelových buněk na signalizaci TGF β , která se významně podílí na EMT karcinomů.

Role myofibroblastů v nádorové angiogenezi

Angiogeneze hraje důležitou roli v progresi nádorů, protože umožňuje nejen zásobování nádorů živinami a odstraňování toxických metabolitů, ale usnadňuje i metastazování nádorů. Cévy nádorů jsou totiž abnormální, nedokonalé a kvůli tomu i mnohem propustnější, což usnadňuje intravasaci i extravasaci nádorových buněk. Důsledkem propustnějších cév je také zvýšení tlaku tkáňového moku v místě nádoru, který přispívá k specifickému mikroprostředí nádorů. Tvorba abnormálních cév nádorů proto slouží jako prognostický marker nádorové progresy a jejího konečného důsledku, metastázování. [19]. Rakovinné buňky sice mohou produkovat proangiogenní faktory, u mnoha nádorů ale mnohem větší množství proangiogenních faktorů tvoří buňky nádorového stroma [104]. Hypoxické mikroprostředí nádoru ovlivňuje vedle rakovinných buněk i buňky stroma a vede k profibrogennímu a proangiogennímu chování CAFs. Takové chování může být u CAFs indukováno rozpustnými faktory (jako je PDGF), produkovány rakovinnými buňkami velkého množství různých nádorů, i bez ohledu na obsah kyslíku v okolí [105]. CAFs se na angiogenezi podílí mnoha různými aktivitami. Mezi ně patří již zmíněná sekrece růstových faktorů (VEGF, ale i bFGF), proteáz (MMP-13), složek ECM (tenascin C, periostin) i rekrutování různých buněčných typů a následné ovlivnění chování rekrutovaných buněk [106]. Rekrutované buněčné typy se podílí na tvorbě specifického cytokinového prostředí (např. imunitní buňky) nebo se přímo podílí na tvorbě nových cév (např. endotelové buňky a jejich prekurzory, pericyty, atd.). CAFs hrají v angiogenezi nádorů prominentní roli a je třeba s nimi počítat např. v antiangiogenní terapii nádorů.

Interakce myofibroblastů /ECM s imunitním systémem v nádorovém stroma

Nádorové buňky ovlivňují reakce imunitního systému ve většině nebo možná dokonce všech rakovinách [107]. CAFs ovlivňují zánětlivé mikroprostředí nádorů dvěma principiálně odlišnými mechanismy. V prvním mechanismu CAFs produkují prozánětlivé proteiny a látky, kterými rekrutují makrofágy, neutrofile a jiné stimulační imunitní buňky. Rekrutované buňky pak podporují různé aspekty nádorové progresy [108-110]. V druhém mechanismu CAFs produkují faktory, které brání buňkám imunitního systému v nalezení a napadení nádorových buněk [111]. Například CAFs melanomů brání cytotoxickému působení buněk NK jak přímým mezibuněčným (buňka - buňka) kontaktem, tak uvolňováním PGE₂ [112]. U adenokarcinomů CAFs zase potlačují imunitní reakce produkcí proteinu FAP [113]. V souladu s rolí CAFs, coby negativních modulátorů imunitní reakce v mikroprostředí nádorů, je pozorování, ve kterém odstranění CAFs z experimentálního nádoru prsu (odstraněním FAP) vede k potlačení metastázování nádorů. Toto potlačení je způsobeno přeměnou imunitního mikroprostředí z Th2 odpovědi na Th1 [114].

Myofibroblasty /ECM a selekce agresivních subtypů nádorových buněk

CAFs přispívají k selekci agresivních subtypů nádorových buněk. Když rakovinné buňky získají vlastnosti kmenových buněk, zvyšuje se jejich agresivita a metastázování [115]. Bylo prokázáno, že CAFs dokážou u karcinomových buněk prostaty navodit vlastnosti typické pro kmenové buňky. Takové rakovinné buňky pak mnohem více metastázovaly [116]. Vlastnosti kmenových buněk získaly i buňky rakoviny slinivky břišní kokultivací s hvězdicovitými buňkami pankreatu (hlavním

profibrogenním buněčným typem slinivky břišní) [117]. K selekci agresivních podtypů nádorových buněk CAFs přispívají také remodelací ECM (změny biochemických i mechanických vlastností), která může způsobit EMT nebo určitý typ invazivity.

Role myofibroblastů /ECM v přípravě tkání pro metastázování

Myofibroblasty se podílí i na přípravě tkání vzdálených orgánů pro metastázování nádorových buněk, připravují takzvanou metastatickou niku. Podle Pagetovy hypotézy „semínka a půdy“ (angl. „seed and soil“), dochází k metastázování do míst, kde je příznivé prostředí [118]. Podle jiné hypotézy dochází k tvorbě metastáz v místech, která jsou svými biomechanickými vlastnostmi velmi podobná místu primárního nádoru (často ztuhlému, fibrotickému). Nedávno bylo ukázáno, že buňky nádorového stroma lidského karcinomu uvolňují určité mikrovezikuly obsahující např. nukleové kyseliny (DNA, mRNA, microRNA), které slouží ke komunikaci mezi buňkami stroma, buňkami rakovinnými i vzdálenými buňkami jiných orgánů, kde se tyto vezikuly podílejí na přípravě pre-metastatické niky [119]. CAFs experimentálních nádorů prsu produkují faktor S100A4, který způsobuje zvýšenou infiltraci T lymfocytů do plic ještě před metastázováním. T lymfocyty následně navozují cytokinové podmínky, které jsou příznivé pro vznik metastáz [120]. Rakovinné buňky mají tendenci metastázovat do fibrotické tkáně [22, 23]. Bylo ukázáno, že cytokinové mikroprostředí obecně vytvářené myofibroblasty obsahuje např. IL1b, TNF- α a SDF1 stimuluje adhezi a následnou transendoteliální migraci rakovinných buněk [121, 122]. Periostin, součást ECM, je zase důležitý pro udržení vlastností rakovinných kmenových buněk a tedy je zásadní pro vznik metastáz [123]. V místě metastázy následně myofibroblasty podporují proliferaci rakovinných buněk [124].

Dále bylo ukázáno, že metastázující buňky si mohou s sebou do místa vznikající metastázy přinést jejich „vlastní půdu“, konkrétně stromální komponenty z primárního nádoru. Buňky nádorového stroma (konkrétně CAFs) v takovém případě putují spolu s metastázujícími rakovinnými buňkami, chrání rakovinné buňky v krevním řečišti před smrtí vyvolanou neuchycením k podkladu (anoikis) a zajišťují tak rakovinným buňkám dlouhodobé přežití a proliferační výhodu v metastatických nodulech [125]. V souladu s přinášením vlastního stroma do míst tvorby metastáz je i pozorování, ve kterém CAFs a rakovinné buňky migrují společně přes ECM, přičemž CAFs pomocí proteáz vytváří cesty, kterými se následně pohybují buňky rakovinné [74]. V jiném modelu bylo ukázáno, že injekce rakovinných buněk spolu s buňkami stroma (CAFs) vede k výrazně vyšší tvorbě metastáz, než když byly injikovány rakovinné buňky samotné [116].

Rozdíly mezi myofibroblasty a fibroblasty spojenými s nádory (CAFs)

Do jaké míry se CAFs odlišují od myofibroblastů účastnících se hojení ran není stále jasné. Faktem je, že fibroblasty izolované z deseti různých anatomických oblastí a následně aktivované sérem (napodobuje reakci aktivovanou při hojení ran) měly společný transkripční profil s buňkami CAFs, izolovanými z různých karcinomů. Tento společný transkripční profil je u CAFs spojený s rozvojem metastáz u pacientů s rakovinou prsu, plic a žaludku [126]. Zatím neexistuje jednotný názor na to, jestli se u CAFs vyskytují genetické anebo epigenetické změny obecného charakteru. Jsou práce, které u CAFs dokládají obecné genetické změny jako např. mutace nádorových supresorů PTEN a p53, ztrátu heterozygotnosti anebo změny počtu kopií alel [127-132] a zároveň jsou práce, které těmto závěrům odporují [133-136]. U rakovin prsu a prostaty byly pozorovány epigenetické změny v metylaci promotorů, které

souvisely se špatnými klinickými výsledky. Řada prací tedy dokládá, že u CAFs ke genetickým a epigenetickým změnám dochází. Tyto změny mohou být způsobené vlivem mutagenů a faktorů z vnějšího prostředí [97] nebo je mohou přímo vyvolávat rakovinné buňky. Například buňky karcinomu prostaty byly v myším modelu schopné parakrinním mechanismem vyvíjet selekční tlak na CAFs, vedoucí ke zvýšené proliferaci buněk s nízkou hladinou p53 [137] nebo mohou rakovinné buňky působit na CAFs prostřednictvím uvolňovaných exozómů (mikrovezikulů), které umožňují přenos genetické informace i např. miRNA působící epigeneticky. Přenos miRNA byl pozorován i prostřednictvím mezerových spojů mezi buňkami nádorového stroma a buňkami rakovinnými [138]. CAFs s genetickými anebo epigenetickými změnami mohou následně reagovat na podněty z okolí jiným způsobem než myofibroblasty účastníci se hojení ran a více přispívají k rozvoji nádorových onemocnění [131, 139]. Je třeba nashromáždit více důkazů, aby bylo možné říci, jak se CAFs od myofibroblastů účastnících se hojení ran liší a jakou roli hrají případné rozdíly v rozvoji nádorových onemocnění. Taková zjištění by mohla ovlivnit případné terapeutické přístupy, které se zaměřují na interakci mezi CAFs a rakovinnými buňkami.

CAFy jako cíl protinádorové terapie

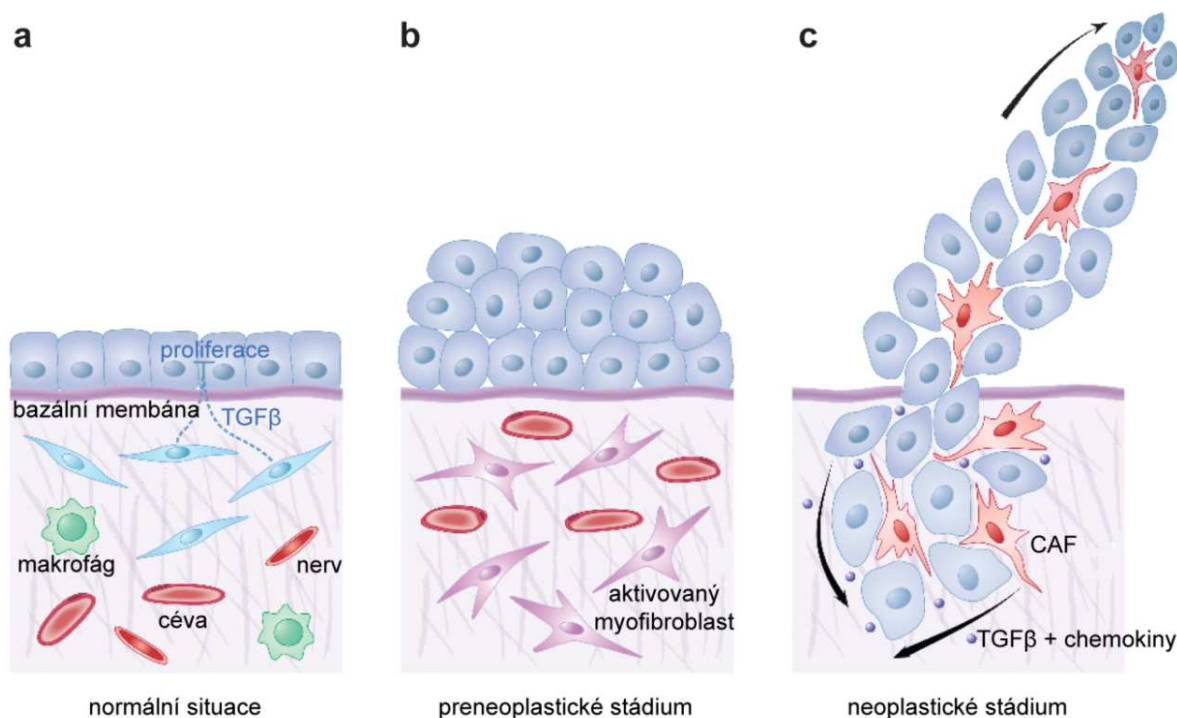
CAFy jsou v posledních několika letech považovány za slibný cíl v protinádorové léčbě z následujících důvodů. Za prvé jsou CAFy v porovnání s rakovinnými buňkami mnohem stabilnější, čímž se snižuje riziko vytvoření rezistence k terapeutickým látkám. Za druhé CAFy jsou zodpovědné za vlastnosti nádorové ECM, bránící difúzi protinádorových látek solidními nádory. Za třetí CAFy podporují přežívání, proliferaci a invazivitu rakovinných buněk [86]. Nejedna práce ukázala, že odstranění CAFs a dalších komponent nádorového stroma vedla k výrazně lepšímu účinku protinádorových látek [73, 140]. CAFy také zprostředkovávají rezistenci k antiangiogenní léčbě nádorů [141]. V budoucnu by tedy kombinovaná léčba zaměřená proti CAFs (nebo nádorovému stroma obecně) a současně rakovinným buňkám mohla vést k lepším klinickým výsledkům. Přestože se v současné době klinicky testuje několik nadějných přístupů [142-144] zacílených na CAFy a jimi zprostředkované působení na mikroprostředí nádorů, momentálně nejsou léky interferující s účinky CAFs v praxi dostupné. Protože myofibroblasty/CAFy mohou vzniknout mnoha různými způsoby a ovlivňují mnoho procesů nádorové progresy, nelze očekávat, že by účinná protinádorová léčba zacílená na CAFy byla založená na zabránění vzniku CAFs nebo interferencí s jednou konkrétní rolí CAFs. Proto je třeba nadále intenzivně studovat obecné mechanismy důležité pro udržení funkcí myofibroblastů/CAFy i interakce mezi rakovinnými buňkami a CAFy.

Role signální dráhy TGF β v biologii myofibroblastů a progresi rakovinného bujení

Signalizace dráhou TGF β zásadním způsobem ovlivňuje fenotyp myofibroblastů jak při hojení ran, tak u fibróz a stromatogeneze nádorů. Signalizace dráhou TGF β hraje důležitou roli v progresi rakoviny, neboť reguluje diferenciaci myofibroblastů, proliferaci epitelových buněk a fungování imunitního systému, tedy reguluje prakticky všechny složky nádoru. Signalizace dráhou TGF β má profibrotickou roli ve fibrogenезi všech orgánů a TGF- β 1 je prototypickým fibrotickým růstovým faktorem [40]. TGF β byl původně identifikován jako faktor způsobující růst embryonálních ledvinových fibroblastů nezávisle na přichycení k podkladu [145]. Ústřední role TGF- β 1 ve fibrogenезi byla objevena při indukci fibrotických lezí, vytvořených v důsledku

injekce purifikovaného TGF- β 1 do podkoží. Velmi silná exprese TGF- β 1, pozorovaná ve všech fibrotických tkáních, vede k produkci kolagenů fibroblasty bez ohledu na jejich původ [146-149]. TGF- β 1 zároveň aktivuje expresi SMA a dalších složek kontraktálního aparátu myofibroblastů [150]. Zásadní roli TGF- β 1 ve fibrogenезi potvrdilo pozorování, že neutralizace antisérem vedla k zlepšení stavu experimentálních zvířat s fibrózou kůže, ledvin, jater, plic i srdce [151-154]. Protože zásadní role TGF- β 1 ve fibróze tkání doposud nebyla v žádném orgánu zpochybněna, je TGF- β 1 a jím spouštěná signalizace považována za hlavní cíl případné léčby fibrotických onemocnění [155]. V dnešní době běží klinické pokusy, ve kterých se sleduje účinek neutralizujících protilátek proti TGF- β 1 v systémové skleróze, myelofibróze a diabetické nefropatii [53].

V počátečních fázích vývoje karcinomů TGF β působí spíše jako nádorový supresor, protože inhibuje proliferaci epitelových buněk a navozuje jejich apoptózu. Poté se ale role TGF β mění a TGF β začíná kancerogenezi podporovat indukcí EMT a zvýšené buněčné motility [156] (obr. 3). Ve změně role TGF β ve vývoji nádorů hrají důležitou úlohu mechanické vlastnosti mikroprostředí, které výrazně ovlivňují myofibroblasty. Různá tuhost ECM reguluje funkční odpověď buněk na TGF β . Při nízké tuhosti mikroprostředí TGF- β 1 indukuje apoptózu, zatímco zvýšená tuhost vede k EMT [157].



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

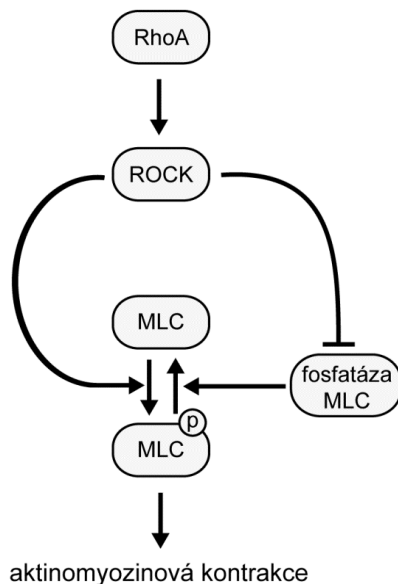
(a) V blízkosti normální epitelové tkáně se nachází dormantní fibroblasty a ostatní podpůrné mezenchymové buněčné typy, které společně potlačují nevhodnou nebo preneoplastickou proliferaci epitelových buněk. Uvolňovaný cytokin TGF β brání proliferaci a může navodit i apoptózu epitelových buněk. (b) Přeměna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

Invazivita rakovinných buněk

Interakce ECM (produkované převážně myofibroblasty) a nádorových buněk silně ovlivňuje schopnost nádorových buněk invadovat do okolních tkání, což je předpokladem pro metastázování nádorů. Invaze matrix nádorovými buňkami je jedním z nejčasnějších a klíčových kroků procesu metastázování. Vlastnosti ECM určují strategii a účinnost buněčné migrace. Rakovinné buňky mohou migrovat přes ECM: 1) cestami (otvory, tunely), které v ECM vytvořily jiné buněčné typy, 2) otvory/tunely, které si tvoří samotné rakovinné buňky pomocí vlastních MMPs (zásadní roli hraje MT1-MMP) při tzv. mezenchymovém způsobu pohybu [158] a 3) protahováním a protlačováním se přes ECM améboidním způsobem bez degradace ECM. Otvory v ECM mohou vytvářet buňky nádorového stroma, jako jsou CAFs/myofibroblasty, buňky hladkého svalstva nebo buňky endotelové, procesem závislým na MMPs [74, 159-162]. Jak již bylo zmíněno, rakovinné buňky mohou spolupracovat např. s CAFs a migrovat společně, přičemž rakovinné buňky využívají schopnosti CAFs degradovat ECM [74]. Cesta uvolněná pro migrující rakovinné buňky se může nacházet i v místech poškozených krevních a lymfatických cév a v nekrotické tkáni MMPs [163].

Při améboidním pohybu mají migrující buňky zakulacenou morfologii a spíše se přes ECM protahují anebo protlačují, než aby ji degradovaly (pomocí MMPs) [164]. Z tohoto důvodu mohou být protinádorové látky cílené na proteázy a integriny neúčinné [165-167]. Při améboidním způsobu pohybu hraje důležitou roli kontrakce kortikálního aktinomyozinového cytoskeletu [168]. Ta umožňuje buňkám protahovat se přes již existující mezery v ECM a přizpůsobovat tvar buňky volnému prostoru. V regulaci aktinomyozinového cytoskeletu obecně hrají důležitou roli molekuly RhoA, ROCK a MLC, které jsou součástí jedné regulační dráhy (obr. 4) a při améboidním způsobu pohybu byla pozorována jejich zvýšená aktivita [164, 168, 169]. RhoA je malý GTPázový protein z proteinové superrodiny Ras, jehož aktivita reguluje aktinový cytoskelet. RhoA aktivuje Rho kinázu ROCK, která fosforyluje lehký řetězec myozinu (MLC) a fosfatázu MLC [170]. Fosforylace fosfatázy MLC vede k její inaktivaci a tedy zvýšení hladiny fosforylovaného MLC. Fosforylace MLC aktivuje ATPázovou aktivitu myozinu II, důsledkem čehož dojde ke kontrakci aktinomyozinového aparátu. Při améboidním pohybu dochází také ke snížené tvorbě integrinů $\alpha 2\beta 1$ a snížení fosforylace kinázy fokálních adhezí (FAK) [164, 171], což naznačuje menší nebo žádné požadavky na tvorbu fokálních adhezí a jimi zprostředkovanou signalizaci. Nízká adheze buněk k podkladu podporuje jejich zakulacení a dovoluje améboidním buňkám relativně rychlý pohyb trojrozměrným (3D) prostředím. Přestože se o améboidní invazivitě a její závislosti na signalizaci dráhou Rho/ROCK/MLC za podmínek *in vitro* ví poměrně dost [168, 172], stále není dostatek důkazů o její skutečné roli a potřebné signalizaci *in vivo*, obzvláště při metastázování [169, 173, 174]. Některé práce naznačují, že přepínání mezi améboidním a mezenchymovým způsobem záleží na hustotě sítě ECM [158, 175, 176], přičemž améboidní způsob migrace se uplatňuje především v prostředí s menší hustotou ECM, zatímco v prostředí husté sítě tuhé ECM se spíše uplatňuje mezenchymový způsob migrace, závislý na degradaci ECM pomocí MMPs. Zvýšenou tuhost prostředí buňky vnímají fokálními adhezemi zprostředkovanými integriny a proteiny jako jsou např. vinkulin, talin, FAK, p130Cas a filamin A [177-180]. Pokud je prostředí příliš tuhé a nedovoluje améboidní pohyb, dojde k AMT, který souvisí s obnovením zvýšené tvorby fokálních adhezí, tvorbě buněčných výběžků a tedy protažené buněčné morfologii, typické pro mezenchymový způsob pohybu [181]. V experimentálních 3D podmínkách mají me-

zenchymově se pohybující buňky typicky protažený tvar (morfologii) [182]. Je pravděpodobné, že nádorové buňky přepínají způsoby pohybu podle podmínek, ve kterých se nalézají. Při mezenchymově-améboidnímu přechodu (MAT) se aktivuje epigenetický program, vedoucí k améboidnímu způsobu pohybu buněk a při AMT se aktivuje mezenchymový způsob pohybu.

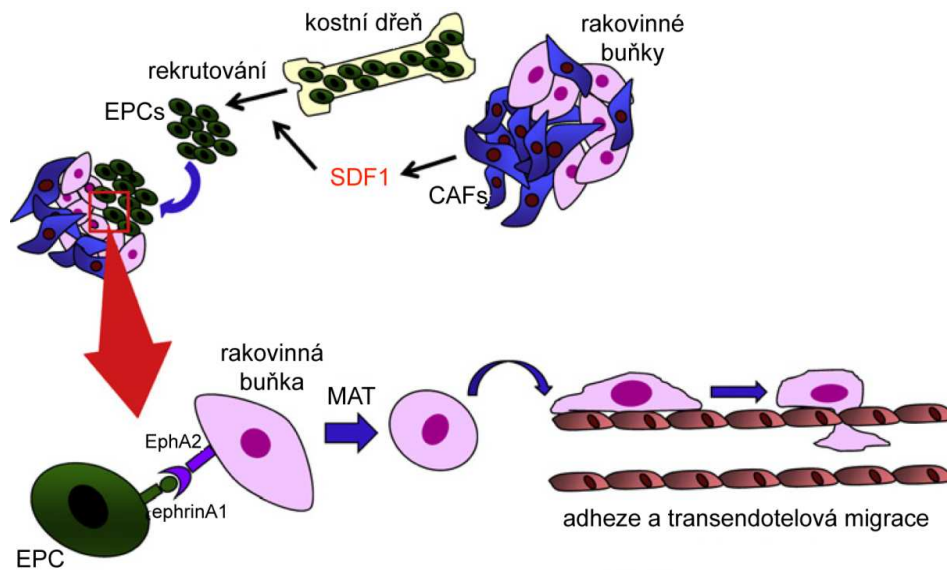


Obr. 4: Zjednodušené schematické zobrazení regulační signální kaskády proteinů RhoA, ROCK a MLC v regulaci kontrakce aktinomyozinového cytoskeletu. RhoA aktivuje Rho kinázu ROCK, která fosforyluje lehký řetězec myozinu (MLC) a fosfatázu MLC. Fosforylace fosfatázy MLC vede k její inaktivaci a tedy zvýšení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

CAFs mohou pomocí secernovaných faktorů nepřímo aktivovat améboidní invazivitu a s ní spojené metastazování rakovinných buněk, jak bylo ukázáno u rakoviny prostaty (obr. 5). CAFs totiž secernováním SDF1 stimulují rekrutování prekurzorů endotelových buněk (EPCs) do místa nádoru. Interakce buněk EPCs a rakovinných buněk prostřednictvím povrchových molekul ephrinA1 a EphA2 vede u rakovinných buněk k MAT, nádorové angiogenezi a indukované adhezi rakovinných buněk k endotelům a migraci skrz ně a nakonec k účinnému metastazování [184, 185]. Obdobně interakce prostřednictvím EphA2 pravděpodobně vede k MAT (závislé na aktivitě RhoA) i u rakovinných buněk melanomů [183], což naznačuje obecnou platnost tohoto mechanismu.

Rodina transkripčních faktorů EGR

Rodina transkripčních faktorů EGR má čtyři členy, konkrétně EGR1, EGR2, EGR3 a EGR4. Název rodiny je zkratkou anglického názvu Early Growth Response, který odráží fakt, že tyto proteiny byly objeveny jako produkty genů, jejichž exprese byla rychle aktivována po stimulaci buněčné proliferace sérem [186-192]. Všichni čtyři členové sdílejí kromě mechanismu regulace transkripce i některé strukturální prvky. Dva členové této rodiny, EGR1 a EGR4, hrají důležitou roli v procesech, které jsou předmětem studia této práce, a proto je jim věnována v této části pozornost.

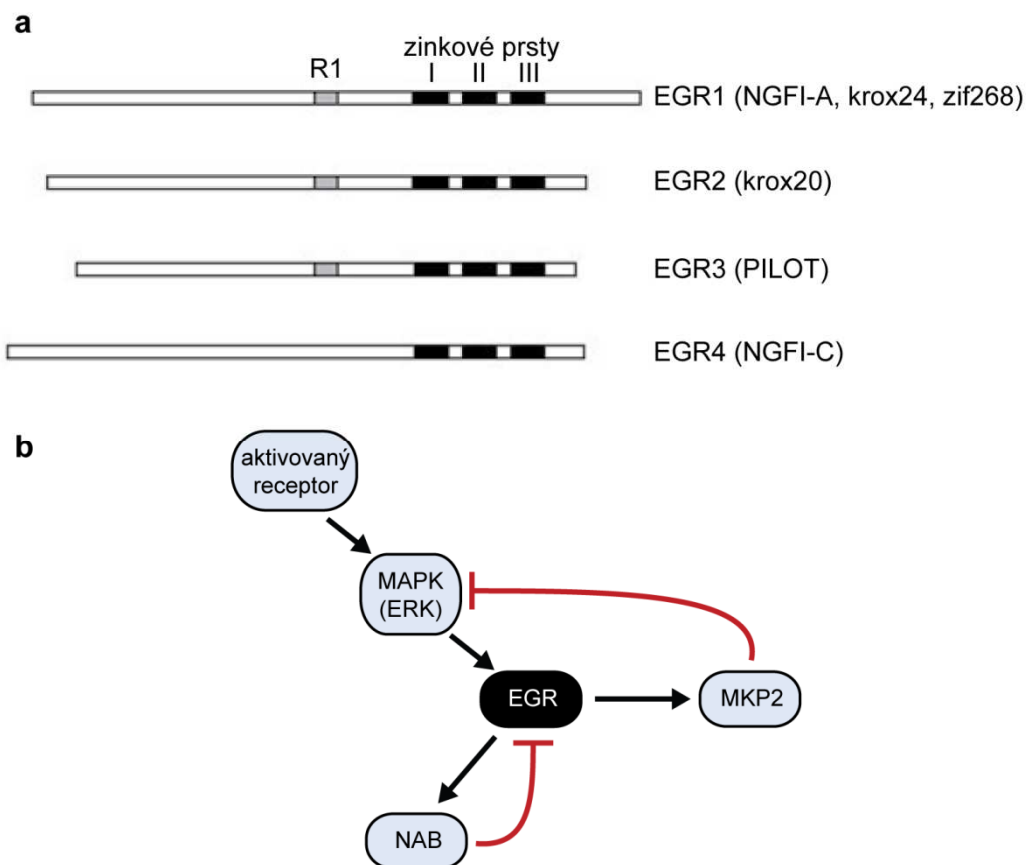


Obr. 5: CAFs nepřímo aktivují améboidní invazivitu a s ní spojené metastázování rakoviny prostaty. CAFs secernováním SDF1 stimulují rekrutování prekursorů endotelových buněk (EPCs) do místa nádoru. Interakce buněk EPCs a rakovinných buněk prostřednictvím povrchových molekul ephrinA1 a EphA2 vede u rakovinných buněk k mezenchymově-améboidnímu přechodu (MAT), nádorové angiogenezi, indukované adhezi rakovinných buněk k endotelům i migraci přes ně a nakonec k účinnému metastázování. Podle [82], upraveno.

Struktura, vlastnosti a regulace aktivity proteinů rodiny EGR

Všichni členové rodiny EGR mají vysoce homologní DNA vazebnou doménu umístěnou na C-konci proteinu [193-196]. DNA vazebná doména obsahuje tři typické motivy zinkových prstů (Cys2-His2) (obr. 6a) a u všech členů rozeznává sekvenční motiv DNA: GCG G/TGG GCG [187, 197]. Další homologní doménou je tzv. R1 doména, konzervovaná u všech členů rodiny EGR, kromě EGR4. R1 doména se nachází v blízkosti motivu prvního zinkového prstu a přímo zprostředkovává interakci s korepresory NAB. Ostatní části proteinů rodiny EGR jsou mezi jednotlivými členy poměrně variabilní.

Proteiny rodiny EGR interagují s jinými proteiny, které interagují s dalšími proteiny a dohromady vytváří komplexy regulující transkripci [198-201]. Důležitou roli ve funkci proteinů EGR1-3 hraje interakce s dvěma členy rodiny transkripčních korepresorů NAB (NAB1 a NAB2). Proteiny NAB totiž rekrutují komplex histonových deacetyláz, které následně brání transkripci regulované transkripčními faktory EGR [202, 203], přesto v některých případech mohou proteiny NAB transkripci i aktivovat [204]. Zajímavé je, že proteiny EGR aktivují transkripci a syntézu proteinů NAB, čímž se vytváří smyčka negativní zpětné vazby [205] (obr. 6b). Transkripce genů kódujících proteiny EGR je do značné míry pod kontrolou signální dráhy MAPK. Signalizace dráhou MAPK vede k aktivaci první vlny transkripce velmi časných genů (angl. „immediate early genes“), do které patří i geny kódující proteiny EGR [206, 207]. Proteiny EGR následně řídí transkripci určitých genů, mezi jinými však aktivují transkripci negativních regulátorů signalizace dráhou MAPK, fosfatáz MKP2/DUSP5 [208, 209], čímž se vytváří smyčka negativní zpětné vazby regulující signalizaci dráhou MAPK (obr. 6b).



Obr. 6: Struktura a regulace aktivity proteinů rodiny EGR. a) Struktura proteinů rodiny EGR podle [213], upraveno. U každého proteinu jsou v závorce uvedeny alternativní názvy. **b)** Zjednodušené schéma regulací aktivity proteinů EGR.

Funkce proteinů rodiny EGR

Proteiny EGR mohou být součástí různorodých komplexů regulujících transkripci v různých typech buněk a mohou tedy hrát i různou roli. Například EGR1 je potřebný pro plodnost samic (reprodukční systém) [210, 211] a zároveň hraje roli v paměti (centrální nervový systém) [212]. Všichni členové rodiny EGR jsou zapojeni ve vývoji a fungování mozku [213, 214]. Zároveň se ukázalo, že některé role členů rodiny EGR jsou pravděpodobně redundantní [215, 216]. Bude potřeba mnoho další práce, abychom dobře pochopili role proteinů EGR ve složité transkripční regulaci rozličných typů buněk. Pro tuto práci je podstatná především role proteinu EGR1 v udržení fenotypu myofibroblastů a jeho účast u nádorových onemocnění.

Roli EGR1 v biologii myofibroblastů a rozvoji fibróz se věnovala již řada prací (přehledně [217, 218]). Z nich vyplývá, že v lidských kožních fibroblastech aktivní signalizace dráhou vede k tvorbě EGR1, který následně aktivuje syntézu kolagenu typu I [219]. U myši bez genu kódujícího EGR1 docházelo ke špatnému hojení ran kůže a fibroblasty z takových myši hůře migrovaly a diferencovaly do myofibroblastů [220]. Vysoká hladina EGR1 byla pozorována u řady fibrotických onemocnění, např. ve sklerodermě [221] nebo plicní sarkoidóze [222]. Zvýšená hladina EGR1 byla pozorována u lidských nádorů, jako jsou karcinom prostaty [223], melanom [224] nebo rakovina jícnu [225]. EGR1 ve spolupráci s dalšími transkripčními faktory (TBX2, β -katenin) podporuje proliferaci buněk rakoviny prsu [226] a rozvoj hepatocelulárního karcinomu [227]. U lidských buněk karcinomu prostaty hraje EGR1 roli

v regulaci růstu nádorových buněk jak *in vitro*, tak *in vivo* [228]. Zvýšená hladina EGR1 souvisí i s aktivním metastázováním karcinomů žaludku, močového měchýře a meduloblastomů [229-232]. EGR1 také může podporovat nádorovou progresi melanomů tím, že prostřednictvím HGF (jehož tvorbu aktivuje) indukuje tvorbu fibronektinu a CD44 [233-235]. V různých typech nádorů EGR1 pravděpodobně přispívá k metastázování aktivací transkripce genu kódujícího heparanázu, enzym štěpící heparan sulfát (složku ECM) [236, 237]. Existuje však i práce ukazující protirakovinné účinky EGR1. EGR1 může aktivovat expresi genu kódujícího nádorový supresor p53, který brání buňkám s poškozeným genomem pokračovat v buněčném dělení [238].

Druhým členem rodiny EGR je EGR4. O funkci proteinu EGR4 je známo jen velmi málo. O EGR4 bylo publikováno, že hraje důležitou roli v časně fázi meiózy při vzniku spermií, jak odhalila analýza myší s mutovaným genem EGR4. Mutovaná zvířata byla fenotypicky normální, pouze samci byli neplodní [239].

Literatura

- [1] Kopfstein L et al. Metastasis: cell-autonomous mechanisms versus contributions by the tumor microenvironment. *Cell Mol Life Sci* 2006; 63: 449-68.
- [2] Steeg PS et al. Metastasis: a therapeutic target for cancer. *Nat Clin Pract Oncol* 2008; 5: 206-19.
- [3] Labiche A et al. Stromal compartment as a survival prognostic factor in advanced ovarian carcinoma. *Int J Gynecol Cancer* 2010; 20: 28-33.
- [4] Planche A et al. Identification of prognostic molecular features in the reactive stroma of human breast and prostate cancer. *PLoS One* 2011; 6: e18640.
- [5] Finak G et al. Stromal gene expression predicts clinical outcome in breast cancer. *Nat Med* 2008; 14: 518-27.
- [6] Sporn MB. The war on cancer. *Lancet* 1996; 347: 1377-81.
- [7] Menon S et al. Cancer cell invasion is enhanced by applied mechanical stimulation. *PLoS One* 2011; 6: e17277.
- [8] Strauli P et al. Morphological studies on V2 carcinoma invasion and tumor-associated connective tissue changes in the rabbit mesentery. *Cancer Res* 1983; 43: 5403-10.
- [9] Webb BA et al. Dysregulated pH: a perfect storm for cancer progression. *Nat Rev Cancer* 2011; 11: 671-7.
- [10] Gallagher FA et al. Magnetic resonance imaging of pH in vivo using hyperpolarized ¹³C-labelled bicarbonate. *Nature* 2008; 453: 940-3.
- [11] Brahim-Horn MC et al. Oxygen, a source of life and stress. *FEBS Lett* 2007; 581: 3582-91.
- [12] Brahim-Horn MC et al. Hypoxia and cancer. *J Mol Med (Berl)* 2007; 85: 1301-7.
- [13] Brahim-Horn MC, et al. Hypoxia signalling controls metabolic demand. *Curr Opin Cell Biol* 2007; 19: 223-9.
- [14] Guppy M. The hypoxic core: a possible answer to the cancer paradox. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 299: 676-80.
- [15] Warburg O. On the origin of cancer cells. *Science* 1956; 123: 309-14.
- [16] Xu RH et al. Inhibition of glycolysis in cancer cells: a novel strategy to overcome drug resistance associated with mitochondrial respiratory defect and hypoxia. *Cancer Res* 2005; 65: 613-21.
- [17] Bartrons R et al. Hypoxia, glucose metabolism and the Warburg's effect. *J Bioenerg Biomembr* 2007; 39: 223-9.
- [18] Merlo LM et al. Cancer as an evolutionary and ecological process. *Nat Rev Cancer* 2006; 6: 924-35.
- [19] Nagy JA et al. Why are tumour blood vessels abnormal and why is it important to know? *Br J Cancer* 2009; 100: 865-9.

- [20] Levental KR et al. Matrix crosslinking forces tumor progression by enhancing integrin signaling. *Cell* 2009; 139: 891-906.
- [21] Zhang Y et al. Ovarian cancer-associated fibroblasts contribute to epithelial ovarian carcinoma metastasis by promoting angiogenesis, lymphangiogenesis and tumor cell invasion. *Cancer Lett* 2011; 303: 47-55.
- [22] Barkan D et al. Extracellular matrix: a gatekeeper in the transition from dormancy to metastatic growth. *Eur J Cancer* 2010; 46: 1181-8.
- [23] O'Connell JT et al. VEGF-A and Tenascin-C produced by S100A4+ stromal cells are important for metastatic colonization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; 108: 16002-7.
- [24] Kalluri R et al. Fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer* 2006; 6: 392-401.
- [25] Barrientos S et al. Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair Regen* 2008; 16: 585-601.
- [26] Nurden AT. Platelets, inflammation and tissue regeneration. *Thromb Haemost* 2011; 105 Suppl 1: S13-33.
- [27] Demirci G et al. Fibrosis in chronic rejection of human liver allografts: expression patterns of transforming growth factor-TGFbeta1 and TGF-beta3. *Transplantation* 1996; 62: 1776-83.
- [28] Werner S et al. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiol Rev* 2003; 83: 835-70.
- [29] Gabbiani G. The myofibroblast in wound healing and fibrocontractive diseases. *J Pathol* 2003; 200: 500-3.
- [30] Desmouliere A et al. Apoptosis mediates the decrease in cellularity during the transition between granulation tissue and scar. *Am J Pathol* 1995; 146: 56-66.
- [31] Rasanen K et al.. Activation of fibroblasts in cancer stroma. *Exp Cell Res* 2010; 316: 2713-22.
- [32] Hinz B et al. Mechanical tension controls granulation tissue contractile activity and myofibroblast differentiation. *Am J Pathol* 2001; 159: 1009-20.
- [33] Abe R et al. Peripheral blood fibrocytes: differentiation pathway and migration to wound sites. *J Immunol* 2001; 166: 7556-62.
- [34] Direkze NC et al. Multiple organ engraftment by bone-marrow-derived myofibroblasts and fibroblasts in bone-marrow-transplanted mice. *Stem Cells* 2003; 21: 514-20.
- [35] Mori L et al. Fibrocytes contribute to the myofibroblast population in wounded skin and originate from the bone marrow. *Exp Cell Res* 2005; 304: 81-90.
- [36] Rajkumar VS et al. Shared expression of phenotypic markers in systemic sclerosis indicates a convergence of pericytes and fibroblasts to a myofibroblast lineage in fibrosis. *Arthritis Res Ther* 2005; 7: R1113-23.
- [37] Tomasek JJ et al. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002; 3: 349-63.
- [38] Lopez-Novoa JM et al. Inflammation and EMT: an alliance towards organ fibrosis and cancer progression. *EMBO Mol Med* 2009; 1: 303-14.
- [39] Pohlers D et al. TGF-beta and fibrosis in different organs - molecular pathway imprints. *Biochim Biophys Acta* 2009; 1792: 746-56.
- [40] Zeisberg M et al. Cellular mechanisms of tissue fibrosis. 1. Common and organ-specific mechanisms associated with tissue fibrosis. *Am J Physiol Cell Physiol* 2013; 304: C216-25.
- [41] Gabbiani G et al. Presence of modified fibroblasts in granulation tissue and their possible role in wound contraction. *Experientia* 1971; 27: 549-50.
- [42] Majno G et al. Contraction of granulation tissue in vitro: similarity to smooth muscle. *Science* 1971; 173: 548-50.
- [43] Dvorak HF. Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *N Engl J Med* 1986; 315: 1650-9.
- [44] Marsh T et al. Fibroblasts as architects of cancer pathogenesis. *Biochim Biophys Acta* 2013; 1832: 1070-8.

- [45] Haemmerli G et al. Tumor-associated desmoplasia in the rabbit mesentery characterized by morphological, biochemical and cytophotometric methods. *Int J Cancer* 1985; 35: 527-34.
- [46] Hashimoto N et al. Bone marrow-derived progenitor cells in pulmonary fibrosis. *J Clin Invest* 2004; 113: 243-52.
- [47] Direkze NC et al. Bone marrow contribution to tumor-associated myofibroblasts and fibroblasts. *Cancer Res* 2004; 64: 8492-5.
- [48] Walker N et al. Resident tissue-specific mesenchymal progenitor cells contribute to fibrogenesis in human lung allografts. *Am J Pathol* 2011; 178: 2461-9.
- [49] Ishii G et al. In vivo characterization of bone marrow-derived fibroblasts recruited into fibrotic lesions. *Stem Cells* 2005; 23: 699-706.
- [50] Humphreys BD et al. Fate tracing reveals the pericyte and not epithelial origin of myofibroblasts in kidney fibrosis. *Am J Pathol* 2010; 176: 85-97.
- [51] Dulauroy S et al. Lineage tracing and genetic ablation of ADAM12(+) perivascular cells identify a major source of profibrotic cells during acute tissue injury. *Nat Med* 2012.
- [52] Zeisberg EM et al. Endothelial-to-mesenchymal transition contributes to cardiac fibrosis. *Nat Med* 2007; 13: 952-61.
- [53] Wynn TA et al. Mechanisms of fibrosis: therapeutic translation for fibrotic disease. *Nat Med* 2012; 18: 1028-40.
- [54] Ronnov-Jessen L et al. The origin of the myofibroblasts in breast cancer. Recapitulation of tumor environment in culture unravels diversity and implicates converted fibroblasts and recruited smooth muscle cells. *J Clin Invest* 1995; 95: 859-73.
- [55] Anderberg C et al. Paracrine signaling by platelet-derived growth factor-CC promotes tumor growth by recruitment of cancer-associated fibroblasts. *Cancer Res* 2009; 69: 369-78.
- [56] Mücke P et al. Tumour-stroma interaction: cancer-associated fibroblasts as novel targets in anti-cancer therapy? *Lung Cancer* 2004; 45 Suppl 2: S163-75.
- [57] Sugimoto H et al. Identification of fibroblast heterogeneity in the tumor microenvironment. *Cancer Biol Ther* 2006; 5: 1640-6.
- [58] Paulsson J et al. Prognostic significance of stromal platelet-derived growth factor beta-receptor expression in human breast cancer. *Am J Pathol* 2009; 175: 334-41.
- [59] Huijbers IJ et al. A role for fibrillar collagen deposition and the collagen internalization receptor endo180 in glioma invasion. *PLoS One* 2010; 5: e9808.
- [60] Kauppila S et al. Aberrant type I and type III collagen gene expression in human breast cancer in vivo. *J Pathol* 1998; 186: 262-8.
- [61] Kaplan RN et al. VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche. *Nature* 2005; 438: 820-7.
- [62] Hasebe T et al. Prognostic significance of fibrotic focus in invasive ductal carcinoma of the breast: a prospective observational study. *Mod Pathol* 2002; 15: 502-16.
- [63] Engler AJ et al. Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell* 2006; 126: 677-89.
- [64] Hotary K et al. A cancer cell metalloprotease triad regulates the basement membrane transmigration program. *Genes Dev* 2006; 20: 2673-86.
- [65] De Wever O et al. Stromal myofibroblasts are drivers of invasive cancer growth. *Int J Cancer* 2008; 123: 2229-38.
- [66] Provenzano PP et al. Matrix density-induced mechanoregulation of breast cell phenotype, signaling and gene expression through a FAK-ERK linkage. *Oncogene* 2009; 28: 4326-43.
- [67] Manning BD et al. AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell* 2007; 129: 1261-74.
- [68] Chen CS. Mechanotransduction - a field pulling together? *J Cell Sci* 2008; 121: 3285-92.

- [69] Shoulders MD et al. Collagen structure and stability. *Annu Rev Biochem* 2009; 78: 929-58.
- [70] Paszek MJ et al. Tensional homeostasis and the malignant phenotype. *Cancer Cell* 2005; 8: 241-54.
- [71] Chun TH et al. A pericellular collagenase directs the 3-dimensional development of white adipose tissue. *Cell* 2006; 125: 577-91.
- [72] Santhanam AN et al. Pcd4 repression of lysyl oxidase inhibits hypoxia-induced breast cancer cell invasion. *Oncogene* 2010; 29: 3921-32.
- [73] Olive KP et al. Inhibition of Hedgehog signaling enhances delivery of chemotherapy in a mouse model of pancreatic cancer. *Science* 2009; 324: 1457-61.
- [74] Gaggioli C et al. Fibroblast-led collective invasion of carcinoma cells with differing roles for RhoGTPases in leading and following cells. *Nat Cell Biol* 2007; 9: 1392-400.
- [75] Shieh AC et al. Tumor cell invasion is promoted by interstitial flow-induced matrix priming by stromal fibroblasts. *Cancer Res* 2011; 71: 790-800.
- [76] Velling T et al. Polymerization of type I and III collagens is dependent on fibronectin and enhanced by integrins alpha 11beta 1 and alpha 2beta 1. *J Biol Chem* 2002; 277: 37377-81.
- [77] Pankov R et al. Fibronectin at a glance. *J Cell Sci* 2002; 115: 3861-3.
- [78] Kobayashi N et al. Hyaluronan deficiency in tumor stroma impairs macrophage trafficking and tumor neovascularization. *Cancer Res* 2010; 70: 7073-83.
- [79] DeClerck K et al. The role of hypoxia and acidosis in promoting metastasis and resistance to chemotherapy. *Front Biosci* 2010; 15: 213-25.
- [80] Heddleston JM et al. Hypoxia inducible factors in cancer stem cells. *Br J Cancer* 2010; 102: 789-95.
- [81] Simian M et al. The interplay of matrix metalloproteinases, morphogens and growth factors is necessary for branching of mammary epithelial cells. *Development* 2001; 128: 3117-31.
- [82] Taddei ML et al. Microenvironment and tumor cell plasticity: An easy way out. *Cancer Lett* 2013.
- [83] Wheaton WW et al. Hypoxia. 2. Hypoxia regulates cellular metabolism. *Am J Physiol Cell Physiol* 2011; 300: C385-93.
- [84] Peters S, et al. MET: a promising anticancer therapeutic target. *Nat Rev Clin Oncol* 2012; 9: 314-26.
- [85] Jedeszko C et al. Fibroblast hepatocyte growth factor promotes invasion of human mammary ductal carcinoma in situ. *Cancer Res* 2009; 69: 9148-55.
- [86] Cirri P et al. Cancer-associated-fibroblasts and tumour cells: a diabolic liaison driving cancer progression. *Cancer Metastasis Rev* 2012; 31: 195-208.
- [87] Wang W et al. Crosstalk to stromal fibroblasts induces resistance of lung cancer to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors. *Clin Cancer Res* 2009; 15: 6630-8.
- [88] Carmeliet P et al. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature* 2011; 473: 298-307.
- [89] Henriksson ML et al. Colorectal cancer cells activate adjacent fibroblasts resulting in FGF1/FGFR3 signaling and increased invasion. *Am J Pathol* 2011; 178: 1387-94.
- [90] Gerber PA et al. Chemokines in tumor-associated angiogenesis. *Biol Chem* 2009; 390: 1213-23.
- [91] Erez N et al. Cancer-Associated Fibroblasts Are Activated in Incipient Neoplasia to Orchestrate Tumor-Promoting Inflammation in an NF-kappaB-Dependent Manner. *Cancer Cell* 2010; 17: 135-47.
- [92] Matsuo Y et al. CXCL8/IL-8 and CXCL12/SDF-1alpha co-operatively promote invasiveness and angiogenesis in pancreatic cancer. *Int J Cancer* 2009; 124: 853-61.
- [93] Toullec A et al. Oxidative stress promotes myofibroblast differentiation and tumour spreading. *EMBO Mol Med* 2010; 2: 211-30.

- [94] Orimo A et al. Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. *Cell* 2005; 121: 335-48.
- [95] Augsten M et al. CXCL14 is an autocrine growth factor for fibroblasts and acts as a multi-modal stimulator of prostate tumor growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106: 3414-9.
- [96] Bhowmick NA et al. Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. *Nature* 2004; 432: 332-7.
- [97] Hu B et al. Multifocal epithelial tumors and field cancerization from loss of mesenchymal CSL signaling. *Cell* 2012; 149: 1207-20.
- [98] Oskarsson T et al. Extracellular matrix players in metastatic niches. *EMBO J* 2012; 31: 254-6.
- [99] Radisky DC et al. Rac1b and reactive oxygen species mediate MMP-3-induced EMT and genomic instability. *Nature* 2005; 436: 123-7.
- [100] Vanharanta S et al. Field cancerization: something new under the sun. *Cell* 2012; 149: 1179-81.
- [101] Kalluri R. EMT: when epithelial cells decide to become mesenchymal-like cells. *J Clin Invest* 2009; 119: 1417-9.
- [102] Thiery JP et al. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* 2009; 139: 871-90.
- [103] Parsons JT et al. Cell adhesion: integrating cytoskeletal dynamics and cellular tension. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2010; 11: 633-43.
- [104] Thijssen VL et al. Angiogenesis gene expression profiling in xenograft models to study cellular interactions. *Exp Cell Res* 2004; 299: 286-93.
- [105] Pietras K et al. Hallmarks of cancer: interactions with the tumor stroma. *Exp Cell Res* 2010; 316: 1324-31.
- [106] Vong S et al. The role of stromal myofibroblast and extracellular matrix in tumor angiogenesis. *Genes Cancer* 2011; 2: 1139-45.
- [107] Hanahan D et al. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011; 144: 646-74.
- [108] Elkabets M et al. Human tumors instigate granulysin-expressing hematopoietic cells that promote malignancy by activating stromal fibroblasts in mice. *J Clin Invest* 2011; 121: 784-99.
- [109] Boersma BJ et al. A stromal gene signature associated with inflammatory breast cancer. *Int J Cancer* 2008; 122: 1324-32.
- [110] Silzle T et al. Tumor-associated fibroblasts recruit blood monocytes into tumor tissue. *Eur J Immunol* 2003; 33: 1311-20.
- [111] Stover DG et al. A delicate balance: TGF-beta and the tumor microenvironment. *J Cell Biochem* 2007; 101: 851-61.
- [112] Balsamo M et al. Melanoma-associated fibroblasts modulate NK cell phenotype and antitumor cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106: 20847-52.
- [113] Kraman M et al. Suppression of antitumor immunity by stromal cells expressing fibroblast activation protein-alpha. *Science* 2010; 330: 827-30.
- [114] Liao D et al. Cancer associated fibroblasts promote tumor growth and metastasis by modulating the tumor immune microenvironment in a 4T1 murine breast cancer model. *PLoS One* 2009; 4: e7965.
- [115] Tu SM et al. Stem-cell origin of metastasis and heterogeneity in solid tumours. *Lancet Oncol* 2002; 3: 508-13.
- [116] Giannoni E et al. Reciprocal activation of prostate cancer cells and cancer-associated fibroblasts stimulates epithelial-mesenchymal transition and cancer stemness. *Cancer Res* 2010; 70: 6945-56.
- [117] Hamada S et al. Pancreatic stellate cells enhance stem cell-like phenotypes in pancreatic cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2012; 421: 349-54.
- [118] Paget S. The distribution of secondary growths in cancer of the breast. 1889. *Cancer Metastasis Rev* 1989; 8: 98-101.

- [119] Grange C et al. Microvesicles released from human renal cancer stem cells stimulate angiogenesis and formation of lung premetastatic niche. *Cancer Res* 2011; 71: 5346-56.
- [120] Grum-Schwensen B et al. Lung metastasis fails in MMTV-PyMT oncomice lacking S100A4 due to a T-cell deficiency in primary tumors. *Cancer Res* 2010; 70: 936-47.
- [121] Rahn JJ et al. MUC1 mediates transendothelial migration in vitro by ligating endothelial cell ICAM-1. *Clin Exp Metastasis* 2005; 22: 475-83.
- [122] Kukreja P et al. Up-regulation of CXCR4 expression in PC-3 cells by stromal-derived factor-1alpha (CXCL12) increases endothelial adhesion and transendothelial migration: role of MEK/ERK signaling pathway-dependent NF-kappaB activation. *Cancer Res* 2005; 65: 9891-8.
- [123] Malanchi I et al. Interactions between cancer stem cells and their niche govern metastatic colonization. *Nature* 2012; 481: 85-9.
- [124] Olaso E et al. Proangiogenic role of tumor-activated hepatic stellate cells in experimental melanoma metastasis. *Hepatology* 2003; 37: 674-85.
- [125] Duda DG et al. Malignant cells facilitate lung metastasis by bringing their own soil. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107: 21677-82.
- [126] Tchou J et al. Human breast cancer associated fibroblasts exhibit subtype specific gene expression profiles. *BMC Med Genomics* 2012; 5: 39.
- [127] Fukino K et al. Genomic instability within tumor stroma and clinicopathological characteristics of sporadic primary invasive breast carcinoma. *JAMA* 2007; 297: 2103-11.
- [128] Kiaris H et al. Evidence for nonautonomous effect of p53 tumor suppressor in carcinogenesis. *Cancer Res* 2005; 65: 1627-30.
- [129] Kurose K et al. Frequent somatic mutations in PTEN and TP53 are mutually exclusive in the stroma of breast carcinomas. *Nat Genet* 2002; 32: 355-7.
- [130] Moinfar F et al. Macro-environment of breast carcinoma: frequent genetic alterations in the normal appearing skins of patients with breast cancer. *Mod Pathol* 2008; 21: 639-46.
- [131] Patocs A et al. Breast-cancer stromal cells with TP53 mutations and nodal metastases. *N Engl J Med* 2007; 357: 2543-51.
- [132] Weber F et al. Microenvironmental genomic alterations and clinicopathological behavior in head and neck squamous cell carcinoma. *JAMA* 2007; 297: 187-95.
- [133] Qiu W et al. No evidence of clonal somatic genetic alterations in cancer-associated fibroblasts from human breast and ovarian carcinomas. *Nat Genet* 2008; 40: 650-5.
- [134] Walter K et al. Pancreatic cancer associated fibroblasts display normal allelotypes. *Cancer Biol Ther* 2008; 7: 882-8.
- [135] Weinberg RA. Coevolution in the tumor microenvironment. *Nat Genet* 2008; 40: 494-5.
- [136] Wallace JA et al. Pten in the breast tumor microenvironment: modeling tumor-stroma coevolution. *Cancer Res* 2011; 71: 1203-7.
- [137] Hill R et al. Selective evolution of stromal mesenchyme with p53 loss in response to epithelial tumorigenesis. *Cell* 2005; 123: 1001-11.
- [138] Lim PK et al. Gap junction-mediated import of microRNA from bone marrow stromal cells can elicit cell cycle quiescence in breast cancer cells. *Cancer Res* 2011; 71: 1550-60.
- [139] Mensing H et al. A study on fibroblast chemotaxis using fibronectin and conditioned medium as chemoattractants. *Eur J Cell Biol* 1983; 29: 268-73.
- [140] Muerkoster S et al. Tumor stroma interactions induce chemoresistance in pancreatic ductal carcinoma cells involving increased secretion and paracrine effects of nitric oxide and interleukin-1beta. *Cancer Res* 2004; 64: 1331-7.
- [141] Crawford Y et al. Tumor and stromal pathways mediating refractoriness/resistance to anti-angiogenic therapies. *Trends Pharmacol Sci* 2009; 30: 624-30.

- [142] Scott AM et al. A phase I dose-escalation study of sibrotuzumab in patients with advanced or metastatic fibroblast activation protein-positive cancer. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 1639-47.
- [143] Mann J et al. Regulation of myofibroblast transdifferentiation by DNA methylation and MeCP2: implications for wound healing and fibrogenesis. *Cell Death Differ* 2007; 14: 275-85.
- [144] Cat B et al. Enhancement of tumor invasion depends on transdifferentiation of skin fibroblasts mediated by reactive oxygen species. *J Cell Sci* 2006; 119: 2727-38.
- [145] Roberts AB et al. Isolation from murine sarcoma cells of novel transforming growth factors potentiated by EGF. *Nature* 1982; 295: 417-9.
- [146] Romanelli RG et al. Effect of pentoxifylline on the degradation of procollagen type I produced by human hepatic stellate cells in response to transforming growth factor-beta 1. *Br J Pharmacol* 1997; 122: 1047-54.
- [147] Kim Y et al. Transcriptional activation of transforming growth factor beta1 and its receptors by the Kruppel-like factor Zf9/core promoter-binding protein and Sp1. Potential mechanisms for autocrine fibrogenesis in response to injury. *J Biol Chem* 1998; 273: 33750-8.
- [148] Hogaboam CM et al. Chronic airway hyperreactivity, goblet cell hyperplasia, and peribronchial fibrosis during allergic airway disease induced by *Aspergillus fumigatus*. *Am J Pathol* 2000; 156: 723-32.
- [149] Abraham DJ et al. Tumor necrosis factor alpha suppresses the induction of connective tissue growth factor by transforming growth factor-beta in normal and scleroderma fibroblasts. *J Biol Chem* 2000; 275: 15220-5.
- [150] Malmstrom J et al. Transforming growth factor-beta 1 specifically induce proteins involved in the myofibroblast contractile apparatus. *Mol Cell Proteomics* 2004; 3: 466-77.
- [151] Roberts AB et al. Transforming growth factor type beta: rapid induction of fibrosis and angiogenesis in vivo and stimulation of collagen formation in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986; 83: 4167-71.
- [152] Kuwahara F et al. Transforming growth factor-beta function blocking prevents myocardial fibrosis and diastolic dysfunction in pressure-overloaded rats. *Circulation* 2002; 106: 130-5.
- [153] Denis M. Neutralization of transforming growth factor-beta 1 in a mouse model of immune-induced lung fibrosis. *Immunology* 1994; 82: 584-90.
- [154] Border WA et al. Suppression of experimental glomerulonephritis by antiserum against transforming growth factor beta 1. *Nature* 1990; 346: 371-4.
- [155] Leask A et al. TGF-beta signaling and the fibrotic response. *FASEB J* 2004; 18: 816-27.
- [156] Massague J. TGFbeta in Cancer. *Cell* 2008; 134: 215-30.
- [157] Leight JL et al. Matrix rigidity regulates a switch between TGF-beta1-induced apoptosis and epithelial-mesenchymal transition. *Mol Biol Cell* 2012; 23: 781-91.
- [158] Sabeh F et al. Protease-dependent versus -independent cancer cell invasion programs: three-dimensional amoeboid movement revisited. *J Cell Biol* 2009; 185: 11-9.
- [159] Hiraoka N et al. Matrix metalloproteinases regulate neovascularization by acting as pericellular fibrinolysins. *Cell* 1998; 95: 365-77.
- [160] Chun TH et al. MT1-MMP-dependent neovessel formation within the confines of the three-dimensional extracellular matrix. *J Cell Biol* 2004; 167: 757-67.
- [161] Sabeh F et al. Tumor cell traffic through the extracellular matrix is controlled by the membrane-anchored collagenase MT1-MMP. *J Cell Biol* 2004; 167: 769-81.
- [162] Filippov S et al. MT1-matrix metalloproteinase directs arterial wall invasion and neointima formation by vascular smooth muscle cells. *J Exp Med* 2005; 202: 663-71.
- [163] Nagano S et al. Cancer cell death enhances the penetration and efficacy of oncolytic herpes simplex virus in tumors. *Cancer Res* 2008; 68: 3795-802.

- [164] Rosel D et al. Up-regulation of Rho/ROCK signaling in sarcoma cells drives invasion and increased generation of protrusive forces. *Mol Cancer Res* 2008; 6: 1410-20.
- [165] Friedl P. Prespecification and plasticity: shifting mechanisms of cell migration. *Curr Opin Cell Biol* 2004; 16: 14-23.
- [166] Yilmaz M et al. Mechanisms of motility in metastasizing cells. *Mol Cancer Res* 2010; 8: 629-42.
- [167] Pani G et al. Redox-based escape mechanism from death: the cancer lesson. *Antioxid Redox Signal* 2009; 11: 2791-806.
- [168] Sahai E et al. Differing modes of tumour cell invasion have distinct requirements for Rho/ROCK signalling and extracellular proteolysis. *Nat Cell Biol* 2003; 5: 711-9.
- [169] Wyckoff JB et al. ROCK- and myosin-dependent matrix deformation enables protease-independent tumor-cell invasion in vivo. *Curr Biol* 2006; 16: 1515-23.
- [170] Amano M et al. Rho-kinase/ROCK: A key regulator of the cytoskeleton and cell polarity. *Cytoskeleton (Hoboken)* 2010; 67: 545-54.
- [171] Carragher NO et al. Calpain 2 and Src dependence distinguishes mesenchymal and amoeboid modes of tumour cell invasion: a link to integrin function. *Oncogene* 2006; 25: 5726-40.
- [172] Friedl P et al. Plasticity of cell migration: a multiscale tuning model. *J Cell Biol* 2010; 188: 11-9.
- [173] Sahai E. Illuminating the metastatic process. *Nat Rev Cancer* 2007; 7: 737-49.
- [174] Pankova K et al. The molecular mechanisms of transition between mesenchymal and amoeboid invasiveness in tumor cells. *Cell Mol Life Sci* 2010; 67: 63-71.
- [175] Brabek J et al. The role of the tissue microenvironment in the regulation of cancer cell motility and invasion. *Cell Commun Signal* 2010; 8: 22.
- [176] Harley BA et al. Microarchitecture of three-dimensional scaffolds influences cell migration behavior via junction interactions. *Biophys J* 2008; 95: 4013-24.
- [177] Giannone G et al. Substrate rigidity and force define form through tyrosine phosphatase and kinase pathways. *Trends Cell Biol* 2006; 16: 213-23.
- [178] Mohl C et al. Becoming stable and strong: the interplay between vinculin exchange dynamics and adhesion strength during adhesion site maturation. *Cell Motil Cytoskeleton* 2009; 66: 350-64.
- [179] Gehler S et al. Filamin A-beta1 integrin complex tunes epithelial cell response to matrix tension. *Mol Biol Cell* 2009; 20: 3224-38.
- [180] Geiger B et al. Transmembrane crosstalk between the extracellular matrix--cytoskeleton crosstalk. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001; 2: 793-805.
- [181] Peyton SR et al. The effects of matrix stiffness and RhoA on the phenotypic plasticity of smooth muscle cells in a 3-D biosynthetic hydrogel system. *Biomaterials* 2008; 29: 2597-607.
- [182] Polyak K et al. Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits. *Nat Rev Cancer* 2009; 9: 265-73.
- [183] Parri M et al. EphA2 reexpression prompts invasion of melanoma cells shifting from mesenchymal to amoeboid-like motility style. *Cancer Res* 2009; 69: 2072-81.
- [184] Taddei ML et al. Kinase-dependent and -independent roles of EphA2 in the regulation of prostate cancer invasion and metastasis. *Am J Pathol* 2009; 174: 1492-503.
- [185] Taddei ML et al. EphA2 induces metastatic growth regulating amoeboid motility and clonogenic potential in prostate carcinoma cells. *Mol Cancer Res* 2011; 9: 149-60.
- [186] Chavrier P et al. A gene encoding a protein with zinc fingers is activated during G0/G1 transition in cultured cells. *EMBO J* 1988; 7: 29-35.
- [187] Lemaire P et al. The serum-inducible mouse gene Krox-24 encodes a sequence-specific transcriptional activator. *Mol Cell Biol* 1990; 10: 3456-67.
- [188] Milbrandt J. A nerve growth factor-induced gene encodes a possible transcriptional regulatory factor. *Science* 1987; 238: 797-9.
- [189] Mages HW et al. Expression of PILOT, a putative transcription factor, requires two signals and is cyclosporin A sensitive in T cells. *Int Immunol* 1993; 5: 63-70.

- [190] Muller HJ et al. Clone pAT 133 identifies a gene that encodes another human member of a class of growth factor-induced genes with almost identical zinc-finger domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88: 10079-83.
- [191] Hallahan DE et al. Protein kinase C mediates x-ray inducibility of nuclear signal transducers EGR1 and JUN. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88: 2156-60.
- [192] Ouellette AJ et al. Expression of two "immediate early" genes, Egr-1 and c-fos, in response to renal ischemia and during compensatory renal hypertrophy in mice. *J Clin Invest* 1990; 85: 766-71.
- [193] Miller JC et al. Rearrangement of side-chains in a Zif268 mutant highlights the complexities of zinc finger-DNA recognition. *J Mol Biol* 2001; 313: 309-15.
- [194] Elrod-Erickson M, et al. High-resolution structures of variant Zif268-DNA complexes: implications for understanding zinc finger-DNA recognition. *Structure* 1998; 6: 451-64.
- [195] Nardelli J et al. Zinc finger-DNA recognition: analysis of base specificity by site-directed mutagenesis. *Nucleic Acids Res* 1992; 20: 4137-44.
- [196] Pavletich NP et al. Zinc finger-DNA recognition: crystal structure of a Zif268-DNA complex at 2.1 Å. *Science* 1991; 252: 809-17.
- [197] Christy B et al. DNA binding site of the growth factor-inducible protein Zif268. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; 86: 8737-41.
- [198] Silverman ES et al. cAMP-response-element-binding-protein-binding protein (CBP) and p300 are transcriptional co-activators of early growth response factor-1 (Egr-1). *Biochem J* 1998; 336 (Pt 1): 183-9.
- [199] Vo N, Goodman RH. CREB-binding protein and p300 in transcriptional regulation. *J Biol Chem* 2001; 276: 13505-8.
- [200] Luciano RL et al. HCF-1 functions as a coactivator for the zinc finger protein Krox20. *J Biol Chem* 2003; 278: 51116-24.
- [201] Dillon RL et al. An EGR2/CITED1 transcription factor complex and the 14-3-3sigma tumor suppressor are involved in regulating ErbB2 expression in a transgenic-mouse model of human breast cancer. *Mol Cell Biol* 2007; 27: 8648-57.
- [202] Swirnoff AH et al. Nab1, a corepressor of NGFI-A (Egr-1), contains an active transcriptional repression domain. *Mol Cell Biol* 1998; 18: 512-24.
- [203] Srinivasan R et al. NAB2 represses transcription by interacting with the CHD4 subunit of the nucleosome remodeling and deacetylase (NuRD) complex. *J Biol Chem* 2006; 281: 15129-37.
- [204] Severson BR et al. A novel activation function for NAB proteins in EGR-dependent transcription of the luteinizing hormone beta gene. *J Biol Chem* 2000; 275: 9749-57.
- [205] Mehta-Grigoriou F et al. Nab proteins mediate a negative feedback loop controlling Krox-20 activity in the developing hindbrain. *Development* 2000; 127: 119-28.
- [206] Chavrier P et al. Structure, chromosome location, and expression of the mouse zinc finger gene Krox-20: multiple gene products and coregulation with the proto-oncogene c-fos. *Mol Cell Biol* 1989; 9: 787-97.
- [207] Christy B et al. Functional serum response elements upstream of the growth factor-inducible gene zif268. *Mol Cell Biol* 1989; 9: 4889-95.
- [208] Zhang T et al. An early growth response protein (Egr) 1 cis-element is required for gonadotropin-releasing hormone-induced mitogen-activated protein kinase phosphatase 2 gene expression. *J Biol Chem* 2001; 276: 45604-13.
- [209] Berasi SP et al. Inhibition of gluconeogenesis through transcriptional activation of EGR1 and DUSP4 by AMP-activated kinase. *J Biol Chem* 2006; 281: 27167-77.
- [210] Lee SL et al. Luteinizing hormone deficiency and female infertility in mice lacking the transcription factor NGFI-A (Egr-1). *Science* 1996; 273: 1219-21.
- [211] Topilko P et al. Multiple pituitary and ovarian defects in Krox-24 (NGFI-A, Egr-1)-targeted mice. *Mol Endocrinol* 1998; 12: 107-22.
- [212] Jones MW et al. A requirement for the immediate early gene Zif268 in the expression of late LTP and long-term memories. *Nat Neurosci* 2001; 4: 289-96.

- [213] O'Donovan KJ et al. The EGR family of transcription-regulatory factors: progress at the interface of molecular and systems neuroscience. *Trends Neurosci* 1999; 22: 167-73.
- [214] Perez-Cadahia B et al. Activation and function of immediate-early genes in the nervous system. *Biochem Cell Biol* 2011; 89: 61-73.
- [215] Chen Z et al. Krox20 stimulates adipogenesis via C/EBPbeta-dependent and -independent mechanisms. *Cell Metab* 2005; 1: 93-106.
- [216] Boyle KB et al. The transcription factors Egr1 and Egr2 have opposing influences on adipocyte differentiation. *Cell Death Differ* 2009; 16: 782-9.
- [217] Bhattacharyya S et al. Egr-1: new conductor for the tissue repair orchestra directs harmony (regeneration) or cacophony (fibrosis). *J Pathol* 2013; 229: 286-97.
- [218] Bhattacharyya S et al. Early growth response transcription factors: key mediators of fibrosis and novel targets for anti-fibrotic therapy. *Matrix Biol* 2011; 30: 235-42.
- [219] Chen SJ et al. The early-immediate gene EGR-1 is induced by transforming growth factor-beta and mediates stimulation of collagen gene expression. *J Biol Chem* 2006; 281: 21183-97.
- [220] Wu M et al. Essential roles for early growth response transcription factor Egr-1 in tissue fibrosis and wound healing. *Am J Pathol* 2009; 175: 1041-55.
- [221] Bhattacharyya S et al. Smad-independent transforming growth factor-beta regulation of early growth response-1 and sustained expression in fibrosis: implications for scleroderma. *Am J Pathol* 2008; 173: 1085-99.
- [222] Bihl MP et al. Progressive pulmonary sarcoidosis--a fibroproliferative process potentially triggered by EGR-1 and IL-6. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis* 2006; 23: 38-50.
- [223] Eid MA et al. Expression of early growth response genes in human prostate cancer. *Cancer Res* 1998; 58: 2461-8.
- [224] Seykora JT et al. Gene expression profiling of melanocytic lesions. *Am J Dermatopathol* 2003; 25: 6-11.
- [225] Wang B et al. A key role for early growth response-1 and nuclear factor-kappaB in mediating and maintaining GRO/CXCR2 proliferative signaling in esophageal cancer. *Mol Cancer Res* 2009; 7: 755-64.
- [226] Redmond KL et al. T-box 2 represses NDRG1 through an EGR1-dependent mechanism to drive the proliferation of breast cancer cells. *Oncogene* 2010; 29: 3252-62.
- [227] Lu D et al. Microsomal prostaglandin E synthase-1 promotes hepatocarcinogenesis through activation of a novel EGR1/beta-catenin signaling axis. *Oncogene* 2012; 31: 842-57.
- [228] Yang SZ et al. Enhanced EGR1 activity promotes the growth of prostate cancer cells in an androgen-depleted environment. *J Cell Biochem* 2006; 97: 1292-9.
- [229] Kobayashi D et al. Overexpression of early growth response-1 as a metastasis-regulatory factor in gastric cancer. *Anticancer Res* 2002; 22: 3963-70.
- [230] Zheng L et al. Abnormal expression of early growth response 1 in gastric cancer: association with tumor invasion, metastasis and heparanase transcription. *Pathol Int* 2010; 60: 268-77.
- [231] Egerod FL et al. High frequency of tumor cells with nuclear Egr-1 protein expression in human bladder cancer is associated with disease progression. *BMC Cancer* 2009; 9: 385.
- [232] Chopra A et al. The use of gene expression analysis to gain insights into signaling mechanisms of metastatic medulloblastoma. *Pediatr Neurosurg* 2003; 39: 68-74.
- [233] Gaggioli C et al. HGF induces fibronectin matrix synthesis in melanoma cells through MAP kinase-dependent signaling pathway and induction of Egr-1. *Oncogene* 2005; 24: 1423-33.
- [234] Recio JA et al. Hepatocyte growth factor/scatter factor induces feedback up-regulation of CD44v6 in melanoma cells through Egr-1. *Cancer Res* 2003; 63: 1576-82.

- [235] Damm S et al. HGF-promoted motility in primary human melanocytes depends on CD44v6 regulated via NF-kappa B, Egr-1, and C/EBP-beta. *J Invest Dermatol* 2010; 130: 1893-903.
- [236] de Mestre AM et al. Early growth response gene 1 (EGR1) regulates heparanase gene transcription in tumor cells. *J Biol Chem* 2005; 280: 35136-47.
- [237] Ogishima T et al. Increased heparanase expression is caused by promoter hypomethylation and up-regulation of transcriptional factor early growth response-1 in human prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 1028-36.
- [238] Krones-Herzig A et al. Early growth response 1 protein, an upstream gatekeeper of the p53 tumor suppressor, controls replicative senescence. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 3233-8.
- [239] Tourtellotte WG et al. Infertility associated with incomplete spermatogenic arrest and oligozoospermia in Egr4-deficient mice. *Development* 1999; 126: 5061-71.



Mgr. Jan Kosla, Ph.D.

je absolventem oboru Molekulární a buněčná biologie, genetika a virologie na Přírodovědecké fakultě Univerzity Karlovy v Praze. Svou doktorskou dizertační práci „Molekulární mechanismy fenotypových přechodů fibroblastických buněk: dediferenciace myofibroblastů a ovlivnění invazivity a metastázování sarkomu“ (školitel RNDr. Michal Dvořák, CSc.) obhájil 5. 9. 2013.

**Rekombinantní vakcíny proti solidním a hematologickým nádorům:
vývoj a stanovení jejich účinnosti**

Katarína Babiarová

Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta, Kateřinská 32, 121 08 Praha 2

Nádorová buňka je charakteristická produkcí nádorových antigenů, čímž se odlišuje od normální somatické buňky a stává se cílem efektorových mechanismů protinádorové imunity. Předložená práce byla zaměřena na vývoj a především studium buněčné imunitní odpovědi rekombinantních vakcín namířených proti několika nádorovým antigenům, specifickým pro hematologické a solidní nádory. Stanovení účinnosti těchto vakcín probíhalo na myším modelu, především pomocí testu ELISPOT-IFN γ . V první části jsem se soustředila na vývoj a stanovení účinnosti genetických a peptidových vakcín proti WT1⁺ nádorům. Jako nejefektivnější se ukázaly peptidové vakcíny aplikované intradermálně (i.d.) tetováním, podávané společně s nemetylovanými CpG motivy a protilátkou neutralizující TGF β v nádoru. Dále jsem sledovala protinádorovou imunitní odpověď na vakcíny nesoucí sekvenci ze spojové oblasti fúzního proteinu BCR-ABL, charakteristického pro chronickou myeloidní leukemii. V laboratoři doc. Forstové byly připraveny vakcíny na bázi parti-

Informační listy GSGM, 2014, 43: 46-56

kulí podobných myšímú polyomaviru (MPyV-VLP), v naší laboratoři jiné typy vakcín (rekombinantní virus vakcinie (rVACV), DNA). Vakcíny nebyly účinné, jelikož protein BCR-ABL není vhodný imunogen, jak se později ukázalo z této i jiných studií. V poslední části dizertační práce se podařilo zvýšit účinnost rVACV vakcín proti nádorům asociovaným s lidským papilomavirem 16 (HPV 16) pomocí koexpresie různých imunomodulátorů (receptor II. typu pro TGF β , Flt3 ligand).

Úvod

Imunoterapie nádorů je založena na rozdílech nádorové buňky a jejího mikroprostředí oproti normálním buňkám zbytku těla, např. přítomnosti nádorových antigenů (TA; tumor antigens). Jedním z jejích úkolů je aktivace TA-specifických efektorových mechanismů. Cílem této práce byl vývoj rekombinantních vakcín proti TA pozitivním nádorům a především studium jimi indukované imunitní odpovědi. Účinnost vakcín byla sledována na myším modelu.

V první části jsem se soustředila na vývoj a stanovení účinnosti genetických a peptidových vakcín proti WT1⁺ hematologickým a solidním nádorům. Genetické vakcíny exprimovaly fragment mezi 94. a 249. aminokyselinou myšního proteinu WT1, který sestával z několika známých epitopů specifických pro cytotoxické T-lymfocyty (CTL; cytotoxic T-lymphocytes). Jako nejefektivnější se ukázaly peptidové vakcíny aplikované i.d. tetováním a podávané společně s protilátkou vychytávající TGF β v nádoru (1). Dalším úkolem mé doktorandské práce bylo studium chronické myeloidní leukémie (CML) a možnosti její terapie. Expresí fúzního proteinu BCR-ABL je charakteristická pro více než 90 % pacientů s CML. Různé studie naznačovaly, že tento protein (především jeho unikátní zlomová oblast) je imunogen vhodný pro indukci protinádorové odpovědi. V našich laboratořích bylo vytvořeno několik typů vakcín exprimujících sekvenci dlouhou 25 aminokyselin ze zlomové oblasti uvedené části proteinu: plasmidové DNA vakcíny (21); vakcíny na bázi rVACV a vakcíny z dendritických buněk (Němečková, nepublikovaná data), či nádorové buněčné vakcíny (29-31). V laboratoři doc. Forstové byly zkonstruovány také vakcíny na bázi MPyV-VLP, ve kterých jsem nedetekovala žádnou BCR-ABL-specifickou buněčnou protinádorovou odpověď. Ukázalo se, že nejsou účinné ani v terapii myších nádorů (16). Později se zjistilo, že protein BCR-ABL není vhodný imunogen.

Už několik let se v naší laboratoři věnuje pozornost přípravě rVACV vakcín proti nádorům asociovaným s lidským papilomavirem 16 (HPV 16), v poslední době především zvýšení jejich protinádorové účinnosti ko-expresí různých imunomodulátorů (receptoru II. typu pro TGF β , Flt3 ligand) (42,43). Náplní mé části práce bylo studium protinádorové imunity indukované těmito rVACV.

Cíle práce

Vývoj rekombinantních vakcín proti nádorovým antigenům specifickým pro hematologické a solidní nádory:

- 1) Vývoj vakcíny proti nádorům exprimujícím WT1 a studium efektorových mechanismů protinádorové imunitní odpovědi.
- 2) Studium imunitní odpovědi proti nádorovému antigenu BCR-ABL po imunizaci vakcínami na bázi partikulí podobných myšímú polyomaviru.
- 3) Studium buněčné imunitní odpovědi vyvolané imunizací vakcínami rekombinantního viru vakcinie proti nádorům asociovaným s lidským papilomavirem 16, u kterých

byla jejich protinádorová účinnost zvýšená ko-expresí imunomodulátorů (receptoru II. typu pro TGF β ; Flt3 ligand).

Materiál a metody

V této dizertační práci byly metodami genového inženýrství zkonstruovány různé typy protinádorových vakcín. V první části jsme připravili DNA vakcíny nebo rVACV, které nesly fúzní gen GUS-WT1 (GUS = pomocný gen pro β -glukuronidázu z bakterie *E. coli*; WT1 = fragment myšního proteinu WT1 o velikosti 155 aminokyselin, mezi 94. a 249. aminokyselinou) nebo nechali nasyntetizovat různé peptidové vakcíny odvozené od proteinu WT1. V další části práce byly v laboratoři doc. Forstové připraveny chimerické BCR-ABL VLP, tj. MPyV-VLP, které nesly fragment, o velikosti 177 aminokyselin, ze spojové oblasti fúzního proteinu BCR-ABL. Poslední námi zkonstruované rVACV vakcíny exprimovaly účinný, vysoce imunogenní nádorový onkoprotein HPV16-E7 v rekombinantní formě SigE7LAMP (Sig = signální sekvence membránového proteinu asociovaného s lyzozomem 1 (LAMP1); E7 = virový onkoprotein HPV16-E7; LAMP = transmembránová a intracelulární doména LAMP1) společně s následujícími imunomodulátory: extracelulární část receptoru II. typu pro TGF β (TGF β RII), resp. jeho upravenou variantu fúzovanou s Fc fragmentem IgG (TGF β RII-Fc) nebo Flt3 ligand (Flt3L).

Pro stanovení účinnosti těchto vakcín byly v této práci používány myší modely Balb/c (vakcíny pro terapii CML, resp. BCR-ABL+ nádory) a C57Bl/6 (vakcíny pro terapii WT1+ anebo HPV16-E7+ nádorů). Ve všech experimentech byly myši imunizovány jednotlivými vakcínami nebo jejich kombinacemi (viz níže popsané imunizační schéma). Ve většině experimentů byly 12 dní po poslední imunizaci myším odebrány sleziny. Izolované splenocyty se používaly jako výchozí materiál pro testování protinádorové buněčné imunity *in vitro*, indukované vakcínami. Na stanovení funkčnosti T-lymfocytů indukovaných danou vakcínou jsme využívali převážně test ELISPOT-IFN γ (CTL, Th-1 odpověď). Tato metoda byla prováděna ihned po izolaci splenocytů (*ex vivo*, tj. 20 hod inkubace *in vitro*) nebo po šestidenní kultivaci *in vitro* s daným stimulantem. Jako stimulanty byly použity převážně epitopy odvozené z daného TA.

Při sledování imunologického účinku vakcín namířených proti HPV16-E7 byl test ELISPOT-IFN γ doprovázen detekcí HPV16-E7-specifických CTL pomocí průtokové cytometrie, kde jsme měřili buňky pozitivní na marker CD8 a na fluorescenčně značený (R-phycoerythrin) tetramer H-2Db/E749-57 (Pelimer, Sanquin, NL). V některých experimentech jsme průtokovou cytometrií sledovali také imunosupresivní faktory, především populaci Treg prostřednictvím fluorescenčně značených protilátek proti markerům CD4, CD25, FoxP3, a to hlavně v čerstvě izolovaných buňkách lymfatických uzlin z imunizovaných myší.

Účinnost připravených protinádorových vakcín se sledovala také *in vivo* na myším modelu na základě pozorování zpomalení růstu, resp. ústupu nádorů. Většina experimentů byla zaměřena na sledování imunoterapeutického efektu dané vakcíny. Nejdříve byly myším subkutánně (s.c.) aplikovány modelové nádorové buněčné linie (WT1⁺ linie TRAMP-C2 odvozena z nádoru prostaty myší C57Bl/6; BCR-ABL+ leukemická myší buněčná linie 12B1 odvozená z myší Balb/c; HPV16-E7+ linie TC-1 odvozena z plicního epitelu myší kmene C57Bl/6). Den poté myši obdržely danou vakcínu. DNA vakcíny byly podávány intradermálně (i.d.) pomocí genové pistole, rVACV intraperitoneálně (i.p.), MPyV-VLP i.p. anebo intranazálně (i.n.) a peptidy nejdříve s.c., později i.d. tetováním. Následně byla v časových intervalech měřena

velikost nádorů. V některých experimentech jsme sledovali potenciál připravených vakcín v preventivním schématu imunizace. V tomto případě byla myším nejdřív podána daná vakcína, o dva týdny později daná modelová nádorová buněčná linie.

Výsledky

Předkládaná dizertační práce byla zaměřena na vývoj a především stanovení účinnosti rekombinantních vakcín proti následujícím nádorovým antigenům: (a) WT1, autologní protein, jehož zvýšená exprese anebo mutovaná forma je typická pro různé solidní a hematologické nádory; (b) fuzní protein BCR-ABL, charakteristický pro hematologické onkologické onemocnění CML; (c) virový onkoprotein HPV16-E7, jehož působení (ve spolupráci s HPV16-E6) vede k vzniku cervikálního karcinomu po perzistentní infekci rizikovým typem papilomaviru. Byly připraveny různé typy vakcín: genetické (DNA, rVACV), VLP a peptidové.

V první části jsme připravili několik typů vakcín exprimujících fúzní protein GUS-WT1 (DNA, rVACV a peptidové vakcíny). Peptidy WT122-140 a WT126-134, podávané i.d. tetováním společně s nemetylovanými CpG oligonukleotidy (CpG ODN), vyvolávaly signifikantně vyšší IFN γ WT1-specifickou T-buněčnou imunitní odpověď než ty samé vakcíny podávané s.c. společně s CpG ODN v kombinaci s nekompletním Freundovým adjuvans (IFA) nebo než imunizace jinými typy vakcín. V terapii myších TRAMP-C2 nádorů se ukázaly peptidy WT122-140 a WT126-134 nejúčinnější ze všech připravených vakcín pouze tehdy, když byl pomocí monoklonální protilátky (mAb) neutralizován TGF β , jež buňky TRAMP-C2 produkují v hojné míře. Jiné ovlivnění, jako odstranění Treg, deregulace exprese pomocí 5-azacytidinu nebo zvýšení molekul MHC I. třídy pomocí poly I:C protinádorový efekt imunizace proti WT1 nezvýšilo. Při srovnání s genetickými vakcínami (DNA, rVACV) mělo tetování peptidovými vakcínami největší inhibiční účinek na růst TRAMP-C2 nádorů.

Dalším úkolem mé dizertační práce bylo studium imunitní odpovědi proti nádorovému antigenu BCR-ABL po imunizaci vakcínami na bázi MPyV-VLP. V laboratoři Doc. Forstové byly zkonstruovány chimerické virové partikule BCR-ABL VLP, sestávající ze sekvence o velikosti 171 aminokyselin ze zlomové oblasti BCR-ABL, vložené do MPyV-VLP. Nezjistila jsem žádnou aktivitu BCR-ABL-specifických CTL, ani přítomnost IFN γ pozitivní BCR-ABL specifické T-buněčné imunitní odpovědi. Detekce IgG a IgM protilátek specifických proti BCR-ABL vedla též k negativním výsledkům. Pozorování potvrzují, že zlomová oblast fúzního proteinu BCR-ABL je hodně slabým imunogenem.

Poslední část této práce byla zaměřena na studium buněčné imunitní odpovědi vyvolané imunizací vakcínami rVACV proti nádorům asociovaným s lidským papilomavirem 16, u kterých byla jejich protinádorová účinnost zvýšená ko-expresí imunomodulátorů (TGF β RII); Flt3L). Zkonstruovali jsme rVACV vakcíny exprimující SigE7LAMP s ko-expresí solubilní formy TGF β RII nebo TGF β RII-Fc nebo s ko-expresí Flt3L. Koexprese těchto imunomodulátorů byla řízená pod časným H5 nebo syntetickým časně/pozdním E/L promotorem rVACV.

Expese TGF β RII a TGF β RII-Fc neovlivnila množení rVACV *in vitro*, ani *in vivo*. Rozdíly ve vyvolání HPV16-E7 specifické IFN γ pozitivní T-buněčné imunitní odpovědi mezi dvojitými rVACV a rVACV exprimujícími jenom SigE7LAMP byly minimální. Zjistila jsem zvýšenou buněčnou imunitu specifickou pro VACV-E3 po imunizaci dvojitými rekombinantami rVACV. Produkce TGF β RII pod kontrolou H5

promotoru VACV významně zvýšila účinnost rVACV vakcíny při terapii TC-1 nádorů u myši.

Testování produkce Flt3L *in vitro* ukázalo vyšší produkci Flt3L pod kontrolou promotoru E/L než pod H5, *in vivo* naopak vyšší expresi Flt3L pod kontrolou H5 než pod E/L. Množení těchto virů *in vitro* a *in vivo* nebylo ovlivněné produkcí Flt3L. V některých intervalech po imunizaci ukázala detekce buněčné imunitní odpovědi zvýšené množství IFN γ + T-lymfocytů specifických pro HPV16-E7 u dvojité rekombinanty rVACV s expresí Flt3L pod H5 promotorem rVACV. Pozitivní efekt protinádorové imunity vyvolané touto rekombinantou rVACV se projevil jak v terapii, tak v protekci myši proti HPV16-E6 a HPV16-E7 pozitivních nádorových buněk TC-1. Zvýšená exprese Flt3L pod H5 vedla k inhibici expanze CD11b+Gr-1+ MDSC a k nárůstu CD11b+CD11c+ DC ve slezinách imunizovaných myši.

Diskuse

Cílem této práce bylo především studium buněčné imunitní odpovědi rekombinantních vakcín namířených proti několika nádorovým antigenům, specifickým pro hematologické a solidní nádory. Účinnost připravených vakcín se sledovala *in vivo* na myším modelu na základě dvou hlavních kritérií. Prvním bylo pozorování zpomalení růstu, resp. ústupu nádorů. Druhým, a zároveň mým hlavním úkolem, byla detekce protinádorové imunity, kterou tyto vakcíny vyvolávají.

Na sledování funkčnosti T-lymfocytů indukovaných některou z připravených vakcín jsem využívala převážně test ELISPOT-IFN γ . I když je sekrece IFN γ typická i pro jiné složky imunity (např. NK-buňky), jeho nejvyšší hladiny jsou produkovány aktivovanými T-lymfocyty (35). Jelikož nestimulované T-lymfocyty produkují nepatrné množství cytokinů, je potřebná jejich stimulace *in vitro* s vybranými peptidy (33). Jako stimulační peptidy jsem používala převážně CTL epitopy, specifické pro MHC molekuly I. třídy. Vzhledem na extrémní citlivost množících se CTL na koncentraci peptidu v kultivačním mediu a na jejich různou afinitu k H2-Db, jsem nejdříve musela vybrat vhodný peptid-epitop a stanovit jeho optimální koncentraci pro experimenty *in vitro*. CTL epitopy byly vybrány na základě literatury a predikce použitím algoritmů RANKPEP a SYFPEITHI. Detekce HPV16-E7-specifické T-buněčné imunitní odpovědi byla v naší laboratoři už zavedená (H-2Db peptid HPV16-E749-57, tj. RAHYNIVTF) (23). Optimalizovala a zaváděla jsem test ELISPOT-IFN pro stanovení WT1-specifické T-buněčné imunity a VACV-specifické imunity.

Nejdřív jsem otestovala odpověď proti CTL epitopům z proteinu WT1, predikovaným z literatury a dle výše popsaného algoritmu. Myši byly imunizovány s.c. syntetickými nonapeptidy (odvozené od té části myšního proteinu WT1, kterou exprimují zkonstruované genetické vakcíny, tj. WT1126-135, WT1136-144, WT1130-138, WT1225-233, WT1235-243) v kombinaci s IFA ve směsi s CpG ODN pro nespecifickou stimulaci imunity. Zjistila jsem, že nejimunogennější je peptid WT1126-135, který jsem pak používala ve všech experimentech pro testování WT1-specifické imunitní odpovědi imunizovaných myši.

Pro optimalizaci metody ELISPOT-IFN γ na stanovení VACV-specifické T-buněčné imunitní odpovědi byl nejdřív vybrán (použitím výše popsaného algoritmu) peptid VACV-E3140-148 (VGPSNSPTF). Byl popsán jako H2-Dd afinitní, mezi poxviry vysoce konzervovaný epitop, vhodný pro detekci VACV-specifických CTL u Balb/c myši (39). V naší laboratoři byla nalezena vhodnost tohoto peptidu pro detekci odpovědi C57Bl/6 myši, kde se peptid váže na molekulu H-2Db. Myši C57Bl/6 byly imunizovány virem rVACV s expresí GUS (1). Zjistila jsem, že splenocyty z těchto myši

vykazovaly vysoké množství VACV-E3140-144 specifických IFN γ + spotů, zatímco kontrolní skupina myši (po aplikaci PBS) byla negativní. Podobně negativní výsledky jsem získala po stimulaci splenocytů z těchto myši s kontrolním, irelevantním peptidem HPV16-E749-57.

Vývoj vakcíny proti nádorům exprimujícím WT1 a studium efektorových mechanismů protinádorové imunitní odpovědi

Dnes úspěšně aplikované peptidové vakcíny pro terapii WT1⁺ nádorů jsou omezeny na léčbu pacientů s konkrétními HLA molekulami, kterými jsou tyto epitopy prezentovány. Proto byly v naší laboratoři připraveny DNA a rVACV vakcíny, které měly být použitelné na léčbu u všech pacientů, bez ohledu na typ HLA. Zkonstruované genetické vakcíny expimovaly fúzní gen GUS-WT1. GUS udílí fúzovaným antigenům větší imunogennost. Daný fragment myšního proteinu WT1 byl vybrán hlavně proto, že obsahuje vícero CTL epitopů specifických pro H-2Db myši molekuly: WT1126-135 (RMFPNAPYL), WT1136-144 (SCLESQPTI) a WT1235-243(CMTWNQMNL) (14,27) a má vysokou homologii (96% aminokyselinové sekvence) s molekulou lidského proteinu WT1 (5,12).

DNA a rVACV vakcíny nebyly dostatečně imunogenní, což může souviset se strukturou fúzního genu. Zdá se, že GUS je vhodnější pro imunizaci proti virovým proteinům, ale ne proti autolognímu proteinu WT1. Do studie byly proto zahrnuty i peptidové vakcíny odvozené od myšního proteinu WT1, u kterých byla předpovězena nebo popsána funkce epitopu specifického pro MHC molekuly I. a/nebo II. třídy (WT1126-135, WT1122-140, WT1122-144).

Dodnes bylo uskutečněno několik experimentálních a klinických studií, které prokázaly účinnost peptidových vakcín, odvozených od proteinu WT1, aplikovaných s.c. anebo i.d. V této práci jsme zavedli nový způsob i.d. podání WT1 peptidů, tetování. V naší laboratoři bylo úspěšně použito už pro imunizaci onkoproteiny HPV16-E6 a HPV16-E7, kdy se ukázalo, že efektivnost peptidových vakcín výrazně ovlivňuje způsob aplikace (32). Zjistila jsem, že i.d. podání peptidů tetováním v kombinaci s CpG ODN vyvolává signifikantně vyšší WT1-specifickou IFN γ + T-buněčnou imunitní odpověď než s.c. podání těch samých peptidů v kombinaci s IFA+CpG ODN. Dále jsem pozorovala, že delší peptidy WT1122-140 a WT1122-144 jsou imunogennější než nonapeptid WT1126-135. Tento výsledek je v souladu s pozorováním v laboratoři RNDr. Reiniše, kde zkoušeli účinnost peptidových vakcín proti tumoru exprimujícímu onkoproteiny HPV16-E6 a HPV16-E7 s deficiencí MHC molekul I. třídy (36). Delší peptid WT1122-140 indukoval WT1-specifickou IFN γ + T-buněčnou imunitní odpověď jenom proti peptidu, kterým byla myš imunizována, avšak ne proti CTL specifickým pro epitop WT1126-135 (jenž je jeho součástí). Příčinou může být nedostatečné zpracování WT1 proteinu v APC.

Buněčná linie TRAMP-C2 je typická sníženou expresí MHC molekul I. třídy na svém povrchu (19), co může být způsobeno epigenetickými mechanismy. Bylo prokázáno, že inkubace nádorových buněk s inhibitory deacetyláz histonů (jako 5-azacytidin (5-azaC) nebo poly I:C) vede ke zvýšené expresi MHC molekul I. třídy na povrchu těchto nádorových buněk, především prostřednictvím stimulace produkce IFN γ (9,13,24,26). I v této dizertační práci se potvrdilo, že inkubace TRAMP-C2 s IFN γ , 5-aza-C nebo poly I:C zvyšuje expresi těchto molekul na povrchu TRAMP-C2, avšak vliv těchto látek na imunizační efekt zkonstruovaných vakcín nebyl prokázán. Ověřovali jsme také, zda přítomnost Treg v nádoru (jako inhibitoru protinádorové imunity) může potlačit imunogennost zkonstruovaných vakcín. Aplikace mAb anti-CD25 myším sice vedla k polovičnímu snížení Treg i 50. den po jejím podání, avšak

kýžený efekt na vakcínami vyvolanou imunitu i na růst TRAMP-C2 nádoru nebyl pozorován.

Důležitou roli v diferenciaci a indukci Treg v tumoru sehraává TGF β , jehož efekt je možné blokovat pomocí protilátek (6,20,25). Nádorová linie buněk TRAMP-C2 produkuje TGF β v hojně míře. I když neutralizace TGF β nijak neovlivnila imunitní odpověď indukovanou peptidovými vakcínami po i.d. aplikaci tetováním, růst nádorů TRAMP-C2 byl v přítomnosti mAb anti-TGF β signifikantně zpomalen. Imunizace peptidy toto zpomalení ještě prohloubila. Zdá se, že hlavním cílem imunosupresivního působení TGF β v TRAMP-C2 nádorech nejsou Treg, ale jiný, zatím neznámý mechanismus, který vede k inhibici efektu protinádorové imunity indukované peptidovými vakcínami.

Studium imunitní odpovědi proti nádorovému antigenu BCR-ABL po imunizaci vakcínami na bázi MPyV-VLP

Mnohé studie poukázaly na to, že unikátní zlomová oblast BCR-ABL (fúzní protein typický pro CML) může být vhodným imunogenem pro indukci protinádorové imunity (2,7,41). Všechny zkonstruované vakcíny (chimerické BCR-ABL VLP, zkonstruované v laboratoři Doc. Forstové; různé DNA a rVACV vakcíny, exprimující část BCR-ABL, připravené v naší laboratoři) selhaly v protekci Balb/c myši nebo v terapii jejich nádorů způsobených podáním nádorové buněčné linie 12B1. Taktéž jsem nedetekovala žádnou IFN γ +, ani IL-2+ BCR-ABL specifickou protinádorovou imunitní odpověď ve splenocytech myši imunizovaných jednotlivými vakcínami. Ze všech těchto pozorování je možné usoudit, že zlomová oblast BCR-ABL není vhodný imunogen, jelikož nevyvolává indukci BCR-ABL specifických CTL, ani B-buněk zodpovědných za tvorbu protilátek anti-BCR-ABL. Tyto výsledky jsou v souladu i s pozorováními jiných skupin (40). Objevila se studie, která vedla k indukci CTL prostřednictvím DC transfekovaných BCR-ABL mRNA (z buněk K562 nebo CML blastů). Vzniklé CTL však nebyly schopny rozeznávat epitopy odvozené z fúzního proteinu BCR-ABL (15). V jiné studii se zjistilo, že imatinibem navozená inhibice tyrozin-kinázové aktivity BCR-ABL proteinu způsobuje úbytek exprese TA (včetně WT1, Bcl-2), což vede k poklesu CML-specifických CTL (3).

Dle nové hypotézy, nikoli protein BCR-ABL jako takový, ale právě jeho biologická aktivita může mít vliv na expresi jiných genů kódujících potenciální TA, a tím na indukci CTL namířených proti leukemickým buňkám CML (15,37).

Studium buněčné imunitní odpovědi vyvolané imunizací rVACV proti nádorům asociovaným s HPV 16, u kterých byla jejich protinádorová účinnost zvýšena ko-expresí imunomodulátorů (TGF β RII; Flt3L)

Účinnost protinádorové rVACV vakcíny lze zvýšit, když jsou různé imunomodulátory (cytokiny, chemokiny, růstové faktory, kostimulační molekuly) exprimovány tím samým rVACV vektorem jako TA, např. GM-CSF (17), CD40L (10) apod. Záměrem této části práce bylo zvýšení terapeutického potenciálu rVACV vakcíny s expresí SigE7LAMP simultánní ko-expresí inhibitorů TGF β . Díky blokaci tohoto cytokinu může dojít k aktivaci dostatečně silné protinádorové HPV16-E7 specifické imunitní odpovědi a k efektivnější terapii nádorů TC-1. Dřívější studie ukázala, že TA-specifickou imunitní odpověď je možné zvýšit aplikací DNA vakcíny s inkorporovaným genem pro solubilní formu TGF β RII (18). Inhibice TGF β pomocí tohoto receptoru vedla ke zvýšení CD8+ CTL ve slezinách myši a jejich nádorech, účinných proti malignímu mezoteliomu (38).

Jelikož jsem u dvojité rekombinanty rVACV, exprimující solubilní TGF β RII pod H5 promotorem, nezjistila zvýšené množství T-lymfocytů specifických pro TA HPV16-E7 a růst nádorů TC-1 byl zpomalen, hledali jsme jiné vysvětlení. Naše hypotéza vychází ze zjištění, že tato rekombinanta produkuje kromě solubilní formy TGF β RII i větší množství méně glykozylované formy TGF β RII. Ta může být vylučována z buňky odlišnými mechanismy než klasický TGF β RII, např. exozomy. Protože mohou fúzovat s membránami sousedících buněk, napomáhají transportu různých proteinů mezi buňkami. Tímto způsobem by mohl být do CTL anebo NK-buněk doručen TGF β navázaný na membránový receptor a snižovat jejich aktivitu (8).

Další možností pro zvýšení imunogenicity rVACV vakcíny je vložení genu pro solubilní faktor, který přímo aktivuje APC, což vede k lepší stimulaci rVACV vakcínou indukované protinádorové imunity. Tuto funkci splňuje růstový faktor Flt3L, který indukuje expanzi plasmacytoidních DC *in vitro*, a též je znám svými adjuvantními vlastnostmi a protinádorovou aktivitou *in vivo*. Extracelulární doména Flt3L a účinky tohoto cytokinu jsou u člověka a myši zaměnitelné, proto jsme zkonstruovali rVACV, které exprimovaly kromě SigE7LAMP i lidský Flt3L.

Zjistili jsme, že koexprese Flt3L vede ke zvýšenému výskytu HPV16-E7-specifické i VACV-E3 specifické imunitní odpovědi v porovnání s rVACV exprimující pouze SigE7LAMP. Pozitivní efekt protinádorové imunity vyvolané touto dvojitou rekombinantou rVACV se projevil jak v terapii, tak protekci myši proti HPV16-E6 a HPV16-E7 pozitivním nádorovým buňkám TC-1. Léčba vedla k regresi nádorů menších než 4 mm², ale neovlivnila růst větších nádorů.

Aplikace Flt3L myším vede k expanzi DC, a tím k zvýšené frekvenci NK-buněk a B- a T-lymfocytů (11,22,34). Na druhou stranu, rVACV jsou známé indukci imunosuprese adaptivní imunitní odpovědi, která je zprostředkována MDSC v nádoru (napomáhající úniku nádoru před imunitou) (4). Ukázalo se, že nejúčinnější vakcína v našem modelu inhibuje expanzi CD11b⁺ Gr-1⁺ MDSC a zvyšuje hladinu CD11b⁺ CD11c⁺ DC ve slezině myši imunizovaných touto vakcínou. Taktéž se ví, že na výše popsanou expanzi DC a přepnutí na Th1 typ imunitní odpovědi je třeba opakovaně podávat Flt3L, nejlépe v průběhu 10 dnů (28). Stejněho efektu, jak se ukázalo v této práci, je schopna jedna dávka rVACV ko-exprimujícího tento cytokin. Ovšem pod podmínkou, že kmen VACV, který se použije na konstrukci takového typu vakcíny, musí být schopný replikace uvnitř savčích buněk. Pokud byly myši imunizovány dvojitou rekombinantou rVACV kmene MVA, který se v savčích buňkách nereplikuje, exprese Flt3L byla krátkodobá. Ačkoli jsme detekovali vyšší imunitní odpověď, omezená koncentrace uvedeného cytokinu nevedla k dostatečnému protinádorovému efektu.

Závěry

V této práci jsme zkonstruovali a především na myším modelu stanovili účinnost rekombinantních vakcín proti několika nádorovým antigenům, specifickým pro hematologické a solidní nádory. Proti nádorům pozitivním na autologní protein WT1 byly zkonstruovány DNA vakcíny a vakcíny na bázi rVACV, které exprimovaly sekvenci myšího proteinu WT1 (mezi 94. a 249. aminokyselinou). Peptidové vakcíny byly odvozeny z té samé části uvedeného proteinu. Našli jsme vhodný biologický model pro stanovení vlivu připravených vakcín na růst nádorů, tj. WT1⁺ buněčnou linii TRAMP-C2, charakteristickou vysokou produkcí imunosupresivního TGF. Zavedli jsme a optimalizovali test ELISPOT-IFN pro detekci vakcínami vyvolané WT1-specifické, jako i rVACV vakcínami vyvolané VACV-E3 specifické T-buněčné imunitní

odpovědi. Protinádorový efekt připravených vakcín se podařilo zvýšit jenom neutralizací TGF. Jiné ovlivnění nebylo účinné (zvýšení molekul MHC I. třídy pomocí poly I:C nebo demetylace těchto genů pomocí 5-azacytidinu, či odstranění Treg). V přítomnosti protilátky proti TGF se jako nejúčinnější ukázaly peptidy aplikované i.d. tetováním, jak v terapii nádorů TRAMP-C2, tak v indukci IFN γ + protinádorové odpovědi namířené proti WT1.

V laboratoři doc. Forstové byly připraveny vakcíny na bázi partikulí podobných myšímú polyomaviru, které nesly fragment o velikosti 177 aminokyselin ze spojové oblasti fúzního proteinu BCR-ABL. V naší laboratoři byly zkonstruovány i jiné typy vakcín (rVACV, DNA) s expresí peptidu dlouhého 25 aminokyselin z té samé oblasti proteinu charakteristického pro CML. Ani jedna z těchto vakcín neindukovala BCR-ABL-specifickou T-buněčnou imunitní odpověď, ani nebyla účinná v terapii myších leukemických nádorů. Ukázalo se, že protein BCR-ABL není vhodný imunogen.

Proti nádorům asociovaným s HPV16 byly zkonstruovány rVACV vakcíny s expresí SigE7LAMP, tj. imunogenní formy onkoproteinu HPV16-E7, jejichž činnost se podařilo zvýšit ko-expresí TGF β RII či Flt3L. Všechny dvojité rekombinanty vyvolaly imunitu, která vedla k redukci myších nádorů TC-1, pozitivních na HPV16-E6 a HPV16-E7. Koexprese Flt3L snižovala expanzi imunosupresivních MDSC, zvyšovala množství DC a měla pozitivní vliv na indukci funkční HPV16-E7-specifické protinádorové imunity. Ačkoli produkce TGF β RII nezvýšila buněčnou imunitu namířenou proti HPV16-E7, vedla ke zvýšení protinádorové imunity jako takové, v důsledku neutralizace imunosupresivního vlivu TGF β v nádorovém mikroprostředí.

Literatura

1. Babiarova K., Kutinova L., Zurkova K., Krystofova J., Brabcova E. et al. (2012). Immunization with WT1-derived peptides by tattooing inhibits the growth of TRAMP-C2 prostate tumor in mice. *J.Immunother.* 35:478-487.
2. Bocchia M., Korontsvit T., Xu Q., Mackinnon S., Yang S.Y. et al. (1996). Specific human cellular immunity to bcr-abl oncogene-derived peptides. *Blood.* 87:3587-3592.
3. Brauer K.M., Werth D., von Bringmann S.K., Kanz L., Grunebach F. et al. (2007). BCR-ABL activity is critical for the immunogenicity of chronic myelogenous leukemia cells. *Cancer Res.* 67:5489-5497.
4. Bronte V., Wang M., Overwijk W.W., Surman D.R., Pericle F. et al. (1998). Apoptotic death of CD8+ T lymphocytes after immunization: induction of a suppressive population of Mac-1+/Gr-1+ cells. *J.Immunol.* 161:5313-5320.
5. Buckler A.J., Pelletier J., Haber D.A., Glaser T., Housman D.E. (1991). Isolation, characterization, and expression of the murine Wilms' tumor gene (WT1) during kidney development. *Mol.Cell Biol.* 11:1707-1712.
6. Chen W., Jin W., Hardegen N., Lei K.J., Li L., Marinos N. et al. (2003). Conversion of peripheral CD4+ CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J.Exp.Med.* 198:1875-1886.
7. Chen W., Peace D.J., Rovira, D.K., You S.G., Cheever M.A. (1992). T-cell immunity to the joining region of p210BCR-ABL protein. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 89:1468-1472.
8. Clayton A., Mitchell J.P., Court J., Mason M.D., Tabi Z. (2007). Human tumor-derived exosomes selectively impair lymphocyte responses to interleukin-2. *Cancer Res.* 67:7458-7466.
9. Coral S., Sigalotti L., Gasparollo A., Cattarossi I., Visintin A. et al. (1999). Prolonged upregulation of the expression of HLA class I antigens and costimulatory molecules on melanoma cells treated with 5-aza-2'-deoxycytidine (5-AZA-CdR). *J.Immunother.* 22:16-24.
10. Feder-Mengus C., Schultz-Thater E., Oertli D., Marti W.R., Heberer M. et al. (2005). Nonreplicating recombinant vaccinia virus expressing CD40 ligand enhances APC capacity to stimulate specific CD4+ and CD8+ T cell responses. *Hum.Gene Ther.* 16:348-360.

11. Fernandez N.C., Lozier A., Flament C., Ricciardi-Castagnoli P., Bellet D. et al. (1999). Dendritic cells directly trigger NK cell functions: cross-talk relevant in innate anti-tumor immune responses in vivo. *Nat.Med.* 5:405-411.
12. Fraizer G.C., Patmasiriwat P., Zhang X., Saunders G.F. (1995). Expression of the tumor suppressor gene WT1 in both human and mouse bone marrow. *Blood* 86:4704-4706.
13. Friboulet L., Gourzones C., Tsao S.W., Morel Y., Paturel C. et al. (2010). Poly(I:C) induces intense expression of c-IAP2 and cooperates with an IAP inhibitor in induction of apoptosis in cancer cells. *BMC Cancer* 10:327.
14. Gaiger A., Reese V., Disis M.L., Cheever M.A. (2000). Immunity to WT1 in the animal model and in patients with acute myeloid leukemia. *Blood* 96:1480-1489.
15. Grunebach F., Mirakaj V., Muller M.R., Brummendorf T., Brossart P. (2006). BCR-ABL is not an immunodominant antigen in chronic myelogenous leukemia. *Cancer Res.* 66:5892-5900.
16. Hruskova V., Moravkova A., Babiarova K., Ludvikova V., Fric J. et al. (2009). Bcr-Abl fusion sequences do not induce immune responses in mice when administered in mouse polyomavirus based virus-like particles. *Int.J.Oncol.* 35:1247-1256.
17. Kim J.H., Oh J.Y., Park B.H., Lee D.E., Kim J.S. et al. (2006). Systemic armed oncolytic and immunologic therapy for cancer with JX-594, a targeted poxvirus expressing GM-CSF. *Mol.Ther.* 14:361-370.
18. Kontani K., Kajino K., Huangi C.L., Fujino S., Taguchi O. et al. (2006). Spontaneous elicitation of potent antitumor immunity and eradication of established tumors by administration of DNA encoding soluble transforming growth factor-beta II receptor without active antigen-sensitization. *Cancer Immunol.Immunother.* 55:579-587.
19. Kwon E.D., Hurwitz A.A., Foster B.A., Madias C., Feldhaus A.L. et al. (1997). Manipulation of T cell costimulatory and inhibitory signals for immunotherapy of prostate cancer. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 94:8099-8103.
20. Li M.O., Sanjabi S., Flavell R.A. (2006). Transforming growth factor-beta controls development, homeostasis, and tolerance of T cells by regulatory T cell-dependent and -independent mechanisms. *Immunity* 25:455-471.
21. Lucansky V., Sobotkova E., Tachezy R., Duskova M., Vonka V. (2009). DNA vaccination against bcr-abl-positive cells in mice. *Int.J.Oncol.* 35:941-951
22. Lynch D.H., Andreasen A., Maraskovsky E., Whitmore J., Miller R.E. et al. (1997). Flt3 ligand induces tumor regression and antitumor immune responses in vivo. *Nat.Med.* 3:625-631.
23. Mackova J., Kutinova L., Hainz P., Krystofova J., Sroller V. et al. (2004). Adjuvant effect of dendritic cells transduced with recombinant vaccinia virus expressing HPV16-E7 is inhibited by co-expression of IL12. *Int.J.Oncol.* 24:1581-1588.
24. Manning J., Indrova M., Lubyova B., Pribylova H., Bieblova J. et al. (2008). Induction of MHC class I molecule cell surface expression and epigenetic activation of antigen-processing machinery components in a murine model for human papilloma virus 16-associated tumours. *Immunology* 123:218-227.
25. Marie J.C., Liggitt D., Rudensky A.Y. (2006). Cellular mechanisms of fatal early-onset autoimmunity in mice with the T cell-specific targeting of transforming growth factor-beta receptor. *Immunity* 25:441-454.
26. Martini M., Testi M.G., Pasetto M., Picchio M.C., Innamorati G., et al. (2010). IFN-gamma-mediated upmodulation of MHC class I expression activates tumor-specific immune response in a mouse model of prostate cancer. *Vaccine* 28:3548-3557.
27. Oka Y., Udaka K., Tsuboi A., Elisseeva O.A., Ogawa, H. et al. (2000). Cancer immunotherapy targeting Wilms' tumor gene WT1 product. *J.Immunol.* 164:1873-1880.
28. Parajuli P., Mosley R.L., Pisarev V., Chavez J., Ulrich A. et al. (2001). Flt3 ligand and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor preferentially expand and stimulate different dendritic and T-cell subsets. *Exp.Hematol.* 29:1185-1193.
29. Petrackova M., Sobotkova E., Duskova M., Jinoch P., Vonka V. (2009). Isolation and properties of gene-modified mouse bcr-abl-transformed cells expressing various immunostimulatory factors. *Neoplasma* 56:194-201.

30. Petrackova M., Stanek L., Mandys V., Dunder P., Vonka V. (2012). Properties of bcr-abl-transformed mouse 12B1 cells secreting interleukin-2 and granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF): II. Adverse effects of GM-CSF. *Int.J.Oncol.* 40:1915-1922.
31. Petrackova M., Tachezy R., Vonka V. (2012). Properties of bcr-abl-transformed mouse 12B1 cells secreting interleukin-2 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: I. Derivation, genetic stability, oncogenicity and immunogenicity. *Int.J.Oncol.* 40:1668-1676.
32. Pokorna D., Polakova I., Kindlova M., Duskova M., Ludvikova V. et al. (2009). Vaccination with human papillomavirus type 16-derived peptides using a tattoo device. *Vaccine* 27:3519-3529.
33. Prussin C. (1997). Cytokine flow cytometry: understanding cytokine biology at the single-cell level. *J.Clin.Immunol.* 17:195-204.
34. Pulendran B., Smith J.L., Jenkins M., Schoenborn M., Maraskovsky E. et al. (1998). Prevention of peripheral tolerance by a dendritic cell growth factor: flt3 ligand as an adjuvant. *J.Exp.Med.* 188:2075-2082.
35. Reinis M. (2010). Immunotherapy of MHC class I-deficient tumors. *Future.Oncol.* 6:1577-1589.
36. Reinis M., Stepanek I., Simova J., Bieblova J., Pribylova H. et al. (2010). Induction of protective immunity against MHC class I-deficient, HPV16-associated tumours with peptide and dendritic cell-based vaccines. *Int.J.Oncol.* 36:545-551.
37. Scheich F., Duyster J., Peschel C., Bernhard H. (2007). The immunogenicity of Bcr-Abl expressing dendritic cells is dependent on the Bcr-Abl kinase activity and dominated by Bcr-Abl regulated antigens. *Blood* 110:2556-2560.
38. Suzuki E., Kapoor V., Cheung H.K., Ling L.E., DeLong P.A. et al. (2004). Soluble type II transforming growth factor-beta receptor inhibits established murine malignant mesothelioma tumor growth by augmenting host antitumor immunity. *Clin.Cancer Res.* 10:5907-5918.
39. Tschärke D.C., Woo W.P., Sakala I.G., Sidney J., Sette A. et al. (2006). Poxvirus CD8+ T-cell determinants and cross-reactivity in BALB/c mice. *J.Virol.* 80:6318-6323.
40. Yotnda P., Firat H., Garcia-Pons F., Garcia Z., Gourru G. et al. (1998). Cytotoxic T cell response against the chimeric p210 BCR-ABL protein in patients with chronic myelogenous leukemia. *J.Clin.Invest.* 101:2290-2296.
41. Zeng Y., Graner M.W., Thompson S., Marron M., Katsanis E. (2005). Induction of BCR-ABL-specific immunity following vaccination with chaperone-rich cell lysates derived from BCR-ABL+ tumor cells. *Blood* 105:2016-2022.
42. Zurkova K., Babiarova K., Hainz P., Krystofova J., Kutinova L. et al. (2009). The expression of the soluble isoform of hFlt3 ligand by recombinant vaccinia virus enhances immunogenicity of the vector. *Oncol.Rep.* 21:1335-1343.
43. Zurkova K., Chlanda P., Samkova Z., Babiarova K., Kutinova L. et al. (2011). Expression of soluble TGF-beta receptor II by recombinant Vaccinia virus enhances E7 specific immunotherapy of HPV16 tumors. *Neoplasma* 58:181-188.

RNDr. Katarína Babiarová, Ph.D.

je absolventkou oboru Molekulární a buněčná biologie, genetika a virologie na Přírodovědecké fakultě Univerzity Karlovy v Praze. Svou doktorskou dizertační práci „Rekombinantní vakcíny proti solidním a hematologickým nádorům: vývoj a stanovení jejich účinnosti“ vypracovala pod vedením RNDr. Šárky Němečkové, DrSc. na oddělení Oddělení experimentální virologie Ústavu hematologie a krevní transfuze v Praze.

Doplnit foto

Studium molekulární podstaty vybraných dědičně podmíněných onemocnění

Mgr. Hana Hartmannová

Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta, Kateřinská 32, 121 08 Praha 2

Vzácná onemocnění jsou klinicky a geneticky heterogenní skupinou onemocnění postihující různé orgány a projevující se v různém věku. Nalézání, charakterizace a studium funkčních dopadů genetických příčin vzácných onemocnění je efektivním nástrojem odhalování funkce lidských genů a genových produktů a otevírá cestu k pochopení molekulárně biologických mechanismů jednotlivých onemocnění. Znalost příčin a mechanismů vzniku vzácných onemocnění je následně východiskem pro jejich efektivní diagnostiku, cílenou léčbu a prevenci a zároveň poskytuje i poznatky pro pochopení genetických a molekulárních příčin komplexních onemocnění. Tato dizertační práce dokumentuje základní koncepční a metodický vývoj postupů biochemické genetiky, funkčního klonování, genetického mapování, pozičního klonování, DNA čipů a genomového sekvenování, které jsou dnes základními nástroji efektivního studia všech geneticky podmíněných onemocnění. Rychlý technologický vývoj a praktická využitelnost řady těchto technik je demonstrována na případech studia molekulární podstaty několika vzácných chorob - deficitu adenylosukcinát lyázy, mukopolysacharidózy typu IIIC, Rotorova syndromu, deficitu ATP syntázy, adultní formy neuronální ceroidní lipofuscinózy, GAPO syndromu a X-vázané restriktivní kardiomyopatie, na jejichž objasnění jsem se během svého studia podílela.

Úvod

Vzácná onemocnění jsou definována jako onemocnění, jejichž prevalence je v Evropě menší než 1:2000 a v USA menší než 1:1250 (1). Odhaduje se, že existuje přes 7 000 vzácných chorob (2). Ve velké většině se jedná o onemocnění dědičně podmíněná, způsobená mutacemi jednotlivých genů. Mohou postihovat pacienty již od velmi útlého věku, projevovat se těžkým fyzickým či mentálním postižením výrazně zhoršujícím kvalitu života pacientů a jejich rodin (3). Celkový počet pacientů trpících vzácným onemocněním se v Evropě odhaduje na 30 milionů, v Severní Americe na 25 milionů (4). Vzácná onemocnění jsou velmi heterogenní skupinou nemocí postihující různé orgány a mající nejrozličnější klinické projevy. Vyskytují se jak velmi vzácně, pouze u několika pacientů na světě, tak i častěji. Příkladem častějšího onemocnění je cystická fibróza (1:2700-3800) nebo narkolepsie s kataplexií s incidencí 1:2000 (3). Příkladem méně častého metabolického onemocnění je metylmalonová acidurie s frekvencí výskytu 1:50000 nově narozených dětí. Znalosti o molekulární podstatě jednotlivých chorob, z nich plynoucí případné možnosti diagnostiky a následné léčby, jsou velmi malé, pacienti tak získávají jen málo informací o chorobě, kterou trpí. Často podstupují ve snaze o zjištění diagnózy náročná vyšetření. V současné době existuje léčba pro pouhých 5 % chorob (5).

Studium vzácných onemocnění bylo dlouhodobě podceňováno, neboť postihovalo jen malou skupinu pacientů a jejich výzkum se proto jevil jako finančně nevýhodný. Až v roce 1983 byla založena organizace National Organisation of Rare Disorders (NORD), která se začala významně podílet na podpoře výzkumu způsobu léčby vzácných onemocnění. V Evropě pacienty se vzácnými onemocněními zastupuje nevládní organizace EURORDIS (Rare Diseases Europe), která sdružuje 561 organizací z 51 zemí. Tato uskupení se snaží zlepšit kvalitu života pacientů s vzácným onemocněním a jejich blízkých. Studium vzácných onemocnění významně přispívá k pochopení základní biologie, definuje kauzální geny a může pomoci vysvětlit jejich biologickou funkci, neboť funkce většiny genů je stále neznámá.

Cíle práce

Teoretická část této dizertační práce dokumentuje základní koncepční a metodický vývoj postupů funkčního klonování, pozičního klonování, DNA čipů a genomového sekvenování, které postupně objasnily více než 3 000 různých typů vzácných onemocnění a jsou dnes základním metodickým nástrojem efektivního studia jak vzácných, tak i populačně častých, geneticky podmíněných onemocnění. Experimentální část dizertační práce demonstruje rychlý technologický vývoj a praktickou využitelnost řady těchto technik na příkladech několika vzácných chorob - deficitu adenylosukcinát lyázy, mukopolysacharidózy typu IIIC, Rotorova syndromu, deficitu ATP syntázy, neuronální ceroidní lipofuscinózy, GAPO syndromu a X-vázané restriktivní kardiomyopatie, na jejichž výzkumu jsem se během svého studia podílela. Hlavními cíli jsou: (1) rozvoj technologie DNA čipu a její využití při studiu vzácných onemocnění; (2) zavedení a využití postupu genetického mapování a pozičního klonování při studiu vzácných onemocnění; (3) zavedení a využití celoexomového sekvenování; (4) identifikace kauzálních genů a mutací a studium molekulární podstaty vybraných vzácných onemocnění (deficit ADSL, deficit ATP syntázy, MPSIIIC, Rotorův syndrom, ANCL, GAPO syndrom, X-vázaná restriktivní hypertrofická kardiomyopatie).

Nové metody sekvenování genomu

Velká většina vzácných onemocnění je způsobena mutacemi jednotlivých genů či funkčně významných genetických elementů. Základním východiskem pro efektivní studium těchto onemocnění je proto určení jejich kauzální genetické příčiny. Sekvenování DNA je dnes jednou z hlavních metod molekulární biologie a genetiky. Znalost sekvence a její analýza umožňují předpovědět řadu základních vlastností kódovaných studovaným fragmentem (předpověď rozpoznávacích sekvencí restriktivních a DNA modifikujících enzymů, sekvencí DNA vazebných proteinů, detekce mutací, předpověď struktury genu a sekvence příslušného transkriptu a proteinu, původ a příbuznost studovaného fragmentu apod.). Obdobně znalost sekvence celého genomu umožňuje předpovědět řadu základních vlastností celého organismu. Nové metody sekvenování DNA umožnily analýzu desítek tisíců genomů případně jejich oblastí kódujících proteiny. Tento vývoj odhalil základní strukturu genetické variability člověka a významným způsobem zjednodušil vyhledávání vzácných genetických mutací způsobujících vzácná onemocnění. Současný přístup určení genetických příčin vzácných onemocnění vychází z univerzálního konceptu porovnávání sekvence genomu postižených jedinců s genetickou variabilitou různých populací. U vzácných onemocnění je výsledkem takového porovnání určení populačně

vzácných či privátních genetických variant studovaných jedinců. Tyto varianty jsou následně hodnoceny na základě obecného genetického modelu onemocnění a segregace jednotlivých variant se studovaným onemocněním v rodině. Významným faktorem je opakovaný výskyt vzácných variant ve vybraném kandidátním genu u nepříbuzných pacientů. Další možnosti poskytuje též analýza mezidruhově sekvenční konzervovanosti, předpokládaného efektu nalezených variant a funkční anotace genů s nalezenými variantami. Vhodným doplňkem kvalifikované analýzy a výběru kandidátních genů je též poziční informace definovaná např. paralelně provedeným genetickým mapováním, analýza RNA v postižených tkáních či tkáňových kulturách. Výsledkem takového postupu je určení omezeného počtu kandidátních genů a variant, jejichž kauzalita musí být ve většině případů ještě následně studována a charakterizována pomocí vhodných biochemických, molekulárně biologických či histopatologických metod.

Sangerova metoda sekvenování sehrála důležitou roli v genomových projektech, včetně projektu lidského genomu. Prudký rozvoj funkční a komparativní genomiky, rozšíření palety aplikací v diagnostice a perspektivy personalizované medicíny podnítily snahy o vývoj alternativních sekvenačních technologií, jejichž cílem je získávání dat podstatně rychlejším a levnějším způsobem. Nová generace sekvenačních technologií (next generation sequencing, NGS) využívá metody založené na různých principech - ligace oligonukleotidů (sequencing by ligation), syntézy DNA (sequencing by synthesis), hybridizace nukleových kyselin (sequencing by hybridization) nebo sekvenování pomocí nanoporů (nanopore sequencing). Všechny tyto technologie jsou v současné době dostupné.

Identifikace kauzálních genů a mutací a studium molekulární podstaty vybraných vzácných onemocnění v Ústavu dědičných metabolických poruch v letech 1996 – 2013

Studium molekulární podstaty deficitu adenylosukcinát lyázy

Deficit adenylosukcinát lyázy (ADSL) (OMIM 103050) je metabolická porucha syntézy purinů *de novo* a purin-nukleotidového cyklu popsána v roce 1984 (6). Patogenetické mechanismy, které vedou k rozvoji individuálních klinických symptomů a způsobují fenotypovou heterogenitu, zůstávají nejasné. Hlavní patogenetický efekt je přisuzován hromadění toxických defosforylovaných substrátů ADSL – sukcinyladenosinu (S-Ado) a sukcinylaminoimidazolkarboxamidribosidu (SAICAr) v mozkomíšním moku a moči (7). Typickými příznaky deficitu ADSL jsou vážné neurologické symptomy jako psychomotorická retardace, epilepsie, hypotonie a autismus. Stupeň postižení je u jednotlivých pacientů různý a klinicky klasifikovány jsou tři typy tohoto onemocnění.

V předkládané práci se nám metodou CapFinder podařilo identifikovat úplnou sekvenci genu *ADSL*, včetně jeho izoforem (GenBank, AF067853). Provedli jsme první podrobnou studii 7 pacientů s deficitem ADSL zahrnující podrobný klinický popis, biochemickou charakterizaci pacientů a identifikovali jsme mutace podmiňující deficit ADSL. V souvislosti s uvedenou studií jsme zároveň identifikovali a určili sukcinyladenosin jako normální složku likvoru (8), naznačili možnou roli sukcinylpurinů v patogenesi postižení centrální nervové soustavy, jak u deficitu ADSL, tak u deficitu fumarázy (9) a využili dostupnosti rekombinantního lidského enzymu k přípravě substrátů a jejich defosforylovaných produktů nezbytných pro studium patogeneze deficitu ADSL (10).

Díky nově vyvinutému diagnostickému přístupu (8) se nám podařilo shromáždit největší světový soubor pacientů <http://www1.lf1.cuni.cz/udmp/adsl/>. Tento soubor zahrnuje pacienty s různou závažností klinického postižení a je zdrojem pro studium patogenetických mechanismů vzniku tohoto onemocnění a pro studium základních biologických mechanismů vzniku a funkce purinozómu.

Rozvoj technologie DNA čipu a její využití při studiu vzácných chorob.

V Ústavu dědičných metabolických poruch 1. LF UK a VFN v Praze (ÚDMP) byl v roce 1998 ve spolupráci s firmou GeneAge Technologies navržen, vyroben a testován přístroj pro tisk DNA čipů, GeneSurfer. Zavedli jsme technologii přípravy skel a sond tak, že jsme byli schopni připravit v jednom cyklu až 60 čipů a nanést sondy o maximální hustotě 4900 sond/cm². Podařilo se nám optimalizovat metodu imobilizace sond na povrch, metodu přípravy fluorescenčně značených vzorků a metody obrazové analýzy a statistického zpracování.

DNA čipy vlastní výroby byly na ÚDMP využity u několika projektů. Projekt h-MitoArray byl určen pro studium exprese genů u mitochondriálních chorob. Pomocí tohoto čipu byla studována genová exprese u pacientů s izolovaným deficitem ATP syntázy, u kterých byla následně identifikována mutace v genu *TMEM70*. H-MitoArray obsahoval sadu 1632 genů, z nichž 992 bylo mitochondriálních, 42 lysozomálních, 277 asociovaných s apoptózou a 321 genů účastnících se karcinogeneze, dále 146 provozních genů a 10 genů *Arabidopsis thaliana*, které sloužily jako nástroj vnitřní kalibrace a normalizace. H-MitoArray byl využit ke studiu genové exprese u fibroblastů 13 pacientů s popsáním defektem F1Fo syntázy a 9 kontrol. Na základě porovnání expresních profilů, funkční anotace, metod genového obohacení a analýzy metabolických drah byly vzorky pacientů rozčleněny do tří skupin. První skupina vyčlenila fibroblasty pacientů se známou mutací v mitochondriální DNA; expresní profil poukazyval na supresi mitochondriální biogeneze a metabolismu a sníženou expresi genů regulujících přechod z G1 do S fáze. Tyto výsledky podpořily hypotézu o regulaci buněčného cyklu mitochondriemi na transkripční a posttranskripční úrovni (11, 12). U druhé skupiny dominovaly v expresním profilu známky aktivované apoptózy a oxidativního stresu, tedy charakteristiky buněčného stárnutí (13, 14). Třetí skupina byla i po stránce expresních profilů velmi heterogenní, což odpovídalo její klinické a biochemické variabilitě. Výsledky expresních studií na h-MitoArray byly verifikovány provedením stejných experimentů na komerční platformě Agilent Human 44k array a byla zjištěna vysoká korelace mezi výsledky obou platform. Byl tak vytvořen cenově výhodný spolehlivý „custom“ DNA čip, který v dané době doplňoval nedostatečné pokrytí mitochondriálních genů u komerčních čipů.

V ÚDMP jsme měli také možnost studovat pacienty s mukopolysacharidózou typu IIIC (MPSIIIC, Sanfilippo syndrom C, OMIM #252930). Jedná se o vzácné autosomálně recesivní lysozomální stádavé onemocnění. Měli jsme k dispozici celkem pět pacientů ze čtyř nepříbuzných rodin, u nichž bylo onemocnění diagnostikováno na základě biochemického vyšetření aktivity N-acetyltransferázy (15). U všech rodin byla provedena vazebná analýza pomocí STR markerů, zároveň bylo na spolupracujícím pracovišti v Montrealu provedeno genotypování 22 mikrosatelitních markerů u 60 pacientů a 44 nepostižených příbuzných. Tyto analýzy zúžily kandidátní oblast na interval 2,6 cM na chromozomu 8 mezi markery D8S1051 a D8S1831. Tento interval obsahoval 32 známých a predikovaných genů. Díky zavedené metodě přípravy vlastních DNA čipů pomocí robotického přístroje jsme navrhli expresní čip, který obsahoval oligonukleotidové sondy genů z kandidátní oblasti. Provedli jsme tak analýzu genové exprese v leukocytech dvou pacientů a čtyř zdravých kontrol. Výsledky ukázaly

sníženou expresi transkriptu genu *TMEM76* u obou pacientů ve srovnání se zdravými kontrolami. Gen *TMEM76* byl také vybrán jako kandidátní gen na základě jeho charakteristik lysozomálního transmembránového glykoproteinu o velikosti odpovídající částečně purifikovanému enzymu (16). Sekvenováním kandidátního genu byly pak identifikovány patogenní mutace v genu *TMEM76* nejprve u pěti studovaných českých pacientů, později celkem u třiceti rodin. Jednalo se o 4 nonsense mutace, 14 missense mutací, 3 mutace způsobující posun čtecího rámce a 6 sestřihových mutací. Funkční význam genu *TMEM76* v patogenezi mukopolysacharidózy typu IIIC byl dále potvrzen funkčními expresními studiemi provedených na patientských fibroblastech.

DNA čipy byly v ÚDMP použity i pro metodu komparativní genomové hybridizace, a to při studiu molekulární podstaty Rotorova syndromu (17). Expresní čipy připravené na ÚDMP našly využití také v zemědělství. Ve spolupráci s Jihočeskou Universitou v Českých Budějovicích jsme vytvořili oligonukleotidový čip schopný efektivně a spolehlivě detekovat viry v listech brambor (18).

Využití postupu genetického mapování a pozičního klonování

Vzhledem k tomu, že analýza genové exprese u pacientů s izolovaným defektem ATP syntázy nepřinesla jasné kandidátní geny pro přímé sekvenování, pokračovali jsme v dalším studiu. U osmi pacientů, jejich sourozenců a rodičů ze sedmi rodin jsme provedli vazebnou analýzu a homozygotní mapování. Tyto analýzy ukázaly jedinou homozygotní oblast na chromozomu 8 sdílenou všemi pacienty. Propojením těchto výsledků s výsledky genové exprese bylo zjištěno, že pouze jediný gen z této oblasti - *TMEM70* měl ve fibroblastech u všech pacientů sníženou expresi v porovnání s kontrolními buňkami. Sekvenováním tohoto genu byla u všech pacientů nalezena homozygotní substituce c.317-2A>G lokalizovaná v sestřihovém místě exonu 2. Dalšími studiemi bylo prokázáno, že tato mutace vede k abnormálnímu sestřihu a následné degradaci mRNA mechanismem "nonsense-mediated decay." Pomocí PCR-RFLP analýzy jsme prokázali přítomnost homozygotní mutace u 23 pacientů z celkového počtu 25. Kauzalita této mutace byla prokázána komplementační studií, obnovením funkce ATP syntázy po vnesení wild-type *TMEM70* do fibroblastů pacientů. Identifikovali jsme *TMEM70* jako protein účastnící se u vyšších eukaryot biogeneze ATP syntázy a prokázali jsme, že porucha *TMEM70* je relativně častá u pacientů s poruchou tvorby energie.

Další onemocnění, kterým jsme se v ÚDMP zabývali, byl Rotorův syndrom (RS, MIM237450), autozomálně recesivní onemocnění, které se projevuje konjugovanou hyperbilirubinémií, koproporfyriurií a sníženou absorpcí diagnostických sloučenin játry, s prodlouženou dobou odbourávání nekonjugovaných anionických diagnostických barev a při cholescintigrafii nedochází k zobrazení jater a žlučovodů. Homozygotní mapování pacientů z osmi rodin odhalilo jedinou homozygotní oblast na chromozomu 12. Po provedení analýzy změn počtu kopií byly u dvou haplotypů objeveny homozygotní delece- u prvního haplotypu delece v genu *SLCO1B3* a u druhého zasahovala delece geny *SLCO1B3*, *SLCO1B1* a *LST-3TM12*. Následná sekvenační analýza odhalila patogenní mutace v genech *SLCO1B3* a *SLCO1B1*, u každého haplotypu byly přítomny mutace nebo delece vždy v obou genech. Předpokládaným důsledkem změn byly vážné změny exprese proteinů či jejich úplná absence. Pro zjištění závažnosti onemocnění byly provedeny funkční studie. Imunochemická barvení jaterních biopsií pacientů prokázala nepřítomnost proteinů OATP1B1 a OATP1B3 kódovanými geny *SLCO1B3* a *SLCO1B1*. Proteiny OATP1B3 a OATP1B1 jsou transportéry organických anionických sloučenin, jsou lokalizovány

na sinusoidní membráně hepatocytů a účastní se přenosu řady sloučenin, jako jsou konjugovaný bilirubin, žlučové kyseliny, steroidy, tyroidní hormony, některé léky, toxiny a jejich konjugáty. Tato studie je významná nejen objevením podstaty RS, ale má také širší klinický dopad. Přestože je výskyt kombinace defektů v obou genech velmi vzácný, výskyt mutací v jednom nebo druhém genu je v populaci mnohem častější. Jedinci s mutacemi v proteinu OATP1B1 nebo OATP1B3 mohou vykazovat hypersenzitivitu na látky transportované těmito přenašeči, například na běžně užívané statiny. Souvislost variant v genu *SLCO1B1* se statiny indukovanou myopií již byla popsána na základě celogenomových populačních studií (19).

Exomové sekvenování

Celoexomové sekvenování umožňuje objasnit také genetickou podstatu sporadických onemocnění a vzácných syndromů. Často se jedná o jednotky či desítky nepříbuzných pacientů s daným syndromem či onemocněním. Výhodné je proto provádět celoexomové sekvenování rodičů a postiženého jedince, výsledný seznam kandidátních variant filtrovat s ohledem na možné typy dědičnosti, na přítomnost variant nepřítomných u rodičů. V případě, že pro analýzu nejsou k dispozici vzorky rodičů postiženého jedince, lze výsledky porovnat s variabilitou v populaci.

Pro studium molekulární podstaty adultní formy neuronální ceroidní lipofuscinózy (ANCL) byla použita kombinace vazebné analýzy, expresní analýzy a exomového sekvenování. Genomová DNA všech dostupných členů rodiny byla nejprve použita pro genotypování a vazebnou analýzu. Identifikovali jsme pět kandidátních oblastí na chromozomech 1, 4, 15, 20 a 22 obsahujících zhruba 560 známých genů. U sedmi dostupných pacientů bylo dále provedeno genotypování a analýza změn počtu kopií, nenalezli jsme však žádné potenciálně patogenní rozsáhlejší delece nebo duplikace. Paralelně jsme provedli analýzu genové exprese z leukocytů čtyř pacientů a čtyř kontrol, získali jsme seznam rozdílně exprimovaných genů, z nichž 65 leželo v oblastech identifikovaných vazebnou analýzou. Funkční anotace a analýza genového obohacení (gene enrichment analysis) ukázaly významnou dysregulaci spliceosomu, upregulaci mnoha složek respiračního řetězce, změněnou expresi genů aktivních u neurodegenerativních chorob, tyto údaje však stále nebyly dostačující pro nalezení mutace v kauzálním genu. Proto jsme se rozhodli sekvenovat celý exom jednoho pacienta na sekvenátoru SOLiDTM4 v Německu. Byl identifikován kandidátní gen *DNAJC5* ležící v oblasti na chromozomu 20q13.33, jehož exprese byla v leukocytech pacienta statisticky významně zvýšena ve srovnání s kontrolami a který obsahoval unikátní heterozygotní mutaci c.346_348delCTC (p. Leu116del). Segregace této záměny byla ověřena u ostatních členů rodiny Sangerovým sekvenováním. Funkční studie prokázaly mutace v genu *DNAJC5* jako příčinou ANCL.

Vzhledem k tomu, že identifikací mutací v genu *DNAJC5* byla objasněna zhruba čtvrtina případů, které jsme měli k dispozici, rozhodli jsme se použít podobný přístup, jaký byl popsán v předchozí studii, i u další rodiny, která nám byla zaslána s diagnózou autozomálně dominantní Kufsovy choroby (20). Vazebnou analýzou bylo nalezeno 14 kandidátních oblastí 14 kandidátních oblastí s pozitivním LOD skóre na chromosomech 3, 4, 8, 9, 10, 13, 14, 16 a 19. Zároveň jsme u jednoho pacienta provedli analýzu změn počtu kopií pomocí Affymetrix GeneChip Mapping 6.0 Array a nenalezli jsme žádné potenciálně patogenní rozsáhlejší delece nebo duplikace. Následně jsme u dvou pacientů a jednoho nepostiženého příbuzného provedli exomové sekvenování na sekvenátoru SOLiD™4 System v ÚDMP. Po propojení dat exomového sekvenování s informacemi z vazebné analýzy jsme získali seznam sedmi jednonukleotidových záměn, ve kterém jsme jako prioritní kandidátní mutaci

označili heterozygotní mutaci c.509C>T (p.Ser170Phe) v genu presenilin 1 (*PSEN1*). Zároveň byl díky funkční anotaci variant nalezených exomovým sekvenováním u všech pacientů identifikován známý polymorfismus c.C173>T (rs17571) v genu kathepsin D (*CTSD*). Tato studie neodhalila další kauzální gen pro adultní formu NCL, rodina zařazena do souboru byla nesprávně diagnostikována a byla u ní identifikována již známá mutace podmiňující Alzheimerovu chorobu.

Dalším studovaným onemocněním byl GAPO syndrom (OMIM 230740) (Growth retardation, Alopecia, Pseudoanodontia, and progressive Optic atrophy), vzácné autozomálně recesivní onemocnění, které je popisováno jako komplex růstové retardace, alopecie, pseudoanodontie s progresivní optickou atrofií. Doposud bylo popsáno kolem třiceti případů na celém světě (21-26). Většina jedinců s tímto onemocněním pochází z příbuzenských svazků. Nejprve jsme provedli analýzu počtu kopií a homozygotní mapování pomocí Affymetrix GeneChip Mapping 6.0 Array. U pacienta ani u rodičů nebyly zjištěny žádné inserce nebo delece, byly identifikovány dvě homozygotní oblasti na chromozomech 2 a 4. Následně bylo provedeno celoexomové sekvenování pacienta i rodičů na sekvenátoru SOLiD™4. Analýza exomových dat ukázala celkem 121 kandidátních variant splňujících kritérium autozomálně recesivní dědičnosti, pouze jedna varianta se vyskytovala v homozygotní oblasti vymezené homozygotním mapováním. Jednalo se o homozygotní záměnu v genu pro antrax toxin receptor 1 (*ANTXR1*) vedoucí k vytvoření předčasného stop kodonu v exonu 7 (c.C505>T; p.R169X). Mutace nebyla přítomna v žádných běžně dostupných databázích. Díky mezinárodní spolupráci se podařilo vytvořit rozsáhlejší soubor pacientů s tímto syndromem, u nichž byla nalezena homozygotní mutace v genu *ANTXR1*(c.C262>T; p.R88X a sestřihová mutace c.1435–12A>G). Funkční studie provedené na fibroblastech a tkáních pacientů s předčasným terminačním kodómem ukázaly významné snížení množství transkriptu *ANTXR1* a absenci proteinu ve tkáních, ta byla potvrzena imunohistochemicky i westernovým přenosem. Imunofluorescenční analýza ukázala u GAPO pacientů výraznou změnu v organizaci aktinových cytoskeletárních mikrofilament. Lze předpokládat, že *ANTXR1* je zásadní pro uspořádání aktinových vláken, narušení aktinové sítě by mohlo být příčinou patologických jevů popsaných u GAPO syndromu.

Zatím posledním studovaným onemocněním byla restriktivní hypertrofická kardiomyopatie vázaná na X. Výzkum byl zaměřen na rodinu, v níž byli tři muži postiženi hypertrofickou kardiomyopatií asociovanou s těžkou dysfunkcí levé komory srdeční. Vzhledem ke známé genetické heterogenitě familiárních kardiomyopatií, jsme provedli celoexomové sekvenování na sekvenátoru SOLiD™4 u dvou postižených chlapců a jejich matky.

Ze sekvenačních dat jsme následným filtrováním získali jedinou potenciálně pato-genní variantu - inserci c.599_600insT v exonu 6 genu *FHL1*. (NM_001159702). *FHL1* kóduje four-and-a-half-LIM-domain protein 1 (FHL1), je přepisován do tří alternativně sestřižených izoform, které se translatují do proteinů FHL1A, FHL1B a FHL1C. Nejčastěji se vyskytuje izoforma FHL1A, která je exprimována především v kosterním svalu, méně již ve svalu srdečním. Inserce c.599_600insT v exonu 6 genu *FHL1* způsobuje posun čtecího rámce translatovaných izoform FHL1A a FHL1B, v obou případech vzniká předčasný terminační kodón.

K charakterizaci identifikované mutace jsme provedli expresní analýzu *FHL1* izoform a potvrdili přítomnost FHL1 proteinů v tkáních pacientů a kontrol. Provedli jsme kvantitativní PCR a RT-PCR analýzu z celkové RNA a westernový přenos homogenátů proteinů zmrazených srdečních tkání. Tyto analýzy ukázaly, že identifikované mutace nemají vliv na transkripci, sestřih a stabilitu *FHL1* mRNA a potvrdily

přítomnost jediného RT-PCR produktu odpovídajícího FHL1A izoformě. Sangerovo sekvenování potvrdilo sekvenci této izoformy a zároveň přítomnost inserce c.599_600insT vedoucí k posunu čtecího rámce. WB analýza srdečních homogenátů ukázala přítomnost imunoreaktivního proteinu odpovídajícího molekulární hmotnosti 27 kDa, předpokládaného zkráceného proteinu vzniklého posunem čtecího rámce. Imunoreaktivní protein o molekulové hmotnosti 32 kDa odpovídající FHL1A izoformě byl identifikován ve vysoké míře u kontrolních vzorků zatím co u pacientů nebyl nalezen. Žádný imunoreaktivní protein o molekulové hmotnosti 22 kDa odpovídající proteinu FHL1C nebyl detekován ani u kontrol, ani u pacientů. Imunohistochemické barvení potvrdilo nepřítomnost všech forem imunoreaktivního proteinu pacientů. Naše výsledky vypovídají o různých rolích FHL1 proteinů v kosterním a srdečním svalu. V kosterním svalstvu má FHL1 mnoho funkcí v procesu migrace myoblastů a jejich prodlužování, při aktivaci buněk a inhibici apoptózy myoblastů, regulaci hmoty kosterního svalstva, tvorby sarkomer a Notch signalizaci (27, 28).

Závěr

Tato práce významně přispěla k zavedení základních molekulárně biologických technik: PCR, klonování, sekvenování a exprese rekombinantních proteinů, celoexomového sekvenování a bioinformatické analýzy v laboratoři Ústavu dědičných metabolických poruch 1. lékařské fakulty UK a VFN v Praze. Zásadně jsem se podílela na zavedení metod genotypování, přípravy oligonukleotidových čipů, na optimalizaci přípravy vzorků a jejich fluorescenčního značení a hybridizačních experimentech, a na zavedení a rozvoji sekvenačních technik pro sekvenátory nové generace. Účastnila jsem se také bioinformatické analýzy výsledků. Všechny tyto techniky dnes tvoří základní metodické zázemí pro kvalifikované studium molekulární podstaty širokého spektra vzácných onemocnění a umožňují rychlé přenášení metodických přístupů do dalších studií.

Souhrnnými výsledky této práce jsou:

1. Identifikace sekvence genu *ADSL* včetně jeho izoform a identifikace mutací podmiňujících deficit *ADSL*. Byla provedena první podrobná studie pacientů s deficitem *ADSL* zahrnující podrobný klinický popis a biochemickou charakterizaci pacientů a vývoj nové diagnostické metody.
2. Zavedení čipu H-MitoArray pro studium mitochondriálních onemocnění, s jehož pomocí, v kombinaci s využitím vazebné analýzy a homozygotního mapování byl identifikován kauzální gen *TMEM70* pro vznik izolovaného deficitu ATP syntázy.
3. Identifikace kauzálního genu pro vznik mukopolysacharidózy typu IIIC - *TMEM76*, kombinací vazebné analýzy, genotypování, expresních DNA čipů a sekvenování.
4. Identifikace molekulární podstaty Rotorova syndromu s využitím metody komparativní genomové hybridizace, homozygotního mapování a sekvenování, nalezení delece a mutace v genech *SLCO1B1* a *SLCO1B3*.
5. Identifikace mutací v genu *DNAJC5* jako kauzální příčiny části případů s adultní formou neuronální ceroidní lipofuscinózy pomocí kombinace vazebné analýzy, analýzy genové exprese, analýzy změn v počtu kopií a celoexomového sekvenování.
6. Identifikace mutací v genu *PSEN1* a polymorfismu v genu *CTSD* u rodiny původně zařazené do souboru suspektních případů ANCL pomocí metod vazebné analýzy a celoexomového sekvenování.
7. Identifikace mutací v genu *ANTXR1* jako kauzální příčiny GAPO syndromu pomocí kombinace analýzy počtu kopií, homozygotního mapování a celoexomového sekvenování.

8. Identifikace a charakterizace mutace v *FHL1* genu způsobující X-vázanou restriktivní hypertrofickou kardiomyopatii pomocí celoexomového sekvenování a expresní analýzy.

Literatura

1. Remuzzi G., Garattini S. (2008). Rare diseases: what's next? *Lancet* 371(9629): 1978-1979.
2. Heemstra H.E., van Weely S., Buller H.A., et al. (2009). Translation of rare disease research into orphan drug development: disease matters. *Drug Discovery Today* 14(23-24): 1166-1173.
3. Dear J.W., Lilitkarntakul P., Webb D.J. (2006). Are rare diseases still orphans or happily adopted? The challenges of developing and using orphan medicinal products. *British Journal of Clinical Pharmacology*. 62(3): 264-271.
4. Schieppati A., Henter J.I., Daina E., et al. (2008). Why rare diseases are an important medical and social issue. *Lancet* 371(9629): 2039-2041.
5. Rohn J. (2013). Billions spent on rare diseases. *Nat Biotech*. 31(5): 368-368.
6. Jaeken J., Vandenberghe G. (1984). An infantile autistic syndrome characterized by the presence of succinyl purines in body-fluids. *Lancet* 2 (8411): 1058-1061.
7. Stone T. W., Roberts L. A., Morris B. J., et al. (1998). Succinylpurines induce neuronal damage in the rat brain. *Adv Exp Med Biol*. 431: 185-189.
8. Krijt J., Knoch S., Hartmannova H., et al. (1999). Identification and determination of succinyladenosine in human cerebrospinal fluid. *J. Chromatography B*. 726(1-2): 53-58.
9. Zeman J., Krijt J., Stratilova L., et al. (2000). Abnormalities in succinylpurines in fumarase deficiency: Possible role in pathogenesis of CNS impairment. *J Inherit Metabol Dis*. 23(4): 371-374.
10. Zikanova M., Krijt J., Hartmannova H., et al. (2005). Preparation of 5-amino-4-imidazole-N-succinocarboxamide ribotide, 5-amino-4-imidazole-N-succinocarboxamide riboside and succinyladenosine, compounds usable in diagnosis and research of adenylosuccinate lyase deficiency. *J Inherit Metabol Dis*. 28(4): 493-499.
11. Gemin A., Sweet S., Preston T. J., et al. (2005). Regulation of the cell cycle in response to inhibition of mitochondrial generated energy. *Biochem Biophys Res Commun*. 332(4): 1122-1132.
12. Mandal S., Guptan P., Owusu-Ansah E., et al. (2005). Mitochondrial regulation of cell cycle progression during development as revealed by the tenured mutation in *Drosophila*. *Dev Cell*. 9(6): 843-854.
13. Shelton D. N., Chang E., Whittier P. S., et al. (1999). Microarray analysis of replicative senescence. *Curr Biol*. 9(17): 939-945.
14. Stockl P., Hutter E., Zwerschke W., et al. (2006). Sustained inhibition of oxidative phosphorylation impairs cell proliferation and induces premature senescence in human fibroblasts. *Exp Gerontol*. 41(7): 674-682.
15. Voznyi Ya V., Karpova E. A., Dudukina T. V., et al. (1993). A fluorimetric enzyme assay for the diagnosis of Sanfilippo disease C (MPS III C). *J Inherit Metab Dis*. 16(2): 465-472.
16. Ausseil J., Loredó-Osti J. C., Verner A., et al. (2004). Localisation of a gene for mucopolysaccharidosis IIIC to the pericentromeric region of chromosome 8. *J Med Genet*. 41(12): 941-945.
17. Hrebicek M., Jirasek T., Hartmannova H., et al. (2007). Rotor-type hyperbilirubinaemia has no defect in the canalicular bilirubin export pump. *Liver International*. 27(4): 485-491.
18. Sip M., Bystricka D., Knoch S., et al. (2010). Detection of viral infections by an oligonucleotide microarray. *J. Virological Methods* 165(1): 64-70.
19. Link E., Parish S., Armitage J., et al. (2008). *SLCO1B1* variants and statin-induced myopathy--a genomewide study. *N Engl J Med*. 359(8): 789-799.

20. Noskova L., Stranecky V., Hartmannova H., *et al.* (2011). Mutations in DNAJC5, encoding cysteine-string protein alpha, cause autosomal-dominant adult-onset neuronal ceroid lipofuscinosis. *Am J Hum Genet.* 89(2): 241-252.
21. Demirgunes E. F., Ersoy-Evans S., Karaduman A. (2009). GAPO syndrome with the novel features of pulmonary hypertension, ankyloglossia, and prognathism. *Am J Med Genet.* 149A(4): 802-805.
22. Goloni-Bertollo E. M., Ruiz M. T., Goloni C. B., *et al.* (2008). GAPO syndrome: three new Brazilian cases, additional osseous manifestations, and review of the literature. *Am J Med Genet* 146A(12):1523-1529.
23. Kocabay G., Mert M. (2009). GAPO syndrome associated with dilated cardiomyopathy: an unreported association. *Am J Med Genet A.* 149A(3): 415-416.
24. Nanda A., Al-Ateeqi W. A., Al-Khawari M. A., *et al.* (2010). GAPO syndrome: a report of two siblings and a review of literature. *Pediatr Dermatol.* 27(2):156-161.
25. Sayli B. S., Gul D. (1996). GAPO syndrome in Turkiye. *Am J Med Genet.* 65(3): 252-253.
26. Tipton R. E., Gorlin R. J. (1984). Growth retardation, alopecia, pseudo-anodontia, and optic atrophy--the GAPO syndrome: report of a patient and review of the literature. *Am J Med Genet.* 19(2): 209-216.
27. Cowling B. S., Cottle D. L., Wilding B. R., *et al.* (2011). Four and a half LIM protein 1 gene mutations cause four distinct human myopathies: a comprehensive review of the clinical, histological and pathological features. *Neuromuscul Disord.* 21(4): 237-251.
28. Shathasivam T., Kislinger T., Gramolini A. O. (2010). Genes, proteins and complexes: the multifaceted nature of FHL family proteins in diverse tissues. *J Cell Mol Med.* 14(12): 2702-2720.

Mgr. Hana Hartmannová, Ph.D. je absolventkou oboru Molekulární a buněčná biologie, genetika a virologie na Přírodovědecké fakultě Univerzity Karlovy v Praze. Svou doktorskou dizertační práci "Studium molekulární podstaty vybraných dědičně podmíněných onemocnění" vypracovala pod vedením Ing. Stanislava Kmocha, CSc. v Ústavu dědičných metabolických poruch 1. lékařské fakulty UK a Všeobecné fakultní nemocnice v Praze.

Doplnit foto

Perličky ze školních lavic

Výroky zkoušených studentů tak, jak je zaznamenal během své pedagogické kariéry na Biologickém ústavu Lékařské fakulty MU (dříve UJEP) prof. MUDr. Jan Šmarda, DrSc.

"Organismy jsou stále obklopeny bakteriemi a jinými nepřátelskými věcmi."

"Pračlověk žil 300.000 let."

"V genetické poradně můžeme téměř s určitostí zjistit, který otec je ten pravý."

"T-test se jmenuje také Studentův test, protože ho vypracoval člověk, který se ve skutečnosti jmenoval úplně jinak; ale tomu testu to už zůstalo."

"Pohlavní výběr je boj samců o samice, při kterém vzniká okouzlení té samice..."

Vyhlášení vítěze Ceny GSGM pro rok 2014

Výbor GSGM obdržel v požadovaném termínu celkem 5 přihlášek do soutěže o Cenu GSGM. Na základě vyhodnocení přihlášek jednotlivých uchazečů členy výboru, při němž byly hlavními kritérii počet publikací, jejich IF a pořadí uchazeče v autorském kolektivu bylo provedeno bodové hodnocení, které určilo toto pořadí soutěžících:



1. Ines Kováčiková, PrF UK Bratislava, Katedra genetiky – 42 bodů
- 2-3. Blanka Zámotná, PřF UK Praha, Katedra genetiky a mikrobiologie – 32 bodů
- 2-3. Tetyana Kobets, Ústav molekulární genetiky AV ČR, v.v.i, Praha – 32 bodů
4. Matyáš Šíma, Ústav molekulární genetiky AV ČR, v.v.i, Praha – 17 bodů
5. Igor Grekov, Ústav molekulární genetiky AV ČR, v.v.i, Praha - 9 bodů

Vítězkou soutěže o Cenu GSGM se tak stala Mgr. Ines Kováčiková, Ph.D. Upřímně blahopřejeme!

Výbor GSGM



Eppendorf Tubes® 5.0 mL



Chybějící mezičlánek

5 ml zkumavka má všechny výhody svých menších příbuzných „eppendorfek“.

Nová 5 ml Eppendorf zkumavka

je vybavena připojeným víčkem, které se snadno otevírá i zavírá jednou rukou, má vysokou mechanickou odolnost, zvládne centrifugaci do 25 000 x g. Vyrábí se podle vysokých kvalitativních standardů firmy Eppendorf, pouze z nejvyššího plastu, nejsou používána žádná aditiva, která by mohla ovlivnit následné aplikace. Zkumavka je dostupná v různých certifikovaných stupních čistoty (PCR clean, Sterile, Biopur, Protein LoBind, DNA LoBind), odolná pro práci a skladování v intervalu teplot -86 °C až 80 °C. Lze inkubovat i nad 80 °C, pro práci v těchto teplotách je však doporučeno použít pojistku na víčko (tube clip).

Při práci s objemy do 5 ml jsou výhody nové zkumavky oproti 15 ml konické zkumavce zřetelné:

- > Menší nebezpečí kontaminace – lze pracovat se standardními špičkami a pipetami, snadno se dosáhne na dno.
- > Je třeba méně skladovacího prostoru.
- > 5 ml Eppendorf zkumavku lze integrovat do většiny postupů, kde se při práci s objemy do 5 ml používají konické 15 ml zkumavky - tvar jejich spodních částí je identický

Dostupné příslušenství: stojánky, krabičky do mrazáků, pro centrifugaci adaptéry a vysokorychlostní rotory, termobloky, stojánky do pipetovacích robotů.



Napište si o vzorek 5 ml zkumavek zdarma:

eppendorf@eppendorf.cz

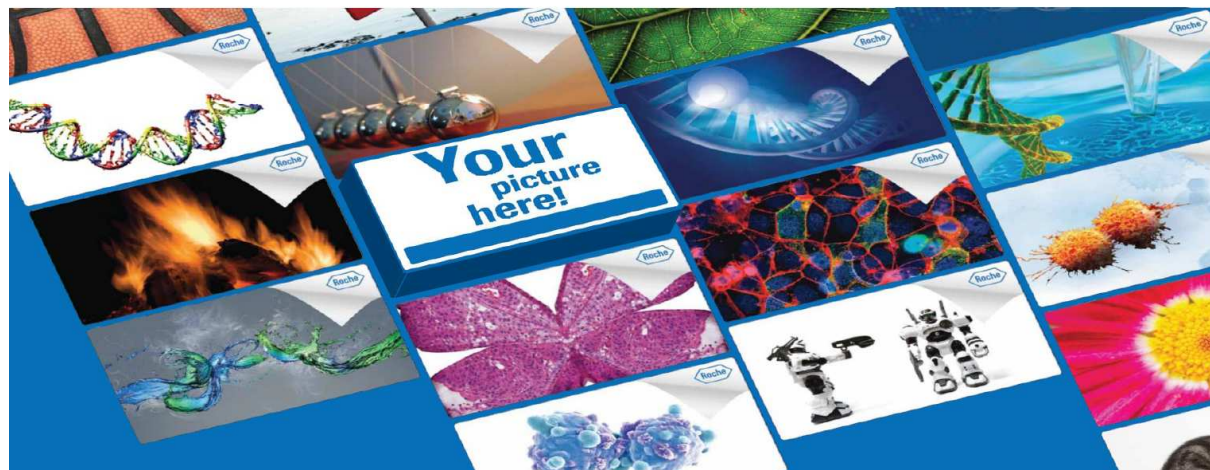
Eppendorf Czech & Slovakia s.r.o.
Kolovratská 1476, 251 01 Říčany
Tel. / Fax.: +420 323 605 454

www.eppendorf.cz



Obr.: Adaptér do rotoru s otvorem pro zkumavku 50 ml

My Roche Box



Vážení zákazníci,
nabízíme Vám možnost si zdarma navrhnout osobní Roche Box – krabičku pro uskladnění Vašich reagentů v mrazáku.

Vyberte si vlastní obrázek, fotografii, nápis a
Váš Roche Box poznáte v mrazáku na první pohled!

Akce platí od 1.6. do 31.10.2014



Je to velmi snadné:

- 1) Navštivte stránky www.myrochebox.cz
- 2) Vložte vlastní obrázek nebo si vyberte obrázek z naší databáze
- 3) Vložte vlastní text
- 4) My Vám Váš Box zdarma doručíme a zároveň od nás získáte voucher na 50% slevu na vybrané reagenty

Pokud budete potřebovat další informace, napište nám na adresu:
czech.appliedscience@roche.com