

MASARYKOVA UNIVERZITA

Přírodovědecká fakulta



**Úloha proteinů rodiny Anterior gradient  
v lidských nádorech**

Habilitační práce

Brno, 2016

Mgr. Roman Hrstka, Ph.D.

## **Poděkování**

Rád bych tímto poděkoval všem kolegům z Regionálního centra aplikované molekulární onkologie při Masarykově onkologickém ústavu v Brně za vytvoření vynikajících pracovních podmínek a Evě Michalové za jazykové korektury. Velký dík patří zejména RNDr. Bořivoji Vojtěškovi, DrSc., který mě zasvětil do tajů vědecké práce a po dlouhá léta je mým mentorem.

V neposlední řadě děkuji svým rodičům, manželce Petře a svým dětem za jejich pochopení, trpělivost a podporu nejen v práci, ale i mimo ni.

# Obsah

1. Úvod .....	4
1.1. Proteiny rodiny Anterior gradient .....	4
1.2. Nomenklatura AGR proteinů .....	4
1.3. Geny kódující AGR proteiny .....	5
1.4. Funkce AGR proteinů v endoplazmatickém retikulu .....	6
2. AGR2 a AGR3 u nádorových onemocnění .....	7
2.1. Analýza exprese AGR2 a AGR3 u pacientek s karcinomem mléčné žlázy .....	7
3. Mechanismy zodpovědné za regulaci exprese AGR2 .....	11
3.1. Klasický mechanismus účinku EsR .....	11
3.2. Neklasický mechanismus účinku EsR .....	13
3.3. Negenomová aktivita EsR .....	16
3.4. Exprese AGR2 u karcinomů mléčné žlázy nezávislá na EsR .....	19
4. Studium funkce proteinů AGR2 a AGR3 na buněčné (molekulární) úrovni .....	23
4.1. Identifikace interakčních partnerů proteinu AGR2 .....	24
4.2. AGR2 jako negativní regulátor proteinu p53 .....	31
4.3 Úloha proteinu AGR2 při vzniku metastáz .....	36
4.4. AGR2 a AGR3 jako sekretované proteiny .....	39
5. Studium exprese AGR2 u vybraných lidských malignit .....	42
5.1. Analýza exprese AGR2 u duktálních adenokarcinomů pankreatu .....	43
6. Studium exprese proteinu AGR3 u vybraných nádorových onemocnění .....	43
7. Závěr .....	47
8. Literatura .....	49
9. Seznam použitých zkratk .....	53
10. Seznam příloh .....	56

# 1. Úvod

## 1.1. Proteiny rodiny Anterior gradient

Rodina proteinů Anterior gradient (AGR) je u člověka tvořena třemi členy: AGR1 (ERp18), AGR2 a AGR3. Geny kódující proteiny Anterior gradient byly původně identifikovány při studiu vývoje embrya drápatky vodní (*Xenopus laevis*) [1]. Jako nejvýznamnější a tudíž i nejvíce prostudovaný se v současnosti jeví gen *XAG-2*, homolog lidského genu kódujícího protein AGR2, jenž hraje důležitou roli při vývoji embrya drápatky [2]. Zvýšená exprese *XAG-2* vede k diferenciaci cementové žlázy, jejíž buňky produkují mukózní sekret potřebný k přichycení čerstvě vylíhnutého embrya v období, než je pulec schopen sám plavat. Další práce zaměřené na studium AGR2 u *Notophthalmus viridescens* (čolek zelenavý), který je označován též jako nAG, prokázaly jeho nezastupitelnou úlohu při regeneraci končetin [3]. Regenerační proces začíná dediferenciací fibroblastů, svalových buněk a Schwannových buněk nervové tkáně. Zesílená proliferace těchto buněk následně vede ke vzniku značného množství mezenchymálních nediferencovaných buněk označovaných jako blastém, který je nezbytný pro vznik regenerované tkáně. nAG je při regeneraci exprimován především Schwannovými buňkami nervového obalu a následně pak i žláзовými buňkami epidermis poraněné tkáně, kde slouží jako mitogen podporující proliferaci buněk blastému [3].

## 1.2. Nomenklatura AGR proteinů

Z biochemického hlediska se všechny AGR proteiny řadí mezi tzv. protein disulfid isomerázy (PDI). Jsou typicky lokalizovány v endoplazmatickém retikulu (ER) prostřednictvím tzv. retenční sekvence. Jedná se o motiv typický pro většinu PDI, tvořený sekvencí aminokyselin lysin (K) – kyselina asparagová (D) – kyselina glutamová (E) – leucin (L), tedy K-D-E-L [4]. Retenční sekvence slouží k retrográdnímu transportu proteinů endoplazmatického retikula uplatňujících se při exportu sekrečních proteinů ven z buňky. Proteiny nesoucí K-D-E-L nebo jemu podobný motiv interagují se specifickými (KDEL) receptory v intermediárních kompartmentech Golgiho aparátu. Tato vazba způsobuje konformační změnu KDEL receptoru a nasměruje jej i s navázaným ligandem do váčků, které se vrací zpět do endoplazmatického retikula. Vyšší pH v endoplazmatickém retikulu pak vede k disociaci K-D-E-L peptidu z KDEL receptoru a jeho následné recyklaci [5]. V případě

AGR1 se můžeme na C-konci setkat se sekvencí E-D-E-L, v případě AGR2 je na C-konci K-T-E-L a u AGR3 Q-S-E-L motiv.

Ze strukturního a především funkčního hlediska je pro PDI důležitý tzv. thioredoxinový motiv, který se vyskytuje v oblasti thioredoxinové domény a obvykle obsahuje dva aktivní cysteinové zbytky oddělené od sebe dvěma různými aminokyselinami C-X-X-C. Právě s využitím těchto cysteinových zbytků se PDI v buňce podílí na oxidačně/redukčních reakcích, které mají zásadní význam pro vznik a správné uspořádání intramolekulárních a intermolekulárních disulfidových vazeb při zrání proteinů v endoplazmatickém retikulu. U AGR1 se můžeme setkat s plně funkčním thioredoxinovým motivem v pozici aminokyselin 66-69: C-G-A-C. Naopak v případě AGR2 a AGR3 se musíme spokojit pouze s motivem C-X-X-S (tzv. „*thioredoxin like*“ motiv), který obsahuje cysteinový a serinový zbytek oddělený dvěma libovolnými aminokyselinami. Přestože CXXS obsahuje pouze jeden cysteinový zbytek a ve srovnání s CXXC doménou vykazuje logicky nižší aktivitu, z hlediska reorganizace disulfidových vazeb může i tato doména přispívat k isomerizaci disulfidových vazeb v endoplazmatickém retikulu [6].

### 1.3. Geny kódující AGR proteiny

Kódující sekvence *AGR1* se u člověka nacházejí na chromosomu 1. Velikost genu je přibližně 36 kb, je tvořen celkem 7 exony, které mohou vést ke vzniku 4 různých transkripčních (sestříhových) variant, přičemž translací největšího transkriptu o velikosti 2396 bp vzniká protein tvořený 172 aminokyselinami o molekulové hmotnosti 19,206 kDa. Naopak geny *AGR2* a *AGR3* jsou lokalizovány v těsné blízkosti na krátkém raménku chromosomu 7. Jejich kódující sekvence vykazují značnou míru podobnosti (téměř 72 %) [7]. *AGR2* představuje oblast o velikosti přibližně 42 kb genomové DNA, ve které se vyskytuje celkem 8 exonů. Celkem bylo predikováno 9 různých transkripčních variant, z nichž pouze 5 dává vznik funkčnímu proteinu. Nejčastěji se vyskytující sestříhovou variantou je *AGR2-001*, jejíž translací vzniká polypeptid o velikosti 175 aminokyselin s předpokládanou molekulovou hmotností 19,979 kDa (**obr. 1**). V případě genu *AGR3*, který je tvořen taktéž 8 exony, je predikována možnost vzniku 4 rozdílných transkriptů, z nichž pouze 3 kódují funkční protein. Nejběžnější variantou je protein *AGR3-001* sestávající ze 166 aminokyselin o molekulové hmotnosti 19,171 kDa (**obr. 1**).

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps	
221 bits(562)	5e-78	Compositional matrix adjust.	108/167(65%)	136/167(81%)	12/167(7%)	
AGR2 10	LLLVALSYTLAR	DTTVKPGAKKDTKDSRPKLPQTL	SRGWGDQLI	WTQTYEEA	LYKSKTSN 69	
	LLLVS LA	K	K RP	PQTL	SRGWGD W QTYEE L S	
AGR3 11	LLLVTVSSNLA	---	IAIK-----	KEKRP--	PQTL	SRGWGDDITWVQTYEEGLFYAQKSK 59
AGR2 70	KPLMI IHHLDE	CPH	SQALKKVFAENKEIQKLAE	– QFVLLNLVYETTDKH	LSPDGQYVPRI 128	
	KPLM IHHL	C	SQALKKVFA N EIQ A F	LNL	ETTDK LSPDGQYVPRI	
AGR3 60	KPLMVIHHLED	CQYS	SQALKKVFAQNEEIQEMAQNKFIM	LNLMHETTDKNL	LSPDGQYVPRI 119	
AGR2 129	MFVDPSLTVRADITGRYSNRLYAYEPADTALLLDNMKKALKLL	KTEL	175			
	MFVDPSLTVRADI	GRYSNRLY	YEP D LL	NMKKAL L	EL	
AGR3 120	MFVDPSLTVRADIAGRYSNRLYTYEPRDLPLLIE	NMKKAL	RLIQSEL	166		

**Obr. 1: Primární sekvence proteinů AGR2 a AGR3.** Zeleně jsou znázorněny signální peptidy, červeně thiredoxin like domény a modře retenční sekvence endoplazmatického retikula.

#### 1.4. Funkce AGR proteinů v endoplazmatickém retikulu

Přítomnost AGR proteinů v endoplazmatickém retikulu naznačuje, že by se tyto proteiny mohly podílet na některých z funkcí této buněčné organely. ER představuje významnou součást sekrečních buněčných drah, neboť umožňuje transport látek do perinukleárního prostoru jádra, ale také směrem z buňky ven do extracelulárního prostoru. Mezi další nezastupitelné funkce ER patří významný podíl na regulaci i) metabolismu lipidů, ii) hladiny vápenatých iontů a především pak iii) proteosynézy včetně oligomerizace nascentních polypeptidů. Vlivem celé řady vnějších signálů nebo působením specifických podmínek buněčného mikroprostředí může docházet k narušení funkce endoplazmatického retikula. Buňka se těmto tlakům snaží čelit vyvoláním procesu, který je označován jako stres endoplazmatického retikula, tzv. „*unfolded protein response*“ neboli UPR (pro více informací viz práci: „*Endoplasmic reticulum stress and apoptosis*“, **příloha 1**).

Higa a kol. provedli proteomickou analýzu, jejímž hlavním cílem byla identifikace proteinů, které jsou asociovány s ribozomy drsného ER. V rámci této studie byl mimo jiné identifikován i protein AGR2, který byl lokalizován v lumen ER, kde byla prokázána jeho interakce s ribozomy. Následně byla této interakci přiřazena důležitá úloha v rámci procesu translokace nascentních polypeptidů [8]. Následovaly další práce, ve kterých byla prokázána přímá spojitost mezi UPR a AGR2 [9]. Význam exprese AGR2 pro nádorové buňky a především pak fundamentální úloha AGR2 při udržování homeostázy ER a v rámci odpovědi ER na stres jsou shrnuty v přehledovém článku nazvaném „*Emerging roles for the pro-oncogenic anterior gradient-2 in cancer development*“ (**příloha 2**).

## 2. AGR2 a AGR3 u nádorových onemocnění

Ve vztahu k nádorovým onemocněním byly proteiny AGR2 a AGR3 poprvé popsány u nádorových buněčných linií odvozených od karcinomu mléčné žlázy. Zajímavé bylo především zjištění, že tyto proteiny jsou exprimovány spolu s funkčními estrogenovými receptory (EsR) [7,10], které představují významný prognostický a prediktivní faktor při léčbě zhoubných novotvarů mléčné žlázy. Poté následovalo několik dalších prací, které se zaměřovaly především na protein AGR2 a možnosti jeho využití jako prognostického nebo prediktivního markeru u karcinomů mléčné žlázy [11-13].

### 2.1. Analýza exprese AGR2 a AGR3 u pacientek s karcinomem mléčné žlázy

V návaznosti na tyto práce byl započat výzkum zaměřený na úlohu proteinů rodiny anterior gradient i na našem pracovišti. Jako první byl analyzován konsekutivní soubor 109 pacientek s primárním karcinomem mléčné žlázy, které byly hospitalizovány v Masarykově onkologickém ústavu v letech 2004-2005. V rámci standardizovaného zpracování byly všechny vzorky obdrženy do 20 minut po chirurgickém zákroku a okamžitě zhodnoceny patologem. Nádorová tkáň byla rozkrájena na kousky přibližně 3×3×8 mm, které byly následně zamrazeny v parách tekutého dusíku nebo uloženy ve fixačním roztoku vhodném pro stabilizaci a protekci RNA. Souběžně byla část nádorové tkáně zfixována, dehydratována a z takto upravené tkáně byly připraveny parafinové bloky. Parafinové bloky byly použity pro přípravu tkáňových arrays umožňujících imunohistochemické barvení několika desítek vzorků současně na jednom skle.

Exprese AGR2 byla analyzována ve vztahu k rutinně stanovovaným klinicko-patologickým parametrům a to na úrovni mRNA pomocí RT-qPCR (**tab. 1**) i proteinu imunohistochemicky (**tab. 2**).

**Tab. 1: Stanovení hladiny exprese AGR2 a AGR3 na úrovni mRNA pomocí RT-qPCR.**

Parametr	Celkem vzorků	exprese AGR2 (p-hladina)		exprese AGR3 (p-hladina)	
		Všechny vzorky	EsR-pozitivní vzorky	Všechny vzorky	EsR-pozitivní vzorky
<b>Histologický grade</b>					
G1	29				
G2	38	0,233 <sup>2</sup>	0,565 <sup>2</sup>	<b>0,001</b> <sup>2</sup>	0,177 <sup>2</sup>
G3	41				
<b>Uzlinové metastázy</b>					
Negativní	41	0,488 <sup>1</sup>	0,672 <sup>1</sup>	0,265 <sup>1</sup>	0,600 <sup>1</sup>
Pozitivní	64				
<b>Velikost tumoru</b>					
	109	0,388 <sup>3</sup> Rs 0,084	0,312 <sup>3</sup> Rs 0,108	0,273 <sup>3</sup> Rs 0,107	0,187 <sup>3</sup> Rs 0,143
<b>EsR status</b>					
Negativní	19	<b>0,034</b> <sup>1</sup>	-	<b>&lt;0,001</b> <sup>1</sup>	-
Pozitivní	90				
<b>PR status</b>					
Negativní	24	<b>0,015</b> <sup>1</sup>	-	<b>&lt;0,001</b> <sup>1</sup>	-
Pozitivní	85				
<b>Her2 amplifikace</b>					
Negativní	87	0,451 <sup>1</sup>	0,738 <sup>1</sup>	0,948 <sup>1</sup>	0,657 <sup>1</sup>
Pozitivní	13				
<b>CD1 amplifikace</b>					
Negativní	83	0,350 <sup>1</sup>	0,280 <sup>1</sup>	0,702 <sup>1</sup>	0,436 <sup>1</sup>
Pozitivní	14				
<b>CD1 exprese (%)</b>					
	96	<b>0,005</b> <sup>3</sup> Rs 0,285	<b>0,010</b> <sup>3</sup> Rs 0,290	<b>&lt;0,001</b> <sup>3</sup> Rs 0,386	<b>0,020</b> <sup>3</sup> Rs 0,268
<b>PCNA exprese</b>					
1 (slabá)	19				
2 (střední)	39	0,310 <sup>2</sup>	0,638 <sup>2</sup>	0,347 <sup>2</sup>	0,571 <sup>2</sup>
3 (silná)	36				
<b>Ki67 exprese (%)</b>					
	109	0,525 <sup>3</sup> Rs 0,062	0,075 <sup>3</sup> Rs 0,189	0,816 <sup>3</sup> Rs -0,023	0,169 <sup>3</sup> Rs 0,189

<sup>1</sup> Mannův-Whitneyův U test

<sup>2</sup> Kruskalův-Wallisův ANOVA test

<sup>3</sup> Spearmannova neparametrická korelace



**Tab. 2: Imunohistochemické stanovení klinicko-patologických parametrů ve vztahu k expresi proteinu AGR2.**

Parametr	Celkem vzorků	AGR2 negativní (%)	AGR2 nízká (%)	AGR2 silná (%)	p-hladina	p-hladina*
<b>Histologický grade</b>						
G1	28	5	15	8		
G2	35	8	20	7	0,161 <sup>4</sup>	0,275 <sup>4</sup>
G3	34	14	11	9		
<b>Uzlinové metastázy</b>						
Negativní	39	16	15	8	0,075 <sup>4</sup>	0,070 <sup>4</sup>
Pozitivní	56	11	29	16		
<b>Velikost tumoru</b>						
	98	27	47	24	0,202 <sup>2</sup>	0,310 <sup>2</sup>
<b>EsR status</b>						
Negativní	17	15	2	0	<0,001 <sup>4</sup>	-
Pozitivní	81	12	45	24		
<b>PR status</b>						
Negativní	19	14	5	0	<0,001 <sup>4</sup>	-
Pozitivní	79	13	42	24		
<b>Her2 amplifikace</b>						
Negativní	87	26	41	20	0,308 <sup>4</sup>	0,272 <sup>4</sup>
Pozitivní	11	1	6	4		
<b>CD1 amplifikace</b>						
Negativní	84	25	42	17	0,115 <sup>4</sup>	0,205 <sup>4</sup>
Pozitivní	13	2	5	6		
<b>CD1 exprese (%)</b>						
	97	27	46	24	<b>0,018<sup>2</sup></b>	0,568 <sup>2</sup>
<b>PCNA exprese</b>						
1 (slabá)	22	4	14	4	<b>0,015<sup>4</sup></b>	0,365 <sup>4</sup>
2 (střední)	38	5	22	11		
3 (silná)	36	16	11	9		
<b>Ki-67 exprese (%)</b>						
	97	27	46	24	0,061 <sup>2</sup>	0,151 <sup>2</sup>

\*pouze EsR-pozitivní vzorky

<sup>2</sup>Kruskalův-Wallisův ANOVA test

<sup>4</sup>Pearsonův Chi-square test

Exprese AGR3 byla analyzována pouze pomocí PCR v reálném čase, neboť tehdy ještě nebyla k dispozici vhodná AGR3 specifická protilátka. V případě exprese na úrovni mRNA bylo možné u AGR2 a AGR3 pozorovat obdobný expresní profil ( $p < 0.001$ ), což poukazuje na podobné mechanismy uplatňující se při regulaci exprese AGR2 a AGR3. Exprese obou studovaných genů pak korelovala s přítomností EsR, progesteronových

receptorů (PR) a exprese cyklinu D1 (**tab. 1**). Jediný rozdíl bylo možné pozorovat při analýze exprese vzhledem ke stupni diferenciaci nádoru, neboť histologický grade statisticky významně koreloval pouze s expresí *AGR3* ( $p=0,001$ ). V případě imunohistochemického stanovení *AGR2* vzhledem k rutinně stanoveným klinicko-patologickým parametrům byla opět potvrzena korelace mezi hladinou exprese *AGR2* a přítomností EsR, PR a exprese cyklinu D1. Lze tedy uzavřít, že byl potvrzen trend obdrženy v rámci analýzy exprese na úrovni mRNA. Navíc bylo možné pozorovat statisticky významnou asociaci s expresí PCNA ( $p=0,015$ ) a hraničně s Ki-67 (0,061), tedy markery zvýšené proliferace (**tab. 2**).

Postupně byla přítomnost *AGR* proteinů, především pak *AGR2*, detekována u řady dalších malignit. Po karcinomu mléčné žlázy jsou co do počtu nejčetnější práce zaměřené na studium *AGR2* u karcinomů prostaty. V souvislosti s touto malignitou se na jednu stranu můžeme setkat s publikacemi ukazujícími korelaci mezi zvýšenou expresí *AGR2* a zhoršenou prognózou onemocnění [14], ale naopak i publikacemi, které deklarují, že *AGR2* u tohoto onemocnění žádný prognostický význam nemá [15]. Z hlediska regulace a vlastností *AGR2* je důležitá práce prokazující regulaci exprese *AGR2* prostřednictvím androgenních receptorů [5,16], což je v souladu s našimi výsledky získanými studiem *AGR2* u karcinomů mléčné žlázy a se současným obecným názorem, že exprese *AGR2* je převážně regulována působením hormonů. V podstatě všechny práce se shodují a diskutují možnosti využití *AGR2* jako biomarkeru karcinomu prostaty [17]. Kromě výše zmíněných karcinomů mléčné žlázy a prostaty byla exprese *AGR2* popsána u řady dalších malignit včetně nádorů jícnu, vaječníků, slinivky břišní, jater, žaludku, střev, plic, ledvin a dalších. Podrobnější informace o expresi proteinu *AGR2* v různých typech tkání, a to nejen nádorových, ale i normálních jsou shrnuty v přehledovém článku s názvem „*Anterior gradient 2: a novel player in tumor cell biology*“ (**příloha 3**).

V současné době je onkopatologu u převážné většiny případů karcinomu mléčné žlázy, spolu s klasickými klinicko-patologickými parametry, rutinně stanovována pouze přítomnost funkčních estrogenových (konkrétně estrogenový receptor  $\alpha$ ), progesteronových a HER2 receptorů. Toto je v současné době realita, a to i navzdory neutuchající snaze nalézt nové vhodné biomarkery, které by byly využitelné při diagnostice či léčbě tohoto onemocnění. Tato praxe spolu se skutečností, že přibližně 70-80 % karcinomů mléčné žlázy exprimuje v době diagnózy estrogenové receptory, jež představují nejdůležitější a dnes jediný standardně vyšetřovaný prediktivní faktor pro hormonální léčbu, iniciovaly náš zvýšený zájem o geny *AGR2* a *AGR3*, jejichž zvýšená exprese byla pozitivně asociována právě s přítomností estrogenových receptorů. Skutečně jsme prokázali, že exprese genů *AGR2* i *AGR3* významně

koreluje s přítomností funkčních estrogenových receptorů, a to jak *in vitro* na modelových buněčných liniích, tak i na klinických vzorcích získaných z resekátů odebraných v rámci chirurgických výkonů prováděných v Masarykově onkologickém ústavu v Brně, což dokládají i publikované práce: „*The pro-metastatic protein anterior gradient-2 predicts poor prognosis in tamoxifen-treated breast cancers*“ (příloha 4) a „*Anterior gradient protein 3 is associated with less aggressive tumors and better outcome of breast cancer patients*“ (příloha 5).

### 3. Mechanismy zodpovědné za regulaci exprese AGR2

#### 3.1. Klasický mechanismus účinku EsR

Skutečnost, že exprese *AGR2* a *AGR3* na úrovni mRNA prokazatelně koreluje s expresí EsR, však ještě nemusí nutně znamenat, že hladina proteinů *AGR2* a *AGR3* je přímo regulována působením estrogenů. Prvním krokem proto bylo alespoň nepřímě potvrdit funkční vztah mezi aktivitou EsR a expresí *AGR2*. Do kultivačního média, ve kterém byla kultivována buněčná linie MCF-7 (EsR+, *AGR2*+), bylo přidáváno různé množství 17- $\beta$  estradiolu (dále jen estrogenu) a analyzovány změny hladiny *AGR2*. Tento jednoduchý experiment prokázal, že hladinu proteinu *AGR2* lze pozitivně modulovat přítomností estrogenu, který představuje přirozený ligand EsR (příloha 4). V návaznosti na získané výsledky byla provedena *in silico* analýza potenciální promotorové sekvence *AGR2*, v rámci které byly identifikovány ERE (*estrogen response element*) konsensus sekvence, na které se mohou specificky vázat EsR a přímo tak regulovat transkripci cílových genů. Pomocí chromatinové precipitace byla skutečně potvrzena vazba EsR na promotorové sekvence *AGR2*. Následně byly promotorové sekvence *AGR2* naklonovány do pGL3 plazmidu před sekvencí kódující luciferázu. Získaný konstrukt byl kotransfekován spolu s pSG5-ER $\alpha$  (plazmid exprimující EsR) do buněk H1299 (EsR-, *AGR2*-). Po přidání estrogenu a tamoxifenu bylo možné pozorovat zvýšenou tvorbu luciferázy, což potvrdilo, že exprese *AGR2* je skutečně regulována na úrovni transkripce pomocí EsR (příloha 4).

Po vstupu do cytoplazmy se estrogen váže na EsR, což vede k uvolnění receptoru z komplexu s chaperony, především Hsp90. EsR je fosforylován, dochází k jeho dimerizaci, čímž je v podstatě plně aktivován a translokován do jádra, kde plní funkci transkripčního faktoru, neboť se následně váže na promotory genů obsahujících ERE místa. Význam funkčních EsR v etiologii karcinomu mléčné žlázy dokládá řada prací. V rámci expresního profilování zaměřeného na geny regulované EsR bylo pomocí čipové analýzy odhaleno více

než 400 genů, u kterých docházelo k významným změnám v expresi v rámci odpovědi na působení estrogenu, a co je zajímavé, u většiny z nich (cca 70%) byla exprese snížena [18]. Především se jednalo o proapoptotické geny, antiproliferační geny a geny kódující transkripční represory. Naopak zvýšená exprese byla pozorována především u genů uplatňujících se při pozitivní regulaci buněčné proliferace, jako jsou růstové faktory či regulátory buněčného cyklu umožňující jeho progresi. I z této práce a mnoha dalších vyplývá, že aktivované EsR indukují expresi proonkogenů a expresi tumor supresorových genů naopak potlačují.

Je tedy nasnadě, že vzhledem k frekvenci výskytu EsR u karcinomů mléčné žlázy a zvýšené hladině hormonů představuje inhibice exprese EsR významný terapeutický přístup. Léčba tamoxifenem je standardní léčebnou modalitou karcinomu mléčné žlázy již od 70. let minulého století a je úspěšně používána až doposud právě u EsR-pozitivních nádorů, které představují více jak 70 % všech případů tohoto onemocnění [19]. Mechanismus účinku tamoxifenu spočívá v kompetitivní inhibici s ligandy, které se váží na EsR, tedy především estrogenu. Nicméně i přes jednoznačný přínos tamoxifenu v léčbě nádorových onemocnění mléčné žlázy, který se odráží především v delším celkovém přežití pacientek, se u řady případů EsR-pozitivních karcinomů po čase objevuje rezistence k tamoxifenu a vyskytují se i případy, kdy bezprostředně po nasazení tamoxifenu nebyl zaznamenán žádný pozitivní léčebný efekt. Jinými slovy se můžeme setkat i s případy, kdy jsou nádory k tamoxifenu rezistentní *de novo*. Dále se odhaduje, že asi u 40 % případů dochází v rámci adjuvantní terapie založené na tamoxifenu ke vzniku rezistence, která vede k relapsu onemocnění a případně i k úmrtí. Možnost predikovat rezistenci k tamoxifenu by tedy mohla významně přispět ke zvýšení účinnosti léčby. O to zajímavější a překvapivější bylo naše zjištění, že působením tamoxifenu dochází k razantnímu zvýšení exprese *AGR2 in vitro* i *in vivo*, a to jak na úrovni mRNA, tak i proteinu (**příloha 4**). Ve světle funkčních studií, které potvrdily, že *AGR2* má schopnost inhibovat nádorový supresor p53 [20,21], může být zodpovědný za tvorbu metastáz [22] a přímo se podílet na zvýšené proliferaci a migraci nádorových buněk [23] a spolu s našim zjištěním, že tamoxifen indukuje expresi *AGR2*, lze spekulovat, že by se *AGR2* mohl přímo uplatňovat při mechanismech zodpovědných za rezistenci karcinomů mléčné žlázy k tamoxifenu a jeho zvýšená exprese by mohla predikovat sníženou citlivost právě k léčbě tamoxifenem.

Analýza exprese *AGR2* na úrovni mRNA pomocí RT-qPCR na konsekutivním souboru pacientek s EsR-pozitivním karcinomem mléčné žlázy léčených tamoxifenem potvrdila, že pacientky s nižší hladinou *AGR2* vykazují významně delší bezpříznakové přežití v porovnání

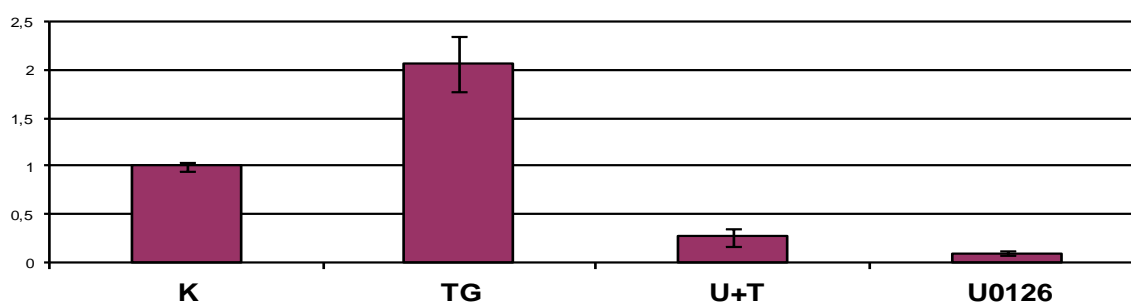
s pacientkami se zvýšenou expresí *AGR2* (**příloha 4**). Možnou úlohu *AGR2* v mechanismech zodpovědných za rezistenci k tamoxifenu dokresluje i naše navazující práce „*AGR2 predicts tamoxifen resistance in postmenopausal breast cancer patients*“ (**příloha 6**), v rámci které byla provedena retrospektivní analýza exprese *AGR2* v „tru-cut“ jehlových biopsiích odebraných od pacientek s EsR-pozitivním karcinomem mléčné žlázy, které nemohly být z důvodu vysokého věku nebo celkové sešlosti operovány a byl jim pouze v rámci adjuvantní léčby podáván tamoxifen. Na tomto souboru postmenopauzálních pacientek bylo možné přímo sledovat odpověď na podávanou terapii vzhledem k expresi *AGR2* v nádorové tkáni, která byla stanovena nejen na úrovni mRNA pomocí RT-qPCR, ale i na úrovni proteinu pomocí imunohistochemického barvení. Tato studie skutečně naznačila možnost využití *AGR2* jako prediktivního markeru v rámci endokrinní terapie karcinomu mléčné žlázy, neboť na základě snížené hladiny mRNA genu *AGR2* bylo možné identifikovat skupinu pacientek, které odpovídaly na terapii, a tudíž docházelo k regresi onemocnění (HR 0,57; 95% IS 0,31 - 0,96;  $p = 0,0366$ ) a na druhou stranu u pacientek se zvýšenou expresí *AGR2* se v mnohem vyšší frekvenci objevovaly případy, kdy léčba tamoxifinem nebyla účinná, nebo dokonce docházelo i k progresi onemocnění ( $p = 0,0011$ ) [24]. Právě v těchto případech by pak zvýšená hladina mohla predikovat rezistenci k tamoxifenu a pacientkám by měly být indikovány jiné terapeutické režimy.

### 3.2. Neklasický mechanismus účinku EsR

Kromě genomového tzv. klasického mechanismu účinku EsR se můžeme setkat i s tzv. neklasickým mechanismem účinku, kdy receptor může interagovat s jiným transkripčním faktorem, nejčastěji Sp-1 (*specific protein-1*) nebo AP-1 (*activator protein-1*) a zesilovat tak intenzitu transkripce cílových genů, jejichž promotorové sekvence nemusí nutně obsahovat ERE místo [25]. Skutečnost, že v promotoru genu *AGR2* bylo *in silico* predikováno vazebné místo pro transkripční faktor AP-1, umocnila naše spekulace, že by se tento transkripční faktor mohl podílet na regulaci exprese *AGR2* ať už v komplexu s EsR nebo na tomto steroidním receptoru nezávisle a iniciovala naši snahu prokázat nebo naopak vyvrátit tento potenciální regulační mechanismus. AP-1 je transkripční faktor indukovatelný působením řady hormonů a růstových faktorů. K jeho vytvoření dochází dimerizací transkripčních faktorů Fos a Jun mechanismem leucinového zipu. Při modulaci transkripční aktivity AP-1 se uplatňuje řada signálních drah, mezi nejčastější patří ERK1/2, JNK či p38 MAPK. Je zajímavé, že právě zablokováním MEK1/2 respektive ERK1/2 signální dráhy pomocí inhibitoru PD98059 lze výrazně potlačit expresi proteinu *AGR2* [26]. Tuto skutečnost jsme

potvrdili i pomocí inhibitoru MAP kináz MEK1/2 označeného U0126. Popsané výsledky nepřímo naznačují na možnou regulaci exprese *AGR2* působením aktivované ERK1/2 signální dráhy, která může úzce souviset s aktivací AP-1 právě v rámci neklasického mechanismu účinku EsR.

Prvním krokem při snaze prokázat predikovanou vazbu AP-1 na promotor genu *AGR2* bylo provedení chromatinové imunoprecipitace (ChIP). Pomocí 1% formaldehydu byl vytvořen „cross-link“ mezi DNA a proteiny, následovala lýze buněk a sonikace vedoucí k fragmentaci DNA. Buněčný lysát byl inkubován s c-Jun specifickou protilátkou s cílem precipitovat komplex AP-1 s navázanými fragmenty DNA. Pomocí PCR v reálném čase byla identifikována a současně kvantifikována *AGR2* promotorová sekvence, na kterou se navázal AP-1. Pro experiment byla použita buněčná linie MCF-7, jež byla vystavena působení thapsigarginu (indukce ER stresu vedoucí ke zvýšené expresi *AGR2*), U0126 (inhibitor MEK1/2) a kombinaci obou látek (**obr. 2**).

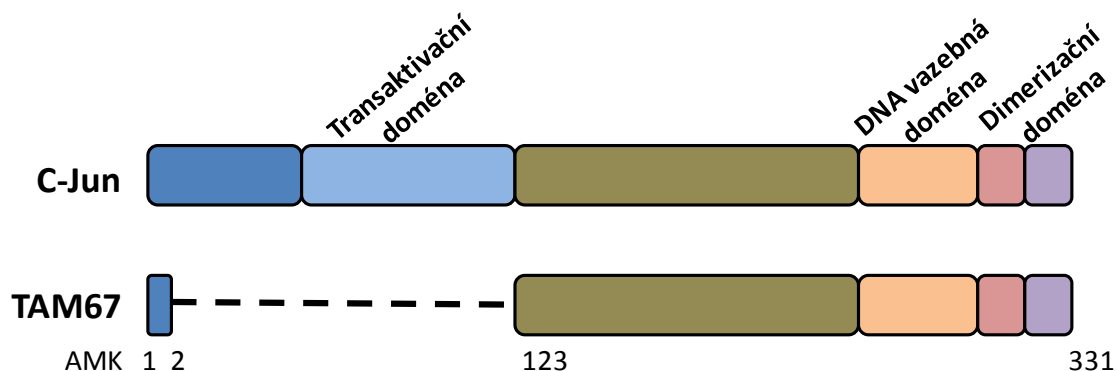


**Obr. 2:** *Analýza vazebné afinity AP-1 k promotoru AGR2 pomocí ChIP. Změny v intenzitě vazby transkripčního faktoru AP-1 na promotor genu AGR2 u buněčné linie MCF-7, která byla vystavena působení thapsigarginu (TG), inhibitoru MEK1/2 (U0126) a jejich kombinaci (U+T) byly relativně kvantifikovány vzhledem ke kontrolním buňkám (K).*

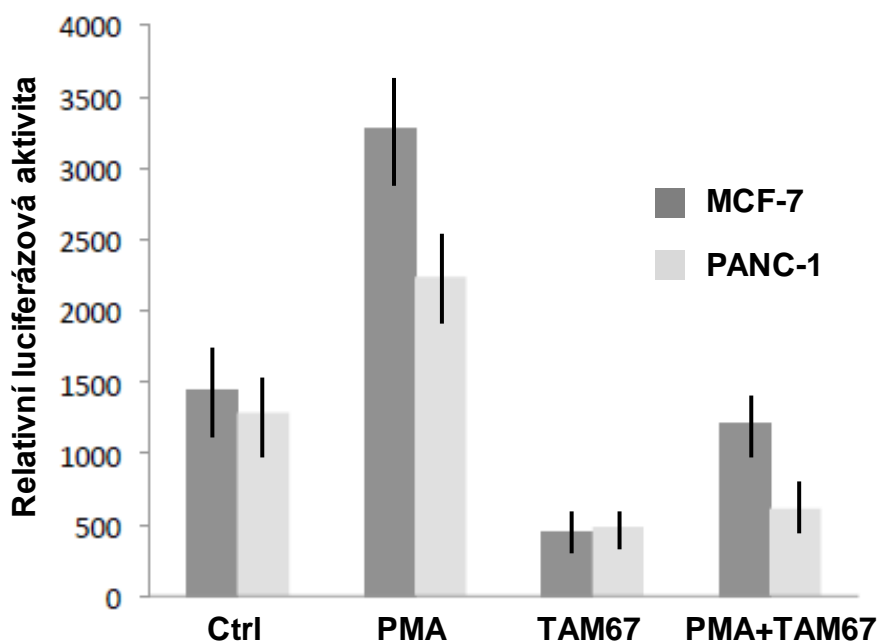
Jak vyplývá z graficky zobrazených výsledků, při indukcí stresu ER působením thapsigarginu docházelo k výraznému zvýšení afinity AP-1 transkripčního faktoru k promotoru *AGR2*. Naopak po působení U0126 se AP-1 transkripční faktor vázal na *AGR2* promotor v mnohem nižší míře v porovnání s kontrolními buňkami. Stejně tak kombinované působení thapsigarginu a U0126 vedlo ke snížení hladiny AP-1, respektive jeho vazebné afinity (**obr. 2**).

S cílem funkčně potvrdit vztah mezi AP-1 a expresí *AGR2* jsme připravili expresní vektor pcDNA3.2-GW-TAM67 nesoucí nekompletní kódující sekvenci proteinu c-Jun, postrádající N-koncovou transaktivační doménu (**obr. 3**). Vzniklý mutovaný protein označený

jako TAM67 vykazuje dominantně negativní efekt vůči *wild-type* c-Jun, který se projevuje inhibicí aktivity AP-1 komplexu [27]. Schopnost TAM67 inhibovat AP-1 byla následně ověřena pomocí reportérového luciferázového systému (**obr. 4**).

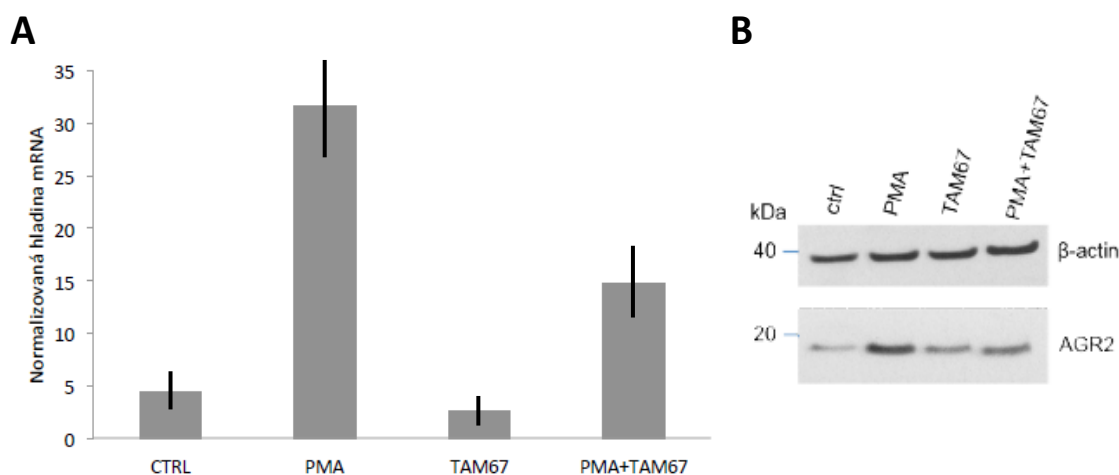


**Obr. 3: Struktura proteinů c-Jun a TAM67.** Dominantně negativní mutant proteinu c-Jun postrádající N-koncovou transaktivační doménu TAM67 má celkovou velikost 210 aminokyselin (AMK) v porovnání s wild-type proteinem c-Jun, jenž má velikosti 331 aminokyselin.



**Obr. 4: Stanovení transkripční aktivity AP-1.** Transkripční aktivita byla ověřena reportérovým testem na buněčných liniích MCF-7 a PANC-1. Buňky byly tranzientně transfekovány p3TPluc plazmidem nesoucím gen kódující luciferázu, před kterým je umístěna regulační sekvence, na niž se specificky může vázat transkripční faktor AP-1 a aktivovat tak expresi genů nacházejících se v bezprostřední blízkosti. Relativní luciferázová aktivita vyjadřuje transkripční aktivitu AP-1 responzivního místa, která je aktivována 20 nM PMA (forbolmyristátacetát) a inhibována transfekcí 1 µg plazmidu pcDNA3.2-GW-TAM67.

Dalším krokem bylo studium vlivu transkripčního komplexu AP-1 na expresi genu *AGR2* s cílem prokázat případné zapojení AP-1 v regulaci exprese tohoto genu. Jako modelový systém byla vybrána buněčná linie MCF-7, do které byl transientně transfekován plazmid pcDNA3.2-GW-TAM67 umožňující expresi AP-1 dominantně negativního mutantu TAM67 nebo pouze prázdný plazmid pcDNA3.2-GW. Poté byly transfekované buňky vystaveny působení PMA (forbolmyristátacetát), který působí mj. i jako aktivátor transkripce prostřednictvím AP-1. Změny v expresi *AGR2* byly stanoveny pomocí RT-qPCR po 24 hod kultivaci (**obr. 5A**) a imunochemicky po 72 hod (**obr. 5B**). PMA indukoval expresi *AGR2* na úrovni mRNA i proteinu. Avšak v případě, že v buňkách docházelo k produkci AP-1 dominantně negativního mutantu TAM67, jsme pozorovali výrazně nižší hladiny *AGR2*.



**Obr. 5: Exprese *AGR2* v důsledku ovlivnění aktivity AP-1 transkripčního komplexu. Stanovení hladiny *AGR2* na úrovni mRNA (A) a proteinu (B) na buněčné linii MCF-7.**

### 3.3. Negenomová aktivita EsR

Ačkoli přítomnost funkčních EsR sama o sobě představuje významný prediktor efektivity endokrinní terapie, funkční interakce mezi EsR a dalšími signálními dráhami, které se uplatňují při regulaci buněčného růstu, při odpovědi na stresové podmínky, reakci na zvýšenou hladinu cytokinů apod. byly též popsány jako významný mechanismus vedoucí/přispívající k rezistenci k endokrinní terapii. Hovoříme o tzv. negenomové aktivitě EsR, kdy je receptor obvykle asociován s plazmatickou membránou a vytváří komplexy s dalšími proteiny, především tyrosinkinázovými receptory nebo proteiny G. Tyto interakce obvykle vedou k aktivaci proproliferčních buněčných signálních drah, jako jsou např.



MAPK/ERK nebo PI3K/AKT [28]. Klinická relevance této formy komunikace EsR se signálními dráhami aktivovanými působením růstových faktorů byla potvrzena i prospektivními klinickými studii na souborech pacientek s metastatickým onemocněním. Tyto studie potvrdily spojení mezi rezistencí k tamoxifenu a zvýšenou hladinou tyrosinkinázových receptorů HER2 a EGFR [29].

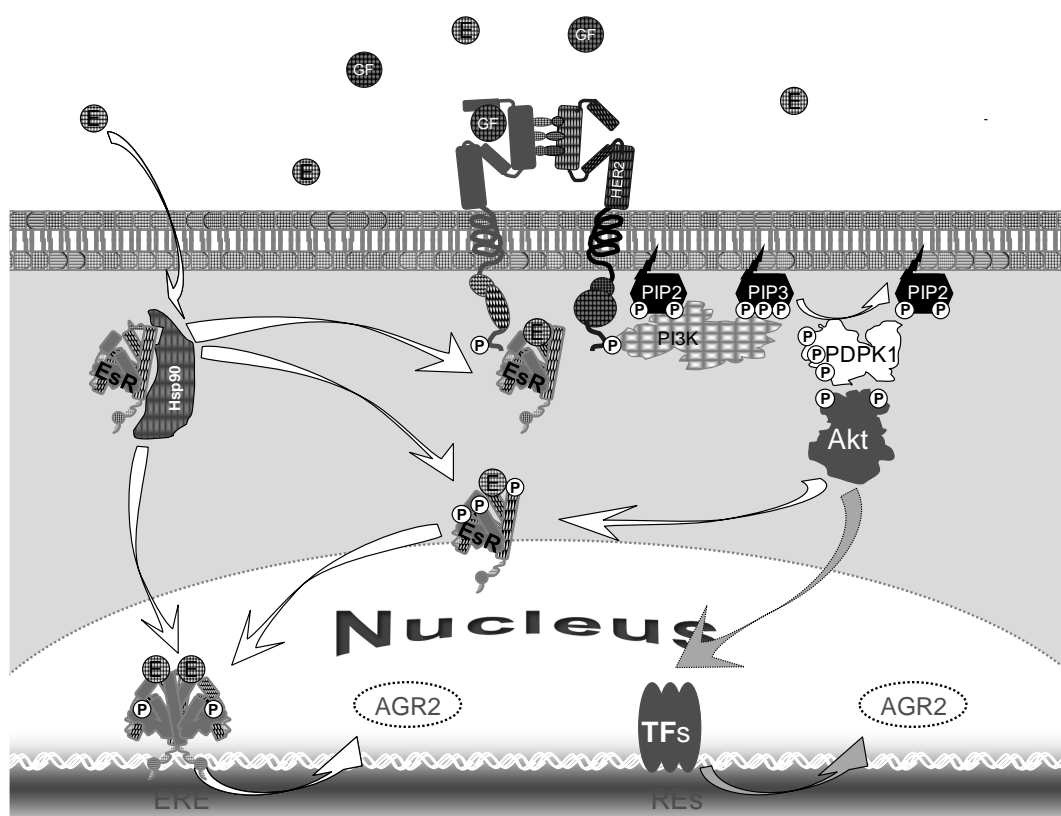
Na možnou spojitost mezi expresí AGR2 a EGFR poukázali ve své práci Dong a kol., kteří testovali hypotézu, zda může protein AGR2 ovlivňovat buněčnou signalizaci řízenou receptory EGFR [30]. V souvislosti s tím byla zjištěna korelace mezi expresí AGR2 a hladinou proteinu AREG (amfiregulin) v buňkách pocházejících z různých typů lidských adenokarcinomů. AREG představuje významný ligand EGFR receptoru, po jehož vazbě dochází k fosforylaci receptoru a iniciaci signalizace aktivující další signální dráhy včetně PI3K/AKT. Posléze se podařilo potvrdit, že AGR2 se přímo uplatňuje při regulaci hladiny AREG, a to jak na úrovni mRNA, tak i proteinu a tudíž může tímto způsobem aktivovat EGFR a PI3K/AKT signální dráhu [30].

Možnost regulace exprese AGR2 i některým z alternativních mechanismů naznačuje i již výše zmíněná práce Zweitzig a kol., v níž autoři ukazují, že exprese AGR2 může být u karcinomů mléčné žlázy ovlivňována i fyziologickým stresem, jako je např. hypoxie či hladovění a že při inhibici ERK1/2 dochází k signifikantní redukci hladiny AGR2 [26].

Další indicií byly výsledky skríningu potenciálních nízkomolekulárních inhibitorů různých buněčných signálních drah v kombinaci s genetickým skrínem pomocí RNA interference, který provedli Iorns a kol. s cílem nalézt nové inhibitory a identifikovat signální dráhy, které se uplatňují při vzniku rezistence k tamoxifenu [31]. Pomocí tohoto přístupu byly skutečně nalezeny dvě sloučeniny triciribin a tetrandrin, které způsobovaly sensitizaci nádorových buněk k tamoxifenu, přičemž byly následně verifikovány jako inhibitory PDPK1-AKT signální dráhy.

Vzhledem k našim předchozím výsledkům potvrzujícím důležitou úlohu AGR2 při rezistenci k tamoxifenu a v návaznosti na uvedené práce jsme se zaměřili na analýzu vztahu mezi působením tamoxifenu, expresí AGR2 a AKT signální dráhou. Prvním krokem byl průkaz vztahu mezi expresí AGR2 a fosforylací AKT na serinu 473 působením tamoxifenu a v kombinaci s působením AKT specifických inhibitorů v čele s triciribinem, terandrinem a Akti-1/2. Při tomto pokusu jsme dle předpokladu pozorovali indukci exprese AGR2 v rámci buněčné odpovědi na expozici tamoxifenu, přičemž míra fosforylace AKT na serinu 473 zůstávala nezměněna. Avšak aplikace AKT inhibitorů vedla nejen k významnému snížení fosforylace AKT na serinu 473, ale i k redukci hladiny AGR2, což ostatně dokládá práce

nazvaná: „*Identification of an AKT-dependent signalling pathway that mediates tamoxifen-dependent induction of the pro-metastatic protein anterior gradient-2*“ (**příloha 7**). Naše výsledky potvrdily, že exprese AGR2 může být přímo regulovaná AKT signální dráhou. Toto tvrzení podpořil i další pokus, v rámci kterého jsme se zaměřili na modulaci hladiny PDPK1 kinázy, která je přímým aktivátorem AKT kinázy. Při indukci AGR2 působením tamoxifenu jsme mohli pozorovat signifikantní snížení hladiny AGR2 při umlčení exprese PDPK1 působením specifických siRNA (**příloha 7**). Funkční vztah mezi AKT signální dráhou a AGR2 pak potvrdila i retrospektivní studie na souboru 94 primárních karcinomů mléčné žlázy, v rámci které byla prokázána statisticky významná korelace mezi expresí AGR2 a fosforylací AKT (**příloha 7**). Schematické zobrazení modulace exprese AGR2 v rámci komunikace mezi EsR a AKT signální dráhou viz **obr. 6**.

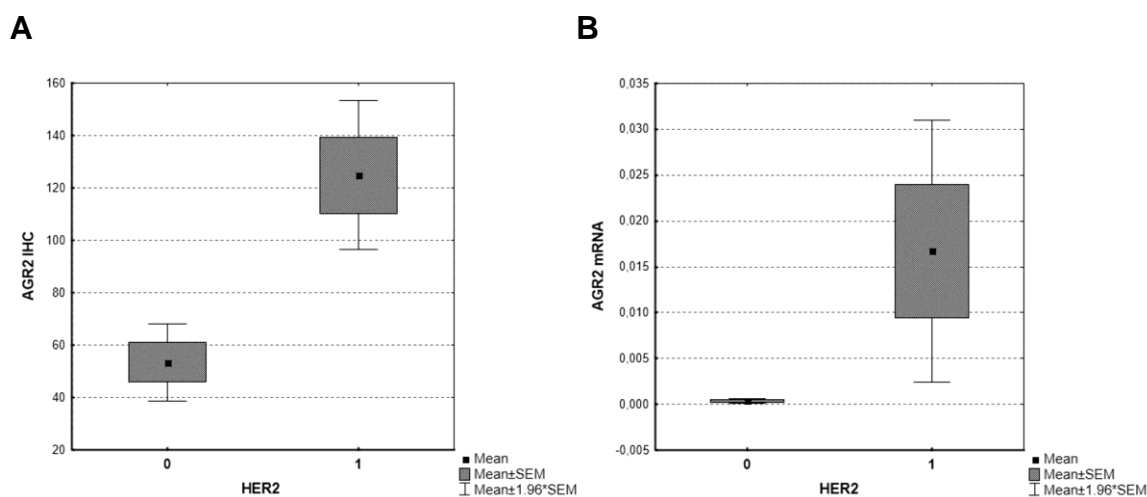


**Obr. 6:** *Potenciální mechanismy regulace exprese AGR2. AGR2 exprese může být regulována: i) přímo (genomicky) vazbou EsR na ERE místa a indukcí transkripce, ii) nengenomicky aktivací pro-onkogenních buněčných signálních drah.*

Další důkaz o úloze AGR2 při změně fenotypu nádorových buněk z tamoxifen-senzitivních na tamoxifen-rezistentní přináší práce Wright a kol., kteří studovali vazbu komplexu tamoxifen-EsR na promotor genu *AGR2* a následnou indukci exprese *AGR2* [32]. V souladu s našimi výsledky ukázali, že zvýšená exprese *AGR2* indukuje buněčnou proliferaci buněk nejen citlivých k tamoxifenu, ale i rezistentních. V souvislosti s tím zjistili, že v případě tamoxifen-senzitivních buněk je zvýšená exprese *AGR2* přímo závislá na přítomnosti EsR a zvýšená hladina *AGR2* následně zprostředkovává zvýšenou expresi EsR. Naopak u tamoxifen-rezistentních buněk není exprese *AGR2* závislá na funkčních EsR, avšak EsR stále vyžadují přítomnost *AGR2*, což naznačuje, že u tamoxifen-rezistentních buněk dochází k deregulaci zpětnovazebné smyčky EsR-*AGR2*-EsR. Autoři dále ukazují, že v případě tamoxifen-rezistentních nádorů se na aktivaci exprese *AGR2* podílí transkripční faktor FOXA1, který obecně hraje důležitou úlohu ve fyziologii buněk odvozených od karcinomů mléčné žlázy a který je schopen udržovat zvýšenou expresi *AGR2* nezávisle na expresi EsR [32].

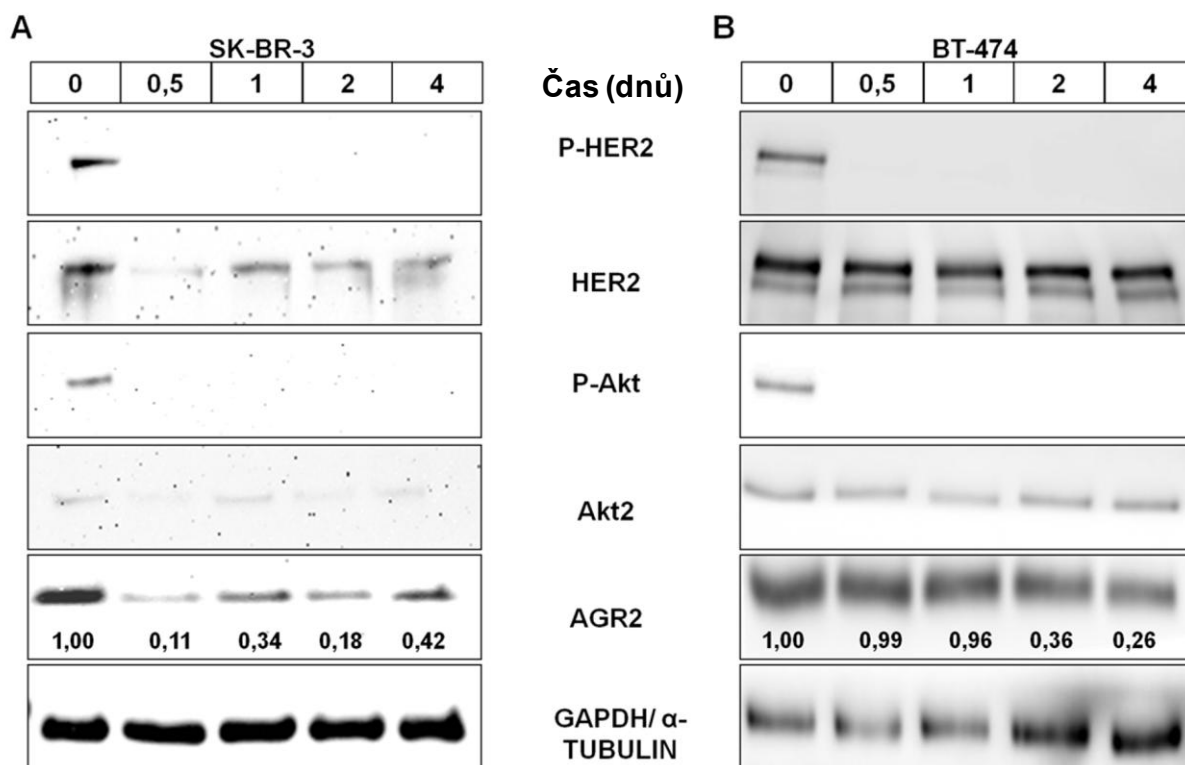
#### **3.4. Exprese *AGR2* u karcinomů mléčné žlázy nezávislá na EsR**

Možnou spojitost mezi expresí receptorů HER2 a proteinem *AGR2* již naznačily výsledky v naší výše zmiňované práci „*Identification of an AKT-dependent signalling pathway that mediates tamoxifen-dependent induction of the pro-metastatic protein anterior gradient-2*“ (příloha 7), kde popisujeme mimo jiné i marginální korelaci mezi imunohistochemicky stanovenou expresí *AGR2* a přítomností receptorů HER2. Receptory HER2 byly determinovány z toho důvodu, že patří mezi možné regulátory PDPK1/AKT signální dráhy. Dalším podpůrným faktem pro započetí studia vztahu mezi *AGR2* a HER2 byla skutečnost, že exprese proteinu *AGR2* byla prokázána i u karcinomů mléčné žlázy (byť méně často), které nedisponují funkčními EsR. Zaměřili jsme se tudíž i na studium karcinomů mléčné žlázy, kde funkční EsR nebyly přítomné. *AGR2* exprese byla prokázána u přibližně 60 % z celkového počtu 211 analyzovaných vzorků. Následující statistická analýza odhalila významnou korelaci ( $p < 0,001$ ; Mannův-Whitneyův U test) mezi expresí *AGR2* a přítomností receptoru HER2 (obr. 7).



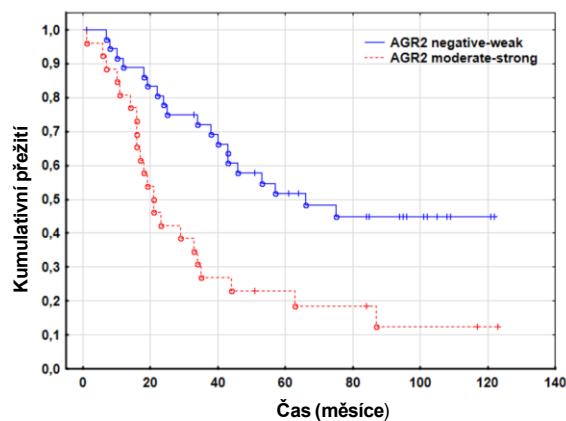
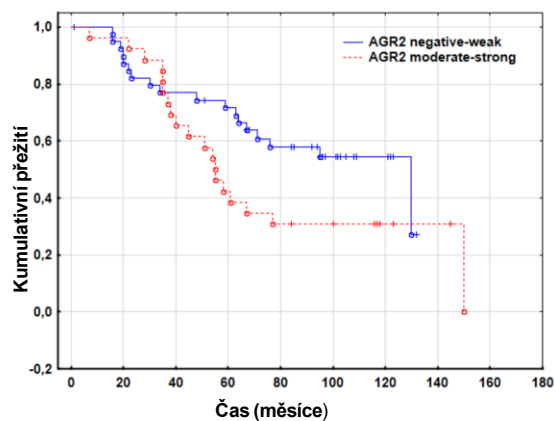
**Obr. 7: Analýza hladiny AGR2 ve vztahu k expresi receptorů HER2.** (A) Expze AGR2 i HER2 byla stanovena pomocí imunohistochemického barvení. V případě AGR2 byla expze definována pomocí tzv. histoskóre, které bylo vypočítáno jako součin intenzity barvení ve škále 0-3 a procenta pozitivních buněk pohybujícího se v rozmezí hodnot 0-100. Expze HER2 byla stanovena rutinně pomocí HercepTestu ve škále 0-3. Pro vlastní analýzu byly použity případy HER2 0-1 vs. 2-3, přičemž u všech případech stanovených jako „2“ byla ještě provedena validace HER2 amplifikace pomocí FISH. (B) Analýza HER2 stanoveného pomocí IHC ve vztahu k expresi AGR2 na úrovni transkripce.

Následná analýza hladiny mRNA genu AGR2 vzhledem k expresi HER2 jednoznačně potvrdila trend pozorovaný na úrovni proteinu ( $p < 0,001$ ; Mannův-Whitneyův U test). Na základě dat získaných z této retrospektivní studie bylo našim dalším cílem prokázat funkční vztah mezi HER2 receptory a AGR2. Pro tyto účely byla zvolena buněčná linie SK-BR-3, u které byla dříve prokázána tvorba proteinu AGR2. Tato linie byla ustavena z karcinomu mléčné žlázy, který byl EsR a PR negativní, ale HER2 pozitivní. Jako alternativní model byly použity buňky BT-474, které mají funkční EsR, avšak současně jsou i HER2-pozitivní. Obě buněčné linie byly vystaveny působení lapatinibu, nízkomolekulárnímu inhibitoru EGFR a HER2. Z předložených imunochemických analýz je jasně patrné, že působením lapatinibu docházelo k inhibici HER2 receptorů, AKT signální dráhy a současně i k viditelnému snížení expze AGR2, a to především u buněčné linie SK-BR-3 (**obr. 8A**). V případě buněčné linie BT-474 byl podobný efekt pozorován až v pozdějších časových intervalech. Potenciálním důvodem mohou být aktivní EsR, které představují alternativní možnost pozitivní regulace AGR2 nezávisle na HER2 receptorech (**obr. 8B**).



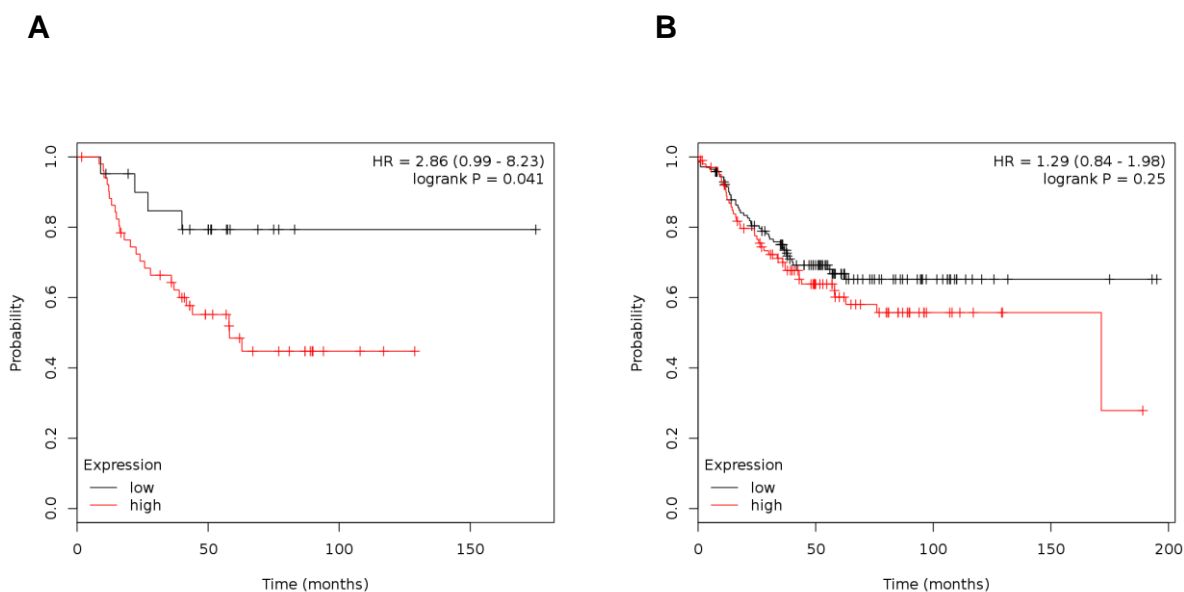
**Obr. 8: Vliv inhibice receptoru HER2 na buněčnou signalizaci a expresi AGR2.** Buněčné linie (A) SK-BR-3 a (B) BT-474 byly vystaveny působení 1 nM lapatinibu po dobu uvedenou v horní části obrázku. Poté byly buňky sklizeny a imunochemicky stanovena exprese vybraných proteinů.

Uvedené výsledky naznačují, že aktivní receptory HER2 se mohou přímo uplatňovat při regulaci exprese AGR2, zřejmě aktivací PI3K/AKT signální dráhy, což do značné míry vysvětluje i výskyt relativně vysoké exprese AGR2 u karcinomů mléčné žlázy negativních pro EsR a PR, ale pozitivních pro HER2. Vzhledem ke skutečnosti, že AGR2 protein vykazuje proonkogenní vlastnosti, byla provedena statistická analýza s cílem zjistit, zda se zvýšená exprese AGR2 u tohoto molekulárního subtypu (EsR-, PR-, HER2+) nějakým způsobem promítá do bezpříznakového (Disease Free Survival, DFS) či celkového (Overall Survival, OS) přežití pacientek (**obr. 9**).

**A****B**

**Obr. 9: Expres AGR2 vzhledem k přežití pacientek s EsR-, PR-, HER2+ karcinomem mléčné žlázy.** Kaplanova-Meierova analýza (A) bezpříznakového a (B) celkového přežití, kdy modrá křivka znázorňuje případy, kdy AGR2 exprese byla stanovena jako negativní nebo slabá (histoscore <50), naopak červená křivka reflektuje případy se zvýšenou hladinou AGR2 (histoscore  $\geq 50$ ).

Naše výsledky zřetelně ukazují, že zvýšená hladina AGR2 představuje negativní prognostický faktor u karcinomů mléčné žlázy, které nemají funkční estrogenové a progesteronové receptory a současně disponují receptory HER2. Paralelní analýza hladiny AGR2 na úrovni transkripce s využitím on-line webové databáze nazvané „Kaplan-Meier Plotter“ (<http://kmplot.com/analysis/index.php?p=service>) pak pouze potvrdila spojitost mezi zvýšenou hladinou AGR2 a zhoršeným přežitím pacientek s EsR-, PR-, HER2+ karcinomem mléčné žlázy (**obr. 10**). Z obrázku je jasně patrný význam přítomnosti HER2 receptorů, která se s velkou pravděpodobností promítá do pozitivní regulace exprese AGR2 a zvýšená hladina exprese AGR2 pak negativně ovlivňuje délku bezpříznakového přežití pacientek. Jinými slovy i tato analýza provedená na nezávislém souboru (n = 73) prokázala, že zvýšená exprese AGR2 může významně přispívat k negativní prognóze pacientek s karcinomy mléčné žlázy, které nemají funkční EsR a PR receptory, ale naopak mají pozitivní HER2 receptory.



**Obr. 10: Metaanalýza vlivu exprese AGR2 na prognózu onemocnění.** Kaplanova-Meierova analýza u kohorty (A) *EsR*-, *PR*-, *HER2*+karcinomů mléčné žlázy,  $p = 0,041$  a (B) *EsR*-, *PR*-karcinomů mléčné žlázy bez ohledu na status *HER2* receptorů,  $p = 0,25$ .

#### 4. Studium funkce proteinů AGR2 a AGR3 na buněčné (molekulární) úrovni

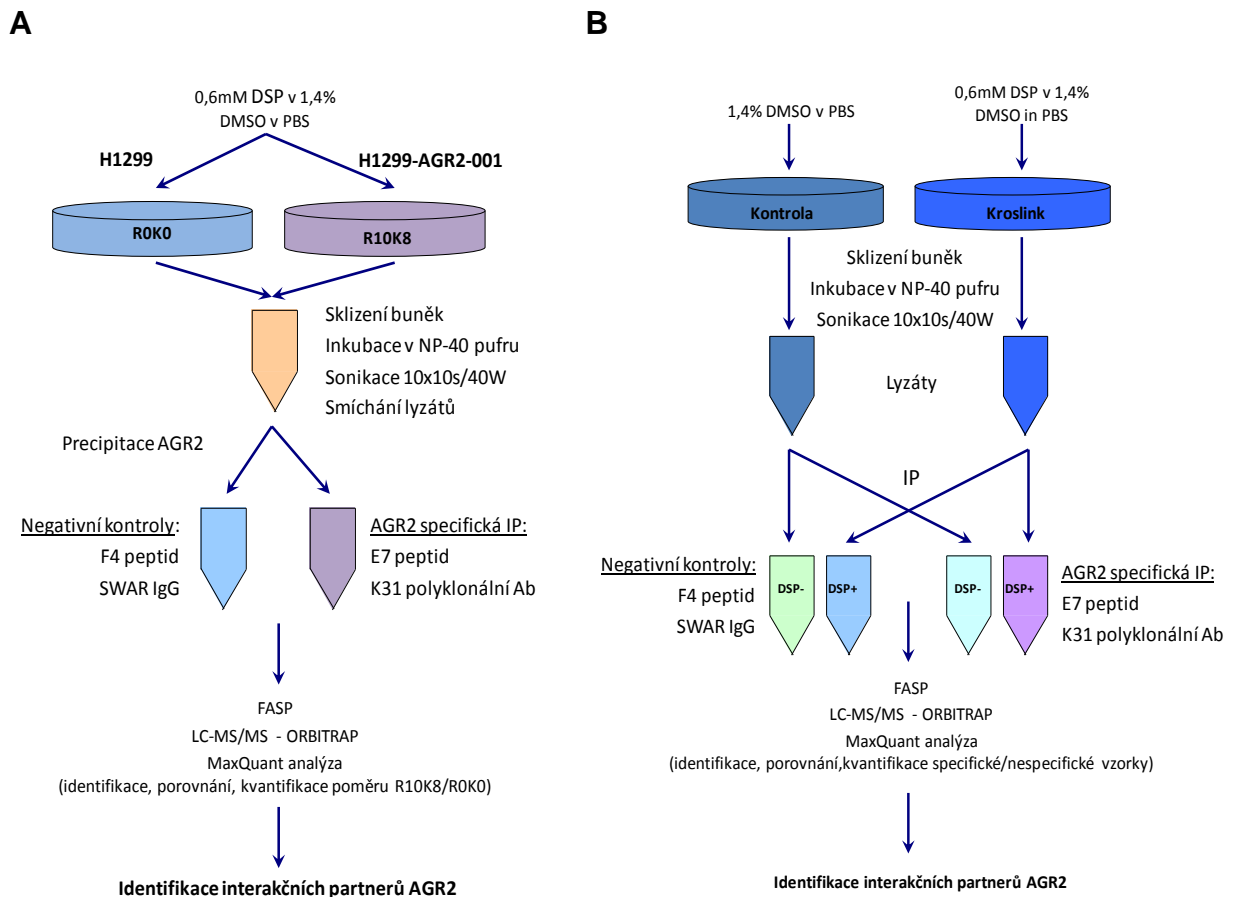
Informace týkající se signálních drah či faktorů zodpovědných za zvýšenou expresi AGR2/3 v nádorových buňkách jsou prozatím značně omezené. Doposud byl podrobněji charakterizován především protein AGR2. Mezi stěžejní patří práce Liu a kol., ve které autoři studují AGR2 ve vztahu k metastazování a v podstatě potvrzují signifikantní úlohu AGR2 při tvorbě metastáz [22]. V návaznosti na tuto práci pak Wang a kol. pomocí *in vitro* i *in vivo* modelů prokázali přímý vliv zvýšené exprese AGR2 na iniciaci neoplastické transformace a zesílenou schopnost buněk migrovat [23]. Tato zjištění jsou mj. i v souladu s výsledky práce ukazující, že protein AGR2 interaguje s C4.4a a DAG-1, o kterých je známo, že se výraznou měrou uplatňují při tvorbě metastáz [33]. Tuto skutečnost podtrhuje i práce, ve které je popsán vývoj nové terapeutické protilátky, pomocí které je možné zablokovat interakci mezi extracelulárně produkovaným proteinem AGR2 a C4.4a receptorem, což ve svém důsledku vedlo k výrazné redukci růstu nádorů a metastazování *in vivo* na testovaných myších xenograftech [34].

#### 4.1. Identifikace interakčních partnerů proteinu AGR2

Přestože protein AGR2 představuje poměrně zajímavý terapeutický cíl a skutečnost, že na svém C-konci nese tzv. ER retenční sekvenci, která předznamenává přítomnost tohoto proteinu v endoplazmatickém retikulu, kde se podílí na skládání a zrání řady proteinů, nejsou k dispozici žádné další práce, které by mapovaly AGR2 interakční partnery. Jedinou výjimku tvoří soubor několika prací, ve kterých je popisována spojitost mezi expresí AGR2 a tvorbou mucinů, konkrétně MUC2, MUC5AC, MUC5B a MUC1 [35-37].

Provedli jsme tedy LC-MS/MS analýzu s cílem najít další interakční partnery proteinu AGR2. Paralelně byly použity dva na sobě nezávislé modelové systémy a dva různé přístupy. V prvním případě byla použita buněčná linie H1299 (AGR2 negativní) a z ní odvozená buněčná linie H1299-AGR2-001 (buňky H1299, do kterých byl stabilně vnesen expresní vektor umožňující produkci AGR2). Buňky H1299 byly kultivovány v lehkém médiu (R0K0), zatímco H1299-AGR2-001 byly kultivovány v těžkém médiu (R10K8). Před samotným sklizením a následnou lýzou byly takto kultivované buňky inkubovány s DSP (Dithiobis[succinimidylpropionát]) s cílem vytvořit mezi buněčnými proteiny reverzibilní kroslinky. Získané buněčné lyzáty byly smíchány v hmotnostním poměru 1:1 a následovala imunoprecipitace pomocí „*in house*“ připravené králičí polyklonální protilátky rozpoznávající AGR2. Druhou alternativou bylo použití biotinylovaného peptidu pracovně nazývaného E7 (biotin-SGSGPTTIYY), který se specificky váže na AGR2 [38] (**obr. 11A**). V rámci druhého přístupu byla použita buněčná linie T-47D, pro kterou je typická silná endogenní exprese AGR2. Pomocí tohoto experimentu byl současně testován efekt kroslinkování na zachycení transientních málo stabilních interakcí, respektive identifikaci falešně pozitivních interakčních partnerů. Polovina buněk byla opět vystavena působení DSP a druhá byla použita jako kontrola. Následně probíhala imunoprecipitace ve stejném schématu jako v předchozím experimentu (**obr. 11B**).



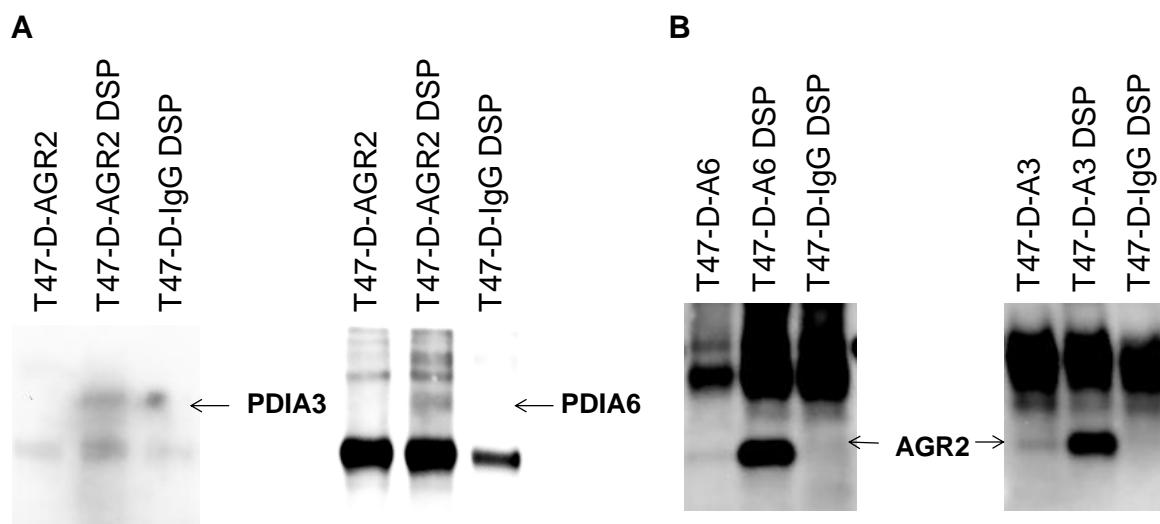


**Obr. 11: Schematické znázornění protokolu identifikace interakčních partnerů proteinu AGR2. (A) SILAC analýza buněčných linií H1299 a H1299-AGR2-001, (B) „Label-free“ analýza buněčné linie T-47D.**

Pomocí obou protokolů se podařilo precipitovat protein AGR2, což bylo potvrzeno imunochemicky s využitím polyakrylamidové gelové elektroforézy (PAGE) následované Westernovým přenosem a imunochemickou identifikací pomocí specifických protilátek. Oba přístupy byly plně kompatibilní s FASP (*Filter-Aided Sample Preparation*) protokolem a následnou LC-MS/MS analýzou. U T-47D buněk bylo identifikováno cca 1600 proteinů, u H1299-AGR2-001 přibližně 200. Jednoznačně byly odhaleny 2 proteiny interagující s AGR2: PDIA3 (ERp57) a PDIA6 (TXNDC7), a to jak v buňkách T-47D, tak i H1299-AGR-001. Skutečnost, že oba nově identifikované proteiny interagující s AGR2 patří taxonomicky do rodiny PDI a nacházejí se v ER, naznačuje, že spolu s AGR2 mohou vytvářet multichaperonové komplexy, které se pravděpodobně podílejí na regulaci homeostázy ER.

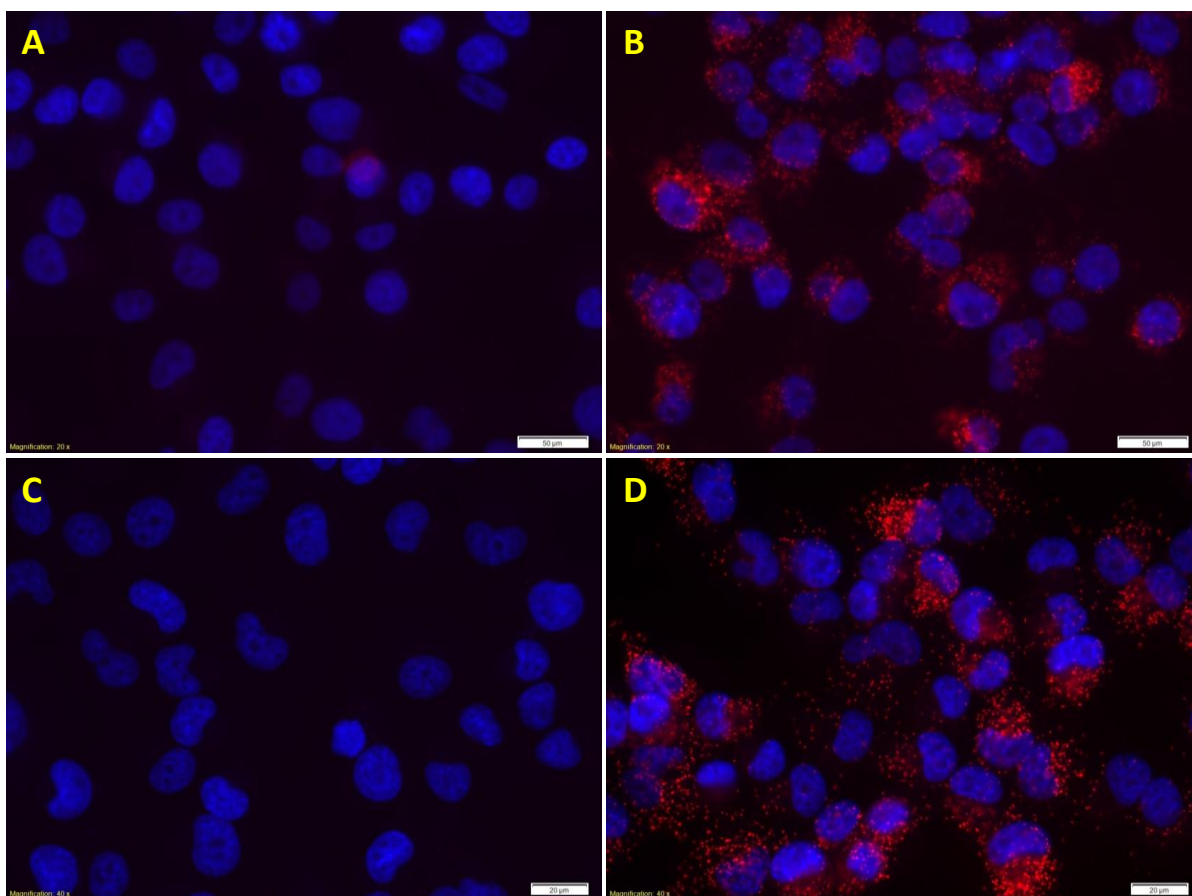
Interakce PDIA3 a PDIA6 s AGR2 byla následně potvrzena i pomocí imunoprecipitace. Proteiny interagující s AGR2 byly precipitovány pomocí AGR2 specifického peptidu E7, respektive AGR2 specifické protilátky, následovala elektroforéza

v polyakrylovém gelu a Westernový přenos. Imunochemicky byla prokázána přítomnost proteinů PDIA3 i PDIA6, které byly precipitovány v komplexu s AGR2 (**obr. 12A**). Pokus byl proveden i opačně, tedy k precipitaci byly použity protilátky rozpoznávající PDIA3, respektive PDIA6 a detekována byla přítomnost proteinu AGR2 (**obr. 12B**).



**Obr. 12: Validace AGR2 interakčních partnerů pomocí imunoprecipitace. Detekce PDIA3 respektive PDIA6 vázaných na AGR2 (A). Detekce AGR2 vázaného na PDIA6 a PDIA3 (B).**

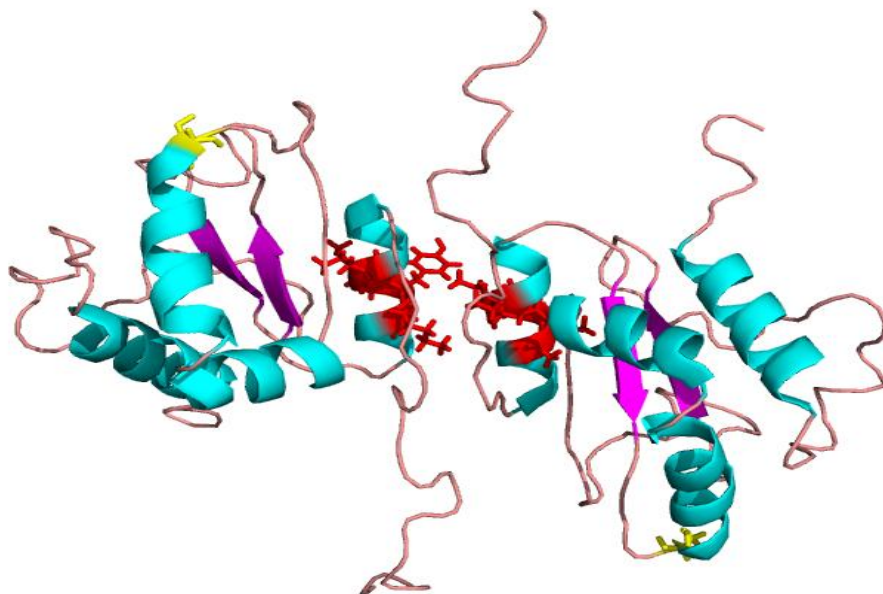
S cílem prokázat, že k interakci nedochází náhodně, respektive nespecificky při sklizení a lýze buněk, jsme použili *in situ* metodu PLA (*Proximity Ligation Assay*). Jedná se o relativně novou techniku umožňující přímou vizualizaci proteinů, jejich hladin, modifikací a především interakcí ve fixovaných buňkách a tkáních. Sondy pro PLA jsou tvořeny specifickými protilátkami s navázaným oligonukleotidem, který slouží jako reportérová molekula. Pokud dojde k navázání sond v těsné blízkosti, právě díky interakci protein – protein, následuje vznik kružnicové DNA, která slouží jako templát pro PCR amplifikaci otáčivou kružnicí. Amplifikační reakce umožňuje vizualizaci sledované interakce [39]. V návaznosti na identifikaci partnerů AGR2 jsme se tedy zaměřili na průkaz interakce AGR2 s PDIA3 a PDIA6 (**obr. 13**).



**Obr. 13: Vizualizace interakcí AGR2-PDIA3 a AGR2-PDIA6 pomocí PLA in situ.** Pro analýzu interakcí byla použita buněčná linie H1299 (AGR2 negativní) a z těchto buněk derivovaný klon H1299-AGR2 se stabilně začleněným expresním plazmidem nesoucím kódující sekvenci pro AGR2, jenž umožňují tvorbu proteinu AGR2. Buňky H1299 sloužily jako negativní kontrola pro interakci AGR2 s PDIA3 (A) respektive PDIA6 (C). Pozitivní signály prokazující protein-proteinovou interakci bylo možné pozorovat u linie H1299-AGR2, a to jak v případě PDIA3 (B), tak i PDIA6 (D).

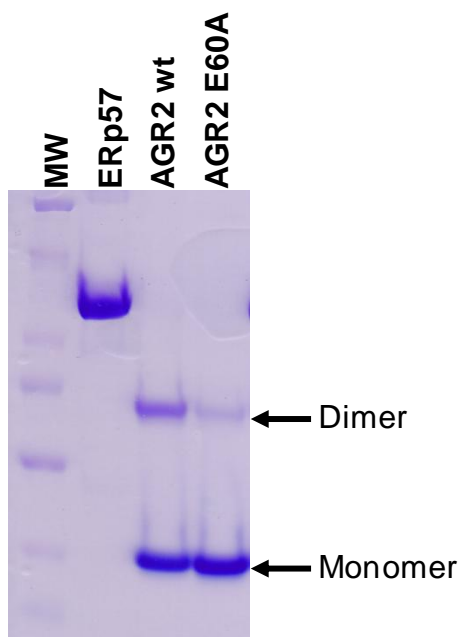
Další zajímavostí je, že pomocí MS analýzy buněk T-47D byl statisticky významně identifikován jako interakční partner proteinu AGR2 i protein AGR3. V případě buněk H1299-AGR2-001 tak tomu nebylo, neboť jsou AGR3 negativní. Možnost, že AGR2 může skutečně tvořit s AGR3 heterodimery, popř. i složitější komplexy (multimery), podporuje značná míra homologie mezi oběma proteiny a především je v souladu s recentně publikovanými pracemi, ve kterých je prokázáno, že protein AGR2 se *in vitro* vyskytuje v rovnovážném stavu mezi monomery a dimery ( $K(d) = 8,83 \mu\text{M}$ ) [40,41]. Na základě NMR (*Nuclear Magnetic Resonance*) stanovené struktury jsme vytvořili model dimeru AGR2, v rámci kterého bylo možné identifikovat oblast obsahující aminokyselinové zbytky E60 a

K64, které umožňují tvorbu solných můstků a jsou pro vznik a stabilizaci dimeru nezbytné (obr. 14).



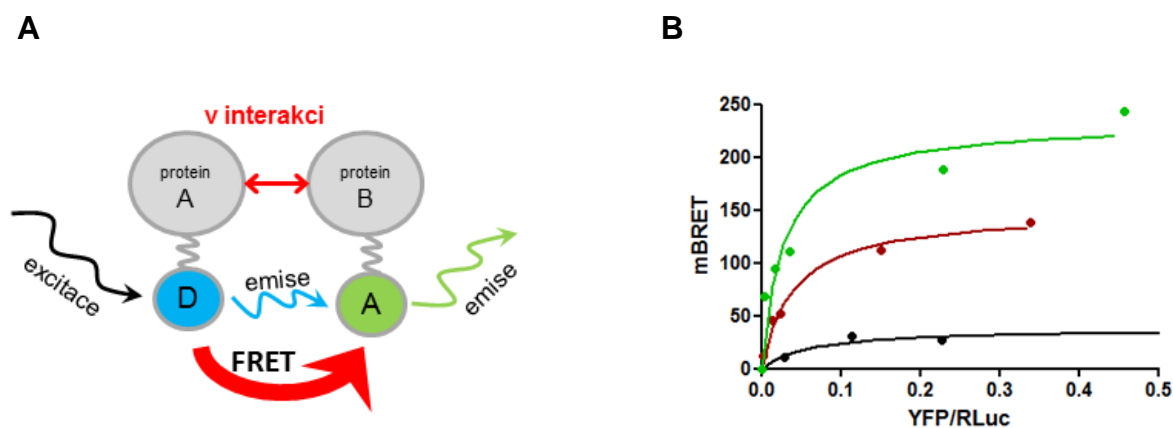
**Obr. 14: Model dimeru AGR2.** Červeně jsou vyznačeny aminokyseliny E60 a K64, které hrají hlavní roli při vzniku a stabilitě dimeru.

Dimerizaci AGR2 jsme následně prokázali i na našem pracovišti s využitím purifikovaného proteinu AGR2, přičemž vzniklé dimery proteinu byly kroslinkovány pomocí glutaraldehydu a následně vizualizovány pomocí barvení Coomassie Brilliant Blue (obr. 15). Na obrázku je též zřetelně vidět, že v případě použití proteinu AGR2 nesoucího mutaci E60A (AGR2 E60A), tedy oblasti důležité pro vznik dimeru, byla schopnost AGR2 tvořit dimery významně redukována.



**Obr. 15: Průkaz dimerizace AGR2 v podmínkách in vitro.** 20  $\mu$ l 0,3 mg/ml proteinu AGR2 bylo 5 min inkubováno v pufru (pH=7,4) obsahujícím 0,23% glutaraldehyd, 25 mM Hepes, 0,1 M NaCl, 50 mM octan draselný. Poté byla reakce zastavena přidáním 2,5  $\mu$ l 1 M TrisCl, pH=8,0.

Funkční analýza založená na využití mutovaných proteinů AGR2 v pozici E60A, které nejsou schopné vytvářet dimery, odhalila, že vznik dimerů nemá zásadní vliv na oxido-redukční vlastnosti proteinu AGR2, ale významně ovlivňuje jeho adhezivitu [41]. V naší práci jsme se zaměřili na potvrzení interakce mezi AGR2 a AGR3 a tedy i možné tvorby heterodimerů AGR2-AGR3. Vzájemnou interakci mezi těmito proteiny se skutečně podařilo potvrdit nejen pomocí imunoprecipitace, ale i PLA *in situ*. S cílem blíže studovat tvorbu AGR2-AGR2 homodimerů a AGR2-AGR3 heterodimerů byla na pracovišti zavedena metoda BRET (*Bioluminescence Resonance Energy Transfer*), která umožňuje zachytit a studovat protein-proteinové interakce v živých buňkách. Tato metoda je založená na přenosu energie mezi donorovou a akceptorovou molekulou v případě, že se tyto molekuly nachází v dostatečné blízkosti (do 10 nm). Jako donorová molekula je využíván enzym luciferáza Rluc, jako akceptorová molekula slouží žlutý fluorescenční protein YFP. K vyvolání reakce je využíván luciferin (světlo emitující molekula), coelenterazine-h slouží jako substrát pro luciferázu, která jej degraduje a dochází tak k uvolnění modrého světla (energie). Ta je zachycena akceptorovou molekulou (YFP) a následně emitována ve formě světla o vyšší vlnové délce (dle emisního spektra akceptoru). Toto uvolněné světlo je zachyceno detektorem a je tak potvrzena interakce mezi proteiny (**obr. 16A**). Pro studium dimerizace AGR proteinů byly do expresních vektorů pRluc-C1 a pEYFP-C1 naklonovány kódující sekvence AGR2 a AGR3 (**obr. 16B**). Z obrázku je jasně patrné, že protein AGR3 tvořil přednostně homodimery, v menší míře však prokazatelně vznikaly i heterodimery. Nicméně otázky týkající se úlohy a funkce těchto heterodimerů v buňce zůstávají nezodpovězeny. Stejně tak bude zajímavé zkoumat, zda přítomnost mutace v kyselině glutamové v pozici 60, která se nachází v oblasti nezbytné pro dimerizaci proteinu AGR2, může ovlivňovat i vznik heterodimerů AGR2-AGR3.



**Obr. 16:** Využití metody BRET při studiu interakcí mezi AGR2 a AGR3. (A) Znárodnění mechanismu rezonančního přenosu energie. (B) Dimerizace AGR3 je znázorněna zelenou křivkou (*pRluc-C1\_AGR3 + pEYFP-C1\_AGR3*), vznik heterodimerů AGR2-AGR3 zachycuje červená křivka (*pRluc-C1\_AGR3 + pEYFP-C1\_AGR2*), negativní kontrolu představuje černá křivka (*pRluc-C1\_AGR3 + pEYFP-C1\_empty*).

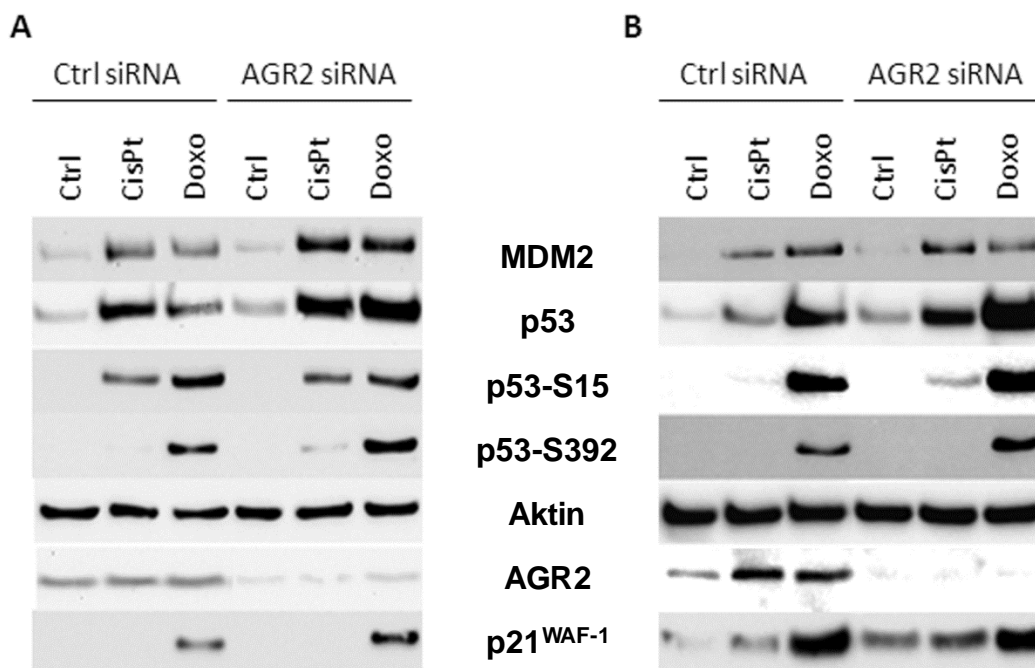
Další metodický přístup pro studium vztahů mezi proteiny včetně identifikace partnerů při protein-proteinových interakcích představuje kvasinkový dvouhybridový skrining (*Yeast Two-Hybrid screening, Y2H*) [42]. Tento systém jsme využili při hledání nových proteinů potenciálně interagujících s AGR2 a podařilo se nám identifikovat poměrně velké množství proteinů včetně již dříve dvou popsaných prometastatických receptorů C4.4A a DAG1. Překvapivě se mezi identifikovanými proteiny objevil i Reptin (RUVB2), nukleární protein uplatňující se při regulaci řady biologických procesů, jako jsou reparace DNA, regulace transkripce, sestavování snoRNP či metastazování [43]. I díky skutečnosti, že existuje celá řada prací ukazujících zvýšenou expresi Reptinu v primárních nádorech [44,45], se analýza interakce tohoto proteinu s AGR2 stala jednou z priorit, viz publikace nazvaná: „*A divergent substrate-binding loop within the pro-oncogenic protein anterior gradient-2 forms a docking site for Reptin*“, (příloha 8). Nejdříve jsme prokázali společnou expresi Reptinu s AGR2 na panelu primárních karcinomů mléčné žlázy a následně jsme potvrdili i jejich interakci pomocí imunoprecipitace. Zajímavým zjištěním bylo, že přítomnost a zvyšování koncentrace ATP významně snižuje stabilitu komplexu tvořeného AGR2 a Reptinem. Dalším krokem byl pokus identifikovat oblast AGR2, na kterou se Reptin váže. Byla připravena peptidová knihovna odvozená z proteinové sekvence AGR2, která byla tvořena biotinem značenými peptidy o velikosti 15 aminokyselin, jejichž sekvence se navzájem překrývaly v 10 aminokyselinách. Jednotlivé peptidy byly navázány na streptavidinem značené agarózové kuličky a následně inkubovány s buněčným lyzátem obsahujícím Reptin. Pomocí Westernové analýzy byl imunochemicky detekován Reptin. Takto se podařilo jednoznačně identifikovat specifickou oblast AGR2 (104-FVLLNLVY-111), která je nezbytná pro vazbu Reptinu (příloha 8). Je

zajímavé, že tato aminokyselinová sekvence je součástí smyčky, která je typická pouze pro AGR2 a u ostatních členů rodiny AGR proteinů se nenachází. To znamená, že interakce AGR2 s Reptinem představuje specifickou vlastnost proteinu AGR2, který se tímto mechanismem může významně podílet na regulaci řady biologických funkcí Reptinu.

#### **4.2. AGR2 jako negativní regulátor proteinu p53**

Při proteomické analýze epitelu Barretova jícnu byla mimo jiné detekována i zvýšená hladina proteinu AGR2. Podstatou vzniku Barretova jícnu je chronické působení refluxátu na sliznici jícnu, které způsobí, že se vrstevnatý dlaždicový nerohovějící epitel jícnu začne měnit na jednovrstevný cylindrický epitel intestinálního typu a vzniká tzv. intestinální metaplazie. Ve své podstatě se jedná o unikátní mikroprostředí, kde je v poměrně vysoké frekvenci pozorován výskyt různých mutací v genu *TP53*. Protein p53 je jeden z nejintenzivněji studovaných nádorových supresorů vůbec. Z tohoto úhlu pohledu se jedná o poměrně zajímavý model umožňující studium mechanismů, které přeživší buňky aktivují právě v kontextu přítomnosti různých variant mutovaného nebo *wild-type* proteinu p53. Pozorování, že zvýšená exprese AGR2 byla detekována především u buněk s *wild-type* p53, naznačila, že se AGR2 může aktivně podílet na inhibici aktivity nádorového supresoru p53 a přispívat tak k maligní transformaci buněk bazální vrstvy dlaždicového epitelu jícnu [21]. Současně Pohler a kol. ukázali, že zvýšená exprese AGR2 skutečně vede ke snížení fosforylace p53 na Ser 392 indukované UV zářením.

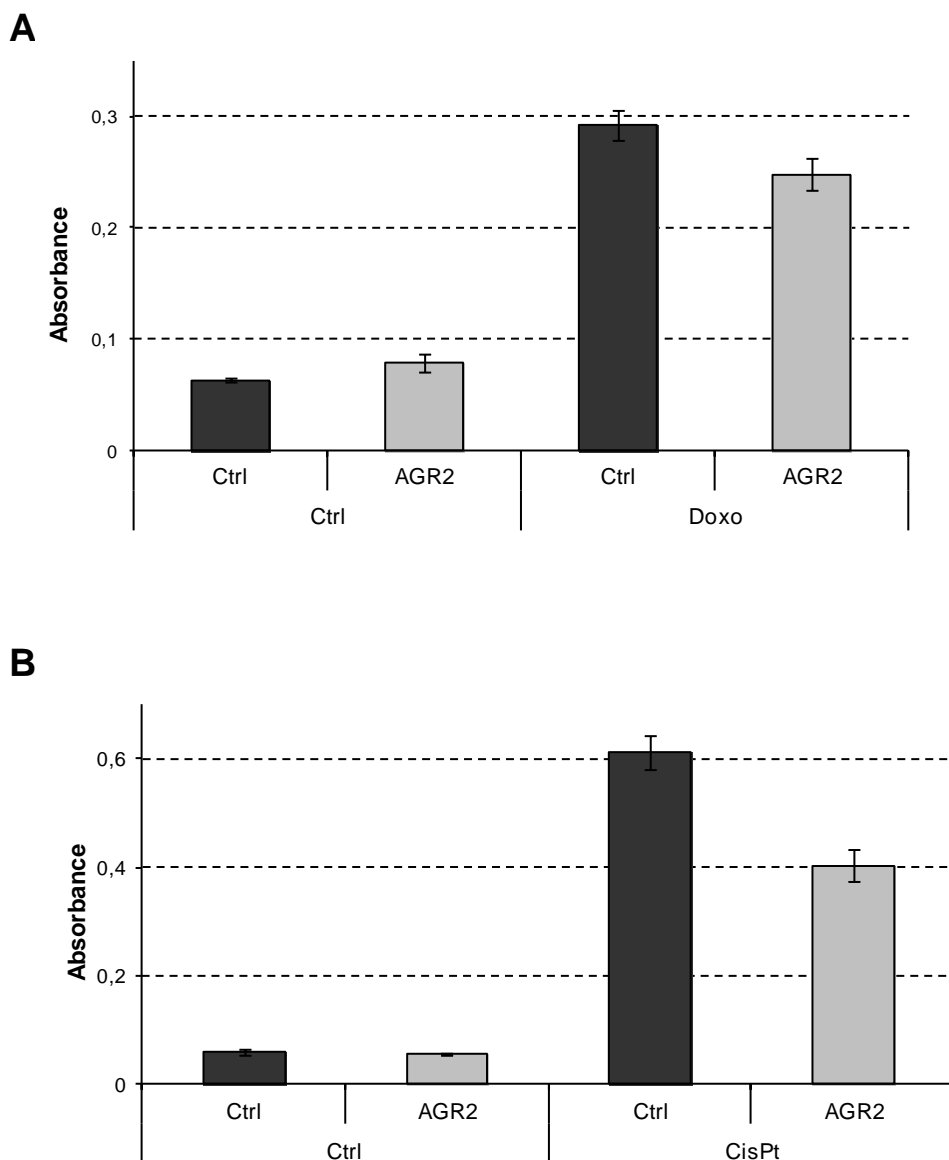
V návaznosti na uvedenou publikaci jsme se zaměřili na studium mechanismu, kterým AGR2 inhibuje aktivitu p53, z čehož rezultovala práce nazvaná „*AGR2 oncoprotein inhibits p38 MAPK and p53 activation through a DUSP10-mediated regulatory pathway*“ (**příloha 9**). Jako modelové byly zvoleny buněčné linie, pro které jsou typické vysoké hladiny AGR2: A549 (odvozená od karcinomu plic, EsR-negativní, wt p53) a MCF-7 (odvozená od karcinomu mléčné žlázy, EsR-pozitivní, wt p53). Pomocí specifické siRNA byla umlčena exprese AGR2 a následně sledována hladina a transkripční aktivita proteinu p53 (**obr. 17**).



**Obr. 17: Studium vlivu exprese AGR2 na protein p53.** Buněčné linie A549 (A) a MCF-7 (B) byly transientně transfekovány kontrolní siRNA (Ctrl siRNA), respektive siRNA specifickou proti AGR2 (AGR2 siRNA). 32 hodin po transfekci byly buňky vystaveny působení cisplatin (CisPt) nebo doxorubicinu (Doxo) po dobu 16 hodin. Poté byly buňky sklizeny do lyzačního pufru a podrobeny imunochemické analýze.

Jak vyplývá z obrázku 17, umlčení exprese AGR2 vedlo nejen ke zvýšení hladiny proteinu p53, ale i k intenzivnější fosforylaci tohoto proteinu na Ser 15 a Ser 392. Stejně tak docházelo k indukci exprese p53 regulovaných genů *mdm2* a *p21<sup>WAF-1</sup>*. Uvedené výsledky zřetelně naznačují, že přítomnost proteinu AGR2 vede k redukci posttranslačních modifikací proteinu p53, které jsou nezbytným předpokladem pro jeho aktivaci. S cílem prokázat, že se zvýšená hladina proteinu AGR2 přímo podílí na inhibici transkripční aktivity p53, byl použit modelový systém umožňující testovat transaktivaci p53 (**obr. 18**). Konkrétně byla použita buněčná linie ARN8, jenž nese stabilně začleněný konstrukt tvořený kódující sekvencí pro  $\beta$ -galaktosidázu, před kterou se nachází regulační oblast obsahující vazebnou, tzv. konsensus, sekvenci pro protein p53 [46]. V případě, že dojde k aktivaci p53, protein p53 se naváže na konsensus sekvenci a dochází k indukci exprese  $\beta$ -galaktosidázy.

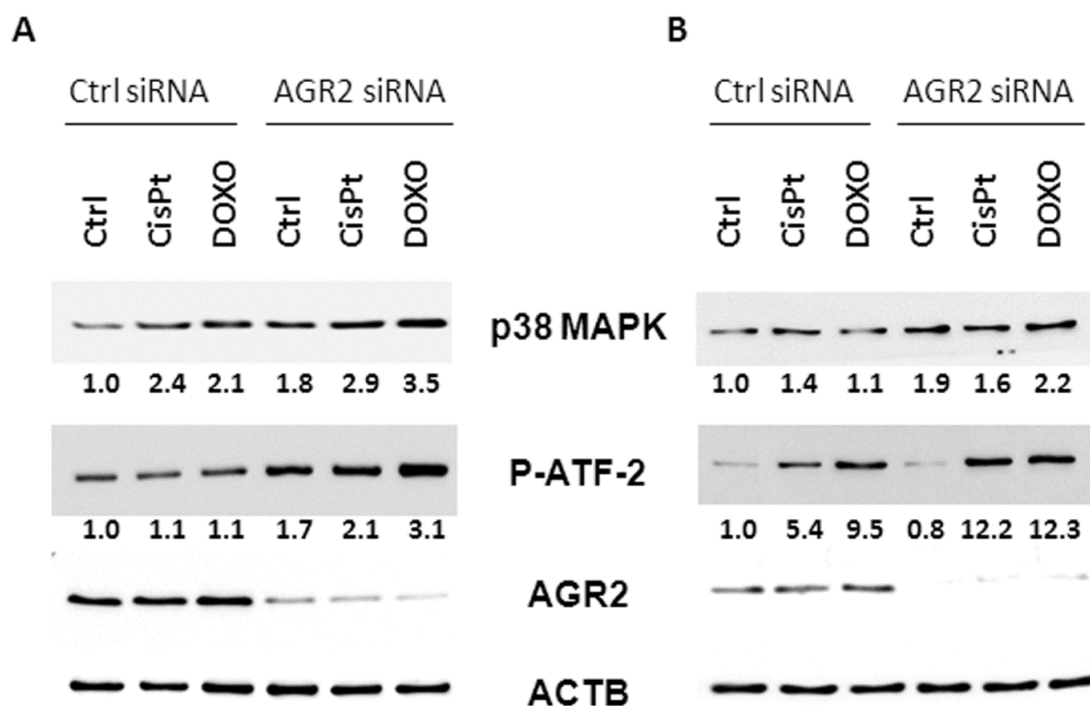




**Obr. 18: Stanovení transkripční aktivity proteinu p53.** Buněčná linie ARN8 byla transientně transfekována prázdným plazmidem (Ctrl) a plazmidem umožňujícím expresi AGR2 (AGR2). Poté byly buňky vystaveny působení doxorubicinu (A) respektive cisplatinu (B) a kolorimetricky stanovena hladina resp. aktivita  $\beta$ -galaktosidázy.

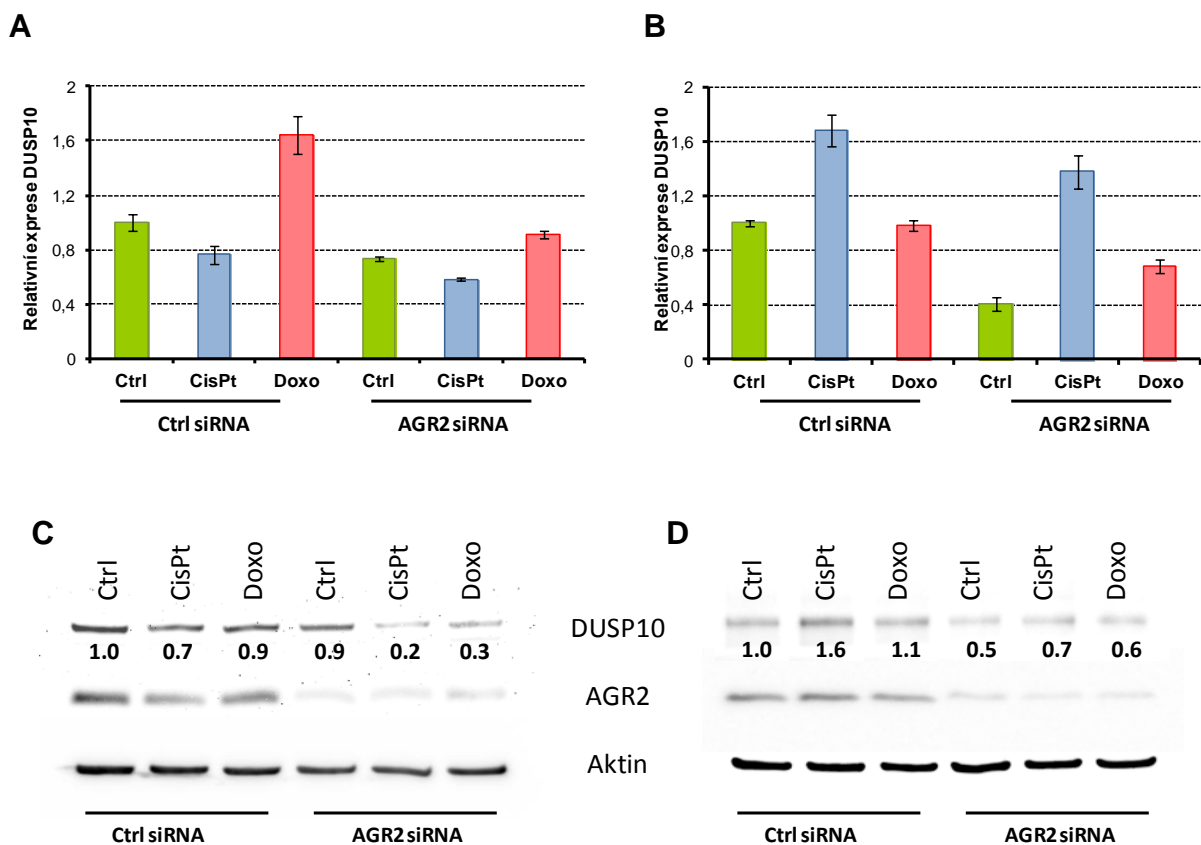
Skutečnost, že zvýšená hladina proteinu AGR2 jednoznačně vede k inhibici transkripční aktivity p53, iniciovala naši snahu identifikovat mechanismus, kterým AGR2 reguluje p53. Vzhledem k pozorovaným změnám v intenzitě fosforylace na Ser 15 a Ser 392 jsme se zaměřili především na kinázy, o kterých je známo, že se na modifikaci p53 v těchto pozicích podílejí. Zatímco v případě ATM/ATR nebyla jednoznačně prokázána přímá spojitost mezi expresí AGR2 a specifickými fosforylacemi p53, při analýze p38 MAP kinázy (p38 MAPK), která se aktivně účastní při fosforylaci na obou studovaných serinech, jsme

skutečně potvrdili, že aktivita p38 MAPK je modulována přítomností proteinu AGR2 (obr. 19).



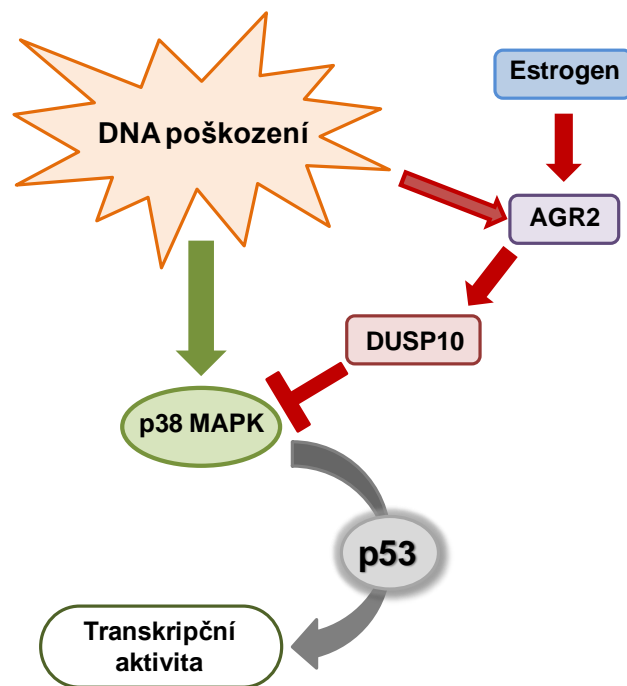
**Obr. 19: Úloha p38 MAPK při AGR2 regulované inhibici proteinu p53.** Buněčné linie A549 (A) a MCF-7 (B) byly transientně transfekovány kontrolní siRNA (Ctrl siRNA), respektive siRNA specifickou proti AGR2 (AGR2 siRNA). 32 hodin po transfekci byly buňky vystaveny působení cisplatin (CisPt) nebo doxorubicinu (Doxo) po dobu 16 hodin. Následně byla imunochemicky analyzována hladina p38 MAPK a především stanovena kinázová aktivita p38 MAPK pomocí detekce fosforylace ATF fúzního proteinu sloužícího jako substrát pro aktivovanou p38 MAPK.

Nicméně mechanismus, kterým AGR2 reguluje aktivitu p38 MAPK zůstal i nadále neobjasněn. Proto byla s využitím technologie mikrofluidních karet paralelně analyzována exprese 92 nejvýznamnějších genů, které se uplatňují při MAP-kinázové signalizaci. Zajímavým zjištěním bylo, že při umlčení exprese AGR2 docházelo u obou buněčných linií k signifikantní změně exprese (snížení) pouze u jednoho genu *DUSP10* (*Dual Specificity Phosphatase 10*) též známého jako *MKP5* (*MAP Kinase Phosphatase 5*) (obr. 20A, B). Tato skutečnost byla potvrzena i dalším nezávislým experimentem na úrovni mRNA pomocí RT-qPCR a stejně tak na úrovni proteinu (obr. 20C, D).



**Obr. 20: Identifikace DUSP10 jako další důležité komponenty AGR2 řízené anti-p53 signální dráhy.** Buněčné linie A549 a MCF-7 byly transientně transfekovány kontrolní siRNA (Ctrl siRNA), respektive siRNA specifickou proti AGR2 mRNA (AGR2 siRNA). 32 hodin po transfekci byly buňky vystaveny působení cisplatiny (CisPt) nebo doxorubicinu (Doxo) po dobu 16 hodin. (A) Stanovení mRNA hladina DUSP10 u A549. (B) Stanovení mRNA hladiny DUSP10 u MCF-7. (C) Imunochemická analýza DUSP10 u A549. (D) Imunochemická analýza DUSP10 u MCF-7.

Na základě obdržných výsledků pak bylo možné schematicky znázornit AGR2 regulovanou signální dráhu (**obr. 21**). Tato dráha se aktivuje především v návaznosti na genotoxický stres a v případě karcinomů mléčné žlázy dochází v úzké kooperaci s aktivovanými EsR k indukci AGR2, což vede ke zvýšení exprese DUSP10. Následkem toho dochází k defosforylaci a tudíž inaktivaci p38 MAPK a v konečném důsledku pak ke snížení transkripční aktivity nádorového supresoru p53.



**Obr. 21:** Grafické znázornění mechanismu zodpovědného za inhibici proteinu p53.

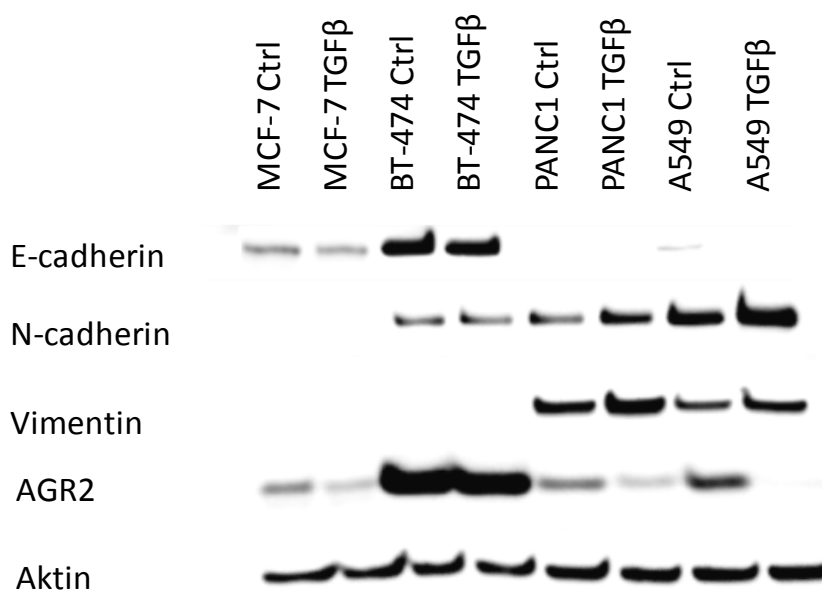
### 4.3 Úloha proteinu AGR2 při vzniku metastáz

Vzhledem ke skutečnosti, že exprese proteinu AGR2 je v případě karcinomu mléčné žlázy silně závislá na funkčních EsR, které představují pozitivní prognostický faktor tohoto onemocnění, bylo značně překvapivé, když byla publikována práce deklarující schopnost AGR2 indukovat tvorbu metastáz [40]. Konkrétně byly krysí benigní mamární buňky Rama 37 transfekovány expresním plazminem obsahujícím kódující sekvence *AGR2* a po jejich vnesení do syngenních krys docházelo ke vzniku metastáz, a to především v plicích. Toto zjištění spolu s výsledky nedávno publikované práce identifikující s metastazováním často spojované proteiny C4.4a a extracelulární alfa-dystroglycan jako interakční partnery proteinu AGR2 [33] vedlo ke zvýšenému zájmu o AGR2 v rámci klinických studií zaměřených na studium metastazování. Výsledky získané napříč klinickými studiemi řady nádorových onemocnění jsou však značně heterogenní a jednoznačně nepotvrdily přímou úlohu AGR2 při vzniku metastáz.

Obecně vzato mají pro metastazování nádorových buněk zásadní význam buněčná migrace a invazivita, tedy děje, v rámci kterých se u nádorových buněk aktivně uplatňuje i AGR2 [23]. Tyto procesy však hrají zásadní úlohu i v řadě dalších biologických procesů, jako jsou embryogeneze, imunitní odpověď, hojení ran, morfogeneze či zánět, přičemž u řady těchto jevů byla aktivní úloha proteinu AGR2 popsána nebo alespoň predikována [3].

Tvorba metastáz probíhá multifaktoriálně během víceúrovňového procesu, jehož prvním krokem bývá oddělení nádorové buňky od primárního nádoru [47]. Toto je umožněno díky zvýšené expresi proteáz štěpících extracelulární matrix. Jednotlivé uvolněné nádorové buňky následně pronikají bazální membránou a mohou prostupovat do stromatu. Tento proces se nazývá epiteliálně-mezenchymální tranzice (EMT) a v jeho důsledku dochází ke ztrátě buněčné adheze, epiteliální polarity a ke zvýšení migrační a invazivní schopnosti nádorových buněk [48]. Buňky s mezenchymálním fenotypem pak tzv. intravazací snadno pronikají do cévního řečiště, které jim umožní dostat se až do oblastí vzdálených orgánů, tzv. extravazaci, a následně dochází k opačnému procesu tzv. mezenchymálně-epiteliální tranzici (MET) a vzniká sekundární nádor neboli metastáza [48].

V naší práci jsme se zaměřili na studium úlohy AGR2 v procesu EMT. Jedním z hlavních důvodů byla skutečnost, že exprese AGR2 byla detekována především u epiteliálních buněk a pokud byly epiteliální nádorové buňky vystaveny působení TGF- $\beta$  (*Transforming growth factor beta*), docházelo k intenzivnímu potlačení exprese AGR2. TGF- $\beta$  představuje snad nejčastěji používaný induktor EMT u nádorových buněčných linií [49,50]. Po vazbě TGF- $\beta$  na TGF- $\beta$  receptory dochází k aktivaci dvou na sobě nezávislých signálních kaskád obecně označovaných jako „Smad-závislé“ a „Smad-nezávislé“. Působením TGF- $\beta$  docházelo nejen k inhibici exprese AGR2, ale i ke změně buněčné morfologie a potlačení exprese E-cadherinu a naopak indukci exprese mezenchymálních markerů vimentinu a N-cadherinu (**obr. 22**).

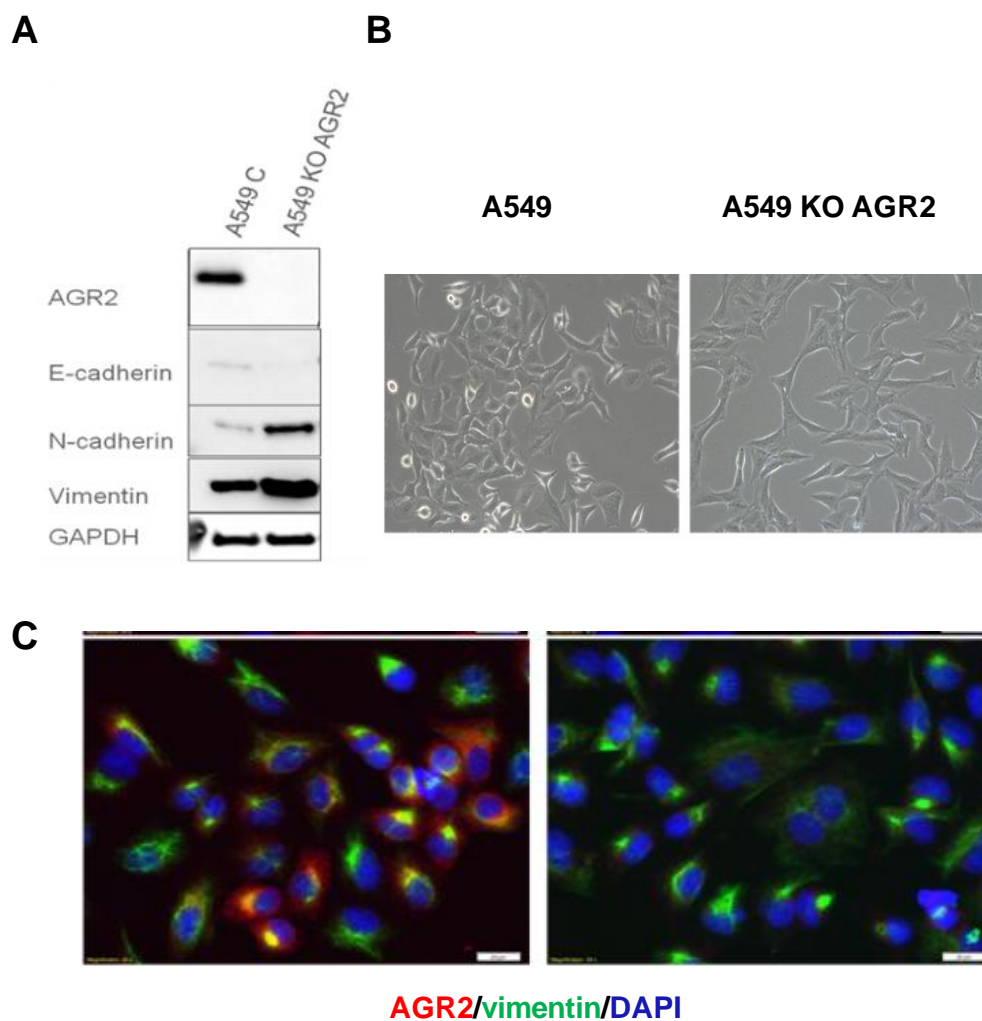


**Obr. 22: Vliv TGF- $\beta$  na hladinu vybraných proteinů.** Změny v expresi vybraných proteinů byly detekovány pomocí imunochemické analýzy u vybraných buněčných linií. Jako kontrola množství nanášeného celkového proteinu byl použit aktin.

V souvislosti s indukcí EMT jsme analyzovali, zda se snížení hladiny AGR2 aktivně uplatňuje při navozování mezenchymálního fenotypu, nebo je pouze vedlejší konsekvencí tohoto procesu buněčné transformace. Nejdříve jsme u nádorových buněk přirozeně exprimujících AGR2 potlačili expresi tohoto proteinu pomocí specifické siRNA. Analogicky jako v případě expozice buněk působení TGF- $\beta$  jsme pozorovali snížení hladiny E-cadherinu a naopak mírnou indukci vimentinu a N-cadherinu.

Vzhledem ke skutečnosti, že působením siRNA nedocházelo k úplnému potlačení exprese AGR2, byl pomocí TALEN technologie z buněčné linie A549 připraven klon (A549 KO AGR2) s umlčenou expresí AGR2. Stanovení exprese markerů EMT pak jasně potvrdilo předchozí výsledky, neboť oproti parentální linii A549 došlo ke ztrátě E-cadherinu a současně bylo pozorováno zvýšení hladin N-cadherinu a vimentinu (**obr. 23A**). Stejně tak bylo možné pomocí invertovaného světelného mikroskopu pozorovat změny v morfologii buněk (**obr. 23B**). Pomocí imunofluorescence byly vzhledem k přítomnosti, respektive nepřítomnosti AGR2 studovány změny v hladině vimentinu a především jeho buněčné lokalizaci. V případě buněk A549 se vimentin nacházel především v perinukleárním prostoru, zatímco po zablokování exprese AGR2 docházelo k jeho difúzní delokalizaci do cytoplazmy (**obr. 23C**).

Naše výsledky jednoznačně ukazují, že expozice TGF- $\beta$  vede u studovaných buněčných linií k indukci EMT a je spojena i s výrazným snížením hladiny proteinu AGR2. Funkční analýzy prokazují, že protein AGR2 představuje jednu z klíčových molekul procesu EMT, neboť v případě manipulace s expresí AGR2 dochází k navození epiteliálně mezenchymální tranzice nezávisle na jakémkoli dalším vnějším podnětu. Naše výsledky dále potvrzují, že protein AGR2 ve své podstatě představuje epiteliální marker a v případě, že dojde k jeho odstranění resp. inhibici exprese, dochází ke snížení hladiny E-cadherinu a naopak indukci exprese N-cadherinu a vimentinu. Nádorová buňka mění svůj fenotyp na mezenchymální, což je provázáno zvýšenou motilitou a invazivitou nádorových buněk a představuje iniciální impuls vedoucí ke vzniku metastáz. Je však nezbytné si uvědomit, že u primárních nádorů dochází k potlačení exprese AGR2 zřejmě pouze transientně. Naše předběžná data naznačují, že během následného procesu MET, kdy se cirkulující mezenchymální buňka snaží kolonizovat vzdálené tkáň, dochází k reexpresi proteinu AGR2, který se významně podílí na schopnosti buněk adherovat [22,51] a především signifikantně zintenzivňuje jejich proliferaci [30,52], čímž podporuje tvorbu sekundárních nádorů.

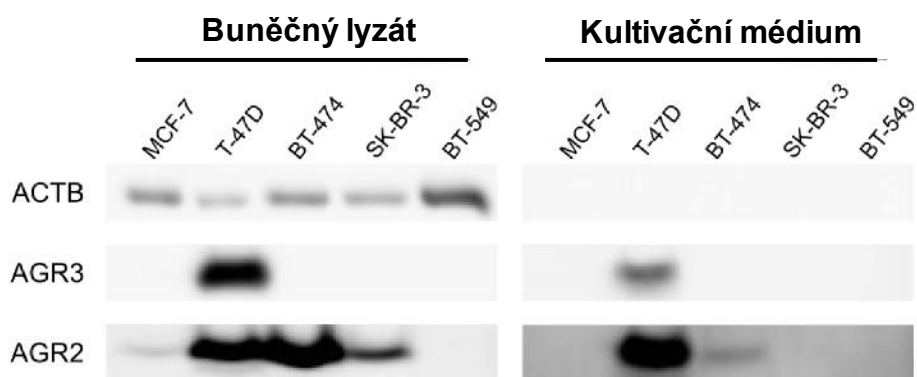


**Obr. 23: Stanovení exprese vybraných proteinů po úplném umlčení exprese genu AGR2.** (A) Imunochemická validace exprese AGR2 a stanovení dalších EMT markerů. Exprese GAPDH byla použita jako kontrola stejného množství nanášeného celkového proteinu. (B) Ukázka změn v morfologii buněk s vyřazenou expresí AGR2 vzhledem k parentální linii A549. (C) In situ analýza exprese AGR2 a vimentinu pomocí imunofluorescenčně značených protilátek, vlevo parentální linie A549, vpravo A549 KO AGR2.

#### 4.4. AGR2 a AGR3 jako sekretované proteiny

AGR2 a AGR3 byly již v roce 2003 identifikovány v rámci proteomické analýzy jako proteiny nacházející se nejen v plazmatické membráně nádorových buněk pocházejících z karcinomu mléčné žlázy, ale i v endozomech. Tato skutečnost dávala za pravdu hypotézám vytvořeným na základě analýzy aminokyselinové sekvence, které i přes přítomnost retenční sekvence predikovaly, že se pravděpodobně jedná o proteiny, které mohou být sekretovány ven z buněk [10]. Následně se objevilo několik dalších prací, které tuto skutečnost potvrdily. Za zmínku stojí především práce autorů Tsuji a kol., která ukazuje schopnost extracelulárního

AGR2 aktivovat fibroblasty ve stromatu a iniciovat tak invazi nádorových buněk [53]. Klíčová je pak práce zaměřená na studium úlohy AGR2 v etiologii karcinomů pankreatu, kde bylo prokázáno, že dochází nejen k indukci zvýšené exprese AGR2, ale současně i sekreci tohoto proteinu [54]. Na tuto publikaci pak v podstatě stejní autoři navazují další významnou práci, kde se jim podařilo u duktálních karcinomů pankreatu identifikovat receptor C4.4A jako cílovou molekulu, se kterou extracelulární AGR2 může interagovat, a iniciovat tak zvýšenou buněčnou proliferaci, migraci, invazivitu a naopak potlačovat indukci apoptózy a obecně vzato tak přispívat ke zvýšené agresivitě nádorových buněk díky autokrinní signalizaci. V návaznosti na toto zjištění pak vyvinuli specifické monoklonální protilátky proti AGR2 i C4.4A, které jim umožnily efektivně zablockovat interakci mezi těmito dvěma proteiny. Následná aplikace těchto protilátek vedla k nejen účinnému potlačení schopnosti nádorových buněk migrovat, ale současně je i senzitivizovala k indukci apoptózy. V rámci *in vivo* studií pak při použití zmiňovaných protilátek na myších xenograftech docházelo nejen k regresi primárních tumorů, ale současně i k redukci počtu metastáz [34]. Možnost využití AGR2 jako nádorového biomarkeru analyzovatelného přímo v tělních tekutinách pak dokládá několik recentních publikací, a to jak v krevním séru [55,56], tak i v moči [17,57,58]. Podobně pak byla zvýšená hladina proteinu AGR3 detekována v krevním séru pacientek s karcinomem mléčné žlázy [59].

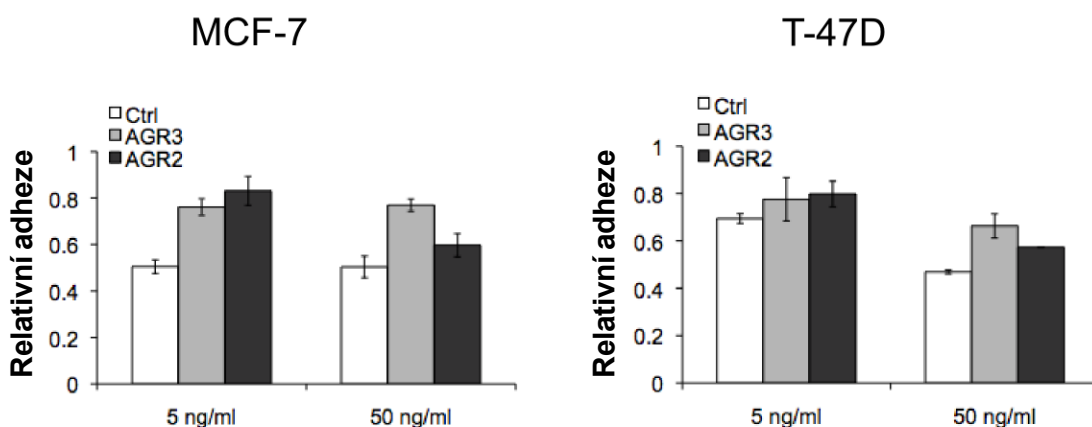


**Obr. 24: Imunochemická analýza.** Hladiny proteinů AGR2 a AGR3 byly stanoveny v buněčném lyzátu a současně kultivačním médiu odebraném před sklizením a lýzou buněk. Aktin (ACTB) byl použit nejen jako kontrola množství nanášeného vzorku, ale i skutečnosti, že v odebraném médiu nebyly přítomny buňky.

Parakrinní/autokrinní signalizací proteinů AGR2 a AGR3 se zabýváme i na našem pracovišti. Prvním krokem byla analýza exprese AGR2 a AGR3 na panelu vybraných buněčných linií odvozených od karcinomu mléčné žlázy a současně pak detekce přítomnosti

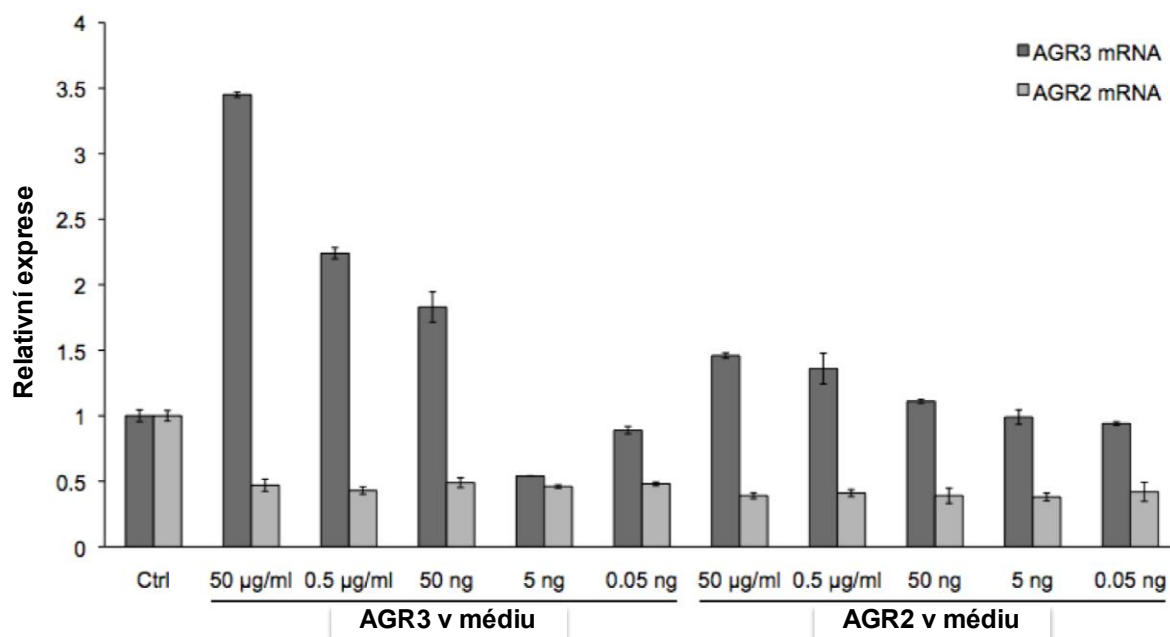


AGR2 a AGR3 v kultivačním médiu, ve kterém byly tyto buněčné linie kultivovány po dobu 72 hodin (**obr. 24**). Sekrece proteinu AGR2 byla pozorována u buněčných linií T-47D a BT-474 a AGR3 pouze u buněk T-47D, pravděpodobně především proto, že u zmíněných linií byla pozorována silná exprese AGR proteinů. Naše předběžné výsledky jednoznačně potvrzují schopnost extracelulárně přítomných proteinů AGR2 nebo AGR3 významným způsobem ovlivňovat fenotyp nádorových buněk, a to především prostřednictvím signálních drah uplatňujících se při regulaci buněčné adheze (**obr. 25**). Bližší analýza buněčné signalizace pomocí kinázových testů u buněčných linií MCF-7 a T-47D kultivovaných s rekombinantním proteinem AGR2 respektive AGR3 přidaným do média prokázala, že dochází k modulaci aktivity řady významných buněčných kináz, které jsou ve vztahu k extracelulárním AGR proteinům v současné době na pracovišti intenzivně studovány.



**Obr. 25:** *Vliv extracelulárního AGR2 a AGR3 na buněčnou adhezi. Ukázka nakolik jsou rekombinantní proteiny AGR2 a AGR3 přidané do kultivačního média k daným buněčným liniím schopny zvýšit jejich adhezivitu ve srovnání s buňkami standardně kultivovanými (Ctrl).*

Funkční analýza účinku rekombinantního proteinu AGR2 přidaného do média, ve kterém byly nádorové buňky kultivovány, ukázala, že dochází zhruba ke dvojnásobné redukci exprese AGR2, zatímco efekt na expresi AGR3 byl v podstatě zanedbatelný. Naopak v případě parakrinního působení AGR3 na okolní nádorové buňky docházelo k masivní indukci exprese AGR3, zatímco exprese AGR2 byla inhibována (**obr. 26**).



**Obr. 26:** Vliv extracelulárního AGR2 a AGR3 na hladinu mRNA AGR2 a AGR3. Změny v expresi AGR2 a AGR3 byly analyzovány na úrovni transkripce u buněčné linie T-47D po působení rekombinantního proteinu AGR3 respektive AGR2. Protein GST byl použit v rámci kontrolního experimentu (Ctrl).

## 5. Studium exprese AGR2 u vybraných lidských malignit

Aberantní exprese AGR2 byla kromě karcinomů mléčné žlázy prokázána i u řady jiných malignit (**Příloha 3**). Protein AGR2 je uvažován jako jeden z potenciálních biomarkerů karcinomu pankreatu, což je nádorové onemocnění, jehož incidence je téměř totožná s mortalitou („*American Cancer Society*“ udává, že za posledních pět let se přežití pacientů prodloužilo v podstatě jen zanedbatelně [60]). Velmi špatná prognóza a pozdní manifestace onemocnění podporují nemalé úsilí nalézt specifické a spolehlivé biomarkery a pochopit přesné molekulární mechanismy uplatňující se při vzniku invazivního karcinomu pankreatu. Doposud však neexistuje dostatečně specifický a senzitivní biomarker, který by jednoznačně přispíval k detekci tohoto onemocnění v raných stádiích, nebo predikoval odpověď na podávanou terapii. Zvýšená exprese AGR2 byla detekována v prekancerózních lézích, nádorových buňkách, buněčných liniích odvozených od karcinomu pankreatu i v cirkulujících nádorových buňkách [61,62]. Na molekulární úrovni AGR2 stimuluje buněčný růst a proliferaci, podporuje invazivitu a především schopnost přežívání pankreatických nádorových buněk a významně tak může přispívat k rezistenci vůči podávané léčbě [54].

### 5.1. Analýza exprese AGR2 u duktálních adenokarcinomů pankreatu

Na souboru 135 nádorových biopsií pocházejících z karcinomů pankreatu jsme pomocí imunohistochemického barvení paralelně analyzovali expresi proteinů AGR2 a mucinu 4. Výsledky jsou detailně popsány v práci „*Anterior gradient 2 and mucin 4 expression mirrors tumor cell differentiation in pancreatic adenocarcinomas, but aberrant anterior gradient 2 expression predicts worse patient outcome in poorly differentiated tumors*“ (**příloha 10**). Vzhledem ke skutečnosti, že IHC barvení proteinu AGR2 vykazovalo heterogenní charakter, byly analyzovány celé tkáňové řezy. V případě, že bylo možné v jednotlivých řezech pozorovat různě diferencované komponenty, byla každá komponenta hodnocena zvlášť. I díky tomuto přístupu jsme jednoznačně prokázali, že hladina exprese proteinu AGR2 odpovídala stupni diferenciaci nádorové tkáně pankreatu. Zajímavější výsledky jsme pozorovali u méně diferencovaných nádorů pankreatu, kde zvýšená hladina AGR2 naopak predikovala horší odpověď pacientů k terapii a kratší přežití. Výsledky práce Ramachandran a kol. ukazují, že pokud dojde k umlčení exprese AGR2, dochází k významnému zefektivnění léčby gemcitabinem. V souladu s tím a na základě našich výsledků by tedy bylo možné v případě málo diferencovaných duktálních adenokarcinomů pankreatu uvažovat o léčebném protokolu, jenž by zahrnoval cílenou terapii proti AGR2 v kombinaci s podáváním gemcitabinu.

### 6. Studium exprese proteinu AGR3 u vybraných nádorových onemocnění

Oproti proteinu AGR2, jehož funkce v nádorové buňce a exprese u různých typů nádorů je poměrně komplexně popsána, se protein AGR3 v odborné literatuře objevuje jen velmi omezeně. Dosavadní poznatky o tomto proteinu jsme shrnuli v přehledovém článku „*The role of AGR2 and AGR3 in cancer: similar but not identical*“, který je zaměřen především na porovnání vlastností AGR3 vzhledem k mnohem více studovanému proteinu AGR2 (**příloha 11**). V souvislosti s lidskými nádorovými onemocněními byly oba proteiny objeveny u buněčné linie MCF-7 [7]. Později byl protein AGR3 objeven pomocí proteomických analýz v membránách u studovaných nádorových linií odvozených od karcinomu mléčné žlázy [10] a následně identifikován i u dalších nádorových onemocnění (**příloha 11**). Přestože jsou oba proteiny u řady nádorových onemocnění koexprimovány, *in silico* analýza pomocí programu MatInspector [63,64] ukázala rozdílná spektra transkripčních faktorů potenciálně se vážajících na promotor *AGR2*, respektive *AGR3*, přičemž řada

transkripčních faktorů byla predikována jako exkluzivně vázající se na promotor genu *AGR2* nebo *AGR3* (**příloha 11**).

Vedle regulace exprese *AGR2* a *AGR3* byly pomocí webové aplikace Genevestigator [65] identifikovány geny, které jsou koexprimovány spolu s *AGR2* a/nebo *AGR3*. Vedle skupiny genů, k jejichž expresi dochází simultánně s oběma geny, byly identifikovány i geny k jejichž ko-expresi dochází pouze s jedním či druhým. V případě *AGR3* bych zmínil především *claudin 3 (CLDN3)*, jehož produkt byl již dříve popsán jako faktor, který se významně uplatňuje při rezistenci nádorů vaječníku k cisplatině. Tato skutečnost je v souladu s výsledky naší práce nazvané: „*Anterior Gradient-3: a novel biomarker for ovarian cancer that mediates cisplatin resistance in xenograft models*“, kde mimo jiné ukazujeme, že zvýšená hladina exprese proteinu *AGR3* může úzce souviset s rezistencí nádorových buněk k cisplatině (**příloha 12**). Pro tuto práci, která vznikla ve spolupráci s Edinburgh Cancer Research Centre, jsme vyvinuli panel monoklonálních protilátek specifických proti proteinu *AGR3*, které byly následně využity k vývoji ELISA testu umožňujícího detekci *AGR3*. Současně byla na našem pracovišti imunohistochemicky analyzována exprese *AGR3* na souboru karcinomů vaječníku. Naše studie odhalila, že protein *AGR3* je exprimován nezávisle na estrogenních receptorech a především, že ke ko-expresi mezi *AGR2* a *AGR3* dochází pouze u mucinózních karcinomů vaječníku, zatímco v případě serózních, endometrioidních a světlobuněčných byla pozorována rozdílná exprese *AGR2* a *AGR3* (**příloha 12**). V kontextu těchto výsledků byla započata nová klinická studie na souboru téměř 300 karcinomů vaječníku s cílem analyzovat rozdílné expresní profily *AGR2* a *AGR3* vzhledem k prognóze pacientek s karcinomem vaječníku a ve vztahu k rozdílné buněčné signalizaci uplatňující se při karcinogenezi daného histologického subtypu.

Zhoubná onemocnění jater patří ve světě k nejčastějším malignitám, a jejich výskyt je častější u mužů nežli u žen. Rizikovými faktory jsou infekce virem hepatitidy typu B a C a hepatotoxické látky, např. aflatoxin. Dalším rizikovým faktorem je jaterní cirhóza, kterou má až 90 % pacientů. Kromě vlastního zhoubného onemocnění představují játra časté místo metastáz ostatních zhoubných nádorů, nejčastěji nádorů plic, mléčné žlázy, tračníku a konečníku. Důvodem je především výrazná vaskularizace, přičemž přibližně 25 % objemu krve vydaného srdcem protéká játry. Nejčastějším primárním nádorem jater je hepatocelulární karcinom (HCC), který tvoří 90 % všech primárních nádorů jater. Druhým nejčastějším nádorem jater je cholangiogenní karcinom (CC), který postihuje intrahepatální žlučovody a obvykle se vyznačuje velmi špatnou prognózou. Terapeutické přístupy u obou jaterních malignit se značně liší, a tudíž maximálně specifické diagnostické přístupy umožňující

rozlišení obou subtypů jsou nanejvýš žádoucí. Mezi nejčastěji používané imunohistochemické markery HCC patří Hep Par 1 (*hepatocyte paraffin antigen-1*), CEA (karcinoembryonální antigen), CD10, AFP (alfa-fetoprotein),  $\beta$ -katenin, Hsp70, a GPC-3 (glypican-3). Nicméně žádný z výše uvedených biomarkerů není univerzálně použitelný a 100% specifický. Při imunohistochemickém stanovení přítomnosti proteinu AGR3 na pilotním souboru karcinomů jater jsme zjistili, že se tento protein nachází specificky u cholangiogenních karcinomů. Proto jsme se v práci nazvané „*Differential expression of anterior gradient protein 3 in intrahepatic cholangiocarcinoma and hepatocellular carcinoma*“ rozhodli rozšířit původní soubor a otestovat AGR3 jako potenciální biomarker specifický pro CC (**příloha 13**). Celkem bylo imunohistochemicky analyzováno 74 případů, z toho 52 mužů (70,3 %) a 22 žen (29,7 %), diagnosticky se jednalo o 26 CC a 48 HCC. Imunohistochemická analýza jasně prokázala, že protein AGR3 se vyskytuje specificky u CC ( $p < 0,00001$ ). Jako referenční bylo použito IHC barvení GPC-3, který se naopak specificky vyskytoval u HCC ( $p = 0,00013$ ). ROC (*receiver operating characteristic*) analýza pak demonstrovala, že pro diferenciální diagnostiku mezi HCC a CC je AGR3 v porovnání s GPC-3 vhodnější ( $AUC_{AGR3} = 0,801$  oproti  $AUC_{GPC-3} = 0,701$ ). Kombinace AGR3 a GPC-3 se pak ukázala jako nejvýhodnější s  $AUC = 0,859$  (**příloha 13**). Na základě získaných výsledků lze konstatovat, že i přes ne zcela homogenní imunohistochemické stanovení AGR3 ve smyslu slabě pozitivního barvení AGR3 u několika HCC a nepřítomnosti AGR3 u 6 CC tento protein v porovnání se stávajícími rutinně používanými biomarkery představuje poměrně atraktivní alternativu při diferenciální diagnostice hepatocelulárního a cholangiogenního karcinomu.

Expresí proteinu AGR3 byla důsledně studována pomocí IHC i na souboru 129 primárních karcinomů mléčné žlázy (**příloha 5**). Přítomnost proteinu AGR3 byla prokázána u přibližně 80 % studovaných případů. Dle očekávání byla prokázána statisticky signifikantní korelace s přítomností estrogenových a progesteronových receptorů a dále pak s histologickým gradem a inverzní korelace s expresí markeru proliferace Ki-67. Jinými slovy zvýšená exprese AGR3 byla typická pro dobře diferencované slabě proliferující EsR-pozitivní tumory. Tento výsledek by tedy naznačoval, že zvýšená exprese AGR3 v případě karcinomů mléčné žlázy souvisí s lepší prognózou tohoto onemocnění, což v podstatě naznačila i Kaplanova-Meierova analýza přežití, kdy pacientky se zvýšenou hladinou AGR3 vykazovaly signifikantně delší bezpříznakové přežití ( $p = 0,037$ ), celkové přežití pak naznačovalo podobný trend ( $p = 0,1111$ ). Avšak Coxův model proporcionálních rizik, jenž umožňuje zjistit vztah mezi dobou přežití a možnými vysvětlujícími proměnnými, prokázal, že expresi AGR3 nelze označit jako samostatný nezávislý prognostický faktor karcinomu mléčné žlázy na

rozdíl od velikosti tumoru a statutu HER2 receptorů v případě bezpříznakového přežití nebo velikosti tumoru a stupně diferencovanosti v případě celkového přežití pacientek (**příloha 5**).

## 7. Závěr

Rodina proteinů Anterior gradient tvoří evolučně poměrně širokou skupinu proteinů, které se vyznačují významnými, ale doposud z velké míry ne zcela prostudovanými funkcemi. Předložená práce je zaměřena na lidské homology AGR2 a AGR3, jejichž přítomnost byla popsána u řady onkologických onemocnění, kde se přímo podílejí na maligní transformaci, rezistenci k léčbě a přispívají tak ke zvýšené agresivitě daného nádorového onemocnění. Poměrně vysoká míra homologie mezi AGR2 a AGR3 predikuje podobné vlastnosti obou proteinů, což se projevuje i v obdobném expresním profilu typickém pro řadu nádorů. Naše výsledky, včetně doposud nepublikovaných, potvrzují v podstatě identický expresní profil AGR2 a AGR3 např. u EsR pozitivních karcinomů mléčné žlázy a naznačují možnou kooperaci mezi oběma proteiny. Toto je mimo jiné podpořeno i skutečností, že AGR2 a AGR3 spolu mohou vytvářet komplexy, čímž se mohou významně podílet na progresi nádorových onemocnění. Otázky týkající se významu interakcí mezi AGR2 a AGR3 a především jejich důsledků na molekulární úrovni v kontextu buněčných procesů, ať už za fyziologických či stresových podmínek, však doposud zůstávají převážně nezodpovězeny.

Na druhou stranu řada nejnovějších poznatků naznačuje existenci exkluzivních funkcí či vlastností typických pouze pro protein AGR2, respektive AGR3. Toto dokládá i naše práce zaměřená na analýzu exprese proteinu AGR3 u karcinomů vaječníku, kde jsme pozorovali podobnou expresi AGR2 a AGR3 pouze u mucinózních karcinomů, zatímco u ostatních typů byla exprese proteinů AGR2 a AGR3 značně heterogenní. V souladu s výše uvedeným, funkční analýza účinku extracelulárních proteinů AGR2 a AGR3 na nádorové buňky ukázala, že odlišně ovlivňují expresi genů *AGR2* a *AGR3* na úrovni transkripce. Souhrnně lze tedy konstatovat, že expresní profily obou genů *AGR2* a *AGR3* jsou značně podobné, nikoli však identické, což mimo jiné odráží i obrovskou diverzitu maligních onemocnění a signálních drah, které se uplatňují při regulaci buněčných procesů v nádorové buňce, v rámci kterých hrají nezanedbatelnou úlohu i proteiny rodiny Anterior gradient.

Mezi nejvýznamnější výsledky získané v rámci téměř desetiletého výzkumu zaměřeného na proteiny AGR bych zařadil verifikaci estrogenových receptorů, jako klíčových regulátorů exprese AGR2 u karcinomů mléčné žlázy. V návaznosti na tuto skutečnost se pak podařilo prokázat, že zvýšená hladina AGR2 může sloužit jako negativní prediktivní faktor při adjuvantní léčbě tamoxifenem. Následně pak byly u karcinomů mléčné žlázy objeveny i další faktory uplatňující se při regulaci exprese AGR2, především se jedná o PDPK-1, AKT a

receptory HER2, čímž se alespoň částečně vysvětlila skutečnost, že zvýšená exprese AGR2 bývá vzácněji pozorována i u EsR negativních karcinomů mléčné žlázy.

Funkční analýzy zaměřené na funkci proteinu AGR2 v nádorových buňkách odhalily mechanismus, kterým se protein AGR2 negativně podílí na regulaci hladiny a především aktivity proteinu p53 a připívá tak k agresivnějšímu fenotypu EsR pozitivních nádorů mléčné žlázy, u kterých nedošlo k mutaci genu *TP53*. Nemalé úsilí v současné době věnujeme studiu úlohy AGR2 při EMT indukované působením TGF- $\beta$ . Při tomto procesu dochází k evidentnímu snížení hladiny proteinu AGR2, což jak se zdá, významně napomáhá k navození mezenchymálního fenotypu původně epiteliálních buněk a přispívá tak k jejich invazivitě a schopnosti tvořit metastázy.



## 8. Literatura

1. Sive HL, Hattori K, Weintraub H. Progressive determination during formation of the anteroposterior axis in *Xenopus laevis*. *Cell* 1989;58:171-80.
2. Aberger F, Weidinger G, Grunz H, Richter K. Anterior specification of embryonic ectoderm: the role of the *Xenopus* cement gland-specific gene XAG-2. *Mech Dev* 1998;72:115-30.
3. Kumar A, Godwin JW, Gates PB, Garza-Garcia AA, Brockes JP. Molecular basis for the nerve dependence of limb regeneration in an adult vertebrate. *Science* 2007;318:772-7.
4. Wilson CL, Sims AH, Howell A, Miller CJ, Clarke RB. Effects of oestrogen on gene expression in epithelium and stroma of normal human breast tissue. *Endocrine-related cancer* 2006;13:617-28.
5. Zhang JS, Gong A, Cheville JC, Smith DI, Young CY. AGR2, an androgen-inducible secretory protein overexpressed in prostate cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 2005;43:249-59.
6. Persson S, Rosenquist M, Knoblach B, Khosravi-Far R, Sommarin M, Michalak M. Diversity of the protein disulfide isomerase family: identification of breast tumor induced Hag2 and Hag3 as novel members of the protein family. *Mol Phylogenet Evol* 2005;36:734-40.
7. Thompson DA, Weigel RJ. hAG-2, the human homologue of the *Xenopus laevis* cement gland gene XAG-2, is coexpressed with estrogen receptor in breast cancer cell lines. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;251:111-6.
8. Higa A, Mulot A, Delom F et al. Role of pro-oncogenic protein disulfide isomerase (PDI) family member anterior gradient 2 (AGR2) in the control of endoplasmic reticulum homeostasis. *The Journal of biological chemistry* 2011;286:44855-68.
9. Adolph TE, Niederreiter L, Blumberg RS, Kaser A. Endoplasmic reticulum stress and inflammation. *Dig Dis* 2012;30:341-6.
10. Adam PJ, Boyd R, Tyson KL et al. Comprehensive proteomic analysis of breast cancer cell membranes reveals unique proteins with potential roles in clinical cancer. *The Journal of biological chemistry* 2003;278:6482-9.
11. Barraclough DL, Platt-Higgins A, de Silva Rudland S et al. The metastasis-associated anterior gradient 2 protein is correlated with poor survival of breast cancer patients. *The American journal of pathology* 2009;175:1848-57.
12. Fritzsche FR, Dahl E, Pahl S et al. Prognostic relevance of AGR2 expression in breast cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2006;12:1728-34.
13. Innes HE, Liu D, Barraclough R et al. Significance of the metastasis-inducing protein AGR2 for outcome in hormonally treated breast cancer patients. *British journal of cancer* 2006;94:1057-65.
14. Zhang Y, Forootan SS, Liu D et al. Increased expression of anterior gradient-2 is significantly associated with poor survival of prostate cancer patients. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 2007;10:293-300.
15. Kristiansen G, Pilarsky C, Wissmann C et al. Expression profiling of microdissected matched prostate cancer samples reveals CD166/MEMD and CD24 as new prognostic markers for patient survival. *The Journal of pathology* 2005;205:359-76.
16. Bu H, Schweiger MR, Manke T et al. Anterior gradient 2 and 3--two prototype androgen-responsive genes transcriptionally upregulated by androgens and by oestrogens in prostate cancer cells. *The FEBS journal* 2013;280:1249-66.

17. Bu H, Bormann S, Schafer G et al. The anterior gradient 2 (AGR2) gene is overexpressed in prostate cancer and may be useful as a urine sediment marker for prostate cancer detection. *Prostate* 2011;71:575-87.
18. Frasor J, Danes JM, Komm B, Chang KC, Lyttle CR, Katzenellenbogen BS. Profiling of estrogen up- and down-regulated gene expression in human breast cancer cells: insights into gene networks and pathways underlying estrogenic control of proliferation and cell phenotype. *Endocrinology* 2003;144:4562-74.
19. Jordan VC. Is tamoxifen the Rosetta stone for breast cancer? *Journal of the National Cancer Institute* 2003;95:338-40.
20. Hrstka R, Bouchalova P, Michalova E et al. AGR2 oncoprotein inhibits p38 MAPK and p53 activation through a DUSP10-mediated regulatory pathway. *Molecular oncology* 2015.
21. Pohler E, Craig AL, Cotton J et al. The Barrett's antigen anterior gradient-2 silences the p53 transcriptional response to DNA damage. *Molecular & cellular proteomics : MCP* 2004;3:534-47.
22. Liu D, Rudland PS, Sibson DR, Platt-Higgins A, Barraclough R. Human homologue of cement gland protein, a novel metastasis inducer associated with breast carcinomas. *Cancer research* 2005;65:3796-805.
23. Wang Z, Hao Y, Lowe AW. The adenocarcinoma-associated antigen, AGR2, promotes tumor growth, cell migration, and cellular transformation. *Cancer research* 2008;68:492-7.
24. Hrstka R, Brychtova V, Fabian P, Vojtesek B, Svoboda M. AGR2 predicts tamoxifen resistance in postmenopausal breast cancer patients. *Disease markers* 2013;35:207-12.
25. Levin ER. Integration of the extranuclear and nuclear actions of estrogen. *Mol Endocrinol* 2005;19:1951-9.
26. Zweitzig DR, Smirnov DA, Connelly MC, Terstappen LW, O'Hara SM, Moran E. Physiological stress induces the metastasis marker AGR2 in breast cancer cells. *Molecular and cellular biochemistry* 2007;306:255-60.
27. Hrstka R, Nenutil R, Fourtouna A et al. The pro-metastatic protein anterior gradient-2 predicts poor prognosis in tamoxifen-treated breast cancers. *Oncogene* 2010;29:4838-47.
28. Kato S, Endoh H, Masuhiro Y et al. Activation of the estrogen receptor through phosphorylation by mitogen-activated protein kinase. *Science* 1995;270:1491-4.
29. Arpino G, Green SJ, Allred DC et al. HER-2 amplification, HER-1 expression, and tamoxifen response in estrogen receptor-positive metastatic breast cancer: a southwest oncology group study. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2004;10:5670-6.
30. Dong A, Gupta A, Pai RK, Tun M, Lowe AW. The human adenocarcinoma-associated gene, AGR2, induces expression of amphiregulin through Hippo pathway co-activator YAP1 activation. *The Journal of biological chemistry* 2011;286:18301-10.
31. Iorns E, Lord CJ, Ashworth A. Parallel RNAi and compound screens identify the PDK1 pathway as a target for tamoxifen sensitization. *The Biochemical journal* 2009;417:361-70.
32. Wright TM, Wardell SE, Jasper JS et al. Delineation of a FOXA1/ERalpha/AGR2 regulatory loop that is dysregulated in endocrine therapy-resistant breast cancer. *Molecular cancer research : MCR* 2014;12:1829-39.
33. Fletcher GC, Patel S, Tyson K et al. hAG-2 and hAG-3, human homologues of genes involved in differentiation, are associated with oestrogen receptor-positive breast tumours and interact with metastasis gene C4.4a and dystroglycan. *British journal of cancer* 2003;88:579-85.

34. Arumugam T, Deng D, Bover L, Wang H, Logsdon CD, Ramachandran V. New Blocking Antibodies against Novel AGR2-C4.4A Pathway Reduce Growth and Metastasis of Pancreatic Tumors and Increase Survival in Mice. *Molecular cancer therapeutics* 2015;14:941-51.
35. Norris AM, Gore A, Balboni A, Young A, Longnecker DS, Korc M. AGR2 is a SMAD4-suppressible gene that modulates MUC1 levels and promotes the initiation and progression of pancreatic intraepithelial neoplasia. *Oncogene* 2013;32:3867-76.
36. Park SW, Zhen G, Verhaeghe C et al. The protein disulfide isomerase AGR2 is essential for production of intestinal mucus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106:6950-5.
37. Schroeder BW, Verhaeghe C, Park SW et al. AGR2 is induced in asthma and promotes allergen-induced mucin overproduction. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2012;47:178-85.
38. Murray E, McKenna EO, Burch LR et al. Microarray-formatted clinical biomarker assay development using peptide aptamers to anterior gradient-2. *Biochemistry* 2007;46:13742-51.
39. Brychtova V, Vojtesek B, Hrstka R. Anterior gradient 2: a novel player in tumor cell biology. *Cancer letters* 2011;304:1-7.
40. Gray TA, Murray E, Nowicki MW et al. Development of a fluorescent monoclonal antibody-based assay to measure the allosteric effects of synthetic peptides on self-oligomerization of AGR2 protein. *Protein science : a publication of the Protein Society* 2013;22:1266-78.
41. Patel P, Clarke C, Barraclough DL et al. Metastasis-promoting anterior gradient 2 protein has a dimeric thioredoxin fold structure and a role in cell adhesion. *Journal of molecular biology* 2013;425:929-43.
42. Young KH. Yeast two-hybrid: so many interactions, (in) so little time. *Biology of reproduction* 1998;58:302-11.
43. Jha S, Dutta A. RVB1/RVB2: running rings around molecular biology. *Molecular cell* 2009;34:521-33.
44. Li W, Zeng J, Li Q et al. Reptin is required for the transcription of telomerase reverse transcriptase and over-expressed in gastric cancer. *Molecular cancer* 2010;9:132.
45. Rousseau B, Menard L, Haurie V et al. Overexpression and role of the ATPase and putative DNA helicase RuvB-like 2 in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2007;46:1108-18.
46. Blaydes JP, Hupp TR. DNA damage triggers DRB-resistant phosphorylation of human p53 at the CK2 site. *Oncogene* 1998;17:1045-52.
47. Patel LR, Camacho DF, Shiozawa Y, Pienta KJ, Taichman RS. Mechanisms of cancer cell metastasis to the bone: a multistep process. *Future Oncol* 2011;7:1285-97.
48. Thiery JP, Sleeman JP. Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nature reviews Molecular cell biology* 2006;7:131-42.
49. Massague J. TGFbeta in Cancer. *Cell* 2008;134:215-30.
50. Massague J. A very private TGF-beta receptor embrace. *Molecular cell* 2008;29:149-50.
51. Chanda D, Lee JH, Sawant A et al. Anterior gradient protein-2 is a regulator of cellular adhesion in prostate cancer. *PloS one* 2014;9:e89940.
52. Verma S, Salmans ML, Geyfman M et al. The estrogen-responsive Agr2 gene regulates mammary epithelial proliferation and facilitates lobuloalveolar development. *Developmental biology* 2012;369:249-60.
53. Tsuji T, Satoyoshi R, Aiba N et al. Agr2 mediates paracrine effects on stromal fibroblasts that promote invasion by gastric signet-ring carcinoma cells. *Cancer research* 2015;75:356-66.

54. Ramachandran V, Arumugam T, Wang H, Logsdon CD. Anterior gradient 2 is expressed and secreted during the development of pancreatic cancer and promotes cancer cell survival. *Cancer research* 2008;68:7811-8.
55. Makawita S, Dimitromanolakis A, Soosaipillai A et al. Validation of four candidate pancreatic cancer serological biomarkers that improve the performance of CA19.9. *BMC cancer* 2013;13:404.
56. Park K, Chung YJ, So H et al. AGR2, a mucinous ovarian cancer marker, promotes cell proliferation and migration. *Exp Mol Med* 2011;43:91-100.
57. Ho ME, Quek SI, True LD et al. Bladder cancer cells secrete while normal bladder cells express but do not secrete AGR2. *Oncotarget* 2016.
58. Shi T, Gao Y, Quek SI et al. A highly sensitive targeted mass spectrometric assay for quantification of AGR2 protein in human urine and serum. *Journal of proteome research* 2014;13:875-82.
59. Garczyk S, von Stillfried S, Antonopoulos W et al. AGR3 in breast cancer: prognostic impact and suitable serum-based biomarker for early cancer detection. *PloS one* 2015;10:e0122106.
60. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA: a cancer journal for clinicians* 2011;61:69-90.
61. Dumartin L, Whiteman HJ, Weeks ME et al. AGR2 is a novel surface antigen that promotes the dissemination of pancreatic cancer cells through regulation of cathepsins B and D. *Cancer research* 2011;71:7091-102.
62. Yano S, Suzuki K, Funatsu G. Isolation from alpha-zein of thermolysin peptides with angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 1996;60:661-3.
63. Cartharius K, Frech K, Grote K et al. MatInspector and beyond: promoter analysis based on transcription factor binding sites. *Bioinformatics* 2005;21:2933-42.
64. Quandt K, Frech K, Karas H, Wingender E, Werner T. MatInd and MatInspector: new fast and versatile tools for detection of consensus matches in nucleotide sequence data. *Nucleic acids research* 1995;23:4878-84.
65. Hruz T, Laule O, Szabo G et al. Genevestigator v3: a reference expression database for the meta-analysis of transcriptomes. *Advances in bioinformatics* 2008;2008:420747.

## 9. Seznam použitých zkratk

AFP	Alfa-fetoprotein
AGR	Anterior gradient
AKT	Protein kináza B
AMK	Aminokyseliny
AP-1	<i>Activator protein-1</i>
AREG	Amfiregulin
ATM	<i>Ataxia Telangiectasia Mutated</i>
ATR	<i>Ataxia Telangiectasia and Rad3-related protein</i>
BRET	<i>Bioluminescence Resonance Energy Transfer</i>
C4.4a	<i>GPI-anchored metastasis-associated protein C4.4A homolog</i>
CC	Cholangiocelulární karcinom
CD1	Cyklin D1
CD10	Společný antigen akutní lymfoblastické leukemie (CALLA)
CEA	Karcinoembryonální antigen
CisPt	Cisplatina
c-Jun	Jun proto-onkogen
CLDN3	Claudin 3
Ctrl	Kontrola
DAG-1	Dystroglykan 1
DFS	Bezpříznakové přežití (disease free survival)
Doxo	Doxorubicin
DSP	Dithiobis[succinimidylpropionát]
DUSP10	<i>Dual Specificity Phosphatase 10</i>
EGFR	Receptor pro epidermální růstový faktor
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EMT	Epiteliálně-mezenchymální tranzice
ER	Endoplazmatické retikulum
ERE	Vazebná místa pro estrogenový receptor ( <i>estrogen response element</i> )
ERK1/2	<i>Extracellular signal-regulated kinase 1/2</i>
ERp57	<i>Endoplasmic reticulum resident protein 57</i>
EsR	Estrogenový receptor

FOXA-1	<i>Forkhead box A1</i>
GPC-3	Glypikan-3
GST	Glutathion-S-transferáza
HCC	Hepatoceulární karcinom
Hep Par 1	<i>Hepatocyte paraffin antigen-1</i>
HER2	Receptor pro lidský epidermální růstový faktor. (human epidermal growth factor receptor 2)
hod	Hodin
HR	<i>Hazard ratio</i>
Hsp90	<i>heat shock protein 90</i>
ChIP	Chromatinová imunopreciptace
IHC	Imunohistochemické barvení
IS	Interval spolehlivosti
JNK	Janusova kináza
K(d)	Disociační konstanta
Ki67	<i>Antigen identified by monoclonal antibody Ki-67</i>
Mdm2	<i>Mouse double minute 2</i>
MEK1/2	Mitogeny aktivovaná protein-kináza 1/2
MET	Mezenchymálně-epiteliální tranzice
MKP5	<i>MAP Kinase Phosphatase 5</i>
mRNA	mediátorová RNA
mTOR	<i>Mammalian target of rapamycin</i>
MUC1	Mucin 1
MUC2	Mucin 2
MUC5AC	Mucin 5AC
MUC5B	Mucin 5B
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>
OS	Celkové přežití ( <i>overall survival</i> )
p21 <sup>WAF-1</sup>	Protein p21 ( <i>cyclin-dependent kinase inhibitor 1A</i> )
p38 MAPK	Mitogeny aktivovaná protein kináza p38
PCNA	<i>Proliferating cell nuclear antigen</i>
PDI	Protein disulfid isomeráza
PDIA3	<i>Protein disulfide isomerase family A3</i>
PDIA6	<i>Protein disulfide isomerase associated 6</i>

PDPK1	Phosphatidylinositol 3-kinase/phosphatidylinositide-dependent protein kinase 1
PI3K	<i>Phosphoinositide 3-kinase</i>
PLA	<i>Proximity Ligation Assay</i>
PR	Progesteronový receptor
ROC	<i>Receiver Operating Characteristic</i>
RT-qPCR	Reversní transkripce kombinovaná s kvantitativní polymerázovou řetězovou reakcí
RUVB2	Reptin
Ser 15	Serin 15
Ser 392	Serin 392
SILAC	<i>Stable isotope labeling by amino acids in cell culture</i>
siRNA	<i>Short interfering RNA</i>
snoRNP	<i>Small nucleolar ribonucleoproteins</i>
Sp-1	Specific protein-1
TGF- $\beta$	Transformující růstový faktor beta ( <i>transforming growth factor beta</i> )
TXNDC7	<i>Thioredoxin domain containing 7</i>
UPR	<i>Unfolded Protein Response</i>
wt	<i>wild-type</i>

## 10. Seznam příloh

- Příloha 1: Faitova J, Krekac D, Hrstka R, Vojtesek B. Endoplasmic reticulum stress and apoptosis. *Cell Mol Biol Lett*. 2006;11(4):488-505.
- Příloha 2: Chevet E, Fessart D, Delom F, Mulot A, Vojtesek B, Hrstka R, Murray E, Gray T, Hupp T. Emerging roles for the pro-oncogenic anterior gradient-2 in cancer development. *Oncogene*. 2013 May 16;32(20):2499-509.
- Příloha 3: Brychtova V, Vojtesek B, Hrstka R. Anterior gradient 2: a novel player in tumor cell biology. *Cancer Lett*. 2011 May 1;304(1):1-7.
- Příloha 4: Hrstka R, Nenutil R, Fourtouna A, Maslon MM, Naughton C, Langdon S, Murray E, Larionov A, Petrakova K, Muller P, Dixon MJ, Hupp TR, Vojtesek B. The pro-metastatic protein anterior gradient-2 predicts poor prognosis in tamoxifen-treated breast cancers. *Oncogene*. 2010 Aug 26;29(34):4838-47.
- Příloha 5: Obacz J, Brychtova V, Podhorec J, Fabian P, Dobes P, Vojtesek B, Hrstka R. Anterior gradient protein 3 is associated with less aggressive tumors and better outcome of breast cancer patients. *Onco Targets Ther*. 2015 Jun 24;8:1523-32.
- Příloha 6: Hrstka R, Brychtova V, Fabian P, Vojtesek B, Svoboda M. AGR2 predicts tamoxifen resistance in postmenopausal breast cancer patients. *Dis Markers*. 2013;35(4):207-12.
- Příloha 7: Hrstka R, Murray E, Brychtova V, Fabian P, Hupp TR, Vojtesek B. Identification of an AKT-dependent signalling pathway that mediates tamoxifen-dependent induction of the pro-metastatic protein anterior gradient-2. *Cancer Lett*. 2013 Jun 10;333(2):187-93.
- Příloha 8: Maslon MM, Hrstka R, Vojtesek B, Hupp TR. A divergent substrate-binding loop within the pro-oncogenic protein anterior gradient-2 forms a docking site for Reptin. *J Mol Biol*. 2010 Dec 3;404(3):418-38.
- Příloha 9: Hrstka R, Bouchalova P, Michalova E, Matoulkova E, Muller P, Coates PJ, Vojtesek B. AGR2 oncoprotein inhibits p38 MAPK and p53 activation through a DUSP10-mediated regulatory pathway. *Mol Oncol*. 2016 May; 10(5):652-62.
- Příloha 10: Brychtova V, Hermanova M, Karasek P, Lenz J, Selingerova I, Vojtesek B, Kala Z, Hrstka R. Anterior gradient 2 and mucin 4 expression mirrors tumor cell differentiation in pancreatic adenocarcinomas, but aberrant anterior gradient 2 expression predicts worse patient outcome in poorly differentiated tumors. *Pancreas*. 2014 Jan;43(1):75-81.
- Příloha 11: Obacz J, Takacova M, Brychtova V, Dobes P, Pastorekova S, Vojtesek B, Hrstka R. The role of AGR2 and AGR3 in cancer: similar but not identical. *Eur J Cell Biol*. 2015 Mar-Apr;94(3-4):139-47.



- Příloha 12: Gray TA, MacLaine NJ, Michie CO, Bouchalova P, Murray E, Howie J, Hrstka R, Maslon MM, Nenutil R, Vojtesek B, Langdon S, Hayward L, Gourley C, Hupp TR. Anterior Gradient-3: a novel biomarker for ovarian cancer that mediates cisplatin resistance in xenograft models. *J Immunol Methods*. 2012 Apr 30;378(1-2):20-32.
- Příloha 13: Brychtova V, Zampachova V, Hrstka R, Fabian P, Novak J, Hermanova M, Vojtesek B. Differential expression of anterior gradient protein 3 in intrahepatic cholangiocarcinoma and hepatocellular carcinoma. *Exp Mol Pathol*. 2014 Apr 18;96(3):375-81.