

**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI**

**Přírodovědecká fakulta**

**Diplomová práce**

**Olomouc 2009**

**Bc. Dana Šimková**

**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI**

**Přírodovědecká fakulta  
Katedra buněčné biologie a genetiky**



**Asporin a další proteiny extracelulární matrix u  
invazivních karcinomů prsu a prostaty**

**Diplomová práce**

Autor: **Bc. Dana Šimková**  
Vedoucí bakalářské práce: **Mgr. Jan Bouchal, Ph.D.**  
Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie  
Forma studia: Prezenční

**Olomouc 2009**

## Souhrn

Metastazování jako hlavní příčina smrti u onkologických pacientů je stále málo prozkoumaným jevem. Jedná se o vícekový proces regulovaný na několika úrovních. Karcinom prostaty je v rozvinutých zemích druhým nejčastěji diagnostikovaným nádorem a třetí nejčastější příčinou smrti u mužů. Karcinom prsu je po nádorech plic nejčastější příčinou smrti u žen s nádorovým onemocněním. Adjuvantní léčba u obou typů nádorů je založena především na modulaci aberantních hormonálních drah a jejich receptorů. Invaze a metastazování vyžaduje extenzivní reorganizaci nádorových buněk, jejich cytoskeletu a povrchových molekul. Signální dráhy angažované v procesu epiteliálně mesenchymální transice a vzniku metastáz jsou především TGF $\beta$ , Wnt, Notch a Hedgehog. Migrující buňky aktivně modulují okolní extracelulární matrix, tvořící primární bariéru postupujícím buňkám. Ve své diplomové práci jsem se soustředila na roli skupiny proteinů, které kooperují s extracelulární matrix, především na protein asporin. Role asporinu v karcinomu prsu a prostaty byla prioritně popsána v naší laboratoři. Motilita nádorových buněk a exprese asporinu byla sledována po *in vitro* ovlivnění TGF $\beta$  (transforming growth factor beta) a ATRA (all trans retinoic acid).

## Summary

Cancer progression and metastasis, main cause of mortality of oncology patients, is still not well understood. It is a multistep process regulated at several levels. Prostate carcinoma is the second most frequently diagnosed cancer and the third cause of death of men in western countries. Breast carcinoma is, after lung cancer, the second most common cause of cancer death of women. Adjuvant therapy of both cancer types is based mainly on blockade of hormonal signalling. Invasion and metastasis require extensive reorganisation of tumour cells, their cytoskeleton and cell surface molecules. Signalling pathways related to epithelial mesenchymal transition and metastasis are principally TGF $\beta$ , Wnt, Notch and Hedgehog. Migrating cells are actively modulating extracellular matrix, which is forming primary barrier for proceeding cells. In my diploma thesis I focused on extracellular matrix related proteins, with asporin as a main target. Role of asporin in breast and prostate carcinoma was first reported by our laboratory. Cell motility and asporin expression was monitored after treatment of breast and prostate cancer cell lines with TGF $\beta$  (Transforming Growth Factor beta) and ATRA (All Trans Retinoic Acid).

Prohlašuji, že jsem svou diplomovou práci zpracovala samostatně a s použitím uvedené literatury.

Olomouc 29.4.2009

.....

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému školiteli Mgr. Janu Bouchalovi, Ph.D. za možnost pracovat na velmi aktuálním tématu, jeho cenné rady, trpělivost a ukázkový přístup. Děkuji také Janě Holinkové, Evě Pimrové a Mgr. Monice Levkové za spolupráci a příjemné pracovní prostředí. Velké poděkování patří profesoru Paulovi Murrayovi, doktoru Vishallu Bhardwajovi a doktoru Karlu Baumforthovi za možnost stáže na CRUK v Birminghamu. V neposlední řadě děkuji své mamince a prarodičům za psychickou a finanční podporu během celého mého studia.

# OBSAH

1	Úvod .....	8
2	Současný stav řešené problematiky .....	10
2.1	Invazivní a metastatický proces .....	10
2.2	Charakteristika epiteliálně mesenchymální transice a její regulace .....	13
2.2.1	Role EMT v karcinomu prsu a prostaty .....	14
2.2.2	Mezenchymálně epiteliální transice (MET) .....	15
2.3	Teorie nádorových kmenových buněk .....	16
2.4	TGF $\beta$ .....	18
2.4.1	BMP dráha (bone morphogenetic protein) .....	20
2.5	Wnt/ $\beta$ catenin signální dráha .....	21
2.5.1	Wnt/ $Ca^{2+}$ signální dráha .....	22
2.5.2	Wnt/PCP signální dráha .....	22
2.5.3	Wnt/G proteinová signalizace .....	23
2.6	Další faktory a signální dráhy angažované v EMT a metastázování .....	23
2.6.1	Notch dráha .....	24
2.6.2	Hedgehog dráha .....	24
2.6.3	NF $\kappa$ B (Nuclear Factor-KappaB) .....	25
2.6.4	ATRA (all trans retinoic acid) .....	26
2.7	Asporin a další proteiny kooperující s ECM .....	26
2.7.1	CUTL1 (CUX1, Cut-like homeobox 1) .....	28
2.7.2	CTHRC1 (collagen triple helix containing 1) .....	28
2.7.3	POSTN (periostin) .....	29
2.7.4	LRRC15 (leucin rich repeat containing 15) .....	29
2.7.5	Versican (CSPG2, chondroitin sulfate proteoglycan 2) .....	29
3	Metodika .....	31
3.1	Vybavení laboratoře .....	31
3.2	Softwarové vybavení laboratoře .....	31
3.3	Chemikálie .....	32
3.4	Buněčné linie .....	33
3.5	Rozmrazování buněk .....	33
3.6	Pasážování buněk .....	34
3.7	Ovlivňování buněk TGF $\beta$ a ATRA .....	34
3.8	Sběr buněk pro účely izolace nukleových kyselin .....	35
3.9	Izolace celkové RNA (za použití Trizolu <sup>®</sup> ) .....	35
3.10	Reverzní transkripce .....	36
3.11	Polymerázová řetězová reakce .....	37
3.12	Gelová elektroforéza .....	38
3.13	Scratch assay .....	39
4	Výsledky .....	40
6	Závěr .....	48
7	Seznam zkratk .....	49
8	Literatura .....	52

# 1 Úvod

Rakovina je definována jako vývojové onemocnění, které zahrnuje dysfunkci mezibuněčných interakcí a vychází z deregulovaného růstu několika buněčných typů (Ingber, 2008). Se svou incidencí 7,5 milionů případů jsou nádory druhým vedoucím onemocněním s nejvyšší úmrtností na světě (www.who.org). Maligní transformace buněk vyžaduje pět až deset genetických zásahů do onkogenů nebo tumor-supresorových genů. Tyto zmutované geny způsobují alterace v řadě buněčných mechanismů, vedoucích ke vzniku plně maligní nádorové buňky (Hanahan *et* Weinberg, 2000).

Karcinom prsu je po nádorech plic nejčastějším příčinou smrti u žen s nádorovým onemocněním v rozvinutých zemích. Hlavními vnějšími faktory ovlivňujícími riziko vzniku karcinomu prsu je dlouhodobá expozice estrogenům, ionizujícímu záření, kouření a dieta s velkým množstvím lipidů (Schultz, 2005). Karcinom prsu se historicky dělí na dvě hlavní skupiny, lobulární a duktální karcinomy s odlišnými fyziologickými atributy (Acs *et al.*, 2001). Nová klasifikace vychází z analýz expresních profilů, kdy byly identifikovány 4 hlavní skupiny karcinomů prsu. První skupina karcinomů je charakterizována expresí cytokeratinů luminálního typu, estrogenových (ER) a progesteronových (PR) receptorů a podle intenzity jejich exprese je dále rozdělena na podskupinu „luminal-A“, s vysokou expresí těchto markerů, a „luminal-B/C“ s nízkou expresí. Druhá skupina karcinomů je definována vysokou expresí ERBB2. Třetí skupina, „basal-like“, se vyznačuje vysokou expresí cytokeratinů bazálního typu a jsou obvykle tzv. triple negativní (ER/PR/ERBB2 negativní). Čtvrtá skupina byla pojmenována „normal-like“ a byla pro ni charakteristická exprese genů exprimovaných především tukovou a neepiteliální tkání z karcinomu prsu. Uvedené rozdělení má zásadní význam pro výběr léčby, kdy se adjuvantní terapie zaciluje zejména na ER, PR a ERBB2, přičemž triple-negativní karcinomy jsou biologicky nejagresivnější skupinou (Perou *et al.*, 2000, Sorlie *et al.*, 2001).

Karcinom prostaty je v rozvinutých zemích druhým nejčastěji diagnostikovaným nádorem a třetí nejčastější příčinou smrti u mužů. U maligních nádorů prostaty jde až na výjimky o adenokarcinom (přes 95% případů). Sarkomy a jiné vzácné formy nádorů mají zastoupení menší než 5%. Karcinom prostaty obvykle vzniká v zadním laloku prostaty (periferní zóna). Nádor vyrůstá především ze žlázového epitelu (submukózní a hlavní žlázy) a vyznačuje se různým stupněm diferenciace. Během časných stádií je růst androgen dependentní a androgenová ablace je standární léčbou nádorů, které již místně progredovaly (orgánově ohraničené léze jsou odstraněny chirurgicky, případně ozařováním). Po počáteční odpovědi však androgenová blokáda přestává být účinná a



nádory progredují do androgen refraktorního stádia, pro které v současné době neexistuje uspokojivá léčba (Damber *et al.* 2008).

Metastázy jsou příčinou smrti u 90 % nádorových onemocnění (Sporn, 1996). Již před více než 100 lety byla popsána hypotéza „seed and soil“ (Paget, 1889), podle které závisí metastazování na vztahu mezi selektovanými nádorovými buňkami („seeds“) a specifickým orgánovým prostředím („soil“) (Fidler, 2003). Stroma cílových tkání vykazuje částečně podobné vlastnosti a metastazující buňky mohou nedostatečné pokrytí nutných signálů kompenzovat genetickými alteracemi a autokrinní signalizací (Wells *et al.* 2008). Obecně je metastazování sekvenční proces, kdy se nádorová buňka musí uvolnit z primárního tumoru, proniknout do okolní tkáně a vstoupit do cévního řečiště krevního, nebo lymfatického systému. Následně musí vystoupit z cirkulace do sekundární tkáně, vytvořit mikrometastázu a pro další růst zajistit krevní zásobení (Croker *et al.* 2008). Invaze a metastazování vyžaduje extenzivní reorganizaci nádorových buněk, jejich cytoskeletu a povrchových molekul. Molekuly zajišťující homotypickou komunikaci jako E-cadherin a konexiny jsou obvykle mutovány a pro destrukci okolní extracelulární matrix sekretují nádorové a stromální buňky metaloproteinázy a aktivují proteázu plazmin (Schultz, 2005). Recentním vysvětlením vzniku metastáz může být teorie nádorových kmenových buněk, která předpokládá, že subpopulací primárního nádoru jsou i „pseudo-kmenové“ („stem-like“) buňky. Tyto buňky mohou být zodpovědné za iniciaci a udržování nádoru, což dává nové možnosti protinádorové terapie, zaměřené právě na nádorové kmenové buňky. Epteliálně mesenchymální transice (EMT) je dalším fenoménem, který se snaží vysvětlit metastazování z pohledu deregulace vývojových mechanismů. Tento proces úzce souvisí se signálními drahami TGF $\beta$ , Wnt, Notch a Hedgehog. K EMT dochází fyziologicky při vývoji embrya, nicméně recentní studie prokázaly proces EMT i u nádorů (Croker *et al.* 2008).

Ve své diplomové práci jsem se zabývala především studiem asporinu, který byl primárně identifikovaný u osteoartritidy, ale recentně byl popsán i v souvislosti s nádory prsu a prostaty (Nakajima *et al.*, 2007, Turashvili *et al.*, 2007). Motilita buněk a exprese asporinu byla sledována po *in vitro* ovlivnění TGF $\beta$  (transforming growth factor beta) a ATRA (all trans retinoic acid).

## 2 Současný stav řešené problematiky

### 2.1 Invazivní a metastatický proces

Invaze a metastazování jsou komplexními procesy. Před nástupem invaze nebo v jejím průběhu nádorové buňky aktivují svou okolní podpurnou tkáň, vyvolávají zánět a angiogenezi. Invaze způsobená karcinomovými buňkami zahrnuje sníženou buněčnou adhezi, zvýšenou motilitu, destrukci bazální laminy a remodelaci ECM. V programu metastazování nádorové buňky vstupují do krevních nebo mízních cév, přežívají zde, vyhýbají se útokům imunitního systému, extravazatují, adherují a prolifерují v odlišné tkáni (přehledně zpracováno v Schultz, 2005).

Aktivní motilita buněk je esenciální jak pro fyziologický vývoj a homeostázu tkání, zahrnující embryonální morfogenezi, hojení ran, imunitní dohled a zánět, tak i pro neoplázie a metastazování (přehledně zpracováno v Friedl *et* Bröcker, 2000). Migrace je typicky regulována integrinovou signalizací, formací fokálních (bodových) kontaktů, aktin-myozin dependentní kontraktilitou. Pohybující se buňka mění svůj tvar a tuhost k tomu aby mohla interagovat s okolními strukturami. ECM poskytuje „substrát“ stejně jako bariéru postupujícímu buněčnému tělu. Nádorové buňky vykazují široké spektrum migračních a invazních mechanismů, včetně deregulace enzymů degradujících ECM [matrix metaloproteinázy (MMP), kathepsiny a „urokinase plasminogen activator“ (uPA)] (Přehledně zpracováno v Friedl *et* Wolf, 2003).

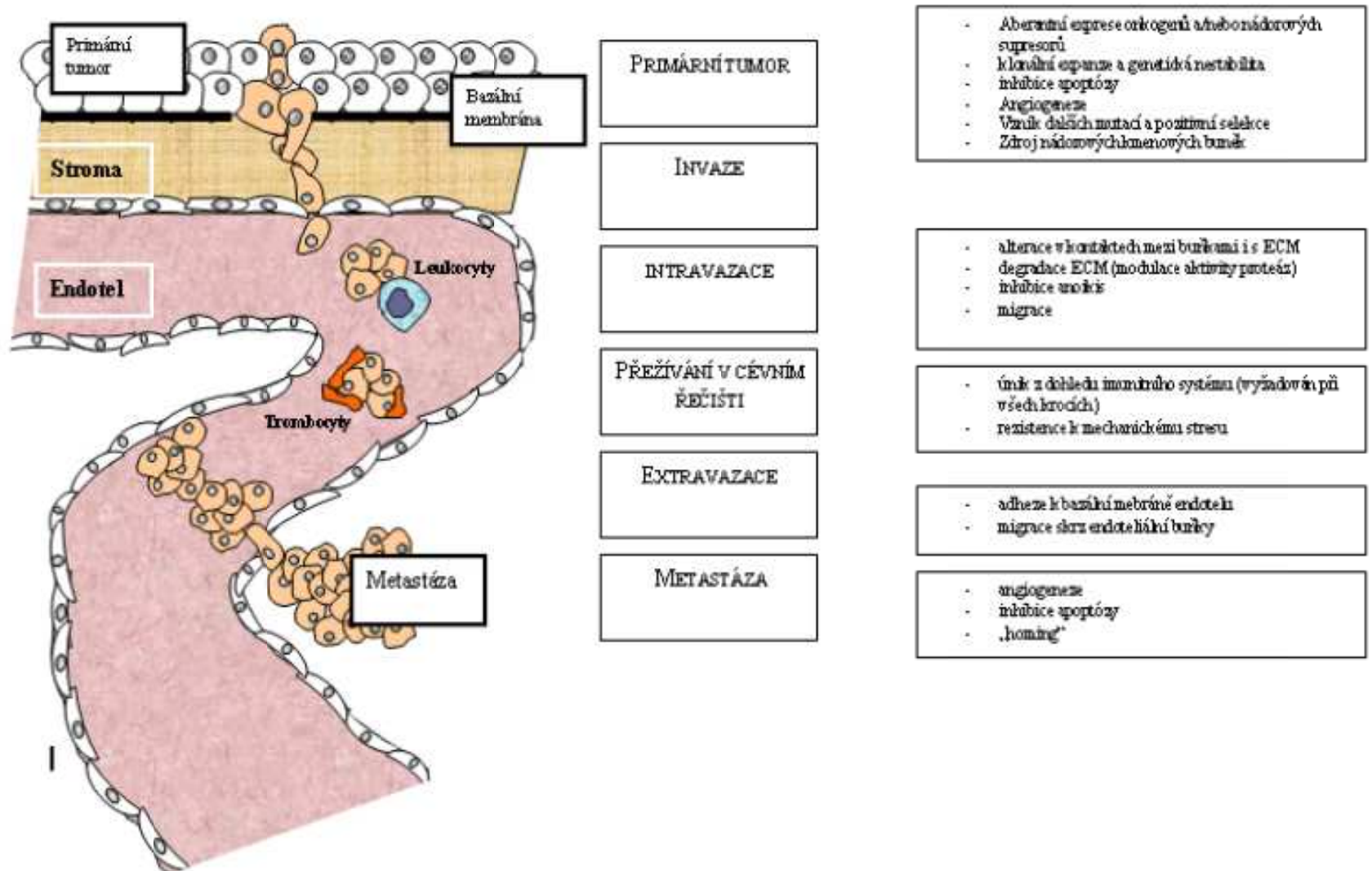
Nádorové buňky jsou schopny infiltrovat do okolní tkáně různými způsoby. Pohyb jednotlivých buněk se označuje jako „jednobuněčná migrace“ a pohyb skupiny, shluku, listu, sloupce jako „skupinová migrace“. V mnoha tumorech jsou zastoupeny obě cesty (Thiery, 2002). Jednobuněčná migrace existuje v mezenchymální a améboidní variantě. V prvním případě se buňky pohybují v pěti fázovém cyklu. Nejdříve se migrující buňka stane polarizovanou, prodlouží se a vytvoří vedoucí lamelu (1.). Dále dochází k interakci s ECM a tvorbě bodových kontaktů (2.) a následuje transport povrchových proteáz s bodová proteolýza (3.) Cyklus je zakončen aktinem zprostředkovanou kontrakcí buňky (4.) a „odlepením se“ vedoucí lamely od podkladu (5.). Buňky s mesenchymální migrací obvykle vykazují fibroblastoidní fenotyp a vyskytují se především u gliomů, fibrosarkomů a epiteliálních nádorů (přehledně zpracováno v Friedl *et* Wolf, 2003).

Améboidní typ migrace najdeme především u lymfocytů, neutrofilů, buněk tumoru ledvin, Ras transformovaných buněk prsních žláz. Pohyb je generován aktinem z kortikálních filament. Améboidní nádorové buňky vykazují nízkou adhezivitu ke

kolagenům díky nízké expresi integrinů (Přehledně zpracováno v Friedl *et* Wolf, 2003). Buňky s améboidní morfologií, jako jsou linie odvozené od melanomů, či rakoviny tlustého střeva nejsou závislé na extracelulární proteolýze a nevytváří pseudopodia. Limitujícím faktorem je blokáce Rho GTPázy anebo ROCK. Zvýšená aktivita Rho vede k aktivaci ROCK kinázy a ta fosforyluje lehký řetězec myozinu, vedoucí k silnější kontrakci aktin-myozinu. Tato síla je pravděpodobně dostačující na deformaci kolagenových vláken a tím k proniknutí skrz ECM bez proteolytického štěpení kolagenu (Sahai *et* Marshall, 2003).

Skupinová migrace je dobře prozkoumaným fenoménem, ke kterému dochází v průběhu embryonálního vývoje blastodermu nebo uzavírání neurální trubice. V kontrastu s jednobuněčnou migrací mají buňky specificky uspořádané kortikální aktinová filamenta. Toto uspořádání umožňuje vznik velkého, multicelulárního buněčného těla. V tumorech mohou být tyto útvary detekovány v každé metastatické fázi. Pro udržení podobného stavu je nutná adheze buňka-buňka a také komunikace mezi jednotlivými buňkami. Výhody skupinové migrace zahrnují vyšší sekreci promigratorních faktorů a/nebo ochranu vnitřních buněk před útoky imunitního systému.

Nově testovaná léčiva zacílená na adhezní receptory nebo proteázy nejsou v klinických fázích výzkumu zatím příliš účinná, přičemž jistým důvodem může být plasticita buněk při „reprogramování“ migračních procesů. Adaptace zahrnují epiteliálně mesenchymální transici (EMT, viz níže), mesenchymálně améboidní transici (MAT) nebo kolektivní améboidní transici (Friedl *et* Wolf, 2003). Proces MAT je charakterizován změnou morfologie (od fibroblastoidního po eliptoidní fenotyp), méně adhezivním typem pohybu, změněnou distribucí integrinu a organizací aktinového cytoskeletu a buňky jsou schopny obejít pětibodový systém migrace zahrnující pericelulární proteolýzu. Faktory vyvolávající MAT mohou být například proteázové inhibitory, zúžení vazeb mezi buňkou a ECM a inhibice Rho signální dráhy. MAT byla jako alternativní dráha prokázána u buněk HT 1080 a MDA-MB-231 při pohybu v Matrigelu (Wolf *et al.* 2003). Proces CAT je podobný konverzi při EMT s tím rozdílem, že migrující buňky udržují vzájemné integrin  $\beta 1$  dependentní vazby. Po aplikaci anti- $\beta 1$  integrin protilátky se skupiny melanomových buněk rozpadly a začaly migrovat samostatně (Hegerfeldt *et al.*, 2002). Naopak na příkladu malobuněčného karcinomu plic byla prokázána konverze jednobuněčné améboidní transice na kolektivní, čímž nádorové buňky získaly zvýšenou rezistenci k ozáření a cytostatikům (Kraus *et al.*, 2002).



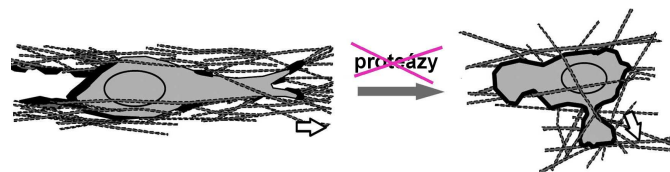
Obr. 1 Schéma metastatického procesu ( Upraveno podle [www.dismal-project.eu/overview.html](http://www.dismal-project.eu/overview.html), Huber *et al.*, 2005 )

## 2.2 Charakteristika epiteliálně mesenchymální transice a její regulace

Epiteliálně mesenchymální transice je přechodným a reverzibilním procesem. Hraje roli v embryonálním vývoji při gastrulaci nebo uzavírání neurální lišty, ale podle recentních poznatků i v nástupu migrace, invaze a rozšiřování nádorů (Thiery *et Sleeman*, 2006). Fenomén epiteliálně mesenchymální transice je sled reakcí zahrnující přechod buněk z epiteliálního do mesenchymálního fenotypu. Epiteliální buňky, které jsou součástí koherentní vrstvy s apikálně bazální polaritou se mění v méně koherentní, izolované buňky s zvýšenou migrační aktivitou bez zmiňované polarity. Mezi hlavní znaky buněk postupujících EMT patří apikální konstriktce, degradace bazální laminy (pokud je přítomna), zvýšená regulace mesenchymálních buňka-buňka a buňka-matrix povrchových molekul, endocytóza (internalizace) povrchových epiteliálních adhezních molekul, buněčných spojů a jejich komponent (Shook *et Keller*, 2003) a celková změna architektury buňky (Lee *et al.*, 2006). Nádorová EMT se od vývojové odlišuje tím, že tumorové buňky nepodstupují úplnou přeměnu ve fyziologicky mesenchymální buňky. Tato situace se nevyskytuje pouze u nádorové de-diferenciace, k inkompletní EMT dochází i při hojení ran (Hugo *et al.*, 2007).

Ztráta epiteliálního E-cadherinu a získání mesenchymálního N-cadherinu je jednou

	Mesenchymální	Améboidní
<b>Migrační strategie</b>	Cestu „vytváří“	Cestu „nachází“
<b>Mechanismus pro obcházení bariér</b>	Proteolyticky; degradace ECM	Morfologické adaptace (kontraktilní kroužek)
<b>Interakce buňka - ECM</b>	Soustředěná; integriny a MT1- MMP ve skupinách	Difuzní; integriny nejsou ve skupinách, MT1- MMP internalizovány a disociovány od integrinů



**Obr. 2 Mechanismy invaze u nádorových buněk** (Upraveno podle Friedl *et al.*, 2007)

z hlavních charakteristik EMT. Tento proces se nazývá "cadherinový spínač". Ztráta genové exprese E-cadherinu je také častou známkou progresu nádoru u většiny karcinomů, pozitivně korelující se špatnou prognózou (přehledně zpracováno v Yilmaz *et* Christofori, 2009).

E-cadherin mimo jiné váže  $\beta$ ,  $\gamma$  a p120 cateniny a zamezuje jejich transformujícímu vlivu na buněčný transkriptom. U normálních buněk je E-cadherin na membráně stabilizován díky p120-cateninu,  $\beta$ -catenin vytváří komplexy s  $\alpha$ -cateninem, čímž je E-cadherin propojen s cytoskeletem. V transformovaných buňkách mnohých karcinomů, je E-cadherin umlčován metylací promotoru nebo je na transkripční úrovni jeho exprese inhibována zvýšenou expresí Slug a Snail represorů (přehledně zpracováno ve Wells *et* Yates *et* Shepard, 2008).

EMT může být vyvolána interními faktory (například genové mutace) nebo vnějšími signály, především řadou růstových faktorů. Mezi ně patří transformační růstový faktor  $\beta$  (TGF  $\beta$ , transformation growth factor  $\beta$ ), hepatocytární růstový faktor (HGF, hepatocyte growth factor), členové rodiny epidermálních růstových faktorů (EGF, epidermal growth factor), inzulinu podobný růstový faktor (IGF, insulin like growth factor) a fibroblastový růstový faktor (FGF = fibroblast growth factor). V průběhu TGF $\beta$  vyvolané EMT je zvýšeně regulována taktéž dráha destičkového růstového faktoru (PDGF, platelet derived growth factor) (Huber *et al.*, 2005). S diverzitou signálů vyvolávajících EMT vzrůstá komplexnost drah vlastních efektorů. K signálním drahám ovlivňovaných TGF $\beta$  v EMT patří malé GTPázy RhoA a Rac1, Ras, fosfatidylinositol-3-kináza (PI3K), mitogenně aktivovaná proteinová kináza (MAPK), s integrinem spojená kináza (ILK = integrin linked kinase) a Notch signální dráha. Recentní studie taktéž prokázaly vliv mikroRNA (miR-200 a miR-205) prostřednictvím modulace funkce genů ZEB1 a ZEB2, které fungují jako transkripční represory E-cadherinu (přehledně zpracováno v Yilmaz *et* Christofori, 2009).

### **2.2.1 Role EMT v karcinomu prsu a prostaty**

Jak již bylo zmíněno v úvodu, nová klasifikace nádorů prsu (luminální ER/PR pozitivní, ERBB2 pozitivní, „basal-like triple-negative“ a „normal-like“) má velký klinický význam pro výběr léčby, kdy adjuvantní terapie se zaciluje zejména na ER, PR, ERBB2 a triple-negativní karcinomy reprezentují nejagresivnější skupinu (Perou *et al.* 2000, Sorlie *et al.*, 2001). Podle srovnání 479 klinických vzorků prsních nádorů dochází

k EMT především u triple-negativních karcinomů. Podle starší klasifikace, EMT asociovala především s nízcí diferenciovanými duktálními karcinomy a karcinosarkomy. Naopak lobulární karcinomy, i když vykazují difúzní invazi a postrádají E-cadherin, neexprimovaly další EMT markery jako jsou vimentin, cadherin 11 a osteonectin (Sarrió *et al.*, 2008).

U nádorů prostaty koreluje snížená exprese E-cadherinu s negativními prognostickými znaky jako jsou Gleasonovo skóre, lokální invazivita, pronikání buněk do cévní soustavy a relapsy tumorů po radioterapii. Mesenchymální markery zahrnují N-cadherin, osteoblastický N-cadherin, WDFC-1 proteiny a zvýšené množství extracelulárních domén N-cadherinu bylo taktéž zjištěno v séru pacientů s karcinomem prostaty. Výše zmíněné změny v expresi mezenchymálních a epiteliálních znaků souvisí s fenotypem dediferencovaných buněk a jejich agresivitou (přehledně zpracováno v Hugo *et al.*, 2007). Mnoho faktorů, které jsou u karcinomu prostaty modifikovány v nádorovém mikroprostředí může přispívat ke vzniku EMT. Patří sem například HGF a EGF, které indukují EMT u DU145 buněk. Podobně zvýšená exprese proteáz PSA (prostatic specific antigen) a KLK4 (kalikrein 4), které jsou potencionální aktivátory pro-EGF a latentní TGFβ, vede k EMT u PC3 buněk. PSA i KLK4 jsou běžnou součástí prostatického sekretu, nicméně při nádorové progresi se mohou dostat do nádorového mikroprostředí při porušení glandulární architektury prostaty (přehledně zpracováno v Hugo *et al.*, 2007).

## 2.2.2 Mezenchymálně epiteliální tranzice (MET)

Při embryogenezi často dochází k přechodné EMT, která je následována MET na místech jako jsou segmentální destičky, ledviny, gastrontestinální trakt, plíce a kůže. Po osídlení nových embryonálních nik, mesenchymální buňky mohou zpětně získat epiteliální

**Tab. 1 Vybrané markery EMT** (Převzato z Lee *et al.*, 2006)

Zvýšená přítomnost proteinů	Snížená přítomnost proteinů	Zvýšená aktivita proteinů	Proteiny kumulující se v jádře	Funkční markery <i>in vitro</i>
N-cadherin	E-cadherin	ILK	β-catenin	Zvýšená migrace
Vimentin	Desmoplakin	GSK-3 β	Smad 2/3	Zvýšená invazivita
Fibronektin	Cytokeratiny	Rho	NFκB	Prodlužování buněk
Snail1 (Snail)			Snail1 (Snail)	Rezistence k anoikis
Snail2 (Slug)			Snail2 (Slug)	
Twist			Twist	
FOXC2				
MMP- 2, -3, -9				
Integrin αβ6				

morfologii (přehledně zpracováno v Blick *et al.*, 2008; Bukholm *et al.*, 2000). Tyto procesy probíhají normálně v rámci vývoje organismu, nicméně podobným mechanismem disponují i nádorové buňky, kde se jedná o mezenchymálně epiteliální reverzní tranzici (MER<sup>T</sup>). Nádorové buňky potom znovu exprimují E-cadherin a vytváří epiteliální spoje. Například na modelu E-cadherin negativní prsní linie MDA-MB-231, které byly inokulovány do tukových polštářků myši, bylo zjištěno, že sekundární plicní metastázy exprimovaly E-cadherin. Tento důležitý experiment ukazuje, že E-cadherin negativní buňky mohou dát základ E-cadherin pozitivním metastázám (přehledně zpracováno v Wells *et Yates et Shepard*, 2008).

### 2.3 Teorie nádorových kmenových buněk

Kmenové buňky mají v organismu nezastupitelnou funkci při udržování homeostázy a sebeobnovy organismu. *Embryonální kmenové buňky* (ESC, embryonic stem cells) je možné připravit z preinplantačních embryí, přičemž z postimplantačních embryí jsou izolovány *embryonální zárodečné buňky* (EGC, embryonic germ cells). Adultní tkáň obsahuje *orgánové (dospělé) kmenové buňky* (ASC, adult stem cells), které dávají za vznik progenitorovým nebo více diferencovaným buňkám. ASC buňky se nacházejí difuzně ve všech tkáních a jsou zároveň potencionálními *nádorovými kmenovými buňkami* (CSC, cancer stem cells) (Hombach-Klonisch *et al.*, 2008). Maligní variantou ESC jsou *embryonální karcinomové buňky* (ECC, embryonic carcinoma cells), které jsou kmenovými buňkami teratokarcinomů (Novotná *et Mareš.*, 2005). Kmenové buňky jsou schopny jak symetrického dělení, při kterém vznikají dvě stejné kmenové buňky tak i asymetrického, kdy kmenová buňka dává vznik dceřiným buňkám podstupujícím diferenciaci. Důkazem toho, že kmenové buňky hrají roli v karcinogenezi je přítomnost několika společných znaků u normálních i nádorových kmenových buněk. Především je to schopnost sebeobnovy, schopnost diferenciace, aktivní telomeráza, blokáda apoptózy, zvýšený membránový transport a schopnost migrovat. Myšlenka o původu nádorů z kmenových buněk je stará přibližně 150 let. Na zvířecích modelech se ukázalo, že identifikovatelná subpopulace nádorových buněk skutečně vykazuje vlastnosti jako je schopnost sebeobnovy a diferenciace. Sebeobnova pohání tumorigenezi, zatímco diferenciace zajišťuje nádorově fenotypovou (Dontu *et al.*, 2003). První důkaz o existenci nádorových kmenových buněk poskytli Bonnet a Dick v roce 1997, kdy vyizolovali subpopulaci CD34<sup>+</sup>/CD38<sup>-</sup> buněk (ve frekvenci menší než 1 na 10000 leukemických



buněk), které byly schopné vyvolat leukemii po inokulaci do NOD/SCID myší. Stejná výzkumná skupina také prokázala, že CSC buňky mají různý potenciál sebeobnovy, což odpovídá heterogenitě (vývojové hierarchii) normálních hematopoietických kmenových buněk. Obdobná pozorování byla učiněna u nádoru prsu, kdy méně než 200 CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> buněk, které tvořily 1-10 % celkové nádorové populace, bylo schopno vyvolat nádor po inokulaci do NOD/SCID myší. Buňky CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> jsou nejen tumorigenní, ale v *in vitro* podmínkách jsou schopny tvořit také mamoféry, což je typické pro normální kmenové buňky prsu (Přehledně zpracováno ve Wicha *et al.*, 2006). Přítomnost tumorových kmenových buněk byla odhalena také v aberantně proliferující mozkové tkáni (Singh *et al.*, 2003), pankreatu (Li *et al.*, 2007), prsu (Al-Hajj *et al.*, 2003), ovariu (Zhang *et al.*, 2008), prostatě (Maitland *et al.*, 2008; Langh *et Frame et Collins*, 2009) a střevě (O'Brien *et al.*, 2007). Transformace normálních kmenových buněk na nádorové je pravděpodobně důsledkem deregulace signálních drah, které jsou zapojeny především v regulaci sebeobnovy (například dráhy Wnt, Notch, Hedgehog a BMP; viz níže).

Vysvětlením selhání současné terapie solidních tumorů může být fakt, že nádor a tvorba metastáz je řízena malou populací nádorových kmenových buněk, které vykazují lékovou rezistenci. Podstata rezistence na chemoterapeutika není dosud jasná, ale důvodem může být vysoká exprese anti-apoptotických proteinů, ABC transportéry nebo gen vícečetné lékové rezistence (MDR = multi drug resistance) (Přehledně zpracováno v Reya *et al.*, 2001). K chemoterapeutické rezistenci mohou přispívat také efektivní reparační mechanismy nebo kinetika buněčného cyklu, kdy je většina nádorových kmenových buněk v G<sub>0</sub> fázi, a tedy necitlivá k chemoterapeutickým agens (přehledně zpracováno Wicha *et al.*, 2006).

CSC pravděpodobně hrají významnou roli v metastázování a existuje několik způsobů jak se mohou zapojovat do tvorby sekundárního ložiska. Původní CSC které vyvolaly primární tumor se mohou podílet přímo na tvorbě metastáz a oba procesy se jsou

**Tab. 2 Přehled vybraných porhcových markerů nádorových kmenových buněk**

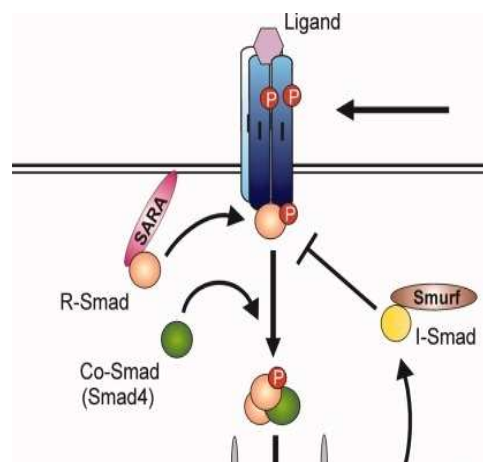
Povrchový marker	Lokalizace	Stav	Citace
CD34 <sup>+</sup> /CD38 <sup>-</sup>	Aberantní lymfocyty, leukemie	exprese	Bonnet <i>et Dick.</i> , 1997
CD44 <sup>+</sup> /CD24 <sup>low lin-</sup>	Karcinom prsu	exprese	Al-Hajj <i>et al.</i> , 2003
Oct -4	Karcinom prsu	exprese	Ponti <i>et al.</i> , 2005
Cx43	Karcinom prsu	absence exprese	Ponti <i>et al.</i> , 2005
CD133 (Prominin)	více tkání	exprese	Mizrak <i>et al.</i> , 2008
ALDH1	Karcinom prsu	exprese	Douville <i>et al.</i> , 2008
CD138 (Syndecan-1)	Vícečetný myelom	absence exprese	Matsui <i>et al.</i> 2004

pravděpodobně spíše paralelní než sekvenční. Druhou možností jsou mutačně nebo epigeneticky změněné CSC, které mohou mít selekční výhodu pro invazivní růst a metastazování. Vytvoření takovéto „metastatické CSC“ pravděpodobně úzce souvisí s epiteliálně mesenchymální tranzicí (EMT). EMT je často pozorována na invazní hranici nádorů, přičemž u nádoru pankreatu byly CSC z této invazivní hranice zásadní pro metastatický proces. V neposlední řadě CSC mohou také metastazovat společně s ostatními typy tumorových buněk. Po uhníždění v sekundárním ložisku CSC přispívají k dalšímu růstu, nicméně v metastáze je obvykle větší procento více diferencovaných buněk než buněk v původním nádoru, což pravděpodobně souvisí s vlivem nového nádorového mikroprostředí (přehledně zpracováno v Marotta *et* Polyak, 2009).

## 2.4 TGF $\beta$

Superrodina transformačního růstového faktoru beta (TGF  $\beta$ , transforming growth factor  $\beta$ ) sestává z více než 35 strukturně podobných polypeptidů a dělí se na dvě hlavní větve, skupinu BMP (bone morphogenetic proteins)/GDF (growth differentiation factor) a TGF  $\beta$ /Activin/Nodal (Leivonen *et* Kähäri, 2007). Faktory z obou skupin mají odlišné, i když komplementární efekty a jsou klíčovými regulátory buněčné proliferace, adheze a modulují extracelulární matrix i imunitní systém (Hogan 1996; Reddi, 2005).

TGF  $\beta$  existuje v pěti izoformách TGF  $\beta$ -1 až 5 a v aminokyselinových sekvencích vykazují 70-80% homologii. Biologicky aktivní formou TGF  $\beta$  jsou homodimery vázané disulfidickými můstky. Nejvíce prevalentní formou je TGF  $\beta$ -1, dále TGF  $\beta$ -2, NGF



**Obr.2 TGF  $\beta$  signální dráha**  
(Upraveno podle Leivonen *et* Kähäri, 2007)

(Nerve growth factor a PDGF (platelet derived growth factor)). V savčích buňkách jsou obecně exprimovány TGF  $\beta$ -1 až 3 a všechny tři izoformy jsou sekretovány v biologicky inaktivních prekurzorech, tzv. latentních TGF  $\beta$  (L-TGF  $\beta$  = latent TGF  $\beta$ ). Při fyziologických podmínkách jsou TGF  $\beta$  aktivovány kyselým prostředím a proteolýzou, především plazminem a matrixovými proteázami (MMPs – matrix metalloproteinases). Po aktivaci se růstové faktory váží na své receptory a iniciují signální kaskádu přes Smad, a případně i

mitogenně aktivované protein kinázy (MAPK – mitogen activated protein kinase) (Annes *et al.*, 2003).

Existují tři typy TGF  $\beta$  receptorů (typ I, II, III), přičemž receptory I a II vytváří po vazbě ligandů heterokomplexy a iniciují intracelulární signalizaci. U savců se nachází sedm různých receptorů typu I a pět receptorů typu II. Receptory TGF  $\beta$  typu I a II jsou velmi podobné transmembránové glykoproteidy s glykosylovanou extracelulární doménou, krátkou transmembránovou doménou a intracelulární serin/threoninovou kinázovou doménou. Signální kaskáda začíná navázáním TGF  $\beta$  na receptor II, který poté interaguje s receptorem I a dochází ke zkřížené fosforylaci. Receptor prvního typu je charakteristický konzervovanou oblastí bohatou na glycin a serin, tzv. GS oblast, která je po dimerizaci fosforylována kinázou T $\beta$ RII. To vede k aktivaci kinázové domény prvního receptoru a iniciaci spádové reakce a fosforylaci Smad signálních mediátorů (přehledně zpracováno v Leivonen *et Kähäri*, 2007). Třetí typ receptoru T $\beta$ RIII, známý také jako betaglycan, může napomáhat při vazbě ligandu k T $\beta$ RII nebo při vazbě inhibinu, aktivinového antagonisty, k aktivinovým receptorům (Lewis *et al.*, 2000).

Savčí rodina Smad je tvořena 8 členy, rozdělené do 3 skupin podle funkce. Receptorově aktivované Smad (R-Smad, Smad 1,-2,-3,-5,-8), běžné mediátorové Smad (Co-Smad = common mediator Smad, Smad 4) a inhibiční Smad (I-Smad, Smad 6 a 7). Smad proteiny obsahují 2 velké konzervované domény, N-terminální (MH1) a C-terminální (MH2) Mad homologické domény. Obě domény jsou odděleny méně konzervovanou oblastí bohatou na prolin, která má význam v kooperaci Smad rodiny a MAPK (mitogen activated protein kinase) dráhou (přehledně zpracováno v Leivonen *et Kähäri*, 2007). Receptory větve TGF  $\beta$  cytokinů reagují se Smad 2 a 3, zatímco skupina BMP receptorů fosforyluje Smad 1, 5, 8. Po aktivaci putují receptorově aktivované Smad

**Tab.3 Role TGF  $\beta$  v tumorigenezi** (Převzato z Massagué, 2008)

Premalignantní stádium	Tumor supresivní efekty: cytostatický efekt, Diferenciace Apoptóza Suprese tumorigenního zánětu Suprese stromatických mitogenů
Maligní progresse (ztráta nádorové suprese)	Ztráta imunitního dohledu Produkce autokrinních mitogenů Motilita
Invazivita a metastázování	Epiteliálně mesenchymální tranzice Myofibroblastová mobilizace Tvorba metastáz
Metastatická kolonizace	Extravazace Zvýšená mobilita osteoklastů Modifikující faktory mikroenvironmentu: Cytokiny, proteázy

faktory do jádra, kde vytváří komplex se Smad 4 (Shi *et* Massagué, 2003). Smad proteiny vykazují DNA vazebnou aktivitu a v kooperaci s dalšími transkripčními kofaktory regulují aktivitu stovek genů (přehledně zpracováno v Massagué, 2008). TGF  $\beta$  stimuluje syntézu hlavních proteinů ECM, zahrnujícím kolagen, proteoglykany, glukosaminoglykany, fibronektin, integriny, trombospondin a proteiny kostní matrix. Degradace těchto proteinů je možná díky inhibici syntézy neutrálních metaloproteináz a zvýšením syntézy proteinázových inhibitorů (Qureshi *et* Ricci *et* Zafarullah, 2008).

V normální tkáni udržuje TGF  $\beta$  homeostázu. V případě poranění je TGF  $\beta$  uvolňován trombocyty a ostatními stromálními komponenty do krve, kde zabraňuje deregulované buněčné proliferaci a zánětu. Podobné podmínky existují i u nádoru, kdy je TGF  $\beta$  často přítomen v nádorovém tkáni jako signál pro prevenci premaligní progresse. TGF  $\beta$  tak může zastávat funkci nádorového supresoru, ale za jiných podmínek podporuje růst a metastázování. Tento paradoxní stav, může být částečně vysvětlen sníženou expresí obou receptorů u nádorových buněk, což i při vysoké sekreci TGF  $\beta$  snižuje autokrinní inhibici růstu. Tento fakt je podporován i nálezem, kdy obnovená exprese u linie buněk lidské rakoviny prostaty vedla k indukci apoptózy a inhibici růstu xenografických tumorů (Djakiew, 2000). Dalším mechanismem rezistence vůči TGF  $\beta$  mohou být mutační změny v receptorech I anebo II a Smad, což podává důkaz o roli Smad signalizace v tumorigenezi (Park *et al.*, 2000). Deregulace TGF  $\beta$  signalizace u Smad se děje především na úrovni Smad 4 a Smad 2 (Massagué *et al.*, 2000).

Důležitá role tohoto růstového faktoru v metastázování byla prokázána na modelech karcinomu prsu. U myší docházelo k tvorbě kostních metastáz prostřednictvím Smad signalizace (Deckers *et al.*, 2006). U buněčné linie MDA-MB-231 byly prokazatelně inhibovány kostní metastázy v myším xenograftu blokadě Smad 4 pomocí RNA-interference. Azuma *et al.* prokázali, že zvýšená exprese inhibičního Smad 7 v kulturách prsních nádorových linií a u *in vivo* modelů inhibovala invazivní fenotyp. TGF  $\beta$  je kritický taktéž pro ER negativní prsní nádorové linie pro konečné fáze metastázování, tj. přežití v cévním řečišti, extravazace nebo kolonizaci v plicní tkáni (Welm, 2008).

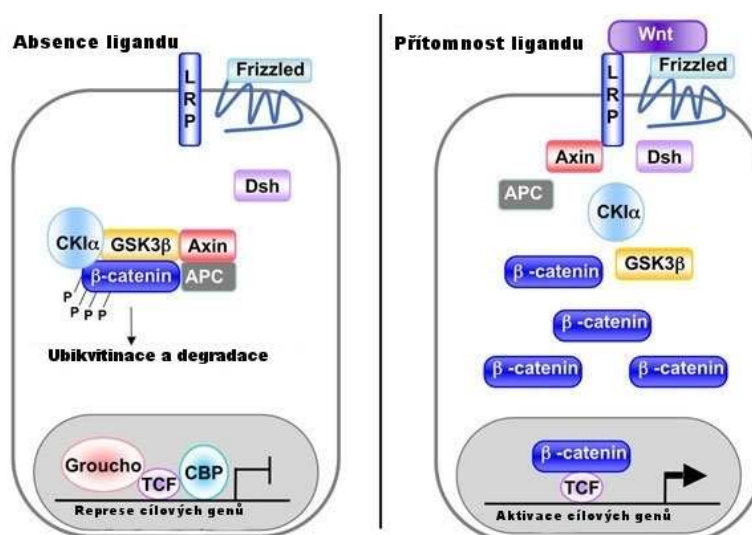
#### **2.4.1 BMP dráha (bone morphogenetic protein)**

BMP signalizace hraje důležitou úlohu v buněčné proliferaci a diferenciaci. Účinky BMP proteinů mohou být autokrinní i parakrinní. Existují dva typy receptorů, přičemž receptor I má tři varianty BMPRIA, BMPRIB a activinový receptor IA

(Yamashita *et al.*, 1995). Exprese receptorů je tkáňově specifická a pro aktivaci signální dráhy je nutná přítomnost obou receptorů, které dimerizují po vazbě ligandu. Dimer je aktivován po fosforylaci receptoru I receptorem II a signalizace poté postupuje přes fosforylaci Smad 1, 5 a 8, které aktivují Smad 4 a jeho translokaci do jádra. BMP proteiny a jejich receptory hrají úlohu v mnoha vývojových procesech nervové soustavy, hematopoézy, srdce a skeletu (Přehledně zpracováno v Bailey *et al.*, 2007). Deregulace BMP dráhy byla také identifikována u několika typů nádorů. BMP 4, 6 a 7 byly exprimovány u prostatického adenokarcinomu s manifestujícími kostními metastázami (Masuda *et al.*, 2003). BMP 2 je taktéž důležitým faktorem u nádorů prsu. Prsní nádorové linie vykazovaly chemotaxi ke zdroji BMP2. Buňky MCF7, které exprimovaly BMP2 zvýšeně invadovaly v Matrigelu® (Clement *et al.*, 2005).

## 2.5 Wnt/ $\beta$ catenin signální dráha

Signální dráha zprostředkovaná Wnt (wingless type) proteiny je vysoce evolučně konzervovaná a je kritická pro buněčnou proliferaci, apoptózu, diferenciaci, migraci i obnovu nádorových kmenových buněk. U lidských buněk existuje 19 Wnt proteinů, které vykazují až 83% homologii. Wnt signalizace se uskutečňuje 10 receptory, zvané Fz receptory (fz, frizzled)(Kato *et al.*, 2006). Transdukce signálu může probíhat nejméně třemi intracelulárními drahami, zahrnujícími kanonickou Wnt/beta-catenin, non-kanonickými Wnt/ $Ca^{2+}$  a Wnt/PCP (planar cell polarity) drahami (Turashvili *et al.*, 2006).



Obr. 3 Wnt kanonická dráha (Upraveno podle David M. Eisenmann, [www.wormbook.org/wntfig1.jpg](http://www.wormbook.org/wntfig1.jpg))

Při absenci Wnt ligandu se beta-catenin váže na CK1 alfa (Casein Kinase-1-alpha), GSK3Beta (Glycogen Synthase Kinase-3-Beta), AXIN (Axis Inhibitor) a APC (Adenomatous Polyposis Coli protein), což vede k ubikvitinaci a proteolýze beta-

cateninů (Blavier *et al.*, 2006) (viz obr. 4). Kanonická Wnt signalizace probíhá připojením ligandu na Fz receptor, což vede k aktivaci Dsh (Dishevelled) proteinu, který inhibuje aktivitu degradačního komplexu APC-axin-GSK3. Tím je umožněna akumulace volného beta-cateninu v cytoplazmě a jeho transport do jádra, kde společně s LEF (Lymphoid-Enhancing Factor) a TCF (T-Cell Factor) aktivuje expresi cílových genů. Cílové geny zahrnují například WISP-1 (Wnt-induced secreted protein 1), CD44, vimentin, MMP7 a 26, uPAR (Urokinase-type Plasminogen Activator Receptor), TCF1 (Transcription Factor-1), Slug, Gastrin a Twist. Tyto geny hrají klíčovou úlohu v buněčném růstu a migraci. Například transkripční faktor Twist a Wnt1 přispívají k tumorigenezi u prsních nádorů, kdy je zvýšeně regulován 69% nádorů prsu (Watanabe *et al.*, 2004). Jinou alterací u nádorů prsu se špatnou prognózou je hypermetylace promotoru sFRP1 (secreted Fz-related protein 1), který je za normálního stavu schopen tvořit komplex s Wnt ligandy a bránit tak jejich vazbě na Fz receptory (Přehledně zpracováno v Turashvilli *et al.*, 2006).

Non-kanonické, na beta-cateninu nezávislé, dráhy primárně modulují buněčný pohyb. Jsou popsány tři mechanismy non-kanonické dráhy, všechny zahrnují vápník jako mediátor. Patří sem dráha Wnt/Ca<sup>2+</sup>, Wnt/PCP a pravděpodobná Wnt/G-protein sig. dráha (Přehledně zpracováno v Kohn *et Moon.*, 2005).

### 2.5.1 Wnt/Ca<sup>2+</sup> signální dráha

Role vápníku ve Wnt signalizaci se děje především v součinnosti s Wnt 11 a Wnt5. Samotná vazba Wnt k Fz receptorům vede ke zvýšené koncentraci vápníku v cytoplazmě. Jev poté moduluje kalcium/calmodulin dependentní protein kinázu II (CamKII) a protein kinázu C (PKC). Specifitě signálu dopomáhají koreceptory Knypek a Ror2 a dále i Fz proteiny. Intracelulární uvolňování vápníku je vyžadováno pro tělesné uspořádání v průběhu embryogeneze. Ztráta funkce Wnt5 u modelu ryby *Danio* vedla k hyperdorzalizaci embryí (Přehledně zpracováno Turashvilli *et al.*, 2006). Předpokládá se, že Wnt/Ca<sup>2+</sup> reguluje vývoj myoblastů a adultních myocytů (Anakwe *et al.*, 2003).

### 2.5.2 Wnt/PCP signální dráha

Role Wnt/PCP dráhy spočívá na rozdíl od kanonické dráhy v efluxu DVL-1 do plasmatické membrány (Widelitz, 2005). Proteiny zúčastněné ve Wnt jsou Fizzled, Dishevelled, Prickle, Strabismus a Rho. Asociace Prickle1 (Pk1), Strabismu a Dishevelled vede k přepínání ve Wnt signalizaci. U embryí *Dania* vedla zvýšená exprese Pk1 k dvou až třináásobnému uvolnění vápníku do cytosolu. Tento nálezn dokládá možný překryv

s Wnt/Ca<sup>2+</sup> (Veeman *et al.*, 2003). Wnt/PCP taktéž zahrnuje malé GTPázy jako Rho a Cdc42. Nadměrná exprese dominantně negativní Cdc42 vedla k změně růstu embryí drápatky *Xenopus*. Tyto změny taktéž vyžadují vápník pro aktivaci (Choi *et al.*, 2002).

### 2.5.3 Wnt/G proteinová signalizace

Díky sekundární struktuře transmembránových Fz receptorů, tvořených sedmi helixy existuje předpoklad pro přenos signálu přes GTP (guanosin-trifosfát). Signalizace přes GTP vyžaduje kalciový tok. Stimulace G proteinů je v asociaci s aktivací fosfatidil inositolové dráhy následovanou transkripcí cílových genů. Aktivita Wnt nezávislá na beta cateninu hraje roli v orientaci tělesné osy. Mutace Wnt5 nebo Fz-2 vedou defektní posteriorní orientaci těla *Dania*. Modelové a klinické studie ukazují, že proces Wnt/G proteinové signalizace závisí na zvýšené expresi a aktivitě inhibitorů (Jönsson *et Anderson*, 2001). Genetická analýza u *Drosophily* prokázala důležitou roli G proteinů pro Fz signalizaci, jejich role v metabolismu obratlovců ovšem zůstává neznámá (Katanaev *et al.*, 2005).

Deregulace E-cadherinu rozvolňuje proteiny z cytoplazmatického adhezního komplexu, vykazující ambivalentní funkce v závislosti na jejich subcelulární lokalizaci. Nejsilnějším partnerem, který s E-cadherinem kooperuje je  $\beta$ -catenin (Clevers, 2006). Inhibice TGF  $\beta$  signalizace u E-cadherin exprimujících FosER buněk došlo k reverzi fenotypu na polarizovaný, ve kterém byl E-cadherin a  $\beta$ -catenin na správných doménách na cytoplazmatické doméně. Ztráta E-cadherinu může přispívat ke zvýšené LEF/TCF- $\beta$ -cateninové signalizaci, která zpětně kooperuje s autokrinní TGF  $\beta$  dráhou aby se udržel nediferencovaný mesenchymální fenotyp (Eger *et al.*, 2004).

U karcinomu prostaty byl prokázán taktéž účinek asociace Wnt5a se sFRP1 (Secreted Frizzled-related protein-1) na inhibici účinků androgenů. sFRP1 inhibuje transkripční aktivitu androgenového receptoru (Kawano *et al.*, 2009). Wnt/beta-catenin primárně reguluje cyklování v průběhu vývoje, zatímco Wnt/PCP reguluje organizaci cytoskeletu (Blavier *et al.*, 2006). Klíčovou úlohu v invazivitě hraje kooperace JNK dráhy a non-kanonické Wnt5a (Pukrop *et al.*, 2006).

## 2.6 Další faktory a signální dráhy angažované v EMT a metastázování

Mezi hlavní signální dráhy angažované při EMT patří kromě TGF $\beta$ /BMP a Wnt taktéž Notch, Hedgehog a NF $\kappa$ B, které budou blíže zmíněny níže. U většiny testovaných

epiteliálních buněčných typů kooperují signální dráhy TGF $\beta$  při vzniku EMT také s onkogenním Ras nebo různými RTK kinázami („receptor tyrosin kinase“; například „epidermal growth factor receptor“). Komplexní interakce zmiňovaných signálních drah v regulaci CSC, nádorové EMT nebo invazivním růstu svědčí o časté reaktivaci latentních vývojových programů v celém procesu karcinogeneze (přehledně zpracováno v Huber *et al.*, 2005).

### 2.6.1 Notch dráha

Notch dráha je klíčová pro udržování simultánního vývoje sousedních buněk. V mnoha tkáních reguluje tato kaskáda diferenciaci, proliferaci a apoptózu. Hlavní části Notch signalizace zahrnují Notch receptor, DSL ligandy (Delta a Serrate/Jagged), CSL DNA-vazebné proteiny (CBF1/RBPJ-kappa). Notch gen pro receptory zahrnuje čtyři varianty, Notch1-4. Pro ligandy existuje genů pět, Jagged1, Jagged2, Delta1, Delta2 and Delta3 (Ohishi *et al.*, 2000). Podobně jako TGF $\beta$  má i Notch pleiotropní účinek a funguje jako tumor-supresivní nebo naopak podporuje nádorové bujení. Aktivita závisí na buněčném kontextu a přítomnosti protoonkogenů (Huber *et al.*, 2005). Pokud je Notch aktivní při udržování stálosti kmenových buněk, má onkogenní funkci, pokud udržuje diferenciaci, má tumor-supresivní účinek (Přehledně zpracováno v Bailey *et al.*, 2007). Notch signalizace podporuje angiogenezi a EMT (Timmerman *et al.*, 2004) a je schopna indukovat invazní fenotyp u epitheliálních prsních buněk a u keratinocytů (Balint *et al.*, 2005). Notch také kooperuje s TGF $\beta$  při zvyšování exprese Hey1 nebo Snail, represorů genů E- a VE- kadherinu. Při rakovině prostaty byl Jagged ligand více exprimován u metastazující tkáně než u benigních hyperplazií a fyziologicky normálních nálezů (Santagata *et al.*, 2004).

### 2.6.2 Hedgehog dráha

Hedgehog dráha udržuje množství kmenových buněk a obecně kontroluje proliferaci, morfologii a diferenciaci (Ingham *et al.*, 2001, Huber *et al.*, 2005). Proteiny této kaskády jsou sekretovány autokrinně i parakrinně. Ligandy hedgehog dráhy Sonic (Shh), Indian (Ihh), Desert (Dhh) inhibují transmembránové proteiny Patched (PTC1 a 2) (Pepinsky *et al.*, 2000). Tím je zrušena negativní regulace SMO (Smoothened) a je umožněna aktivace Gli transkripčních faktorů. Tato signální dráha je doposud ve stádiu



intenzivního výzkumu a například vztah PTC s SMO a následná aktivace Gli proteinů není plně vysvětlena (Přehledně zpracováno v Bailey *et al.*, 2007). Nicméně vysoká aktivita genů z této signální kaskády byla asociována s metastazováním u karcinomu prostaty a prostatické nádorové kmenové buňky po modulaci této dráhy vykazovaly zvýšenou expresi molekuly Snail a represi E-cadherinu. Hedgehog dráha nesporně přispívá k EMT a je také mediátorem angiogeneze (přehledně zpracováno v Huber *et al.*, 2005).

### 2.6.3 NFκB (Nuclear Factor-KappaB)

NFκB dráha je důležitým regulátorem proliferace, apoptózy a hraje kritickou roli v tumorigenezi (Baldwin, 1996). Může být aktivována širokým spektrem faktorů a odpovídá mimo jiné na stres, imunitní a zánětlivou reakci. Rodina transkripčních faktorů NFκB sestává s pěti členů p50, p52, RelA (p65), c-Rel a RelB (Vigo *et al.*, 2002). Všechny obsahují konzervovanou N terminální doménu RHD (rel homology domain), která váže DNA a je zodpovědná také za homo/heterodimerizaci. TAD („transcription activation domain“) doménu obsahují pouze p65, c-Rel a RelB. Proteiny p50 a p52 mohou aktivovat transkripci cílových genů pouze při heterodimerizaci s faktory obsahujícími TAD, přičemž ve formě homodimerů regulují NFκB signalizaci negativně. NFκB proteiny jsou v cytosolárním prostředí inhibovány inhibitory IκB (IκB-alfa, -beta, -gamma, -epsilon, BCL3, p100 and p105). Všechny inhibitory obsahují specifickou sekvenci aminokyselin zvanou ankyrin, kterou se váží na NFκB proteiny. Po aktivaci NFκB, například působením lipopolysacharidů, TNF (tumor necrosis factor) nebo IL-1 (interleukin1) dochází k aktivaci kinázového komplexu IKK, což vede k fosforylaci, ubikvitinaci a degradaci inhibitorů. IKK komplex sestává ze dvou homologických kinázových podjednotek IKK1/IKK2 a regulační podjednotky NEMO („NFκB essential regulator“). Degradace inhibitorů umožňuje přechod NFκB do jádra a aktivaci cílových genů, mezi které patří také represory E-cadherinu Snail a Twist. V té souvislosti je důležité, že NFκB byla popsána jako významný mediátor EMT u modelu karcinomu prsu (Huber *et al.*, 2004). U prostatických buněčných linií je NFκB dráha konstitutivně aktivní u androgen insensitivní PC-3 linie, ale nikoli u androgen sensitivní LNCaP. Alterovaná NFκB dráha byla popsána u refraktorních a metastatických nádorů prostaty a její inhibice může mít velký potenciál pro léčbu androgen insensitivních stádií karcinomu prostaty (Benitez *et al.*, 2009).

#### 2.6.4 ATRA (all trans retinoic acid)

Retinoidy a jejich přirozená i syntetická analoga jsou používána pro léčbu rakoviny více než 30 let (Sporn *et al.*, 1996). Hrají důležitou úlohu v kontrole proliferace, diferenciaci, metabolismu, reprodukce a morfogeneze. Mechanismy účinku zahrnují supresi růstu a podporu diferenciaci maligních buněk, inhibice schopnosti produkovat degradační enzymy nutné pro invazi, blokaci migrace, neovaskularizace a zprostředkování anti-tumorové imunitní odpovědi hostitele (Lotan, 1991). Pleotropní aktivity retinoidů vychází primárně ze schopnosti regulovat genovou expresi prostřednictvím jaderných retinoidních receptorů (RAR). RAR proteiny asociují s retinoidním X receptorem (RXR), vytváří heterodimery vážící se na RARE (RAR response elements) v regulačních oblastech cílových genů (Donato *et al.*, 2007). ATRA („All *trans* Retinoic Acid“) a další retinoidy jsou potencionálně schopné vyvolat regresi neoplastické tkáně k normálnímu fenotypu (Přehledně zpracováno v Huynh *et Brodie et Njar*, 2006). ATRA je například silným faktorem pro indukci diferenciaci při akutní myeloidní leukemii (Orlandi *et al.*, 2003). Bylo prokázáno, že retinoidy jsou efektivními léčivými rakoviny prsu (Donato *et al.*, 2007) a mají také význam při její prevenci (Veronesi *et al.*, 2006). Deficit retinoidů hraje důležitou úlohu i v karcinomu prostaty, kdy úroveň endogenní ATRy je pět až osmkrát nižší u nádorů než v normální fyziologické tkáni (Pasquali *et al.*, 1996). Účinek retinoidů je však limitován jejich rapidním metabolismem *in vivo*. Proto novým přístupem k léčbě tumorů mohou být látky blokující jejich metabolismus (RAMBA, „retinoic acid metabolism blocking agent“), který zvyšuje množství retinoidů v nádorové.

#### 2.7 Asporin a další proteiny kooperující s ECM

Asporin byl identifikován nezávisle třemi skupinami v roce 2001 (Henry *et al.*, Lorenzo *et al.*, Yamada *et al.*). Je novým členem LRR (small leucine rich repeat) rodiny proteoglykanů, kam dále patří decorin a biglycan. Rodina LRR zahrnuje 13 členů, které se dělí na tři subrodiny, založené na organizaci, struktuře a aminokyselinové podobnosti (Nakajima *et al.*, 2007). Hlavní funkcí, která je společná pro většinu LRR proteinů je schopnost vázat kolagen přes svou LRR doménu. Vysoká variabilita N terminální domény umožňuje interakce s ostatními složkami extracelulární matrix, které propojují a stabilizují fibrilární síť. Změny v poměru a množství LRR proteinů se odráží i ve změněném uspořádání kolagenových fibril (Danielson *et al.*, 1997; Chakravarti *et al.*, 1998; Svensson

*et al.*, 1999). Zvláštním znakem asporinu je jeho na aspartát bohatý N-konec, což je i základem jeho jména. Je blízce příbuzný s decorinem, i když neobsahuje serin/glycin dipeptidovou sekvenci nutnou pro skládání orto - glykosaminoglykanů, takže strukturně do proteoglykanů vlastně nepatří. Protein obsahuje 379 aminokyselin, N-glykosylační místo na Asn<sup>281</sup> a potencionální O-glykosylační oblast na Ser<sup>54</sup> (Lorenzo *et al.*, 2001). Lokus asporinu leží na chromozomu č. 9q21.3-q22 (Henry *et al.*, 2001). Expres ASPN v průběhu vývoje myšího embrya byla prokázána v kostře a ostatních pojivových tkáních (šlachy, skléra, pojivové obaly svalů a dermis). Lidské fetální a adultní tkáně vykazovaly nejvyšší expresi asporinu v aortě a děloze. Snížená expres byla u prsních žláz a prostaty (Henry *et al.*, 2001). Yamada a spolupracovníci studovali asporin v peridotálním ligamentu, kde byl abundantně exprimován společně s geny jako periostin, osteonectin, kolagen typu I a III (Yamada *et al.*, 2001). Asporin je abundantně exprimován také v chrupavce s osteoartritidou a jeho expres se zvyšuje s její progresivní degenerací (Nakajima *et al.*, 2007). I když LRR proteoglykany hrají prokazatelnou roli v růstu kostí, kranofaciálním vývoji a vzniku kolagenových fibril, je jejich konkrétní úloha v chrupavce nejasná. Asporin blokuje chondrogenezi v časném i pozdním stádiu a interaguje a inhibuje TGF- $\beta$ , což způsobuje nízký obsah aggrecanu a kolagenu typu II při osteoartritidě (Kizawa *et al.*, 2005). TGF- $\beta$  naopak stimuluje asporinovou expresi, což poukazuje na regulační zpětnovazebnou smyčku (Nakajima *et al.*, 2007).

Asporin byl recentně popsán také v souvislosti s nádorovým onemocněním (Turashvili *et al.*, 2007). Na pracovišti školitele byly mikrodisekovány normální duktální a lobulární buňky i nádorové buňky příslušných invazivních karcinomů prsu. Následně byla v těchto buňkách stanovena genová expres pomocí celogenomových čipů firmy Affymetrix a byla provedena řada srovnání mezi jednotlivými buněčnými populacemi. Vedle dalších zajímavých výsledků se podařilo zjistit významně vyšší expresi asporinu u invazivních lobulárních karcinomů oproti normálním buňkám i duktálním karcinomům. Zvýšená expres asporinu, kolagenů a dalších proteinů extracelulární matrix (viz také geny níže) byla doprovázena změnami signálních drah TGF- $\beta$  a Wnt, které souvisí s fenoménem epitheliálně-mesenchymální transformace. Hledáním v dostupných „fulltextových“ článcích (pomocí Google i studiem relevantní literatury) se nám podařilo zachytit další čtyři práce, kde asporin byl sice mezi řadou dalších genů (identifikovaných pomocí microarrays), ale nebyl autory diskutován ani dále studován (Michl *et al.* 2005, Best *et al.* 2005, Stanbrough *et al.* 2006, Klein *et al.* 2009). Ve dvou studiích byl asporin mezi geny se zvýšenou expresí u androgen independentních karcinomech prostaty (Best *et al.* 2005 a

Stanbrough *et al.* 2006). Ve třetí práci byla exprese asporinu zvýšena proteinem CUTL1, který stimuluje motilitu i invazivitu nádorových buněk (Michl *et al.* 2005) a v poslední práci byl asporin mezi 22 geny specifickými pro metastazování do kostí (Klein *et al.* 2009). Tyto práce jsou v souladu s naší hypotézou o významu asporinu pro invazivní růst nádorových buněk.

### **2.7.1 CUTL1 (CUX1, Cut-like homeobox 1)**

CUTL1 patří do rodiny homeoboxových transkripčních faktorů regulujících buněčný růst a diferenciaci (Nepveu, 2001). Je evolučně konzervován a obsahuje čtyři DNA vazebné domény. Tři z nich jsou známy jako „cut repetice“ a jedna jako „cut homeodoména“ (Harada *et al.*, 1995). CUTL1 nehraje přímou roli v EMT, ale je nutný pro krátkodobé efekty TGF- $\beta$  na buněčnou motilitu, zahrnující obojí dráhy, Smad4 dependentní a p38 MAPKinázovou signalizaci. Geny které spadají pod regulaci CUTL1 byly již dříve identifikovány jako modulátory buněčné invaze na různých buněčných modelů tumorů. Patří sem pleiotropin (PTN) sekretovaný růstový faktor, který podněcuje růst a metastázování v mesenchymálních buňkách. Dále WNT5A člen „wingless“ genové rodiny, který je v asociaci s motilitou a invazivitou metastatického melanomu (Michl *et al.*, 2005). Také snížená  $\alpha 6$  integrinová exprese může vést k redukované adhezivitě na lamininu v ECM a tudíž k redukované invazivitě. Recentní studie prokázaly regulační efekt Src na CUTL 1. Zvýšená akumulace Src po proteazomové inhibici CUTL1 umlčených buněk naznačuje, že aktivita tohoto transkripčního faktoru je asociovaná s degradací Src (Aleksic *et al.*, 2007). Exprese CUTL1 je indukována TGF- $\beta$  a je nutná pro buněčnou motilitu, což z něj dělá potencionálně nový cíl pro blokování invazivity tumorů (Michl *et al.*, 2005).

### **2.7.2 CTHRC1 (collagen triple helix containing 1)**

Další gen nově asociován s karcinogenezí je CTHRC1, který byl popsán u melanomů, rakoviny prsu a dalších solidních nádorů (Tang *et al.*, 2006, Turashvili *et al.* 2007). CTHRC1 se neexprimuje u non invazivních fázích melanomu ale je zvýšen u primárně invazivních melanomů a jeho exprese dále stoupá u metastatických melanomů. CTHRC1 byl zvýšeně exprimován po ovlivnění TGF- $\beta$  a BMP4 (Bone morphogenetic protein 4) a přispíval ke zvýšené migraci fibroblastů a buněk hladkého svalstva (Payagay

*et al.*, 2005). Sekvenční analýza CTHRC1 promotorového regionu ukázala vazebné místo pro Smad, který je součástí signalizačních kaskád TGF- $\beta$  a BMP4. Zmiňované melanomy produkovaly TGF- $\beta$  a BMP4 v souvislosti s hloubkou invadujícího ložiska (Rothhammer *et al.*, 2005).

### **2.7.3 POSTN (periostin)**

Shao *et al.* (2004) popsal periostin jako mesenchymálně specifický gen, který je schopen indukovat nádorovou progresi a angiogenezi u karcinomu prsu. POSTN („osteoblast-specific secreted protein“) ovlivňuje adhezivitu buněk při vývoji kostí a byl popsán také v souvislosti se zvýšenou angiogenezí a progresí u nádorů ovarií, plic a tlustého střeva (Gillan *et al.*, 2002, Bao *et al.* 2004). Na molekulární úrovni je periostin schopen přes  $\alpha\beta 3$  integriny aktivovat Akt/PKB signální dráhu a podporovat tak nádorový růst (Bao *et al.* 2004). Periostin byl v poslední době diskutován jako možný prognostický marker i potenciální terapeutický cíl (Kudo *et al.* 2007).

### **2.7.4 LRRC15 (leucin rich repeat containing 15)**

Dalším LRR proteinem (vedle asporinu), jehož zvýšená hladina byla popsána v invazivních karcinomech prsu, je LRRC15 (alias Lib). Tento protein interagující s extracelulární matrix, může být indukován zánětlivým procesem (Sato *et al.* 2002) a byl popsán při progresi řady nádorů včetně karcinomů prsu a prostaty (Schuetz *et al.* 2006, Stanbrough *et al.* 2006). Recentně byl společně s asporinem identifikován jako specifický gen pro kostní metastázy karcinomu prsu (Klein *et al.* 2009). V souvislosti s genovou terapií nádorů (přesněji, obnovení exprese nádorového supresoru p53 pomocí adenovirového nosiče) byla popsána důležitá interference LRRC15 s vazbou adenovirů na povrch nádorových buněk (O'Prey *et al.* 2008).

### **2.7.5 Versican (CSPG2, chondroitin sulfate proteoglycan 2)**

Versican tvoří jednu z hlavních složek ECM, který jí umožňuje flexibilitu a hydrataci při klíčových událostech embryogeneze i karcinogeneze. Versican interaguje jednak s ECM komponenty jako hyaluronan, kolagen typu I, fibronectin a také například s různými chemokiny, povrchovými proteiny CD44, integrin b1 nebo EGFR (Přehledně

zpracováno v Rahmani *et al.*, 2006). Akumulace anti-adhezivního versicanu byla zaznamenána u řady nádorů včetně pokročilých karcinomů prostaty a prsu (přehledně zpracováno v Ricciardelli *et al.* 2009).

## 3 Metodika

### 3.1 Vybavení laboratoře

- Flow box I (Clean Air, Schoeller)
- Flow box II ( Alexa Vertical SD4, Bioair Instruments)
- Světelný mikroskop (Nikon Elipse TS 1000)
- Inkubátor (Heracell, Heracus)
- „Nanodrop“ (Spectrofotometer ND-1000, Nanodrop)
- Elektroforetický zdroj napětí (MP-300N, Major Science)
- Transiluminátor (G-BOX, Syngene)
- Thermocyklér (Biometra, T-personal)
- Skleněná láhev s uzávěrem (Fischerbrand; objem 100 ml, 400 ml)
- Petriho misky (40 × 11 mm, TPP)
- Pipety (10 ml, 20 ml, 100 ml, 1000 ml, 5000 ml)
- Zkumavky (Gama Group a.s)
- „Eppendorf“ zkumavky (Eppendorf)
- Stripy do thermocykléru (Eppendorf)
- Kultivační lahve (rozsah 25 mm<sup>2</sup>, 75 mm<sup>2</sup>, TPP)
- Vodní lázeň (Julabo, TW 8, Biotech)
- Centrifugy ( MR 221, Jouan; BR4i, Jouan)
- Vortex (PV-1, Grant Instruments)
- Blokovaná lázeň, (P-lab a.s)
- MiniPROTEAN<sup>®</sup>, Biorad
- Elektroforetická skla (tloušťka 0,75 mm)

### 3.2 Softwarové vybavení laboratoře

- Nanodrop software
- GeneSnap from Syngene
- Corel Draw
- Corel Photopaint

### 3.3 Chemikálie

- PBS 10× (160g NaCl, 4g KCl, 64,2g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 4g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> doplnit do 2 litrů destilovanou vodou)
- Trypsin (Sigma)
- DMEM (GIBCO)
- Penicilin/streptomycin (GIBCO)
- Glutamin (GIBCO)
- Stripované medium (RPMI F12, bez fenolové červeně– FBS 2,5 %, Penicilin/streptomycin 10 %) (GIBCO)
- Fetal bovine serum (GIBCO)
- Ethanol
- TGF-β (10 ng/ml; rozpouštědlo PBS, Sigma)
- ATRA (Sigma, USA)
- Trizol<sup>®</sup> (Trizol Reagent, Invitrogen)
- Chloroform (p.a., Lachema)
- Izopropanol (p.a., Lachema)
- Akrylamid 40% (Mono-Bis solution, Serva, Germany)
- TBE pufr 5× (na 1 l: 54g TRIS base; 27,5 kys. boritá, 20 ml 0,5 × EDTA, pH = 8,0)
- Deionizovaná voda (vlastní výroba)
- persíran amonný (0,1g persíranu amonného / 1ml ddH<sub>2</sub>O) (Sigma)
- N,N,N',N' TEMED – (tetrametylendiamin for electrophoresis, Serva, Germany)
- Ethidium Bromid (Amresco)
- Random primery (50-250ng) (Promega)
- dNTP (Promega)
- Voda pro PCR (Sigma)
- Pufr pro reverzní transkripci, MuMLV (Finnzymes)
- RNA Secure (Applied Biosystems)
- RT transkriptáza (Finnzymes)
- PCR pufr (včetně 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>) (Top Bio)
- DNA Polymeráza (Top Bio)
- DNA marker (rozsah 155-970 pb) (Top bio)



### 3.4 Buněčné linie

- DU-145
- MDA-MB-231
- PC-3

Všechny buněčné linie použité v experimentech v rámci mé diplomové práce byly získány z American Tissue Culture Company ( ATCC, USA).

- Hep-2-G
- NIH3T3
- MCF7
- BPH1
- T47D

(RNA vzorky poskytl Mgr. Jan Bouchal Ph.D.)

- LNCaP

(LN-abl, LN-R, LN-Cos, LN-Sfra - RNA vzorky, s laskavým dovolením Prof. Culiga, Rakousko).

- C4-2 (RNA vzorek s laskavým dovolením Doc. Hajdúcha, LEM UP Olomouc).

### 3.5 Rozmrazování buněk

Pokud není s buňkami pracováno přímo, je vhodné je zamrazit. Rozmrazování je nutné provádět rychle a citlivě, jinak dojde k poškození buněk a znehodnocení vzorku.

Postup:

- 1) V dokumentaci vyhledáme kryozkumavku s požadovanou buněčnou linií.
- 2) Kryozkumavku vyzvedneme z prostředí tekutého dusíku, nebo mrazícího boxu s teplotou  $-80^{\circ}\text{C}$ .
- 3) Rychlým krouživým pohybem obsah zkumavky rozmrazíme ve vodní lázni.
- 4) Rozmrazujeme až do malé pelety peckovitého tvaru (teplotní pojistka).
- 5) Buněčnou suspenzi převedeme do 3 ml temperovaného media.
- 6) Kryozkumavku vypláchneme přibližně 1 ml media.
- 7) Buněčnou suspenzi standardně stočíme (1200rpm/5 min/ $25^{\circ}\text{C}$ ).
- 8) Supernatant vylijeme a buňky resuspendujeme v 3 ml čerstvého media.
- 9) Daný objem buněk převedeme do kultivačních lahví.

- 10) Buněčnou linii necháme kultivovat v inkubátoru při 37°C , 5% CO<sub>2</sub>, 99% vlhkost, po dobu nutnou k nárůstu do dostatečné konfluency, nebo do vyčerpání živin a akumulace metabolických zplodin (indikátorem je změna barvy media).

### 3.6 Pasážování buněk

Pasážováním rozumíme výměnu media s vyčerpanými živinami, akumulovanými metabolity a mrtvými buňkami, které by znemožňovalo další růst buněčné populace.

Pasážováním taktéž regulujeme počet narostlých buněk.

Postup:

- 1) Před samotným pasážováním je nutno zkontrolovat kondici, konfluenci a případnou kontaminaci buněk.
- 2) Odsajeme medium z kultivační lahve.
- 3) 3× opakovaně promyjeme 4 ml PBS.
- 4) Po posledním promytí napipetujeme do lahve 500 – 1000 µl trypsinu.
- 5) Kultivační láhev necháme stát 3-5 min v termostatu.
- 6) Po uplynutí dané doby zkontrolujeme, zda jsou buňky sférické a plavou.
- 7) Do kultivační lahve přidáme 3 ml media a odsajeme do připravené zkumavky.
- 8) Láhev propláchneme 3 ml PBS a znovu celý objem odsajeme do stejné zkumavky.
- 9) Suspenzi standardně stočíme (1200rpm/5 min/25°C).
- 10) Slijeme supernatant, pelet resuspendujeme v 1 ml čistého media.
- 11) Do nové lahve přeneseme adekvátní množství buněk, případně určité množství použijeme na experimenty.

### 3.7 Ovlivňování buněk TGF β a ATRA

Postup:

- 1) Buňky testované linie pasážujeme a nasadíme do malých kultivačních Petriho misek (průměr = 4 cm).
- 2) Necháme kultivovat 24 hod při standardních podmínkách:
  - a. kultivační medium = DMEM - FBS 12%, Penicilin/Streptomycin 10%
  - b. Kultivační podmínky: 37°C , 5% CO<sub>2</sub>, 99%
- 3) Po jednom dni kultivace by měla být konfluency v misce přibližně 60%.

- 4) Pokud buňky dosáhly požadované hustoty nárůstu, odsajeme medium, dvakrát promyjeme vytemperovaným PBS, buňky překryjeme čerstvým stripovaným mediem (RPMI – FBS 2,5 %, Penicilin/Streptomycin 10 %) s TGF  $\beta$  (0,1 ng/ml media). Jako kontrolu použijeme stripované medium se stejným přidaným množstvím PBS v případě ovlivnění TGF  $\beta$ . Pro ovlivnění ATRou máme jako kontrolu stejné množství DMSO
- 5) Buňky sbíráme v intervalech 3, 8 a 24 hodin po ovlivnění.
- 6) Stejným způsobem postupujeme u kultivace s ATRA

### **3.8 Sběr buněk pro účely izolace nukleových kyselin**

Postup:

- 1) Z kultivační nádoby, kde rostou buňky v monovrstvě, odsajeme medium a promyjeme opakovaně 1 ml PBS.
- 2) Na monovrstvu buněk napipetujeme určitý objem Trizolu<sup>®</sup> (pro kultivační misku (25 cm je adekvátní množství 400-500  $\mu$ l reagentie).
- 3) Opakovaně odsáváme a spouštíme v proudu na buňky, proces opakujeme 4-6 $\times$ .
- 4) Celý objem zlyzovaných buněk poté odsajeme do ependorf zkumavek a zamrazíme na -80°C.

### **3.9 Izolace celkové RNA (za použití Trizolu<sup>®</sup>)**

Postup:

- 1) Zamražený lyzát buněk dané linie necháme při pokojové teplotě rozmraznout.
- 2) Směs zahřejeme v „heatblocku“ při 60°C 10 min.
- 3) Poté inkubujeme při pokojové teplotě 5 min.
- 4) Přidáme 200  $\mu$ l chloroformu na 1 ml použitého Trizolu<sup>®</sup>.
- 5) Vortexujeme 15 sec a inkubujeme 3 min při pokojové teplotě.
- 6) Centrifugujeme 12000 rpm/15 min/4°C.
- 7) Vodní fázi přeneseme do nové zkumavky.
- 8) S vodní fází opakujeme krok č. 4-7.
- 9) Přidáme 0,5 ml izopropanolu na 1 ml použitého Trizolu<sup>®</sup>.
- 10) Několikrát promícháme převrácením zkumavky.
- 11) Inkubujeme 10 min při pokojové teplotě.

- 12) Centrifugujeme 12000 rpm/10 min/4°C.
- 13) Opatrně odsajeme supernatant a pelet promyjeme 500 µl 75% ethanolu.
- 14) Centrifugujeme 7500 rpm/5 min/4°C.
- 15) Zopakujeme krok č. 13 a 14.
- 16) Odsajeme supernatant a necháme schnout na vzduchu 30 min.
- 17) Téměř suchý pelet resuspendujeme v ddH<sub>2</sub>O a promícháme pipetováním.
- 18) Vzorek necháme stát při pokojové teplotě 10 min a poté inkubujeme při 60°C 10 min.
- 19) Pro kvantifikaci a určení čistoty RNA měříme vzorek spektrofotometricky při 260/280 nm, přístrojem „Nanodrop“.

### 3.10 Reverzní transkripce

Postup:

- 1) Připravíme si do každé zkumavky reakční směs podle Tab.4

**Tab. 4 Reakční směs pro reverzní transkripci**

Reagencie	Objem reagensů na 1 zkumavku / 1 reakci
10 mM random primery (50-250ng)	0,5
10 mM dNTP	1
RNA (0,01-500 ng)	1,5
voda	13,7
<b>celkem</b>	<b>16,7</b>

- 2) Směs zahříváme v termocykléru při 70 °C 5min. Poté chladíme na ledu minimálně jednu minutu.
- 3) Ke vzorkům přidáme další reagenty podle Tab.5

**Tab. 5 Směs pro inhibici RNáz**

Reagencie	Objem reagensů na 1 zkumavku / 1 reakci
10x buffer	2
<b>RNA Secure</b>	<b>0,8</b>

- 4) Vzorky zahříváme při 60°C 10 min. Při této teplotě se projeví inhibiční účinek RNA Secure. Poté chladíme na ledu.
- 5) Pokračujeme přidáním reverzní transkriptázy ke všem vzorkům podle Tab. 6.

**Tab. 6 Poměr reverzní transkriptázy k celkovému objemu reakce**

Reagencie	Objem reagensů na 1 zkumavku / 1 reakci
<i>RT transkriptáza</i>	0,5
<b>celkem</b>	<b>20</b>

- 6) Inkubace 5 min při 25°C, 60 min při 42°C, 10 min při 70°C.
- 7) Vzorky po posledním kroku umístíme do mrazícího boxu a uchováváme při -20°C.

### 3.11 Polymerázová řetězová reakce

Postup:

- 1) Do zkumavek si připravíme PCR směs podle Tab. 7

**Tab. 7 Rozpis reagensů pro PCR**

Reagencie	Objem reagensů na 1 zkumavku / 1 reakci
PCR pufr, včetně 1,5 mM MgCl <sub>2</sub>	2,5
10 mM dNTP	1
50 uM primer sense	<b>0,5</b>
50 uM primer antisense	<b>0,5</b>
<b>Polymeráza</b>	1
DNA (2 µl cDNA)	2
voda	17,5
<b>celkem</b>	<b>25</b>

**Tab. 8 Sekvence primerů pro gen ASPN, CUTL1 a Col1A1**

Primer	Sekvence
ASPN Forward	5' GTT CAG CTT GGG AAC TTT GGA ATG TAA 3'
ASPN Reverse	5' ACT GCA ATA GAT GCT TGT TTC TCT CAA CCC 3'
CUTL1 Forward	5' CCAAGCTGCGGGAGAATTC 3'
CUTL1 Reverse	5' CAGCCTGGCCTTTGAGTTTTT 3'
Col1A1Forward	5' TTTTTCCTTTGCATTCATCTCTCAAA 3'
Col1A1Reverse	5' CATTGTTTCTGTGTCTTCTGGGGAG 3'

Délka ampliconu pro gen ASPN je 243 bp, pro CUTL1 108 bp a pro Col1A1 303 bp.

- 2) V termocykléru poté spustíme teplotní program podle tab.9

**Tab. 9 Teplotní průběh polymerázové řetězové reakce**

Krok	Teplota	Doba trvání (min)	Počet cyklů
Denaturace	96°C	16,4 min	35 cyklů
	95°C	1 min	
Annealing	58°C	1 min	
	72°C	1 min	
Elongace řetězce	72°C	10 min	
	4°C	neurčeno	
Udržovací fáze	4°C	neurčeno	

- 3) Pokud dále nepokračujeme, zamrazíme vzorky při -20°C.

### 3.12 Gelová elektroforéza

Postup:

- 1) Připravíme si zásobní 12,5 % roztok směsi A v poměru 29:1 Mono:Bis akrylamidu podle schématu:

#### Směs A

Akrylamid 29:1 (Mono:Bis) .....15,625 ml  
5 × TBE.....5 ml  
Deionizovaná voda.....29,38 ml

- 2) Pro pracovní roztok akrylamidu (směs B) pokračujeme podle schématu:

#### Směs B

Zásobní roztok .....9,9 ml  
Persíran amonný.....100 µl  
TEMED.....10 µl

- 3) Před přípravou směsi B si sestavíme aparaturu MiniPROTEAN<sup>®</sup>.
- 4) Vytvoříme směs B smícháním jednotlivých složek.
- 5) Zkumavku se směsí B jemně promícháme několikerým převrácením.
- 6) Pomocí pasturovy pipety vlijeme směs mezi dvojici skel v MiniPROTEAN<sup>®</sup> stojanu.
- 7) Neprodleně vložíme hřebínky.
- 8) Čekáme minimálně 25 min do zatuhnutí gelů.
- 9) Ztuhlé gely ve skle poté vložíme do MiniPROTEAN<sup>®</sup> setu.
- 10) Do vnitřní části nalijeme čerstvý TBE pufr (0,5×) a čekáme 10 minut, zda „jádro“ neprotéká.
- 11) Pokud TBE (0,5×) pufr neopouští „jádro“ dolijeme vnější objem nádoby.
- 12) Odstraníme ze skel hřebínky a jamky jemně promyjeme proudem pufru.
- 13) K PCR vzorkům napipetujeme 2,5 µl loading pufru a promícháme.
- 14) Do jamek napipetujeme 5 µl PCR produktu/ jamka.
- 15) Pro snadnější detekci aplikujeme taktéž 2 µl velikostního markeru.

- 16) Přiložíme krytku s elektrodami, druhou část elektrod vložíme do zdroje napětí a zapneme zdroj. V první fázi 75V/30 min, poté 150V/30 min.
- 17) Gel s amplikony barvíme v roztoku Ethidium bromidu (500 mlTBE/50 $\mu$ l Eth.Br) 30 min.
- 18) Výsledek zdokumentujeme pomocí transiluminátoru a softwarového programu „Gene Snap, Syngene“.

### 3.13 Scratch assay

Jednou z nejčastějších orientačních metod pro zjištění migrační rychlosti buněk v 2D rozměru je „scratch assay“. Na plně konfluentní populaci nádorových buněk se vytvoří mezera, kterou migrující buňky zaplní. Scratch assay je orientační metoda, protože je mezera zaplněná migrujícími buňkami neodlišitelná od místa zaplněného proliferujícími buňkami.

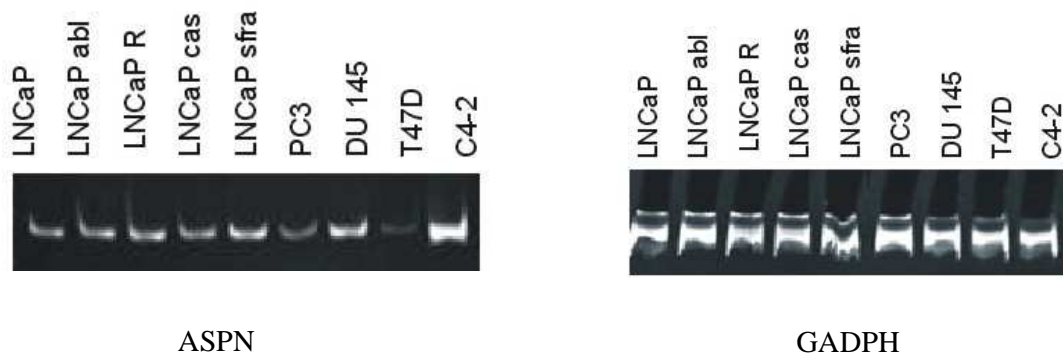
Postup:

- 1) Na Petriho misce necháme narůst buňky do minimálně 60% konfluency ve standardních podmínkách.
- 2) Po jednom až dvou dnech kultivace buňky zkontrolujeme a odsajeme staré medium.
- 3) Opakovaně promyjeme obsah misky temperovaným PBS.
- 4) DMEM medium vyměníme za stripované medium.
- 5) Na povrchu vytvoříme pár tenkých diametrálních mezer špičkou velikosti 20-200  $\mu$ l.
- 6) Pořizujeme fotodokumentaci každé 3, 8 a 24 hodin.

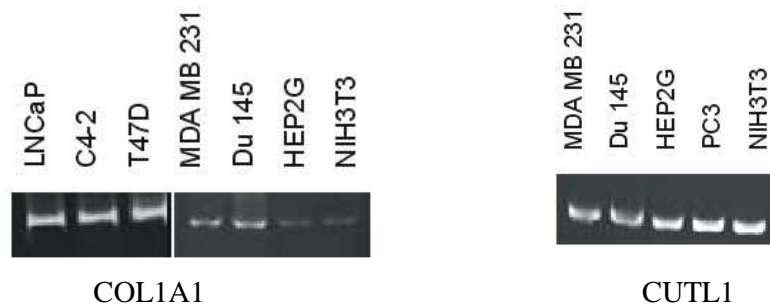
## 4 Výsledky

Nejprve byl proveden screening buněčných linií odvozených od karcinomu prsu a prostaty, zda vůbec exprimují gen pro asporin. Expres asporinu byla sledována jednak u androgen senzitivní prostatické nádorové linie LNCaP a pěti jejích sublinií (LNCaP-abl, -R, -cas, -sfra a C4-2) a dále u dvou androgen insenzitivních linií PC3 a DU145 (Obr.4). Nejvyšší exprese byla nalezena u sublinie C4-2, nicméně pro další experimenty byly použity lépe charakterizované linie DU145 a PC3. Expres asporinu byla také nalezena u dvou linií odvozených od karcinomu prsu, T47D a MDA-MB-231 (Obr.5). Předběžný screening byl proveden také pro další geny alterované při EMT (Obr.6). Expres kolagenu typu 1 i CUTL1 byla nalezena ve všech testovaných liniích

**Obr.4** Srovnání exprese asporinu u buněčných linií karcinomu prsu a prostaty



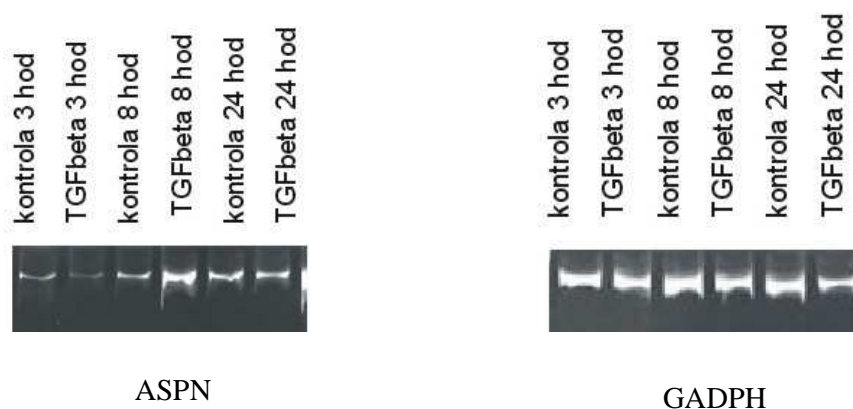
**Obr. 5,6** Srovnání nádorových buněčných linií na expresi kolagenu typu 1 (COL1A1) a CUTL1 (kontrolní gen GAPDH byl exprimován ve všech vzorcích, data nezobrazena)



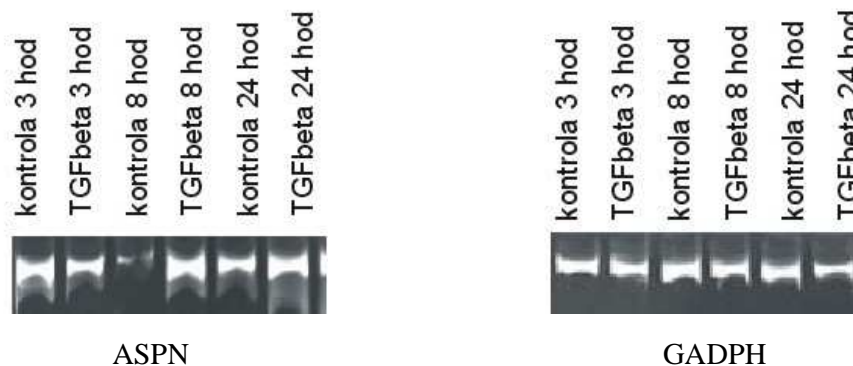


Vybrané linie byly dále ovlivněny TGF $\beta$  a ve vybraných intervalech byla sledována modulace exprese asporinu. U linie DU145 došlo v porovnání s kontrolami a GADPH ke zvýšení exprese asporinu v 8 hodinovém intervalu. 3 h interval vyžaduje senzitivnější metodu detekce. 24 h perioda zůstala beze změny (Obr. 7). Tento experiment byl s obdobnými výsledky opakován pětkrát. Zvýšená exprese asporinu po 3 a 8 hodinovém ovlivnění byla pozorována také u prostatické linie PC3, nicméně tento experiment byl doposud opakován pouze dvakrát. Prsní linie MDA-MB-231 vykazovala nehomogenní expresi asporinu v rámci pěti opakovaných experimentů a způsob modulace po působení TGF $\beta$  není prozatím jasný.

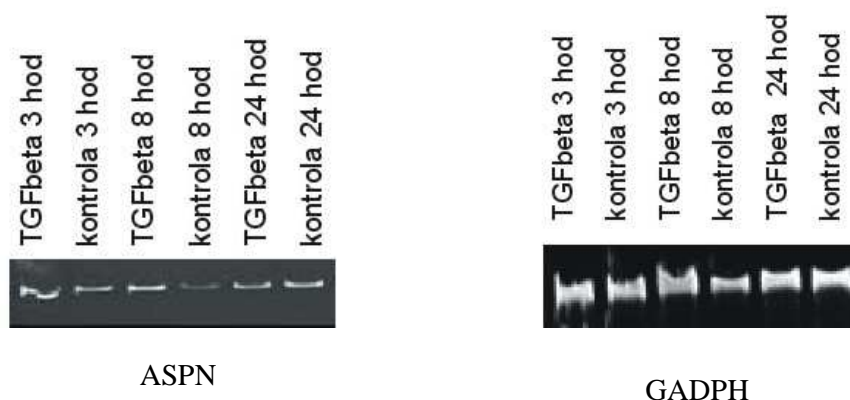
*Obr. 7 Expresní profil asporinu po kultivaci DU-145 buněk s TGF $\beta$*



*Obr. 8 Expresní profil asporinu po kultivaci MDA-MB-231 buněk s TGF  $\beta$  (vzorek pro kontrolu 8 hod pravděpodobně obsahoval inhibitor reverzní transkripce a expresi je nutné analyzovat znovu po přečištění RNA)*

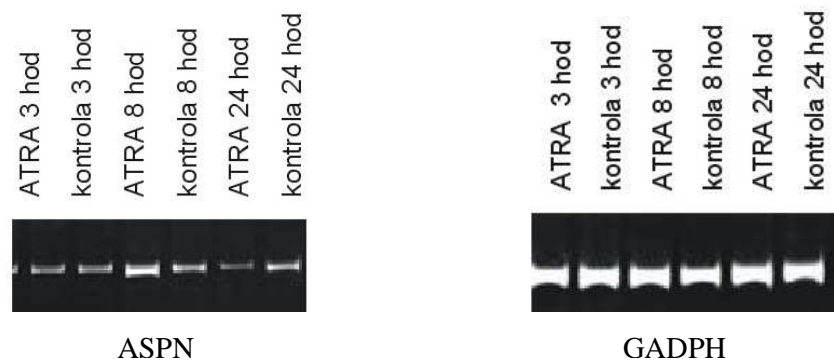


**Obr.9** *Expresní profil asporinu po kultivaci PC-3 buněk s TGFβ*

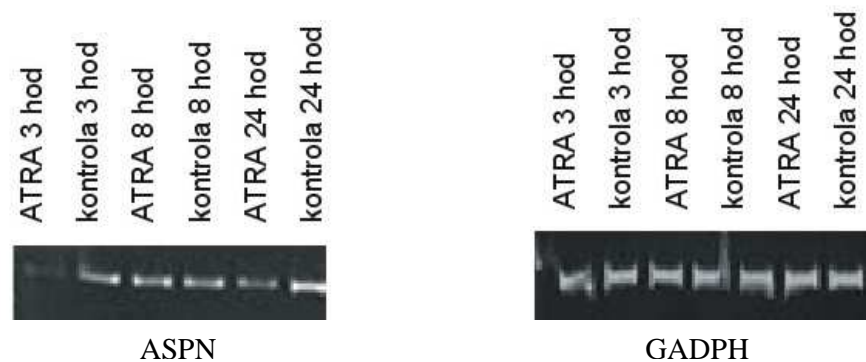


Expresse asporinu byla testována také po působení ATRA. U linií PC3, DU 145 a MDA-MB-231 nebyly pozorovány výrazné změny (Obr.10, 11, 12).

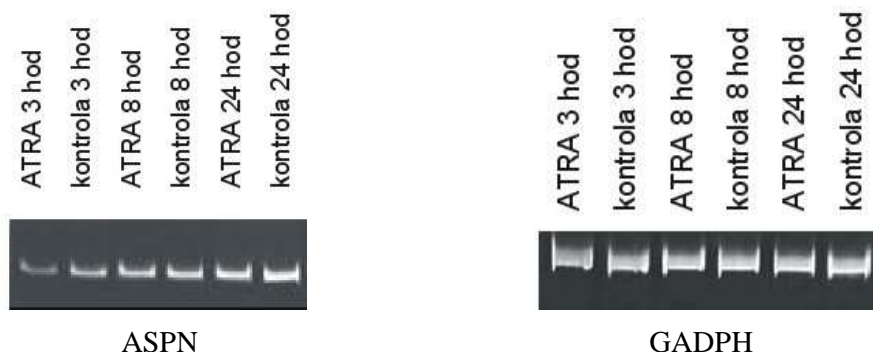
**Obr. 10** *Expresní profil asporinu po kultivaci DU-145 buněk s ATRA*



**Obr. 11** *Expresní profil asporinu po kultivaci MDA-MB-231 buněk s ATRA (vzorek pro kontrolu 3 hod pravděpodobně obsahoval inhibitor reverzní transkripce a expresi je nutné analyzovat znovu po přečištění RNA)*

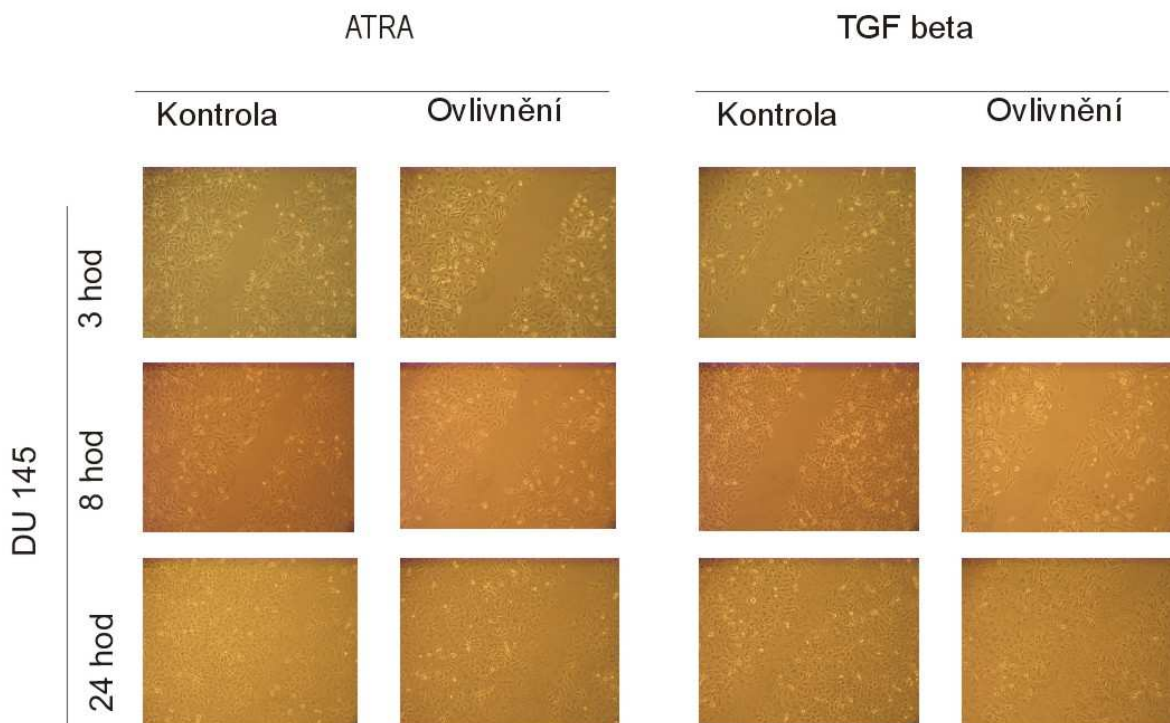


**Obr. 12** *Expresní profil asporinu po kultivaci PC-3 buněk s ATRA*

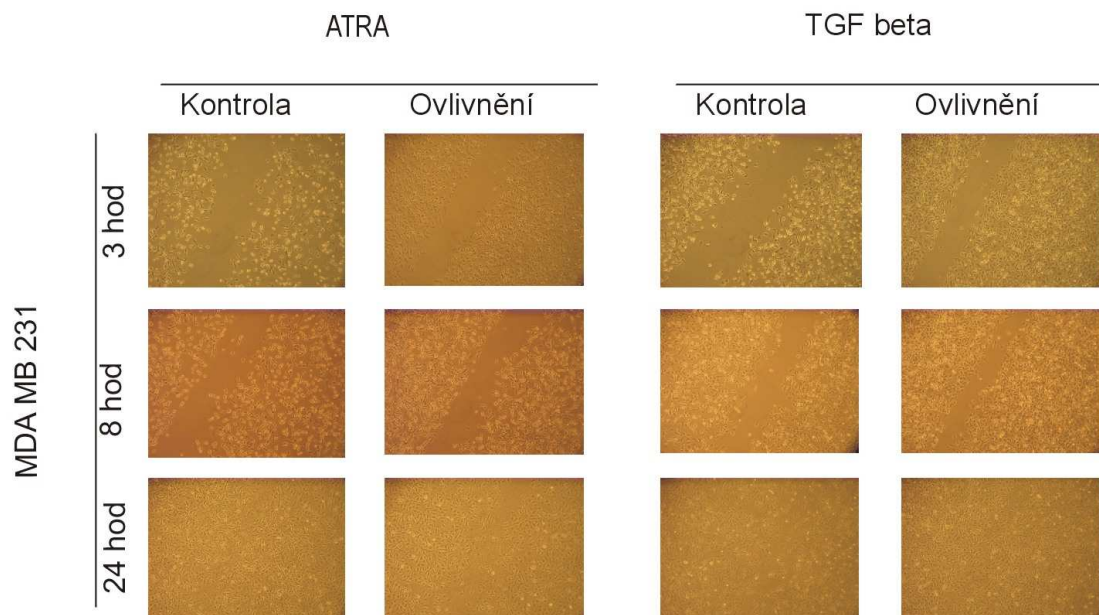


V rámci výše zmiňovaných experimentů byla sledován také předběžně invazivní růst pomocí scratch testu. Prostatická linie PC3 po ovlivnění ATRou vykazovala sníženou migraci po 8 a 24 hod periodě, přičemž TGF $\beta$  neměl téměř žádný efekt. Další prostatická linie DU145 vykazovala v porovnání s kontrolou lehce sníženou migrační aktivitu po obohacení media ATRou a TGF $\beta$  opět něměl na migraci této linie žádný vliv. Prsní linie MDA MB 231 reagovala na ovlivnění nejcitlivěji. ATRA signifikantně inhibovala migrační aktivitu v porovnání s kontrolami u všech měřených intervalů. TGF $\beta$  stimuloval migraci taktěž u všech tří preiod. (Obr.13, 14, 15).

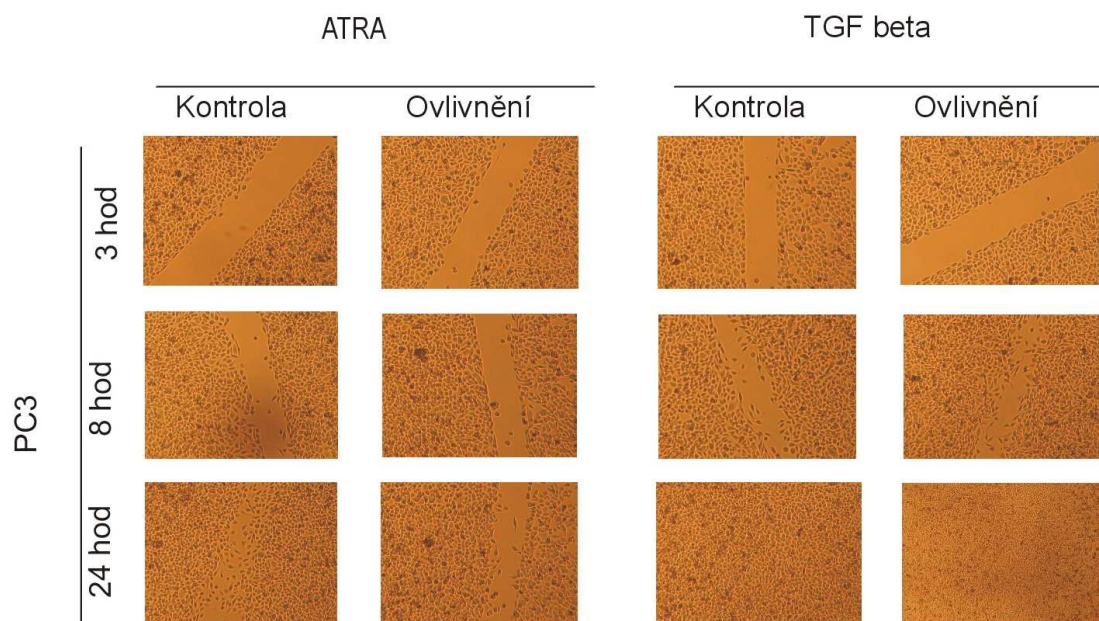
**Obr. 13** *Scratch assay DU145 po ovlivnění TGF $\beta$  a ATRA*



**Obr. 14 Scratch assay MDA MB 231 po ovlivnění TGFβ a ATRA**



**Obr. 15 Scratch assay PC3 po ovlivnění TGFβ a ATRA**



## 5 Diskuze

Diplomová práce byla zaměřena na proteiny extracelulární matrix u in vitro modelu karcinomu prsu a prostaty. Především byl studován asporin, který byl na pracovišti školitele recentně popsán u invazivních nádorů prsu. Asporin (ASPN) patří do LRR nadrodiny, která zahrnuje i příbuzné decorin a biglykan. Bylo prokázáno, že asporin, decorin, biglycan a fibromodulin váží a ovlivňují signalizaci TGF $\beta$ . Decorin inhibuje TGF $\beta$  dvěma pravděpodobnými mechanismy. U makrofágů se decorin váže na TGF $\beta$  receptory a brání jejich obsazení ligandem, v druhém případě inhibuje TGF $\beta$  signalizaci fosforylací Smad2. Studie o osteoartritidě prokázala kolokalizaci asporinu s TGF $\beta$  v extracelulární matrix chrupavky. Nakajima et al. uvádí, že asporin inhibuje vazbu TGF $\beta$  na vlastní receptor, a že TGF $\beta$  stimuluje asporinovou expresi u buněk chrupavky (Nakajima *et al.*, 2007). Naše výsledky naznačují, že exprese asporinu může být ovlivněna TGF $\beta$  také u karcinomu prostaty. U nádorových prostatických linií došlo ke zvýšené expresi v porovnání s kontrolním genem a kontrolami v intervalu po 8 h, a to u obou linií DU-145 a PC3. Prsní buněčná linie MDA-MB-231 nebyla výrazněji ovlivněna cytokinem TGF $\beta$ . Nicméně u této linie byla popsána snížená exprese asporinu po „knock-down“ CUTL1 (viz níže), jehož exprese je zvyšována TGF $\beta$  (Michl *et al.* 2005). V rámci další práce ověříme modulaci exprese CUTL1 pomocí TGF $\beta$ , a případně otestujeme jiné experimentální podmínky (koncentrace cytokinu, množství séra, apod). V rámci výše zmiňovaných experimentů vykazovaly některé kontrolní vzorky cDNA výrazně sníženou expresi a jejich analýza bude zopakována. Jednak bude primární RNA přečištěna od možných inhibitorů RT-PCR reakce (například stopy Trizolu) a exprese bude přesněji kvantifikována pomocí qRT-PCR (kvantifikaci nebylo možno provést dříve z důvodu administrativních průtahů v rámci Interní grantové agentury MZ ČR a odloženému začátku řešení výzkumného grantu školitele). V rámci úvodního screeningu byla nejvyšší hladina asporinu nalezena u sublinie C4-2, kterou plánujeme detailněji studovat v rámci zmiňovaného grantu. Tato androgen independentní linie byla připravena in vivo v myších, kterým byly injikovány androgen dependentní LNCaP buňky společně s fibroblasty odvozenými od osteosarcomu (Thalman *et al.* 1994). Zmiňovaná kokultivace mohla do určité míry simulovat změněné nádorové mikroprostředí, ve kterém může docházet k razantním změnám signálních drah i exprese řady genů ECM. Zvýšená exprese asporinu byla opravdu zjištěna pomocí microarray analýz u androgen independentních nádorů (Best *et al.* 2005, Stanbrough *et al.* 2006). V souvislosti s kokultivací s osteosarkomovými

fibroblasty může být důležitá další recentní microarray analýza nádorů prsu, ve které byl asporin mezi 22 geny specifickými pro metastazování do kostí (Klein *et al.* 2009).

Série prostatických, prsních, hepatocytární a jedné fibroblastické linie byla testována na expresi genů CUTL1 a kolagenu COL1A1. CUTL1 je cílovou molekulou TGF $\beta$  a jako transkripční faktor zasahuje do buněčné diferenciaci, motility a invazivity, přičemž byl asociován s pokročilými nádory prsu (Michl *et al.* 2005). Expresce CUTL1 měla zvyšující se tendenci od nejnižší hladiny u MDA-MB-231 až po PC3 a NIH3T3 s nejvyššími hodnotami. Expresce COL1A1 byla přibližně stejně vysoká jak u prsních (T47D, MDA-MB-231) tak i prostatických linií (LNCaP, C4-2, DU-145). Hepatocytární buňky HEP2G a NIH3T3 kolagen typu I téměř neexprimovaly. Dle našich znalostí nebyla expresce kolagenů buňkami epiteliálních nádorů doposud popsána a tento fenomén velmi pravděpodobně souvisí se změnami během epiteliálně mesenchymální transice.

Druhým zkoumaným faktorem byla ATRA (all trans retinoic acid), která má terapeutický potenciál díky regulaci terminální diferenciaci u epiteliálních buněk exprimující RAR (retinoic acid receptor). RAR a androgenový receptor vykazují korelaci s proliferací a celkovou pokročilostí primárního adenokarcinomu prostaty (Huss *et al.*, 2004). ATRA měla prokazatelný inhibiční účinek na buněčný cyklus modelových prostatických buněk C2N (clonal prostate tumor cells) *in vitro*, kdy snižovala nádorovou proliferaci a zvyšovala apoptózu (Huss *et al.*, 2004). U prsní linie MDA-MB-231 inhibuje ATRA invazivní schopnost buněk, zatímco u SKBR-3 a BT-20 má účinek stimulační. ATRA regulovala invazivitu prostřednictvím stimulace/inhibice MMP (Liu *et al.*, 2005). Vliv ATRy na expresi asporinu v našich experimentech nebyl zatím jednoznačný, přičemž stanovení byla provedena v duplikátech pro DU-145 a MDA-MB-231 a zatím jednou byly analyzovány PC3. Informativnější bude také přesnější kvantifikace oproti kontrolnímu genu pomocí qRT-PCR.

Pro předběžnou analýzu TGF $\beta$  /ATRY na plošnou migraci byla provedena „scratch assay“. V konfluentní kultuře buněk byla špičkou vytvořena podlouhlá rýha, kterou buňky migrovaly až do úplného zaplnění. U prsní linie MDA-MB-231 měla ATRA výrazný inhibiční efekt, zatímco TGF $\beta$  zvyšoval migrační aktivitu. Prostatická linie DU-145 byla ATRou lehce ovlivněna negativně a kultivace v mediu obohaceném TGF $\beta$  nevedla k žádné změně. Na PC3 model měla ATRA inhibiční efekt, kdežto efekt TGF $\beta$  byl neutrální. Otázkou zůstává, zda byl znovustvořený prostor zaplněn migrujícími nebo proliferujícími buňkami, což by měly odlišit další experimenty s přidavkem mitomycinu C, který je inhibitorem právě proliferace.

Práce se v budoucnu bude rozšiřovat o testování funkce asporinu a dalších proteinů extracelulární matrix na úrovni proteinů pomocí western blottingu. Díky grantu bude studována migrační a invazní aktivita buněk (Boydenovy komůrky a Matrigel) po „knock-down“ umlčování siRNA/shRNA nebo „knock-in“ asporinu (vlození pomocí komerčně dostupného expresního vektoru). Bude také provedena další modulace signálních drah TGF $\beta$ , Wnt, Notch, Hedgehog a NF-kappaB. Zkoumání invazivního a metastatického procesu je v *in vitro* podmínkách značně omezeno, protože buňky primárního nádoru i metastázy jsou ve velké míře podporovány a ovlivňovány stromálními buňkami. Stroma nádoru je tvořené fibroblasty, endoteliálními buňkami, residentními makrofágy a dalšími buňkami imunitního systému (Friedl *et* Bröcker, 2000). *In vitro* experimenty jsou proto v rámci grantu doplněny o imunohistochemickou analýzu patientských vzorků karcinomu prsu i prostaty. Ve spolupráci s Dr. Bořivojem Vojtěškem (Masarykův Onkologický Ústav, Brno) se nám již podařilo navrhnout a připravit protilátky proti dvěma epitopům asporinu a tyto králičí polyklonální protilátky byly již otestovány na malém souboru invazivních karcinomů prsu (komerčně dostupná protilátky nebyly zatím pro imunohistochemii použitelné). Tříletý projekt by měl alespoň zčásti objasnit úlohu asporinu i dalších proteinů ECM v nádorovém růstu a také ověřit jejich prognostický a diagnostický význam u karcinomů prsu a prostaty.

## 6 Závěr

Vzhledem k vysoké incidenci patří nádorová onemocnění nepochybně mezi civilizační choroby. Metastazování je hlavní příčinou smrti u onkologických pacientů a hlubší pochopení tohoto procesu je klíčové pro nalezení účinnější léčby. Mechanismus vzniku a progresu sekundárních ložisek je vícekrokový, vyžadující kooperaci mnoha faktorů. Mezi jevy umožňující migrační schopnosti transformovaných buněk patří epiteliálně mesenchymální tranzice, díky níž se buňky z epiteliálního fenotypu mění na mesenchymální a získávají tak větší migrační a invazivní potenciál.

V diplomové práci jsem se zabývala významem genů kooperujících s extracelulární matrix při metastazování. Experimentální část zahrnuje srovnání hladiny exprese genu asporinu, Cut11 a COL1A1 mezi prsními, prostatickými, hepatocytárními a fibroblastoidními modelovými buňkami. Hladiny asporinu byly dále analyzovány po ovlivnění transformačním růstovým faktorem  $\beta$  (TGF  $\beta$ ) a retinovou kyselinou (ATRA). Taktéž byla sledována migrační aktivita buněk pomocí „scratch assay“.

V současné době jsou zatím provedené testy pouze orientační, nicméně poskytují dobrý základ pro další rozpracování v navazujícím výzkumném projektu. Naše výsledky poukazují na zvýšení exprese asporinu po ovlivnění TGF  $\beta$  a zvýšenou migraci u buněk kultivovaných v TGF  $\beta$  obohaceném mediu. Vliv ATRy na expresi asporinu byl nejednoznačný, nicméně v migračních testech ATRA prokázala jasný inhibiční účinek. V rámci navazujícího projektu bude důležité spojení in vitro mechanistických experimentů s analýzou archivních vzorků od pacientů s karcinomy prsu a prostaty.



## 7 Seznam zkratek

ABC –ATP-binding cassette transporters; ATP vázající transportéry  
APC - Adenomatous Polyposis Coli protein; adenomový polypózní protein  
ARCaP - Androgen-refractory human prostate cancer cell model; androgenově refraktorní model lidského karcinomu prostaty  
ASC – adult stem cell; adultní kmenové buňky  
ASPN - asporin  
ATRA - all trans retinoic acid; retinová kyselina  
BMP – bone morphogenetic protein; kostní morfogenetický protein  
CAT – collective ameboid transition; kolektivní ameboidní transice  
CD – cluster of differentiation; diferenciační marker  
CK1 alfa - Casein Kinase-1-alpha; kaseinová kináza alfa  
CSC – cancer stem cell; nádorové kmenové buňky  
CSPG2 - chondroitin sulfate proteoglycan 2, versican  
CTHRC1 - collagen triple helix containing 1  
CUTL1 – CUX1, Cut-like homeobox 1  
Dhh - desert  
DMEM – Dulbeco´s modified Eagle´s medium; Dulbecovo modifikované Eaglovo medium  
dNTP – deoxy ribonucleotide triphosphate; deoxyribo nukleotid trifosfát  
Dsh – DVL1, dishevelled 1  
ECC – embryonic carcinoma cell; embryonální karcinomové buňky  
ECM – extra-cellular matrix; extracelulární matrix  
EDTA – ethylene diamin tetra-acetic acid; etylen diamin tetra octová kyselina  
EGC – embryonic germ cell; embryonální zárodečné buňky  
EGF – epidermal growth factor; epidermální růstový faktor  
EMT – epithelial mesenchymal transition; epiteliálně mesenchymální transice  
ER - estrogen  
ERBB2 - v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2; erb-b2 erytroblastoidní leukemický homolog virálního onkogenu  
ESC – embryonic stem cell; embryonální kmenové buňky  
FBS – fetal bovine serum; fetální hovězí sérum  
FGF – fibroblast growth factor; fibroblastický růstový faktor

Fz – frizzled  
GDF – growth differentiation factor; růstový diferenciační faktor  
GS – glycin-serin  
HGF – hepatocyte growth factor; hepatocytární růstový faktor  
IGF – insuline growth factor; insulínu podobný růstový faktor  
ILK – integrin linked kinase; s integrinem spojená kináza  
KLK4 – kalikrein 4  
LEF – lymphoid enhancing factor; faktor podporující lymfocyty  
MAPK – mitogen activated protein kinase; mitogenně aktivovaná proteinová kináza  
MAT – mesenchymal ameboid transition; mesenchymálně epiteliální transice  
MDR – multidrug resistance; vícečetná léková rezistence  
MeRT – mesenchymal epithelial reverting transition; mesenchymálně epiteliální reverzní transice  
miRNA – micro RNA  
MMP – matrix metaloproteinase; matrix metaloproteináza  
NGF – nerve growth factor; neuronální růstový faktor  
NOD/SCID - non-obese diabetic scid Spontaneous Mutant Model;  
P/S – penicilin/streptomycin  
PBS -Phosphate buffered saline; fosfátový pufr obsahující sůl  
PCP – planar cell polarity; plošná buněčná polarita  
PCR – polymerase chain reaction; polymerázová řetězoá reakce  
PDGF – platelled derived growth factor; růstový faktor derivovaný z trombocytů  
PI3K -Phosphoinositide-3 kinase; fosfo inositid-3- kináza  
POSTN - periostin  
PR - progesteron  
PSA – prostatic specific antigen; prostaticky specifický antigen  
PTCH1 - Patched homolog 1  
ROCK - Rho kinase  
sFRP1 - secreted Fz-related protein 1; protein příbuzný k Fz, sekretovaná forma  
Shh – sonic hedgehog  
SMO - Smoothened  
TAD – transcription activation domain; transkripčně aktivační doména  
TBE – TRIS, boric acid, EDTA; TRIS, boritá kyselina, EDTA  
TCF – T-cell factor; faktor odvozený od T lymfocytů

TCF1 – Transcription factor 1; transkripční faktor 1

TGF $\beta$  - transforming grow factor  $\beta$ ; transformační růstový faktor  $\beta$

uPA – urokinase plasminogen activator; urokinázový plasminogenní inhibitor

WDFC1 – WAP four-disulfide core domain 1

Wnt – wingless a int

## 8 Literatura

1. **Acs G, Lawton TJ, Rebbeck TR, LiVolsi VA, Zhang PJ:** Differential expression of E-cadherin in lobular and ductal neoplasms of the breast and its biologic and diagnostic implications. *Am J Clin Pathol* 2001, 115: 85-98.
2. **Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF:** Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003, 100: 3983-8.
3. **Anakwe K, Robson L, Hadley J, Buxton P, Church V, Allen S et al.:** Wnt signalling regulates myogenic differentiation in the developing avian wing. *Development* 2003, 130: 3503-14.
4. **Annes JP, Munger JS, Rifkin DB: Making sense of latent TGFbeta activation.** *J Cell Sci* 2003, 116: 217-24.
5. **Azuma H, Ehata S, Miyazaki H, Watabe T, Maruyama O, Imamura T et al.:** Effect of Smad7 expression on metastasis of mouse mammary carcinoma JygMC(A) cells. *J Natl Cancer Inst* 2005, 97: 1734-46.
6. **Bailey JM, Singh PK, Hollingsworth MA:** Cancer metastasis facilitated by developmental pathways: Sonic hedgehog, Notch, and bone morphogenic proteins. *J Cell Biochem* 2007, 102: 829-39.
7. **Baldwin AS Jr:** The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol* 1996, 14: 649-83.
8. **Balint K, Xiao M, Pinnix CC, Soma A, Veres I, Juhasz I et al.:** Activation of Notch1 signaling is required for beta-catenin-mediated human primary melanoma progression. *J Clin Invest* 2005, 115: 3166-76.
9. **Benitez DA, Hermoso MA, Pozo-Guisado E, Fernandez-Salguero PM, Castellon EA:** Regulation of cell survival by resveratrol involves inhibition of NFkappaB-regulated gene expression in prostate cancer cells. *Prostate* 2009.
10. **Best CJ, Gillespie JW, Yi Y, Chandramouli GV, Perlmutter MA, Gathright Y et al.:** Molecular alterations in primary prostate cancer after androgen ablation therapy. *Clin Cancer Res* 2005, 11: 6823-34.
11. **Blavier L, Lazaryev A, Dorey F, Shackelford GM, DeClerck YA:** Matrix metalloproteinases play an active role in Wnt1-induced mammary tumorigenesis. *Cancer Res* 2006, 66: 2691-9.
12. **Blick T, Widodo E, Hugo H, Waltham M, Lenburg ME, Neve RM et al.:** Epithelial mesenchymal transition traits in human breast cancer cell lines. *Clin Exp Metastasis* 2008, 25: 629-42.
13. **Bukholm IK, Nesland JM, Borresen-Dale AL:** Re-expression of E-cadherin, alpha-catenin and beta-catenin, but not of gamma-catenin, in metastatic tissue from breast cancer patients [seecomments] *J Pathol* 2000, 190: 15-9.
14. **Clement JH, Raida M, Sanger J, Bicknell R, Liu J, Naumann A et al.:** Bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) induces in vitro invasion and in vivo hormone independent growth of breast carcinoma cells. *Int J Oncol* 2005, 27: 401-7.
15. **Clevers H:** Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell* 2006, 127:

469-80.

16. **Crocker AK, Allan AL:** Cancer stem cells: implications for the progression and treatment of metastatic disease. *J Cell Mol Med* 2008, 12: 374-90.
17. **Damber JE, Aus G:** Prostate cancer. *Lancet* 2008, 371: 1710-21.
18. **Danielson KG, Baribault H, Holmes DF, Graham H, Kadler KE, Iozzo RV:** Targeted disruption of decorin leads to abnormal collagen fibril morphology and skin fragility. *J Cell Biol* 1997, 136: 729-43.
19. **Deckers M, van Dinther M, Buijs J, Que I, Lowik C, van der Pluijm G et al.:** The tumor suppressor Smad4 is required for transforming growth factor beta-induced epithelial to mesenchymal transition and bone metastasis of breast cancer cells. *Cancer Res* 2006, 66: 2202-9.
20. **Djakiew D:** Dysregulated expression of growth factors and their receptors in the development of prostate cancer. *Prostate* 2000, 42: 150-60.
21. **Dontu G, Al-Hajj M, Abdallah WM, Clarke MF, Wicha MS:** Stem cells in normal breast development and breast cancer. *Cell Prolif* 2003, 36 Suppl 1: 59-72.
22. **Douville J, Beaulieu R, Balicki D:** ALDH1 as a Functional Marker of Cancer Stem and Progenitor Cells. *Stem Cells Dev* 2008.
23. **Eger A, Stockinger A, Park J, Langkopf E, Mikula M, Gotzmann J et al.:** beta-Catenin and TGFbeta signalling cooperate to maintain a mesenchymal phenotype after FosER-induced epithelial to mesenchymal transition. *Oncogene* 2004, 23: 2672-2680.
24. **Fidler IJ:** Understanding bone metastases: the key to the effective treatment of prostate cancer. *Clin Adv Hematol Oncol* 2003, 1: 278-9.
25. **Friedl P, Brocker EB:** The biology of cell locomotion within three-dimensional extracellular matrix. *Cell Mol Life Sci* 2000, 57: 41-64.
26. **Friedl P, Wolf K:** Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. *Nat Rev Cancer* 2003, 3: 362-74.
27. **Hanahan D, Weinberg RA:** The hallmarks of cancer. *Cell* 2000, 100: 57-70.
28. **Harada R, Berube G, Tamplin OJ, Denis-Larose C, Nepveu A:** DNA-binding specificity of the cut repeats from the human cut-like protein. *Mol Cell Biol* 1995, 15: 129-40.
29. **Hegerfeldt Y, Tusch M, Brocker EB, Friedl P:** Collective cell movement in primary melanoma explants: plasticity of cell-cell interaction, beta1-integrin function, and migration strategies. *Cancer Res* 2002, 62: 2125-30.
30. **Hegerfeldt Y, Tusch M, Brocker EB, Friedl P:** Collective cell movement in primary melanoma explants: plasticity of cell-cell interaction, beta1-integrin function, and migration strategies. *Cancer Res* 2002, 62: 2125-30.
31. **Heissmeyer V, Krappmann D, Hatada EN, Scheidereit C:** Shared pathways of IkappaB kinase-induced SCF(betaTrCP)-mediated ubiquitination and degradation for the NF-kappaB precursor p105 and IkappaBalpha. *Mol Cell Biol* 2001, 21: 1024-35.
32. **Hogan BL:** Bone morphogenetic proteins in development. *Curr Opin Genet Dev* 1996, 6: 432-8.

33. **Hombach-Klonisch S, Panigrahi S, Rashedi I, Seifert A, Alberti E, Pocar P et al.:** Adult stem cells and their trans-differentiation potential--perspectives and therapeutic applications. *J Mol Med* 2008, 86: 1301-14.
34. **Huber MA, Beug H, Wirth T:** Epithelial-mesenchymal transition: NF-kappaB takes center stage. *Cell Cycle* 2004, 3: 1477-80.
35. **Huber MA, Kraut N, Beug H:** Molecular requirements for epithelial-mesenchymal transition during tumor progression. *Curr Opin Cell Biol* 2005, 17: 548-58.
36. **Hugo H, Ackland ML, Blick T, Lawrence MG, Clements JA, Williams ED et al.:** Epithelial--mesenchymal and mesenchymal--epithelial transitions in carcinoma progression. *J Cell Physiol* 2007, 213: 374-83.
37. **Huss WJ, Lai L, Barrios RJ, Hirschi KK, Greenberg NM.:** Retinoic acid slows progression and promotes apoptosis of spontaneous prostate cancer. *Prostate*. 2004 Oct 1;61(2):142-52
38. **Huynh CK, Brodie AM, Njar VC:** Inhibitory effects of retinoic acid metabolism blocking agents (RAMBAs) on the growth of human prostate cancer cells and LNCaP prostate tumour xenografts in SCID mice. *Br J Cancer* 2006, 94: 513-23.
39. **Chakravarti S, Magnuson T, Lass JH, Jepsen KJ, LaMantia C, Carroll H:** **Lumican regulates collagen fibril assembly:** skin fragility and corneal opacity in the absence of lumican. *J Cell Biol* 1998, 141: 1277-86.
40. **Choi SC, Han JK:** Xenopus Cdc42 regulates convergent extension movements during gastrulation through Wnt/Ca2+ signaling pathway. *Dev Biol* 2002, 244: 342-57.
41. **Ingber DE.:** Can cancer be reversed Can cancer be reversed by engineering the tumor microenvironment? *Semin Cancer Biol*. 2008 Oct;18(5):356-64. Epub 2008 Apr 1
42. **Ingham PW, McMahon AP:** Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles. *Genes Dev* 2001, 15: 3059-87.
43. **Katanaev VL, Ponzelli R, Semeriva M, Tomlinson A:** Trimeric G protein-dependent frizzled signaling in Drosophila. *Cell* 2005, 120: 111-22.
44. **Katoh M, Katoh M:** Cross-talk of WNT and FGF signaling pathways at GSK3beta to regulate beta-catenin and SNAIL signaling cascades. *Cancer Biol Ther* 2006, 5: 1059-64.
45. **Kawano Y, Diez S, Uysal-Onganer P, Darrington RS, Waxman J, Kypta RM:** Secreted Frizzled-related protein-1 is a negative regulator of androgen receptor activity in prostate cancer. *Br J Cancer* 2009, 100: 1165-74.
46. **Klein A, Olendrowitz C, Schmutzler R, Hampl J, Schlag PM, Maass N et al.:** Identification of brain- and bone-specific breast cancer metastasis genes. *Cancer Lett* 2009, 276: 212-20.
47. **Kohn AD, Moon RT:** Wnt and calcium signaling: beta-catenin-independent pathways. *Cell Calcium* 2005, 38: 439-46.
48. **Kraus AC, Ferber I, Bachmann SO, Specht H, Wimmel A, Gross MW et al.:** In vitro chemo- and radio-resistance in small cell lung cancer correlates with cell adhesion and constitutive activation of AKT and MAP kinase pathways. *Oncogene* 2002, 21: 8683-95.

49. **Kraus AC, Ferber I, Bachmann SO, Specht H, Wimmel A, Gross MW et al.:** In vitro chemo- and radio-resistance in small cell lung cancer correlates with cell adhesion and constitutive activation of AKT and MAP kinase pathways. *Oncogene* 2002, 21: 8683-95.
50. **Lang SH, Frame FM, Collins AT:** Prostate cancer stem cells. *J Pathol* 2009, 217: 299-306.
51. **Lee JM, Dedhar S, Kalluri R, Thompson EW:** The epithelial-mesenchymal transition: new insights in signaling, development, and disease. *J Cell Biol* 2006, 172: 973-81.
52. **Leivonen SK, Kahari VM:** Transforming growth factor-beta signaling in cancer invasion and metastasis. *Int J Cancer* 2007, 121: 2119-24.
53. **Li C, Heidt DG, Dalerba P, Burant CF, Zhang L, Adsay V et al.:** Identification of pancreatic cancer stem cells. *Cancer Res* 2007, 67: 1030-7.
54. **Lotan R:** Retinoids as modulators of tumor cells invasion and metastasis. *Semin Cancer Biol* 1991, 2: 197-208.
55. **Maitland NJ, Collins AT:** Prostate cancer stem cells: a new target for therapy. *J Clin Oncol* 2008, 26: 2862-70.
56. **Marotta LL, Polyak K:** Cancer stem cells: a model in the making. *Curr Opin Genet Dev* 2009, 19: 44-50.
57. **Massague J, Blain SW, Lo RS:** TGFbeta signaling in growth control, cancer, and heritable disorders. *Cell* 2000, 103: 295-309.
58. **Massague J:** TGFbeta in Cancer. *Cell* 2008, 134: 215-30.
59. **Masuda H, Urushibara M, Kihara K:** Successful treatment of dermatomyositis associated with adenocarcinoma of the prostate after radical prostatectomy. *J Urol* 2003, 169: 1084.
60. **Matsui W, Huff CA, Wang Q, Malehorn MT, Barber J, Tanhehco Y et al.:** Characterization of clonogenic multiple myeloma cells. *Blood* 2004, 103: 2332-6.
61. **Mizrak D, Brittan M, Alison MR:** CD133: molecule of the moment. *J Pathol* 2008, 214: 3-9.
62. **Novotná b., Mareš J:** Vývojová biologie pro mediky, Karolinum, 1. vyd, 2005.
63. **O'Brien CA, Pollett A, Gallinger S, Dick JE:** A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature* 2007, 445: 106-10.
64. **Ohishi K, Varnum-Finney B, Flowers D, Anasetti C, Myerson D, Bernstein ID:** Monocytes express high amounts of Notch and undergo cytokine specific apoptosis following interaction with the Notch ligand, Delta-1. *Blood* 2000, 95: 2847-54.
65. **Orlandi M, Mantovani B, Ammar K, Avitabile E, Dal Monte P, Bartolini G:** Retinoids and cancer: antitumoral effects of ATRA, 9-cis RA and the new retinoid IIF on the HL-60 leukemic cell line. *Med Princ Pract* 2003, 12: 164-9.
66. **Park BJ, Park JI, Byun DS, Park JH, Chi SG:** Mitogenic conversion of transforming growth factor-beta1 effect by oncogenic Ha-Ras-induced activation of the mitogen-activated protein kinase signaling pathway in human prostate cancer. *Cancer Res* 2000, 60: 3031-8.
67. **Pasquali D, Thaller C, Eichele G:** Abnormal level of retinoic acid in prostate

- cancer tissues. *J Clin Endocrinol Metab* 1996, 81: 2186-91.
68. **Pepinsky RB, Rayhorn P, Day ES, Dergay A, Williams KP, Galdes A et al.:** Mapping sonic hedgehog-receptor interactions by steric interference. *J Biol Chem* 2000, 275: 10995-1001.
  69. **Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA et al.:** Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 2000, 406: 747-52.
  70. **Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA et al.:** Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 2000, 406: 747-52.
  71. **Ponti D, Costa A, Zaffaroni N, Pratesi G, Petrangolini G, Coradini D et al.:** Isolation and in vitro propagation of tumorigenic breast cancer cells with stem/progenitor cell properties. *Cancer Res* 2005, 65: 5506-11.
  72. **Pygagay P, Heroult M, Wang Q, Lehnert W, Belden J, Liaw L et al.:** Collagen triple helix repeat containing 1, a novel secreted protein in injured and diseased arteries, inhibits collagen expression and promotes cell migration. *Circ Res* 2005, 96: 261-8.
  73. **Qureshi HY, Ricci G, Zafarullah M:** Smad signaling pathway is a pivotal component of tissue inhibitor of metalloproteinases-3 regulation by transforming growth factor beta in human chondrocytes. *Biochim Biophys Acta* 2008, 1783: 1605-12.
  74. **Reddi AH:** BMPs: from bone morphogenetic proteins to body morphogenetic proteins. *Cytokine Growth Factor Rev* 2005, 16: 249-50.
  75. **Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL:** Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 2001, 414: 105-11.
  76. **Rothhammer T, Poser I, Soncin F, Bataille F, Moser M, Bosserhoff AK:** Bone morphogenic proteins are overexpressed in malignant melanoma and promote cell invasion and migration. *Cancer Res* 2005, 65: 448-56.
  77. **Sahai E, Marshall CJ:** Differing modes of tumour cell invasion have distinct requirements for Rho/ROCK signalling and extracellular proteolysis. *Nat Cell Biol* 2003, 5: 711-9.
  78. **Santagata S, Demichelis F, Riva A, Varambally S, Hofer MD, Kutok JL et al.:** JAGGED1 expression is associated with prostate cancer metastasis and recurrence. *Cancer Res* 2004, 64: 6854-7.
  79. **Sarrio D, Rodriguez-Pinilla SM, Hardisson D, Cano A, Moreno-Bueno G, Palacios J:** Epithelial-mesenchymal transition in breast cancer relates to the basal-like phenotype. *Cancer Res* 2008, 68: 989-97.
  80. **Satoh K, Hata M, Yokota H:** High lib mRNA expression in breast carcinomas. *DNA Res* 2004, 11: 199-203.
  81. **Shao R, Bao S, Bai X, Blanchette C, Anderson RM, Dang T et al.:** Acquired expression of periostin by human breast cancers promotes tumor angiogenesis through up-regulation of vascular endothelial growth factor receptor 2 expression. *Mol Cell Biol* 2004, 24: 3992-4003.
  82. **Shi Y, Massague J:** Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* 2003, 113: 685-700.
  83. **Shook D, Keller R:** Mechanisms, mechanics and function of epithelial-



- mesenchymal transitions in early development. *Mech Dev* 2003, 120: 1351-83.
84. **Schuetz CS, Bonin M, Clare SE, Nieselt K, Sotlar K, Walter M et al.:** Progression-specific genes identified by expression profiling of matched ductal carcinomas in situ and invasive breast tumors, combining laser capture microdissection and oligonucleotide microarray analysis. *Cancer Res* 2006, 66: 5278-86.
  85. **Schultz WA:** Molecular Biology of Human Cancers, pp 193-217, Springer 2005, Dordrecht, Germany
  86. **Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, Bonn VE, Hawkins C, Squire J et al.:** Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res* 2003, 63: 5821-8.
  87. **Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H et al.:** Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001, 98: 10869-74.
  88. **Stanbrough M, Bubley GJ, Ross K, Golub TR, Rubin MA, Penning TM et al.:** Increased expression of genes converting adrenal androgens to testosterone in androgen-independent prostate cancer. *Cancer Res* 2006, 66: 2815-25.
  89. **Suling Liu, Gabriela Dontu and Max S Wicha:** Mammary stem cells, self-renewal pathways, and carcinogenesis *Breast Cancer Res.* 2005;7(3):86-95.
  90. **Svensson L, Aszodi A, Reinholt FP, Fassler R, Heinegard D, Oldberg A:** Fibromodulin-null mice have abnormal collagen fibrils, tissue organization, and altered lumican deposition in tendon. *J Biol Chem* 1999, 274: 9636-47.
  91. **Tang L, Dai DL, Su M, Martinka M, Li G, Zhou Y:** Aberrant expression of collagen triple helix repeat containing 1 in human solid cancers. *Clin Cancer Res* 2006, 12: 3716-22.
  92. **Thalmann GN, Anezinis PE, Chang SM, Zhou HE, Kim EE, Hopwood VL, Pathak S, von Eschenbach AC, Chung LW:** Androgen-independent cancer progression and bone metastasis in the LNCaP model of human prostate cancer *Cancer Res.* 1994 15;54(10):2577-81
  93. **Thiery JP, Sleeman JP:** Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006, 7: 131-42.
  94. **Thiery JP:** Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer* 2002, 2: 442-54.
  95. **Timmerman LA, Grego-Bessa J, Raya A, Bertran E, Perez-Pomares JM, Diez J et al.:** Notch promotes epithelial-mesenchymal transition during cardiac development and oncogenic transformation. *Genes Dev* 2004, 18: 99-115.
  96. **Turashvili G, Bouchal J, Baumforth K, Wei W, Dziechciarkova M, Ehrmann J et al.:** Novel markers for differentiation of lobular and ductal invasive breast carcinomas by laser microdissection and microarray analysis. *BMC Cancer* 2007, 7: 55.
  97. **Turashvili G, Bouchal J, Burkadze G, Kolar Z:** Wnt signaling pathway in mammary gland development and carcinogenesis. *Pathobiology* 2006, 73: 213-23.
  98. **Veeman MT, Slusarski DC, Kaykas A, Louie SH, Moon RT:** Zebrafish prickle, a modulator of noncanonical Wnt/Fz signaling, regulates gastrulation movements. *Curr Biol* 2003, 13: 680-5.

99. **Watanabe O, Imamura H, Shimizu T, Kinoshita J, Okabe T, Hirano A et al.:** Expression of twist and wnt in human breast cancer. *Anticancer Res* 2004, 24: 3851-6.
100. **Wells A, Yates C, Shepard CR:** E-cadherin as an indicator of mesenchymal to epithelial reverting transitions during the metastatic seeding of disseminated carcinomas. *Clin Exp Metastasis* 2008, 25: 621-8.
101. **Welm AL:** TGFbeta primes breast tumor cells for metastasis. *Cell* 2008, 133: 27-8.
102. **Wicha MS, Liu S, Dontu G:** Cancer stem cells: an old idea--a paradigm shift. *Cancer Res* 2006, 66: 1883-90-discussion1895-6.
103. **Wolf K, Mazo I, Leung H, Engelke K, von Andrian UH, Deryugina EI et al.:** Compensation mechanism in tumor cell migration: mesenchymal-amoeboid transition after blocking of pericellular proteolysis. *J Cell Biol* 2003, 160: 267-77.
104. **Yamashita H, ten Dijke P, Huylebroeck D, Sampath TK, Andries M, Smith JC et al.:** Osteogenic protein-1 binds to activin type II receptors and induces certain activin-like effects. *J Cell Biol* 1995, 130: 217-26.
105. **Yilmaz M, Christofori G:** EMT, the cytoskeleton, and cancer cell invasion. *Cancer Metastasis Rev* 2009, 28: 15-33.
106. **Zhang S, Balch C, Chan MW, Lai HC, Matei D, Schilder JM et al.:** Identification and characterization of ovarian cancer-initiating cells from primary human tumors. *Cancer Res* 2008, 68: 4311-20.